

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu



DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESCOLHA E PREFERÊNCIA EM PEIXES:
UMA ABORDAGEM PARA O BEM-ESTAR

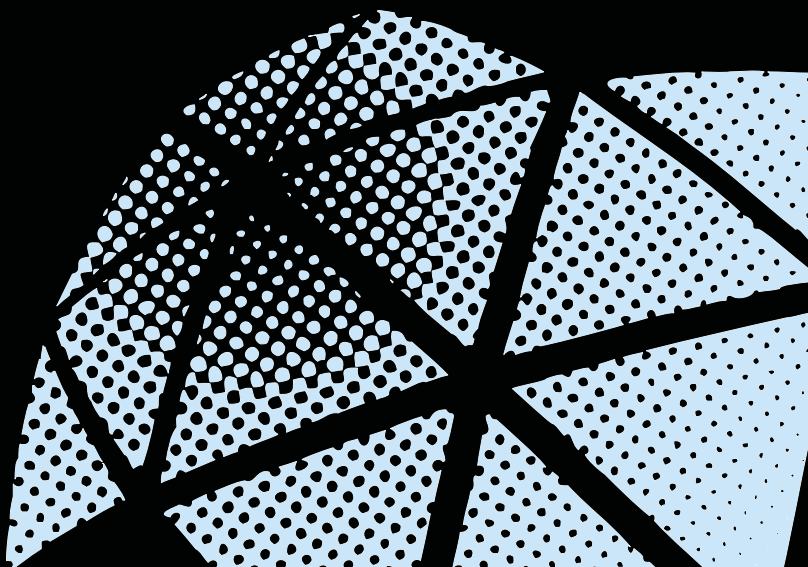
Caroline Marques Maia

Orientador: Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Apoio



Botucatu – SP
2012



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Instituto de Biociências
Campus de Botucatu



DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESCOLHA E PREFERÊNCIA EM PEIXES: UMA ABORDAGEM PARA O BEM-ESTAR

Caroline Marques Maia

Orientador: Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu (SP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

Apoio



Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Maia, Caroline Marques.

Diferenciação entre escolha e preferência em peixes: uma abordagem para o bem-estar / Caroline Marques Maia. – Botucatu: [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Gilson Luiz Volpato

Capes: 20404000

1. Tilápia (Peixe) - Comportamento. 2. Zoologia.

Palavras-chave: Bem-estar; Bloqueio; Cor ambiental; Escolha; Granulometria de substrato; Pareamento; Preferência; Tilápia-do-Nilo.

*Dedico este trabalho a todos os etólogos
que há anos não medem esforços na
incansável busca pelo bem-estar animal*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Gilson Luiz Volpato, por ter me iniciado no mundo científico, mostrando-me quais caminhos eu deveria seguir. Também agradeço pelos ensinamentos e conselhos vindos do grande cientista que ele é... Obrigada pelas horas de conversa sobre o majestoso universo científico, que sempre me instigaram, cada vez mais, ao “fazer ciência”. Obrigada por confiar em minha capacidade e por apostar em meu futuro...

Aos meus pais José e Elisabeth, por todo apoio que sempre me deram, por me fortalecerem nos momentos mais difíceis e por serem meu exemplo de vida pessoal e profissional... Agradeço muito pela total dedicação a este trabalho, especialmente na parte metodológica.

Aos meus colegas de laboratório: Danielle, Fernanda, Graziela, Mônica e Renato por discutirem este trabalho comigo inúmeras vezes, o que me fez crescer muito nesses dois anos de mestrado... Obrigada também pelos momentos de descontração que passamos juntos, pois eles sempre restabeleceram minhas energias para que eu pudesse seguir em frente.

As minhas grandes amigas Dra. Eliana Ferraz Santos e Daniele Victoratti por acreditarem e confiarem em meu potencial. Também agradeço por, mesmo estando distantes, sempre estarem presentes em minha vida, fortalecendo-me e me proporcionando momentos de crescimento profissional e pessoal.

Deus por sempre estar presente, dando-me forças e iluminando meu caminho. Agradeço também por colocar pessoas maravilhosas em minha vida...

“There is a danger that well meaning people define animal welfare in terms of what they think animals want or what pleases them. But if we take animal sentience seriously, we must ensure that the animal voice is heard.”

(Marian Dawkins, 2006)

SUMÁRIO

RESUMO	1
PROCEDIMENTOS DE ÉTICA	3
INTRODUÇÃO	5
<i>Objetivos</i>	9
METODOLOGIA GERAL	10
<i>Animais e Manutenção</i>	11
<i>Estrutura Geral da Dissertação</i>	11
<i>Teste de Escolha/Preferência</i>	12
CAPÍTULO 1	15
<i>METODOLOGIA – procedimentos específicos</i>	16
<i>RESULTADOS</i>	16
<i>DISCUSSÃO</i>	23
CAPÍTULO 2	25
Experimento 1	26
<i>METODOLOGIA – procedimentos específicos</i>	26
<i>RESULTADOS</i>	28
Experimento 2	31
<i>METODOLOGIA – procedimentos específicos</i>	31
<i>RESULTADOS</i>	32
<i>Teste de pareamento entre uma escolha e uma preferência</i>	35
<i>DISCUSSÃO</i>	37
CAPÍTULO 3	39
Parte I	40
<i>METODOLOGIA</i>	40
<i>RESULTADOS</i>	42
Parte II	46
<i>METODOLOGIA</i>	46
<i>RESULTADOS</i>	48
Parte III	49
<i>METODOLOGIA</i>	49
<i>RESULTADOS</i>	49
<i>DISCUSSÃO</i>	51
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55

Resumo



determinação das preferências dos animais tem sido aplicada visando identificar condições de conforto. Porém, tal determinação está envolta em problemas conceituais, pois se baseia, basicamente, em testes de escolha sobre itens do ambiente. Até que ponto uma opção escolhida é uma condição de preferência para os animais? Aqui avaliamos tal problemática estudando as escolhas de juvenis do peixe tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L., 1759) em duas condições sob isolamento social: cor ambiental e granulometria de substrato, nas quais usamos testes de múltipla escolha por 10 dias consecutivos. Encontramos tanto escolhas apenas momentâneas (*escolhas*) quanto escolhas consistentes ao longo dos dias (*preferências*), além de uma variabilidade nas respostas entre os indivíduos, revelando maior importância do perfil individual na determinação de escolhas e preferências. Para avaliar se o tipo de teste (múltipla escolha ou pareamento entre itens) pode influenciar as respostas de escolha e preferência, repetimos os testes na condição cor ambiental (pois, no estudo anterior, detectamos mais preferências nesta condição do que na granulometria de substrato), determinamos as escolhas e preferências individuais e, então, bloqueamos compartimentos preferidos ou mais escolhidos. Após 10 dias de teste pareamos, por mais 10 dias, dois itens de escolha, dois itens de preferência ou um item de escolha e um item de preferência. Ao parearmos itens previamente vistos como escolha, alguns indivíduos escolheram consistentemente um dos itens, revelando falsa preferência. No pareamento entre preferências, houve indivíduos que não tiveram escolha consistente, revelando falsa escolha. Já no pareamento entre uma escolha e uma preferência houve diferentes perfis de resposta. Assim, testes que pareiam itens devem ser evitados, pois podem levar a constatação de falsas escolhas e preferências. Além disso, investigamos em parte desses dados, métodos de análise para se determinar preferências. Concluímos que a melhor forma de análise é por meio de comparações entre as frequências diárias de visitação a cada uma das opções de escolha oferecida, excluindo-se os dados dos três primeiros dos 10 dias de estudo, a partir da qual se estabelece como opção de preferência aquela que foi escolhida em seis ou sete dias. Complementando essa análise, vimos que o coeficiente de variação em torno da média das frequências de visitação de cada dia fornece um referencial importante: se maior que 90%, trata-se apenas de escolha e não preferência dessa opção.

Procedimientos de Ética



s protocolos experimentais desta dissertação estão de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-SP (Protocolo n° 220-CEEA).

Introdução



Ciência do bem-estar animal tem crescido gradualmente desde a década de 60 (Duncan, 2006). Provavelmente isso ocorreu como resultado do aumento da discussão sobre como o gado é tratado e do crescimento de organizações contra o sofrimento animal na pesquisa e nas indústrias de alimentação (Volpato *et al.*, 2009), os quais foram impulsionados pelo trabalho de Ruth Harrison (1964). Apesar disso, conhecer quando os animais atendem a tais condições de bem-estar é ainda um desafio. Desde os avanços mais significativos da ciência do bem-estar animal, o foco central tem sido direcionado para a busca de indicadores fisiológicos e comportamentais de bem-estar (Volpato *et al.*, 2009). Porém, houve uma dificuldade no encontro de eixos fisiológicos como indicadores inequívocos de bem-estar, além da problemática de definir bem-estar com base em comportamentos naturais (Volpato *et al.*, 2009).

A busca por indicadores fisiológicos de bem-estar foi provavelmente embasada pelo sucesso no achado dos eixos fisiológicos do estresse, sendo que muitos estudos passaram a assumir que a redução de estresse melhora as condições de bem-estar. O estado de estresse é um requisito para se enfrentar situações estressoras (o animal deve canalizar energia para isso), de forma que não apresentá-lo poderia resultar em prejuízos adaptativos – assim, trata-se de elementos de seleção natural (Volpato *et al.*, 2007 e 2009). Porém, no caso de bem-estar, condições consideradas boas podem ocorrer mesmo em momentos de desgaste metabólico (por ex., migrações e cortejamento sexual), que são consideradas estressantes. Assim, como uma boa condição de bem-estar pode ocorrer tanto em condições de alta demanda metabólica, ou de baixa demanda, é pouco provável que um eixo metabólico específico tenha sido selecionado (em contraposição à questão do estresse). Por outro lado, supor a vida natural como sinônimo de bem-estar é também falho, pois se parte do pressuposto que na natureza toda condição é boa para o animal. Na realidade, um animal sendo perseguido, ou sem conseguir os recursos desejados, pode ser facilmente considerado em condições de bem-estar pobre (termo usado por Broom, 1991 – *poor* ou *good welfare*).

Em vista dessa problemática envolvendo a dificuldade de se encontrar indicadores confiáveis de bem-estar, Dawkins (2006, 2008) propõe que devemos observar melhor quais são as vontades e necessidades dos animais com os quais trabalhamos. Isso pressupõe que o animal que esteja em condições que deseja deva estar em boas condições de bem-estar. Nesse contexto, Volpato *et al.* (2007) sustentam que a melhor opção é definir o estado de bem-estar como o estado interno de um animal quando ele permanece sob condições as quais escolheu livremente. Essa definição, baseada na escolha dos animais,

implica que não se olhe somente o estado do animal, mas, principalmente, se as condições nas quais ele está são as de sua escolha. Mais tarde, Dawkins (2008) acrescenta a essa definição o estado de saúde, sendo este um estado necessário, porém não suficiente, para o bem-estar (Volpato *et al.*, 2009).

Assim, alguns estudos têm sido direcionados para melhor se conhecer as condições de escolha dos animais. Neste caso, os pesquisadores buscam conhecer condições que os animais “querem” a fim de usá-las para criar situações adequadas de manutenção e criação desses indivíduos. Tal abordagem no estudo do bem-estar animal começou na década de 70 por Marian Dawkins (*apud* Galhardo *et al.*, 2009) e foram mais recentemente enfatizadas por essa autora (Dawkins, 2006 e 2008). A detecção das condições que os animais “querem” é feita geralmente por testes de escolha, onde o animal deve optar por uma entre duas ou mais condições que lhe são oferecidas (*e.g.* escolha por sacarose em gatos - Bartoshuk *et al.*, 1971; escolha por parceiro sexual - Ryan, 1980; Basolo, 1990; Schluter *et al.*, 1998; Schlupp *et al.*, 1999; Braithwaite & Barber, 2000; Gonçalves & Oliveira, 2003; Liao & Lu, 2009; escolha por substrato - Webster & Hart, 2004; Galhardo *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2010; escolha dirigida pela aprendizagem dependente do estado - Pompilio *et al.*, 2006; escolha por temperatura ambiente - Girguis & Lee, 2006).

Embora o uso dos testes de escolha na abordagem do bem-estar animal esteja aumentando na literatura, há ainda alguns problemas conceituais envolvidos e que precisam ser investigados. Na busca pelas “opções” dos animais, nos deparamos com um problema lógico crucial: as escolhas são apenas momentâneas, relativas a uma situação imediata, ou podem ser mais duradouras? Na literatura, no entanto, essas situações têm sido tratadas praticamente como sinônimos (*e.g.* Schluter *et al.*, 1998; Schlupp *et al.*, 1999; Gonçalves & Oliveira, 2003; Webster & Hart, 2004; Galhardo *et al.*, 2009; Liao & Lu, 2009). No presente estudo nos debruçamos para encontrar subsídios factuais que sirvam de referência para que as diferenciações entre escolhas momentâneas e aquelas mais consistentes (duradouras) possam ser avaliadas e suas implicações incorporadas na definição de bem-estar. De fato, em estudos pilotos desenvolvidos em nossos laboratórios, vimos que há opções de escolha dos peixes que parecem se manter ao longo do tempo, enquanto outras são mais pontuais e não se repetem em situações similares sucessivas.

Aqui usamos o termo *escolha* para indicar aquelas que ocorrem num momento e não se repetem sistematicamente em escolhas sucessivas. Por outro lado, chamamos de *preferência* às opções (escolhas) que são consistentes (se repetem) em testes subsequentes.

Assim, se em testes sucessivos o animal mantém predominantemente uma única escolha, dizemos que se trata de *preferência*; se nos testes sucessivos houver variação da escolha, sem consistência, então dizemos que se trata apenas de *escolha*. A partir disso, testamos experimentalmente se esses dois perfis ocorrem, de fato, em duas situações de escolha dos peixes (cor ambiental e granulometria de substrato). Sendo o caso, sua discriminação se torna indispensável quando se pretende usar esses conceitos com implicações para análises do bem-estar dos animais. Por exemplo, oferecer-lhes apenas condições de escolha pode não ser adequado, principalmente quando se pensa em situações mais crônicas de convívio com essas condições.

Testes de pareamento, ou seja, testes em que há apenas duas opções de escolha disponíveis, têm sido intensamente utilizados nos estudos sobre as escolhas dos animais (*e.g.* Bartoshuk *et al.*, 1971; Aigner & Balster, 1978; Ryan, 1980; Basolo, 1990; Johnsson *et al.*, 2000; Webster & Hart, 2004; Rios-Cardenas *et al.*, 2007; Walling *et al.*, 2008). A forma como esses testes são desenvolvidos também pode ter implicações para falsas interpretações sobre as opções dos animais (veja Volpato *et al.*, 2007). O teste de pareamento diminui a liberdade de escolha. No pareamento entre dois itens de preferência, estes podem se anular a ponto de que o animal oscile sua resposta ao longo dos dias entre os dois itens, uma vez que ambos são de sua preferência, caracterizando, então, apenas escolha de um deles ou de ambos. Por outro lado, se dois itens de escolha são pareados, o animal pode escolher de forma consistente um dos itens, pois estaria escolhendo a melhor entre as duas opções disponíveis, o que daria a impressão de tratar-se de uma preferência. Já no pareamento entre um item de escolha e um item de preferência, a força da preferência pode anular uma opção de escolha. Da mesma forma, avaliações em poucos testes sucessivos também podem levar a falsas preferências, principalmente quando os animais estão ainda se acostumando ao ambiente de teste. Assim, testamos essas possibilidades lógicas avaliando a consistência da resposta de escolha em pareamento de dois itens de preferência, dois itens de escolha e também um item de escolha contra um item de preferência.

Além disso, a análise de dados sobre preferência geralmente não é padronizada entre os estudos, havendo variação inclusive nos testes estatísticos empregados (*e.g.* Spence & Smith, 2006; Bennett *et al.*, 2007; Burfeind *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2010). Assim, examinamos aqui também formas de se analisar os dados, avaliando se essas abordagens podem superestimar ou subestimar as conclusões sobre escolhas e preferências.

Como modelo de estudo, utilizamos juvenis do peixe tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759). Em relação à ambiente colorido, essa espécie tem sido descrita como preferindo a cor amarela, mas isso visto apenas em testes pontuais realizados em poucos dias (dois dias de teste: Luchiari *et al.*, 2007; quatro dias de teste: Freitas & Volpato, 2011). Além disso, há também descrição de escolha dessa espécie por tipo de substrato (Mendonça *et al.*, 2010). Essas duas condições (cor ambiental e tipo de substrato) foram, então, investigadas aqui. Mais ainda, por ser a tilápia-do-Nilo uma espécie amplamente usada na piscicultura, as conclusões sobre suas escolhas e preferências podem auxiliar em seu manejo nas condições de cultivo.

Objetivos

Avaliamos experimentalmente a seguinte tese e as respectivas hipóteses:

TESE – A detecção de preferência e escolha na tilápia-do-Nilo pode ser afetada pelo tempo e tipo de teste aplicado, bem como pela forma de análise dos dados.

Hipótese 1: Existem condições que são escolhidas consistentemente ao longo do tempo (preferência), enquanto outras não mostram essa consistência (escolha).

Hipótese 2: Testes de pareamento entre itens anteriormente preferidos podem levar a falsas indicações de escolha.

Hipótese 3: Testes de pareamento entre itens anteriormente escolhidos podem levar a falsas indicações de preferência.

Hipótese 4: Testes de pareamento entre um item de escolha e um item de preferência resultam em opção pelo item de preferência.

Hipótese 5: A forma como os dados são analisados pode levar a superestimativas ou subestimativas dos itens de preferência.

Metodologia Geral

Animais e Manutenção

Usamos juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759) (~ 5 a 7 cm de comprimento total), providas de centros reprodutores que foram mantidos, no mínimo, por 30 dias em biotério (2 peixes/10 L em tanques de 1000 a 1700 L) antes do início dos experimentos. Nesse período de ajuste, os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração extrusada para peixes tropicais (5% da biomassa/dia). A temperatura da água foi mantida em torno de 25 a 27 °C; pH $\cong$ 6,8; amônia < 0,3 ppm; nitrito < 0,05 ppm; aeração constante e fotofase das 06:00 h às 18:00 h. A luminosidade foi de cor branca com intensidade de aproximadamente 300 Lux à altura dos tanques.

Estrutura Geral da Dissertação

Este texto é dividido em três capítulos, cada um avaliando parte das hipóteses do estudo, quais sejam:

CAPÍTULO 1 – Teste da hipótese 1. Desenvolvemos um experimento sobre escolhas/preferências em duas condições distintas: cor ambiental e granulometria de substrato. Basicamente, registrávamos para cada peixe suas escolhas em relação a quatro possibilidades, ao longo de 10 dias consecutivos. Como as respostas mais evidentes ocorreram no experimento sobre as cores ambientais, no capítulo seguinte centramos as análises apenas nessa variável.

CAPÍTULO 2 – Teste das hipóteses 2, 3 e 4. Veja esquema na figura 1. Numa primeira fase (pré-bloqueio), estudamos as opções dos animais (escolhas ou preferências) frente a quatro cores ambientais. Em seguida, bloqueamos acesso a certas cores (fase bloqueio) e, na última fase (pareamento), pareamos condições de preferência x preferência, escolha x escolha e escolha x preferência. Cada fase teve duração de 10 dias consecutivos.

CAPÍTULO 3 – Teste da hipótese 5. Utilizando parte dos dados obtidos neste estudo, testamos formas de análise para posterior inferência das escolhas ou preferências dos

animais. Com isso, conseguimos determinar uma forma mais apropriada para análise das respostas desses peixes.

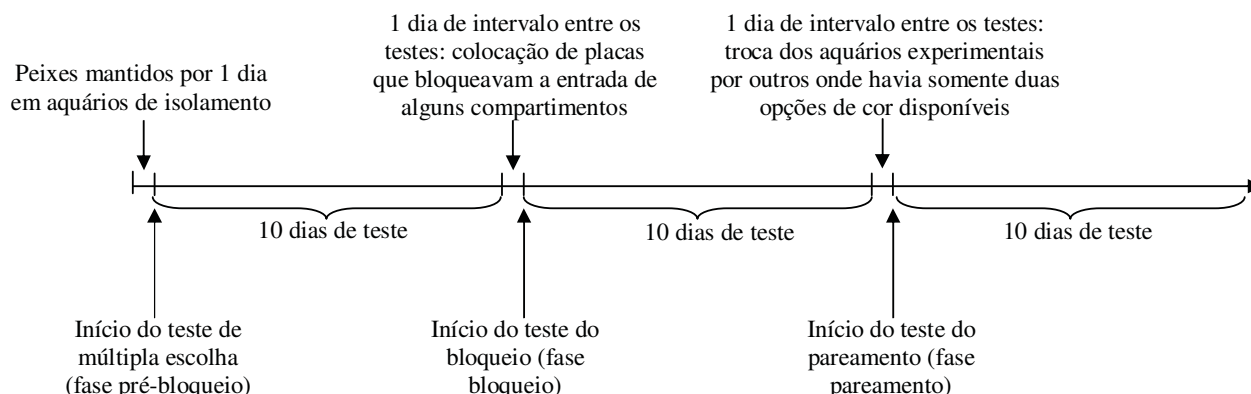


Figura 1: Dinâmica dos testes realizados no **CAPÍTULO 2**. No teste do bloqueio, foram bloqueadas cores preferidas ou, na ausência destas, as mais escolhidas. No teste do pareamento, foi pareada uma preferência pré com uma pós-bloqueio no **Experimento 1**, já no **Experimento 2** foram pareadas duas escolhas. Em alguns casos houve pareamento entre uma escolha e uma preferência (vide **CAPÍTULO 2** para mais informações). Veja foto dos aquários experimentais na figura 2.

Teste de Escolha/Preferência

Após isolamento de 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), selecionamos para estudo apenas os peixes com coloração clara ao redor do olho, que é um indicativo de ausência ou baixo nível de estresse (Volpato *et al.*, 2003; Miyai *et al.*, 2011). Os testes foram sempre realizados no período da manhã, que é quando a tilápia-do-Nilo apresenta maior decisão nas escolhas (Gestich & Volpato, 2009).

Após o período de isolamento, cada peixe era transferido para o respectivo aquário experimental (figura 2A), sendo introduzido no compartimento central, no interior de um cilindro plástico transparente (diâmetro ~ 8 cm; figura 2A), permanecendo nele por 5 min para possibilitar ajuste e percepção dos compartimentos oferecidos como opções de escolha. Em seguida, esse cilindro era cuidadosamente removido, permitindo que o peixe se movimentasse livremente pelo aquário, sendo este filmado por 1 h. A câmera de filmagem ficava situada acima do aquário, de forma que a captação da imagem era feita a partir de uma visão da parte superior do aquário. Ao final da filmagem, o peixe retornava ao respectivo aquário de isolamento. Essas observações foram repetidas em 10 dias sucessivos, caracterizando assim um período para análise das escolhas e preferências individuais. A partir das filmagens registramos, a cada 30 s (permitindo registrar 120 posições do peixe por dia), a frequência de visitação do peixe em cada compartimento do

aquário experimental. O peixe era considerado dentro de um compartimento quando seus dois olhos adentravam esse recinto. No teste de bloqueio (**CAPÍTULO 2**, 2ª fase de teste) fechávamos, com placas brancas de PVC, os compartimentos que eram de preferência do peixe ou, na existência apenas de escolhas, daqueles que foram mais freqüentemente escolhidos (vide figura 2B, fase bloqueio). As placas de PVC eram semi-circulares, o que permitia que o compartimento central branco (que era circular) permanecesse íntegro durante os testes de bloqueio (vide figura 2B, fase bloqueio). Para os testes de pareamento (**CAPÍTULO 2**, 3ª fase de teste), os aquários experimentais foram substituídos por outros de mesma estrutura, porém com apenas duas opções de escolha disponíveis (dois compartimentos para cada uma das duas cores selecionadas, situados alternadamente entre si – vide figura 2B, fase pareamento).

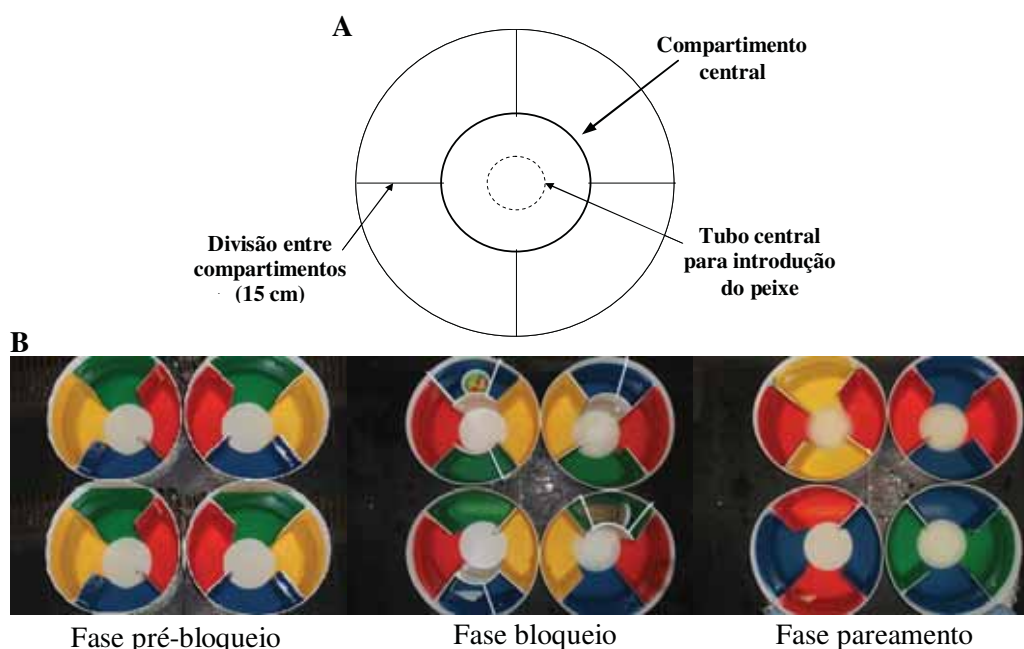


Figura 2: Vista superior do aquário experimental (cilíndrico). **A** – Esquema indicando os cinco compartimentos que apresentavam mesmo volume e área, sendo que cada um foi ajustado para a respectiva condição de teste. No caso das cores, cada compartimento periférico foi internamente revestido pela respectiva cor (revestimento feito por papel adesivo colorido). Para as condições de substrato, colocamos uma divisória na base (2 cm de altura), abrangendo a entrada de cada compartimento. Assim, cada um deles recebeu internamente o respectivo substrato (camada de 2 cm). A área central foi revestida com acrílico branco na altura de 2 cm, de forma a manter o mesmo nível entre essa área e a dos substratos. Diâmetro do aquário = 40 cm; altura da coluna de água = 15 cm. As paredes externas do aquário e as divisórias internas eram opacas (para o teste do substrato, eram de cor branca). **B** - Foto superior dos aquários experimentais nas três diferentes fases de testes (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento). Na fase bloqueio podemos notar as placas brancas e semi-circulares de PVC que bloqueavam a entrada do peixe nos compartimentos. A fixação das placas foi feita com o auxílio de ganchos de ferro revestidos por papel adesivo branco. Em alguns casos foi necessária a colocação de potes preenchidos com substrato atrás das placas que serviam como apoio para garantir que as placas permanecessem imóveis. Na fase pareamento podemos notar que apenas duas opções de cor ambiental estavam disponíveis pelo revestimento de compartimentos opostos com a mesma cor de papel adesivo.

Durante os testes, a fim de manter boa qualidade da água, os aquários de isolamento foram sifonados de uma a três vezes por semana, sempre pela manhã enquanto o peixe estava no aquário experimental, quando também realizamos trocas parciais da água. O pH permaneceu em torno de 7,2. A luz na superfície dos aquários era branca com intensidade de ~ 150 Lux à altura dos aquários experimentais.

Capítulo 1

*Há escolhas apenas momentâneas e escolhas
que são consistentes ao longo do tempo?*

*T*estamos a hipótese de que existem condições que são escolhidas consistentemente ao longo do tempo (preferência), enquanto outras não mostram essa consistência (escolhas).

METODOLOGIA – procedimentos específicos

Nossa hipótese foi testada em duas condições: 1) cor ambiental e 2) granulometria de substrato. Para cada uma delas foram oferecidas, nos compartimentos do aparelho teste (figura 2A), quatro opções de escolha: cores (amarela, vermelha, azul e verde) ou substrato (areia fina, areia grossa, pedregulho pequeno e pedregulho grande¹), além da área central em ambos os casos (cor branca e sem substrato). Os testes de escolha foram realizados conforme a **METODOLOGIA GERAL**, item *Teste de Escolha/Preferência*.

Avaliamos 24 peixes na condição cor ambiental e 23 na condição granulometria de substrato. Não houve diferença significativa do comprimento total dos peixes entre as duas condições testadas (média $\pm$ dp: cor ambiental = $6,91 \pm 0,41$ cm e granulometria de substrato = $6,93 \pm 0,36$ cm; teste Mann-Whitney, $P = 0,73$) e nem quanto ao peso dos indivíduos (média $\pm$ dp: cor ambiental = $5,51 \pm 0,96$ g e granulometria de substrato = $5,45 \pm 0,90$ g; teste t de Student, $P = 0,85$). A temperatura da água também não variou entre as condições (média $\pm$ dp: cor ambiental = $25,83 \pm 0,87^{\circ}\text{C}$ e granulometria de substrato = $25,65 \pm 0,70$; teste t de Student, $P = 0,22$).

Na análise dos dados, comparamos as frequências de visitação entre os compartimentos num mesmo dia (independentemente para as condições cor ambiental e granulometria do substrato), por meio de teste de proporção de Goodman (1965 – dentro de multinomiais). Em seguida, comparamos a proporção de dias em que cada compartimento se apresentava como escolhido. A partir de uma análise visual dos dados obtidos, percebemos a necessidade de uma análise mais criteriosa para detectar escolhas e preferências. Os detalhes das análises encetadas são apresentados no **CAPÍTULO 3**.

RESULTADOS

Houve tanto escolhas quanto preferências. Porém, detectamos um maior número de indivíduos ($n = 19$) com alguma preferência na condição cor ambiental em comparação

¹ Granulometria: areia fina ($0,12 \pm 0,04$ cm), areia grossa ($0,57 \pm 0,07$ cm), pedregulho pequeno ($1,04 \pm 0,16$ cm) e pedregulho grande ($1,64 \pm 0,29$ cm). Adaptado de Stoner & Abookire, 2002 e Stoner & Ottmar, 2003.

aos indivíduos testados na condição granulometria de substrato ($n = 10$) (figura 3; teste de Goodman, 1964 - entre multinomiais). O número de indivíduos que apresentaram escolha foi o mesmo em ambas as condições ($n = 20$). O perfil de resposta de cada peixe variou na amostra, havendo peixes que mostraram apenas preferência, apenas escolha ou ambos (tabela 1). Houve também uma variabilidade entre os indivíduos nos itens escolhidos ou preferidos (vide as diferentes cores e tipos de substrato escolhidos ou preferidos na tabela 1 e nas figuras 4, 5, 6 e 7). O desenvolvimento das escolhas momentâneas que se tornaram consistentes ao longo do tempo (indicando preferências) pode se acompanhado nas figuras 4, 5, 6 e 7.

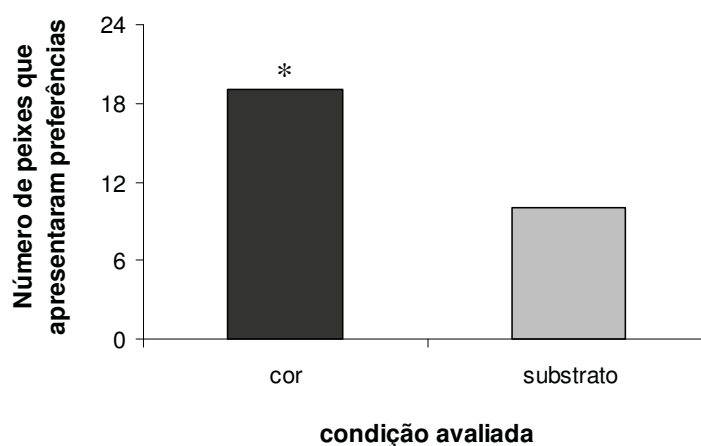


Figura 3: Número de peixes que exibiram ao menos uma escolha significativamente consistente (preferência) na condição cor ambiental comparada à condição granulometria de substrato (teste de Goodman, 1964 - entre multinomiais; * = $P < 0,05$).

Tabela 1: Cores e tipos de substrato escolhidos (E) e preferidos (P) pelos peixes testados nas condições cor ambiental ou granulometria de substrato.

Peixe	Cor ambiental				Granulometria de substrato			
	Vm	Am	Az	Vd	Af	Ag	Pp	Pg
1	E	P			E	E		
2	P	P			P	P		
3		P			P	P		E
4	E		P	E	P			
5			E	P	E	P	E	E
6	E	E	E	E	P	E	E	
7			P	P			E	E
8		P	E	P	P			
9	E	E	E		E	E	E	E
10		P	E			P	E	E
11	E	E	E	E	P	E	E	
12	P	E	E		E	E		E
13			P	E		E	E	E
14		E	P	P	E			E
15	E	E	E		E	E		E
16		E	E	E		E		E
17	P		E	E	E	P	E	
18				P	E	E		E
19	P		E		P	E	E	E
20	E	E		P	E	E	E	E
21	P		E	E	E	E		E
22	E		P	E	E	E	E	E
23	P		E		E	E	E	E
24	P		P	E				

Vm = vermelho; Am = amarelo; Az = azul; Vd = verde; Af = areia fina; Ag = areia grossa; Pp = pedregulho pequeno; Pg = pedregulho grande. Para definição de E e P, vide INTRODUÇÃO.

Condição: Escolha por cor ambiental

--■-- verde —▲— amarelo - - □ - - azul —●— vermelho

19

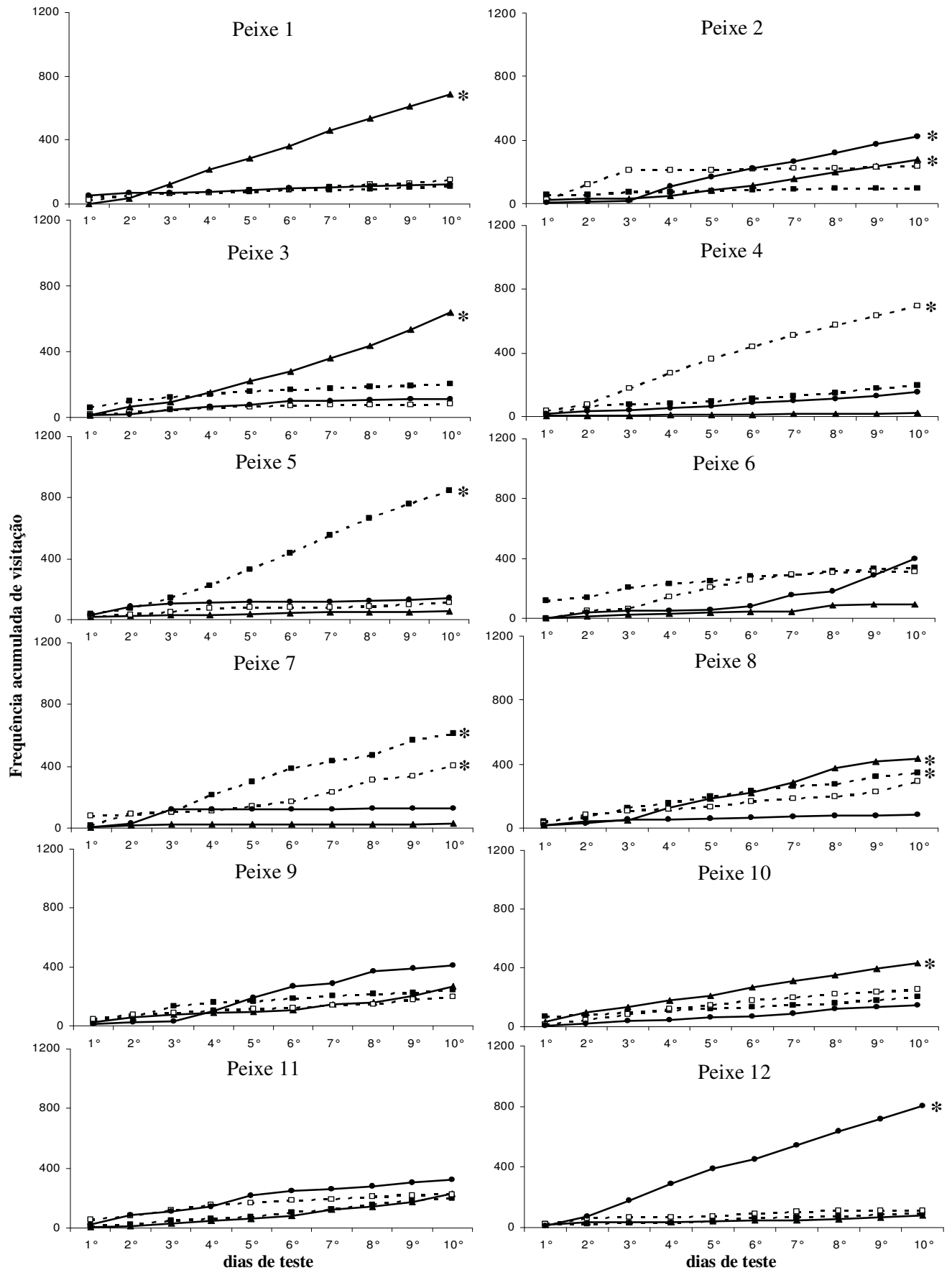


Figura 4: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 dias de teste. * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

Condição: Escolha por cor ambiental

- ■ - verde — ▲ — amarelo - □ - azul — ● — vermelho

20

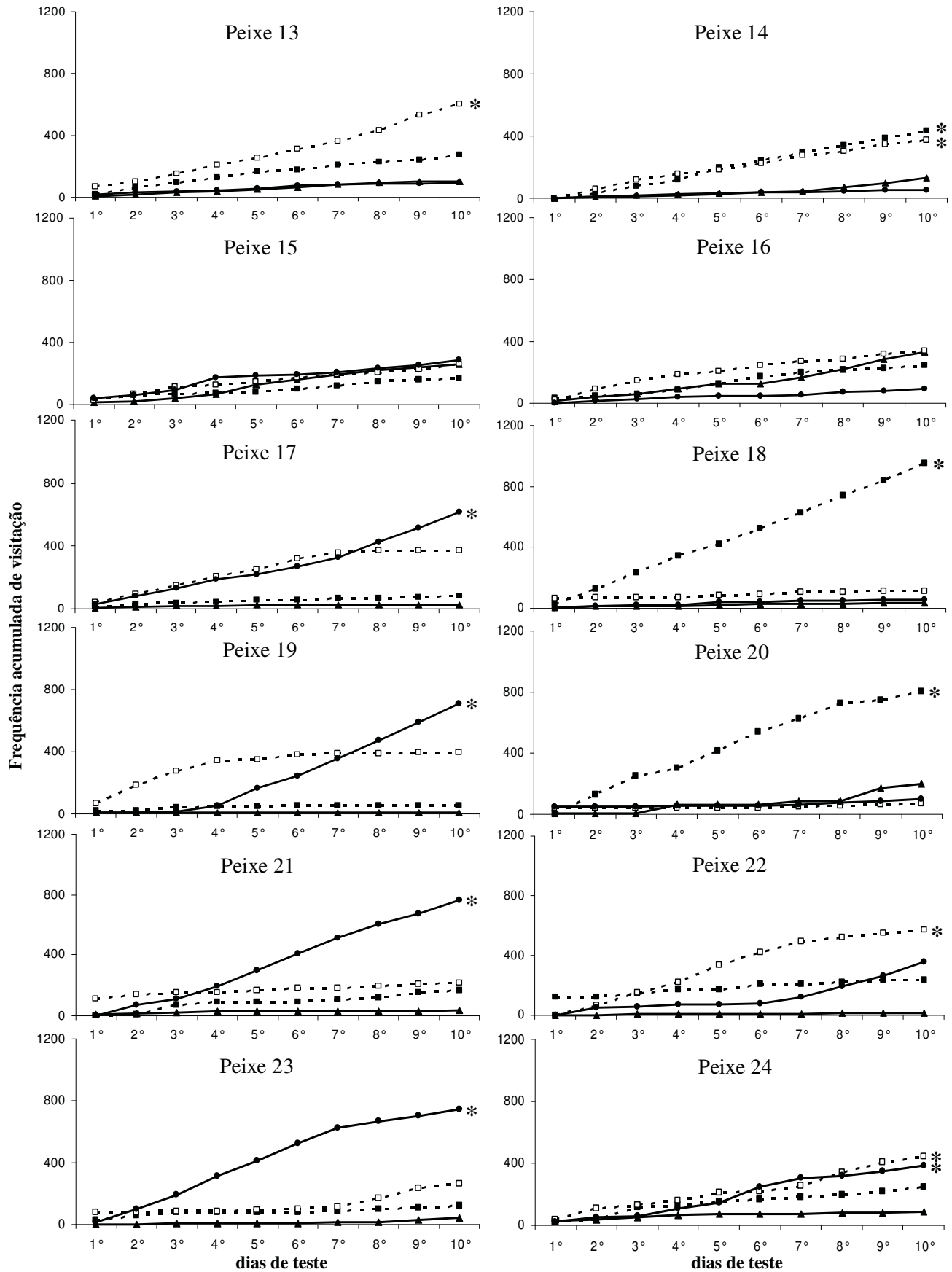


Figura 5: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 dias de teste. * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

Condição: Escolha por granulometria de substrato

--- Areia fina — Areia grossa - - - Pedregulho pequeno — Pedregulho grande

21

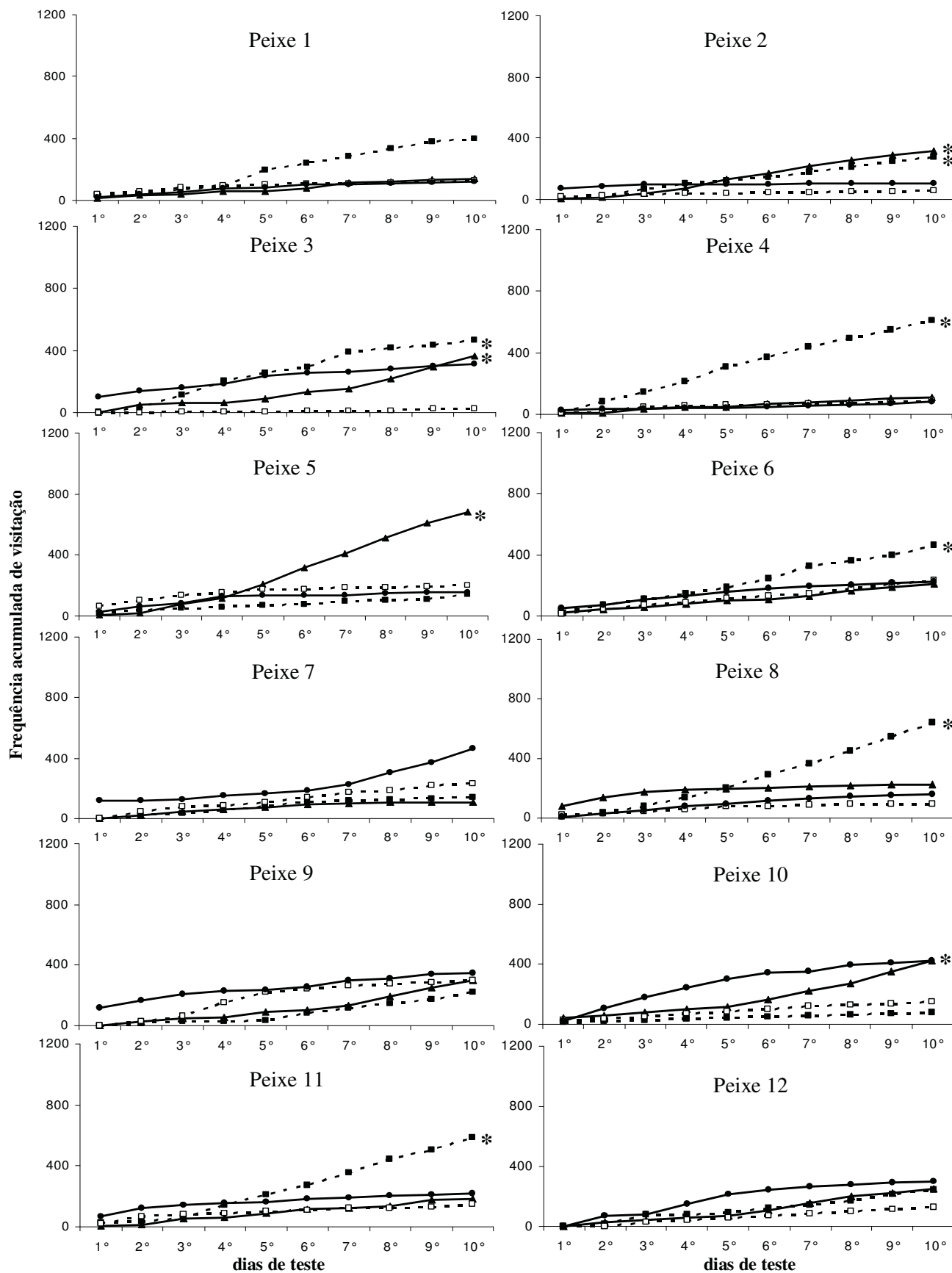


Figura 6: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes substratos do aquário experimental ao longo dos 10 dias de teste. * indica tipo de substrato significativamente preferido (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$). No caso do peixe 10, a preferência desenvolvida foi pela areia grossa.

• • • Areia fina — Areia grossa • • • Pedregulho pequeno — Pedregulho grande

Figura 7: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes substratos do aquário experimental ao longo dos 10 dias de teste. * indica tipo de substrato significativamente preferido (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0.05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo identificamos respostas caracterizadas como escolhas e outras como preferências. Vimos, ainda, que os itens escolhidos ou preferidos variaram entre os indivíduos (tabela 1 e figuras 4, 5, 6 e 7). Além disso, há um maior número de ocorrência de perfis de preferência na condição cor ambiental comparada à condição granulometria de substrato (figura 3), o que não ocorre em relação aos perfis de escolha.

Grande parte dos estudos sobre preferência conclui sobre esse perfil a partir da análise de escolhas vistas em testes realizados em até quatro dias (*e.g.* Schluter *et al.*, 1998; Schlupp *et al.*, 1999; Gonçalves & Oliveira, 2003; Webster & Hart, 2004; Rios-Cardenas *et al.*, 2007; Liao & Lu, 2009). Porém, nosso estudo indica que escolhas podem não significar preferências que se mantenham em escolhas sucessivas. Alguns estudos sobre consistência das escolhas têm sido realizados (*e.g.* Godin & Dugatkin, 1995; Wolfgang & Birkhead, 2004; Cummings & Mollaghan, 2006; Browne *et al.*, 2010), mas nesses estudos avaliam-se apenas a repetibilidade das escolhas em, no máximo, quatro dias, sem considerar escolhas momentâneas como sendo diferentes de escolhas consistentes (preferências). Schilman & Lazzari (2004) estudaram as preferências térmicas dos insetos triatomíneos (*Rhodnius prolixus*) por 20 dias, porém o período prolongado dos testes de escolha estava mais relacionado aos efeitos da temperatura na perda de água e índice de conversão de nutrientes do que com questões conceituais das preferências. Além disso, pelo fato desses autores não conseguirem individualizar os insetos, não foram realizadas análises estatísticas para determinação das preferências. Neste contexto, vemos que nosso estudo é pioneiro em tratar, com suporte empírico, escolhas e preferências como sendo fenômenos biológicos distintos. Os testes de escolha visam identificar situações de conforto aos animais (Dawkins, 2006; Volpato *et al.*, 2007), muitas vezes com o objetivo de nortear a escolha de condições que devam ser aplicadas a animais cativos para melhorar seu bem-estar. Assim, faz sentido utilizarmos a preferência do animal e não a escolha, pois sendo essas opções (escolha ou preferência) importantes para dar ao animal condições que lhes sejam agradáveis, devem ser assim consideradas em dias sucessivos (preferência) e não apenas momentaneamente (escolha).

A literatura relacionada a estudos de escolha e preferência não apresenta um padrão na forma de analisar os dados. Além disso, normalmente as análises são feitas em nível de grupo e não de indivíduos (*e.g.* Soriguer *et al.*, 2002; Thomas, 2002; Matsumoto *et al.*, 2008; Burfeind *et al.*, 2009; Snowberg & Benkman, 2009; Zizzari *et al.*, 2009). Alguns

estudos demonstraram a existência de uma variabilidade individual significativa em respostas de preferência, mas em testes realizados apenas em poucas triagens ou em poucos dias (*e.g.* Godin & Dugatkin, 1995; Wolfgang & Birkhead, 2004; Browne *et al.*, 2010). Por meio dos diferentes tipos de análise estatística aplicados aos dados de nosso estudo, constatamos que a preferência ou mesmo escolha dos itens oferecidos é individual em testes realizados por 10 dias consecutivos. Nesse contexto, nosso estudo mostra que a variabilidade entre os indivíduos pode persistir por vários dias de teste, indicando que testes que buscam determinar uma preferência válida para todos os indivíduos da espécie devam ser revistos. Quando pensamos em usar tais testes para tomarmos medidas considerando o estado de bem-estar dos animais, particularmente em grupos pouco numerosos, nossos dados sustentam que a análise das escolhas e preferências individuais é imperativa.

Embora o mesmo número de indivíduos tenha feito escolhas nas duas condições testadas, na condição cor ambiental houve um maior número de indivíduos que apresentaram preferências do que na condição granulometria de substrato (figura 3). Assim, parece que na tilápia-do-Nilo, em fase juvenil, o tipo de substrato não é uma característica tão relevante como a cor ambiental. Mendonça *et al.* (2010) mostraram que a tilápia demonstra escolha por um tipo específico de substrato (areia) quando em contexto reprodutivo, mas não na ausência deste último, o que faz sentido considerando o gasto energético envolvido na construção do ninho sobre o substrato em contexto reprodutivo (Mendonça *et al.*, 2010). Sendo assim, o fato de termos obtido, significativamente, um maior número de preferências por cor ambiental do que por tipo de substrato pode ter decorrido da idade dos peixes testados (juvenis ainda fora da fase reprodutiva) e do contexto envolvido nos testes de escolha.

Assim, vemos que escolha e preferência são dois fenômenos distintos, ou seja, há escolhas momentâneas (num dia, por ex.) e também aquelas que são consistentes ao longo do tempo (as preferências). Além disso, há uma variabilidade grande entre indivíduos da mesma espécie em relação tanto a respostas de escolha quanto de preferência. Dessa forma, recomendamos a aplicação de testes de escolha ao longo do tempo para determinação de preferências, bem como a consideração de escolhas e preferências ao nível de indivíduo.

Capítulo 2

*Testes que pareiam itens forçam o
aparecimento de escolhas e preferências?*

Experimento 1

*T*estamos a hipótese de que duas opções de preferência, quando confrontadas entre si, podem levar a ocorrência de falsas escolhas.

METODOLOGIA – procedimentos específicos

Realizamos este experimento apenas com a condição cor ambiental, uma vez que no **CAPÍTULO 1** o número de indivíduos que apresentaram preferência nesta condição ($n = 19$) foi maior que o número de indivíduos que apresentaram preferência na condição granulometria de substrato ($n = 10$; figura 3; teste de Goodman, 1964 - entre multinomiais; $P < 0,05$).

Neste experimento repetimos o procedimento realizado no **CAPÍTULO 1**, identificando itens preferidos e escolhidos de cada indivíduo (fase pré-bloqueio, vide figura 1) e, então, bloqueamos alguns desses itens e realizamos novos testes de escolha, com os mesmos indivíduos, por mais 10 dias (fase bloqueio, vide figura 1). O bloqueio foi realizado para verificar se uma nova preferência poderia surgir na ausência da preferência anterior (aquela escolhida consistentemente no teste com quatro opções de escolha – fase pré-bloqueio) ou na ausência das cores mais escolhidas sem, no entanto, terem sido preferências na fase pré-bloqueio (figura 8). Ou seja, quando detectávamos preferências na fase pré-bloqueio com base em análise visual gráfica (uma vez que inicialmente não sabíamos qual forma de analisar os dados seria mais adequada e isso só foi resolvido mais à frente – vide **CAPÍTULO 3**), estas eram bloqueadas na fase bloqueio; quando visualmente detectávamos apenas escolhas na fase pré-bloqueio, aquelas mais escolhidas sem, no entanto, serem preferências, eram bloqueadas. Neste teste do bloqueio das cores nós novamente avaliamos as escolhas e preferências de cada indivíduo e, então, confrontamos duas cores preferidas num teste de pareamento. Assim, em indivíduos nos quais bloqueamos preferências e detectamos o surgimento de nova preferência, fizemos o teste de pareamento entre preferências (pré e pós-bloqueio); quando bloqueamos preferências ou escolhas e detectamos apenas escolhas (ou preferência, no caso do bloqueio de escolhas), os indivíduos foram usados no **Experimento 2** deste capítulo, ou seja, no teste de pareamento entre escolhas (vide figura 8).

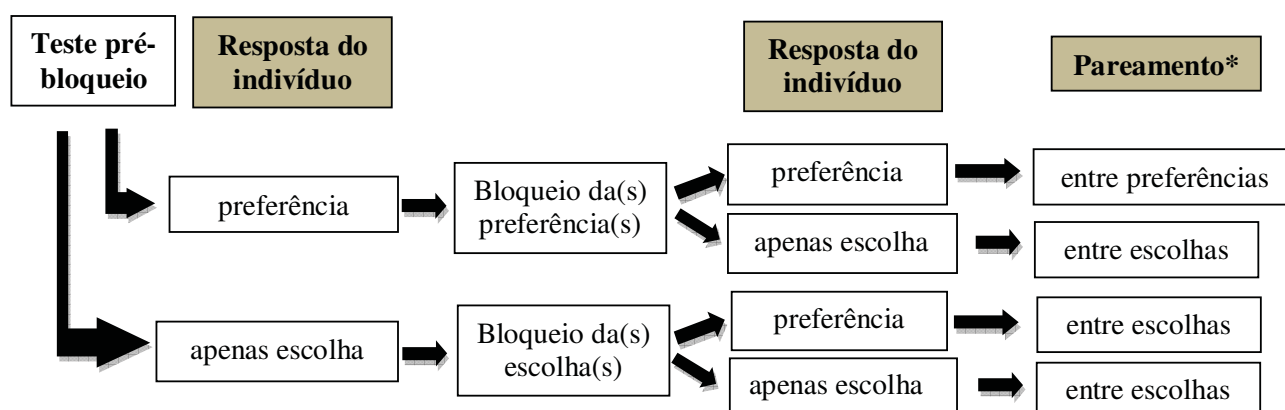


Figura 8: Esquema das respostas dos indivíduos aos testes de pré-bloqueio e bloqueio, identificando quais testes foram aplicados frente às diferentes respostas. *Como inicialmente usamos análise visual gráfica para determinar quais seriam as cores pareadas, uma vez que não sabíamos qual seria a análise estatística mais adequada aos dados, houve quatro casos em que o pareamento ocorreu entre uma escolha e uma preferência.

Assim, investigamos por mais 10 dias as escolhas/preferências em teste de pareamento (dois compartimentos para cada uma das duas cores selecionadas, situados alternadamente entre si – vide figura 2B, fase pareamento; ou seja, somente duas opções de cor estavam disponíveis). Então, novamente avaliamos as escolhas e preferências de cada indivíduo. Como descrito acima, inicialmente nem todos os indivíduos testados apresentaram preferências pré e/ou pós-bloqueio (figura 8). Dessa forma, para realizarmos o pareamento entre preferências, selecionamos 10 indivíduos (média $\pm$ dp: comprimento total = $7,08 \pm 0,20$ cm e peso = $5,62 \pm 0,47$ g) com preferências pré e pós-bloqueio visualmente evidentes (como mencionado anteriormente, os demais indivíduos, ou seja, aqueles que não apresentaram preferências pré e/ou pós bloqueio visualmente evidentes, foram testados no **Experimento 2** deste capítulo).

Para detectarmos as preferências com base em análise visual gráfica, em cada fase de teste (a cada 10 dias), plotávamos os resultados em gráficos com as frequências de visitação e, em seguida, escolhíamos as cores que visualmente se destacavam das demais (com maior inclinação nas curvas das frequências cumulativas) como preferências (vide figura 9).

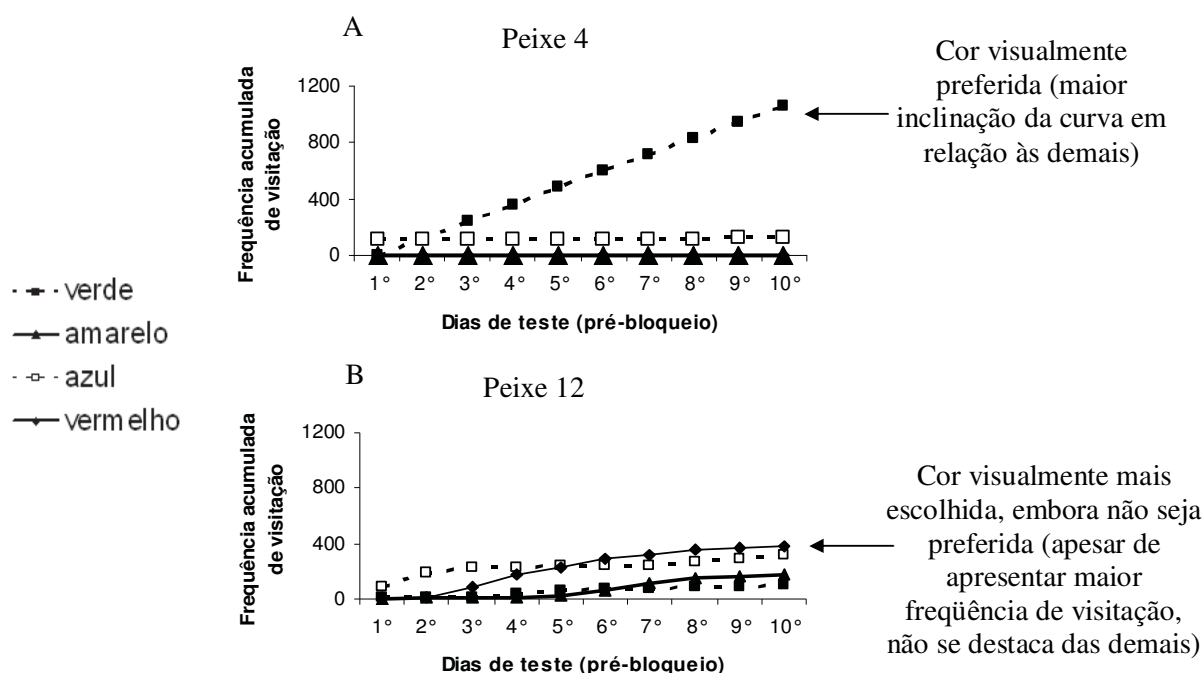


Figura 9: Exemplos de gráficos que utilizamos para determinar quais cores parear. A - Para realizarmos o teste de pareamento entre preferências, selecionamos cores com maiores frequências de visita o que as demais e que se destacavam destas. B - Para realizarmos o teste do pareamento entre escolhas, selecionamos cores com maiores frequências de visita o que as demais, mas que não se destacavam destas (cores mais escolhidas sem, no entanto, serem preferências).

Após o teste do pareamento, a análise consistiu em saber se a consistência da escolha foi perdida quando pareamos dois itens de preferência (o que chamamos de falsa escolha). Os detalhes das análises encetadas são apresentados no **CAPÍTULO 3**.

Houve um dia de intervalo entre cada fase (pré-bloqueio e bloqueio; bloqueio e pareamento) (figura 1). Esses intervalos foram necessários para ajustes dos aquários experimentais para realiza o dos testes de bloqueio e pareamento, sendo que, no pareamento, tivemos que trocar os aquários experimentais, realizando troca total de água (vide **METODOLOGIA GERAL**, item *Teste de Escolha/Preferência*). A temperatura média dos aquários experimentais durante todo o período de teste foi $24,85 \pm 0,22^\circ\text{C}$ (média $\pm$ dp).

RESULTADOS

Conforme a tabela 2 e as figuras 10 e 11, dos 10 indivíduos testados três não apresentaram preferência (o que chamamos de falsas escolhas; peixes 1, 3 e 5), cinco mantiveram a preferência que havia surgido antes do bloqueio (peixes 4, 6, 7, 8 e 9) e dois mantiveram a preferência que surgiu somente após o bloqueio (peixes 2 e 10). Novamente

houve grande variabilidade nas respostas entre os indivíduos (vide as diferentes cores que foram preferidas e escolhidas na tabela 2 e nas figuras 10 e 11; teste de Goodman, 1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$). O desenvolvimento das escolhas momentâneas que se tornaram consistentes ao longo do tempo (indicando preferências) pode se acompanhado, nas três fases de teste (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento), nas figuras 10 e 11.

Tabela 2: Cores escolhidas (E) e preferidas (P) pelos peixes testados na condição cor ambiental nas fases pré-bloqueio, bloqueio e pareamento.

Peixe	Fase pré-bloqueio				Fase bloqueio				Fase pareamento			
	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd
1	P		E	E	---		P	E	E	---		---
2			E	P	E		P	---	---	---	P	
3	E		P	P	P		---	---	E	---	---	
4			P	E			---	P	---	---	P	
5	E		P	E	P		---	P	E	---	E	---
6	P	E	E	E	---	P		E	P		---	---
7	E		P	E	P		---	E		---	P	---
8	P		E		---		E	P	P	---	---	
9			P		P	E	---			---	P	---
10		E	E	P	E		P	---	---	---	P	

Vm = vermelho; Am = amarelo; Az = azul; Vd = verde; --- = cor bloqueada (fase bloqueio) ou ausente (fase pareamento). Para definição de E e P, vide **INTRODUÇÃO**.

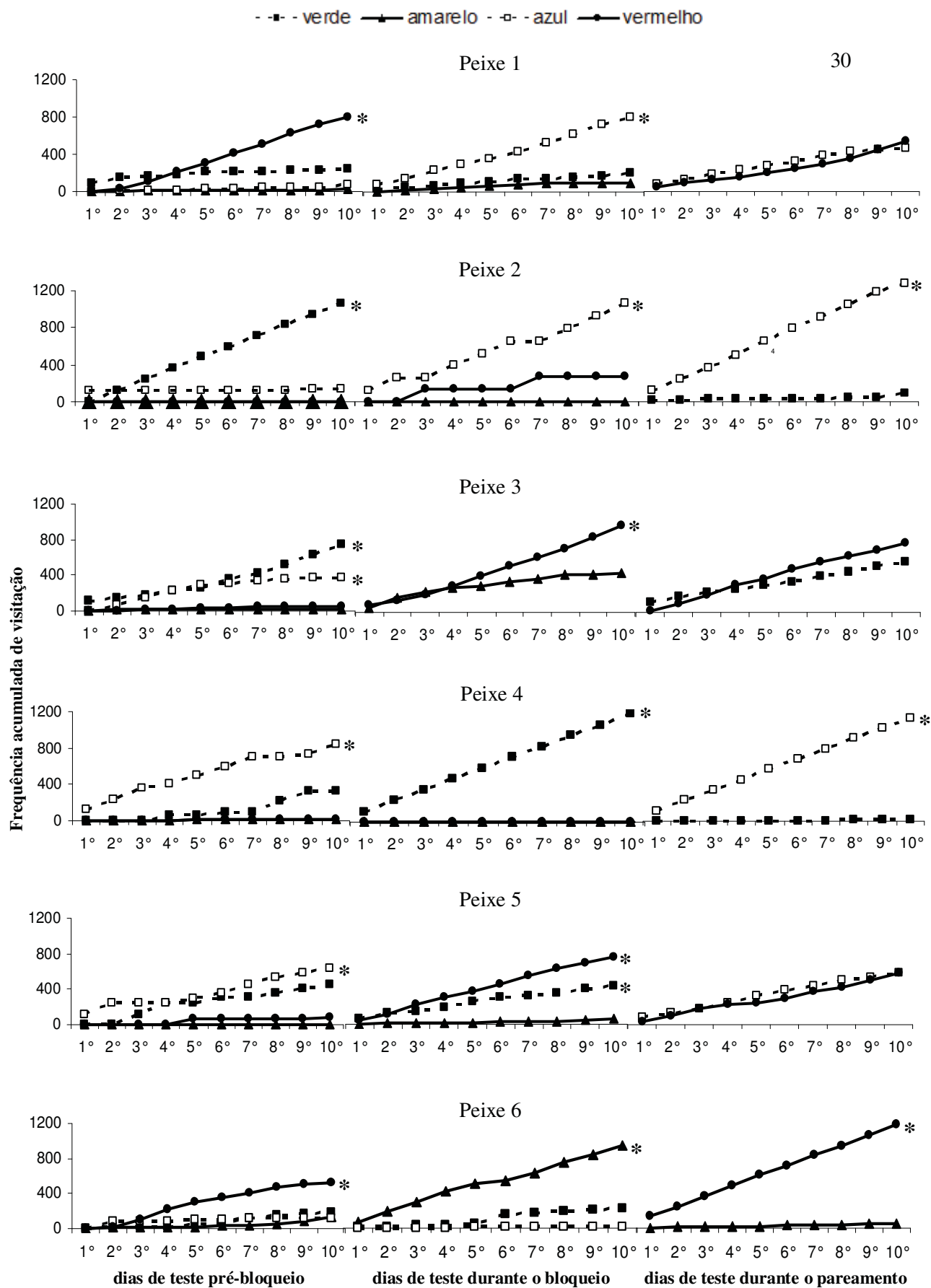


Figura 10: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 primeiros dias de teste (pré-bloqueio); durante o bloqueio (10 dias) e durante o pareamento (10 dias). * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

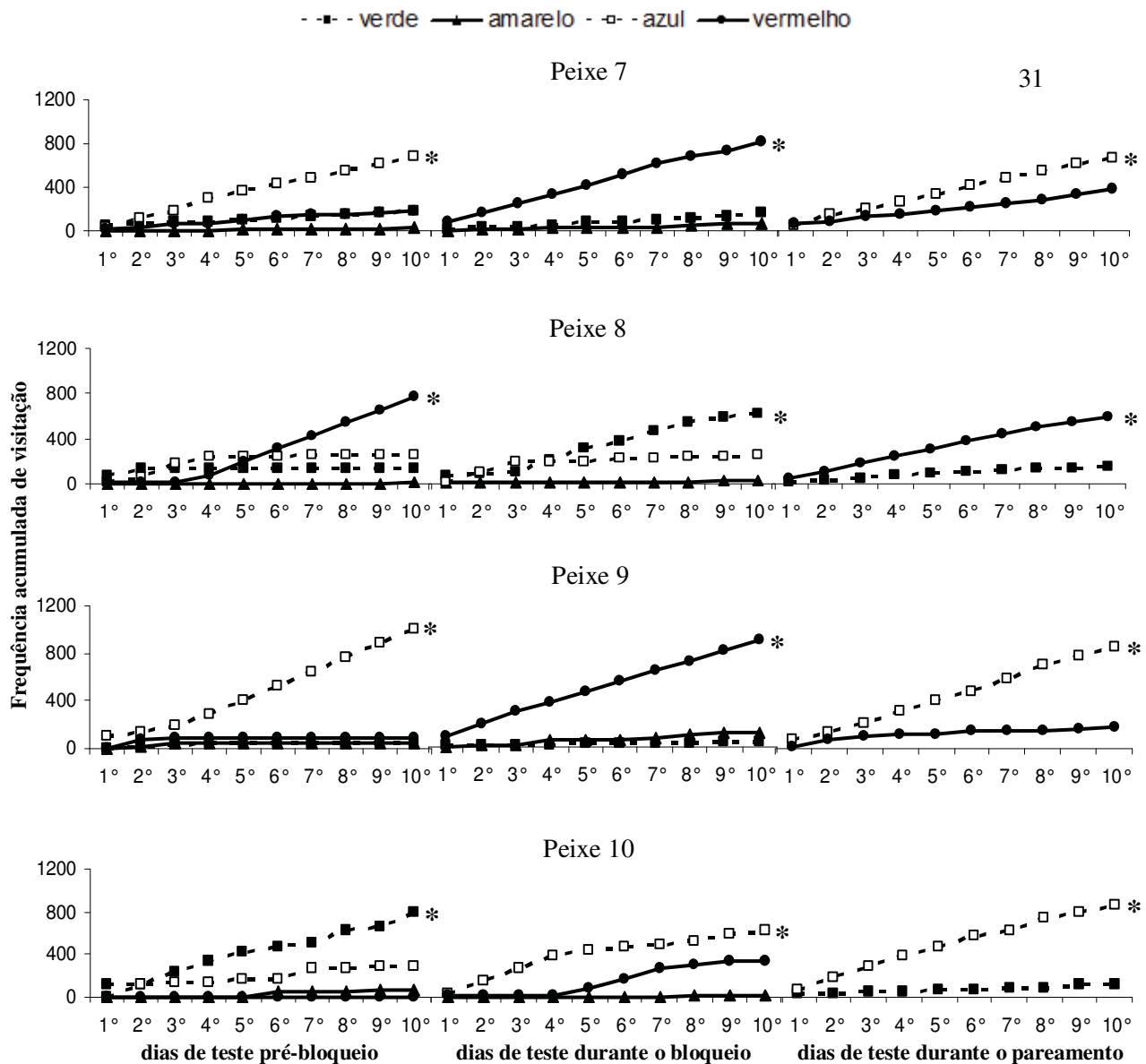


Figura 11: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 primeiros dias de teste (pré-bloqueio); durante o bloqueio (10 dias) e durante o pareamento (10 dias). * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

Experimento 2

Testamos a hipótese de que duas opções de escolha, quando confrontadas entre si, podem levar a ocorrência de falsas preferências.

METODOLOGIA – procedimentos específicos

Como mencionado na *METODOLOGIA – procedimentos específicos* do **Experimento 1** deste capítulo, alguns indivíduos testados inicialmente não apresentaram

preferência pré e/ou pós-bloqueio visualmente evidentes (figura 8). Em oito desses indivíduos (média $\pm$ dp: comprimento total = $7,04 \pm 0,13$ cm e peso = $5,50 \pm 0,48$ g) realizamos o teste do pareamento entre escolhas. Os testes foram realizados conforme o **Experimento 1** do **CAPÍTULO 2** (vide figura 1), exceto pelo fato de que ao invés de parearmos cores preferidas, pareamos cores escolhidas (vide figura 8). Novamente utilizamos análise gráfica visual para determinarmos quais cores foram as mais escolhidas, sem serem preferências, ou seja, embora tivessem frequências de visitação altas, não se destacavam das demais em termos de inclinação das curvas (vide figura 9). Após o teste de pareamento, a análise consistiu em saber se surgiu uma escolha consistente (o que chamamos de falsa preferência) quando pareamos dois itens de escolha. Os detalhes das análises encetadas são apresentados no **CAPÍTULO 3**.

Também realizamos dois dias de intervalo entre os testes, nos mesmos períodos e com as mesmas finalidades descritas no **Experimento 1** do **CAPÍTULO 2** (vide figura 1). A temperatura média dos aquários experimentais durante todo o período de teste foi $24,68 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ dp).

RESULTADOS

Conforme a tabela 3 e as figuras 12 e 13, dos oito indivíduos testados três não apresentaram preferência (peixes 2, 4 e 5) enquanto cinco escolheram consistentemente uma das cores disponíveis (o que chamamos de falsas preferências; peixes 1, 3, 6, 7 e 8). Novamente houve grande variabilidade nas escolhas entre os indivíduos (vide as diferentes cores que foram preferidas e escolhidas na tabela 3 e nas figuras 12 e 13; teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$). O desenvolvimento das escolhas momentâneas que se tornaram consistentes ao longo do tempo (indicando preferências) pode se acompanhado, nas três fases de teste (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento), nas figuras 12 e 13.

Tabela 3: Cores escolhidas (E) e preferidas (P) pelos peixes testados na condição cor ambiental nas fases pré-bloqueio, bloqueio e pareamento.

Peixe	Fase pré-bloqueio				Fase bloqueio				Fase pareamento			
	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd
1	E	P		E	E	---	E	---	---	---	P	
2	P		E	E	---	E	---	E	---	E		---
3	E	E	E	E	---	P	---		P	---	---	
4			P	E	E		---	E	E	---	---	
5	P		E	E	---	E		---	---		E	---
6	E	E	P	E		E	---	E		---	---	P
7	E		E	E	E	E	---	---	P		---	---
8	E		E	E	E		---	E		---	P	---

Vm = vermelho; Am = amarelo; Az = azul; Vd = verde; --- = cor bloqueada (fase bloqueio) ou ausente (fase pareamento). Para definição de E e **P**, vide **INTRODUÇÃO**.

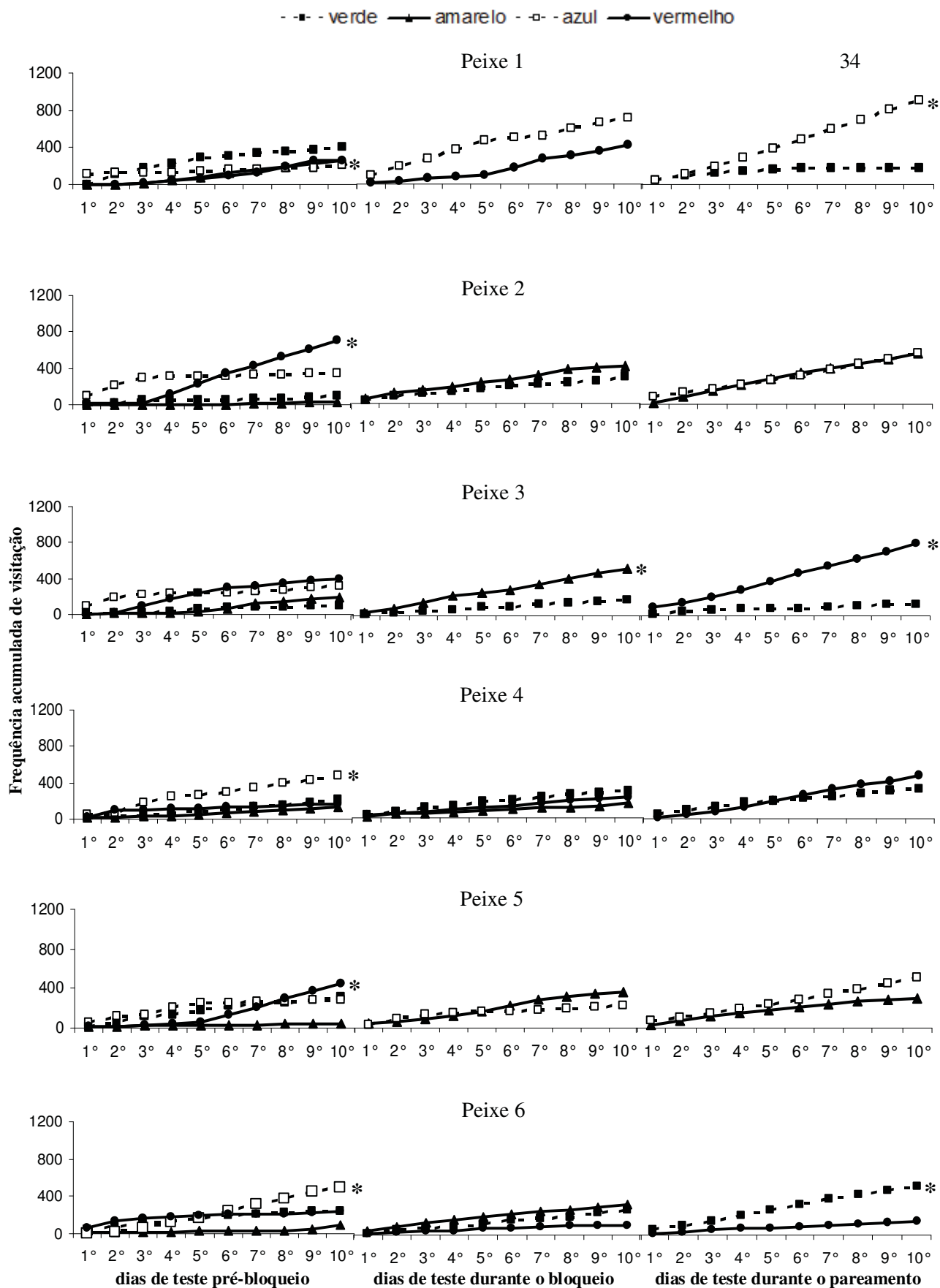


Figura 12: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 primeiros dias de teste (pré-bloqueio); durante o bloqueio (10 dias) e durante o pareamento (10 dias). * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$). No caso do peixe 1, a preferência desenvolvida durante o teste pré-bloqueio foi pela cor amarela.

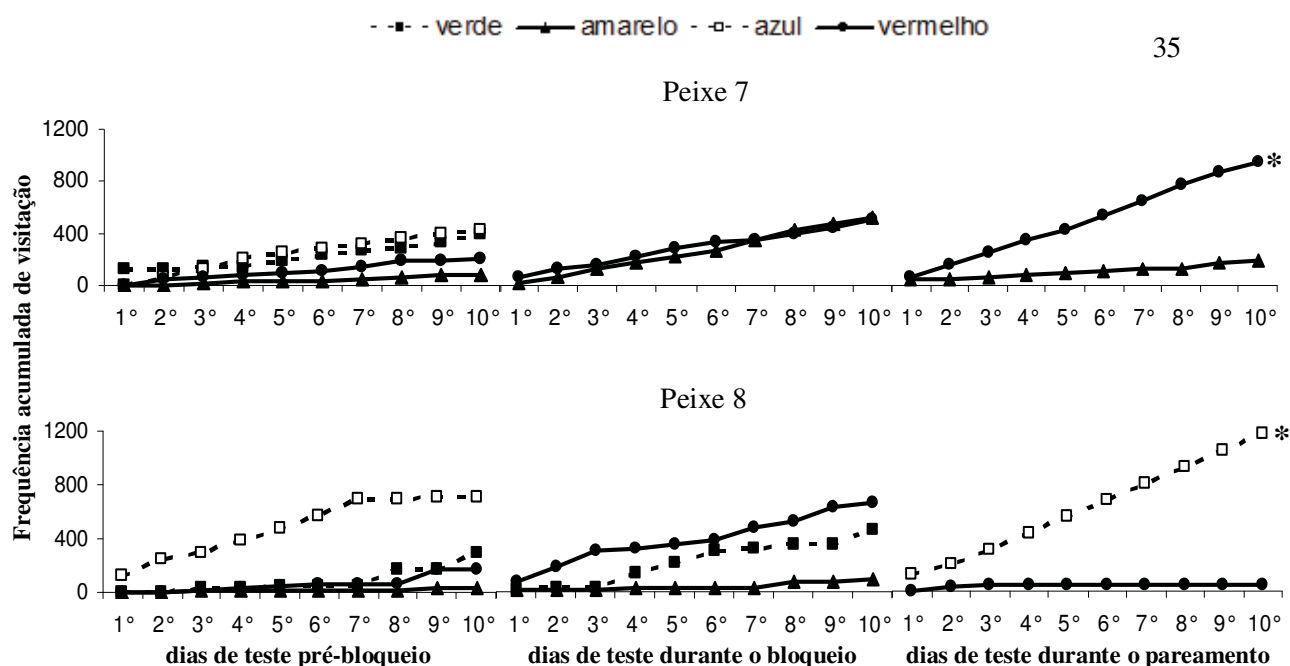


Figura 13: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 primeiros dias de teste (pré-bloqueio); durante o bloqueio (10 dias) e durante o pareamento (10 dias). * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

Teste de pareamento entre uma escolha e uma preferência

Conforme inicialmente não sabíamos qual seria a análise estatística mais adequada para detectar escolhas e preferências, usamos análise visual gráfica dos dados dos testes das fases pré-bloqueio e bloqueio para realizar os testes de pareamento (conforme descrito na *METODOLOGIA – procedimentos específicos* do **Experimento 1** deste capítulo). Assim, considerando que optamos, posteriormente, pela análise dia-a-dia sem os dados dos três primeiros dias (vide **CAPÍTULO 3**), houve casos em que o pareamento ocorreu entre uma escolha e uma preferência ($n = 4$). Nesses casos, a temperatura média dos aquários experimentais durante todo o período de teste foi $24,90 \pm 0,20^\circ\text{C}$ (média $\pm$ dp).

Conforme a tabela 4 e a figura 14, dos quatro indivíduos testados (média $\pm$ dp: comprimento total = $7,03 \pm 0,17\text{cm}$ e peso = $5,63 \pm 0,69\text{g}$), um apresentou escolha consistente pela preferência (peixe 3), dois não desenvolveram escolha consistente (peixes 2 e 4) e um preferiu a escolha (peixe 1) (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$). A tabela 4 mostra as cores escolhidas e preferidas pelos indivíduos. O desenvolvimento das escolhas momentâneas que se tornaram consistentes ao longo do tempo (indicando preferências) pode se acompanhado, nas três fases de teste (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento), na figura 14.

Tabela 4: Cores escolhidas (E) e preferidas (P) pelos peixes testados na condição cor ambiental nas fases pré-bloqueio, bloqueio e pareamento.

Peixe	Fase pré-bloqueio				Fase bloqueio				Fase pareamento			
	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd	Vm	Am	Az	Vd
1			E	E	P		---	---		---	---	P
2	P		E		---	E	P	E	---	---		E
3	E		P	P	E		---	---		---	P	---
4	P		P		---		---	E	---	---	E	

Vm = vermelho; Am = amarelo; Az = azul; Vd = verde; --- = cor bloqueada (fase bloqueio) ou ausente (fase pareamento). Para definição de E e P, vide **INTRODUÇÃO**.

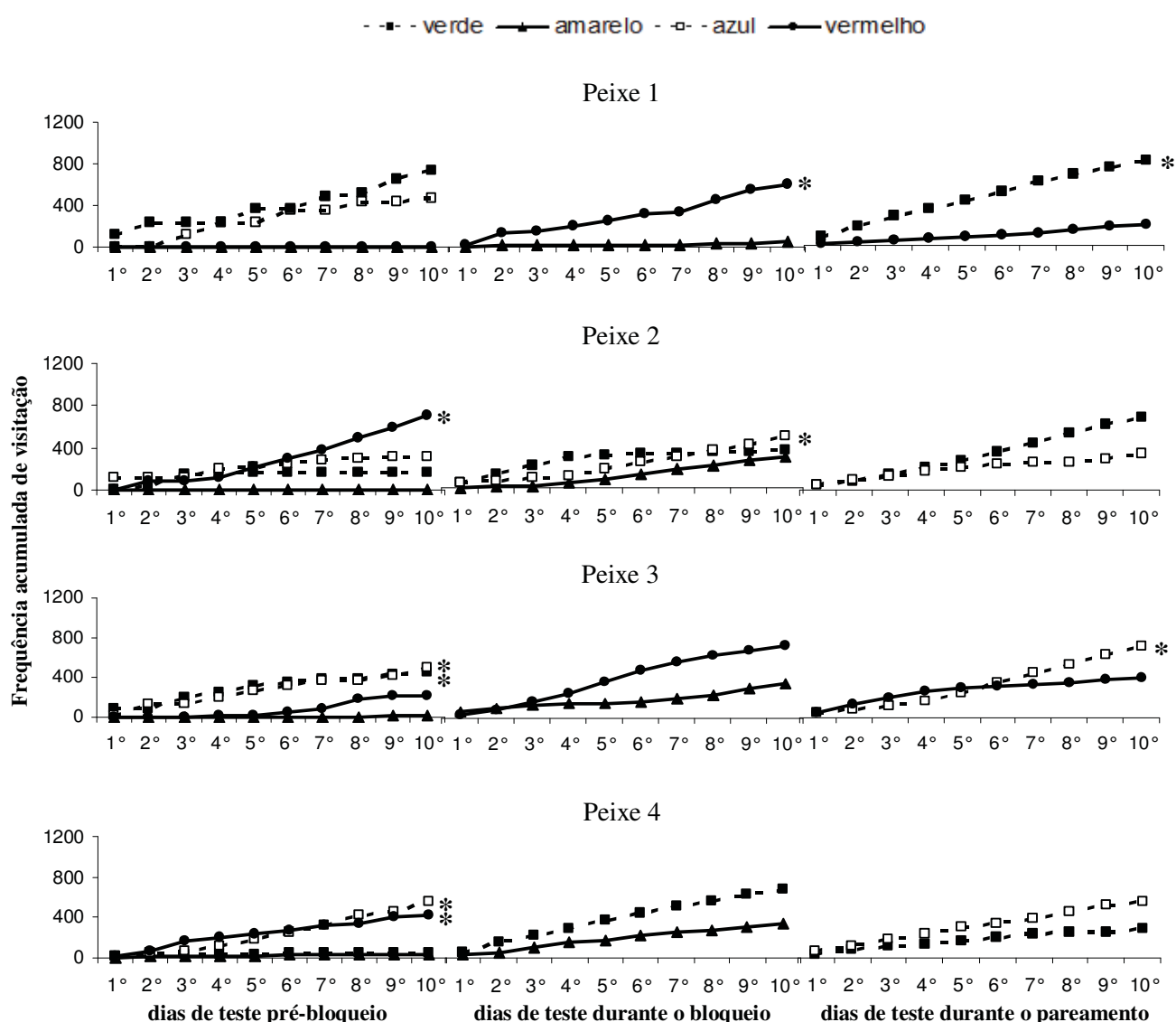


Figura 14: Frequências acumuladas de visitação nos compartimentos de diferentes cores do aquário experimental ao longo dos 10 primeiros dias de teste (pré-bloqueio); durante o bloqueio (10 dias) e durante o pareamento (10 dias). * indica cor significativamente preferida (teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais; $P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que testes que pareiam itens preferidos podem forçar o aparecimento de falsas escolhas (tabela 2 e figuras 10 e 11), bem como testes que pareiam itens escolhidos podem forçar o aparecimento de falsas preferências (tabela 3 e figuras 12 e 13). Além disso, testes que pareiam escolha com preferência podem levar a três respostas individuais (tabela 4 e figura 14): a) preferência do item previamente preferido; b) preferência do item previamente escolhido; e c) escolha, independentemente da opção anterior sobre esse item escolhido. Esses dados reforçam que escolha e preferência devem ser fenômenos mais complexos do que a forma como vêm sendo avaliadas na literatura e que testes de pareamento não são adequados para determinação de escolhas e preferências.

Testes de pareamento têm sido muito utilizados pela literatura para determinar preferências (*e.g.* Bartoshuk *et al.*, 1971; Geller, 1971; Aigner & Balster, 1978; Ryan, 1980; Basolo, 1990; Johnsson *et al.*, 2000; Webster & Hart, 2004; Rios-Cardenas *et al.*, 2007; Walling *et al.*, 2008). Em nosso estudo, vimos que tais testes podem levar à ocorrência tanto de falsas escolhas (tabela 2 e figuras 10 e 11) quanto de falsas preferências (tabela 3 e figuras 12 e 13). Ao parear dois itens que sejam preferências, corre-se o risco do animal alternar sua resposta entre os dois itens pareados, já que há um conflito na escolha entre os dois itens, uma vez que ambos são de preferência do animal. Dessa forma, não identificamos os itens como sendo preferências, mas sim apenas como escolhas, porém, falsas escolhas. A situação inversa (ou seja, a ocorrência de uma falsa preferência) pode acontecer no pareamento entre dois itens que sejam apenas escolhas. Nesse caso, o animal pode escolher consistentemente um dos itens não porque este seja de sua preferência, mas sim porque o animal não possui outras opções e, dessa forma, prefira o melhor item entre as duas opções disponíveis. Ou seja, escolhe o que dispõe numa situação de opções restritas, mas não significa que seja uma preferência irrestrita. Nossos dados mostram que ambas as situações podem ocorrer (tabelas 2 e 3; figuras 10, 11, 12 e 13). Assim, a recomendação de que os testes de escolha sejam feitos em situações de amplas possibilidades (Volpato *et al.*, 2007) é condizente com a base empírica aqui apresentada.

Além disso, como visto anteriormente, nos testes de pareamento por 10 dias entre uma escolha e uma preferência, ocorreram três respostas distintas (tabela 4 e figura 14). Isso refuta nossa hipótese inicial de que, em testes de pareamento entre um item de escolha e um item de preferência, a opção pela preferência se manteria como escolha consistente.

Esses dados mostram a variabilidade intra e interindividual nas respostas, sustentando a complexidade dos fenômenos escolha e preferência. Considerando que a maior parte dos estudos realizados infere preferências a partir de escolhas (*e.g.* Schluter *et al.*, 1998; Schlupp *et al.*, 1999; Gonçalves & Oliveira, 2003; Webster & Hart, 2004; Galhardo *et al.*, 2009; Liao & Lu, 2009) e que a literatura não segue um padrão para o tempo de aplicação dos testes de escolha (*e.g.* preferência definida com base em minutos de observação comportamental: 90s - Spence & Smith, 2006; horas: 3h - Kitamura *et al.*, 2002; três triagens com intervalos de dois dias: Cummings & Mollaghan, 2006), nossos dados mostram a necessidade de se aplicar os testes por mais tempo. Ademais, novamente vemos que testes que pareiam itens podem forçar respostas individuais distintas, uma vez que o indivíduo testado dispõe de apenas duas opções de escolha. Assim, pareamento entre um item de escolha e um item de preferência pode fazer com que a escolha, por ter certa preferência e apresentar-se num sistema de poucas opções, elimine a preponderância do item preferido; inversamente, a força da preferência pode anular uma opção de escolha.

Dessa forma, considerando que testes de escolha visam detectar situações de conforto aos animais, recomendamos que os estudos nessa área utilizem testes de múltipla escolha ao invés de testes de pareamento. Além disso, sugerimos que mais estudos sejam realizados buscando uma melhor compreensão a cerca da plasticidade e complexidade tanto de escolhas quanto de preferências.

Capítulo 3

*Como analisar a ocorrência de escolhas
e preferências?*



partir de uma análise visual dos dados obtidos no **CAPÍTULO 1**, percebemos a necessidade de uma análise mais criteriosa para detectar escolhas e preferências. Dessa forma, num primeiro momento (**Parte I**), avaliamos algumas formas de analisar os dados de escolha e preferência a fim de verificar qual seria a forma mais objetiva de análise para se inferir respostas de escolha e preferência individuais. Essas formas foram testadas nos dados da fase pré-bloqueio do **CAPÍTULO 2**, porque usamos apenas os casos em que os animais estavam sendo submetidos pela primeira vez ao sistema de teste (fase pré-bloqueio – vide figura 1). Assim, testamos a comparação, entre compartimentos, de frequências diárias de visitação e também comparações de frequências somadas ao longo do tempo (cumulativas). A comparação de frequências diárias de visitação se mostrou a mais adequada, uma vez que não superestimou preferências como ocorreu com as análises de comparações de frequências somadas ao longo do tempo. Em seguida (**Parte II**), como constatamos, através de análise visual gráfica, que houve um período de ajuste do peixe ao ambiente de teste, e que este estava prejudicando a detecção de preferências, comparamos novamente as frequências diárias de visitação sem considerar os dados dos três primeiros dias de teste. Por último (**Parte III**), calculamos os coeficientes de variação (CV) das frequências de visitação nos compartimentos tanto para escolhas quanto para preferências, considerando respostas de escolha e preferência como sendo aquelas detectadas pela análise da comparação de frequências diárias de visitação sem os dados dos três primeiros dias. Quando constatamos que essa última era a análise mais adequada, ela foi aplicada aos dados de todos os testes de escolha/preferência realizados neste trabalho (ou seja, tabelas e figuras apresentadas anteriormente, que indicam dados de escolha e preferência individuais, têm base nessa análise).

Parte I

Uma vez que as análises visuais dos dados do **CAPÍTULO 1** revelaram respostas nítidas de escolha e preferência, partimos para um segundo empreendimento: avaliação de formas mais objetivas de análise para se detectar escolha e preferência.

METODOLOGIA

Em todas as comparações que testamos, excluimos o compartimento central, pois ele era estruturalmente diferente dos demais e permitia ampla visualização dos

compartimentos adjacentes, além de funcionar como um corredor de passagem entre as opções de escolha. Dessa forma, esse compartimento não era uma opção de escolha similar às demais e, além disso, registros de indivíduos presentes no compartimento central podem ter ocorrido devido ao fato do animal estar se deslocando de um compartimento a outro. Porém, nas análises estatísticas, incluímos esse compartimento como uma opção de escolha do animal, uma vez que o fato do indivíduo testado estar em um dos compartimentos dependia do fato dele não estar em nenhum dos demais (incluindo o compartimento central). Dessa forma, nas análises estatísticas consideramos cinco compartimentos (opções de escolha) como dependentes entre si, embora não tenhamos comparado a frequência de um desses compartimentos (central) com aquelas dos demais. Com essa consideração, tornamos o teste (Goodman, 1965 - dentro de multinomiais) mais rigoroso para se aceitar algum efeito. O nível de significância foi sempre fixado em 5%.

Os dados que tínhamos para realizar as análises eram as frequências diárias de visitação a cada uma das opções oferecidas (compartimentos). A partir desses dados, testamos as possibilidades de análises descritas a seguir:

a) **Análise dia-a-dia:** as frequências de visitação em cada compartimento eram comparadas entre si (teste de proporção de Goodman), independentemente em cada um dos 10 dias. Quando havia alguma frequência significativamente maior que as demais, essa era considerada escolha nesse dia. Então, avaliávamos a frequência de dias em que essa opção era escolhida. Quando a mesma opção era escolhida em oito ou mais dias de teste, consecutivos ou não, ela era considerada preferência [note que a partir de oito dias, de um total de 10, já existe diferença na proporção de dias pelo teste de Goodman, 1965 – dentro de multinomiais ($8 > 2$; $9 > 1$ e $10 > 0$)].

b) **Análise progressiva das frequências acumuladas:** Comparávamos, entre os compartimentos, as frequências de visitação de cada opção de escolha acumuladas ao longo dos dias (somatório de frequências diárias para cada compartimento), sendo os somatórios das frequências calculados em ordem progressiva (do 1º ao 10º dia). Assim, comparávamos as frequências de visitação, entre si, do 1º dia; em seguida, comparávamos as frequências de visitação, entre si, do 1º dia somadas às do 2º dia; então, comparávamos as frequências de visitação, entre si, do 1º dia somadas às do 2º e 3º dias e, assim por diante, até chegarmos ao 10º dia (quando comparávamos as somas das frequências de visitação de todos os dias entre os compartimentos). Quando havia alguma frequência

acumulada (somada) significativamente maior que as demais, essa era considerada escolha nesse dia. Então, como no caso anterior, avaliávamos a frequência de dias em que cada opção era significativamente escolhida.

c) **Análise regressiva das frequências acumuladas:** Comparávamos, entre os compartimentos, as frequências de visitação de cada opção de escolha acumuladas ao longo dos dias, como no caso anterior, porém obedecendo à ordem regressiva (do 10° ao 1° dia). Assim, começávamos pela comparação entre as frequências de visitação do 10° dia, e em seguida íamos somando e comparando as frequências de visitação entre si em direção ao 1° dia. Novamente, quando havia alguma frequência acumulada (somada) significativamente maior que as demais, essa era considerada escolha nesse dia. Então, como anteriormente, avaliávamos a frequência de dias em que cada opção era significativamente escolhida.

d) **Análise das frequências acumuladas no 10° dia:** Comparávamos, entre os compartimentos, os somatórios das frequências diárias calculado apenas no 10° dia, ou seja, somávamos todas as frequências diárias de visitação para cada um dos compartimentos e comparávamos esses somatórios entre si uma única vez (no 10° dia). Neste caso, consideramos como escolha consistente aquela que foi significativamente escolhida na comparação única entre esses somatórios. Esta análise difere do caso “b” porque não avaliamos o número de dias da escolha, mas apenas a comparação única entre as frequências totais de visitação nos compartimentos.

RESULTADOS

Um número maior de preferências foi detectado através das análises que compararam frequências de visitação acumuladas ao longo dos dias em comparação com a análise dia-a-dia (tabela 5; teste de Goodman, 1964 – entre multinomiais), sendo que a análise das frequências acumuladas no 10° dia foi a que detectou, significativamente, o maior número de preferências (tabela 5; teste de Goodman, 1964 – entre multinomiais). Assim, a análise que comparou frequências diárias de visitação entre os compartimentos (análise dia-a-dia) subestimou as preferências, ou seja, algumas escolhas consistentes não foram detectadas como preferências (vide item a). Já as análises que compararam frequências acumuladas de visitação entre os compartimentos superestimaram as

preferências (principalmente a análise das frequências acumuladas no 10º dia – vide tabela 5), ou seja, algumas preferências detectadas por essas análises não foram escolhas consistentes ao longo dos dias (vide itens b, c e d).

Tabela 5: Cores preferidas pelos peixes testados, detectadas por diferentes formas de análise, na fase pré-bloqueio (CAPÍTULO 2)

Peixe	Preferências detectadas nas análises (fase pré-bloqueio)			
	dia-a-dia	Progressiva das frequências acumuladas	Regressiva das frequências acumuladas	Frequências acumuladas no 10º dia
1	Vm	Vm/Vd	Az/Vm	Vd/Az/Vm
2	---	Vd	Am	Vd
3	---	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Az
4	Vd	Vd/Az	Vd	Vd/Az
5	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Az/Vm
6	Vm	Vd/Az/Vm	Az/Vm	Vd/Az/Vm
7	Az	Az	Vd/Az	Vd/Az
8	Az	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Az/Vm
9	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Az/Vm	Vd/Az/Vm
10	---	Vd/Az	Vm	Vd/Az/Vm
11	Az/Vm	Az/Vm	Az/Vm	Az/Vm
12	---	Az/Vm	Am/Vm	Am/Az/Vm
13	---	Vm	Vd/Am/Vm	Vd/Vm
14	Az	Vd/Az/Vm	Vd/Az	Vd/Az/Vm
15	Az	Az	Vd/Az	Vd/Az
16	---	Vd/Az	Vd/Vm	Vd/Az/Vm
17	---	Vd/Az	Vm	Vd/Az/Vm
18	Az	Vd/Az/Vm	Az	Vd/Az/Vm
19	---	Vd/Az/Vm	Vd/Az/Vm	Vd/Az/Vm
20	Az	Az/Vm	Az	Az/Vm
21	---	Az	Vd/Vm	Vd/Az/Vm
22	Vd	Vd/Az	Vd/Az	Vd/Am/Az
TOTAL	16*	43	41	57**

Vm = vermelho; Vd = verde; Az = azul; Am = amarelo; --- = ausência de preferência. * indica que houve um menor número de preferências detectado na análise dia-a-dia do que nas demais (teste de Goodman, 1964 – entre multinomiais; $P < 0,05$). ** indica que houve um maior número de preferências detectado na análise das frequências acumuladas no 10º dia do que nas demais (teste de Goodman, 1964 – entre multinomiais; $P < 0,05$).

a) **Análise dia-a-dia:** Nesta análise, a detecção das preferências foi prejudicada pelos primeiros dias de teste (peixes 10, 12, 13 e 17), provavelmente por causa do período de ajuste ao novo ambiente (exemplo: tabela 6, cor vermelha), o que acarretou na subestimativa das preferências. Além disso, houve casos (peixes 2, 15, 16, 18, 19) em que

algumas respostas menos intensas, porém consistentes ao longo dos dias, não foram consideradas preferências por esta análise (exemplo: tabela 7, cor verde).

Tabela 6: Exemplo de uma situação experimental em que a detecção das preferências foi prejudicada pelos primeiros dias de teste pela análise dia-a-dia.

Peixe 10	Dias de teste									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Neutro	2	1	2	2	0	4	0	0	4	4
Verde	4	6	33	5	0	3	7	15	17	7
Amarelo	3	0	0	0	0	1	19	1	7	3
Azul	98	112	85	13	7	2	8	9	7	4
Vermelho*	13	1	0	100	113	110	86	95	85	102

* para a cor vermelha, houve uma baixa frequência de visitação nos três primeiros dias de teste, porém a partir do 4° dia vemos um aumento nas frequências de visitação que se mantém até o último dia de teste. Assim, os três primeiros dias de teste devem ter sido um período de ajuste do peixe ao ambiente. Pelo teste de Goodman (1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$), não houve preferência pela cor vermelha, uma vez que a escolha deve se repetir em oito ou mais dias num total de 10 dias de teste para ser considerada, estatisticamente, como preferência por esta análise. Assim houve uma subestimativa da preferência por essa cor.

Tabela 7: Exemplo de uma situação experimental em que houve frequência de visitação baixa, porém consistente ao longo dos dias.

Peixe 16	Dias de teste									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Neutro	24	13	8	8	20	1	4	9	5	13
Verde*	18	38	66	17	34	51	13	21	30	23
Amarelo	10	9	5	5	4	0	2	3	1	2
Azul	57	58	20	80	40	4	14	3	10	3
Vermelho	11	2	21	10	22	64	87	84	74	79

* para a cor verde, houve uma frequência de visitação considerável, embora baixa, mas que variou pouco ao longo dos 10 dias de teste (contraste com o período do 6° ao 10° dia da cor vermelha). Pelo teste de Goodman (1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$), não houve preferência pela cor verde quando utilizamos a análise dia-a-dia. Assim houve uma subestimativa da resposta menos intensa, porém consistente, dessa cor.

b) **Análise progressiva das frequências acumuladas:** Supervalorizou os primeiros dias de teste em vários indivíduos testados (peixes 1, 4, 6, 10, 12, 16, 17, 18, 20, 22), pois os primeiros dias foram sendo somados e comparados ao longo dos dias. Dessa forma, se em um dos dias iniciais do teste tínhamos, por exemplo, uma alta frequência de visitação em uma determinada cor que não se repetiu nos outros dias, a análise detectou essa cor como preferência (exemplo: tabela 8, cor azul).

Tabela 8: Exemplo de uma situação experimental em que os primeiros dias de teste foram supervalorizados pela análise progressiva das frequências acumuladas.

Peixe 4	Dias de teste									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Neutro	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0
Verde	0	120	120	120	120	114	120	120	108	120
Amarelo	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Azul*	120	0	0	0	0	0	0	0	11	0
Vermelho	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

* para a cor azul, houve uma alta frequência de visitação no 1° dia de teste, porém a partir do 2° dia vemos uma queda nas frequências de visitação que se mantém até o último dia de teste. Pelo teste de Goodman (1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$), houve preferência pela cor azul, uma vez que nesta análise as frequências de visitação dos primeiros dias foram somadas às demais ao longo das comparações diárias. Assim houve uma supervalorização da alta frequência de visitação da cor azul no 1° dia, o que acarretou na superestimativa da preferência por essa cor.

c) **Análise regressiva das frequências acumuladas:** Supervalorizou os últimos dias de teste em alguns indivíduos testados (peixes 7, 9, 13 e 21), pois os últimos dias foram sendo somados e comparados ao longo dos dias. Dessa forma, se em um dos dias finais do teste tínhamos, por exemplo, uma alta frequência de visitação em uma determinada cor que não se repetiu nos outros dias, a análise detectou essa cor como preferência (exemplo: tabela 9, cor verde).

Tabela 9: Exemplo de uma situação experimental em que os últimos dias de teste foram supervalorizados pela análise regressiva das frequências acumuladas.

Peixe 21	Dias de teste									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Neutro	0	0	7	3	5	1	0	0	2	0
Verde*	0	0	25	13	4	10	0	112	5	117
Amarelo	0	0	15	3	1	2	0	2	1	0
Azul	120	120	50	87	101	97	120	5	1	2
Vermelho	0	0	23	14	9	10	0	1	111	1

* para a cor verde, houve uma alta frequência de visitação no 8° e 10° dias de teste, porém nos dias anteriores vemos uma queda nas frequências de visitação. Pelo teste de Goodman (1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$), houve preferência pela cor verde, uma vez que nesta análise as frequências de visitação dos últimos dias foram somadas às demais ao longo das comparações diárias. Assim houve uma supervalorização da alta frequência de visitação da cor azul no 8° e 10° dias, o que acarretou na superestimativa da preferência por essa cor.

d) **Análise das frequências acumuladas no 10° dia:** Supervalorizou todo e qualquer dia de teste em vários indivíduos testados (peixes 1, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 20, 21 e 22). Como nesta análise comparamos uma única vez, entre si, as frequências de visitação de todos os dias somadas, qualquer dia de teste em que tenha ocorrido uma alta frequência de visitação em uma determinada cor, sem que esta tenha se repetido nos outros dias, levou à detecção de preferência para essa cor (exemplo: tabela 10, cor amarela). Por isso, nesta análise, tivemos o maior número de preferências detectadas (vide tabela 5).

Tabela 10: Exemplo de uma situação experimental em que um dos dias de teste foi supervalorizado pela análise das frequências acumuladas no 10º dia.

Peixe 22	Dias de teste									
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Neutro	0	0	0	2	1	0	1	0	56	0
Verde	120	0	113	102	81	63	25	120	42	120
Amarelo*	0	0	0	3	0	56	0	0	3	0
Azul	0	120	7	10	38	0	94	0	19	0
Vermelho	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0

* para a cor amarela, houve uma alta frequência de visitação no 6º dia de teste, porém tanto nos dias anteriores quanto nos posteriores, vemos uma queda nas frequências de visitação para essa cor. Pelo teste de Goodman (1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$), houve preferência pela cor amarela, uma vez que a frequência de visitação do 6º dia foi somada às demais para a comparação única entre as frequências somadas no 10º dia. Assim houve uma supervalorização da alta frequência de visitação da cor amarela no 6º dia, o que acarretou na superestimativa da preferência por essa cor.

Parte II

Uma análise visual dos dados obtidos na fase pré-bloqueio do **CAPÍTULO 2** indica que nos primeiros dias de teste houve menor definição nas escolhas do que nos dias seguintes. Como isso pode decorrer do processo de ajuste dos animais à situação de teste, refizemos as análises da opção análise dia-a-dia, que foi a que melhor identificou as escolhas e preferências, pois não superestimou as últimas, excluindo-se os dados dos três primeiros dias.

METODOLOGIA

Da análise visual das frequências cumulativas do período pré-bloqueio dos 22 peixes apresentados no **CAPÍTULO 2**, vemos que as distinções de escolha que começam a caracterizar um comportamento linear aumentando com o passar dos dias iniciaram-se, em média ($\pm$ dp), após $3,73 \pm 1,96$ dias (período de ajuste ao ambiente de teste - vide exemplos na figura 15), e que a mediana desses dados foi 4,0. Porém, consideramos que a opção de excluir os quatro primeiros dias deixava pouca flexibilidade para os próximos dias de análise (seis dias seguintes), o que reduziria as análises de proporção dos dias. Assim, optamos por excluir os três primeiros dias de teste e refazer a análise dia-a-dia, pois a exclusão dos três primeiros dias já reduz consideravelmente o efeito de ajuste dos animais e possibilita maior período para análise das escolhas posteriores. Além disso, a retirada dos três primeiros dias das análises não prejudica a detecção das preferências em casos onde o período de ajuste ao ambiente é de um, dois, três ou quatro dias de teste (vide figura 16).

Assim como descrito na **Parte I**, aqui o compartimento central também foi excluído de todas as comparações entre as frequências, embora tenhamos considerado os cinco compartimentos como sendo dependentes entre si para aplicação do teste de Goodman (1965 – dentro de multinomiais). O nível de significância foi fixado em 5%.

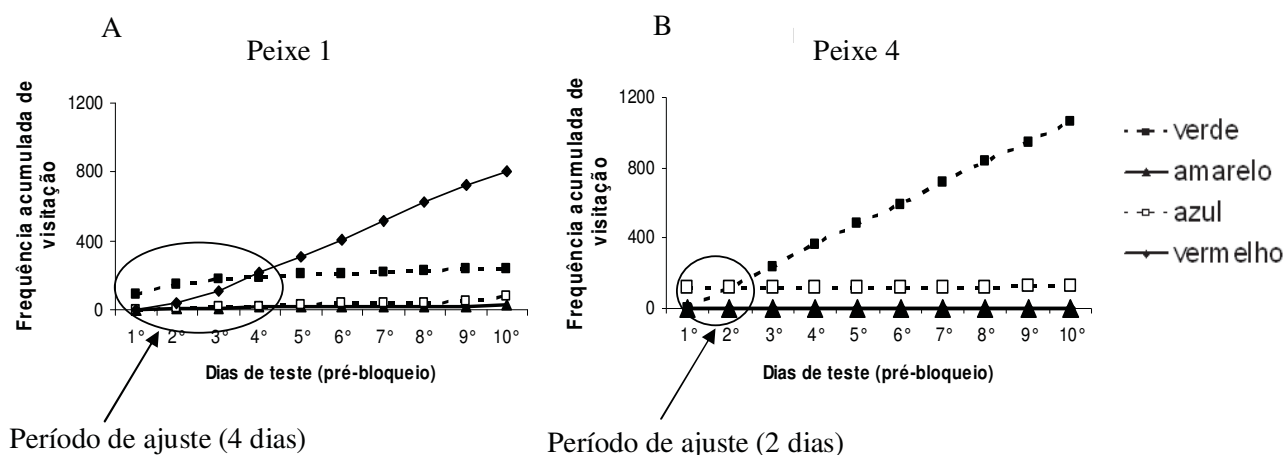


Figura 15: Exemplos de gráficos de frequências acumuladas de visitação onde, visualmente, detectamos o período de ajuste dos indivíduos testados. A – Houve um período de ajuste ao ambiente novo de quatro dias. B – Houve um período de ajuste ao ambiente novo de dois dias. Seguindo o período de ajuste, as preferências individuais claramente se estabelecem.

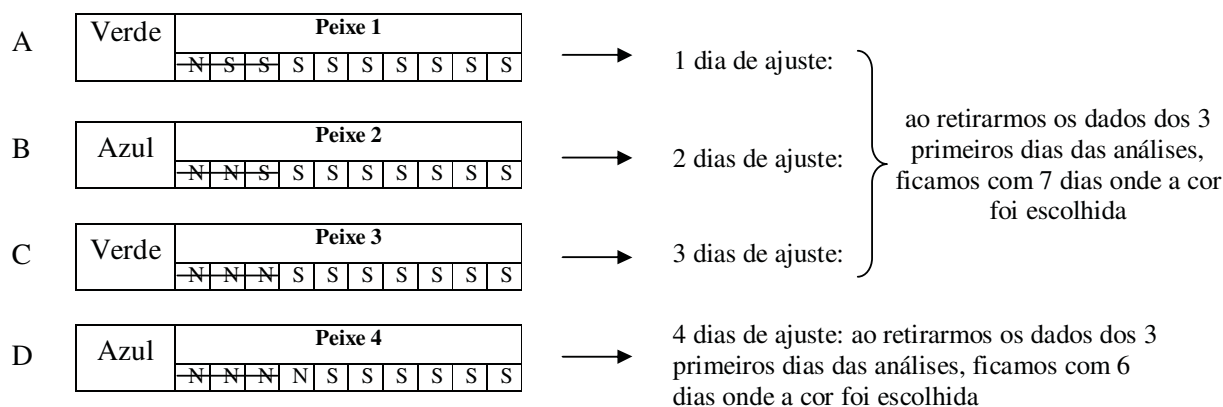


Figura 16: Exemplos hipotéticos de situações onde há um período de ajuste dos peixes ao ambiente novo. Cada “S” ou “N” representa a escolha ou não escolha, respectivamente, em cada um dos 10 dias de teste. A – um dia de ajuste; B – dois dias de ajuste; C – três dias de ajuste; D – quatro dias de ajuste. Ao retirarmos os dados dos três primeiros dias das análises, temos um restante de sete dias de teste, situação na qual as opções escolhidas por seis ou sete dias são consideradas consistentes (teste de Goodman, 1965 - dentro de multinomiais; $P < 0,05$). Assim, identificamos preferências em todas as situações acima.

RESULTADOS

- **Análise dia-a-dia sem os dados dos três primeiros dias:** Ao contrário da análise dia-a-dia quando não excluímos os dados dos três primeiros dias de observação (**Parte I**), a exclusão dessas observações iniciais (período de ajuste) não prejudicou a detecção das preferências (note que na tabela 11 aparecem mais preferências na análise dia-a-dia dos últimos sete dias – sem os dados dos três primeiros dias - do que na análise dia-a-dia). Porém, houve casos (peixes 15, 16, 18 e 19) em que algumas respostas consistentes ao longo dos dias, porém menos intensas, também não foram consideradas preferências por esta análise (exemplo: tabela 7, cor verde).

Tabela 11: Cores preferidas pelos peixes testados, detectadas por diferentes formas de análise, na fase pré-bloqueio (**CAPÍTULO 2**).

Peixe	Preferências detectadas nas análises (fase pré-bloqueio)	
	dia-a-dia	dia-a-dia
	(10 dias)	(últimos 7 dias)
1	Vm	Vm
2	---	Am
3	---	---
4	Vd	Vd
5	Vd/Az	Vd/Az
6	Vm	Vm
7	Az	Az
8	Az	Az
9	Vd/Az	Vd/Az
10	---	Vm
11	Az/Vm	Az/Vm
12	---	---
13	---	Vm
14	Az	Az
15	Az	Az
16	---	Vm
17	---	Vm
18	Az	Az
19	---	---
20	Az	Az
21	---	---
22	Vd	Vd

Vm = vermelho; Vd = verde; Az = azul; Am = amarelo; --- = ausência de preferência.

Parte III

Uma vez que na análise dia-a-dia sem os dados dos três primeiros dias a detecção das preferências não foi prejudicada pelos primeiros dias de teste e, além disso, esta análise não superestimou preferências, ela foi selecionada e, em seguida, procedemos para o cálculo dos coeficientes de variação (CV) das frequências de visita dos 10 dias de teste. O cálculo foi feito tanto para escolhas quanto para preferências, a fim de identificar diferenças entre esses dois perfis. O pressuposto nesta proposta é que preferências exibam menor variabilidade ao longo dos dias, comparadas às escolhas. Fizemos tais análises tanto para os dados do **CAPÍTULO 1** quanto para os do **CAPÍTULO 2**.

METODOLOGIA

Calculamos o coeficiente de variação (CV) das frequências de visita em cada opção de escolha ou preferência para cada grupo de 10 dias de teste. Dessa forma, pudemos avaliar quanto, proporcionalmente, o desvio se afastou da média das frequências diárias de visita. Então, comparamos essa variabilidade (CV) entre os casos considerados escolha e aqueles considerados preferência pelo exame apresentado na **Parte II** (análise dia-a-dia sem os dados dos três primeiros dias). Nosso foco aqui foi verificar se os coeficientes de variação das escolhas foram significativamente maiores que aqueles das preferências, uma vez que, pelo fato da escolha não persistir em longo prazo, esperávamos que os desvios em relação às médias fossem maiores nas escolhas que aqueles das preferências. Assim, procedemos à comparação dos conjuntos de CVs das opções de escolha *versus* as opções de preferência em cada grupo de 10 dias de teste. Como esses valores foram heterocedásticos (teste F-Max) os valores que apresentaram distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov) foram comparados por teste t não pareado, com a correção Welch, e aqueles que não mostraram normalidade foram comparados por teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em 5%.

RESULTADOS

- **CAPÍTULO 1:** Para ambas as condições de teste (cor ambiental e granulometria de substrato), os coeficientes de variação das escolhas foram significativamente maiores

que aqueles das preferências (tabela 12). Os valores máximos e mínimos dos coeficientes de variação das escolhas e preferências são indicados na tabela 12.

- **CAPÍTULO 2:** Para todas as fases de teste (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento), os coeficientes de variação das escolhas foram significativamente maiores que aqueles das preferências (tabela 12). Os valores máximos e mínimos dos coeficientes de variação das escolhas e preferências são indicados na tabela 12.

Independente do capítulo do qual os dados foram analisados, da condição (cor ambiental ou granulometria de substrato) ou da fase de teste (pré-bloqueio, bloqueio ou pareamento), os coeficientes de variação das preferências foram sempre menores que 90 % (tabela 12), enquanto para as escolhas vemos coeficientes de variação de até quase 290% (embora também tenham ocorrido valores menores que 90% – tabela 12).

Tabela 12: Padrões de coeficientes de variação (CVs) das frequências de visitação nos compartimentos segundo classificações de escolha (E) ou preferência (P).

	N	Média $\pm$ dp	Mediana	Mínimo	Máximo
CAPÍTULO 1					
Cor ambiental	24				
E		82,72 $\pm$ 34,11 *	---	36,09	150,92
P		48,80 $\pm$ 14,60	---	24,88	73,38
Granulometria	23				
E		---	67,88*	27,70	272,41
P		---	47,20	32,07	79,85
CAPÍTULO 2					
Pré-bloqueio	22				
E		114,73 $\pm$ 57,91 *	---	42,71	287,94
P		59,91 $\pm$ 14,98	---	31,77	85,52
Bloqueio	22				
E		64,49 $\pm$ 46,29*	---	19,61	209,73
P		31,85 $\pm$ 20,70	---	0	67,95
Pareamento	22				
E		34,48 $\pm$ 18,69*	---	16,52	83,53
P		16,53 $\pm$ 9,65	---	1,08	37,19

A comparação dos CVs entre escolhas e preferências na condição cor ambiental, fase pré-bloqueio, fase bloqueio e fase pareamento foi feita por teste t não pareado com correção Welch ($P < 0,0001$, $t = 5,40$; $P < 0,0001$, $t = 5,97$; $P < 0,005$, $t = 3,03$ e $P < 0,016$, $t = 2,81$, respectivamente). Na condição granulometria de substrato, a comparação dos CVs foi feita por teste Mann-Whitney ($P < 0,007$, $U = 160$). * indica diferença significativa entre os CVs das escolhas e aqueles das preferências em cada condição (cor ambiental e granulometria de substrato) ou fase (pré-bloqueio, bloqueio e pareamento). Os valores de CV são apresentados em %.

DISCUSSÃO

Das opções de análise investigadas, vimos que cada uma pode interferir nas constatações de escolha e preferência. Delas, a melhor opção é a análise dia-a-dia (análise das frequências diárias de visitação), excluindo-se os dados dos três primeiros dias de observação (pois este é um período de ajuste do animal ao ambiente de teste), complementada pela análise do coeficiente de variação (CV) das escolhas e preferências.

Em análises de frequências acumuladas de visitação, sejam elas aplicadas em ordem progressiva, regressiva ou por somatórios totais comparados no 10º dia de observação, há a detecção de respostas menos intensas, porém consistentes, como preferências, mas pode ocorrer a detecção de escolhas inconsistentes ao longo do tempo como preferências (vide tabelas 8, 9 e 10). Já em análises de frequências diárias de visitação, não há detecção de escolhas que são inconsistentes como preferências, porém, também não há detecção de algumas respostas menos intensas como preferências (vide tabela 7), mesmo com a retirada das observações dos três primeiros dias das análises. Ou seja, embora analisar sem os dados dos três primeiros dias de teste, comparando frequências diárias de visitação, não tenha prejudicado a detecção de preferências que se estabelecem após o período de ajuste, ainda há casos em que preferências menos intensas não são detectadas.

O fato dos CVs das escolhas serem significativamente maiores que aqueles das preferências (tabela 12) mostra que, nos casos de escolha, a proporção para a qual o desvio se distancia da média é maior do que em casos de preferência. Isso faz sentido, uma vez que nas escolhas ocorrem frequências mais elevadas em apenas um ou alguns dias o que gera um desvio grande em torno da média. Por outro lado, nas preferências as frequências mais elevadas normalmente oscilam pouco ao longo do tempo, o que gera um desvio menor em torno das médias. Ou seja, os dados da diferença entre os CVs reforçam a existência dos fenômenos escolha e preferência.

Além dessa utilidade geral da análise do CV, no caso da tilápia-do-Nilo para a escolha de cor ambiental ou granulometria de substrato, determinamos o limiar de 90% a partir do qual as respostas são consideradas escolhas. De fato, nas preferências, não houve $CV \geq 90\%$, enquanto que nas escolhas os CVs alcançaram valores próximos a 290% (vide tabela 12). Com isso, embora não possamos diferenciar escolha de preferência nos casos de $CV < 90\%$, a ultrapassagem desse limiar sugere tratar-se de escolha. Notem que tal decisão, para se tornar mais sólida, deve vir associada à análise dia-a-dia executada

excluindo-se os dados dos três primeiros dias, agora sim caracterizando um bom sistema de análise das escolhas e preferências.

Outra implicação de nosso estudo é que os melhores resultados são obtidos quando excluimos o período de ajuste (no caso das condições deste estudo, os três primeiros dias). Considerando que a maioria dos estudos de escolha infere preferência a partir de escolhas detectadas em, no máximo, quatro dias (*e.g.* Ryan, 1980; Godin & Dugatkin, 1995; Schluter *et al.*, 1998; Schlupp *et al.*, 1999; Gonçalves & Oliveira, 2003; Webster & Hart, 2004; Wolfgang & Birkhead, 2004; Cummings & Mollaghan, 2006; Rios-Cardenas *et al.*, 2007; Liao & Lu, 2009; Browne *et al.*, 2010), nossos dados indicam que muitos desses precisem de uma reavaliação antes que se usem tais respostas para propósitos práticos sobre o bem-estar desses animais.

Neste contexto, recomendamos a utilização da análise dia-a-dia (análise das frequências diárias de visitação) sem os dados dos três primeiros dias de observação para avaliar a ocorrência de escolhas e preferências. Embora essa análise não detecte respostas menos intensas como preferências, com a sua utilização não corremos o risco de detectar como preferências aquelas opções que não foram consistentemente escolhidas ao longo dos dias. Além disso, com esta análise, a detecção das preferências não é prejudicada pelos primeiros dias de teste (período de ajuste ao ambiente). Também sugerimos a comparação entre os coeficientes de variação de escolhas e preferências, pois esta ajuda a confirmar a existência desses dois distintos perfis.

Conclusões



á escolhas apenas momentâneas e também aquelas que são consistentes ao longo do tempo, ou seja, escolha e preferência são dois fenômenos distintos que devem ser bem mais complexos do que a forma como vem sendo tratados na literatura. Além disso, testes que pareiam opções de escolha podem forçar o aparecimento de falsas escolhas e preferências. Esses dados sustentam a importância da aplicação de testes de múltipla escolha ao longo do tempo para a determinação das preferências. Recomendamos cautela ao extrapolar as preferências de alguns indivíduos para toda a espécie, uma vez que neste trabalho a variabilidade de resposta intra e interindividual foi grande. Ademais, vimos que análises estatísticas que comparam as frequências diárias de visitaçoão podem subestimar preferências enquanto análises que comparam as frequências de visitaçoão somadas ao longo dos dias podem superestimar preferências. Assim, para avaliar a ocorrência de escolhas e preferências, recomendamos a utilização da análise dia-a-dia (análise das frequências diárias de visitaçoão) sem os dados dos três primeiros dias de teste (período de ajuste ao ambiente), pois além de não superestimar preferências esta análise minimiza a subestimaçoão dessas últimas. Além disso, incentivamos a comparaçoão entre os coeficientes de variaçoão de escolhas e preferências como complementaçoão às análises de dados.

Referências

- Aigner, T.G. & Balster, R.L. 1978. Choice behavior in rhesus monkeys: cocaine versus food. *Science*, 201: 534-535.
- Bartoshuk, L.M.; Harned, M.A. & Parks, L.A. 1971. Taste of water in the cat: effects of sucrose preference. *Science*, 171: 699-701.
- Basolo, A.L. 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science*, 250: 808-810.
- Bennett, W.R.; Edmondson, G.; Williamson, K. & Gelley, J. 2007. An investigation of the substrate preference of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) eleutheroembryos. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 539-542.
- Braithwaite, V.A. & Barber, I. 2000. Limitations to colour-based sexual preferences in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47: 413-416.
- Browne, W.J.; Caplen, G.; Edgar, J.; Wilson, L.R. & Nicol, C.J. 2010. Consistency, transitivity and inter-relationships between measures of choice in environmental preference tests with chickens. *Behavioural Processes*, 83: 72-88.
- Broom, D.M. 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69(10): 4167-4175.
- Burfeind, D.D.; Tibbetts, I.R. & Udy, J.W. 2009. Habitat preference of three common fishes for seagrass, *Caulerpa taxifolia*, and unvegetated substrate in Moreton Bay, Australia. *Environmental Biology of Fishes*, 84: 317-322.
- Cummings, M. & Mollaghan, D. 2006. Repeatability and consistency of female preference behaviours in a northern swordtail, *Xiphophorus nigrensis*. *Animal Behaviour*, 72: 217-224.
- Dawkins, M.S. 2006. Through animal eyes: what behaviour tell us. *Applied Animal Behaviour Science*, 100: 4-10.
- Dawkins, M.S. 2008. The science of animal suffering. *Ethology*, 114: 937-945.

- Duncan, I.J.H. 2006. The changing concept of animal sentience. *Applied Animal Behaviour Science*, 100: 11-19.
- Freitas, R.H.A. & Volpato, G.L. 2011. Avaliação do bem-estar da tilápia-do-Nilo a partir do esforço para obtenção de condições de preferência. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP – campus de Botucatu (SP).
- Galhardo, L.; Almeida, O. & Oliveira, R.F. 2009. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Applied Animal Behaviour Science*, 120: 224-230.
- Geller, I. 1971. Ethanol preference in the rat as a function of photoperiod. *Science*, 173: 456-459.
- Gestich, C.C. & Volpato, G.L. 2009. Escolha de pareamento com coespecíficos na tilápia-do-Nilo: o tamanho e o horário do dia são importantes? In: XIX Congresso de Biólogos do CRBio-01 (SP, MT, MS), 2009, São Pedro. Anais do XIX Congresso de Biólogos do CRBio-01.
- Girguis, P.R. & Lee, R.W. 2006. Thermal preference and tolerance of alvinellids. *Science*, 312: 231.
- Godin, J.J. & Dugatkin, L.A. 1995. Variability and repeatability of female mating preference in the guppy. *Animal Behaviour*, 49: 1427-1433.
- Gonçalves, D.M. & Oliveira, R.F. 2003. Time spent close to a sexual partner as a measure of female mate preference in a sex-role-reversed population of the blenny *Salaria pavo* (Risso) (Pisces: Blenniidae). *Acta Ethologica*, 6: 1-5.
- Goodman, L.A. 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics, Hayward*, 35: 716-725.
- Goodman, L.A. 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Techometrics*, 7(2): 247-254.

- Harrison, R. 1964. Animal Machines: The new factory farming industry. *Vincent Stuart Publishers, London*. 186 p.
- Johnsson, J.I.; Carlsson, M. & Sundstrom, L.F. 2000. Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48: 373-377.
- Kitamura, J.; Taru, M. & Sunobe, T. 2002. Female preference of the gobiid fish *Eviota abax* in relation to elongation of the first dorsal spine in males. *Journal of Ethology*, 20: 133-135.
- Liao, W.B. & Lu, X. 2009. Male mate choice in the Andrew's toad *Bufo andrewsi*: a preference for larger females. *Journal of Ethology*, 27: 413-417.
- Luchiari, A.C.; Duarte, C.R.A.; Freire, F.A.M. & Nissinen, K. 2007. Hierarchical status and colour preference in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Ethology*, 25: 169-175.
- Matsumoto, Y.; Takegaki, T.; Tawa, A. & Natsukari, Y. 2008. Female within-nest spawning-site preference in a paternal brooding blenny and its effect on the female mate choice. *Journal of Zoology*, 276: 48-53.
- Mendonça, F.Z.; Volpato, G.L.; Costa-Ferreira, R.S. & Gonçalves-de-Freitas, E. 2010. Substratum choice for nesting in male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 77: 1439-1445.
- Miyai, C.A.; Sanches, F.H.C.; Costa, T.M.; Colpo, K.D.; Volpato, G.L. & Barreto, R.E. 2011. The correlation between subordinate fish eye colour and received attacks: a negative social feedback mechanism for the reduction of aggression during the formation of dominance hierarchies. *Zoology*, 114: 335-339.
- Pompilio, L.; Kacelnik, A. & Behmer, S.T. 2006. State-dependent learned valuation drives choice in an invertebrate. *Science*, 311: 1613-1615.

- Rios-Cardenas, O.; Tudor, M.S. & Morris, M.R. 2007. Female preference variation has implications for the maintenance of an alternative mating strategy in a swordtail fish. *Animal Behaviour*, 74: 633-640.
- Ryan, M.J. 1980. Female mate choice in a neotropical frog. *Science*, 209: 523-525.
- Schilman, P.E. & Lazzari, C.R. 2004. Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. *Acta Tropica*, 90: 115-122.
- Schlupp, I.; Waschulewski, M. & Ryan, M.J. 1999. Female preferences for naturally occurring novel male traits. *Behaviour*, 136: 519-527.
- Schluter, A.; Parzefall, J. & Schlupp, I. 1998. Female preference for symmetrical vertical bars in male sailfin mollies. *Animal Behaviour*, 56: 147-153.
- Snowberg, L.K. & Benkman, C.W. 2009. Mate choice based on a key ecological performance trait. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 762-769.
- Soriguer, M.C.; Domezain, A.; Aragonés, J.; Domezain, J. & Hernando, J.A. 2002. Feeding preference in juveniles of *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 691-694.
- Spence, R. & Smith, C. 2006. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology*, 17(5): 779-783.
- Stoner, A.W. & Abookire, A.A. 2002. Sediment preferences and size-specific distribution of young-of-the-year Pacific halibut in an Alaska nursery. *Journal of Fish Biology*, 61: 540-559.
- Stoner, A.W. & Ottmar, M.L. 2003. Relationships between size-specific sediment preferences and burial capabilities in juveniles of two Alaska flatfishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 282: 85-101.
- Thomas, S.A. 2002. Scent marking and mate choice in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Animal Behaviour*, 63: 1121-1127.

- Volpato, G.L.; Luchiari, A.C.; Duarte, C.R.A.; Barreto, R.E. & Ramanzini, G.C. 2003. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 1659-1663.
- Volpato, G.L.; Freitas, E.G. & Castilho, M.F. 2007. Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75: 165-171.
- Volpato, G.L.; Giaquinto, P.C.; Castilho, M.F.; Barreto, R.E. & Freitas, E.G. 2009. Animal welfare: from concepts to reality. *Oecologia Brasiliensis*, 13(1): 5-15.
- Walling, C.A.; Royle, N.J.; Lindstrom, J. & Metcalfe, N.B. 2008. Experience-induced preference for short-sworded males in the green swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Animal Behaviour*, 76: 271-276.
- Webster, M.M. & Hart, P.J.B. 2004. Substrate discrimination and preference in foraging fish. *Animal Behaviour*, 68: 1071-1077.
- Wolfgang, F. & Birkhead, T.R. 2004. Repeatability of mate choice in the zebra finch: consistency within and between females. *Animal Behaviour*, 68: 1017-1028.
- Zizzari, Z.V.; Braakhuis, A.; van Straalen, N.M. & Ellers, J. 2009. Female preference and fitness benefits of mate choice in a species with dissociated sperm transfer. *Animal Behaviour*, 78: 1261-1267.