
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

ANÁLISE DOS EFEITOS DE ENRIQUECIMENTO OLFATIVO NOS
COMPORTAMENTOS REPRODUTIVOS DE CAÇÃO-LIXA,
Ginglymostoma cirratum (BONNATERRE, 1788)
(ELASMOBRANCHII: ORECTOLOBIFORMES)

HELEN COLBACHINI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Fevereiro - 2018

Helen Colbachini

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE ENRIQUECIMENTO OLFATIVO NOS
COMPORTAMENTOS REPRODUTIVOS DE CAÇÃO-LIXA,
Ginglymostoma cirratum (BONNATERRE, 1788) (ELASMOBRANCHII:
ORECTOLOBIFORMES)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Co-Orientadora: Cristiane Schilbach Pizzutto

Rio Claro (SP)

Fevereiro de 2018

591.16 Colbachini, Helen
C684a Análise dos efeitos de enriquecimento olfativo nos
comportamentos reprodutivos de cação-lixo, *Ginglymostoma*
cirratum (Bonnaterre, 1788) (Elasmobranchii:
Orectolobiformes) / Helen Colbachini. - Rio Claro, 2018
47 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig
Coorientadora: Cristiane Schilbach Pizzutto

1. Reprodução animal. 2. Cativeiro. 3. Elasmobrânquios.
4. Enriquecimento ambiental. 5. Mediação olfativa. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

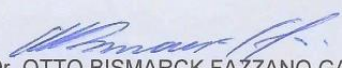
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise dos efeitos de enriquecimento olfativo nos comportamentos reprodutivos de cação-lixo, *Gynglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788) (Elasmobranchii: Orectolobiformes)

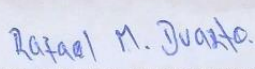
AUTORA: HELEN COLBACHINI

ORIENTADOR: OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG

COORIENTADORA: CRISTIANE SCHILBACH PIZZUTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG
Campus Litoral Paulista / UNESP - Instituto de Biociências - São Vicente/SP


Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE
Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

Prof. Dr. CRISTIANO SCHETINI DE AZEVEDO
Departamento de Zoologia / Universidade Federal de Ouro Preto

Rio Claro, 19 de fevereiro de 2018

DEDICATÓRIA

*A minha Anita, por ser meu melhor exemplo de dedicação e resiliência,
independente das confusões que a vida coloca no caminho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Otto Bismarck Fazzano Gadig e Cristiane Schilbach Pizzutto que aceitaram o desafio deste trabalho e apoiaram minhas decisões durante estes dois anos e meio. Aprendi muito neste tempo com vocês e sei que ainda tenho um longo caminho pela frente, mas fazer o mestrado ao lado de dois pesquisadores tão especiais me fez dar um grande passo a frente.

À minha família, por ter me ensinado que nenhum sonho é grande demais e que podemos sim mudar o mundo aos poucos. Sem o apoio de vocês eu não teria coragem de enfrentar o desafio da conservação dos meus tão queridos elasmobrânquios. E principalmente, agradeço por toda e cada folhinha de manjerição separada para o estudo! Essa ajuda me poupou muitas horas de sono durante o trabalho.

Às equipes do Aquário de São Paulo e do Projeto Tamar, por abrirem as portas para mim, serem tão acolhedores e participativos em todo o trabalho. Todos os conselhos e sugestões foram ouvidos de coração e muitos incorporados a este trabalho. Vocês são demais e tenho orgulho de dizer que tive a oportunidade de trabalhar ao lado de profissionais tão admiráveis. Mas deixo um agradecimento especial para o Rafael Caprioli Gutierrez, o Carlos Gularte, o Daniel Nicolau e o Eduardo Fernandes, por todos os velcros colocados e os sacos de micra lavados (quase) sem reclamação.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e ao querido amigo Leonardo Mendes pela criação do protocolo de extração de manjerição, por aceitarem a responsabilidade de desenvolver o material durante todo o estudo e principalmente por aguentarem minhas cobranças e meus surtos quando os equipamentos não funcionavam como o esperado. Sem o envolvimento de vocês, grande parte deste trabalho seria inviável.

Às amigas Thais Niero e Juliana Thiemy Kina por me auxiliarem na observação para o pico de atividade. Vocês sabem que eu não confiaria em pessoas que não fossem tão dedicadas e comprometidas como vocês. Sei que abusei de vocês nestes três dias, mas tenham certeza que foi graças a vocês que não virei um zumbi nesta etapa.

Ao Bruno Ogata por se disponibilizar a ir ao Aquário e ter esses olhos e habilidades de japa com fotografia. Suas fotos conseguiram valorizar ainda mais a beleza única de cada um dos tubarões.

Ao Marcel Miranda por sua incrível inteligência e habilidade na estatística, por sua vontade de compartilhar seus conhecimentos e principalmente sua paciência em explicar para quem está começando. Grande parte do meu conhecimento estatístico deve-se as suas ajudas e é por isso que tenho certeza que você será um excelente professor em um futuro muito próximo.

À equipe do Laboratório de Pesquisas de Elasmobrânquios pelo suporte e toda a hospitalidade nas minhas raras visitas. Vocês são ótimos e vão longe, espero sempre fazer parte desta rede de pesquisadores brilhantes.

E finalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento que tornou essa pesquisa viável.

RESUMO

O cação-lixá, *Ginglymostoma cirratum*, é um dos tubarões mais exibidos em Aquários no mundo, porém a taxa de insucesso reprodutivo desta espécie ainda é alta. Considerando a provável mediação olfativa para a sua reprodução e o potencial de enriquecimentos ambientais afetarem positivamente a reprodução de animais sob cuidados humanos, o presente trabalho objetivou avaliar se a utilização de enriquecimento olfativo geraria efeitos na exibição de comportamentos reprodutivos de cação-lixá, bem como se esse efeito seria diferencial de acordo com o sexo. Este trabalho também propôs avaliar a proximidade física como um indicativo de comportamento proceptivo de fêmeas. O estudo foi dividido em três fases (controle – sem enriquecimento; enriquecimento a curto prazo – recém aplicado; enriquecimento a longo prazo – após incorporado na rotina de manejo) e foi realizado em duas instituições com manejos distintos. O enriquecimento utilizado foi manjerição comercial (*Ocimum basilicum*), inicialmente apresentado na forma de bloco de gelo e, para o estudo a longo prazo, apresentado na forma de extrato. As observações comportamentais ocorreram através da amostragem focal com registro instantâneo, totalizando 120 horas de observação por animal, divididas em dois momentos (ativo e inativo). Os resultados indicam maior atividade relacionada ao período noturno e às sessões de alimentação; maior frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos no período inativo, no sexo masculino e nas fases com enriquecimento ambiental; maior riqueza comportamental em machos e na fase de enriquecimento a longo prazo. A análise de proximidade mostrou-se eficiente como indicativa de comportamento sócio-sexual, assim como o comportamento “movimento corporal”. É importante atentar que os efeitos são diferenciados para os sexos, sendo essencial o acompanhamento próximo e a criação de cronogramas para evitar uma super-estimulação ou uma habituação ao enriquecimento. Apesar disso, o fato da maior frequência de comportamentos reprodutivos ter ocorrido no período inativo facilita este acompanhamento, visto que se refere ao período de funcionamento de instituições zoológico (dia). Por fim, com a definição dos comportamentos proceptivos faz-se possível determinar quais fêmeas estão receptivas e assim delinear programas reprodutivos mais eficientes. Esses resultados destacam a importância de possuir um manejo que estimule constantemente os sentidos dos elasmobrânquios, especialmente em instituições que desejem realizar programas de reprodução.

PALAVRAS-CHAVE: Cativeiro. Elasmobrânquios. Enriquecimento ambiental. Mediação olfativa. Reprodução. Tubarão.

ABSTRACT

Nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, is one of the most exhibited sharks in Aquariums in the world, however, the reproductive failure rate of this species continues high. Since there probably is an olfactory mediation for its reproduction and environmental enrichments have a potential positive effect on the reproduction of captive animals, the present study aimed to evaluate whether the use of olfactory enrichment would generate effects in the exhibition of reproductive behaviors of nurse sharks, as well as if this effect would be differential according to sex. This study also proposed to evaluate physical proximity as an indicative of proceptive female behavior. The study was divided in three phases (control – without enrichment, short-term enrichment – recently applied, long-term enrichment – after being incorporated into the management routine) and was performed in two institutions with distinct husbandry. The enrichment used was commercial basil (*Ocimum basilicum*), which was initially prepared as an ice block and, for the long-term phase, presented as an extract. The behavioral observations were performed through focal sampling with instantaneous recording, totaling 120 hours of observation per animal, divided into two moments (active and inactive). Results show greater activity related to nocturnal period and feeding sessions; greater frequency of occurrence of reproductive behaviors in the inactive period, with males and during the long-term enriched phase. The proximity analysis was efficient as indicative of socio-sexual behavior, as well as the “body movement” behavior. It is important to note that the enrichment effects are differentiated for the sexes and therefore, close monitoring and scheduling are essential to avoid over-stimulation or habituation to the enrichment. Nevertheless, the fact that the greater frequency of reproductive behavior occurred during the inactive period facilitates this monitoring, since it refers to the operating hours of zoological institutions (daytime). Finally, with the definition of proceptive behavior, it is possible to determine which females are receptive and thus, to delineate more efficient breeding programs. These results highlight the importance of having a management that constantly stimulates the senses of elasmobranchs, especially in institutions that aims to carry out breeding programs.

KEYWORDS: Captivity. Elasmobranchs. Environmental Enrichment. Olfactory Mediation. Reproduction. Shark.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. <i>LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO.....</i>	<i>14</i>
2.2. <i>OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....</i>	<i>15</i>
2.3. <i>ENRIQUECIMENTO OLFATIVO.....</i>	<i>19</i>
2.4. <i>ANÁLISE DE DADOS.....</i>	<i>21</i>
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
ANEXO 1.....	37
ANEXO 2.....	43

1. INTRODUÇÃO

Alteração de *habitat*, sobre-exploração, espécies invasoras e mudanças climáticas são algumas das principais ameaças que muitas populações naturais estão enfrentando. Essas ameaças diminuem o potencial de persistência das espécies, tornando-as mais suscetíveis a eventos estocásticos que podem levar à extinção (IUCN/SSC, 2014). Neste contexto, é essencial haver planos de manejo focados na conservação e o manejo *ex-situ* aparece como um forte aliado na prevenção da extinção de espécies ameaçadas (Conway, 2011).

Essa aliança deve-se, em grande parte, à missão dos zoológicos e aquários de educar seus visitantes, realizar pesquisas que auxiliem o conhecimento sobre a biodiversidade, influenciar o engajamento da população e de políticos para a conservação, contribuir efetivamente para o salvamento de espécies na natureza e realizar manejo populacional sustentável a longo prazo (Barongi et al., 2015). Apesar disso, animais terrestres possuem maior nível de sucesso em seus programas de reprodução, sendo necessário que os aquários desenvolvam melhor seus programas para atingir tal sustentabilidade (Penning et al., 2009).

É importante atentar para o fato de que programas de reprodução são desafiadores e não devem ser considerados como tratamentos emergenciais de última instância, sendo uma ferramenta que deve ser implementada antes das espécies atingirem um nível de ameaça irreversível (Conde et al., 2011). Muitas espécies de elasmobrânquios têm apresentado declínio global em sua abundância (Lee et al., 2015) e a maioria delas ainda não apresenta sucesso na reprodução *ex-situ* (Henningsen et al., 2004a).

O cação-lixo, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788), é um dos elasmobrânquios mais exibidos em aquários no mundo (AES, 2008). Seu comportamento reprodutivo já foi observado em ambiente natural (Carrier et al., 1994; Pratt & Carrier, 2001) e ambiente controlado (Klimley, 1980), sendo que a maior parte dos eventos reprodutivos envolvem cópulas consecutivas com mais de um macho (Compagno, 2001). É uma espécie ovovivípara que apresenta maturidade tardia, reproduz-se a cada dois anos e sua gestação dura de cinco a seis meses (Compagno, 2001).

Mas apesar das observações de comportamentos reprodutivos também em ambiente controlado, a taxa de insucesso reprodutivo da espécie nessas condições é relativamente alta (Henningsen et al., 2004b; Koop, 2005), sendo frequente a liberação de “wind eggs” - cápsulas de ovos totalmente formadas, porém sem embrião ou vitelo no interior (Carrier et al.,

2003; Henningsen et al., 2004b). Atualmente, as descrições de sucesso reprodutivo em ambiente controlado da espécie restringem-se a situações de semi-cativeiro (Kuenen, 2000), a captura de indivíduos pós cópula em ambiente natural (Carrier et al., 2003) e a um caso de reprodução em um Aquário brasileiro (contato pessoal).

Essa situação torna-se ainda mais preocupante quando consideramos que a espécie é listada como vulnerável no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2008), tendo sofrido extremo declínio populacional na região sudeste da costa brasileira e considerada localmente extinta no Rio de Janeiro (Rosa et al., 2006).

O insucesso reprodutivo de diversas espécies em ambiente artificial está relacionado a fatores como baixos níveis de bem-estar e ambiente com baixa complexidade (Azevedo et al., 2007), que diminuem a responsividade dos animais (Carlstead & Shepherdson, 1994). É provável que estímulos ambientais que aumentem a atividade dos indivíduos possam beneficiar inclusive funções reprodutivas, porém a análise dos efeitos reprodutivos gerados pela complexidade física e temporal é pouco documentada (Carlstead & Shepherdson, 1994).

Uma alternativa para aumentar essa complexidade é com a inclusão de enriquecimento ambiental (Carlstead & Shepherdson, 1994). O enriquecimento ambiental pode ser definido como mudanças no ambiente de animais sob cuidados humanos que objetivam o benefício de seus habitantes (Young, 2003). Mas, além de melhorar os níveis de bem-estar dos organismos, o enriquecimento ambiental pode também afetar suas taxas reprodutivas (Carlstead & Shepherdson, 1994; Clark & King, 2008).

Os enriquecimentos ambientais podem ser subdivididos em categorias de acordo com sua função, são elas: físico (modificações estruturais), sensorial (estimulações aos sistemas sensoriais e cerebral), alimentar (referindo-se tanto a diferentes alimentos quanto à forma de se ofertar a dieta), social (interações com conspecíficos) e cognitivo (para reduzir monotomia física e psicológica) (Näslund & Johnsson, 2014). E dentre estes tipos de enriquecimento, o olfativo aparece com maior potencial de estimular a reprodução e a realização de comportamentos naturais (Clark & King, 2008).

Porém, apesar dos avanços crescentes nos estudos dessa área, apenas 0,42% dos trabalhos correspondem à categoria dos peixes (Azevedo et al., 2007). Essa porcentagem diminui ainda mais quando restringimos o enriquecimento ao tipo olfativo e/ou em contexto de zoológicos e aquários (Azevedo et al., 2007; Clark & King, 2008). Apesar da escassez de

estudos, utilizar enriquecimentos olfativos para elasmobrânquios aparece como potencial estratégia de manejo, visto que este grupo animal é reconhecido por extraordinária capacidade sensorial, destacadamente o olfato (Gardiner et al., 2012).

Este potencial é ainda maior quando consideramos os indícios de que atrativos químicos sexuais (como feromônios) são liberados pela cloaca de fêmeas e atuam na atração de machos em ambiente natural (Gardiner et al., 2012), indicando possível mediação olfativa durante a corte (Johnson & Nelson, 1978; Luer & Gilbert, 1985; Yano et al., 1999; Henningsen et al., 2004a).

A teoria da mediação olfativa durante a corte, apesar de sugerida apenas indiretamente, é fortalecida em cação-lixo pelo desempenho de comportamentos pré-copulatórios como a “natação paralela” (em que o macho se posiciona paralelamente à fêmea a uma distância menor do que duas nadadeiras peitorais, e ambos nadam sincronicamente por alguns minutos) e o “seguir” (em que o macho segue a fêmea proximamente com seu focinho direcionado ao ventre da fêmea, algumas vezes tocando-o) (Klimley, 1980; Carrier et al., 1994, Gardiner et al., 2012).

Para o acasalamento ocorrer, é necessária uma sequência de comportamentos reprodutivos. Em algumas espécies essa sequência já é conhecida e corresponde à atratividade, seguida de “apetitividade” e consumação. Em fêmeas, a atratividade e a “apetitividade” são caracterizadas pela proceptividade (comportamento que inicia ou aumenta a probabilidade do macho exibir comportamentos sexuais direcionados a ela, onde os comportamentos com mediação química se incluem) e a consumação pela receptividade (comportamentos necessários para a cópula fértil com um macho em potencial e normalmente relacionados à postura da fêmea) (Beach, 1976).

Considerando a provável mediação olfativa na reprodução de cação-lixo (Klimley, 1980; Pratt & Carrier, 2001), o elevado insucesso na reprodução (Henningsen et al., 2004b; Koop, 2005) e o baixo conhecimento da relação entre estimulação ambiental e respostas comportamentais (Carlstead & Shepherdson, 1994), o presente trabalho objetivou avaliar se o enriquecimento olfativo aumenta a frequência de exibição de comportamentos reprodutivos, bem como a riqueza destes comportamentos em *Ginglymostoma cirratum*. Objetivou também analisar se este possível efeito seria maior em machos do que em fêmeas, visto que a mediação olfativa atua na atração apenas de machos. A fim de melhor compreender a

preparação das fêmeas para eventos reprodutivos e os efeitos de enriquecimento ambiental na sua reprodução, este trabalho também avaliou a proximidade física entre os indivíduos como uma possível indicação de comportamento proceptivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado em dois locais de experimentação que apresentam manejos distintos da espécie:

- A) Aquário de São Paulo (SP): apresenta um tanque multi-espécies com um milhão de litros de água salgada, sendo que entre as espécies exibidas há oito indivíduos de *G. cirratum*, seis fêmeas e dois machos (Figura 1). O manejo e as características do recinto correspondem a um ambiente controlado.
- B) Base de Visitantes do Projeto Tamar na Praia do Forte, Mata de São João (BA): apresenta também um tanque multi-espécies, porém com 190 mil litros de água marinha, onde três indivíduos (duas fêmeas e um macho) da espécie estudada habitam (Figura 2). A localização próxima ao oceano e o ambiente aberto permitem manejo menos controlado e mais naturalístico, mesmo que o recinto não apresente substrato.



Figura 1 - Tanque habitado por oito indivíduos de *Ginglymostoma cirratum* no Aquário de São Paulo. O corredor de visitantes atravessa o recinto pelo meio, ficando visível em suas laterais (aonde há maiores profundidades) e na parte superior (menor profundidade e área de conexão entre as laterais do tanque).



Figura 2 - Tanque habitado por três indivíduos de *Ginglymostoma cirratum* no Centro de Visitantes de Praia do Forte do Projeto TAMAR.

As observações ocorreram em duas etapas, como se segue:

- 1) Verão 2015/2016: esta etapa correspondeu à observação de pico de atividade, para a definição do horário de observação; seguida da observação sem interferência (fase controle) e da observação com a inclusão de enriquecimento (fase de curto prazo). Esta etapa ocorreu entre dezembro e março.
- 2) Verão 2016/2017: a segunda etapa, por sua vez, corresponde à fase de observação após a inclusão do estímulo olfativo na rotina de manejo (fase de longo prazo). As observações foram realizadas entre janeiro e março.

Devido à distância geográfica entre os dois locais de estudo, as observações no Aquário de São Paulo ocorreram entre dezembro e janeiro, enquanto que no Projeto Tamar ocorreram entre fevereiro e março em ambos os anos. Apesar do enriquecimento ter continuado a ser ofertado entre as duas etapas, não ocorreram observações nestes meses, visto que o objetivo era analisar o comportamento reprodutivo, o qual é relacionado com o verão em ambiente natural (Pratt & Carrier, 2001; Carrier et al., 2003). Apesar disso, estudos em regiões equatoriais indicam não haver tal relação nestes locais (Castro & Rosa, 2005; Garla et al., 2016).

2.2.OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

A fim de analisar os comportamentos realizados por todos os indivíduos do tanque, foi selecionada a amostragem focal com registro instantâneo a cada dois minutos (Altman, 1974; Lehner, 1996). Diariamente os animais foram observados durante quatro horas, sendo duas horas para cada período (ativo e inativo). Dois métodos para a identificação dos animais

foram usados: marcas naturais (tais como recortes nas nadadeiras, deficiências estruturais, sexo, etc.) (McFarlane et al., 1990; Castro & Rosa, 2005; Pine et al., 2012); ou identificação por velcros coloridos colocados nos espécimes (nos casos em que a primeira opção não for possível) (Figuras 3 e 4) (ANEXO 1).



Figura 3 - Exemplo de marca natural usada para identificação individual de *Ginglymostoma cirratum* no presente estudo. Crédito: Bruno Ogata.



Figura 4 - Marcação artificial com fita de velcro colorida utilizada no presente estudo, colocada na base da nadadeira caudal de *Ginglymostoma cirratum*. Crédito: Bruno Ogata.

Foram realizadas 120 horas de observação comportamental por animal, sendo 40 horas para a fase controle (A), 40 horas correspondentes aos primeiros contatos com o enriquecimento olfativo (fase de curto prazo – B) e as 40 horas restantes corresponderam à fase de enriquecimento a longo prazo (C). Cada fase durou 10 dias.

Os horários de observação foram definidos após a realização de observações prévias do padrão de atividade para cada grupo observado. Tal procedimento foi necessário por conta das informações disponíveis na literatura de que a espécie tem hábitos noturnos (Compagno, 2001), porém não há estudos que comprovem que o pico de atividade se mantém noturno em ambiente *ex-situ*; além disso, cada ambiente apresenta uma rotina diferente, sendo necessário diminuir o ruído causado pelos diferentes manejos.

Esses padrões de atividade foram feitos em três dias consecutivos a partir de amostragem *scan* com intervalos de 15 minutos para contagem de indivíduos ativos, totalizando 72 horas de observação (Altman, 1974; Lehner, 1996). O perfil gerado indicou um padrão de atividade. As observações então seguiram a delimitação de dois momentos de observação: um durante o pico e outro durante a menor atividade. A observação, inclusive durante a menor atividade, deveu-se ao fato da reprodução desta espécie em ambiente natural possivelmente não ocorrer em momento preferencial do dia (Carrier et al., 1994).

O repertório comportamental reprodutivo esperado está descrito no Quadro 1 e seguiu os comportamentos descritos nos trabalhos de Klimley (1980), Carrier et al. (1994) e Pratt & Carrier (2001) (ANEXO 2). A fim de incluir ainda mais as reações comportamentais das fêmeas, foi observada também a proximidade dos indivíduos de sexos opostos. Isso para avaliar uma possível medida de proceptividade e receptividade (Beach, 1976).

Essa proximidade foi considerada como uma distância menor que a metade do comprimento dos indivíduos. Quando eles encontravam-se dentro desta distância, a proximidade foi contabilizada. Ao final do estudo, relacionou-se a contagem da proximidade com os eventos reprodutivos ocorridos, a fim de avaliar se o posicionamento do grupo está relacionado à reprodução.

Quadro 1 - Etograma dos comportamentos reprodutivos de cação lixa *Ginglymostoma cirratum*. Os comportamentos listados foram descritos segundo as definições dos trabalhos de Klimley (1980), Carrier et al. (1994) e Pratt & Carrier (2001).

Comportamentos	Descrição
Natação Paralela	Natação sincrônica entre uma fêmea e um ou dois machos, com distância menor que duas nadadeiras peitorais entre os indivíduos.

Seguir	Macho segue proxivamente uma fêmea, com seu nariz direcionado ao ventre da fêmea. Em alguns momentos, o macho pode encostar o focinho no ventre da fêmea.
Mordida Peitoral	Macho morde a margem posterior ou engolfa a nadadeira peitoral da fêmea.
Evitar – Fêmea Girando o Corpo	Fêmea gira em 90° a região anterior em frente ao macho; em seguida endireita-se, ficando perpendicular ao macho; e então gira seu corpo 130° sobre suas costas.
Evitar – Fêmea Deitada de Costas	Fêmea permanece imóvel e rígida, com o ventre para cima, durante contato do macho.
Comportamento Agressivo do Macho	Macho realiza comportamentos agressivos contra a fêmea em fuga.
Reposicionar	Macho movimenta a fêmea da posição perpendicular à paralela.
Deitar Paralelamente e Elevar a Cauda	Casal permanece no substrato, com a fêmea elevando sua cauda. Esse comportamento demonstra aceitação da fêmea.
Arqueamento da Fêmea e Dobra de Nadadeiras	Após receber a mordida peitoral, a fêmea se arqueia e dobra suas nadadeiras pélvicas como forma de facilitar a inserção do cláspers.
Macho sobre Fêmea	Macho se posiciona sobre a fêmea, que já está com a região ventral para cima.
Giro do Macho	Macho gira seu corpo, ficando com a região ventral para cima e paralelo à fêmea (também nessa posição).
Deitados de Costas	Casal permanece em paralelo e sem movimento, deitados sobre suas regiões

	dorsais. É nessa posição que pode ocorrer a inserção do cláspers.
Flexão do Cláspers	Um dos cláspers do macho dobra gradualmente em arco de 60° em direção à fêmea.
Inserção do Cláspers	Macho insere um de seus cláspers na cloaca da fêmea.

2.3.ENRIQUECIMENTO OLFATIVO

O enriquecimento olfativo utilizado foi uma mistura de manjeriço comercial (*Ocimum basilicum*) com água na forma de bloco de gelo (proporção de 0,36g de folhas de manjeriço e 4,5mL de água para cada 1000L de água do tanque), propiciando dispersão contínua no recinto durante a observação. A escolha desta erva deveu-se ao fato de o manjeriço apresentar propriedades antioxidantes nos tecidos ovarianos em ratos (Khaki et al., 2013), bem como aumento da espermatogênese, viabilidade, motilidade e testosterona sérica total (Khaki et al., 2011). Além disso, por ser um item que os animais não foram previamente sensibilizados, esperava-se que não houvesse relação direta com a alimentação e, com isso, não gerasse apenas aumento de comportamentos de forrageio.

O manjeriço teve uma única origem (um único fornecedor), a fim de garantir que não ocorressem diferenças genéticas entre os locais de estudo. A erva foi batida com água em liquidificador, a fim de obter uma mistura homogênea. Após congelamento em câmara fria, para que o material derretesse lentamente, o bloco foi inserido em um cesto para evitar o acesso direto ao material por parte dos animais e, ao mesmo tempo, permitir maior superfície de contato com a água (Figura 5). O bloco de gelo permaneceu na água até seu total derretimento.

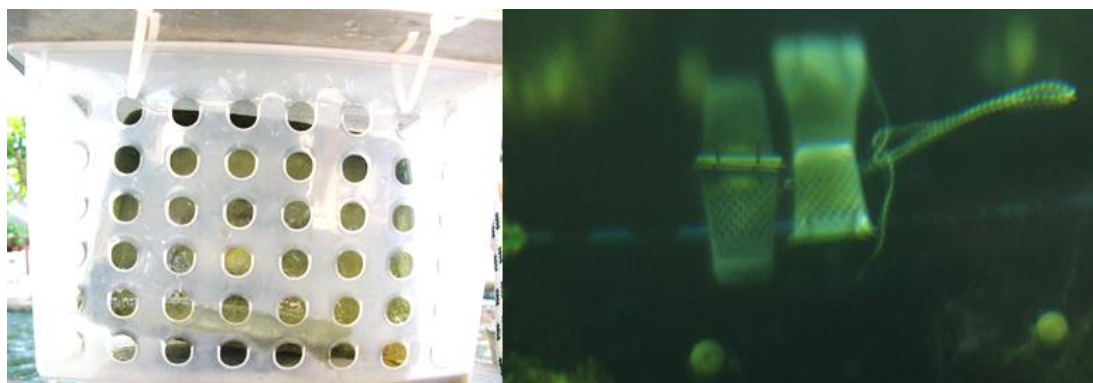


Figura 5 – Dispositivo utilizado para o enriquecimento olfativo ofertado a *Ginglymostoma cirratum*. O bloco de gelo com manjerição foi inserido em um cesto com furos e colocado no tanque para uma lenta e constante dispersão no ambiente. À esquerda encontra-se o material ofertado à população do Projeto TAMAR da Praia do Forte (BA) e à direita o material ofertado à população do Aquário de São Paulo (SP). O tamanho variável do enriquecimento deveu-se à diferença entre os tamanhos dos recintos.

A fim de evitar uma possível super-estimulação dos animais por se tratar de sistemas de água semi-fechados, o material foi fornecido em três momentos de inatividade e três de atividade na primeira etapa do estudo (1^o, 5^o e 8^o dia de observação em inatividade e 1^o, 4^o e 8^o em atividade). Durante o período entre as etapas (após a realização do tratamento de curto prazo em cada aquário), o fornecimento de enriquecimento olfativo ocorreu de forma mais intervalada (dois enriquecimentos por mês) e em horários aleatórios para evitar que o enriquecimento se tornasse parte da rotina.

Para facilitar a introdução do enriquecimento olfativo na rotina de manejo de ambas instituições, o bloco de gelo foi substituído por um extrato (respeitando as mesmas proporções de gramas de folha de manjerição por recinto). Para preparar o extrato, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar (40°C) por 48 horas. O material desidratado foi triturado em moinho de facas (membrana 0.5 mm de diâmetro), a fim de se obter material uniforme visando otimizar a extração.

O procedimento de extração foi realizado na proporção 1:5 (sólido:solvente), a água destilada foi escolhida como solvente extrator para garantir a solubilidade do material e evitar quaisquer riscos de toxicidade aos animais. A extração foi realizada em 48 horas sob rotação (120 RPM) e temperatura controlada (27°C). O sobrenadante foi submetido à filtração convencional e liofilizado até completa desidratação. O extrato final pode ser observado na figura 6. Este extrato foi diluído em água do próprio tanque e então foi disperso no recinto.



Figura 6 - Extrato liofilizado de manjeriço (*Ocimum basilicum*) usado como enriquecimento olfativo para cação-lica.

2.4. ANÁLISE DE DADOS

A partir da coleta de dados foi possível avaliar tanto a frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos (quantidade de vezes que um comportamento reprodutivo qualquer ocorreu durante cada observação), quanto a riqueza comportamental (quantidade de atos comportamentais realizados pelo animal durante cada observação) e a proximidade dos indivíduos. Os dados foram analisados pelo Programa R (R Core Team, 2012), com a análise do efeito do enriquecimento sendo feita pelo teste GLMM através da função *glmer*. Para melhor compreender o efeito do enriquecimento, as variáveis fase do estudo, sexo e período do dia foram consideradas como fixas, enquanto que as variáveis indivíduo e instituição foram incluídas como aleatórias no modelo (Bates et al., 2015). A interação entre as variáveis sexo e fase e as variáveis período e fase foram também incluídas no modelo. O erro de estrutura considerado foi o de Poisson (Crawley, 2013). A análise diferencial encontrada no modelo foi realizada a posteriori pelo Teste de Contraste de Tukey através da função *glht* (Zar, 2010, Crawley, 2013). Para a análise de proximidade, devido à não normalidade dos dados, foi selecionado o teste de correlação de Spearman considerando as variáveis frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos e a proximidade entre macho e fêmea. O teste foi realizado no Programa R através da função *cor.test* (Crawley, 2013). Esta mesma análise foi feita comparando as variáveis frequência de ocorrência de comportamentos de machos para uma determinada fêmea e frequência de ocorrência de movimentação corporal, um novo comportamento identificado no estudo.

3. RESULTADOS

A análise de atividade identificou dois picos para a população do Aquário de São Paulo (local A), um entre às 14:45 e 15:45h e outro entre às 20:30 e 01:45h. Pelo fato do primeiro horário estar relacionado à atividade de alimentação, foi selecionado um período dentro do segundo pico, o qual correspondeu à observação das 21:00 às 23:00h. Para a seleção do período de observação de inatividade, foi selecionado o horário das 06:00 às 08:00h por ser o período de maior inatividade consecutiva, permitindo as duas horas de observação dentro deste perfil de atividade.

Na população do Projeto TAMAR (local B), um pico de atividade foi observado entre às 14:30 e às 16:30h. Este pico estava relacionado ao horário de alimentação (que ocorre às 16:30h). Porém, por ter sido identificado apenas um outro pico de atividade com duração menor que uma hora (entre 02:45 e 03:30), foi mantida a observação durante a atividade pré-alimentação. A observação de inatividade poderia ocorrer das 04:00 às 13:45h, das 19:15 às 20:30h e das 23:30 às 02:00h; porém a escolha do horário das 10:45 às 12:45h ocorreu tanto por estar dentro do maior período de inatividade consecutivo, quanto para evitar interferências extras (como o uso de lanternas) e para evitar englobar alterações da rotina de manejo (como limpeza de tanque que ocorria tanto no início da manhã como após às 19hs).

Durante a observação comportamental foram observados diversos comportamentos reprodutivos, como se segue: seguir, mordida peitoral, movimentação de cláspers, reposicionar, natação paralela, evitar, elevar a cauda e movimento corporal. Apesar das sequências reprodutivas, durante o período de observação nenhum evento reprodutivo chegou à fase de cópula. Entretanto, nos meses de observação foram vistas cópulas em ambas as instituições fora do período de observação.

Na análise do GLMM foi evidenciado que a frequência de ocorrência do comportamento reprodutivo é significativamente maior no período inativo do que no período ativo ($p=0,013846$), significativamente maior em machos que em fêmeas ($p=0,000209$) (Figura 7) e significativamente maior na fase de longo prazo ($p<1e-04$) do que as fases controle e de curto prazo, bem como maior na fase de curto prazo ($p=0,00991$) do que na fase controle (Figura 8).

curto prazo ($p=0,008670$), e o sexo e a fase de enriquecimento a longo prazo ($p<2e-16$) e enriquecimento a longo prazo e período do dia, sendo que as fêmeas apresentaram um crescimento contínuo na frequência entre as fases do estudo, enquanto que os machos apresentaram ocorrências maiores (outliers) na fase de curto prazo, quando comparado às fases controle e longo prazo.

A segunda análise GLMM identificou que a riqueza comportamental dos machos foi significativamente maior que a das fêmeas ($p=7,69e-05$), assim como a riqueza na fase de longo prazo foi significativamente maior que na fase controle ($p<0,001$), mas não houve diferença quanto ao período ($p=0,30056$) e entre o controle e a fase de curto prazo ($p=0,1259$). Foi também possível observar interação entre as variáveis sexo e enriquecimento a curto prazo ($p=0,00888$) e a longo prazo ($p=0,00209$), onde em ambos os casos os machos apresentaram uma riqueza maior que as fêmeas.

Durante este estudo, foi observado que o extrato de manjerição teve durabilidade de 2 a 3 dias. Essa duração foi inferida a partir dos resquícios encontrados nos filtros do tanque nos dias que seguiram a inserção do enriquecimento.

A avaliação de proximidade permitiu encontrar correlação positiva entre as variáveis proximidade e frequência de comportamento reprodutivo dos machos desempenhados para cada fêmea ($r = 0,1590483$, $p=3,616e-06$) (Figura 15). A partir dessa correlação, foi realizado o GLMM que identificou o período inativo com maior frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos do que o período ativo ($p<2e-16$) e a fase de enriquecimento a longo prazo ($p<2e-16$) com maior frequência do que a fase controle ($p<1e-05$) e a fase de curto prazo ($p<1e-05$). Além destas diferenças, foi possível notar interação entre as variáveis período e enriquecimento a curto prazo ($p=1,37e-08$) e período e enriquecimento a longo prazo ($p=0,000912$), onde novamente o período inativo apresentou maior frequência do que o período ativo.

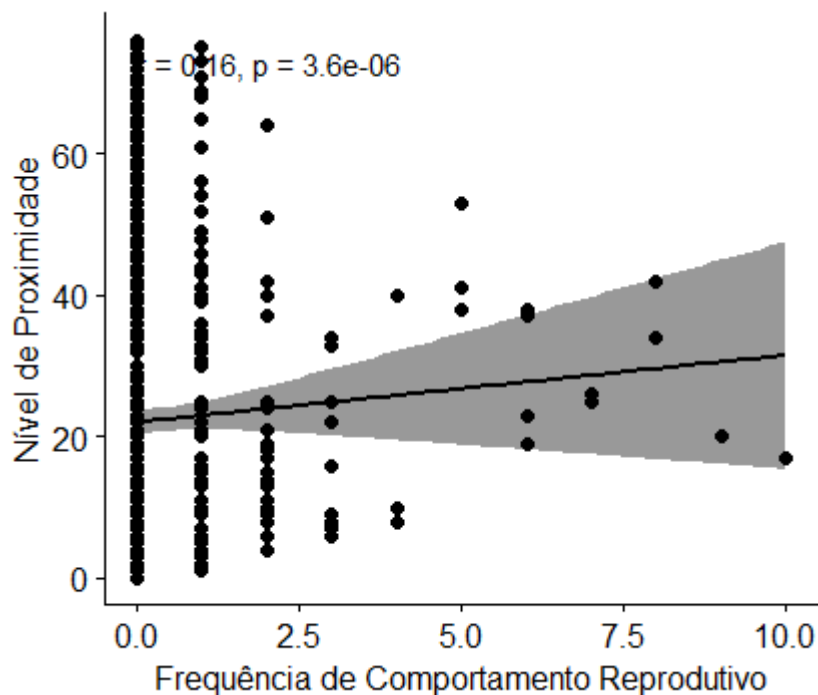


Figura 15 – Análise da correlação entre o nível de proximidade entre machos e fêmeas com a frequência de comportamentos reprodutivos de machos desempenhados para estas fêmeas. Teste de correlação de Spearman com $Rho = 0,1590483$ e $p=3.616e-06$.

Apesar de identificada a correlação positiva com a proximidade dos animais, essa correlação foi baixa ($r=0,1590483$) e pode não ser uma representação fiel da realidade. Com isso, um comportamento identificado no decorrer do trabalho apareceu como possível indicativo de proceptividade e receptividade: o movimento corporal. Este comportamento corresponde à fêmea quando se movimenta fazendo um zigue-e-zague com o corpo, esfregando-o sobre o substrato. Durante o período gestacional e em fêmeas que estão em períodos próximos à liberação de cápsula de ovo foi observado aumento de intensidade. A partir dessas observações, foi feito o teste de correlação de Spearman, o qual encontrou uma correlação positiva forte entre a frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos desempenhados para uma fêmea e a frequência de ocorrência do comportamento de movimentação corporal ($r=0,6236600$, $p<2,2e-16$) (Figura 16).

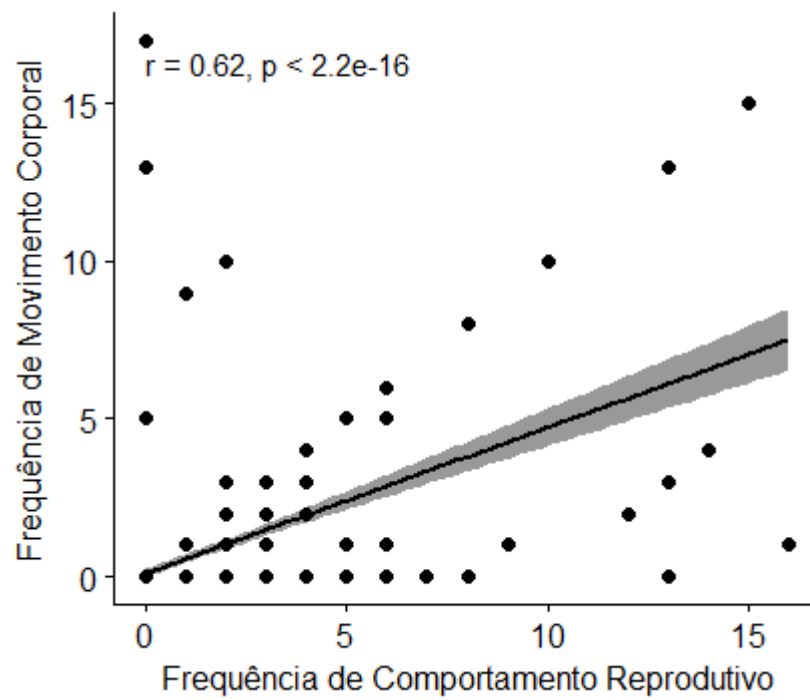


Figura 16 - Análise da correlação entre a frequência de comportamentos reprodutivos que machos desempenharam para cada fêmea e a frequência de ocorrência do comportamento movimento corporal. Teste de correlação de Spearman com $Rho = 0,6236600$ e $p=2,26e-16$.

4. DISCUSSÃO

O uso de enriquecimento ambiental em aquários de visitação pública tem como um dos principais objetivos promover o bem-estar animal e aumentar a exibição de comportamentos naturais (Näslund & Johnsson, 2014). Porém o bem-estar de animais aquáticos é pouco estudado quando comparado com animais terrestres, sendo evidente a escassez de estudos que analisem o bem-estar e a aplicação de enriquecimento ambiental com elasmobrânquios (Näslund & Johnsson, 2014; Greenway et al., 2016). Neste contexto, este trabalho apresentou um novo enriquecimento ambiental de fácil acesso e baixo-custo financeiro, aparecendo como uma nova opção para aquários que exibam elasmobrânquios.

A aplicação do enriquecimento olfativo (manjerição) neste estudo afetou positivamente os comportamentos reprodutivos de cações-lixia, sendo observado aumento na frequência de comportamentos reprodutivos tanto na fase de curto prazo, quanto na de longo prazo. Além deste aumento, tanto a riqueza quanto a proximidade entre os casais tiveram aumento após a inclusão do enriquecimento na rotina de manejo (longo prazo). Essa relação entre a utilização de enriquecimento ambiental com as taxas reprodutivas de algumas espécies já havia sido relatada por alguns autores (Carlstead & Shepherdson, 1994; Clark & King, 2008; Nielsen et al., 2015) inclusive havendo relatos com peixes ósseos (Wafer et al., 2016), porém esta é a primeira vez que foi demonstrado em elasmobrânquios.

Pesquisas sobre o uso do enriquecimento ambiental mostram que seu objetivo é atingido através do efeito da novidade (Crofton et al., 2015), sendo que os animais podem se habituar a um mesmo enriquecimento quando usado em altas frequências, tornando-o menos efetivo (Kuczaj et al., 2002; Tarou & Bashaw, 2007; Anderson et al., 2010). Apesar do uso contínuo do manjerição como enriquecimento olfativo (durante o período de um ano), o efeito a longo prazo foi maior em todas as variáveis observadas, o que indica sua alta efetividade. Provavelmente essa eficiência está relacionada com o protocolo de aplicação de enriquecimento criado neste estudo. Isso porque o extrato de manjerição se mantinha no tanque por até três dias, tendo alta interação com os animais, porém sendo incluso novamente apenas após um intervalo de aproximadamente 15 dias. Este intervalo aparentemente foi suficiente para gerar o fenômeno de recuperação instantânea, no qual um intervalo de tempo para a reapresentação de um mesmo enriquecimento é suficiente para que este continue estimulando reações comportamentais nos animais (Tarou & Bashaw, 2007; Anderson et al., 2010).

Outro indicativo de que o enriquecimento olfativo aumentou a responsividade dos machos às pistas sensoriais do ambiente foi o interesse direcionado a uma fêmea específica que posteriormente foi diagnosticada como prenhe (correspondeu a aproximadamente 92% da frequência de ocorrência de comportamento reprodutivo que o macho desempenhou na fase de longo prazo). Este interesse pontual também colabora com a teoria de mediação olfativa em elasmobrânquios (Johnson & Nelson, 1978; Luer & Gilbert, 1985; Yano et al., 1999; Henningsen et al., 2004a, Gardiner et al., 2012). Possivelmente, um programa de enriquecimento ambiental que siga o protocolo criado no presente estudo, porém inclua diferentes ervas a cada mês, possa gerar um efeito ainda maior na responsividade dos machos e, conseqüentemente, nos eventos reprodutivos.

Além do efeito direto no comportamento, o sexo dos animais apareceu como uma variável que afetou o modelo criado. A diferença na frequência de ocorrência e na riqueza de comportamentos reprodutivos pode ser explicada pelo fato dos machos apresentarem comportamentos ativos de perseguição e investimento nas fêmeas (Klimley, 1980; Carrier et al., 1994; Pratt & Carrier, 2001), o que é responsável pela maior ocorrência de comportamentos pré-copulatórios, como os comportamentos de seguir e movimentar os cláspers.

O sexo também apresentou interação com as fases do estudo, o que indica que houve diferença no efeito do enriquecimento de acordo com essa variável, em especial no efeito sob as fêmeas a longo prazo. Considerando que machos precisam encontrar fêmeas receptivas em ambiente natural através de provável mediação olfativa (Klimley, 1980; Pratt & Carrier, 2001), seus sistemas sensoriais poderiam ser mais desenvolvidos do que os encontrados em fêmeas e, com isso, enriquecimentos olfativos gerariam maiores efeitos nesse sexo, tornando seus sentidos mais aguçados. Tal dimorfismo sexual em órgãos olfativos já foi descrito para a raia *Narcine timlei* (Waghray, 1985) e para o cão *Scyliorhinus canicula* (Arif, 2011), sendo que neste segundo, há inclusive dimorfismo sexual nas Ampolas de Lorenzini (Crooks & Waring, 2013). Ambos dimorfismos em *S. canicula* estão potencialmente relacionados com a habilidade de detectar parceiros e, conseqüentemente, conseguir copular (Arif, 2011; Crooks & Waring, 2013).

Essa teoria explicaria o aumento nos *outliers* da frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos bem como no *outlier* da riqueza comportamental de machos entre a fase controle e curto prazo, quando comparado com as fêmeas nestas mesmas fases.

Enquanto que o maior aumento observado na fase de longo prazo em fêmeas pode ser explicado por dois motivos: a presença de uma fêmea receptiva (prenhe) durante a fase de longo prazo fez com que a média dos comportamentos reprodutivos das fêmeas aumentasse neste momento, evidenciando interação entre as variáveis sexo e fase; além disso, a exposição de peixes a enriquecimentos a longo prazo gera maiores efeitos quando comparados com animais recém expostos ao enriquecimento (Bergendahl et al., 2015). Apesar disso, não foi observado maior efeito a longo prazo nos machos, o que indica uma possível habituação que pode estar relacionada com a teoria de maior sensibilidade ao olfato. É importante destacar que os *outliers* para estudos de eventos comportamentais pouco frequentes não devem ser descartados, visto que fornecem informações sobre a real distribuição dos dados (Shahbaba, 2012).

Além do sexo, a variável período também se destacou neste estudo. A análise de perfil de atividade encontrou picos relacionados às sessões de alimentação e ao período noturno. Esse resultado corrobora com a biologia da espécie, visto que são animais noturnos (Compagno, 2001) e são adaptados à economia de gasto energético, com modo de vida sedentário (Whitney et al., 2016). Dessa forma, a estratégia de menor custo energético relacionaria o aumento de atividade apenas às funções essenciais, como a alimentação e a reprodução. Apesar disso, nos modelos gerados para análise de frequência de ocorrência e de proximidade, o período inativo foi o que apresentou maior relação com os eventos reprodutivos.

Carrier et al. (1994) apontaram a possibilidade de não haver período preferencial para a reprodução em ambiente natural, porém uma conclusão clara não pôde ser tomada, visto que foram feitas mais observações em períodos diurnos do que noturnos (momento que são mais ativos) (Compagno, 2001). Apesar de ter sido identificada diferença no presente estudo, o fato do período inativo coincidir com o horário de funcionamento de instituições que mantêm esta espécie favorece que mais estudos sejam realizados sobre a reprodução de cação-lixia, já que parte das dificuldades observacionais neste ambiente é diminuída se ocorrer no período diurno.

Além da análise do efeito do enriquecimento olfativo, o presente trabalho encontrou dois indicativos da proceptividade das fêmeas: a proximidade e a movimentação corporal. Conhecer os comportamentos proceptivos é importante, pois permite entender o contexto dos eventos reprodutivos, visto que as fêmeas não são essencialmente passivas na reprodução e a

proceptividade aparece como o indicativo comportamental dado como resposta a um estímulo de um macho conspecífico (Beach, 1976). Dessa forma, a proximidade e a movimentação corporal aparecem como comportamentos sócio-sexuais em cações-lixas.

Apesar de ser uma espécie gregária (Compagno, 2001), a proximidade entre os indivíduos foi correlacionada com os comportamentos reprodutivos que machos desempenharam às fêmeas. Esse resultado sugere que as agregações não são formadas aleatoriamente, havendo escolha relacionada à atratividade entre os casais. Durante a pesquisa, foi observada na maior população (local A) possível preferência de agregação, na qual uma fêmea encontrava-se frequentemente em repouso do lado de um macho específico, porém dificilmente próxima do outro macho do tanque. Mais estudos que analisem a proximidade devem ser realizados para analisar se essa escolha de agregação é um indicativo de escolha de parceiros reprodutivos.

Além da proximidade, o movimento corporal foi também considerado comportamento proceptivo. Este é o primeiro relato deste comportamento que se difere do *Grooming* (rolar o corpo sobre o substrato para remoção de parasitas) (Smith et al., 2015) por ocorrer enquanto o animal está em repouso e de forma mais contínua. A associação deste comportamento com a reprodução deveu-se por este ter ocorrido com maior intensidade em uma fêmea no dia em que esta liberou uma cápsula de ovo, bem como ter ocorrido com outra fêmea apenas durante seu período receptivo (fêmea prenhe).

Possivelmente este movimento de zigue-e-zague contribui para a movimentação do trato reprodutivo, o que facilitaria a liberação das cápsulas de ovo dos ovários para os úteros. Devido ao fato do movimento corporal ocorrer com o animal em repouso no substrato, não é possível avaliar se há abertura de cloaca durante o movimento. Apesar disso, caso a função do comportamento seja realmente a sugerida neste trabalho, é provável que ocorra uma liberação de pistas sensoriais em conjunto, o que explicaria o fato do interesse direcionado do macho na fêmea receptiva.

Mais estudos sobre a proceptividade de elasmobrânquios são necessários para que se permita maior entendimento sobre os comportamentos sócio-sexuais e os eventos reprodutivos em si. A percepção de fêmeas receptivas em ambientes controlados é de extrema importância, para que os programas de reprodução sejam direcionados a essas fêmeas e

também haja um maior acompanhamento nos indicativos de prenhez nos meses seguintes à época reprodutiva.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enriquecimento ambiental é uma prática de manejo com potencial efeito no bem-estar animal, sendo que para cações-lixá, *Ginglymostoma cirratum*, o enriquecimento olfativo de manjerição foi eficiente em aumentar a frequência de ocorrência de comportamentos reprodutivos, bem como a riqueza de comportamentos reprodutivos. Neste contexto, instituições que exibam elasmobrânquios devem inserir enriquecimentos ambientais na rotina de manejo, principalmente se desejarem atingir o sucesso reprodutivo.

O fato do enriquecimento olfativo ter aumentado os comportamentos reprodutivos desta espécie aparece como mais um indicativo da mediação olfativa na espécie, visto que deixa os indivíduos mais alertas às pistas sensoriais do ambiente. Porém, apesar da eficiência do enriquecimento olfativo de manjerição, é necessário que os protocolos de manejo sejam bem delineados para que não ocorra uma super-estimulação, visto que os tanques normalmente apresentam sistemas de circulação fechados, e nem uma habituação ao enriquecimento, pela recorrência de utilização de um mesmo tipo.

Assim, é importante conhecer o tempo que o enriquecimento continua fazendo efeito dentro do tanque e o tempo para se atingir o fenômeno da recuperação instantânea. Essas informações, em conjunto com dados das próprias populações (como horários de manejo e períodos de atividade), permitem criar um protocolo que possa se prolongar a longo prazo e atingir resultados ainda maiores.

Adicionalmente, conhecendo os comportamentos proceptivos da espécie (proximidade e movimento corporal), é possível realizar um acompanhamento da preparação das fêmeas e identificar os períodos em que estão com maior probabilidade de estarem receptivas. Com isso, os programas de reprodução devem ser direcionados a estas fêmeas e intensificados no período de maior receptividade como tentativa de aumentar a efetividade dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- AES [American Elasmobranch Society] (2008). The 2008 AES International captive elasmobranch census. Disponível em: < <http://elasmobranch.org/census.php>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.
- Altmann, J (1974) Observational study of behavior sampling methods. *Behaviour*, 49: 227-267.
- Anderson C; Arun AS; Jensen P (2010) Habituation to environmental enrichment in captive sloth bears – Effect on stereotypies. *Zoo Biology*, 29: 705-714.
- Arif S (2011) Sexual dimorphism and asymmetry in the olfactory organs and brain structure of the catshark, *Scyliorhinus canicula*. Tese de Mestrado. University of Portsmouth.
- Azevedo CS; Cipreste CF; Young RJ (2007) Environmental enrichment: A GAP analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, 102: 329-343.
- Barongi R; Fisker FA; Parker M; Gusset M (2015) Committing to Conservation: The World Zoo and Aquarium Conservation Strategy. Gland: WAZA Executive Office.
- Bates D; Mächler M; Bolker BM; Walker SC (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67: 1-48.
- Beach FA (1976) Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and behavior*, 7: 105-138.
- Bergendahl IA; Salvanes AGV; Braithwaite VA (2015) Determining the effects of duration and recency of exposure to environmental enrichment. *Applied Animal Behaviour Science*, 176: 163-169.
- Carlstead K; Shepherdson D (1994) Effects of environmental enrichment on reproduction. *Zoo Biology*, 13: 447-458.
- Carrier JC; Murru FL; Walsh MT; Pratt HL (2003) Assessing reproductive potential and gestation in nurse sharks (*Ginglymostoma cirratum*) using ultrasonography and endoscopy: an example of bridging the gap between field research and captive studies. *Zoo Biology*, 22: 179-187.
- Carrier JC; Pratt HL; Martin LK (1994) Group reproductive behaviors in free-living nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia*, 1994: 646-656.
- Castro, ALF; Rosa, RS (2005) Use of natural marks on population estimates of nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, at Atol das Rocas Biological Reserve, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 72: 213-221.
- Clark F; King AJ (2008) A critical review of zoo-based olfactory enrichment. In: Hurst JA; Beynon RJ; Roberts CR; Wyatt TD (eds.). *Chemical signals in vertebrates 11*. New York: Springer, 391-398.
- Conde, DA; Flesness, N; Colchero, F; Jones, DR; Scheuerlein, A (2011) An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*, 331: 1390-1391.
- Conway WG (2011) Buying time for wild animals with zoos. *Zoo Biology*, 30: 1-8.

Compagno LJV (2001) Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. v. 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). Roma: FAO species catalogue for fishery purposes. FAO, 191-194.

Crawley, MJ (2013) The R Book. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.

Crofton EJ; Zhang Y; Green TA (2015) Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 49: 19-31.

Crooks N; Waring CP (2013) A study into the sexual dimorphisms of the Ampullae of Lorenzini in the lesser-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). *Environmental Biology of Fishes*, 96: 585-590.

Gardiner JM; Hueter RE; Maruska KP; Sisneros JA; Casper BM; Mann DA; Demski LS (2012) Sensory Physiology and Behavior of Elasmobranchs. In: Carrier JC; Musick JA; Heithaus MR (eds.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 349-401.

Garla RC; Gadig OBF; Garrone-Neto D (2016) Movement and activity patterns of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, in an oceanic Marine Protected Area of the South-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*: 1-8.

Greenway E; Jones KS; Cooke GM (2016) Environmental enrichment in captive juvenile thornback rays, *Raja clavata* (Linnaeus 1758). *Applied Animal Behaviour Science*, 182: 86-93.

Henningsen AD; Smale M; Garner R; Kinnunen N (2004b) Reproduction, embryonic development, and reproductive physiology of elasmobranchs. In: Smith M; Warmolts D; Thoney D; Hueter R (eds.). *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive care of sharks, rays and their relatives*. Ohio: Ohio Biological Survey, 227-236.

Henningsen AD; Smale MJ; Gordon I; Garner R; Marin-Osorno R; Kinnunen N (2004a) Captive breeding and sexual conflict in elasmobranchs. In: Smith M; Warmolts D; Thoney D; Hueter R (eds.). *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive care of sharks, rays and their relatives*. Ohio: Ohio Biological Survey, 237-248.

IUCN/SSC (2014) Guidelines on the Use of *Ex Situ* Management for Species Conservation. v. 2. Switzerland: IUCN Species Survival Commission.

Johnson RH; Nelson DR (1978) Copulation and possible olfaction-mediated pair formation in two species of Carcharhinid. *Copeia*, 1978: 539-542.

Khaki A; Azad FF; Nouri M; Khaki AA (2011) Effects of basil, *Ocimum basilicum* on spermatogenesis in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 4601-4604.

Khaki A; Khaki AA; Ezzatzadeh A; A-Ashteani H (2013) Effect of *Ocimum basilicum* on ovary tissue histopathology after exposure to electromagnetic fields (EMF) in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7: 1703-1706.

Klimley AP (1980) Observations of courtship and copulation in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia*, 1980: 878-882.

Koop JH (2005) Reproduction of captive *Raja ssp.* in the Dolfinarium Harderwijk. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 85: 1201-1202.

Kuczaj S; Lacinak T; Fad O; Trone M; Solangi M; Ramos J (2002) Keeping Environmental Enrichment Enriching. International Journal of Comparative Psychology, 15: 127-137.

Kuenen M (2000) A log of captive births by an Atlantic nurse shark, "Sarah". Drum and Croaker, 31: 22-23, fev 2000.

Lee KA; Huveneers C; Peddemors V; Boomer A; Harcourt RG (2015) Born to be free? Assessing the viability of releasing captive-bred wobbegongs to restock depleted populations. Frontiers in Marine Science, 2: 1-14.

Lehner PN (1996) Handbook of ethological methods. Cambridge: Cambridge University Press.

Luer CA; Gilbert PW (1985) Mating behavior, egg deposition, incubation period, and hatching in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. Environmental Biology of Fishes, 13: 161-171.

Machado ABM; Drummond GM; Paglia AP (2008) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

McFarlane GA; Wydoski RS; Prince ED (1990) External tags and marks: Historical review of the development of external tags and marks. American Fisheries Society Symposium, 7: 9-29.

Näslund J; Johnsson JI (2014) Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. Fish and Fisheries, 17: 1-30.

Nielsen BL; Jezierski T; Bolhuis JE; Amo L; Rosell F; Oostindjer M; Christensen JW; McKeegan D; Wells DL; Hepper P (2015) Olfaction: An Overlooked Sensory Modality in Applied Ethology and Animal Welfare. Frontiers in Veterinary Science, 2: 1-3.

Penning M; Reid GMcG; Koldewey H; Dick G; Andrews B; Arai K; Garratt P; Gendron S; Lange J; Tanner K; Tonge S; Van den Sande P; Warmolts D; Gibson C (2009) Turning the Tide: A Global Aquarium Strategy for Conservation and Sustainability. Switzerland: World Association of Zoos and Aquariums.

Pine WE; Hightower J; Coggins LG; Lauretta MV; Pollock KH (2012) Design and analysis of tagging studies. In: Zale AV; Parrish DL; Sutton TM (eds.). Fisheries Techniques Manual. Bethesda: American Fisheries Society, 521-572.

Pratt Jr HL; Carrier JC (2001) A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Environmental Biology of Fishes, 60: 157-188.

R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.Rproject.org/>. "2012.

Rosa RS; Castro ALF; Furtado M; Monzini J; Grubbs RD (2006) *Ginglymostoma cirratum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006: e.T60223A12325895. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T60223A12325895.en>. Acesso em: 25 de julho de 2017.

Shahbaba B (2012) Biostatistics with R. Use R! New York: Springer.

Smith KR; Scarpaci C; Loudon BM; Otway NM (2015) Behaviour of aggregated grey nurse sharks *Carcharias taurus* off eastern Australia: similarities and differences among life-history stages and sites. *Endangered Species Research*, 27: 69-85.

Tarou LR; Bashaw MJ (2007) Maximizing the effectiveness of environmental enrichment: suggestions from the experimental analysis of behavior. *Applied Animal Behaviour Science*, 102: 189-204.

Wafer LN; Jensen VB; Whitney JC; Gomez TH; Flores R; Goodwin BS (2016) Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55: 291-294.

Waghray S (1985) Olfactory organ and its sexual dimorphism in the electric ray, *Narcine timlei* (Day). *Indian Journal of Fisheries*, 32: 148-151.

Whitney NM; Lear, KO; Gaskins, LC; Gleiss, AC (2016) The effects of temperature and swimming speed on the metabolic rate of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*, Bonaterre. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 477: 40-46.

Yano K; Sato F; Takahashi T (1999) Observations of mating behavior of the manta ray, *Manta birostris*, at the Ogasawara Islands, Japan. *Ichthyological Research*, 46: 289-296.

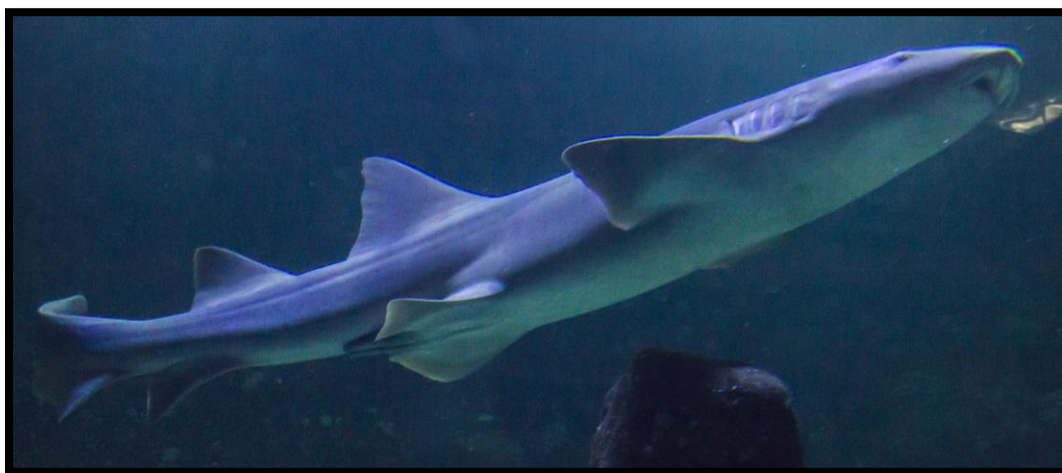
Young, RJ (2003) Environmental enrichment for captive animals. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Zar JH (2010) Biostatistical analysis. New Jersey: Pearson Prentice Hall, Inc.

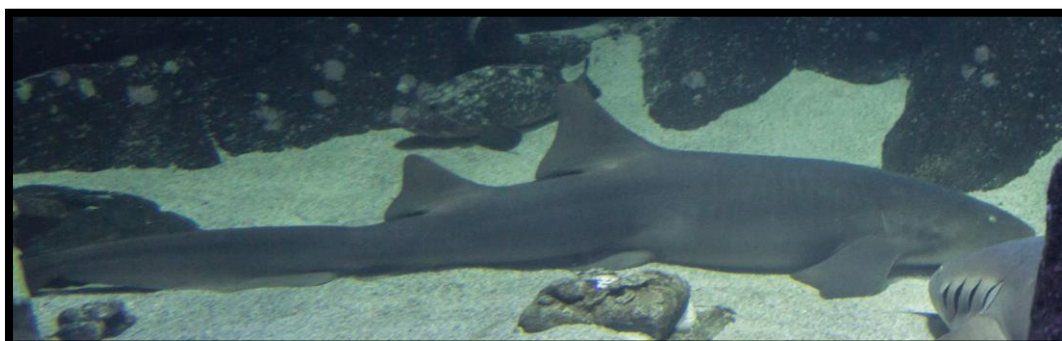
ANEXO 1

INFORMAÇÕES SOBRE OS ESPÉCIMES ESTUDADOS

-Macho 1 (Bruce): Macho adulto do local A. Chegou na instituição em 2008 e foi visto exibindo comportamentos reprodutivos previamente ao estudo pela equipe técnica local, sendo então considerado adulto para este estudo. É diferenciado das fêmeas por apresentar clássper e do outro macho por apresentar a primeira nadadeira dorsal “recortada”. Por as marcas naturais não serem tão evidentes, nas duas fases iniciais do trabalho o animal foi marcado com velcro, porém na terceira fase não foi marcado por a observadora ter se familiarizado com as marcas naturais [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



-Macho 2 (Tutuzinho): Macho adulto do local A. Chegou na instituição no ano de 2008 como um indivíduo juvenil, até o presente trabalho havia sido observado interesse nas fêmeas, porém nunca visto tentativa efetiva de cópula, apesar disso, foi considerado adulto para o presente estudo. Além da presença de clássper, este indivíduo se diferencia dos outros por apresentar cor mais amarronzada e a mancha branca na base da primeira nadadeira dorsal bem evidenciada. Este indivíduo recebeu marcação com velcro apenas nas primeiras duas fases do estudo, porém, como o Macho 1, não foi necessário marca-lo na última [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



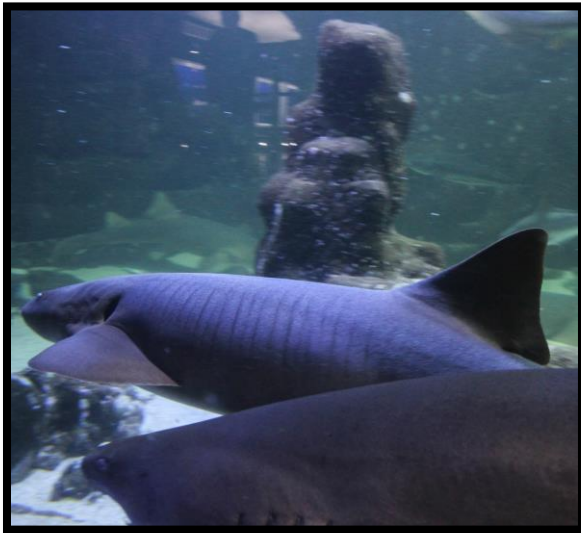
-Macho 3 (Pão de Leite): Macho adulto do local B. Chegou na instituição em 2002 e, além de exibir comportamentos reprodutivos, já obteve sucesso na reprodução com uma fêmea da mesma instituição. Diferencia-se dos outros indivíduos do local pela presença de cláspes, por ser o indivíduo de cor mais clara e por sua primeira nadadeira dorsal apresentar em sua região central dois triângulos como recorte. Este indivíduo não recebeu marcação de velcro em nenhuma fase do estudo.



-Fêmea 1 (Elen): Fêmea adulta do local A. Chegou na instituição no ano de 2010 e até o presente estudo, não havia relatos de comportamentos reprodutivos com esta fêmea. Por ter apresentado comportamentos reprodutivos nas observações, foi considerada como adulta. Diferencia-se dos outros indivíduos do tanque por apresentar um grande recorte na primeira nadadeira dorsal em formato de “L”. Esta fêmea não recebeu marcação de velcro em nenhuma fase do estudo por sua marcação natural ser evidente inclusive no período noturno [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



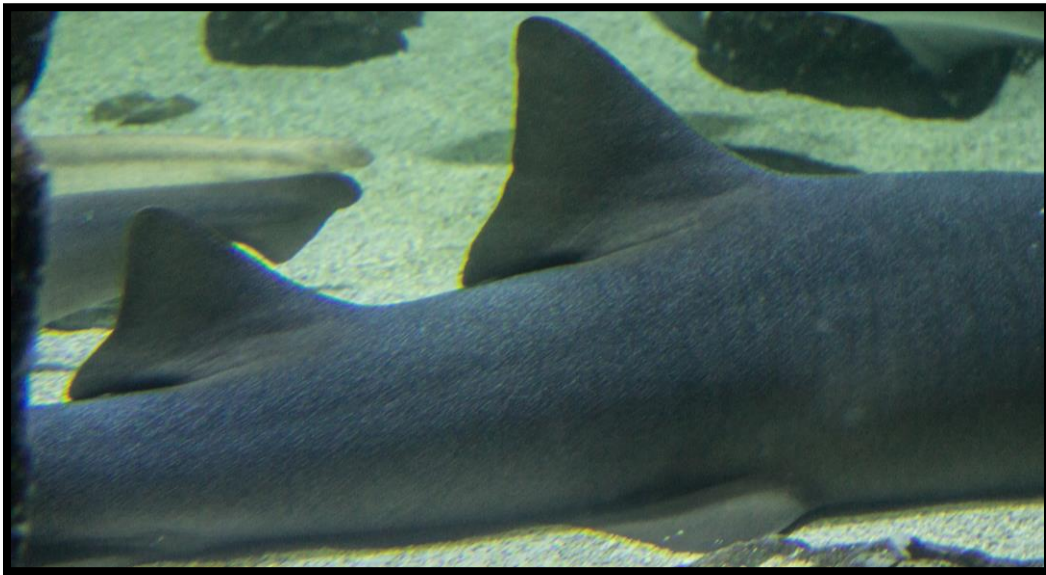
-Fêmea 2 (Gabi): Fêmea adulta do local A. Chegou em 2013 já como um indivíduo adulto, foi vista pela equipe técnica envolvida em eventos reprodutivos e apresenta preferência por um local específico do tanque, onde normalmente permanece sozinha. Sua coloração é azulada e sua primeira nadadeira dorsal apresenta um recorte ondulado. Por a noite ser muito difícil de identifica-la, permaneceu com marcação de velcro na base da cauda nas três fases [Crédito das imagens: Bruno Ogata].



-Fêmea 3 (Gorda): Fêmea adulta do local A. Está na instituição desde 2008, quando já chegou como adulta. Há relatos de cópulas com esta fêmea prévios ao estudo. Suas principais diferenças são o maior tamanho, o recorte na ponta da nadadeira pélvica direita e o pequeno triângulo recortado no centro da nadadeira peitoral direita. Também devido à dificuldade de observar estas diferenças à noite e em alguns locais do tanque, este indivíduo permaneceu com marcação de velcro nas três fases do estudo [Crédito das imagens: Bruno Ogata].



-Fêmea 4 (Bolinha): Fêmea adulta do local A. Este indivíduo chegou na instituição em 2008, porém desde então não houve relatos de participação em eventos reprodutivos. Por ter realizado comportamentos reprodutivos neste estudo, foi também considerada como adulta. Diferencia-se dos outros indivíduos por apresentar cor azulada e sua primeira nadadeira dorsal apresentar dois pequenos recortes (um triangular central e outro em meia lua na parte superior). Devido à dificuldade de identificar estas diferenças no período noturno, esta fêmea foi marcada com velcro nas três fases do estudo [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



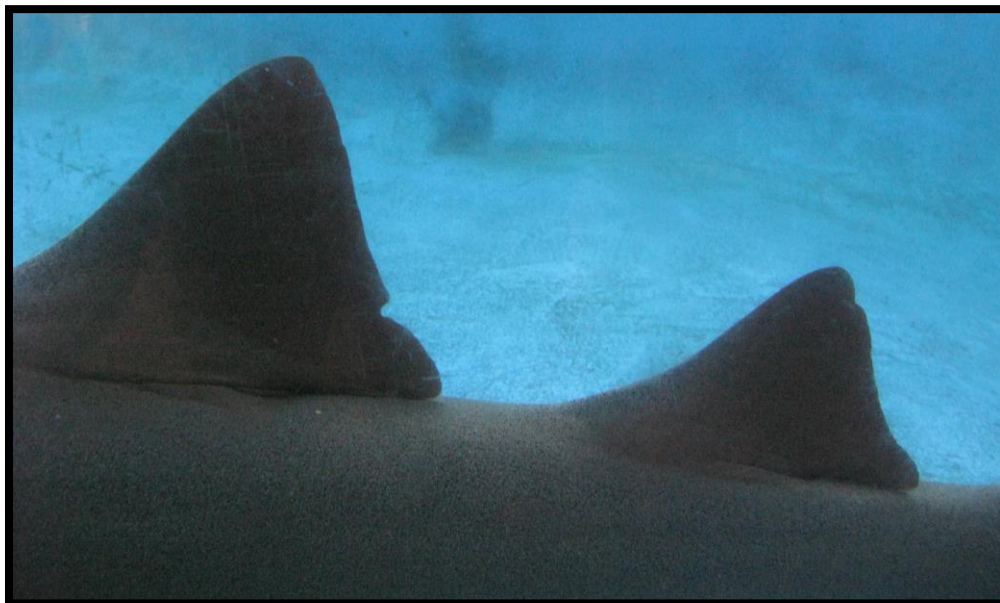
-Fêmea 5 (Machadinha): Fêmea adulta do local A. Chegou como um indivíduo juvenil na instituição no ano de 2013. Não havia sido observada em eventos reprodutivos previamente e é o animal mais curioso do tanque. Por ter realizado comportamentos reprodutivos neste estudo, foi também considerada como adulta. Apresenta como marca natural uma deformação na região dorsal, na forma de uma pequena depressão; também apresenta dois pequenos recortes triangulares na região central da primeira nadadeira dorsal. Apesar dessas diferenças, esta fêmea foi marcada na primeira fase do estudo para habituação da observadora [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



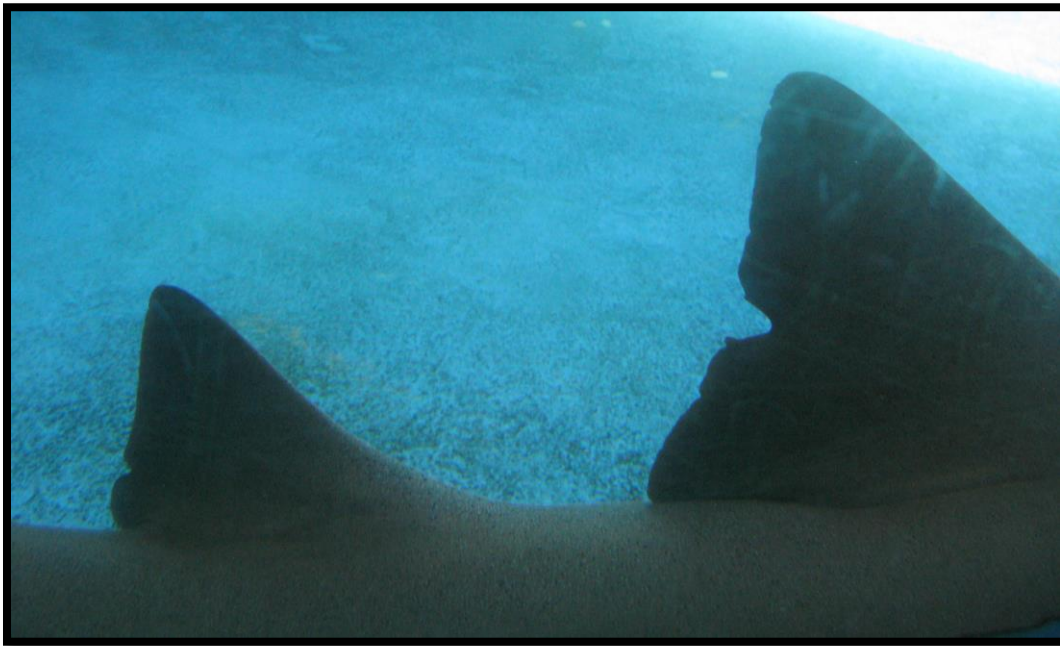
-Fêmea 6 (Capixaba): Fêmea adulta do local A. Este indivíduo está na instituição desde 2010 e não foram relatados eventos reprodutivos envolvendo esta fêmea. Por ter realizado comportamentos reprodutivos neste estudo, foi também considerada como adulta. Sua diferenciação natural é seu tamanho e um pequeno recorte na nadadeira peitoral esquerda, porém por sua similaridade com a fêmea 3, o indivíduo foi marcado com velcro nas três fases de estudo [Crédito da imagem: Bruno Ogata].



-Fêmea 7 (Açaí): Fêmea adulta do local B. Este indivíduo chegou em 2002 e é considerada adulta por ter apresentado mais de uma prenhez. A diferenciação que apresenta dos outros indivíduos do tanque são sua coloração escura e arroxeada, seu maior tamanho, a presença de um recorte triangular na base da primeira nadadeira dorsal e a presença de um pequeno recorte também triangular na parte superior da segunda nadadeira dorsal. Este indivíduo não foi marcado com velcro em nenhuma fase do estudo e foi identificado novamente como prenhe após o término do trabalho.



-Fêmea 8 (Mascote): Fêmea adulta do local B. Está na instituição desde 2002, quando ainda era juvenil e é considerada pela equipe técnica como o indivíduo mais curioso do local. Foi considerada adulta neste trabalho por ter sido relatado que no ano anterior ao início do estudo houve tentativa de cópula com esta fêmea. Difere-se dos outros indivíduos do local por apresentar um grande recorte triangular no centro da primeira nadadeira dorsal e um pequeno triângulo na base da segunda nadadeira dorsal. Este indivíduo não apresentou marcação por velcro em nenhuma fase do estudo.



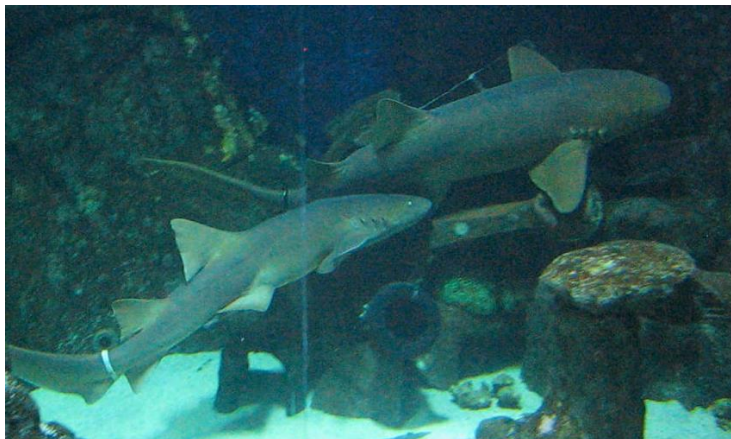
ANEXO 2

ILUSTRAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS REPRODUTIVOS DE CAÇÃO-LIXA *GINGLYMOSTOMA CIRRATUM* OBSERVADOS NO ESTUDO

-Natação Paralela (natação sincrônica entre uma fêmea e um ou dois machos, com distância menor que duas nadadeiras peitorais entre os indivíduos):



-Seguir (macho segue proximamente uma fêmea, com seu nariz direcionado ao ventre da fêmea. Em alguns momentos, o macho pode encostar o focinho no ventre da fêmea):



-Mordida Peitoral (macho morde a margem posterior ou engolfa a nadadeira peitoral da fêmea):



-Evitar/Fêmea Girando o Corpo (fêmea gira em 90° a região anterior em frente ao macho; em seguida endireita-se, ficando perpendicular ao macho; e então gira seu corpo 130° sobre suas costas):



-Evitar/Fêmea Deitada de Costas (fêmea permanece imóvel e rígida, com o ventre para cima, durante contato do macho):



-Reposicionar (macho movimenta a fêmea da posição perpendicular à paralela):



-Deitar Paralelamente e Elevar a Cauda (casal permanece no substrato, com a fêmea elevando sua cauda. Esse comportamento demonstra aceitação da fêmea):



-Arqueamento da Fêmea e Dobra de Nadadeiras (após receber a mordida peitoral, a fêmea se arqueia e dobra suas nadadeiras pélvicas como forma de facilitar a inserção do cláspes):



-Macho sobre a Fêmea (macho se posiciona sobre a fêmea, que já está com a região ventral para cima):



-Flexão do Cásper (um dos cláspers do macho dobra gradualmente em arco de 60° em direção à fêmea):



-Inserção do Clásper (macho insere um de seus cláspers na cloaca da fêmea):

