

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

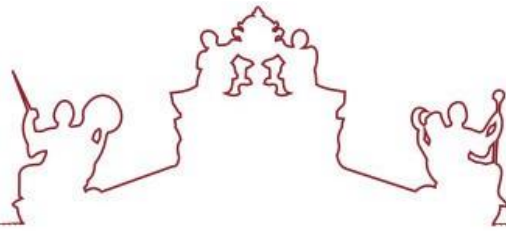
Dissertação

Enriquecimento ambiental em cães de abrigo – uma  
abordagem ao comportamento e à fisiologia

Laura Gonçalves Labrador

Orientador(es) | A. M. F. Pereira

Margarida Câmara



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

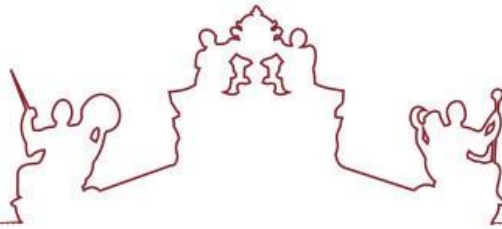
Dissertação

Enriquecimento ambiental em cães de abrigo – uma  
abordagem ao comportamento e à fisiologia

Laura Gonçalves Labrador

Orientador(es) | A. M. F. Pereira

Margarida Câmara



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora)

Vogais | A. M. F. Pereira (Universidade de Évora) (Orientador)

Gonçalo Da Graça Pereira (Universidade de Évora) (Arguente)

## Agradecimentos

Quero ser Médica veterinária desde que me lembro. Nunca tive aqueles dilemas que faziam a vida impossível a muitos dos meus colegas, “queres trabalhar em que área?”, “queres estudar o quê?”, “o que queres ser quando fores grande?”. Para mim era uma pergunta fácil. Queria trabalhar com animais, queria estudar os animais, queria ser Médica veterinária.

Hoje, uns quantos anos depois, estou quase a concretizar um dos meus maiores sonhos.

Mas sei que apenas consegui chegar onde cheguei, graças à contribuição de todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a continuar.

Em primeiro lugar, tenho que agradecer aos meus pais e aos meus irmãos.

Os meus pais sempre me ensinaram que o êxito é a realização progressiva de um sonho e que, enquanto nos mantivéssemos nessa luta constante pelos nossos objetivos, seríamos absolutamente felizes.

Eles tinham razão. Relembro todos estes anos com um enorme carinho porque, apesar dos dias difíceis, sempre dei o meu melhor e sempre me mantive no caminho.

Obrigado pais, vocês foram os primeiros a acreditar em mim.

Por outro lado, os meus irmãos foram um enorme apoio durante todo este percurso. Estiveram sempre aí, impedindo que me sentisse sozinha ou sem forças. Foram capazes de aguentar os meus momentos baixos e de me dizer “não faz mal, vai tudo correr bem”.

Obrigado, Fernando, Maria e Quelucha, vocês tornaram-me mais capaz.

Aos meus colegas de curso, as pessoas que estiveram comigo nas trincheiras desta guerra onde partilhamos lágrimas, sorrisos, piadas, apontamentos, jantares, tristeza e felicidade, obrigado. Vocês sabem melhor do que ninguém, a força que temos. Se chegamos até este ponto é porque somos realmente especiais.

Um agradecimento especial à Mafalda, à Marina, ao César, à Inês, à Raquel, à Sara Amaral, à Annette, à Cátia e à Sara Pamintuan, que fizeram dos dias maus, menos maus, e dos dias bons, melhores ainda.

Um enorme agradecimento também ao grupo “Todos”, aquele que me mostrou a força de um pequeno grupo de estudantes com um coração gigante. Somos apenas pessoas de todos os lados unidas pela enorme vontade de ajudar e facilitar a vida de quem precisa. Somos apenas nós, e isso chega. Estarão sempre comigo. Obrigado.

Aos meus professores, os responsáveis por grande parte deste caminho, por terem tido a coragem suficiente para, apesar das suas próprias lutas, nos terem ajudado a vencer a nossa.

Em especial, ao professor Alfredo Pereira por ter aceitado ser meu orientador e por ter tido a capacidade de organizar tudo o que a mim me estava a escapar. Por ter gasto parte do seu tempo (tempo que não tinha) para responder às minhas questões e para me guiar em cada passo. Acho que fazemos uma equipa imparável, muito obrigado.

A toda a equipa do Canil Municipal de Évora, pela paciência que tiveram durante a realização do estudo. Foram uns meses de muita mudança, muitas alterações nas rotinas e muitas chatices e preocupações novas. Vocês foram incansáveis. Não tinham que o fazer, mas fizeram-no. Obrigado por me ajudarem a terminar esta etapa.

Em especial, à Doutora Margarida Câmara e à voluntária Marta Correia, por toda a disponibilidade e preocupação que demonstraram em todas as etapas do estudo. Marta, teria sido impossível sem a tua ajuda. O teu conhecimento e o teu esforço foram vitais para a realização deste estudo.

Agradecer também à professora Elsa Lamy e ao professor Paulo Infante pela sua ajuda imprescindível na recolha e processamento das amostras de saliva e na análise estatística dos dados obtidos, respetivamente.

A toda a equipa do Hospital Veterinário de Loulé que, apesar de não terem influência direta no trabalho de projeto, contribuíram para o meu crescimento e evolução, fazendo-me acreditar em mim e nas minhas capacidades. Vocês não imaginam como foram importantes neste processo. E, por último, um obrigado a mim mesma, pelas lutas que venci e tantas outras que perdi, por não ter desistido nunca e por ter a força de vontade suficiente para continuar quando tudo pede para parar. Consegui, obrigado.

**Resumo**

Para perceber a interferência no comportamento e na fisiologia de vários tipos de enriquecimento ambiental em cães de canil, oito cães foram submetidos a períodos de ausência e presença de enriquecimento social e estimulação odorífera com recurso a ramos de alecrim, bem como a gravações durante todas as fases para posterior análise do comportamento e colheitas de saliva para determinação do cortisol salivar.

Os resultados revelaram uma redução significativa dos comportamentos indicadores de stresse e intermédios, e um aumento significativo dos comportamentos considerados desejáveis, bem como uma tendência decrescente do cortisol salivar entre as fases.

Os ramos de alecrim foram utilizados como brinquedos e mostraram-se bons estimuladores cognitivos.

Concluiu-se assim que é possível melhorar as condições de bem-estar dos cães de canil com pequenas alterações no ambiente que promovam a estimulação cognitiva através da introdução de ramos de alecrim e, se possível, do contacto social, do exercício e da brincadeira.

Palavras-chave: enriquecimento ambiental, stresse, cão, comportamento, fisiologia

**Abstract**

Environmental enrichment in shelter dogs – a behaviour and physiological approach

In order to understand the interference of several types of environmental enrichment on the behaviour and physiology of shelter dogs, eight dogs were submitted to periods of absence and presence of social enrichment and olfactive stimulation using rosemary branches, as well as recordings during all phases to posterior behaviour analysis and salivary collections to determine salivary cortisol.

The results showed a significant reduction of stresse and intermediate behaviours, and a significant increase of the desirable ones, as well as a downward trend of salivary cortisol throughout the phases.

The rosemary branches were used as toys and showed up as good cognitive stimulators.

We could conclude that it is possible to improve the welfare conditions of shelter dogs with little changes of the environment that promote cognitive stimulation through introduction of rosemary branches and, if possible, social contact, exercise and playfulness.

Keywords: environmental enrichment, stresse, dog, behaviour, physiology.

**Índice**

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice de gráficos .....	vii
Índice de tabelas .....	ix
Índice de figuras .....	x
Lista de abreviaturas .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Revisão de literatura .....	3
2.1. Componente comportamental .....	3
2.2. Componente fisiológica .....	6
2.2.1. Cortisol.....	6
2.2.2. Neurotransmissores .....	8
2.3. Enriquecimento ambiental .....	9
3. Objetivos do estudo .....	13
4. Materiais e métodos .....	14
4.1. Nota prévia .....	14
4.2. Local e condições de alojamento habitual .....	14
4.3. Alojamento durante o estudo .....	14
4.4. Amostra .....	15
4.5. Delineamento experimental.....	16
4.5.1. Primeira etapa – teste piloto.....	16
4.5.2. Segunda etapa .....	17
4.6. Recolha de dados.....	18
4.6.1. Comportamento.....	18
4.6.2. Saliva .....	19
4.7. Processamento da informação.....	20
4.7.1. Comportamento.....	20
4.7.2. Saliva.....	25



5.	Análise estatística.....	25
6.	Resultados.....	26
6.1.	Componente comportamental.....	26
6.1.1.	Comportamentos indicadores de stresse.....	26
6.1.1.1.	Variável específica “Andar sem rumo”.....	28
6.1.2.	Comportamentos intermédios.....	29
6.1.2.1.	Variável específica “Lamber-se”.....	30
6.1.2.2.	Variável específica “Ficar atento”.....	31
6.1.3.	Comportamentos considerados desejáveis.....	32
6.1.3.1.	Variável específica “Brincar”.....	34
6.1.3.2.	Variável específica “Deitar”.....	35
6.1.4.	Interação com o estímulo adicional – ramos de alecrim.....	36
6.2.	Componente fisiológica.....	38
6.2.1.	Cortisol salivar.....	38
7.	Discussão.....	39
7.1.	Componente comportamental.....	40
7.2.	Componente fisiológica.....	48
8.	Principais ilações.....	52
9.	Nota final.....	53
10.	Bibliografia.....	54

**Índice de gráficos**

Gráfico 1 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo ..... 27

Gráfico 2 - Comparação das médias do tempo de permanência nos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo ..... 27

Gráfico 3 - Comparação dos percentis relativos ao tempo de permanência nos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo ..... 28

Gráfico 4 – Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Andar sem rumo" ao longo das três fases do estudo ..... 28

Gráfico 5 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos intermédios nas três fases do estudo ..... 29

Gráfico 6 - Comparação das médias do tempo de permanência dos comportamentos intermédios nas três fases do estudo ..... 30

Gráfico 7 - Comparação dos percentis relativos ao tempo de permanência nos comportamentos intermédios nas três fases do estudo ..... 30

Gráfico 8 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Lamberse" ao longo das três fases do estudo ..... 31

Gráfico 9 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Ficar atento" ao longo das três fases do estudo ..... 31

Gráfico 10 - Comparação das médias dos tempos de permanência no comportamento "ficar atento" ao longo das três fases de estudo ..... 32

Gráfico 11 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo..... 33

Gráfico 12 - Comparação das médias dos tempos de permanência nos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo..... 33

Gráfico 13 - Comparação dos percentis relativos aos tempos de permanência nos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo..... 34

Gráfico 14 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Brincar" ao longo das três fases do estudo ..... 34

Gráfico 15 - Comparação das médias do tempo de permanência no comportamento "Brincar" ao longo das três fases do estudo ..... 35

Gráfico 16 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Deitar" ao longo das três fases do estudo ..... 36

Gráfico 17 - Comparação das médias do tempo de permanência no comportamento "Deitar" ao longo das três fases do estudo ..... 36

Gráfico 18 - Frequência absoluta da interação de cada animal com os ramos de alecrim ..... 37

Gráfico 19 - Frequência relativa do total de interações com os ramos de alecrim ..... 37

Gráfico 20 - Tempo total de interação com os ramos de alecrim durante a fase 3 ..... 38

Gráfico 21 - Média e erro padrão da média dos níveis de cortisol salivar em cada uma das três fases .....	38
Gráfico 22 - Mediana do nível de cortisol salivar em cada uma das três fases.....	39

**Índice de tabelas**

Tabela 1 - Esquema do delineamento experimental seguido durante o estudo.....	16
Tabela 2 - Descrição dos procedimentos realizados em cada fase .....	16
Tabela 3 - Descrição dos comportamentos observados.....	20
Tabela 4 - Comportamentos observados divididos por categorias segundo o tipo .....	22
Tabela 5 - Exemplo de um etograma (segunda etapa; primeira fase; parque 1; 18-02-2020)...	23
Tabela 6 -Exemplo de um registo baseado no tempo de desempenho de cada tipo de comportamento (segunda etapa; terceira fase; parque 1; 17-03-2020) .....	24

**Índice de figuras**

Figura 1 - Parque 1 .....	15
Figura 2 - Parque 2 .....	15
Figura 3 - Câmaras, do tipo GoPro, utilizadas para a recolha de informação audiovisual .....	18
Figura 4 - Posicionamento dos tripés com as câmaras, em dia de chuva, para a recolha de informação audiovisual (fotografia cedida pela voluntária Marta Correia).....	19
Figura 5 - Salivetes utilizadas para a recolha de saliva .....	20

**Lista de abreviaturas**

ACTH – Hormona adrenocorticotrópica (adrenocorticotrophic hormone)

CME – Canil Municipal de Évora

CRH – Hormona libertadora de corticotropina (corticotrophin releasing hormone)

Min – Minutos

## 1. Introdução

Apesar de, dia após dia, existir uma maior consciencialização em relação aos animais, e apesar das leis que já existem para criminalizar, com multas ou penas de prisão, qualquer pessoa que não respeite o seu estatuto jurídico (Lei n.º 8/2017 de 3 de março, 2017), a verdade é que o número de animais abandonados em Portugal não tem diminuído significativamente. Em 2017 foram recolhidos cerca de quarenta e um mil animais, enquanto em 2018 foram apenas menos cinco mil (36 000 animais), de acordo com o relatório de gestão da lei nº 27/2016, de 23 de agosto dos Centros de recolha oficial (2020). Segundo o mesmo relatório, em 2019 este número foi de cerca de trinta e dois mil animais.

Infelizmente, o número de adotantes não chega aos vinte mil por ano (Centros de recolha oficial, 2020) pelo que, a maioria dos animais recolhidos são condenados a passar grande parte da sua vida nos centros de recolha oficiais, ou canis.

Com a entrada em vigor em 2018 da lei que proíbe o abate dos animais saudáveis em centros de recolha oficiais (Lei n.º 27/2016 de 23 de agosto, 2016), estes locais foram obrigados a alojar um maior número de animais durante um período de tempo mais longo (até que sejam adotados ou até ao fim da sua vida) pelo que se torna mais difícil garantir o bem-estar de todas as vidas lá presentes (Dalla Villa et al., 2013).

Para determinar se o bem-estar dos animais é garantido importa, em primeiro lugar, perceber que condições devem ser asseguradas para atingir tal fim.

Segundo o Farm Animal Welfare Council (Farm Animal Welfare Council, 2012) e o “Code of Practice for the Welfare of Dogs” (Great Britain and Department for Environment, 2017), os objetivos de bem-estar animal são cinco e estão presentes no conceito das cinco liberdades: livre de fome e de sede; livre de desconforto; livre de dor, sofrimento ou doença; livre de expressar o comportamento normal; livre de medo e stresse.

Sendo assim, tendo por base o “Code of Practice for the Welfare of Dogs”, a pessoa responsável por um animal é também responsável por providenciar todas as suas necessidades e deve proporcionar-lhe os cinco pontos necessários para a manutenção do seu bem-estar (Great Britain and Department for Environment, 2017):

- Providenciar um ambiente adequado para viver, tendo este que ser limpo, seguro e calmo, com possibilidade do animal se esconder e com uma zona afastada da área de descanso para realizar as suas necessidades.
- Providenciar uma dieta balanceada, evitando excessos que possam provocar um aumento de peso com consequências negativas para a saúde do animal, bem como água limpa e fresca durante todo o dia.

- Permitir a expressão do seu comportamento natural que inclui o exercício físico, a brincadeira com outros animais e pessoas e o descanso sem perturbação, evitando situações que possam provocar stresse ou aborrecimento.
- Providenciar contacto com outras pessoas e animais de modo a evitar a solidão. Caso o cão permaneça com outro animal, é importante possuírem espaço e brinquedos adequados para ambos, para minimizar confrontos e marcações de território. É importante permanecer atento a qualquer sinal de medo ou stresse.
- Manter a saúde do animal, protegendo-o de dor, sofrimento e doença. É importante monitorizar o comportamento e procurar sinais de dor ou ferimentos e, caso algo não se apresente de acordo com o que é natural para o cão, deve-se contactar imediatamente um veterinário para detetar atempadamente possíveis problemas.

Apesar da função indispensável que os centros de recolha desenvolvem, a enorme lotação e a consequente falta de espaço, conjugada com a falta de funcionários e/ou voluntários, acabam por ser fatores limitantes quando se trata de atingir os objetivos descritos anteriormente.

O meio envolvente é geralmente bastante restrito, tanto em tamanho como em complexidade, limitando o contacto com outros cães, com pessoas e com o mundo exterior (Taylor and Mills, 2007) e impossibilitando, muitas vezes, a existência de uma área separada da zona de descanso, para que os animais possam fazer as suas necessidades. Esta restrição de espaço e falta de estimulação faz com que o ambiente de um canil seja potencialmente stressante (Beerda et al., 2000).

Por outro lado, estes locais são caracterizados pelo intenso ruído de fundo que contribui para um potencial agravamento do stresse (Taylor and Mills, 2007). Um estudo mostrou que seis meses de exposição ao ruído existente em abrigos (que pode alcançar os 100dB segundo Sales et al. (1997), Coppola et al. (2006<sup>a</sup>) e Venn (2013)) originou a perda de algum grau de audição de todos os cães incluídos no estudo (Scheifele et al., 2012).

O isolamento é outro dos principais problemas encontrados em centros de recolha. Tanto interespecie (com pessoas), como intraespecie (com outros cães), os cães de abrigo vivem num ambiente hipostimulante, uma vez que a maioria dos canis opta por alojar os animais individualmente para evitar problemas de agressividade e minimizar a transmissão de doenças (D.L. Wells, 2004a). Apesar dos benefícios do alojamento individual a nível prático e de monitorização (Taylor and Mills, 2007), este isolamento tende a promover a expressão de diversos comportamentos negativos associados ao stresse (Beerda et al., 2000).

A exposição continuada a todos os fatores acima descritos, origina frequentemente respostas fisiológicas e comportamentais associadas ao stresse crónico, principalmente nas situações mais graves de inadaptação ao ambiente (van Rooijen, 1991; Hubrecht et al., 1992; Beerda et al., 1999b; Morgan and Tromborg, 2007).



Para concluir acerca do bem-estar dos cães de abrigo, é importante avaliar o nível de stresse destes animais, uma vez que este é o indicador que melhor expressa a menor qualidade de vida, sobretudo quando se trata de stresse crónico (Beerda et al., 1999b).

Com a finalidade de inferir acerca da qualidade de vida dos cães alojados em canil, os estudos recorreram a dois tipos de informação: a análise comportamental (Beerda et al., 1999b; Graham et al., 2005; Kogan et al., 2012) e a fisiológica, sendo que a fisiológica tem duas componentes, a hormonal (Beerda et al., 2000; Coppola et al., 2006b; Dalla Villa et al., 2013; Hennessy, 2013) e a nervosa (Beerda et al., 1999a; Odendaal and Meintjes, 2003; Osella et al., 2005; Alberghina et al., 2017).

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Componente comportamental**

Na componente comportamental, é importante distinguir que tipo de padrões são característicos de animais com baixos níveis de stresse e, conseqüentemente, maior bem-estar e, pelo contrário, quais os comportamentos que têm maior expressão quando os cães são sujeitos a fatores de stresse.

Por um lado, dormir durante o dia (Kogan et al., 2012; Owczarczak-Garstecka and Burman, 2016), descansar e sentar, bem como a redução da excitação quando as pessoas se aproximam das jaulas (posturas calmas e menor número de saltos na porta da jaula) (Herron et al., 2014) são comportamentos considerados desejáveis nos animais alojados em abrigos. Porém, caso este tipo de condutas ocorra de forma excessivamente prolongada deve suspeitar-se de hipoestimulação e de stresse psicológico (Hubrecht et al., 1992; Wells et al., 2002; Hiby et al., 2006; Dalla Villa et al., 2013). O silêncio, ou seja, a diminuição da vocalização também pode ser considerado um comportamento característico de bem-estar (Herron et al., 2014; Kogan et al., 2012).

Dalla Villa et al. (2013) observaram que cães alojados em grupos apresentavam uma maior percentagem de comportamentos afiliativos (brincar, contacto social) do que cães alojados aos pares. Este tipo de comportamento, em conjunto com a exploração (cheirar e procurar na jaula) e a diminuição dos comportamentos repetitivos, já tinham sido descritos como indicadores de bem-estar (Fraser and Duncan, 1998; Rooney and Bradshaw, 2014).

Hubrecht et al. (1992) também verificaram que, quando o alojamento era feito em grupos, havia um aumento significativo do interesse pelo ambiente, com uma maior percentagem de tempo dedicada a cheirar o chão, provavelmente pela procura do cheiro dos outros cães pertencentes ao grupo.

Cães mais sociáveis, não só com outros cães mas também com pessoas, mostraram possuir menores níveis de stresse (Dufour et al., 2005).

Segundo o “Code of practice for the welfare of dogs”, a maioria dos cães apresenta como naturais comportamentos como brincar, socializar, farejar e investigar (Great Britain and Department for Environment, 2017).

Segundo este mesmo código, e do ponto de vista negativo, podem ser observados em animais com algum nível de stresse, comportamentos como vocalização excessiva, destruição dos objetos presentes no meio, arfar excessivo, lambe as comissuras labiais, esconder-se e comportamentos de agressividade.

Rooney et al. (2009) caracterizam a resposta ao stresse com comportamentos como bocejar, lambe as comissuras labiais, arfar, tremores, postura baixa, esconder-se, ladrar e rosnar.

O BSAVA - Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine, apresenta três categorias de comportamentos passíveis de identificar em cães sujeitos a fatores de stresse: comportamentos “deslocados”, ou seja, comportamentos normais que são realizados em contextos inapropriados (lambe, grooming, picacismo), comportamentos estereotipados (lambe excessivamente, circling, correr atrás da cauda, correr junto à rede da jaula, vocalização excessiva, polidipsia, polifagia) e comportamentos de “alucinação” (permanecer a olhar para o exterior sem um objetivo claro, caçar moscas) (Horwitz and Mills, 2010).

Os autores também diferenciam a abordagem comportamental segundo o tipo de stresse a que os cães estão sujeitos – agudo ou crónico. Quando se trata de stresse agudo, as condutas mais comuns são agressividade, procurar um sítio para se esconder, procura de contacto/atenção com humanos ou outros animais, arfar, salivar, urinar/defecar, dilatação das pupilas, vocalização e anorexia (Horwitz and Mills, 2010).

Walker et al. (2016) provaram que cães alojados em canis, a curto e a longo prazo, apresentam maior percentagem de comportamentos como lambe as patas, escavar, vocalizar, beber, arfar, abanar a cauda e atividade física, quando comparados com cães que vivem com famílias.

No entanto, Hubrecht et al. (1992), identificaram como sinal de stresse crónico induzido pelo isolamento, não só o excesso de locomoção como também a inatividade prolongada, uma vez que os animais passavam uma grande parte do tempo “aborrecidos”, procurando sempre estímulo sensorial no ambiente que os rodeava.

Já Beerda et al. (1997, 1999b) e Grigg et al. (2017) descreviam os comportamentos como lambe as patas, escavar, circling, comer fezes, vocalizar e aumento da atividade física em conjunto com os comportamentos estereotipados (saltar e correr), como característicos de cães sujeitos a stresse crónico por restrição de espaço e isolamento.

Segundo Beerda et al. (1999b), esta restrição provocou nos animais uma mudança comportamental a três níveis: maior excitação quando eram estimulados (abanar a cauda, vocalizar, circling, urinar, defecar e alterações nos estados de locomoção), maior agressividade (rosnar, eriçar o pelo e postura elevada) e mais comportamentos relacionados com a falta de previsibilidade (lambe as patas, posturas ambivalentes, mudanças na locomoção e tremores).

Beerda et al. (2000), num estudo onde quatro grupos de cães foram alojados em condições sucessivamente mais restritas, tanto em espaço como em complexidade ambiental (redução do

tamanho da jaula e eliminação do alojamento conjunto) mostraram que os comportamentos como excesso de locomoção, vocalização, lambar as patas e urinar aumentaram do primeiro para o último grupo (sendo o último o correspondente às maiores restrições). Os animais pertencentes ao grupo com maiores restrições também se destacaram por raramente apresentarem uma postura elevada (comportamento já descrito como indicador de stresse por Beerda et al. (1999b)).

Outro estudo onde 58 cães foram submetidos a restrição de alimento e de espaço obteve resultados que corroboram a bibliografia já existente. Os animais aumentaram a vocalização, mantiveram a cauda e a própria postura baixa, dedicaram mais tempo a lambar as patas e o focinho, bem como a escavar e a morder a jaula. Comportamentos como bocejar e esconder-se também aumentaram. Alguns animais, pelo contrário, mostraram maior grau de inatividade (Bodnariu, 2008).

Os tremores também podem ser utilizados para identificar o nível de bem-estar, já que estão relacionados com pior qualidade de vida (Beerda et al., 2000; Kogan et al., 2012).

Vários outros estudos defendem igualmente que os comportamentos estereotipados e repetitivos, bem como a auto-mutilação, são indicadores de stresse grave e podem ser utilizados para avaliar os níveis baixos de bem-estar dos cães (Mason et al., 2007; Hewson et al., 2007; Denham et al., 2014; Hecht and Horowitz, 2017).

Ainda na componente comportamental, é importante também definir a metodologia utilizada no registo dos diferentes comportamentos dos animais.

É possível dividir a metodologia em dois tipos: focal, quando o registo comportamental é feito apenas num momento (o operador regista os comportamentos de cada animal individualmente ou de todos os animais num momento e realiza vários registos durante um período, de acordo com uma periodicidade pré-definida) e contínua, caracterizada pelo registo de todas as condutas, sem interrupções, ao longo de um período.

A abordagem focal foi utilizada em menor escala mas está presente em vários estudos: Hennessy et al. (2001), Wells and Egli (2004), Pastore et al. (2011), Kogan et al. (2012), Herron et al. (2014) e Oliveira (2017).

A abordagem contínua tem sido a mais utilizada em estudos anteriores (Beerda et al., 1997, 2000; Rooney et al., 2007; Bodnariu, 2008; Dalla Villa et al., 2013; Denham et al., 2014; Owczarczak-Garstecka and Burman, 2016; Walker et al., 2016; Kiddie et al., 2017). Os dados são obtidos recorrendo à gravação dos animais durante um determinado intervalo de tempo para, posteriormente, se discriminarem todos os comportamentos por eles realizados.

Neste caso é também possível registar os comportamentos tendo em conta o número de vezes que foram realizados ou a quantidade de tempo dedicada a cada comportamento. Alguns autores optaram por utilizar ambos os tipos de registo (Owczarczak-Garstecka and Burman, 2016; Walker et al., 2016).

As duas abordagens possuem a desvantagem de poderem interferir no comportamento dos animais em estudo por falta de habituação ao operador ou à câmara (Dalla Villa et al., 2013; Kiddie et al., 2017). No entanto, na abordagem contínua é possível ultrapassar esta dificuldade mais facilmente do que na abordagem focal, uma vez que, por um lado, os animais podem passar por um período de habituação ao material utilizado, o que é comum à abordagem focal, e por outro, os primeiros e os últimos minutos das gravações obtidas (minutos correspondentes ao momento em que as câmaras são colocadas e retiradas do local, respetivamente) podem ser descartados de modo a diminuir esta influência, o que apenas é possível na abordagem contínua (Dalla Villa et al., 2013).

## **2.2. Componente fisiológica**

Quando se trata da avaliação fisiológica do stresse, o parâmetro mais utilizado é, sem dúvida, o cortisol. Numerosos estudos demonstraram a relevância desta hormona na avaliação do bem-estar (Beerda et al., 2000; Coppola et al., 2006b; Dalla Villa et al., 2013; Hennessy, 2013; Hewison et al., 2014). No entanto, existem outras substâncias que podem ser medidas, nomeadamente a serotonina e a dopamina, para aferir a qualidade de vida dos animais (Axelrod and Reisine, 1984; Riva et al., 2008; Sechi et al., 2017).

### **2.2.1. Cortisol**

O mecanismo de libertação do cortisol no organismo é complexo.

Quando há uma ameaça à homeostasia do animal, o hipotálamo é estimulado com sinais neurológicos. Nesse momento, o hipotálamo liberta CRH (hormona libertadora de corticotropina) no sistema porta hipotálamo-hipofisário, que funciona como um transportador destes péptidos até aos recetores da porção anterior da hipófise. Por sua vez, a hipófise liberta ACTH (hormona adrenocorticotrófica) na circulação sanguínea, que estimula os recetores do córtex adrenal, libertando este glucocorticoides (cortisol) (Hennessy, 2013).

O facto do tempo decorrido entre o estímulo e a libertação de cortisol ser de alguns minutos (Davidson et al., 1968; Coover et al., 1979) pode permitir que as recolhas sejam feitas sem afetar significativamente os resultados (Hennessy, 2013), embora nem sempre tal ocorra.

Os glucocorticoides libertados pela glândula adrenal ou os seus metabolitos estão presentes no sangue, saliva, urina, fezes e cabelo (Hennessy, 2013).

Aumentos e diminuições dos níveis desta hormona estão associados a numerosos fatores (DeKosky et al., 1984; Cobb et al., 2016) que são muitas vezes difíceis de padronizar, tal como a idade (Palazzolo and Quadri, 1987), a presença de comportamentos dominantes (associados a níveis de cortisol fecal mais elevados) (Sands and Creel, 2004), a exposição a ciclos diferentes de luz/escuro (Sachar et al., 1973), as experiências anteriores do animal em centros de recolha oficial (Hiby et al., 2006), a esterilização e o tamanho do próprio animal (Sandri et al., 2015).

O cortisol salivar é um método menos invasivo, característica muito importante quando se discorre sobre o bem-estar animal (Damián et al., 2018), e é considerado um melhor indicador

fisiológico de stresse do que o cortisol plasmático, uma vez que é o reflexo direto da porção ativa do cortisol total (Kirschbaum and Hellhammer, 1989; Cook et al., 1997; Gröschl et al., 2000).

Segundo Cobb et al. (2016), o valor normal de cortisol salivar em cães varia entre 0 e 33.79 mg/dL, sendo que um aumento da concentração desta hormona está associado a níveis de stresse elevados (Beerda et al., 2000; Coppola et al., 2006b; Rooney et al., 2007; Dalla Villa et al., 2013).

No entanto, todas as influências externas anteriormente citadas levaram a que o cortisol salivar não fosse considerado, por alguns autores, um marcador fidedigno de bem-estar quando utilizado isoladamente (Cobb et al., 2016). Neste estudo verificou-se que os animais alojados em canis possuíam menor concentração de cortisol salivar do que aqueles que viviam em casas privadas, o que poderia sugerir uma exaustão do complexo hipotálamo-hipofisário com consequente redução dos níveis desta hormona (Cobb et al., 2016).

Já Hennessy (2013) tinha concluído que a concentração de cortisol era mais fiável quando usada para medir situações de stresse pontual do que naquelas associadas ao stresse crónico.

Por outro lado, Pastore et al. (2011) registaram que os cães presentes em competições de *agility* mostravam igualmente alguns comportamentos indicadores de stresse mas a concentração de cortisol salivar, apesar de sofrer aumentos, não estava significativamente relacionada com aquelas alterações comportamentais.

Hennessy et al. (2001) observaram que animais com menores concentrações de cortisol em ambiente de canil mostravam mais problemas comportamentais após a sua adoção.

Apesar da clara vantagem que o cortisol salivar possui (o facto de ser um método menos invasivo do que o cortisol plasmático), este método tem também algumas desvantagens (Granger et al., 2007) que podem interferir com os resultados finais (para além da variação intrínseca de cada animal) e que devem ser tidas em conta aquando da sua escolha.

A quantidade de amostra obtida possui um grande intervalo de valores. Segundo Dreschel and Granger (2009), pode variar entre os 0 e os 1.5 ml, sendo que as quantidades mais baixas são geralmente amostras de animais de menor dimensão ou menos cooperantes. Este facto, juntamente com a evidência de que alguma quantidade de saliva pode permanecer no material de recolha (especialmente no caso do algodão) (Harmon et al., 2007) acaba por limitar a duplicação das determinações nas amostras para garantir a sua validade.

Na mesma linha de pensamento, Srithunyarat et al. (2018) relataram que a quantidade de amostra recolhida sem recurso a estimulantes era, muitas vezes insuficiente para a avaliação laboratorial. Por este motivo, é importante utilizar um estimulador da produção de saliva para garantir que a amostra é suficiente para a determinação pretendida.

Apesar da recomendação, o próprio estimulante pode também influenciar os resultados pelo que é necessário ter a percepção de que os parâmetros poderão ser alterados por ele.

O ácido cítrico é o estimulante mais utilizado (Kobelt et al., 2003; Dreschel and Granger, 2009; Cobb et al., 2016) embora tenha interferência nos resultados. Em humanos, o ácido cítrico mostrou provocar um falso aumento dos níveis de testosterona e cortisol salivar devido a uma

acidificação da amostra (Schwartz et al., 1998; Granger et al., 2004). Outro estudo em cães, confirmou também a possibilidade de ocorrer esta interferência com o pH da amostra e, conseqüentemente, com a medição de cortisol, uma vez que se verificou que uma pequena quantidade de ácido cítrico (0.01g/ml) provocou uma diminuição significativa do pH da amostra e uma elevação proporcional na concentração de cortisol salivar (Dreschel and Granger, 2009). Sendo assim, é necessário ser cauteloso na utilização desta hormona como indicador da qualidade de vida dos animais.

### 2.2.2. Neurotransmissores

Em relação aos neurotransmissores, aqueles que parecem apresentar uma maior correspondência com os níveis, altos ou baixos, de bem-estar são a serotonina e a dopamina, uma vez que possuem uma poderosa relação com a componente comportamental, tanto positiva (comportamentos associados ao bem-estar) como negativa (comportamentos relacionados com ansiedade e agressividade) (Riva et al., 2008; Hashemi et al., 2012).

Apesar do consenso em algumas das funções destes dois neurotransmissores, a verdade é que a sua presença em determinados comportamentos e a relação existente entre eles é controversa. A serotonina, graças à ativação de vários recetores, tem a capacidade de interferir em numerosas funções fisiológicas (Casper, 1998), tais como o humor, a cognição, o comportamento, o apetite, a memória e a capacidade de aprendizagem (Smythies, 2005).

Igualmente a agressividade (Rosado et al., 2010) e a impulsividade (Wright et al., 2012) estão relacionados com a diminuição dos níveis séricos de serotonina.

Da mesma forma, uma diminuição dos níveis de serotonina pode indicar situações de stresse crónico, graças à diminuição do *turnover* deste neurotransmissor (van Praag, 2004).

Alberghina et al. (2017), num estudo realizado num canil de Itália, concluíram que níveis baixos de serotonina são indicadores ansiedade e de stresse crónico. Nesse mesmo estudo, é ainda realçado que os animais com níveis superiores de serotonina apresentaram um maior número de comportamentos considerados amigáveis perante o operador.

Segundo Bosch et al. (2007), uma situação de stresse agudo resulta num maior *turnover* de serotonina, aumentando os seus níveis séricos, porém, quando este fator de stresse se torna crónico, há uma diminuição mais ou menos acentuada desses níveis.

Em relação à dopamina, ela está envolvida, aparentemente, na agressividade e no comportamento sexual (Rogeness et al., 1984; Haney et al., 1990), bem como no sistema de recompensa (Robbins and Everitt, 1996; Tobler et al., 2003; Fibiger and Phillips, 2011).

Tal como a serotonina, a dopamina é um neurotransmissor igualmente relacionado com os níveis de stresse presente nos animais. No entanto, a bibliografia existente é menos consensual, uma vez que os dados são contraditórios. Assim, em ratos exibindo níveis mais elevados de dopamina estão associados episódios de stresse e agressividade (Modigh, 1973; Mitchell and Gratton, 1994). Riva et al. (2008) corroboraram estes resultados ao observarem níveis superiores de dopamina em cães com problemas de ansiedade.

Ainda em cães, outros estudos apresentam resultados contrários, uma vez que concluíram que são os níveis baixos deste neurotransmissor que se relacionam com comportamentos de ansiedade (Osella et al., 2005) e de impulsividade (Wright et al., 2012).

Odendaal and Meintjes (2003) corroboram os dados acima descritos, uma vez que observaram que a interação positiva entre homens e cães resultou num aumento significativo da dopamina sérica em ambos os participantes.

Lebelt et al. (1998) evidenciaram que em cavalos, os comportamentos estereotipados estão associados a uma inibição das vias nervosas dopaminérgicas.

### **2.3. Enriquecimento ambiental**

As regras da sociedade atual, que incluem a melhoria das condições de bem-estar dos animais e o respeito pelas suas liberdades, originaram nas pessoas uma necessidade de proporcionar aos cães alojados em canis uma maior qualidade de vida e menos stresse.

Para se atingir este fim, recorre-se maioritariamente ao enriquecimento ambiental, cujos objetivos incluem, por um lado, a aproximação do comportamento dos animais ao padrão da espécie, o aumento da capacidade para lidar com alterações ambientais, a melhoria dos comportamentos considerados positivos e a redução, ou até mesmo eliminação, dos comportamentos estereotipados (Chamove and Moodie, 1990; Young, 2003; Wells, 2009). Por outro, a tentativa da redução dos níveis de cortisol (Coppola et al., 2006b), já que a permanência de níveis elevados desta hormona pode originar uma redução da competência imunitária e aumento da frequência de doenças (Dhabhar, 2009).

Existem vários tipos de enriquecimento ambiental que provaram ser eficazes no alcance dos objetivos acima descritos.

Em primeiro lugar, é possível separar as técnicas de enriquecimento ambiental em duas categorias: enriquecimento animado/vivo e enriquecimento inanimado (Beerda et al., 2000; D.L. Wells, 2004a).

Dentro do enriquecimento ambiental animado, distinguem-se a interação intra-espécie (com outros cães) e inter-espécie (com humanos).

Como foi descrito anteriormente, embora o alojamento individual possua algumas vantagens, o cão é um animal social e portanto o isolamento pode originar comportamentos considerados indesejáveis nos animais albergados em centros, tal como a inatividade e os comportamentos estereotipados (Mertens and Unshelm, 1996; Beerda et al., 2000). Por outro lado, existem muitas vantagens quando se opta por um alojamento aos pares ou em grupo, tal como o aumento dos comportamentos afiliativos e de interação social, bem como a exploração graças ao maior interesse pelo ambiente (Fraser and Duncan, 1998; Dalla Villa et al., 2013; Rooney and Bradshaw, 2014). Da mesma forma, há também uma maior taxa de sucesso na adoção de animais pertencentes a grupos, visto que, por um lado, os cães podem interagir de forma mais natural com outros cães (comportamento apreciado por possíveis adotantes), e por outro, esta

interação promove a habituação a outros animais diminuindo os problemas comportamentais (Mertens and Unshelm, 1996), apesar de também poder levar a uma maior sensibilização destes mesmos cães (Bruce Overmier, 2002; Riemer et al., 2020).

Grigg et al. (2017) observaram que cães que viviam aos pares, quando comparados com os alojados individualmente, apresentavam menos comportamentos repetitivos (saltar, ladrar e arfar) e passavam períodos mais curtos em vigilância ativa à procura de estímulo. Neste estudo foram ainda confirmados os resultados apresentados por Mertens and Unshelm (1996) relativamente à agressividade, uma vez que, em ambos os casos, não existiu agressividade entre os coabitantes.

Sendo assim, ainda que o contacto visual com outros cães possa promover o aumento da vocalização (Sales et al., 1997; Coppola et al., 2006a), é importante fornecer esta interação uma vez que os animais adquirem mais controlo e lidam melhor com o ambiente onde estão inseridos (Hubrecht et al., 1992).

Mertens and Unshelm (1996) constataram que o isolamento favorecia comportamentos passivos, estereotipados e de agressividade. Os animais também vocalizavam significativamente mais do que aqueles alojados em grupos. Estes, por sua vez, estavam mais ativos e apresentavam mais comportamentos de exploração, com uma redução substancial dos comportamentos estereotipados.

No entanto, na maioria dos canis, não há possibilidade de fornecer este tipo de enriquecimento devido à falta de espaço para a junção dos animais ou para a promoção da interação entre indivíduos.

O contacto com pessoas é outro dos parâmetros importantes para melhorar as condições de vida dentro dos centros de recolha oficial.

Numerosos estudos comprovaram que a interação humana, ainda que por breves períodos, tem consequências altamente desejáveis nos cães de abrigo, tanto a nível comportamental como fisiológico (Coppola et al., 2006b; Normando et al., 2009; Herron et al., 2014; Protopopova et al., 2018).

Por exemplo, Protopopova et al. (2018), mostraram que, tanto as interações calmas entre os voluntários e os animais, como as sessões de exercício, diminuíram comportamentos negativos no geral, tal como saltar na porta e ladrar, e aumentaram comportamentos como deitar, ficar calmo e quieto e passar mais tempo na parte da frente do canil, que é um comportamento muito apreciado por possíveis adotantes (Wells and Hepper, 2000).

Coppola et al. (2006), constataram que 45 minutos de contacto com pessoas (incluindo treino, passeio e brincadeiras) era capaz de reduzir significativamente o nível de cortisol salivar desses mesmos cães.

Normando et al. (2009), evidenciaram que o contacto com pessoas apenas através da visão, pode aumentar significativamente comportamentos desejáveis tais como passar mais tempo na parte visível da jaula (visibilidade), maior contacto social e mobilidade.



Para além de todas estas vantagens, o contacto com pessoas é ainda fundamental quando se trata de cães que sofreram experiências negativas antes da sua entrada no centro de recolha (Mertens and Unshelm, 1996). Estes cães possuem, geralmente, maior dificuldade em confiar e em permitir o contacto com humanos, tornando a sua adoção mais problemática. A interação inter-espécie, ou seja, a dessensibilização, permite reduzir o medo dos animais em relação às pessoas, com consequências positivas aquando da adoção (Mertens and Unshelm, 1996).

Este tipo de enriquecimento sofre da mesma impossibilidade que o descrito no ponto anterior, uma vez que, apesar de ser altamente eficaz na melhoria das condições de bem-estar dos animais, é, na maioria dos casos, difícil de executar em centros de recolha devido à falta de funcionários e/ou voluntários.

O enriquecimento ambiental inanimado é utilizado para proporcionar aos animais um ambiente mais estimulante dentro da jaula (D.L. Wells, 2004a). É também relativamente mais fácil de realizar em canis do que o animado, graças à menor necessidade em funcionários e/ou em espaço.

Os brinquedos, os sons e os aromas são várias das opções utilizadas para oferecer conforto e estímulo aos cães.

O fornecimento de brinquedos é talvez das técnicas mais utilizadas neste tipo de centros (D.L. Wells, 2004a). No entanto, Wells and Hepper (2000), defendem que os brinquedos são mais vantajosos para aumentar a taxa de adoção (os possíveis adotantes vêm os cães que possuem brinquedos na jaula, mais desejáveis) do que para o estímulo dos animais em si. Este estudo sugere que, em ambientes hiper-estimulantes, a introdução de brinquedos não influencia o comportamento dos animais.

Hubrecht (1993) observou que os cães jovens mostram interesse nos brinquedos introduzidos durante várias semanas. Já DeLuca and Kranda (1992); Wells and Hepper (2000); D.L. Wells (2004) verificaram que, em animais adultos, este interesse desaparecia em questão de dias, devido à habituação rápida aos brinquedos, ou simplesmente esse interesse não existia desde o primeiro contacto com o estímulo (Wells and Hepper, 2000).

Pullen et al. (2010) num estudo em que oferecia a cães alojados em abrigo diferentes tipos de brinquedos e diferentes abordagens ao próprio brinquedo (estar posicionado no chão ou pendurado, por exemplo), concluíram que os cães preferiam brinquedos mastigáveis, tal como peluches e ossos de borracha e não mostravam interesse em brinquedos duros. Igualmente valorizavam brinquedos passíveis de ser levados na boca, desvalorizando os maiores, tal como bolas, que provocavam pouca interação e estímulo. No entanto, o estudo mostra também que o tempo despendido com esses brinquedos é geralmente pouco, sobretudo quando há outras formas de enriquecimento (interação com cães ou pessoas, passeios, entre outros).

Schipper et al. (2008), por outro lado, verificou que brinquedos com comida, tal como puzzles, incrementavam o nível de atividade dos animais testados. A vocalização, pelo contrário, reduzia-

se, o que levou os autores a sugerir que enquanto os cães interagiam com o brinquedo, tinham uma redução da interação com o ambiente externo.

O estímulo sonoro, por outro lado, não é tão utilizado nos centros de recolha oficial, uma vez que os seus benefícios são menos conhecidos, mas o interesse por esta área tem vindo a aumentar. Está provado que, em pessoas, a exposição a música clássica ou relaxante tem benefícios fisiológicos (Bechtold et al., 2009), incluindo a diminuição da ansiedade (Dubois et al., 1995) e o aumento da tolerância a procedimentos desconfortáveis (Nelson et al., 2008).

De igual forma, um estudo de 2016 mostrou que gatos expostos a diferentes géneros musicais durante um procedimento cirúrgico, apresentavam alterações na frequência respiratória e no diâmetro pupilar consoante as variações musicais (Mira et al., 2016).

Para concluir acerca do efeito deste tipo de música em cães de canil, Bowman et al. (2015), realizaram um estudo onde se utilizou música clássica como fonte de enriquecimento durante sete dias (cerca de seis horas e trinta minutos por dia). Os resultados deste estudo mostraram que os animais no grupo experimental (grupo com estímulo sonoro) passaram mais tempo deitados e sem vocalizar do que aqueles no grupo controlo. No entanto, este trabalho concluiu também que, quando é utilizada sempre a mesma lista de reprodução, os animais mostram habituação e retornam aos comportamentos anteriores (Bowman et al., 2015).

Kogan et al. (2012) evidenciaram também que a música clássica é benéfica para os cães de abrigo. Desta vez foi comparada a utilização de música clássica com *heavy metal* e os resultados indicaram que, quando expostos à primeira, os animais passavam a maior parte do tempo a dormir e em silêncio. Contrariamente, quando expostos ao *heavy metal*, o comportamento predominante eram os tremores.

Por último, o estímulo olfativo é ainda pouco associado ao enriquecimento ambiental deste tipo de locais, uma vez que os seus benefícios são menos óbvios.

Existem estudos que mostram o poder dos aromas em gatos (Powell, 1995; Schuett and Frase, 2001; Wells and Egli, 2004), ratos (Buchbauer et al., 1993, 1991; Umezu, 2000; Umezu et al., 2001) e porcos (Bradshaw et al., 1998).

Existem também numerosas investigações que nos informam acerca da grande acuidade olfativa dos cães, sendo estes utilizados em várias áreas onde é necessário identificar odores impercetíveis do ponto de vista humano (Schoon and De Bruin, 1994; Lorenzo et al., 2003; Willis et al., 2004).

Tendo em conta essa grande capacidade olfativa que caracteriza os cães, é provável que um enriquecimento deste tipo possa também influenciá-los a nível comportamental e fisiológico.

Wells (2006) mostrou que os cães que apresentavam excesso de excitação durante viagens de carro podiam ficar mais serenos através da introdução de mantas impregnadas com aroma de lavanda. Os animais reduziam significativamente a hiperatividade e a vocalização.

Resultados semelhantes já tinham sido observados por Graham et al. (2005), os quais puderam evidenciar a influência dos aromas no comportamento de cães alojados em canis. Quatro grupos

de animais foram expostos a quatro aromas diferentes (lavanda, camomila, alecrim e hortelã-pimenta), por forma a observarem as relações entre os aromas e os comportamentos adotados. Os resultados revelaram que tanto a lavanda como a camomila promoveram o relaxamento e estimularam os animais a descansar mais e a vocalizar menos. Enquanto o alecrim e a hortelã-pimenta exaltaram um aumento da vocalização e da locomoção, bem como do estado de alerta. Esta diversidade de respostas pressupõe a possibilidade de intervenção diferenciada nos indivíduos consoante os seus comportamentos predominantes: uso de odores estimulantes para os indivíduos hipotativos e odores calmantes para os hiperativos.

### **3. Objetivos do estudo**

Este estudo, realizado no âmbito do mestrado integrado em Medicina Veterinária, pela Universidade de Évora, teve como principal objetivo identificar como é que o enriquecimento ambiental interfere na componente comportamental e fisiológica dos cães alojados em canis, através da quantificação das respostas comportamentais associadas a diferentes tipos de enriquecimentos ambientais e as suas correspondências com os níveis de cortisol salivar.

Para isso, grupos de quatro animais foram alojados em dois parques e expostos a um período de restrição de enriquecimento ambiental (fase 1), seguido de um período onde foi adotada a rotina normal com enriquecimento ambiental através de contacto com humanos e cerca de três horas num parque grande com interação com os outros animais do canil (fase 2) e, por último, a um período de enriquecimento ambiental semelhante à fase 2 mas acrescido, com estimulação sensorial através do aroma como complemento ao enriquecimento já existente (fase 3).

As hipóteses do estudo foram elaboradas tendo em conta uma situação baseada em alojamento em grupo e sem outro tipo de enriquecimento, consistindo em:

- O enriquecimento ambiental, por via do contacto diário com humanos e a permanência num parque grande durante cerca de três horas tem influência no comportamento dos animais com efeitos benéficos nos níveis de bem-estar e qualidade de vida dos mesmos?
- A adição de uma estimulação odorífera ao já existente enriquecimento ambiental tem algum efeito suplementar na estimulação cognitiva e nos níveis de bem-estar e qualidade de vida dos animais?

Para atingir estes objetivos foram utilizados dois tipos de informação.

Por um lado, os animais foram sujeitos a filmagens sucessivas ao longo do estudo para avaliar a evolução comportamental dos animais de acordo com as mudanças introduzidas.

Por outro, em todas as fases foi recolhida saliva de cada um dos participantes para a determinação posterior do cortisol salivar.

#### **4. Materiais e métodos**

##### **4.1. Nota prévia**

Numa primeira abordagem pretendia-se também introduzir nos objetivos do estudo a avaliação dos níveis séricos de serotonina e dopamina de modo a compreender melhor que tipo de relação existia entre os neurotransmissores e a presença ou não de enriquecimento ambiental.

Infelizmente esta determinação não pode fazer parte do plano de trabalho por, entre outros motivos, falta de financiamento.

##### **4.2. Local e condições de alojamento habitual**

O trabalho de projeto decorreu no Canil Municipal de Évora (CME), em dois períodos que compreenderam quatro meses (setembro-outubro de 2019 e fevereiro-março de 2020).

O CME é coordenado pela Dra. Margarida Câmara, que é médica veterinária da Câmara Municipal de Évora desde 2005.

As condições são semelhantes à maioria dos canis de Portugal. Os animais são alojados, individualmente, aos pares ou em pequenos grupos (conforme o espaço disponível e de acordo com o temperamento do próprio animal).

Os cães recolhidos ou entregues no canil têm de permanecer, no mínimo, quinze dias no centro antes de poderem ser adotados, para garantir o período de quarentena e, ao mesmo tempo, impedir a saída antes de poderem ser reclamados pelos possíveis donos.

A rotina habitual no CME inclui cerca de 3h de convívio num parque grande onde se colocam os animais, em grupos, das 9h até às 12h, aproximadamente. Durante a manhã, quando os animais estão no parque, procede-se à limpeza das jaulas e à colocação de comida e água fresca. Durante a tarde, de acordo com a disponibilidade de voluntários (fator limitante), os animais são passeados no terreno fora do canil (sem horário ou dias fixos).

##### **4.3. Alojamento durante o estudo**

Para efeitos do estudo, foram utilizados dois parques contíguos, com cerca de 9,2m<sup>2</sup>, para alojar dois grupos de quatro animais cada, correspondendo aproximadamente a 2,3m<sup>2</sup> por cão.

Ambos os parques possuem uma vedação em rede e um telhado composto por placas metálicas. O chão é revestido por areia e os cães têm à sua disposição dois comedouros (com comida seca *ad libitum*), dois bebedouros e quatro camas de plástico com mantas. Na separação dos parques, a metade inferior da vedação possui um revestimento em malha verde, com cerca de 90 cm, para impedir que os cães tenham contacto visual com o parque do lado. No entanto, tal nem sempre ocorre, pois os cães de maior porte conseguem atingir este objetivo quando se colocam de pé, apoiados na vedação.

O contacto visual é possível com as jaulas que se encontram à frente dos parques.

As dimensões dos parques são semelhantes:

- Parque 1: comprimento – 3,87 cm; largura – 2,36 cm; altura – 1,87 cm



Figura 1 - Parque 1

- Parque 2: comprimento – 4,21 cm; largura – 2,44 cm; altura – 1,93 cm



Figura 2 - Parque 2

Na primeira etapa, que serviu como teste piloto, correspondente ao período entre setembro e outubro, apenas foi utilizado o parque 2.

Somente durante a segunda etapa, entre fevereiro e março, se recorreu a todo o espaço disponível.

#### 4.4. Amostra

A escolha da amostra teve apenas como critério o temperamento e as possíveis incompatibilidades com os cães pertencentes a cada grupo, não sendo critério o tempo de alojamento, a idade ou o sexo.

Foram então escolhidos oito animais, todos com mais de dois meses e menos de três anos de alojamento no centro, com idades compreendidas, por estimativa, entre o um e os seis anos (cinco machos e sete fêmeas).

Na primeira etapa apenas foi utilizado o parque 2 e o grupo compreendia apenas cinco cães.

#### 4.5. Delineamento experimental

Tal como já foi referido anteriormente, o trabalho de projeto descrito, compreendeu duas etapas, desenvolvidas em duas alturas diferentes, sendo que a primeira etapa correspondeu apenas a um teste piloto.

Ambas as etapas foram, por sua vez, divididas em várias fases.

Para facilitar a perceção do protocolo, foram construídas as tabelas 1 e 2, com o esquema de todo o delineamento experimental e a descrição de cada uma das fases, respetivamente.

Ainda assim, para uma melhor compreensão, o protocolo experimental será também analisado individualmente.

Tabela 1 - Esquema do delineamento experimental seguido durante o estudo

	1ª Etapa (teste piloto)	2ª Etapa
<b>Fase 0 (adaptação)</b>	De 14 a 16 de outubro	De 10 a 17 de fevereiro
<b>Fase 1 (sem enriquecimento)</b>	De 16 a 27 de outubro	De 17 a 26 de fevereiro
<b>Fase 2 (com enriquecimento)</b>	De 28 de outubro a 1 de novembro	De 26 de fevereiro a 11 de março
<b>Fase 3 (com estímulo extra)</b>		De 11 a 25 de março

Tabela 2 - Descrição dos procedimentos realizados em cada fase

<b>Fase 0 (adaptação)</b>	Período de adaptação dos animais à sua nova condição, uma vez que os cães eram alojados, em situações normais, isoladamente, bem como às câmaras usadas nas filmagens.
<b>Fase 1 (sem enriquecimento)</b>	Eliminação de todo o tipo de enriquecimento ambiental pertencente à rotina normal dos animais
<b>Fase 2 (com enriquecimento)</b>	Recuperação do enriquecimento ambiental que fazia parte da rotina normal dos animais antes do início do estudo
<b>Fase 3 (com estímulo extra)</b>	Introdução de uma nova forma de enriquecimento ambiental nos parques, com manutenção do existente previamente

##### 4.5.1. Primeira etapa – teste piloto (de 13 de outubro a 1 de novembro de 2019):

O objetivo nesta primeira etapa foi apenas conhecer o comportamento normal dos animais, as suas rotinas e a forma como são tratados diariamente. Por outro lado, pretendeu-se dar aos animais um primeiro contacto com a colheita de saliva.

Para esta avaliação foi utilizado um grupo de 5 animais – Banzai, Diana, Hopper, Tília e Joice – que foram alojados no parque 2.

Infelizmente, no final da segunda semana, a Joice teve de ser retirada do estudo devido a problemas comportamentais com os restantes membros. Para manter o número de animais, foi introduzida a Princesa.

Esta etapa foi dividida em três fases.

- Fase 0 (de 14 a 16 de outubro) – colocação dos animais no parque 2 mantendo a rotina normal. No dia 14 foram recolhidas amostras de saliva com salivetes, apenas como forma de treino para as recolhas que seriam realizadas posteriormente (foram enviadas para laboratório para quantificar a quantidade de amostra presente no algodão).
- Fase 1 (de 16 a 27 de outubro) – eliminação de qualquer enriquecimento ambiental (parque grande e passeios). Do dia 21 ao dia 25 de outubro, os animais foram submetidos a gravações. No dia 25, depois de terminadas as gravações, foram novamente realizadas colheitas de saliva.
- Fase 2 (de dia 28 de outubro a 1 de novembro) – regresso à rotina normal, retirando os passeios esporádicos com voluntários, devido à impossibilidade de padronizar ditos passeios. As filmagens foram efetuadas de igual forma. No dia 1 de dezembro foram novamente colhidas amostras de saliva, com as salivetes, e foram enviadas para laboratório.

#### 4.5.2. Segunda etapa (de 10 de fevereiro a 25 de março de 2020):

A segunda etapa correspondeu então ao estudo em si onde foi recolhida a informação já padronizada e completa numa tentativa de responder às questões iniciais e atingir os objetivos do trabalho.

Esta etapa foi muito semelhante à etapa 1 mas com a utilização dos dois parques preparados para o mesmo efeito. Para além das fases 0, 1 e 2 já descritas anteriormente na primeira etapa, esta contou ainda com uma fase sequente (fase 3) onde se pretendeu estudar a influência do enriquecimento ambiental olfativo adicional no comportamento e na fisiologia dos animais, adicionando, à rotina prévia, uma outra forma de enriquecimento que visou estimular o sentido do olfato nos animais.

Após ponderadas várias opções de estimulação olfativa considerou-se que das alternativas viáveis, aquela eventualmente mais vantajosa seria a introdução de um aroma estimulante na rotina destes animais, pelo que se optou pelo alecrim que, tal como foi mencionado anteriormente, tem o efeito de promover a estimulação cognitiva (Graham et al., 2005).

Sendo assim, oito cães foram divididos em dois grupos de quatro (grupos onde os animais já se conhecem e com relações entre os seus membros estáveis), e alojados nos dois parques disponíveis durante sete semanas, correspondentes às três fases. No parque 1, encontrava-se o Kylo, a Noz, o Pantufa e o Hopper, enquanto o parque 2 alojava a Princesa, a Carol, o Banzai e a Tália.

- Fase 0 (de 10 de fevereiro a 17 de fevereiro): adaptação às novas condições de alojamento, aos novos animais e à nova rotina. Esta fase não foi considerada para análise.
- Fase 1 (de 17 de fevereiro a 26 de fevereiro): a partir de dia 17, deu-se início ao período de filmagens, que decorreu até ao dia 21 de fevereiro. Posteriormente, os animais mantiveram a rotina até ao dia 26 desse mesmo mês, quando foram efetuadas as colheitas de saliva.
- Fase 2 (de 26 de fevereiro a 11 de março): no dia 26 de fevereiro, os animais entraram em fase 2 mas apenas no dia dois de março se retomaram as filmagens, que permaneceram até dia seis de março. Novamente, a rotina manteve-se até ao dia 11 de março, quando foram efetuadas as colheitas de saliva.
- Fase 3 (de 11 de março a 25 de março): a partir do dia 11 de março, foram colocados ramos de alecrim fresco em vários pontos do parque. A filmagens decorreram de 16 a 20 de março (dia em que também terminou a estimulação odorífera). No dia 25 de março, foram realizadas as colheitas de saliva tal como nas fases anteriores.

#### 4.6. Recolha de dados

##### 4.6.1. Comportamento

As filmagens foram realizadas recorrendo a câmaras do tipo GoPro, com dois tripés que foram colocados no local mais apropriado para a visualização de cada um dos parques. A colocação dos tripés teve como base a conjugação de dois critérios: maior proximidade aos parques e visualização de toda a largura do parque. As câmaras foram configuradas para alta definição e wide-angle. As gravações decorreram entre as 15h30 e as 17h (cerca de 1h30min por dia), e, para minimizar o estímulo relacionado com a presença, foi reduzido, tanto quanto possível, o



Figura 3 - Câmaras, do tipo GoPro, utilizadas para a recolha de informação audiovisual





Figura 4 - Posicionamento dos tripés com as câmaras, em dia de chuva, para a recolha de informação audiovisual (fotografia cedida pela voluntária Marta Correia)

contacto com os animais durante o procedimento. Para atingir este objetivo, a câmara foi colocada e retirada do local pré-fixado sem qualquer interação com os cães dentro dos parques. A escolha do momento do dia para as filmagens teve como critério o final dos procedimentos dentro do canil de modo a evitar os estímulos aleatórios provenientes dos trabalhadores do centro.

#### 4.6.2. Saliva

Para as colheitas de saliva foram previamente testados dois métodos, o primeiro com recurso a esponjas e o segundo com as próprias salivetes, de modo a verificar que tipo de sistema tinha a melhor relação entre a facilidade de colheita e a quantidade de amostra colhida. Ambos os materiais foram colocados na boca de cada animal, com a ajuda de uma pinça hemostática, durante dez a vinte segundos, tentando estimular a mastigação. Posteriormente, o algodão ou a esponja, eram transferidos para o tubo da salivete e armazenados em gelo até ao término das recolhas.

O segundo método, recorrendo às salivetes, foi o escolhido para a continuidade do protocolo graças à maior quantidade de saliva obtida.



Figura 5 - Salivetes utilizadas para a recolha de saliva

Tendo em conta a bibliografia existente, a fim de estimular uma maior produção de saliva, as salivetes foram embebidas no dia anterior às colheitas numa solução de ácido cítrico a 5% (Kobelt et al., 2003) e, posteriormente, secas na estufa a 40°C.

Depois de terminadas as colheitas, as salivetes foram armazenadas num congelador convencional até à etapa seguinte, que consistiu na centrifugação de cada amostra (3000g, 10 minutos a 4°C) e na transferência da saliva presente na parte inferior da salivete, para um tubo de polietileno que foi armazenado a -80°C até ao momento da quantificação de cortisol.

#### 4.7. Processamento da informação

##### 4.7.1. Comportamento

Depois de obtida toda a informação audiovisual correspondente à componente comportamental, as imagens foram analisadas individualmente, ou seja, foi utilizada uma abordagem contínua para cada animal. Em primeiro lugar, foram discriminados todos os comportamentos observados, que posteriormente iriam servir de construção do etograma, organizando-se a informação numa tabela, junto com a descrição de cada comportamento.

Tabela 3 - Descrição dos comportamentos observados

<u>Comportamentos</u>	<u>Descrição</u>	<u>Comportamentos</u>	<u>Descrição</u>
<b>Abanar a cauda</b>	Movimentar a cauda de um lado para o outro	<b>Ladrar</b>	Ação de ladrar, excetuando quando ocorre durante a interação com outros cães do parque

<b>Deitar na cama</b>	Deitar-se em qualquer lugar onde haja uma cama, uma manta ou um tapete	<b>Ganir</b>	Ação de ganir, excetuando quando ocorre durante a interação com outros cães do parque
<b>Deitar no chão</b>	Deitar-se no chão, sem contacto com mantas ou tapetes	<b>Uivar</b>	Ação de uivar
<b>Defecar</b>	Ação de defecar	<b>Brincar sozinho</b>	Brincar com o material existente dentro do parque (arranhar, morder, escavar, correr, etc)
<b>Urinar</b>	Ação de urinar	<b>Caçar moscas</b>	Ação de morder o ar na tentativa de caçar insetos
<b>Beber</b>	Beber num dos bebedouros disponíveis	<b>Brincar com outro cão</b>	Brincar com um ou mais cães do parque (correr, saltar, ladrar, morder, rebolar, etc)
<b>Comer</b>	Comer num dos comedouros disponíveis	<b>Montar</b>	Ação de montar outro cão
<b>Comer do chão</b>	Comer qualquer coisa que encontre no chão, seja ração seca ou não	<b>Voltar à cama</b>	Depois de realizar qualquer comportamento, regressar à cama sem se deitar
<b>Cheirar</b>	Cheirar qualquer lado do parque ou do material existente dentro do parque (camas, mantas, etc), com exceção dos outros cães	<b>Ficar atento</b>	Deitado, sentado ou de pé, permanecer atento ao que o rodeia, com a cabeça levantada
<b>Sentar</b>	Sentar em qualquer zona do parque, sem excluir as camas ou as mantas	<b>Esperar ansioso</b>	Esperar junto à porta, com postura ansiosa, dirigindo o olhar para o local de entrada de pessoas
<b>Interagir positivo</b>	Interagir com outro cão de forma amigável (cheirar, tocar, lamber, etc)	<b>Empoleirar na rede</b>	Levantar as patas da frente e apoiá-las na rede que rodeia o parque
<b>Interagir negativo</b>	Interagir com outro cão de forma agressiva (ladrar, rosnar, ameaçar, morder, etc)	<b>Subir para o telhado</b>	Subir para qualquer estrutura que possua "telhado", incluindo as casotas e os comedouros
<b>Escavar (defecar)</b>	Escavar no chão preparando o local para defecar	<b>Perseguir a cauda</b>	Ação de perseguir a própria cauda tentando alcançá-la com a boca
<b>Escavar (deitar)</b>	Escavar no chão preparando o local para se deitar	<b>Arranhar a rede</b>	Utilizar as patas para arranhar a rede que rodeia o parque
<b>Fazer a cama</b>	Com as patas ou a boca, mexer nas mantas	<b>Morder a rede</b>	Utilizar a boca para morder a rede que rodeia o parque

	existentes para se deitar imediatamente depois		
<b>Lamber-se</b>	Lamber qualquer parte do próprio corpo	<b>Correr da porta à cama sem parar</b>	Correr, compulsivamente, desde a porta do parque a qualquer cama existente
<b>Coçar-se</b>	Utilizar as patas ou a boca para coçar qualquer parte do corpo	<b>Andar sem rumo</b>	Andar de um lado para o outro da jaula sem um objetivo (geralmente volta à posição inicial)
<b>Bocejar</b>	Ação de bocejar	<b>Interagir alecrim</b>	Cheirar, tocar ou brincar com os ramos de alecrim colocados na jaula
<b>Sacudir</b>	Ação de sacudir o corpo	<b>Espreguiçar</b>	Ação de espreguiçar o corpo

Posteriormente, estes comportamentos foram divididos, tendo por base a bibliografia já existente, em comportamentos desejáveis, ou seja, aqueles comportamentos que indicam bem-estar, uma vez que os animais os expressam naturalmente (por exemplo, abanar a cauda, comer, brincar (Kogan et al., 2012; Dalla Villa et al., 2013; Rooney and Bradshaw, 2014; Owczarczak-Garstecka and Burman, 2016; Great Britain and Department for Environment, 2017)); comportamentos intermédios, definindo-se estes como os comportamentos que podem ser desejáveis normalmente mas que se tornam indicadores de stresse quando são realizados compulsivamente (ficar atento, comer do chão, lamber-se, por exemplo (Hubrecht et al., 1992; Bodnariu, 2008; Horwitz and Mills, 2010)); e comportamentos de stresse, ou seja, aqueles que os animais expressam quando estão sujeitos a uma fonte de stresse, tanto aguda como crónica (ladrar, andar sem rumo, esperar ansioso, entre outros (Beerda et al., 2000; Horwitz and Mills, 2010; Walker et al., 2016; Great Britain and Department for Environment, 2017; Grigg et al., 2017)). Para uma interpretação mais simples, a cada uma destas três categorias foi-lhe atribuída uma cor, tal como representado na tabela seguinte.

Tabela 4 - Comportamentos observados divididos por categorias segundo o tipo

<b>Comportamentos</b>			
Abanar a cauda	LadRAR	Interagir positivo	Empoleirar na rede
Deitar na cama	Ganir	Interagir negativo	Subir para o telhado
Deitar no chão	Uivar	Escavar (defecar)	Perseguir a cauda
Defecar	Brincar sozinho	Escavar (deitar)	Andar sem rumo

Urinar	Sentar	Fazer a cama	Morder a rede
Beber	Brincar com outro cão	Lamber-se	Esperar ansioso
Comer	Montar	Coçar-se	Espreguiçar
Comer do chão	Voltar à cama	Bocejar	Sacudir
Cheirar	Ficar atento	Interagir alecrim	

<b>Verde:</b> comportamentos considerados desejáveis
<b>Amarelo:</b> comportamentos considerados desejáveis, mas que indicam stresse quando são realizados compulsivamente
<b>Vermelho:</b> comportamentos indicadores de stresse

O último passo correspondeu, precisamente, à análise do comportamento, que decorreu em duas vertentes: frequência de ocorrência de cada comportamento e tempo de desempenho de cada tipo de comportamento.

Para a análise com base na frequência com que ocorreram cada um dos comportamentos discriminados anteriormente, em cada filmagem, cada indivíduo foi monitorizado individualmente relativamente aos seus comportamentos exibidos, às suas interações sociais e às respetivas frequências. Desta forma, um dia de gravações correspondia a dois etogramas, um por cada parque, idêntico ao apresentado na tabela 5.

Tabela 5 - Exemplo de um etograma (segunda etapa; primeira fase; parque 1; 18-02-2020)

Comportamento	Kylo	Noz	Pantufa	Hopper
Abanar cauda	4	1	17	20
Deitar cama	15	3	0	5
Deitar chão	1	5	8	2
Defecar	0	0	0	1
Urinar	1	2	1	7
Beber	1	1	0	1
LadRAR	0	0	0	7
Cheirar	30	8	1	21
Esperar ansioso	0	0	4	11
Ganir	0	1	8	2

Sentar	7	10	0	28
Interagir (+)	3	0	0	1
Interagir (-)	1	2	1	1
Empoleirar rede	8	1	0	2
Comer	11	0	0	6
Escavar (defecar)	0	0	0	0
Escavar (deitar)	0	0	0	0
Fazer a cama	1	0	0	0
Voltar à cama	16	7	0	12
Lamber-se	2	1	2	0
Coçar-se	3	1	1	5
Sacudir	1	2	1	2
Bocejar	2	0	1	4
Espreguiçar	5	1	1	8
Perseguir a cauda	0	0	0	0
Brincar com outro cão	4	7	0	3
Ficar atento	15	27	8	63
Subir telhado	5	15	0	1
Brincar sozinho	11	2	0	0
Comer do chão	6	0	0	3
Andar sem rumo	2	2	0	12
Montar	0	0	0	0
Uivar	0	0	0	0
Morder rede	0	0	0	0

Para a análise com base no tempo de ocorrência foram utilizados os três grupos de comportamentos – desejáveis, intermédios e stresse – e para cada um dos oito animais foi registado o tempo de permanência em cada uma das categorias. Posteriormente, quatro dos comportamentos (deitar, brincar, ficar atento e interagir com o alecrim) foram individualizados e o tempo de desempenho de cada um foi registado (tabela 6).

Tabela 6 -Exemplo de um registo baseado no tempo de desempenho de cada tipo de comportamento (segunda etapa; terceira fase; parque 1; 17-03-2020)

Comportamento	Kylo	Noz	Pantufa	Hopper
Deitar	89,8	106,4	113,3	109,4
Brincar	1,1	1,1	0	0
Ficar atento	0,8	4,8	0	4,4
Interagir Alecrim	0,3	0,3	0	0
Fisiológico	107,7737	108,9526	114,6	109,6286

Intermédio	0,8	4,8	0	4,4
Stresse	6,026316	0,847368	0	0,571429

#### 4.7.2. Saliva

O processamento das amostras de saliva visou a determinação da quantidade de cortisol em cada amostra. Para atingir esse objetivo, o cortisol, em  $\mu\text{g/dL}$ , foi quantificado nas amostras anteriormente centrifugadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , através de um kit Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay (EIA) (Damián et al., 2018), utilizando as instruções do fornecedor. Seguidamente, a absorvância foi lida a 450nm, num leitor de microplacas (Glomax Promega), sendo que cada amostra foi realizada em duplicado.

## 5. Análise estatística

Para a análise dos dados recolhidos foram escolhidos diferentes modelos estatísticos.

A primeira etapa constituiu um teste piloto e portanto os resultados não foram sujeitos a qualquer análise.

Para os dados relativos ao comportamento recorreu-se a diferentes abordagens para avaliar o efeito de fase. Atendendo às medidas repetidas em cada animal, considerou-se o animal como efeito aleatório e a fase e o parque como fatores fixos. Foram considerados os modelos lineares mistos (com coeficientes estimados por máxima verosimilhança restrita) e, uma vez que a variável resposta é uma contagem, também foi ajustado o modelo linear misto generalizados com resposta Poisson e parâmetro de dispersão (com resultados idênticos ao modelo com resposta QuasiPoisson (com coeficientes estimados por quasi-verosimilhança penalizada) e o modelo linear misto generalizado com resposta binomial negativa, ambos para atender à elevada dispersão existente.

Atendendo a que os resultados foram consistentes nas várias abordagens, com coeficientes estimados muito próximos, optou-se por apresentar os resultados obtidos para o modelo linear misto, propondo a transformação da variável resposta pela raiz quadrada, pois além de satisfazer o pressuposto da normalidade dos resíduos e dos efeitos aleatórios, apresentou uma variância dos resíduos mais homogênea e com menos outliers. Posteriormente, em cada categoria de comportamentos, foram escolhidos comportamentos específicos para serem analisados individualmente de acordo com os mesmos procedimentos metodológicos descritos anteriormente. Dado o excesso de zeros nos comportamentos escolhidos e a sobredispersão, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo misto Hurdle com resposta Binomial Negativa.

Para a análise do cortisol salivar e para a duração dos comportamentos foram analisadas a normalidade pelo método de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo método de Levene tendo sido adotado um modelo estatístico com a Fase como efeito fixo e o fator Animal como efeito aleatório dentro da Fase, modelo que se mostrou mais adequado. Sempre que ocorreram

diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) as médias foram comparadas pelo método Tukey. Todas as análises foram efetuadas pelo software R Project for Statistical Computing.

## **6. Resultados**

Tal como foi referido anteriormente, para efeitos do estudo, apenas foram contabilizados os dados relativos à segunda etapa (de 10 de fevereiro a 25 de março de 2020).

A análise estatística dos três tipos de comportamentos foi separada de acordo com a metodologia de observação, ou seja, utilizando, por um lado, a frequência de ocorrência de cada comportamento e, por outro, o tempo despendido em cada uma das categorias.

Foram ainda discriminados três comportamentos específicos – ficar atento, deitar e brincar – graças à sua grande representação no tempo total de gravação (foram os comportamentos onde os animais permaneceram a maior parte do seu tempo).

### **6.1. Componente comportamental**

Em primeiro lugar, o conjunto de cada categoria de comportamento foi analisado e comparado em cada uma das três fases.

Recorreu-se a diferentes abordagens para avaliar o efeito da Fase. Atendendo às medidas repetidas em cada animal, nos modelos considerados considerou-se o Animal como efeito aleatório e a Fase e o Parque como fatores fixos. Os resultados observados evidenciaram que o efeito Parque não foi significativo ( $p = 0,879$ ), tal como se esperava.

Atendendo a que os resultados foram consistentes nas várias abordagens, foi proposta uma análise conjunta com a transformação da variável resposta pela raiz quadrada, pois além de satisfazer o pressuposto da normalidade dos resíduos e dos efeitos aleatórios, apresentou uma variância dos resíduos mais homogênea e menos outliers.

#### **6.1.1. Comportamentos indicadores de stresse**

Tendo por base a frequência de ocorrência, para o conjunto de todos os comportamentos indicadores de stresse, o efeito do Parque foi não significativo ( $p = 0,879$ ) e o efeito da Fase foi altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

Comparando as médias das diferentes fases com ajustamento de Tukey concluímos que a fase 1 ( $20,3 \pm 14,2$ ) regista um número médio de ocorrências significativamente superior relativamente à fase 2 ( $11,6 \pm 14,0$ ), valor  $p < 0,001$  e à fase 3 ( $6,3 \pm 8,3$ ), valor  $p < 0,001$ . Também a fase 2 tem um número médio de ocorrências significativamente superior à fase 3, valor  $p = 0,012$ .

O gráfico 1 representa as médias deste tipo de comportamentos ao longo do estudo.



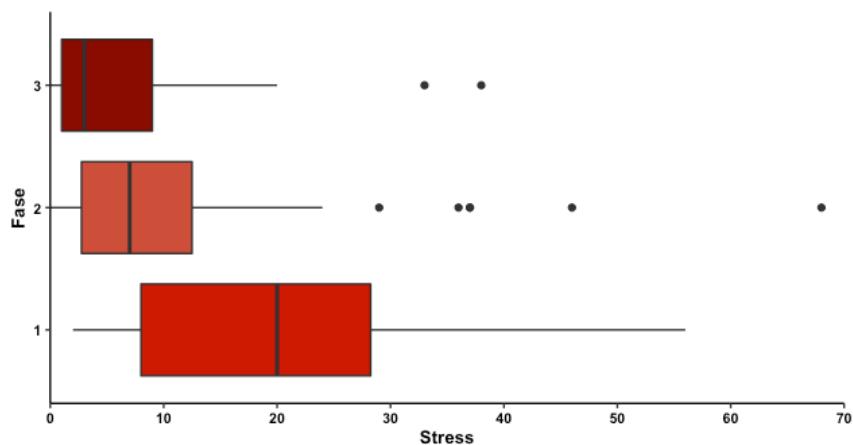


Gráfico 1 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo

Quando se utiliza como base de dados o tempo de permanência nos comportamentos de stresse, são também encontradas diferenças significativas entre as fases ( $p=0,00002$ ).

Comparando as médias das diferentes fases através da comparação pelo método de Tukey – Kramer, verifica-se uma redução progressiva do tempo despendido neste tipo de comportamentos da fase 1 (média de 5,09min) para a fase 2 (média de 3,34min) e desta para a fase 3 (média de 1,63min),  $p=0,00005$  e  $p=0,018$ , respetivamente, tal como se observa nos gráficos 2 e 3.

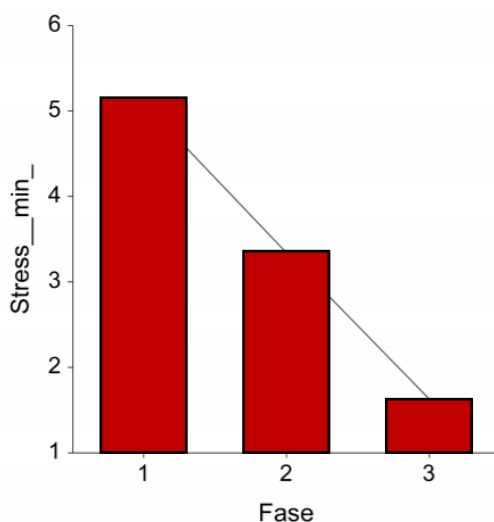


Gráfico 2 - Comparação das médias do tempo de permanência nos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo

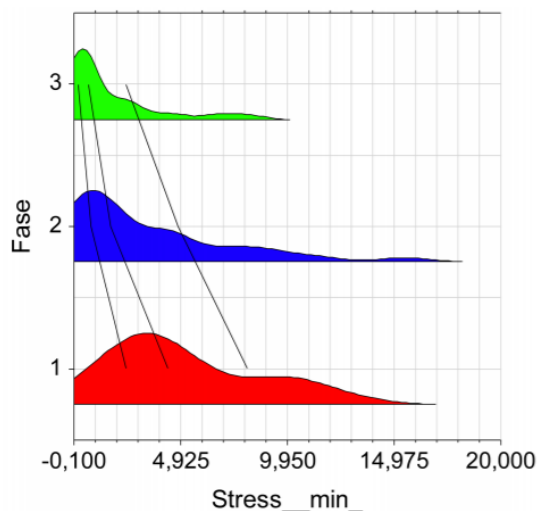


Gráfico 3 - Comparação dos percentis relativos ao tempo de permanência nos comportamentos indicadores de stresse nas três fases do estudo

#### 6.1.1.1. Variável específica "Andar sem rumo"

Dado o excesso de zeros, que se refere à ausência de determinado comportamento no etograma (a mediana é igual a zero) e a sobredispersão existente devido ao reduzido número de animais, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo misto Hurdle com resposta binomial negativa.

Para esta variável, tanto o efeito do Parque ( $p=0,302$ ) como o efeito da Fase ( $p=0,505$ ) não registaram diferenças significativas.

Na parte do modelo que explica as não ocorrências do comportamento, verificou-se que na fase 3 há quase cinco vezes mais possibilidades deste comportamento não ocorrer quando comparada com as restantes fases ( $p<0,001$ ).

No gráfico 4 é possível observar a representação das médias deste comportamento.

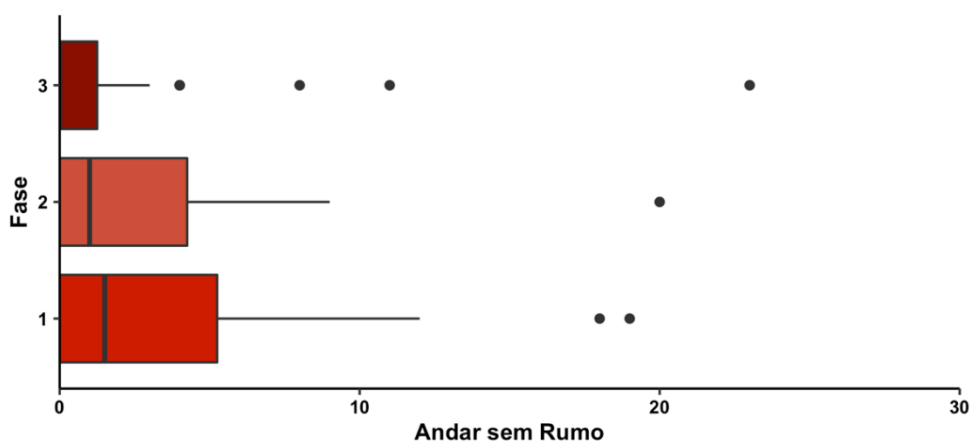


Gráfico 4 – Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Andar sem rumo" ao longo das três fases do estudo

## 6.1.2. Comportamentos intermédios

Sob o ponto de vista da frequência de ocorrência de cada comportamento, o efeito do Parque foi não significativo ( $p=0,988$ ) e o efeito da Fase foi altamente significativo (valor  $p<0,001$ ).

Comparando as médias das diferentes fases com ajustamento de Tukey (gráfico 5) concluímos que na fase 1 ( $23,1\pm 15,1$ ) se regista um número médio de ocorrências significativamente superior do que na fase 2 ( $10,0\pm 8,9$ ), valor  $p<0,001$  e do que a fase 3 ( $7,8\pm 6,9$ ), valor  $p<0,001$ . Porém, não se registaram diferenças significativas entre as fases 2 e 3 ( $p=0,390$ ).

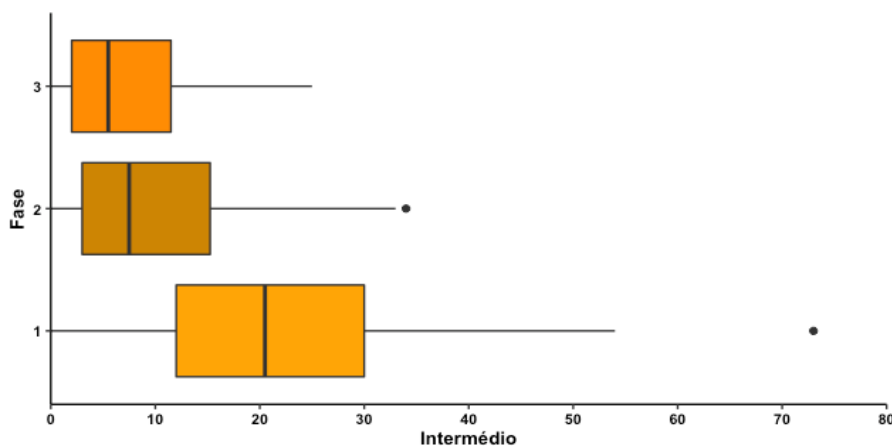


Gráfico 5 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos intermédios nas três fases do estudo

Relativamente ao tempo de permanência nos comportamentos intermédios, há diferenças estatisticamente significativas entre as fases ( $p=0,004$ ). Ao comparar as médias entre fases, verifica-se uma redução estatisticamente significativa da média da fase 1 para as fases 2 e 3 ( $p=0,001$ ), com médias de 18,30min, 10,41min e 9,25min, respetivamente. No entanto, entre as fases 2 e 3 não ocorrem diferenças significativas ( $p=0,69$ ).

As médias e os respetivos percentis dos tempos de permanência nesta categoria de comportamento estão representados nos gráficos 6 e 7, respetivamente.

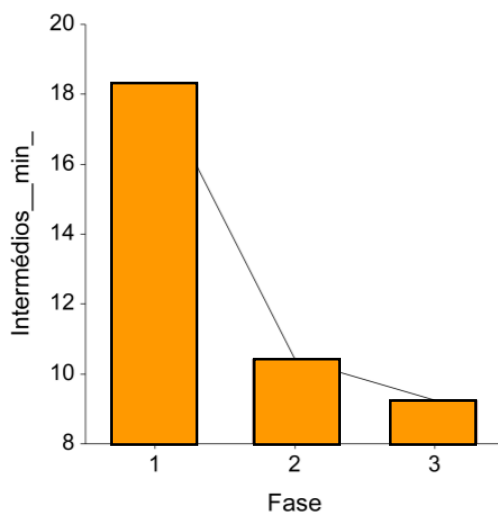


Gráfico 6 - Comparação das médias do tempo de permanência dos comportamentos intermédios nas três fases do estudo

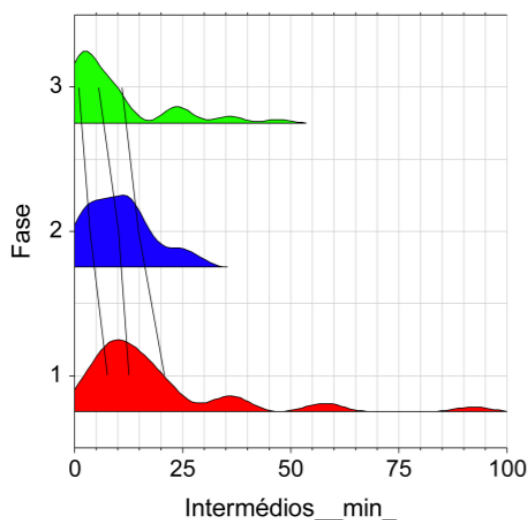


Gráfico 7 - Comparação dos percentis relativos ao tempo de permanência nos comportamentos intermédios nas três fases do estudo

#### 6.1.2.1. Variável específica “Lamber-se”

Dado o excesso de zeros e a sobredispersão o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo misto Hurdle com resposta Binomial Negativa.

Na parte do modelo que explica as ocorrências o efeito do Parque não foi significativo (0,492) e o efeito da Fase também não foi significativo (valor  $p=0,121$ ).

As médias desta variável específica estão representadas no gráfico 8.

Na parte do modelo que explica a não ocorrência do comportamento “lamber-se”, um indivíduo que esteja na fase 3 ou na fase 2 apresenta cerca de 3 vezes mais possibilidades de não demonstrar este comportamento relativamente à fase 1 ( $p=0,015$ ). Situação singular ocorreu com

o fator Parque onde, no parque 1 o comportamento “lamber-se” tem metade das possibilidades de ocorrência comparado com o parque 2 ( $p=0,038$ ).

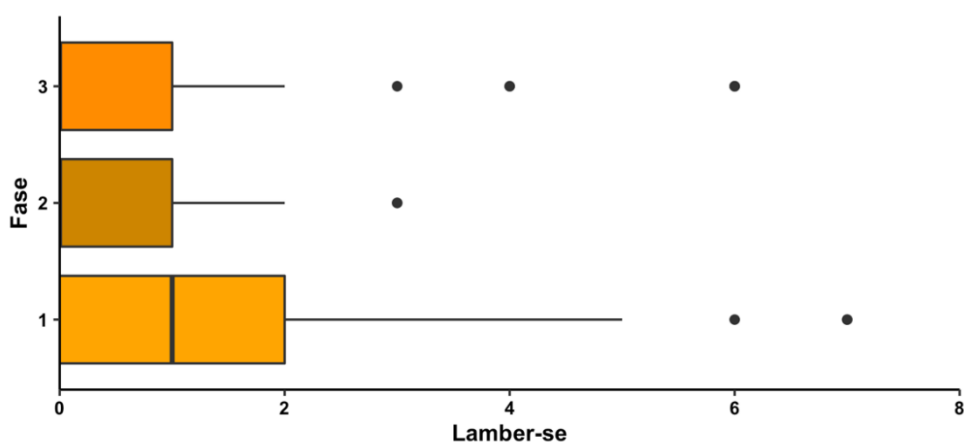


Gráfico 8 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Lamber-se" ao longo das três fases do estudo

#### 6.1.2.2. Variável específica “Ficar atento”

Analisando os dados relativos à frequência de ocorrência desta variável específica, foi ajustado um modelo linear misto transformando a variável resposta através da raiz quadrada.

O efeito do Parque não foi significativo (0,985) e o efeito da Fase foi altamente significativo (valor  $p<0,001$ ).

Comparando as médias das diferentes fases com ajustamento de Tukey concluímos que a fase 1 ( $19,5\pm 14,4$ ) registra um número médio de ocorrências significativamente superior do que a fase 2 ( $8,3\pm 7,5$ ), valor  $p<0,001$  e do que a fase 3 ( $6,6\pm 6,4$ ), valor  $p<0,001$  (gráfico 9). Não se registraram diferenças significativas entre a fase 2 e a fase 3 ( $p=0,418$ ).

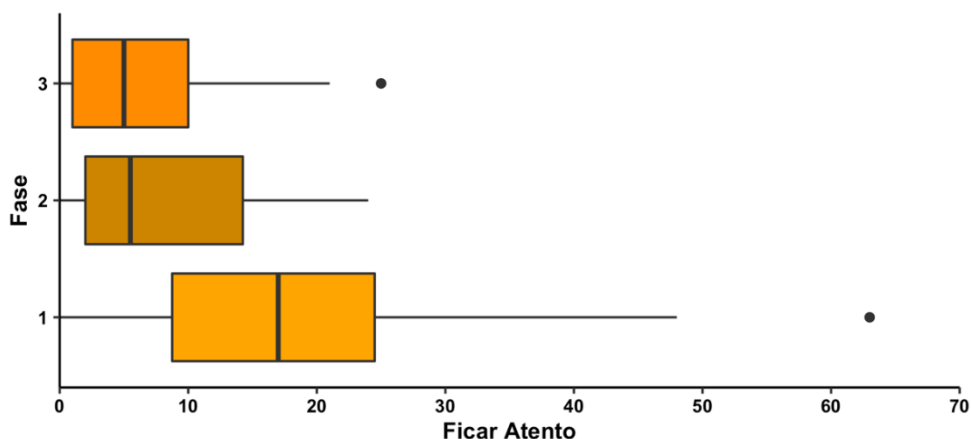


Gráfico 9 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Ficar atento" ao longo das três fases do estudo

Por outro lado, ao utilizar o tempo de permanência neste comportamento, verificou-se que o efeito Fase foi significativo ( $p=0,01$ ). Comparando as médias das diferentes fases, observa-se um decréscimo da fase 1 (17,04min) para as fases 2 (9,68min) e 3 (8,97min) estatisticamente significativo ( $p=0,003$ ). No entanto, as médias das fases 2 e 3 não apresentam diferenças significativas ( $p=0,8$ ). Os dados relativos ao tempo de permanência neste comportamento ao longo do estudo estão representados no gráfico 10.

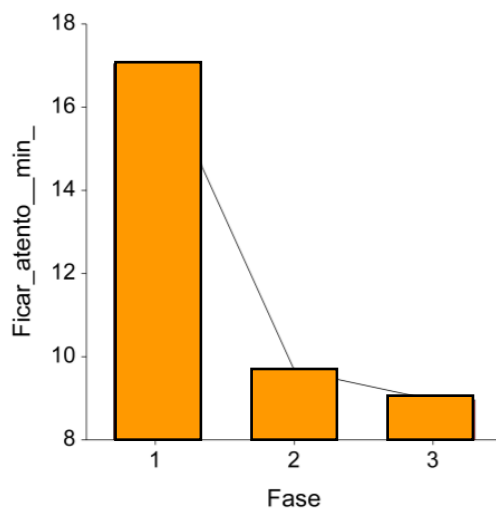


Gráfico 10 - Comparação das médias dos tempos de permanência no comportamento "ficar atento" ao longo das três fases de estudo

#### 6.1.3. Comportamentos considerados desejáveis

Quando se utiliza como base de dados a frequência de ocorrência de cada comportamento, verifica-se que o efeito do Parque foi não significativo (0,733) e o efeito da Fase foi altamente significativo (valor  $p<0,001$ ).

Comparando as médias das diferentes fases com ajustamento de Tukey (gráfico 11) concluímos que a fase 1 ( $43,0\pm 23,7$ ) regista um número médio de ocorrências significativamente superior do que a fase 2 ( $26,9\pm 19,3$ ), valor  $p<0,001$  e do que a fase 3 ( $20,9\pm 16,5$ ), valor  $p<0,001$ . No entanto, não se registaram diferenças significativas entre as fases 2 e 3 ( $p=0,104$ ).

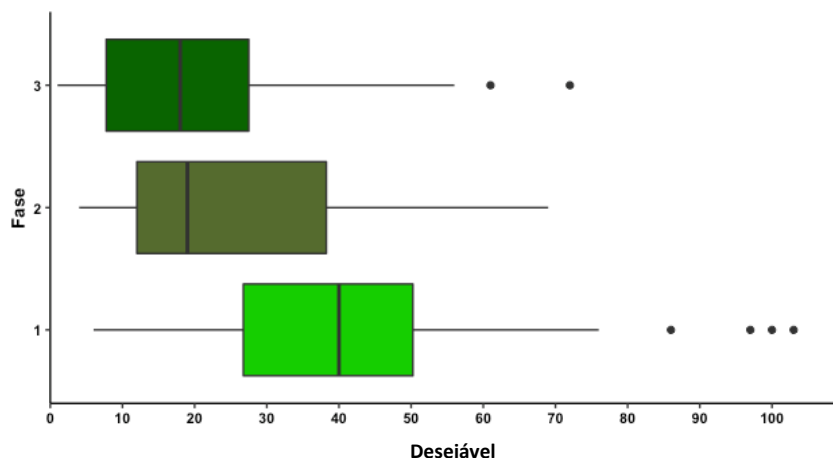


Gráfico 11 - Comparação das médias da frequência de ocorrência dos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo

Por outro lado, ao analisar o tempo de permanência dos animais nesta categoria de comportamentos verifica-se que o efeito fase foi significativo ( $p=0,003$ ).

Ao examinar as médias das diferentes fases com recurso à comparação de médias pelo método de Tukey – Kramer, observa-se um aumento significativo da média da fase 1 (68,08min) para a fase 3 (84,46min) com  $p=0,002$ . Contudo, não há diferenças estatisticamente significativas quando se comparam as fases 2 e 3 ( $p=0,19$ ), apesar de haver alguma tendência crescente.

Os gráficos 12 e 13 representam as médias e os percentis do tempo de permanência nesta categoria de comportamentos nas diferentes fases.

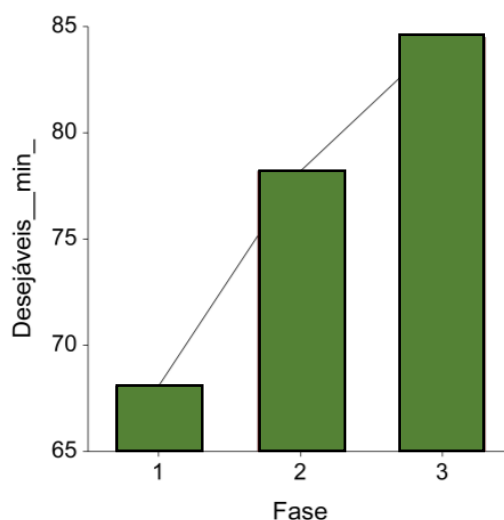


Gráfico 12 - Comparação das médias dos tempos de permanência nos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo

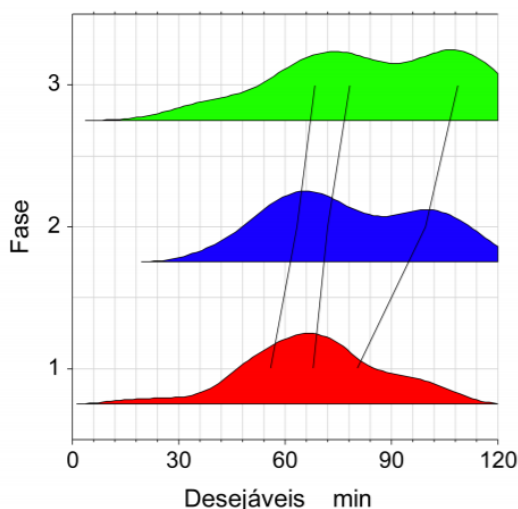


Gráfico 13 - Comparação dos percentis relativos aos tempos de permanência nos comportamentos considerados desejáveis nas três fases do estudo

#### 6.1.3.1. Variável específica “Brincar”

Do ponto de vista da frequência de ocorrência, dado o excesso de zeros (a mediana é igual a zero) e a sobredispersão existente o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo misto de zeros inflacionados com resposta binomial negativa.

Na parte do modelo que explica as ocorrências o efeito do Parque não foi significativo (0,992) e o efeito da Fase também não foi significativo (valor  $p=0,376$ ).

Na parte do modelo que explica a não ocorrência do comportamento “Brincar”, estar na fase 3 aumenta em mais de 5 vezes as possibilidades de não ocorrer o comportamento “Brincar” quando comparada com a fase 1 (valor  $p=0,021$ ).

A comparação das médias desta variável específica está representada no gráfico 14.

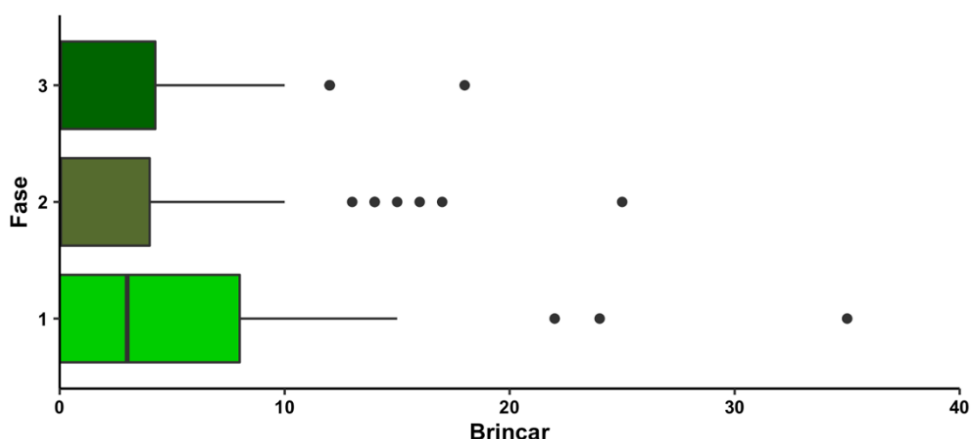


Gráfico 14 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Brincar" ao longo das três fases do estudo



Ao realizar a análise tendo em conta o tempo de permanência neste comportamento, os resultados são diferentes dos obtidos na análise anterior, uma vez que o efeito Fase foi significativo ( $p=0,04$ ), tal como representado no gráfico 15. Ao comparar as médias das três fases, observa-se que não há diferenças significativas da fase 1 (3,036min) para as fases 2 e 3 ( $p=0,29$ ) mas a fase 3 (2,62min) apresenta uma redução estatisticamente significativa da sua média quando comparada com a fase 2 (6,60min), com  $p=0,022$ .

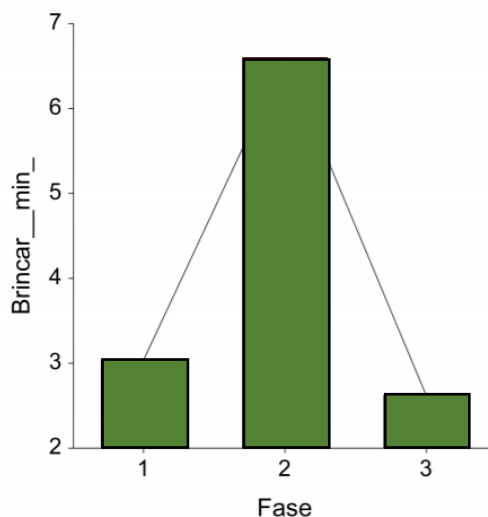


Gráfico 15 - Comparação das médias do tempo de permanência no comportamento "Brincar" ao longo das três fases do estudo

#### 6.1.3.2. Variável específica "Deitar"

Neste caso, utilizando a metodologia de análise que tem como base de dados a frequência de ocorrência de comportamento, foi ajustado um modelo linear misto transformando a variável resposta através da raiz quadrada.

O efeito do Parque foi significativo (0,036) e o efeito da Fase foi altamente significativo (valor  $p<0,001$ ).

O parque 1 ( $8,6\pm 5,3$ ) registou um número médio de ocorrências superior ao parque 2 ( $5,7\pm 3,6$ ). Comparando as médias das diferentes fases (gráfico 16) concluímos que a fase 1 ( $9,6\pm 5,7$ ) regista um número médio de ocorrências significativamente superior do que a fase 2 ( $6,6\pm 4,0$ ), valor  $p=0,001$  e do que a fase 3 ( $5,3\pm 3,2$ ), valor  $p<0,001$ . Não se registaram diferenças significativas entre a fase 2 e a fase 3 ( $p=0,126$ ).

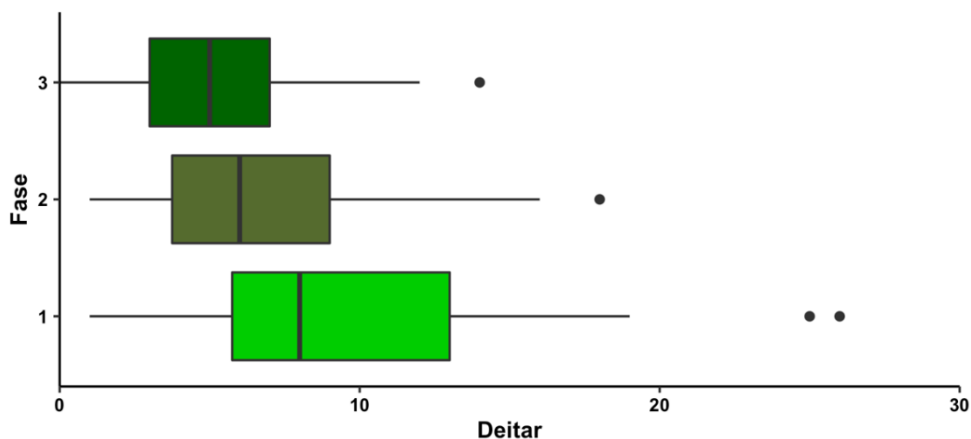


Gráfico 16 - Comparação das médias da frequência de ocorrência da variável específica "Deitar" ao longo das três fases do estudo

Quando se comparam os tempos despendidos neste comportamento, observam-se diferenças significativas entre fases ( $p=0,001$ ), tal como representado no gráfico 17.

Comparando as médias, encontra-se um incremento significativo da média deste comportamento da primeira para a terceira fase (57,06min e 78,24min, respetivamente), com  $p=0,002$ . Entre as fases 2 e 3, as médias (66,45min e 78,24min, respetivamente) são significativamente diferentes ( $p=0,04$ ).

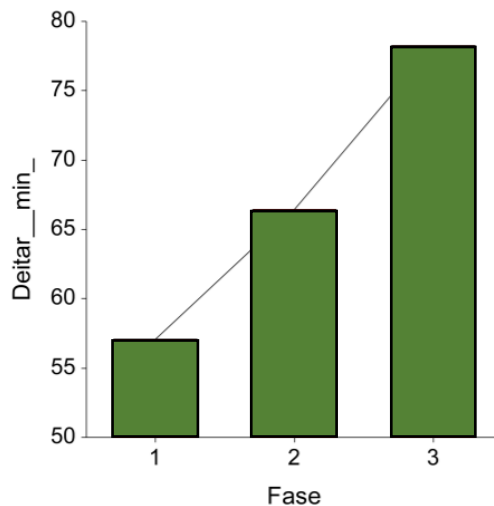


Gráfico 17 - Comparação das médias do tempo de permanência no comportamento "Deitar" ao longo das três fases do estudo

#### 6.1.4. Interação com o estímulo adicional – ramos de alecrim

Visto que o número de interações com o elemento adicional não foi muito elevado (apenas 50) e que este apenas foi introduzido na terceira fase, o tratamento dos dados obtidos foi realizado separadamente dos restantes comportamentos numa tentativa de padronizar os resultados.

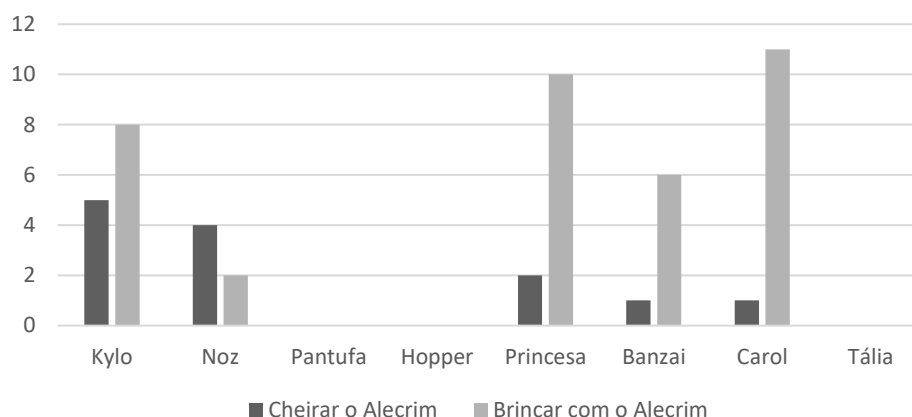


Gráfico 18 - Frequência absoluta da interação de cada animal com os ramos de alecrim

Para obter uma melhor visualização da interação com este novo estímulo, foi construído um gráfico (gráfico 18) com ambas as possibilidades de interação – brincar com o alecrim e cheirar o alecrim – e o número de vezes que cada animal desempenhou cada uma das possibilidades. Através do gráfico 18 verifica-se que houve três animais que não tiveram qualquer tipo de interação com os ramos de alecrim, um no parque 2 e dois no parque 1.

Por outro lado, observa-se que o comportamento “brincar com o alecrim” é o predominante, superando quase sempre o comportamento “cheirar o alecrim”. Apenas um dos cães, a Noz, efetuou mais vezes a segunda interação.

A Princesa e a Carol, ambas do parque 2, foram os animais mais estimulados pela presença deste enriquecimento ambiental uma vez que o utilizaram para brincar dez e onze vezes, respetivamente.

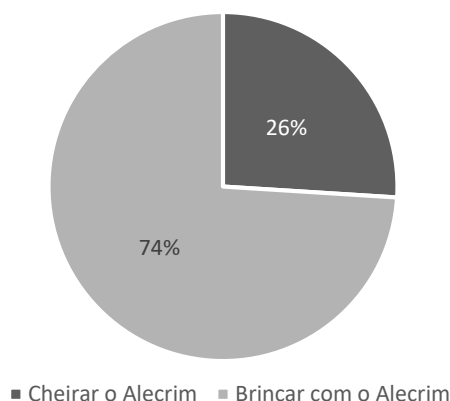


Gráfico 19 - Frequência relativa do total de interações com os ramos de alecrim

Posteriormente, na tentativa de simplificar a perceção dos resultados, comparou-se a frequência relativa de cada tipo de interação e confirmou-se a diferença presente entre ambas as possibilidades. O comportamento “cheirar o Alecrim” correspondeu apenas a 26% das interações totais, enquanto o “brincar com o Alecrim” correspondeu às restantes 74% das interações (gráfico 19).

Para finalizar, os dados foram analisados sob ponto de vista temporal de modo a perceber quanto tempo foi gasto por cada animal na interação com o elemento extra.

O gráfico 20 ilustra a referida análise e permite observar que o máximo de tempo destinado a esta interação foi 5,4 minutos (correspondentes às 12 interações da Carol) e o mínimo, excluindo os três animais que não realizaram nenhuma interação, foi 0,6 minutos correspondentes às 6 interações da Noz.

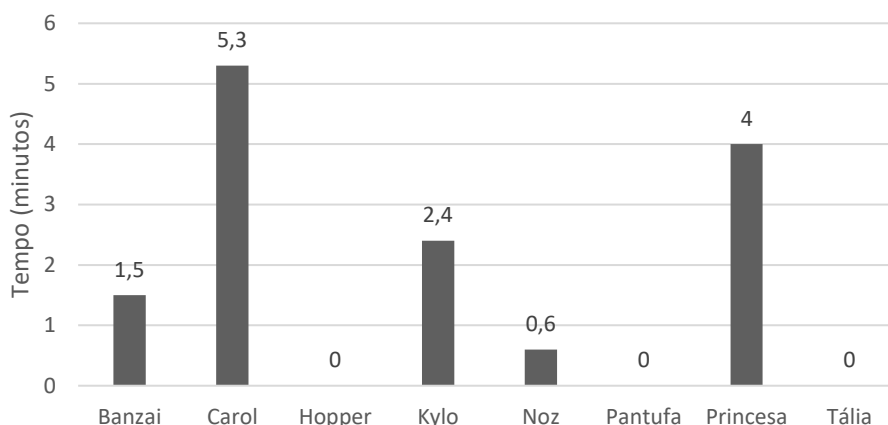


Gráfico 20 - Tempo total de interação com os ramos de alecrim durante a fase 3

## 6.2. Componente fisiológica

### 6.2.1. Cortisol salivar

Comparando as médias das diferentes fases com ajustamento de Tukey – Kramer concluímos que a fase 1 ( $189,66 \pm 35,95$ ) regista um número médio de ocorrências superior à fase 2 ( $186,22 \pm 35,95$ ) e à fase 3 ( $173,41 \pm 33,62$ ), porém, sem diferenças significativas entre fases ( $p=0,94$ )

A informação relativa às médias e medianas de cortisol salivar ao longo do estudo estão representadas, respetivamente, nos gráficos 21 e 22.

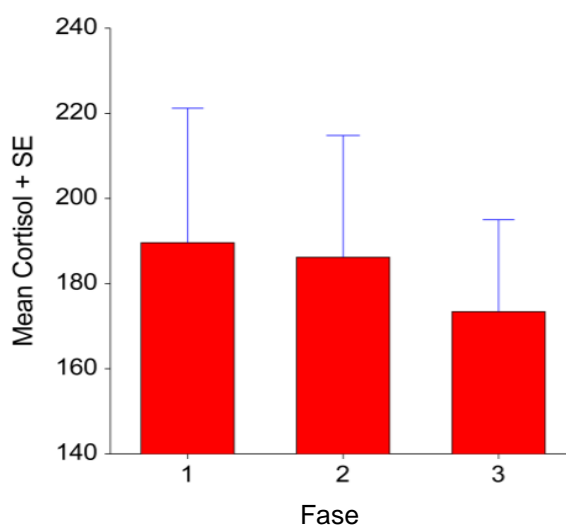


Gráfico 21 - Média e erro padrão da média dos níveis de cortisol salivar em cada uma das três fases

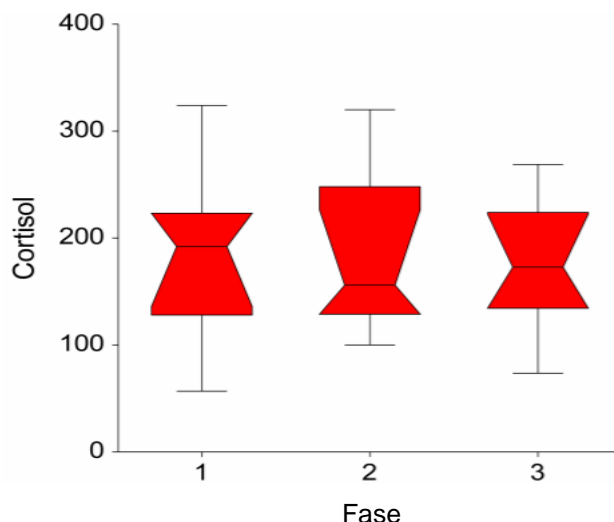


Gráfico 22 - Mediana do nível de cortisol salivar em cada uma das três fases

## 7. Discussão

O presente estudo passou por três fases distintas, mas todas elas foram idênticas quanto aos animais, às condições de alojamento e à metodologia de recolha de dados.

Desta forma, é possível avaliar quais as variáveis que realmente sofreram alguma mudança durante o decorrer do estudo, que neste caso corresponderam ao tipo de enriquecimento ambiental presente ou à sua ausência.

De acordo com a diversa bibliografia, verifica-se que um dos grandes problemas existentes em ambiente de canil é o isolamento (Mertens and Unshelm, 1996; Beerda et al., 2000; Grigg et al., 2017). Esta componente não está presente no estudo desenvolvido, uma vez que os animais foram alojados em grupos de quatro durante todo o procedimento. Desta forma, outro tipo de problemas que poderiam surgir nos animais nestas condições, seriam aqueles associados à falta de outros tipos de estimulação e de enriquecimento, tal como a interação inter-espécie (com pessoas) em momentos de exercício, treino ou brincadeira, e o enriquecimento inanimado com recurso a brinquedos, aromas ou sons.

Previamente ao estudo, os animais utilizados possuíam uma rotina diária que incluía cerca de três horas de exercício num parque grande onde havia possibilidade de interação com os outros animais do canil e com pessoas no momento do transporte entre as jaulas e o parque grande.

Na primeira fase do estudo esta rotina foi suprimida durante 16 dias (de dia 10 de fevereiro até dia 26 de fevereiro) permanecendo os cães fechados nos parques 1 e 2, simulando aquilo que frequentemente se passa em outros canis.

Nas duas fases seguintes (de dia 26 de fevereiro a 11 de março e de 11 de março a 25 de março, respetivamente), a rotina dos animais voltou à normalidade, recuperando-se assim o enriquecimento ambiental correspondente à interação com humanos e ao exercício físico, e na terceira fase houve ainda um estímulo olfativo adicional resultante da introdução dos ramos de alecrim.

### 7.1. Componente comportamental

De um ponto de vista geral, é possível observar que nos três tipos de comportamentos (indicadores de stresse, intermédios e desejáveis) não houve qualquer influência do local de alojamento (parque 1 ou parque 2) na frequência de ocorrência de cada comportamento (valor  $p=0,879$  nos comportamentos indicadores de stresse, valor  $p=0,988$  nos intermédios e valor  $p=0,733$  naqueles considerados desejáveis). Isto indica que efetivamente, e tal como se pretendia, as condições de alojamento foram idênticas nos dois parques e que estas mesmas condições se mantiveram estáveis até ao final do estudo.

Por outro lado, verifica-se também que o efeito fase foi altamente significativo (valor  $p<0,001$ ) nos três tipos de comportamento.

Quando estes são analisados sob o ponto de vista da frequência de ocorrência, observa-se uma redução progressiva das médias da fase 1 para a fase 3 nos três tipos de comportamentos, incluindo os comportamentos desejáveis ( $p<0,001$ ). Porém, ao utilizar o tempo de permanência em cada comportamento, verifica-se precisamente o oposto naqueles considerados desejáveis, ou seja, estes sofrem um aumento estatisticamente significativo da fase 1 para a 3 ( $p=0,002$ ).

Esta diferença prende-se no facto dos animais terem permanecido durante mais tempo em cada comportamento, mudando menos frequentemente de comportamento.

Na categoria dos comportamentos “desejáveis” estão integrados os comportamentos como deitar, sentar ou brincar sozinho ou com outro animal. O tempo gasto nesta categoria aumentou ( $p=0,002$ ) e esse maior período num mesmo comportamento originou uma redução na frequência com que estes mesmos comportamentos ocorreram. Por exemplo, considerando que um certo animal passou mais tempo deitado ou a brincar na fase 2 do que na fase 1, mas que o fez de forma mais prolongada na fase 2 enquanto que na fase 1, houve duas interrupções, a frequência do comportamento será contabilizada apenas uma vez na fase 2 e duas vezes na fase 1. Desta forma, há que considerar a quantificação do tempo em que cada comportamento ocorre, para complementar a informação obtida a partir da frequência de ocorrência dos comportamentos.

Nos comportamentos do tipo intermédio e naqueles considerados desejáveis, as fases 2 e 3 apresentaram médias semelhantes, sem diferenças significativas tanto na frequência de ocorrência ( $p=0,390$  nos comportamentos intermédios e  $p=0,104$  nos considerados desejáveis) como no tempo de permanência ( $p=0,69$  nos comportamentos intermédios e  $p=0,19$  naqueles considerados desejáveis).

Este facto pode ser justificado pelo nível de interação que houve com o elemento extra (ramos de alecrim) introduzido na terceira fase. Pelo gráfico 18 é possível inferir que no total dos oito animais, apenas se registaram 50 interações com o alecrim, e que essas 50 interações corresponderam a 13,8 minutos (gráfico 20), o que representa uma pequena percentagem do tempo total de observação.

Desta forma, tendo em conta que nem todos os animais interagiram com o alecrim e que aquelas interações que ocorreram não foram em número ou tempo suficiente para provocar uma alteração significativa no dia-a-dia dos mesmos, era expectável que os dados fossem

semelhantes aos da fase dois. Todas as outras condições de alojamento e de enriquecimento se mantiveram constantes quando comparadas com a fase 2.

Contudo, esta interação foi suficiente para diminuir a média da frequência de ocorrência dos comportamentos de stresse, passando de  $11,6 \pm 14,0$  na fase dois para  $6,3 \pm 8,3$  na fase três (gráfico 1), bem como o tempo total despendido nesta categoria de comportamentos, passando de 3,34min na fase 2 para 1,63min na fase 3 (gráficos 2 e 3), com alterações estatisticamente significativas em ambos os casos ( $p=0,012$  e  $p=0,018$ , respetivamente).

Para a melhor compreensão dos resultados, os três tipos de comportamento e a interação com o alecrim serão discutidos separadamente.

Após análise dos resultados obtidos, é possível verificar que os comportamentos indicadores de stresse sofreram uma redução na frequência de ocorrência e, principalmente, na duração em que ocorrem entre as fases 1 e 3 (gráfico 1 e gráficos 2 e 3, respetivamente). A fase três foi aquela que apresentou uma média inferior ( $6,3 \pm 8,3$  e 1,63min, respetivamente), mostrando que, tanto a frequência como a duração, foram significativamente inferiores à fase 1 e à fase 2 ( $p=0,012$  quanto à frequência de ocorrência e  $p=0,018$  quanto ao tempo de permanência).

De acordo com Farm Animal Welfare Council (2012) e Great Britain and Department for Environment (2017), para garantir a melhoria nas condições de vida dos cães, é necessário diminuir, tanto quanto possível, o seu nível de stresse, uma vez que o elevado nível de stresse crónico é um dos melhores indicadores de má qualidade de vida nos animais (Beerda et al., 1999b). Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que, a nível comportamental, os animais foram evidenciando um decréscimo nos níveis de stresse entre as fases 1 e 3, ou seja, é lícito supor que no final do estudo os seus níveis de bem-estar seriam superiores aos evidenciados no início.

Na verdade, era expectável que na fase 1, os animais exibissem maior frequência e permanecessem mais tempo realizando comportamentos associados a stresse, devido à ausência do enriquecimento ambiental e social. A média nesta fase mostrou ser a mais alta das três ( $20,3 \pm 14,2$  no número de ocorrências e 5,09min no tempo de permanência).

De acordo com a vasta bibliografia, quando há este tipo de mudança de ambiente capaz de tornar o meio mais imprevisível (Beerda et al., 1999b), associada, neste caso, à ausência de interações sociais inter-espécie, os animais podem acentuar os comportamentos característicos de stresse, como por exemplo vocalizar excessivamente (Beerda et al., 1997, 1999b, 2000; Bodnariu, 2008; Grigg et al., 2017; Protopopova et al., 2018), andar ou correr sem rumo, saltar em excesso (Beerda et al., 2000; Protopopova et al., 2018), morder a jaula (Bodnariu, 2008) e interações negativas com os restantes membros do grupo com agressividade redirigida (Beerda et al., 1999b; Great Britain and Department for Environment, 2017) e, eventualmente comportamentos estereotipados (Beerda et al., 1997, 2000; Protopopova et al., 2018).

Com efeito, foram estes os comportamentos utilizados como indicadores de stresse no presente estudo e aqueles em que ambos os grupos se mostraram em maior escala na fase 1.

Nas fases 2 e 3, com a introdução do enriquecimento providenciado pelo parque grande e pela interação com humanos, era expectável que o tipo de comportamentos descrito anteriormente reduzisse, pelo incremento da complexidade do ambiente e pela estimulação social. Os dados revelam precisamente este facto, tanto quanto à frequência de ocorrência, representados no gráfico 1 ( $p < 0,001$ ) como naqueles relativos ao tempo de permanência, representados nos gráficos 2 e 3 ( $p = 0,00005$  e  $p = 0,018$ ).

Protopopova et al. (2018) descreveram que, a interação com humanos e as sessões de exercício determinavam uma redução de comportamentos de hiperexcitabilidade como saltar e ladrar e um aumento daqueles considerados desejáveis, tal como deitar, sentar e permanecer tranquilo. Na fase 3 houve ainda uma redução mais acentuada na média dos comportamentos de stresse observados tanto na frequência de ocorrência como na duração de cada comportamento, o que pode indicar que, uma vez que todos os outros parâmetros permaneceram idênticos à fase 2, a introdução de ramos de alecrim poderá ter sido benéfica para promover um acréscimo de estimulação cognitiva e assim melhorar os níveis de bem-estar.

É possível constatar (gráficos 1 e 2), que a maior diferença observada foi, sem dúvida, da fase 1 para a fase 2 (de  $20,3 \pm 14,2$  para  $11,6 \pm 14,0$  e de  $5,09\text{min}$  para  $3,34\text{min}$ ), o que indica que a interação social inter-espécie e o exercício físico contribuíram mais para o melhoramento da qualidade de vida dos cães de canil.

Um dos comportamentos que melhor pode representar o stresse psicológico é o, “andar sem rumo” (gráfico 4), ou seja, o aumento da locomoção sem um objetivo concreto. Durante o período experimental observou-se que este comportamento consistia em andar dentro da jaula, de uma ponta à outra, parando várias vezes durante o caminho e permanecer a olhar para o vazio voltando posteriormente ao mesmo andamento.

Este comportamento foi descrito anteriormente como um indicador de stresse por Hubrecht et al. (1992), Beerda et al. (1997, 1999b, 2000), Walker et al. (2016) e Grigg et al. (2017).

Horwitz and Mills (2010) diferenciam os comportamentos indicadores de stresse em três categorias, sendo que “andar sem rumo” pode ser inserido em duas delas. Ao ser caracterizado pela locomoção continuada sem um objetivo, pode-se considerar um comportamento estereotipado, intercalado por outro que consiste em “olhar para o vazio” que também se enquadra na descrição dos comportamentos de “alucinação”.

Sendo assim, e tendo em conta os resultados apresentados nos gráficos 1, 2 e 3, que indicam uma redução dos níveis de stresse dos animais, seria expectável que houvesse uma diminuição na frequência do comportamento descrito, uma vez que se trata de um comportamento indicador de stresse.

Por observação do gráfico 4, verifica-se que os resultados obtidos não estão de acordo com a informação do parágrafo anterior, porque nem a fase nem o parque em que os animais estavam alojados tiveram influência na frequência de ocorrência da conduta acima descrita ( $p = 0,505$ ). No entanto, a terceira fase do estudo evidencia um aumento de probabilidade de obter um zero, ou seja, de não ocorrência do comportamento ( $p < 0,001$ ), indicando que, apesar das diferenças entre



as fases não terem sido significativas, os animais reduziram significativamente o comportamento “andar sem rumo” na fase 3, quando comparada com as restantes fases, o que vai ao encontro das expectativas, sugerindo uma melhoria nos indicadores da qualidade de vida dos animais ao longo do trabalho.

Os comportamentos intermédios são aqueles considerados desejáveis quando realizados normalmente, mas que, quando a sua frequência é exagerada, podem ser indicadores de stresse, como é o caso de urinar, lambe-se ou ficar atento.

Após análise dos resultados obtidos nesta categoria (gráficos 5, 6 e 7), verifica-se que, a média deste tipo de comportamentos diminui da fase 1 para a 3 ( $p < 0,001$  para a frequência de ocorrência e  $p = 0,001$  para a duração) enquanto entre as fases 2 e 3 não se constata diferenças significativas entre si ( $p = 0,390$  e  $p = 0,69$ ).

O facto de se ter observado esta redução da fase 1 para as fases 2 e 3, poderá ser devida à introdução do enriquecimento ambiental correspondente ao parque grande e à interação com humanos e poderá ser interpretada como uma redução dos níveis de stresse, já que os comportamentos intermédios são, na sua base, indicadores de stresse quando realizados compulsivamente.

Hubrecht et al. (1992) descreveram que a inatividade juntamente com a procura constante de estímulo no ambiente exterior (equivalente ao comportamento “ficar atento” no presente estudo) era indicador de stresse psicológico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bodnariu, (2008) e Horwitz and Mills (2010) que também identificaram como comportamentos que podiam indicar stresse, a inatividade, o lambe-se em excesso e os comportamentos alucinatórios como permanecer atento sem um objetivo claro.

Da mesma forma, Grigg et al. (2017) verificou que cães alojados aos pares apresentavam uma redução significativa do comportamento de vigilância do ambiente exterior, conjugado com a maior interação social.

Em termos gerais os comportamentos intermédios entre as fases 2 e 3 não foram significativamente diferentes. Este resultado pode ser justificado pelo nível insuficiente de interação com o elemento extra introduzido, pelo reduzido número de animais utilizados ou devido à variabilidade individual.

Apesar do número total de interações ser de 50 (gráfico 18), tendo em conta que nem todos os animais interagiram com este elemento e que, mesmo aqueles que o fizeram, fizeram-no durante pouco tempo (máximo de 5,3 minutos – gráfico 20) era expectável que não houvesse uma grande variação entre resultados, quando avaliados no seu conjunto, já que todos os outros fatores permaneceram inalterados durante as últimas duas fases.

Nos gráficos 8, 9 e 10 foram evidenciados dois dos comportamentos caracterizados como intermédios: lambe-se (gráfico 8) e ficar atento (gráfico 9 e 10).

Ambos os comportamentos podem ser desejáveis porque fazem parte da rotina normal dos cães saudáveis. No entanto, ambos também estão descritos como potenciais indicadores de stresse sempre que são exibidos em excesso (Hubrecht et al. (1992); Bodnariu (2008); Horwitz and Mills (2010); Grigg et al. (2017)), uma vez que podem mostrar falta de estimulação cognitiva e, que, eventualmente, podem evoluir para comportamentos estereotipados.

Relativamente ao comportamento “lamber-se” (gráfico 8) este não foi influenciado pelo local de alojamento nem pela fase do estudo ( $p=0,492$  e  $p=0,121$ , respetivamente). No entanto, a probabilidade desse comportamento não ocorrer nas fases 2 e 3 foi três vezes superior ao constatado na fase 1 ( $p=0,015$ ), ou seja, é mais provável que os animais não apresentem este comportamento nas fases 2 e 3 do que na 1.

Esta evidência pode sugerir que efetuar o comportamento “lamber-se” estaria mais ligado à situação de stresse vivida pelos animais na fase 1 do que à necessidade biológica de o fazer, uma vez que nas fases seguintes, com a melhoria das condições de alojamento, esta “pretensa necessidade” diminuiu.

O comportamento “ficar atento” foi avaliado utilizando ambas as metodologias de análise (frequência de ocorrência e tempo de permanência).

Quando este é analisado sob o ponto de vista da frequência de ocorrência, observa-se uma tendência semelhante aos resultados anteriores, com uma redução das médias da fase 1 para a 3 ( $19,5 \pm 14,4$ ;  $8,3 \pm 7,5$  e  $6,6 \pm 6,4$ , respetivamente, com valor  $p < 0,001$  em ambas), apesar de não se registarem diferenças significativas entre a fase 2 e 3 (valor  $p=0,418$ ).

Da mesma forma, os resultados referentes ao tempo de permanência dos animais neste comportamento específico mostram que o efeito Fase foi significativo ( $p=0,01$ ), revelando um decréscimo significativo da fase 1 para as fases 2 e 3 ( $p=0,003$ ) e uma ausência de diferenças significativas entre as fases 2 e 3 ( $p=0,8$ ).

Este comportamento indicia uma falta de estimulação cognitiva dos animais, que determina a procura de estímulo no ambiente exterior (Hubrecht et al., 1992; Grigg et al., 2017). Desta forma, eles permanecem constantemente com hipervigilância a tudo o que acontece no exterior e apresentam-se mais reativos a qualquer estímulo externo.

O facto da média de ocorrência deste comportamento se ter reduzido da fase 1 para as fases 2 e 3, sugere que nas fases 2 e 3 os animais obtiveram uma estimulação cognitiva superior e que não necessitaram de procurar com tanta frequência a estimulação externa, na tentativa de suprir as suas necessidades, levando à redução deste comportamento. Outra eventual explicação para a redução observada pode estar associada a um nível de cansaço mais acentuado devido às interações sociais e às brincadeiras durante a permanência no parque grande, originando maiores períodos de descanso (tal como se confirma nos resultados referentes aos comportamentos desejáveis), eventuais alterações nos níveis de endorfinas, reduzindo assim o tempo despendido na procura de estímulo externo.

Os resultados relativos aos comportamentos intermédios vão ao encontro das expectativas, uma vez que dão indícios de uma crescente estimulação cognitiva ao longo do estudo com melhoria das condições de alojamento e de enriquecimento entre a primeira fase e as seguintes.

Os comportamentos considerados desejáveis são aqueles que, quando realizados, podem indicar que os animais têm elevados níveis de bem-estar e, conseqüentemente, uma melhor qualidade de vida.

Tendo em conta que se pretendia, com o presente estudo, diminuir o stresse associado à permanência em ambiente de canil e incrementar a qualidade de vida dos animais, esperar-se-ia um aumento dos comportamentos desejáveis na terceira fase, quando comparada com a primeira.

Esta categoria é bastante vasta e engloba comportamentos afiliativos como interação positiva com os outros animais do grupo, exploração, brincadeira (Dufour et al., 2005; Dalla Villa et al., 2013; Rooney and Bradshaw 2014; Great Britain and Department for Environment 2017); satisfação das necessidades básicas com comportamentos como comer, beber, defecar (Great Britain and Department for Environment 2017); comportamentos de repouso, tal como descansar, deitar e sentar (Kogan et al., 2012; Owczarczak-Garstecka and Burman 2016).

Apesar da inatividade poder ser um possível indicador de stresse psicológico (Hubrecht et al., 1992; Bodnariu, 2008), os comportamentos como deitar e sentar foram considerados desejáveis uma vez que os animais escolhidos para integrar os parques não apresentavam, antes do início do trabalho, quaisquer indícios de hipoatividade.

Ao analisar este tipo de comportamentos (gráfico 11) verifica-se que, tal como nos comportamentos intermédios, houve uma redução da frequência média da fase 1 para a fase 3 ( $p < 0,001$ ) e, tal como no caso anterior, as fases 2 e 3 não apresentaram uma diferença significativa (valor  $p = 0,104$ ).

No entanto, quando se analisa segundo o tempo despendido (gráficos 12 e 13), constata-se precisamente o oposto: há um aumento progressivo do tempo de permanência na realização de comportamentos desejáveis da fase 1 para a fase 3, com médias de 68,08min e 84,46min, respetivamente ( $p = 0,002$ ), ou seja, o efeito fase foi altamente significativo ( $p = 0,003$ ).

Esta diferença prende-se com o facto dos animais terem permanecido durante mais tempo nesta categoria, e portanto não mudaram tantas vezes de comportamento, provocando assim uma redução da frequência de ocorrência dos mesmos.

Resultados semelhantes são encontrados nas variáveis específicas “brincar” e “deitar”.

No caso da variável “brincar” (gráfico 14) nem o efeito Parque nem o efeito Fase mostraram qualquer tipo de influência nos resultados ( $p = 0,992$  e  $p = 0,376$ , respetivamente), sendo que a probabilidade de ausência do comportamento brincar aumentou em mais de cinco vezes na fase 3, quando comparada com a fase 1 ( $p = 0,021$ ).

Quanto ao tempo de permanência (gráfico 15) observa-se que o efeito fase foi significativo ( $p = 0,04$ ) com um aumento deste comportamento da fase 1 para a fase 2 com posterior redução

na fase 3. A média deste comportamento mostrou diferenças significativas apenas entre as fases 2 e 3 ( $p=0,022$ ), com redução de 6,60min na fase 2 para 2,62min na fase 3.

No caso da variável “deitar” (gráfico 16) constata-se uma tendência decrescente da média de ocorrências da fase 1 para a 2 ( $p=0,001$ ) e desta para a 3 ( $p=0,0015$ ), apesar de não se encontrarem diferenças significativas entre as fases 2 e 3 ( $p=0,126$ ). O efeito Parque foi significativo ( $p=0,036$ ) e o efeito Fase foi altamente significativo ( $p<0,001$ ). Contudo, relativamente ao tempo de permanência (gráfico 17), há um incremento da média deste comportamento da primeira (57,06min) para a terceira fase (78,24min) ( $p=0,002$ ), e também entre as fases 2 e 3 ( $p=0,04$ ), com valores de 66,45min e 78,24min, respetivamente.

Ainda que a frequência dos comportamentos evidencie uma redução na média dos comportamentos desejáveis, esta redução deve-se essencialmente à maior duração dos mesmos e não parece indiciar uma deterioração das condições de bem-estar dos animais.

Com a melhoria das condições de enriquecimento ambiental, era expectável obter um incremento na frequência dos comportamentos considerados desejáveis, tal como observaram Normando et al. (2009) que concluíram que o contacto com pessoas apenas através da visão podia diminuir a procura por esconderijos, com uma maior aproximação da parte da frente da jaula, aumentar a exploração, o contacto social (abanando a cauda durante mais tempo) e a locomoção dos cães. Este último comportamento torna-se especialmente importante quando se trata de animais hipotativos. Protopopova et al. (2018) também obtiveram resultados semelhantes quando aumentaram a interação com humanos, com maior expressão dos comportamentos deitar e permanecer calmo e quieto.

Já Owczarczak-Garstecka and Burman (2016) tinham concluído que o aumento do período de descanso durante o dia era indicador de bem-estar. Também Dalla Villa et al. (2013) constataram que o stresse era capaz de provocar alterações nos padrões de sono dos animais.

Fraser and Duncan (1998), Rooney and Bradshaw (2014) evidenciaram, igualmente, que os comportamentos afiliativos, tal como brincar e o contacto social, junto com a exploração eram indicadores de bem-estar.

A mesma informação é apresentada pelo “Code of practice for the welfare of dogs”, associando aos animais saudáveis com elevados níveis de bem-estar, comportamentos como brincar, socializar, farejar e investigar (Great Britain and Department for Environment, 2017).

Atendendo a estas constatações, esperava-se um aumento do tempo que os animais permanecessem nos comportamentos pertencentes a esta categoria, tal como deitar e brincar.

No presente estudo obtiveram-se resultados semelhantes nos comportamentos desejáveis e, especificamente, na variável “deitar”. Os animais passaram mais tempo nesta categoria de comportamentos nas fases 2 e 3 do que na primeira fase, aumentado, sobretudo, o tempo que permaneceram a dormir.

A variável específica “brincar”, não possui um padrão claro ao longo do estudo. Observa-se que, realmente, houve um incremento deste comportamento (gráfico 15) da fase 1 para a 2. No entanto, na fase três houve uma nova redução.

Estes resultados parecem indicar que, nestas condições, talvez este comportamento não seja suficientemente discriminante, uma vez que se verifica uma elevada variação de animal para animal. Porém, de um modo geral, relativamente a esta variável, a informação obtida parece indicar uma tendência de melhoria nas condições de bem-estar da primeira para a terceira fase.

O enriquecimento ambiental resultante da integração dos ramos de alecrim no ambiente de ambos os parques, teve como objetivo um acréscimo de estimulação olfativa. De acordo com o estudo de Graham et al. (2005), o alecrim foi um dos odores estimulantes que resultou, naquele caso, numa maior estimulação cognitiva dos animais, resultando num aumento do estado de alerta e da locomoção, bem como da vocalização.

Um dos critérios de seleção dos animais que integraram os grupos foi a tranquilidade dos mesmos, sempre com a reserva de evitar animais já considerados hipoativos, uma vez que o seu tipo de comportamento iria enviesar os resultados e originar erros de interpretação.

O tipo de temperamento escolhido levaria então a uma estadia menos problemática e a uma melhor interação com os restantes animais do parque.

Tendo em conta este facto, decidiu-se adicionar alecrim como enriquecimento odorífero para promover a estimulação cognitiva e assim evitar uma aproximação da hipoatividade que poderia ser originada pela introdução de odores calmantes como a lavanda ou a camomila (Graham et al., 2005).

No entanto, ao analisar os resultados referentes a esta interação (gráfico 19) observa-se que o número de vezes em que os animais cheiraram os ramos de alecrim (26% das vezes) foi muito inferior ao número de vezes em que os ramos foram utilizados para brincar (74% das vezes). Da mesma forma, os resultados referentes às três categorias de comportamento indicam ausência de resposta relativamente àqueles comportamentos que poderiam ter aumentado com a estimulação odorífera, nomeadamente a vocalização (comportamento indicador de stresse) e o estado de alerta (comportamento intermédio), verificando-se apenas alteração no comportamento exploratório (comportamento desejável) (Graham et al., 2005).

É de salientar que a maior interação com os ramos de alecrim foi através da brincadeira (gráficos 18 e 19). Quando os ramos eram introduzidos nos parques, os animais utilizavam-nos imediatamente para brincar (morder, atirar, esconder). Esta rotina tornou-se habitual e não houve um aumento das interações negativas por posse de recursos com os outros animais do grupo.

Os gráficos 18 e 20 agrupam as interações com o alecrim segundo a frequência absoluta e o tempo de interação, respetivamente. Por comparação, observa-se que nem sempre o maior número de interações corresponde a mais tempo de interação, o que é expectável, pois maior número de interações pode significar uma menor duração das mesmas. Por exemplo, o Kylo e a Carol apresentam 13 e 12 interações, respetivamente, mas a nível temporal, a Carol interagiu durante 5,3min com o alecrim enquanto o Kylo apenas interagiu 2,5min. Tal deve-se a que, apesar do número de interações no Kylo ser superior, estas foram de menor duração. A Carol interagiu de forma mais prolongada, originando uma frequência absoluta menor.

Pela comparação entre animais verifica-se que apenas três dos oito cães não apresentaram qualquer tipo de interação com o alecrim – a Tália, o Pantufa e o Hopper. Coincidentemente, estes três animais são aqueles que possuem as idades mais avançadas de ambos os grupos. Estes dados são concordantes com os constatados por Wells and Hepper (2000) que concluíram que cães mais velhos perdiam rapidamente o interesse pelos brinquedos introduzidos, ou simplesmente não mostravam qualquer tipo de interesse desde o primeiro momento. No entanto, mesmo naqueles animais que realmente brincaram com os ramos de alecrim (gráfico 18), observou-se que o dispêndio total de tempo nessa interação foi baixo (máximo de 5,3 minutos – gráfico 20), o que confirma os resultados de Pullen et al. (2010) acerca do pouco tempo gasto com os brinquedos, sobretudo quando se verificam outras formas de enriquecimento, tal como a presença de animais ou pessoas.

Independentemente do pouco tempo utilizado nesta interação, os resultados evidenciam realmente uma redução significativa do tempo de permanência dos animais em comportamentos indicadores de stresse da fase 2 para a fase 3 ( $p=0.018$ ). Desta forma, ainda que os comportamentos desejáveis não tenham aumentado significativamente na terceira fase, e tendo em conta que todos os fatores, excluindo a introdução dos ramos de alecrim, se mantiveram idênticos à fase 2, há indícios de que a introdução deste estímulo adicional tenha contribuído para a melhoria das condições de bem-estar dos animais e conseqüente aumento da qualidade de vida.

Este tipo de informação obriga, contudo, a uma reavaliação das condições escolhidas para o enriquecimento ambiental, uma vez que é possível que a estimulação odorífera não tenha sido alcançada devido ao facto dos animais serem suficientemente estimulados por outros fatores externos ao parque e/ou à escolha do objeto introduzido na última fase. A utilização de ramos de alecrim provocou nos animais uma percepção diferente da pretendida inicialmente, uma vez que, na maioria das vezes, não os cheiraram e partiram diretamente para a brincadeira, acabando por desfazer a zona do ramo com odor. Atendendo a que o comportamento de brincadeira é igualmente desejável, o resultado foi igualmente satisfatório embora por razões diferentes da inicialmente prevista. No entanto, pensa-se que a estimulação odorífera teria sido provavelmente conseguida caso se tivesse optado por outro tipo de objeto, tal como velas ou difusores que não pudessem ser destruídos pelos animais.

Contudo, a verdade é que houve realmente um grau de enriquecimento ambiental, sem um aumento das interações negativas. Tratando-se de uma opção de baixo custo, a adição deste tipo de estímulo (ramos de alecrim) pode ser uma possibilidade adicional quando se pretende melhorar os níveis de bem-estar dos animais, sobretudo aqueles que vivem isoladamente ou num ambiente mais restritivo sem outros tipos de enriquecimento.

## **7.2. Componente fisiológica**

Na componente fisiológica, estava previsto o estudo de dois parâmetros: o cortisol salivar e os neurotransmissores séricos, nomeadamente a serotonina e a dopamina.

No entanto, não houve possibilidade de completar a determinação dos níveis de dopamina e serotonina séricas, apenas permanecendo a avaliação do cortisol salivar.

Segundo alguns dos autores, os níveis elevados de cortisol nos cães estão associados a condições de stresse crónico e, por consequência, uma concentração inferior desta hormona relaciona-se com melhores condições de bem-estar por haver redução da ansiedade (Coppola et al., 2006b; Rooney et al., 2007; Dalla Villa et al., 2013).

Tendo em conta os resultados obtidos na componente comportamental que apontam para uma melhoria do bem-estar dos animais com redução dos níveis de stresse, e visto que, efetivamente, as condições de alojamento e de enriquecimento foram progressivamente melhores ao longo do estudo, era expectável a obtenção de determinações de cortisol salivar decrescentes da primeira para a terceira fase.

Assim sendo, seria expectável uma redução na média de valores de cortisol salivar entre a primeira e a terceira fase, o que indicaria que realmente a concentração desta hormona era mais baixa no sangue (e consequentemente na saliva), dando indícios de melhor qualidade de vida.

Apesar de se verificar uma tendência decrescente entre as fases 1 e 3 (gráficos 21 e 22), não se registaram alterações estatisticamente significativas entre as diferentes fases ( $p=0,226$ ).

De acordo com o exposto, esperar-se-ia uma maior correspondência entre a vertente comportamental e a componente fisiológica, relativamente às diferentes significativas entre fases, o que não ocorreu.

Perante os resultados obtidos é importante salientar que todas as amostras foram colhidas nas mesmas condições, ou seja, que todos os animais estavam na mesma fase do estudo e possuíam as mesmas condições de alojamento e de recolha. O presente estudo garantiu essa padronização precisamente para evitar erros de amostragem.

No entanto, importa destacar que os oito animais integrantes no estudo possuíam temperamentos diferentes com diferentes limiares de excitação, o que implicou uma grande discrepância comportamental aquando do momento da colheita. Alguns dos animais eram cooperantes e permitiam todo o procedimento sem dificuldade, mas outros acabavam por dificultar ou ainda impossibilitar a colheita numa primeira instância, originando maiores tempos de recolha e amostras menos volumosas.

Segundo Davidson et al. (1968), Coover et al. (1979) e Hennessy (2013), o tempo decorrido entre uma certa estimulação e a libertação de cortisol é de alguns minutos, o que possibilita a recolha das amostras sem influência significativa na variação dos resultados, ou seja, sem um aumento significativo do cortisol induzido pelo estímulo da colheita. No entanto, alguns dos animais precisaram efetivamente de mais minutos para a obtenção de uma quantidade aceitável de saliva, o que pode suscitar algumas dúvidas quanto à influência ou não do estímulo da manipulação no cortisol salivar determinado.

Acresce ainda à limitação referida o facto de que, segundo Harmon et al. (2007), quando o material utilizado para a recolha é o algodão, tal como no presente estudo, alguma quantidade de saliva pode permanecer no material após centrifugação, o que diminui muitas vezes o volume

da amostra que já era inicialmente baixo no caso dos animais mais pequenos ou menos cooperantes.

Uma terceira explicação para os resultados obtidos prende-se no facto de ter sido utilizado ácido cítrico como estimulante da produção de saliva. A decisão de utilizar esta substância visou diminuir o impacto do tempo de recolha através de uma maior estimulação glandular, ou seja, aumentar a quantidade de amostra obtida em cada animal no mais curto intervalo de tempo possível. Contudo, de acordo com diversos autores, este estimulante poderá originar um falso aumento do cortisol salivar por diminuição do pH da amostra (Schwartz et al., 1998; Granger et al., 2004; Dreschel and Granger, 2009)

Excluindo estas possibilidades de erro que podem ocorrer na colheita e no processamento de cada amostra, há ainda que ter em atenção a enorme variação individual dos níveis de cortisol entre os cães (DeKosky et al., 1984; Cobb et al., 2016) devido a fatores como a idade (Palazzolo and Quadri, 1987), as experiências anteriores (Hiby et al., 2006) e o tamanho do animal (Sandri et al., 2015). Adicionalmente, o temperamento dos indivíduos em estudo foi bastante variado na forma como interagiram com as pessoas e com o ambiente, o que por se pode determinar níveis de cortisol basais diferenciados. Estes são alguns dos parâmetros que, aliados ao restrito número de cães participantes no estudo, poderão ter influenciado a variabilidade nas respostas e assim a ausência de diferenças significativas entre as fases, uma vez que, apesar das condições de alojamento e colheita de amostras serem idênticas, os animais possuíam idades, tamanhos e experiências passadas completamente diferentes.

Hennessy, (2013) e Cobb et al. (2016) salientaram que o cortisol salivar poderia não ser a medida mais fiável na medição de situações de stresse crónico, apresentando algumas limitações como biomarcador de bem-estar quando usado isoladamente.

Desta forma, os resultados apresentados sugerem que, provavelmente, graças ao restrito número de animais da amostra e à própria variabilidade entre os cães, o poder das análises realizadas não foi suficiente para detetar diferenças significativas entre as fases.

Ainda assim, a tendência decrescente encontrada nas médias dos níveis de cortisol ao longo das fases, vai ao encontro das respostas comportamentais observadas e sugere um menor grau de stresse no final do estudo quando comparado com a primeira fase.

Esta conjugação de resultados permitiu, ainda assim, tirar algumas ilações relativamente ao enriquecimento ambiental.

Em primeiro lugar, a diferença existente entre a resposta ao enriquecimento da fase 2 quando comparado com a fase 3, dá indícios de que, efetivamente, a interação inter-espécie e os momentos de exercício e brincadeira tiveram, neste caso, um maior impacto quando se pretendeu diminuir o stresse dos animais do que aquele provocado pela adição de brinquedos nos locais de alojamento.

Apesar da dificuldade que geralmente se constata nos centros de recolha para implementar este tipo de enriquecimento (por falta de espaço, de trabalhadores ou de voluntários), conclui-se que,



sempre que possível, seria benéfico introduzir enriquecimentos semelhantes ao fornecido na segunda fase do estudo, visto que este é determinante na melhoria das condições de bem-estar dos animais.

Em segundo lugar, conclui-se que a adição dos ramos de alecrim, que não tem relevância no orçamento geral, pode permitir uma certa estimulação ambiental e cognitiva nos animais, tanto mais relevante se não houver possibilidade de proporcionar tipos de enriquecimento que requeiram mais tempo, trabalhadores ou instalações, como é o caso das interações com humanos, dos passeios e dos momentos de brincadeira com outros animais. Estes, ao permanecerem concentrados no objeto durante algum tempo, poderão diminuir a ansiedade provocada pela procura constante de estímulo externo e podem reduzir os níveis circulantes de cortisol.

Sendo assim, quando a primeira opção não for viável, é sempre benéfico optar por este tipo de estímulo já que há realmente uma melhoria da qualidade de vida dos animais.

Por último, é importante pensar em adicionar este tipo de objetos em vários momentos do dia porque, se por um lado, o próprio objeto é de fácil destruição, por outro, o momento da introdução do estímulo adicional é precisamente aquele em que os animais mais interagem com o objeto.

Tal como em todos os estudos, foram encontradas várias limitações durante os procedimentos que impossibilitaram a obtenção de resultados eventualmente mais significativos.

Na componente comportamental, a principal limitação existente foi a própria escolha do método de avaliação das imagens. Devido ao facto de se ter escolhido um método de avaliação que tem por base o número de vezes que cada comportamento é realizado, alguns dos resultados podem parecer incongruentes caso não se tenha em consideração a duração em que ocorre cada comportamento. Assim, as gravações foram também analisadas sob o ponto de vista temporal, ou seja, avaliando a quantidade de tempo gasta em cada comportamento.

Por outro lado, seria desejável ter dois momentos de avaliação comportamental, durante a manhã e ao final da tarde. Desta forma, poder-se-ia avaliar com maior detalhe as variações comportamentais dos animais, principalmente antes e depois do parque grande e da interação social com humanos. Porém, devido às rotinas do próprio canil, não foi possível a realização da dita observação matutina, por haver muitos procedimentos e porque a periodicidade destes não permitia uma uniformidade nas observações.

Quanto à componente fisiológica, uma das limitações foi a falta de financiamento para a determinação dos níveis séricos de dopamina e serotonina. Estes neurotransmissores poderiam ter agregado um valor acrescido e possibilitado uma melhor compreensão entre a relação com os níveis de stresse, a alteração dos comportamentos e o bem-estar dos animais.

Na determinação do cortisol salivar também foram encontrados alguns problemas que poderiam ter sido ultrapassados caso os animais tivessem sido submetidos a um treino mais exaustivo para a colheita de saliva. Na verdade, no momento da recolha, alguns dos animais eram menos cooperantes simplesmente porque ficavam muito ansiosos pela interação com pessoas e pela

antecipação de poderem sair do parque. Caso tivessem sido previamente preparados e treinados de uma forma mais programada e durante mais tempo, talvez esta ansiedade e excitação poderia ter sido reduzida por haver reconhecimento e previsibilidade dos procedimentos seguintes.

Outra limitação prendeu-se com o facto dos animais não possuírem todos as mesmas características (idade, tempo de permanência no canil, limiar de excitação, etc). No entanto, nos canis nem sempre é possível encontrar amostras muito homogéneas, constituídas por indivíduos semelhantes, o que tem de ser compensado por um maior número de repetições, com amostras constituídas por um maior número de indivíduos, o que nem sempre é possível.

Apesar das limitações, os resultados do estudo conduzem de forma inequívoca, para uma melhoria dos indicadores de bem-estar entre as fases 1 e 3.

## **8. Principais ilações**

O presente estudo partiu da hipótese de que cães alojados em condições de enriquecimento ambiental sucessivamente mais satisfatórias e desafiadoras apresentariam uma redução dos indicadores de stresse, nas componentes comportamental e fisiológica e, conseqüentemente, um aumento dos indicadores de bem-estar.

Perante os resultados obtidos, conclui-se que houve uma melhoria significativa desses indicadores entre a fase 1 (sem qualquer tipo de enriquecimento ambiental) e as fases 2 e 3. Os animais apresentaram-se mais relaxados na fase 2 e mostraram menos comportamentos indicadores de stresse. O cortisol salivar também mostrou uma tendência decrescente, indo ao encontro dos indicadores comportamentais.

A fase 3, traduziu-se em melhorias menos acentuadas, tendo os animais mantido padrões comportamentais próximos dos observados na fase 2, evidenciando ligeiras diferenças positivas associadas à redução dos comportamentos indicadores de stresse.

Os resultados obtidos permitem concluir que, apesar da adição da estimulação odorífera providenciada pelo alecrim não ter mostrado um efeito tão exuberante quanto o esperado, relativamente à fase 2, há indicação clara de que a introdução dos ramos de alecrim foi benéfica. Muitos dos animais, por serem mais velhos, não mostraram interesse neste elemento, o que provocou uma redução do número de interações. No entanto, aqueles que mostraram interesse e que brincaram com os ramos de alecrim, fizeram-no após o momento de maior enriquecimento correspondente ao parque grande, o que permite concluir que o alecrim provocou a estimulação cognitiva pretendida, ainda que de uma forma diferente daquela planeada inicialmente.

Esta utilização, por muitos dos cães, dos ramos de alecrim como brinquedos originou uma melhoria nos resultados obtidos, com indícios de melhoria dos níveis de bem-estar, sendo fortemente recomendável a sua utilização em canis onde não há possibilidade de adicionar outro tipo de estímulos.

Desta forma foi possível perceber como é que a incorporação de diferentes tipos de enriquecimento ambiental pode interferir positivamente na qualidade de vida dos cães alojados em centros de recolha oficial.

## **9. Nota final**

Nos dias de hoje é possível observar na sociedade uma preocupação crescente no que diz respeito aos direitos dos animais e à qualidade de vida que estes possuem, tanto em ambiente familiar como em ambiente de canil.

A verdade é que, com o aumento constante da população de cães abandonados e a impossibilidade de encontrar adotantes para todos eles, os centros de recolha oficial têm vindo a reportar vários problemas tanto a nível de espaço como a nível de cuidado para com os animais.

A ideia generalizada acerca de um canil tende a ser negativa. A sociedade vê os canis como um sítio triste, com jaulas frias e solitárias onde os animais não têm qualquer tipo de interação com o mundo exterior e onde vivem infelizes durante toda a sua vida.

Esta ideia, infelizmente, poderá corresponder à realidade em alguns casos mas, felizmente, não é o caso do Canil Municipal de Évora.

Este espaço é um local alegre onde os animais são tratados com o respeito que merecem e onde se tenta, na medida do possível, fornecer um ambiente enriquecedor e estimulante.

O objetivo final é sempre tornar a estadia de cada cão, o mais curta e o mais agradável possível. É importantíssimo destacar as excelentes condições que já fazem parte do canil que contribuem para os superiores níveis de bem-estar, bem como o enorme esforço realizado pela equipa técnica deste centro, liderada pela Médica veterinária municipal, a Dra. Margarida Câmara e pela voluntária Marta Correia, cuja dedicação promove a melhoria da qualidade de vida dos animais alojados naquele espaço.

Como animais sociais, os cães precisam de interagir com outros cães e, se possível com pessoas para uma maior estimulação cognitiva e conseqüentemente, melhores condições de vida.

No Canil Municipal de Évora, os animais são alojados, dentro do possível, aos pares ou em grupos e possuem cerca de 3h onde podem interagir livremente com outros animais e onde há espaço suficiente para se exercitarem e brincarem. Há ainda a vantagem adicional do contacto com humanos no transporte entre o local habitual e o parque grande.

Mesmo aqueles cães considerados problemáticos por serem mais agressivos ou possuírem um temperamento menos amigável (que são geralmente deixados de lado no que se refere a interações com pessoas e outros cães) usufruem desta estimulação em alturas do dia diferentes dos restantes animais de modo a facilitar a sua integração.

Os animais alojados no canil de Évora desfrutam ainda de um tipo de enriquecimento adicional com passeios e sessões de treino, possibilitado pela presença de voluntários externos e da

voluntária Marta Correia. Estas sessões visam melhorar o comportamento dos cães e facilitar a sua adoção.

As excelentes condições de bem-estar dos animais são confirmadas no presente estudo. Os resultados indicam que, a passagem da fase 1 para a fase 2 representou uma enorme melhoria nas condições de bem-estar dos animais com reduções tanto nos comportamentos de stresse e intermédios, como no cortisol salivar. Estes resultados foram conjugados com um aumento daqueles comportamentos considerados desejáveis, ou seja, indicadores de bem-estar.

A rotina dos animais leva-nos a concluir que os habitantes do Canil Municipal de Évora, que usufruem das condições relatadas na fase 2 do presente estudo, evidenciam um elevado nível de bem-estar com níveis relativamente baixos de stresse. Porém, é ainda possível diligenciar no sentido de providenciar maior estimulação cognitiva nos animais alojados em grupo, através de estimulações várias, entre as quais as odoríferas. Neste particular, podem usar-se estímulos potencialmente calmantes ou estimulantes nos parques onde ocorrem animais mais ou menos reativos. Este aspeto é particularmente relevante nos animais alojados individualmente onde estas formas de enriquecimento ambiental se tornam mais relevantes.

A Dra. Margarida Câmara e a Marta Correia são ainda as coordenadoras do Projeto Fiel que, graças à sua enorme dedicação, facilitou os canais de comunicação e adoção de animais portugueses em países estrangeiros, aumentando muito a taxa de adoção do canil.

Todas estas iniciativas fazem com que o Canil Municipal de Évora deva ser visto como um exemplo para todo o país, uma vez que existe uma enorme preocupação e trabalho, tanto na melhoria das condições de bem-estar dos animais presentes no centro como no aumento da taxa de adoção desses mesmos animais.

## **10. Bibliografia**

- Alberghina, D., Rizzo, M., Piccione, G., Giannetto, C., Panzera, M., 2017. An exploratory study about the association between serum serotonin concentrations and canine-human social interactions in shelter dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Veterinary Behavior* 18, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2016.09.006>
- Axelrod, J., Reisine, T., 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224, 452–459. <https://doi.org/10.1126/science.6143403>
- Bechtold, M.L., Puli, S.R., Othman, M.O., Bartalos, C.R., Marshall, J.B., Roy, P.K., 2009. Effect of Music on Patients Undergoing Colonoscopy: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Dig Dis Sci* 54, 19–24. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0312-0>
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Bernadina, W., Van Hooff, J.A.R.A.M., De Vries, H.W., Mol, J.A., 1999a. Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. II. Hormonal and Immunological Responses. *Physiology & Behavior* 66, 243–254. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00290-X)

- Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, J., J.A.R.A.M, Vries, Mol, J., 2000. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal welfare* 9, 2000, 49-62 9.
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, Jan.A.R.A.M., de Vries, H.W., 1997. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 52, 307–319. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01131-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01131-8)
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Van Hooff, J.A.R.A.M., De Vries, H.W., Mol, J.A., 1999b. Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. I. Behavioral Responses. *Physiology & Behavior* 66, 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00289-3)
- Bodnariu, A., 2008. INDICATORS OF STRESS AND STRESS ASSESSMENT IN DOGS 7.
- Bosch, G., Beerda, B., Hendriks, W.H., van der Poel, A.F.B., Verstegen, M.W.A., 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutr. Res. Rev.* 20, 180–194. <https://doi.org/10.1017/S095442240781331X>
- Bowman, A., Scottish SPCA, Dowell, F.J., Evans, N.P., 2015. ‘Four Seasons’ in an animal rescue centre; classical music reduces environmental stress in kennelled dogs. *Physiology & Behavior* 143, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.035>
- Bradshaw, R.H., Marchant, J.N., Meredith, M.J., Broom, D.M., 1998. Effects of Lavender Straw on Stress and Travel Sickness in Pigs. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 4, 271–275. <https://doi.org/10.1089/acm.1998.4.3-271>
- Bruce Overmier, J., 2002. Sensitization, conditioning, and learning: Can they help us understand somatization and disability? *Scand J Psychol* 43, 105–112. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00275>
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jäger, W., 1991. Aromatherapy: Evidence for Sedative Effects of the Essential Oil of Lavender after Inhalation. *Zeitschrift für Naturforschung C* 46, 1067–1072. <https://doi.org/10.1515/znc-1991-11-1223>
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jäger, W., Plank, C., Dietrich, H., 1993. Fragrance Compounds and Essential Oils with Sedative Effects upon Inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82, 660–664. <https://doi.org/10.1002/jps.2600820623>
- Casper, R.C., 1998. Serotonin, a Major Player in the Regulation of Feeding and Affect. *BIOL PSYCHIATRY* 44:795–797.
- Centros de recolha oficial, 2020. Relatório Lei nº 27/2016, de 23 de Agosto.
- Chamove, A.S., Moodie, E.M., 1990. Are alarming events good for captive monkeys? *Applied Animal Behaviour Science* 27, 169–176. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90016-7)
- Cobb, M.L., Iskandarani, K., Chinchilli, V.M., Dreschel, N.A., 2016. A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domestic Animal Endocrinology* 57, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.04.003>
- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P., Morgan Jones, S.D., 1997. Radioimmunoassay for Cortisol in Pig Saliva and Serum. *J. Agric. Food Chem.* 45, 395–399. <https://doi.org/10.1021/jf960619d>

- Coover, G.D., Heybach, J.P., Lenz, J., Miller, J.F., 1979. Corticosterone “basal levels” and response to ether anesthesia in rats on a water deprivation regimen. *Physiology & Behavior* 22, 653–656. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90225-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90225-7)
- Coppola, C.L., Enns, R.M., Grandin, T., 2006a. Noise in the Animal Shelter Environment: Building Design and the Effects of Daily Noise Exposure. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 9, 1–7. [https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0901\\_1](https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0901_1)
- Coppola, C.L., Grandin, T., Enns, R.M., 2006b. Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs? *Physiology & Behavior* 87, 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.12.001>
- Dalla Villa, P., Barnard, S., Di Fede, E., Podaliri, M., Candeloro, L., Di Nardo, A., Siracusa, C., Serpell, J.A., 2013. Behavioural and physiological responses of shelter dogs to long-term confinement. *Vet. Ital.* 49, 231–241.
- Damián, J.P., Bengoa, L., Pessina, P., Martínez, S., Fumagalli, F., 2018. Serial collection method of dog saliva: Effects of different chemical stimulants on behaviour, volume and saliva composition. *Open Vet J.* 8, 229. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i3.1>
- Davidson, J.M., Jones, L.E., Levine, S., 1968. Feedback Regulation of Adrenocorticotropin Secretion in “Basal” and “Stress” Conditions: Acute and Chronic Effects of Intrahypothalamic Corticoid Implantation. *Endocrinology* 82, 655–663. <https://doi.org/10.1210/endo-82-4-655>
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., Cotman, C.W., 1984. Elevated corticosterone levels. A possible cause of reduced axon sprouting in aged animals. *Neuroendocrinology* 38, 33–38. <https://doi.org/10.1159/000123862>
- DeLuca, A.M. (National C.I., Kranda, K.C., 1992. Environmental enrichment in a large animal facility. *Lab animal (USA)*.
- Denham, H.D.C., Bradshaw, J.W.S., Rooney, N.J., 2014. Repetitive behaviour in kennelled domestic dog: Stereotypical or not? *Physiology & Behavior* 128, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.007>
- Dhabhar, F.S., 2009. Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16, 300–317. <https://doi.org/10.1159/000216188>
- Dreschel, N.A., Granger, D.A., 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior* 55, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.09.010>
- Dubois, J.M., Bartter, T., Pratter, M.R., 1995. Music Improves Patient Comfort Level During Outpatient Bronchoscopy. *Chest* 108, 129–130. <https://doi.org/10.1378/chest.108.1.129>
- Dufour, A.B., Viggiano, E., Palme, R., De Palma, C., Natoli, E., Fantini, C., Barillari, E., 2005. Evaluating the temperament in shelter dogs. *Behav* 142, 1307–1328. <https://doi.org/10.1163/156853905774539337>
- Farm Animal Welfare Council, [webmaster@defra.gsi.gov.uk](mailto:webmaster@defra.gsi.gov.uk), 2012. FAWC - Farm Animal Welfare Council [WWW Document]. URL

- <https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20121010012427/http://www.fawc.org.uk/freedom.htm> (accessed 3.25.20).
- Fibiger, H.C., Phillips, A.G., 2011. Reward, Motivation, Cognition: Psychobiology of Mesotelencephalic Dopamine Systems, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. cp010412. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp010412>
- Fraser, D., Duncan, I.J.H., 1998. 'Pleasures', 'Pains' and Animal Welfare: Toward a Natural History of Affect 14.
- Graham, L., Wells, D.L., Hepper, P.G., 2005. The influence of olfactory stimulation on the behaviour of dogs housed in a rescue shelter. *Applied Animal Behaviour Science* 91, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.08.024>
- Granger, D.A., Kivlighan, K.T., Fortunato, C., Harmon, A.G., Hibel, L.C., Schwartz, E.B., Whembolua, G.-L., 2007. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol. Behav.* 92, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.004>
- Granger, D.A., Shirtcliff, E.A., Booth, A., Kivlighan, K.T., Schwartz, E.B., 2004. The “trouble” with salivary testosterone. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1229–1240. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.02.005>
- Great Britain, Department for Environment, F.& R.A., 2017. Code of practice for the welfare of dogs.
- Grigg, E.K., Nibblett, B.M., Robinson, J.Q., Smits, J.E., 2017. Evaluating pair versus solitary housing in kennelled domestic dogs ( *Canis familiaris* ) using behaviour and hair cortisol: a pilot study. *Vet Rec Open* 4, e000193. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2016-000193>
- Gröschl, M., Biskupek-Sigwart, J., Rauh, M., Dörr, H.G., 2000. Measurement of Cortisol in Saliva Using a Commercial Radioimmunoassay Developed for Serum. *Messung von Speichel-Cortisol mittels eines kommerziellen Serum-Radioimmunoassays. LaboratoriumsMedizin* 24, 314–318. <https://doi.org/10.1515/labm.2000.24.6-7.314>
- Haney, M., Noda, K., Kream, R., Miczek, K.A., 1990. Regional Serotonin and Dopamine Activity: Sensitivity to Amphetamine and Aggressive Behavior in Mice.
- Harmon, A.G., Hibel, L.C., Rummyantseva, O., Granger, D.A., 2007. Measuring salivary cortisol in studies of child development: watch out--what goes in may not come out of saliva collection devices. *Dev Psychobiol* 49, 495–500. <https://doi.org/10.1002/dev.20231>
- Hashemi, P., Dankoski, E.C., Lama, R., Wood, K.M., Takmakov, P., Wightman, R.M., 2012. Brain dopamine and serotonin differ in regulation and its consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11510–11515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201547109>
- Hecht, J., Horowitz, A., 2017. Introduction to dog behavior, in: Weiss, E., Mohan-Gibbons, H., Zawistowski, S. (Eds.), *Animal Behavior for Shelter Veterinarians and Staff*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 3–30. <https://doi.org/10.1002/9781119421313.ch1>

- Hennessy, M.B., 2013. Using hypothalamic–pituitary–adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review. *Applied Animal Behaviour Science* 149, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.004>
- Hennessy, M.B., Voith, V.L., Mazzei, S.J., Buttram, J., Miller, D.D., Linden, F., 2001. Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied Animal Behaviour Science* 73, 217–233. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00139-3)
- Herron, M.E., Kirby-Madden, T.M., Lord, L.K., 2014. Effects of environmental enrichment on the behavior of shelter dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244, 687–692. <https://doi.org/10.2460/javma.244.6.687>
- Hewison, L.F., Wright, H.F., Zulch, H.E., Ellis, S.L.H., 2014. Short term consequences of preventing visitor access to kennels on noise and the behaviour and physiology of dogs housed in a rescue shelter. *Physiology & Behavior* 133, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.045>
- Hewson, C.J., Hiby, E., Bradshaw, J.W.S., 2007. Assessing quality of life in companion and kennelled dogs: A critical review. *Animal Welfare* 16, 89–95.
- Hiby, E., Rooney, N., Bradshaw, J., 2006. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior* 89, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.07.012>
- Horwitz, D., Mills, D., 2010. *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine*, 2nd Edition | Wiley [WWW Document]. URL <https://www.wiley.com/en-us/BSAVA+Manual+of+Canine+and+Feline+Behavioural+Medicine%2C+2nd+Edition-p-9781905319152> (accessed 6.21.20).
- Hubrecht, R.C., 1993. A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 37, 345–361. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90123-7)
- Hubrecht, R.C., Serpell, J.A., Poole, T.B., 1992. Correlates of pen size and housing conditions on the behaviour of kennelled dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 34, 365–383. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(05\)80096-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(05)80096-6)
- Kiddie, J., Bodymore, A., Dittrich, A., 2017. Environmental Enrichment in Kennelled Pit Bull Terriers (*Canis lupus familiaris*). *Animals* 7, 27. <https://doi.org/10.3390/ani7040027>
- Kirschbaum, C., Hellhammer, D.H., 1989. Salivary Cortisol in Psychobiological Research: An Overview. *Neuropsychobiology* 22, 150–169. <https://doi.org/10.1159/000118611>
- Kobelt, A.J., Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Butler, K.L., 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* 75, 157–161. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00080-8)
- Kogan, L.R., Schoenfeld-Tacher, R., Simon, A.A., 2012. Behavioral effects of auditory stimulation on kenneled dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 7, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2011.11.002>



- Lebelt, D., Zanella, A.J., Unshelm, J., 1998. Physiological correlates associated with cribbing behaviour in horses: changes in thermal threshold, heart rate, plasma  $\beta$ -endorphin and serotonin. *Equine Veterinary Journal* 30, 21–27. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb05140.x>
- Lei n.º 8/2017 de 3 de março, 2017, 2017. Portugal: Diário da República n.º 45/2017, Série I de 2017-03-03; URL <https://data.dre.pt/eli/lei/8/2017/03/03/p/dre/pt/html>.
- Lei n.º 27/2016 de 23 de agosto, 2016, 2016. Portugal: Diário da República, 1.ª série — N.º 161 — 23 de agosto de 2016. URL <https://data.dre.pt/eli/lei/27/2016/08/23/p/dre/pt/html>.
- Lorenzo, N., Wan, T., Harper, R.J., Hsu, Y.-L., Chow, M., Rose, S., Furton, K.G., 2003. Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 1212–1224. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2018-7>
- Mason, G., Clubb, R., Latham, N., Vickery, S., 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? *Applied Animal Behaviour Science* 102, 163–188. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.041>
- Mertens, P.A., Unshelm, J., 1996. Effects of Group and Individual Housing on the Behavior of Kennelled Dogs in Animal Shelters. *Anthrozoös* 9, 40–51. <https://doi.org/10.2752/089279396787001662>
- Mira, F., Costa, A., Mendes, E., Azevedo, P., Carreira, L.M., 2016. Influence of music and its genres on respiratory rate and pupil diameter variations in cats under general anaesthesia: contribution to promoting patient safety. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18, 150–159. <https://doi.org/10.1177/1098612X15575778>
- Mitchell, J.B., Gratton, A., 1994. Involvement of Mesolimbic Dopamine Neurons in Sexual Behaviors: Implications for the Neurobiology of Motivation. *Reviews in the Neurosciences* 5. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.1994.5.4.317>
- Modigh, K., 1973. Effects of isolation and fighting in mice on the rate of synthesis of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine in the brain. *Psychopharmacologia* 33, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF00428790>
- Morgan, K.N., Tromborg, C.T., 2007. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102, 262–302. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.032>
- Nelson, A., Hartl, W., Jauch, K.-W., Fricchione, G.L., Benson, H., Warshaw, A.L., Conrad, C., 2008. The impact of music on hypermetabolism in critical illness: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 11, 790–794. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328314dd01>
- Normando, S., Corain, L., Salvadoretti, M., Meers, L., Valsecchi, P., 2009. Effects of an Enhanced Human Interaction Program on shelter dogs' behaviour analysed using a novel nonparametric test. *Applied Animal Behaviour Science* 116, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.10.005>

- Odendaal, J.S.J., Meintjes, R.A., 2003. Neurophysiological Correlates of Affiliative Behaviour between Humans and Dogs. *The Veterinary Journal* 165, 296–301. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00237-X)
- Oliveira, A.B., 2017. Efeito do enriquecimento ambiental no bem-estar de cães alojados em Centro de Recolha Oficial - Estudo piloto. Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra.
- Osella, M.C., Odore, R., Badino, P., Cuniberti, B., Bergamasco, L., 2005. Plasma Dopamine Neurophysiological Correlates in Anxious Dogs.
- Owczarczak-Garstecka, S.C., Burman, O.H.P., 2016. Can Sleep and Resting Behaviours Be Used as Indicators of Welfare in Shelter Dogs (*Canis lupus familiaris*)? *PLoS ONE* 11, e0163620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163620>
- Palazzolo, D.L., Quadri, S.K., 1987. Plasma thyroxine and cortisol under basal conditions and during cold stress in the aging dog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185, 305–311. <https://doi.org/10.3181/00379727-185-42549>
- Pastore, C., Pirrone, F., Balzarotti, F., Faustini, M., Pierantoni, L., Albertini, M., 2011. Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 6, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2011.01.001>
- Powell, D.M., 1995. Preliminary Evaluation of Environmental Enrichment Techniques for African Lions. *Animal Welfare* 11.
- Protopopova, A., Hauser, H., Goldman, K.J., Wynne, C.D.L., 2018. The effects of exercise and calm interactions on in-kennel behavior of shelter dogs. *Behav. Processes* 146, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.11.013>
- Pullen, A.J., Merrill, R.J.N., Bradshaw, J.W.S., 2010. Preferences for toy types and presentations in kennel housed dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 125, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.04.004>
- Riemer, S., Heritier, C., Windschnurer, I., Arhant, C., Pratsch, L., Affenzeller, N., 2020. A Review on Mitigating Fear and Aggression in Dogs and Cats in a Veterinary Setting. <https://doi.org/10.20944/preprints202012.0138.v1>
- Riva, J., Bondiolotti, G., Michelazzi, M., Verga, M., Carenzi, C., 2008. Anxiety related behavioural disorders and neurotransmitters in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 114, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.020>
- Robbins, T.W., Everitt, B.J., 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 228–236. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80077-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80077-8)
- Rogeness, G.A., Hernandez, J.M., Macedo, C.A., Mitchell, E.L., Amrung, S.A., Harris, W.R., 1984. Clinical Characteristics of Emotionally Disturbed Boys with Very Low Activities of Dopamine- $\beta$ -hydroxylase. *Journal of the American Academy of Child Psychiatry* 23, 203–208. <https://doi.org/10.1097/00004583-198403000-00013>

- Rooney, N., Bradshaw, J., 2014. Canine Welfare Science: An Antidote to Sentiment and Myth, in: Horowitz, A. (Ed.), *Domestic Dog Cognition and Behavior*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 241–274. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-53994-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-53994-7_11)
- Rooney, N., Gaines, S., Hiby, E., 2009. A practitioner's guide to working dog welfare. *Journal of Veterinary Behavior* 4, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2008.10.037>
- Rooney, N.J., Gaines, S.A., Bradshaw, J.W.S., 2007. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior* 92, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.011>
- Rosado, B., García-Belenguer, S., León, M., Chacón, G., Villegas, A., Palacio, J., 2010. Blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 123, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.01.009>
- Sachar, E.J., Hellman, L., Roffwarg, H.P., Halpern, F.S., Fukushima, D.K., Gallagher, T.F., 1973. Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 28, 19–24. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1973.01750310011002>
- Sales, G., Hubrecht, R., Peyvandi, A., Milligan, S., Shield, B., 1997. Noise in dog kennelling: Is barking a welfare problem for dogs? *Applied Animal Behaviour Science* 52, 321–329. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01132-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01132-X)
- Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M.G., Stefanon, B., 2015. Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal of Veterinary Behavior* 10, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.03.011>
- Sands, J., Creel, S., 2004. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal Behaviour* 67, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.03.019>
- Scheifele, P., Martin, D., Clark, J.G., Kemper, D., Wells, J., 2012. Effect of kennel noise on hearing in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 73, 482–489. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.4.482>
- Schipper, L.L., Vinke, C.M., Schilder, M.B.H., Spruijt, B.M., 2008. The effect of feeding enrichment toys on the behaviour of kennelled dogs (*Canis familiaris*). *Applied Animal Behaviour Science* 114, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.001>
- Schoon, G.A.A., De Bruin, J.C., 1994. The ability of dogs to recognize and cross-match human odours. *Forensic Science International* 69, 111–118. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)90247-X](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)90247-X)
- Schuett, E.B., Frase, B.A., 2001. Making Scents: Using the Olfactory Senses for Lion Enrichment. *The Shape Of Enrichment - a Quarterly Source of Ideas for Enrichment* 10, 3.
- Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., Laird, B., 1998. Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Dev* 69, 1503–1513.

- Sechi, S., Di Cerbo, A., Canello, S., Guidetti, G., Chiavolelli, F., Fiore, F., Cocco, R., 2017. Effects in dogs with behavioural disorders of a commercial nutraceutical diet on stress and neuroendocrine parameters. *Veterinary Record* 180, 18–18. <https://doi.org/10.1136/vr.103865>
- Smythies, J., 2005. Section V. Serotonin System, in: *International Review of Neurobiology*. Elsevier, pp. 217–268. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)64005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)64005-6)
- Strithunyarat, T., Hagman, R., Höglund, O.V., Stridsberg, M., Hanson, J., Lagerstedt, A.S., Pettersson, A., 2018. Catestatin, vasostatin, cortisol, and visual analog scale scoring for stress assessment in healthy dogs. *Research in Veterinary Science* 117, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.11.015>
- Taylor, K., Mills, D., 2007. The effect of the kennel environment on canine welfare: a critical review of experimental studies. *Animal Welfare* 13.
- Tobler, P.N., Dickinson, A., Schultz, W., 2003. Coding of Predicted Reward Omission by Dopamine Neurons in a Conditioned Inhibition Paradigm. *J Neurosci* 23, 10402–10410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-32-10402.2003>
- Umezū, T., 2000. Behavioral Effects of Plant-Derived Essential Oils in the Geller Type Conflict Test in Mice. *Jpn.J.Pharmacol* 83, 150–153. <https://doi.org/10.1254/jjp.83.150>
- Umezū, T., Sakata, A., Ito, H., 2001. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 69, 383–390. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00543-3)
- van Praag, H.M., 2004. Can stress cause depression? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 28, 891–907. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.031>
- van Rooijen, J., 1991. Predictability and boredom. *Applied Animal Behaviour Science* 31, 283–287. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90014-O](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90014-O)
- Venn, R.E., 2013. *Effects of Acute and Chronic Noise Exposure on Cochlear Function and Hearing in Dogs (Dissertação)*. Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine College of Medical, Veterinary and Life Sciences University of Glasgow, Glasgow.
- Walker, J.K., Dale, A.R., D'Eath, R.B., Wemelsfelder, F., 2016. Qualitative Behaviour Assessment of dogs in the shelter and home environment and relationship with quantitative behaviour assessment and physiological responses. *Applied Animal Behaviour Science* 184, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.08.012>
- Wells, D.L., 2009. Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. *Applied Animal Behaviour Science* 118, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.01.002>
- Wells, D.L., 2006. Aromatherapy for travel-induced excitement in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 964–967. <https://doi.org/10.2460/javma.229.6.964>

- Wells, D.L., 2004a. A review of environmental enrichment for kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Applied Animal Behaviour Science* 85, 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.11.005>
- Wells, D.L., 2004b. The influence of toys on the behaviour and welfare of kennelled dogs. *Animal Welfare* 13, 367–373.
- Wells, D.L., Egli, J.M., 2004. The influence of olfactory enrichment on the behaviour of captive black-footed cats, *Felis nigripes*. *Applied Animal Behaviour Science* 85, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.08.013>
- Wells, D.L., Graham, L., Hepper, P.G., 2002. The Influence of Length of Time in a Rescue Shelter on the Behaviour of Kennelled Dogs. *Animal Welfare* 11, 317–325.
- Wells, D.L., Hepper, P.G., 2000. The influence of environmental change on the behaviour of sheltered dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 68, 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00100-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00100-3)
- Willis, C.M., Church, S.M., Guest, C.M., Cook, W.A., McCarthy, N., Bransbury, A.J., Church, M.R.T., Church, J.C.T., 2004. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ* 329, 712. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7468.712>
- Wright, H.F., Mills, D.S., Pollux, P.M.J., 2012. Behavioural and physiological correlates of impulsivity in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Physiology & Behavior* 105, 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.019>
- Young, R.J., 2003. Environmental enrichment: an Historical Perspective, in: *Environmental enrichment for captive animals*. Blackwell Publishing, Universitites Federation for Animal Welfare, p. 3.