

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL E SENSORIAL COMO
ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O BEM-ESTAR DE EQUINOS EM
CONDIÇÕES DE ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO

Ana Caroline Bini de Lima

CAMPO GRANDE, MS

2024

BINI DE LIMA, A. C.	ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL E SENSORIAL COMO ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O BEM-ESTAR DE EQUINOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO	2024
---------------------	---	------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL E SENSORIAL COMO
ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O BEM-ESTAR DE EQUINOS
EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO**

**SOCIAL AND SENSORY ENVIRONMENTAL ENRICHMENT AS
STRATEGIES TO OPTIMIZE THE WELFARE OF HORSES UNDER
SHORT-TERM STRESS CONDITIONS**

Ana Caroline Bini de Lima

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Viviane Maria Oliveira dos Santos

Tese apresentada à Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção
do título de Doutora em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2024



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

ANA CAROLINE BINI DE LIMA

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL E SENSORIAL COMO ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O
BEM-ESTAR DE EQUINOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO**
**SOCIAL AND SENSORY ENVIRONMENTAL ENRICHMENT AS STRATEGIES TO OPTIMIZE EQUINE
WELFARE UNDER SHORT-TERM STRESS CONDITIONS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito para obtenção do título
de Doutora em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 29-04-2024

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Viviane Maria Oliveira dos Santos
(UFMS) – Presidente

Dra. Fabiana Ribeiro Caldara
(UFGD)

Dra. Marina Pagliai Ferreira da Luz
(UNESP)

Dr. Nivaldo Karvatte Junior
(UFRN)

Dra. Reíssa Alves Vilela
(UEMS)

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Reíssa Alves Vilela, Usuário Externo**, em 03/05/2024, às 16:18, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Ribeiro Caldara, Usuário Externo**, em 06/05/2024, às 08:24, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Nivaldo Karvatte Junior, Usuário Externo**, em 06/05/2024, às 08:55, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Maria Oliveira dos Santos Nieto, Professora do Magistério Superior**, em 06/05/2024, às 13:21, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Marina Pagliai Ferreira da Luz, Usuário Externo**, em 06/05/2024, às 14:29, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4829846** e o código CRC **FB8C547D**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 4829846

Dedicatória

*Dedico esta tese aos cavalos que passaram pela minha vida
moldando eternamente minha forma de ver o mundo,
em especial meu querido Malibu.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo seu amor e graça que me sustentaram para realização deste sonho profissional.

À minha família amada, por todo suporte e incentivo que me mantiveram de pé ao longo deste percurso.

À toda equipe do NEABBE, que se esmerou contribuindo de forma inigualável para realização deste projeto.

À minha querida orientadora Prof^a Dra. Viviane Maria Oliveira dos Santos, por acreditar em mim, compartilhar seus conhecimentos com muito amor, e permitir explorar ao máximo meu potencial e criatividade como cientista.

À empresa Laszlo (Therra Aromas e Sabores Indústria de Alimentos LTDA) e a MSc. Gioconda Assumpção, pelo incentivo e concessão dos óleos essenciais utilizados.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade da realização do Doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e apoio a pesquisa.

*“O que você faz, faz a diferença,
e você precisa decidir que tipo de diferença quer fazer.”
(Jane Goodall)*

RESUMO

BINI DE LIMA, A.C. Enriquecimento ambiental social e sensorial como estratégias para otimizar o bem-estar de equinos em condições de estresse de curta duração. 2024. 91f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024

A pesquisa foi desenvolvida para avaliar o efeito de diferentes estratégias de enriquecimento ambiental (EA) sensorial e social sobre o bem-estar de equinos em condições de estresse de curta duração (isolamento social e restrição de movimentos). No capítulo 1, têm-se a revisão de literatura, onde foi abordado inicialmente os desafios enfrentados por equinos no ambiente doméstico e caracterizada a resposta fisiológica e comportamental ao estresse. Em seguida, são descritas estratégias para redução do estresse, sendo apontada a relevância do EA sensorial e social como alternativas em potencial para melhorar o bem-estar da espécie. No capítulo 2 é apresentado o artigo em que foi proposto avaliar o efeito do EA social sem contato, em cavalos submetidos à restrição de movimentos imposta pelo manejo de contenção em tronco, e sua capacidade de facilitar o amortecimento social, promovendo a redução de respostas ao estresse. Foram avaliados equinos da raça Pantaneiro (n=11) em delineamento crossover com tratamento EAS (Enriquecimento ambiental social durante manejo de contenção em tronco), e tratamento IS (Isolamento social durante manejo de contenção em tronco). Parâmetros fisiológicos e expressões faciais (EquiFACS) foram avaliados ao longo dos 24 minutos em que os animais permaneceram contidos. Quando os cavalos foram submetidos ao manejo em isolamento social (IS) as frequências cardíaca e respiratória foram maiores ($p<0,05$) do que, quando acompanhados por um coespecífico (EAS). A frequência de expressões faciais associadas a resposta ao estresse como *dilatador de narinas* (AD38), *levantador de sobrancelha interna* (AU101), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1), *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104), também foram maiores ($p<0,05$) para IS em comparação com EAS. O EA social sem contato se mostrou uma estratégia eficaz para mitigar o estresse induzido pelo manejo, demonstrando que esta prática pode facilitar o amortecimento social. No capítulo 3 é apresentado o artigo em que foi proposto avaliar o efeito do EA sensorial olfativo com óleo essencial de lavanda em cavalos submetidos à restrição de movimentos imposta pelo manejo de contenção em tronco e isolamento social, e sua capacidade de reduzir respostas ao estresse. Foram avaliados equinos da raça Pantaneiro (n=7) em delineamento crossover com tratamento lavanda (óleo essencial de *Lavandula augustifolia*) e tratamento controle (TACC). Parâmetros fisiológicos e comportamentais (comportamento geral e expressões faciais - EquiFACS) foram avaliados ao longo dos 24 minutos em que os animais permaneceram contidos. Quando os cavalos receberam o tratamento lavanda sua frequência cardíaca foi menor após a estimulação olfativa ($p<0,05$). Paralelamente, foi observado aumento da temperatura ocular ($p<0,05$) para o enriquecimento com lavanda. A frequência de expressões faciais associadas a resposta ao estresse como *dilatador de narinas* (AD38), *mastigação* (AD81), *exposição da língua* (AD19) e *piscada* (AU145), também foram menores ($p<0,05$) para lavanda. O EA olfativo com óleo essencial de lavanda influenciou parâmetros fisiológicos e expressões faciais de cavalos Pantaneiros, e se mostrou uma estratégia eficaz para atenuar o estresse de curta duração induzido pelo manejo. Com base nas observações promissoras da utilização do enriquecimento ambiental sensorial e social sobre o bem-estar de equinos em condições de estresse de curta duração obtidas nesta tese, recomenda-se a implantação de ambas as estratégias em centros equestres.

Palavras-chave: amortecimento social, comportamento, expressão facial, odorantes

ABSTRACT

BINI DE LIMA, A.C. Social and sensory environmental enrichment as strategies to optimize equine welfare under short-term stress conditions. 2024. 91f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, MS, 2024

The research was developed to evaluate the effect of different sensory and social environmental enrichment (EE) strategies on the welfare of horses under short-term stress conditions (social isolation and movement restriction). In chapter 1, there is a literature review, which initially addressed the challenges faced by horses in the domestic environment and characterized the physiological and behavioral stress responses. Next, strategies for reducing stress are described, highlighting the relevance of sensory and social EE as potential alternatives to improve the well-being of the species. Chapter 2 presents the article in which it was proposed to evaluate the effect of non-contact social EE on horses subjected to movement restriction imposed by restraint handling in stocks, and its ability to facilitate social buffering by promoting the reduction of stress responses. Pantaneiro horses (n=11) were evaluated in a crossover design with EAS treatment (Social environmental enrichment during restraint handling in stocks) and IS treatment (Social isolation during restraint handling in stocks). Physiological parameters and facial expressions (EquiFACS) were assessed throughout the 24 minutes that the animals remained restrained. When horses were subjected to handling in social isolation (IS), heart and respiratory rates were higher ($p<0.05$) than when accompanied by a conspecific (EAS). The frequency of facial expressions associated with the stress response such as *nostril dilation* (AD38), *inner brow raiser* (AU101), *upper lid raiser* (AU5), *eye white increase* (AD1), *ears forward* (EAD101) and *ear rotator* (EAD104), were also greater ($p<0.05$) for IS compared to EAS. Non-contact social EE proved to be an effective strategy to mitigate handling-induced stress, demonstrating that this practice can facilitate social buffering. Chapter 3 presents the article in which it was proposed to evaluate the effect of olfactory sensory EE with lavender essential oil on horses subjected to movement restrictions imposed by restraint handling in stocks and social isolation, and its ability to reduce stress responses. Pantaneiro horses (n=7) were evaluated in a crossover design with lavender treatment (*Lavandula augustifolia* essential oil) and control treatment (TACC). Physiological and behavioral (general behavior and facial expressions – EquiFACS) parameters were assessed throughout the 24 minutes that the animals remained restrained. When horses received the lavender treatment their heart rate was lower after olfactory stimulation ($p<0.05$). At the same time, an increase in ocular temperature ($p<0.05$) was observed for lavender enrichment. The frequency of facial expressions associated with the stress response, such as *nostril dilation* (AD38), *chewing* (AD81), *tongue show* (AD19) and *blink* (AU145), were also lower ($p<0.05$) for lavender. Olfactory EE with lavender essential oil influenced physiological parameters and facial expressions of Pantaneiro horses and proved to be an effective strategy to mitigate short-term stress induced by handling. Based on the promising observations of the use of sensory and social environmental enrichment on the welfare of horses in short-term stress conditions obtained in this thesis, it is recommended the implementation of both strategies in equestrian centers.

Keywords: behavior, facial expression, odorants, social buffering

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Modelo padrão de resposta ao estresse..	24
Figura 2. Infográfico representando opções de enriquecimento ambiental social	27
Figura 3. Visão geral de estruturas e células associadas ao sistema olfativo equino	33
Figura 4. Equino expressando resposta de Flehmen: (a) garanhão expressando resposta de Flehmen após estimulação olfativa com óleo essencial; (b) infográfico dos processos envolvidos durante a expressão da resposta Flehmen.	36

ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL REDUZ EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS A REPOSTA AO ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO EM EQUINOS.....

	51
Figura 1. Diagrama do delineamento experimental.....	54
Figura 2. Configuração experimental da área para o teste, bem como a localização do animal avaliado e do coespecífico durante as coletas... ..	56
Figura 3. Procedimento experimental.....	56
Figura 4. Gráficos de caixas: (a) Frequência respiratória (movimentos/min); (b) Temperatura ocular (°C) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de quatro pontos de coleta	61
Figura 5. Gráficos de caixas: (a) Descritor de ação facial orelhas para frente (EAD101; frequência/min); (b) Descritor de ação facial orelhas para trás (EAD104; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos	62
Figura 6. Gráficos de caixas: (a) Unidade de ação facial levantador da sobrancelha interna (AU101; frequência/min); (b) Unidade de ação facial piscada (AU145; frequência/min); (c) Unidade de ação facial levantador da pálpebra (AU5; frequência/min); (d) Descritor de ação facial aumento do branco dos olhos (AD1; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos	63
Figura 7. Gráficos de caixas do descritor de ação dilatação da narina (AD38; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos.	64
Figura 8. Biplot bidimensional da análise de componentes principais com as expressões faciais e as observações separadas por tratamento	65

ARTIGO 2: ENRIQUECIMENTO OLFATIVO COM ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA INFLUENCIA EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE EQUINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO.....	75
Figura 1. Diagrama do delineamento experimental.....	78
Figura 2. Preparação da amostra e estimulação olfativa através de apresentação concentrada do óleo es-sencial de lavanda, ou TACC	80
Figura 3. Procedimento experimental.....	80
Figura 4. Gráfico de caixas da temperatura do ocular (°C) nos tratamentos controle e lavanda antes (P1 e P2) e após estimulação olfativa (P3 e P4)	85
Figura 5. Gráficos de caixas: (a) Piscada (AU145; frequência/min); (b) Dilatação da narina (AD38; frequência/min); (c) Exposição da língua (AD19; frequência/min); (d) Mastigação (AD81; frequência/min) nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).	87
Figura 6. Biplot bidimensional da análise de componentes principais com as expressões faciais e os indivíduos separados por tratamento (a) ou por intervalos (b)	89

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL REDUZ EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS A REPOSTA AO ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO EM EQUINOS..... 51

Tabela 1. Ambiente térmico e índices bioclimáticos para caracterização do ambiente experimental 55

Tabela 2. Respostas cardíacas do coespecífico destinado ao EAS como parceiro social, durante as coletas 57

Tabela 3. Códigos pertencentes ao EquiFACS selecionados para codificação de expressões faciais em vídeos de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco) 58

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos parâmetros cardíacos de equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos... 60

Tabela 5. Média e desvio-padrão ou mediana e amplitude interquartil dos parâmetros fisiológicos de equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo dos quatro pontos de coleta 60

Tabela 6. Média e desvio-padrão ou mediana e amplitude interquartil da frequência por minuto dos parâmetros faciais expressos por equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos 61

Tabela 7. Valores de carga, autovalores e variância da análise de componentes principais (PC = componente principal; em negrito estão os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que - 0,40 indicando associação da variável com o PC)..... 65

ARTIGO 2: ENRIQUECIMENTO OLFATIVO COM ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA INFLUENCIA EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE EQUINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO 75

Tabela 1. Ambiente térmico e índices bioclimáticos para caracterização do ambiente experimental 79

Tabela 2. Códigos pertencentes ao EquiFACS selecionados para codificação de expressões faciais em vídeos de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco e isolamento social)..... 82

Tabela 3. Etograma descritivo para avaliação comportamental de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco e isolamento social) 83

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos parâmetros cardíacos de equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente) ...	84
Tabela 5. Média e desvio-padrão dos parâmetros fisiológicos de equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes (P1 e P2) e após estimulação olfativa (P3 e P4).....	85
Tabela 6. Média e desvio-padrão de parâmetros comportamentais apresentados por equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).....	86
Tabela 7. Média e desvio-padrão da frequência por minuto de parâmetros faciais expressos por equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).....	86
Tabela 8. Valores de carga, autovalores e variância da análise de componentes principais (PC = componente principal; em negrito estão os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que - 0,40 indicando associação da variável com o PC).....	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	O cavalo doméstico: desafios ambientais e bem-estar	20
2.1.1	Cavalo Pantaneiro: origem, características adaptativas e importância no cenário regional.....	22
2.2	Resposta ao estresse.....	23
2.3	Estratégias para redução do estresse de equinos em ambiente doméstico.....	26
2.3.1	Enriquecimento ambiental social	27
2.3.1.1	Suporte e amortecimento social	32
2.3.2	Enriquecimento ambiental sensorial olfativo	31
2.3.2.1	Estimulação olfativa e o olfato equino	32
2.3.2.2	Utilização de óleos essenciais para estimulação olfativa	37
	REFERÊNCIAS	40

ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL REDUZ EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS A REPOSTA AO ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO EM EQUINOS.....

1.	Introdução	52
2.	Materiais e Métodos	53
2.1	<i>Animais, alojamento e habituação</i>	53
2.2	<i>Delineamento experimental</i>	54
2.3	<i>Condições ambientais</i>	55
2.4	<i>Procedimento experimental</i>	55
2.5	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	56
2.5.1	Frequência cardíaca (FC) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC)	56
2.5.2	Frequência respiratória (FR).....	57
2.5.3	Temperatura ocular por termografia infravermelha (TOT)	57
2.5.4	Temperatura auricular por termômetro infravermelho (TAT).....	57
2.6	<i>Parâmetros faciais</i>	58
2.6.1	Gravação de vídeo.....	58

2.6.2	Processamento e codificação de vídeos com sistema de codificação de ação facial equina (EquiFACS)	58
2.7	<i>Descrição estatística</i>	59
3.	Resultados.....	60
3.1	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	60
3.2	<i>Parâmetros faciais</i>	61
4.	Discussão	66
5.	Conclusão	70
	Referências	70

ARTIGO 2: ENRIQUECIMENTO OLFATIVO COM ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA INFLUENCIA EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE EQUINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO

1.	Introdução	76
2.	Materiais e Métodos	78
2.1	<i>Animais, alojamento e habituação</i>	78
2.2	<i>Delineamento experimental</i>	78
2.3	<i>Condições ambientais</i>	79
2.4	<i>Procedimento experimental</i>	80
2.5	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	81
2.5.1	Frequência cardíaca (FC) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC)	81
2.5.2	Frequência respiratória (FR).....	81
2.5.3	Temperatura ocular por termografia infravermelha (TOT).....	81
2.5.4	Temperatura auricular por termômetro infravermelho (TAT).....	81
2.6	<i>Parâmetros comportamentais</i>	82
2.6.1	Gravação de vídeo.....	82
2.6.2	Processamento e codificação de vídeos com sistema de codificação de ação facial equina (EquiFACS)	82
2.6.3	Processamento de vídeos e avaliação de comportamentos gerais.....	83
2.7	<i>Descrição estatística</i>	83
3.	Resultados.....	84
3.1	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	84
3.2	<i>Parâmetros comportamentais</i>	85

4.	Discussão	89
5.	Conclusão	92
	Referências	92
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

1 INTRODUÇÃO

Cavalos domésticos enfrentam uma série de desafios inerentes ao ambiente em que são mantidos e manejados. Para lidar com estes desafios, os animais contam com respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse que, embora sejam adaptativas, quando provocadas por longa duração, ou com frequência, podem comprometer o bem-estar (BUDZYŃSKA, 2014; MCGREEVY *et al.*, 2018). Por este motivo, há constante busca por alternativas que possam auxiliar na redução do estresse e aumentar a capacidade dos animais de lidar com desafios.

O enriquecimento ambiental tem sido apontado como alternativa para melhorar a situação cativa de cavalos domésticos e a segurança de tratadores (LANSADE *et al.*, 2014; SARRAFCHI; BLOKHUIS, 2013). De forma geral, estratégias de enriquecimento envolvem o fornecimento de estímulos sensoriais, novos objetos, contatos sociais e a possibilidade de exercício voluntário (LANSADE *et al.*, 2014), o que resulta em um ambiente interativo e complexo, permitindo que os animais expressem padrões comportamentais típicos da espécie.

A estimulação olfativa, particularmente, é uma forma de enriquecimento ambiental sensorial com potencial considerável. Odores são relativamente baratos, acessíveis, fáceis de armazenar e podem se tornar dinâmicos no tempo e espaço, criando um aspecto de novidade (NIELSEN *et al.*, 2015), o que faz da estimulação olfativa interessante do ponto de vista prático. Estudos recentes demonstraram que a estimulação olfativa pode afetar parâmetros fisiológicos, assim como comportamentais de cavalos domésticos (FERGUSON; KLEINMAN; BROWNING, 2013; GUILLAUME *et al.*, 2018; HEITMAN *et al.*, 2018; RØRVANG; NICOVA; YNGVESSON, 2021).

As pesquisas desenvolvidas com equinos até o momento focaram, em sua maioria, na utilização do óleo essencial de lavanda, que demonstrou ter o potencial de reduzir a intensidade da resposta ao estresse em cavalos expostos a diversos tipos de estressores (FERGUSON; KLEINMAN; BROWNING, 2013; HEITMAN *et al.*, 2018; POUTARAUD *et al.*, 2018). Embora os resultados sejam promissores, ainda há lacunas relacionadas a esta área do conhecimento, e, estudos realizados em diferentes contextos relacionados ao ambiente doméstico podem trazer um leque maior de possibilidades com relação a utilização da estimulação olfativa como enriquecimento ambiental sensorial.

Outra categoria de enriquecimento ambiental que pode ser especialmente vantajosa para equinos, por se tratar de uma espécie gregária, é o enriquecimento ambiental social. Esse tipo de enriquecimento envolve proporcionar oportunidades para socialização e pode facilitar o

1 suporte social, um atributo distinto observado em mamíferos sociais, através do qual animais
2 na companhia de membros da mesma espécie experimentam melhor bem-estar físico e
3 psicológico (KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006; MCMILLAN, 2020).

4 A introdução de membros da mesma espécie (coespecíficos) como método de
5 enriquecimento ambiental pode aumentar a capacidade dos animais de lidar com desafios, visto
6 que, o suporte social possui efeitos amortecedores que mitigam o impacto negativo dos
7 estressores sob bem-estar do indivíduo (KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006; RICCI-BONOT
8 *et al.*, 2021). Esse fenômeno é conhecido como amortecimento social, já relatado em equinos
9 por diferentes autores (RICCI-BONOT *et al.*, 2021; RØRVANG; CHRISTENSEN, 2018;
10 VISSER; ELLIS; VAN REENEN, 2008). Ainda assim, a utilização de parceiros sociais como
11 enriquecimento ambiental social e as vantagens do amortecimento social em equinos tem sido
12 pouco explorada na ciência animal, o que destaca a necessidade de novos estudos que abordem
13 o uso dessa estratégia no manejo cotidiano de equinos.

14 Em vista disso, a pesquisa foi desenvolvida para avaliar o efeito de diferentes estratégias
15 de enriquecimento ambiental (sensorial e social) sobre o bem-estar de equinos em condições de
16 estresse de curta duração (isolamento social e restrição de movimentos). O trabalho apresentado
17 é composto por três capítulos, sendo: Capítulo 1, uma revisão de literatura com tópicos
18 relevantes para compreensão do tema abordado; Capítulo 2, artigo intitulado “Enriquecimento
19 ambiental social reduz expressões faciais e parâmetros fisiológicos relacionados a reposta ao
20 estresse de curta duração em equinos”, redigido de acordo com as normas da revista *Animals*;
21 Capítulo 3, artigo intitulado “Enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda influencia
22 expressões faciais e parâmetros fisiológicos de equinos submetidos a estresse de curta duração”
23 redigido de acordo com as normas da revista *Animals*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CAVALO DOMÉSTICO: DESAFIOS AMBIENTAIS E BEM-ESTAR

O repertório comportamental inclui uma gama de atividades que podem ser observadas em uma espécie específica, e que permitem que esta espécie se adapte ao seu habitat (MILLS, 2010). O repertório comportamental do cavalo evoluiu em resposta aos desafios enfrentados no nicho evolutivo de um herbívoro pastejador, que forma grupos sociais e geralmente evita a predação por meio da fuga (BOTREAU *et al.*, 2023; COOPER; ALBENTOSA, 2005).

No ambiente doméstico, muitos destes desafios enfrentados no habitat natural foram extinguidos. No entanto, a necessidade psicológica de responder a fatores ambientais podem ainda existir, mesmo que a necessidade biológica de expressar respostas comportamentais adaptativas tenha sido eliminada (COOPER; ALBENTOSA, 2005). Embora a domesticação de cavalos tenha ocorrido há mais de 5.000 anos, evidências sugerem que os padrões comportamentais dos cavalos domésticos não diferem substancialmente dos padrões de cavalos ferais de vida livre e, apesar de gerações de reprodução em habitats não naturais, é comum que animais domésticos ainda apresentem comportamentos de seu repertório original (HAUSBERGER; LESIMPLE; HENRY, 2021; MILLS, 2010; SARRAFCHI; BLOKHUIS, 2013).

Os habitats naturais são frequentemente ricos, proporcionando estímulos que variam no espaço e no tempo, permitindo que os animais expressem ampla gama de comportamentos. Em contrapartida, o ambiente doméstico é, em geral, forjado para atender as necessidades biológicas básicas dos animais, sendo menos complexos e dinâmicos (BOTREAU *et al.*, 2023). Essa discrepância, associada ao fato de cavalos serem mantidos com frequência em condições subótimas (HAUSBERGER; LESIMPLE; HENRY, 2021), geram impactos negativos sobre o bem-estar da espécie.

Cavalos enfrentam constantemente diversos desafios inerentes ao ambiente doméstico, sendo comum que, a expressão de seu comportamento natural seja limitada drasticamente. É usual em diversos países que cavalos estabulados sejam mantidos em isolamento social, privados dos benefícios do contato social com coespecíficos. No entanto, para uma espécie gregária como o cavalo, é provável que o suporte social seja crítico para o funcionamento mental saudável, devido à pressão evolutiva para não se tornar um indivíduo isolado e, conseqüentemente, vulnerável enquanto presa (MILLS; RICCI-BONOT; HALL, 2020).

1 Além do isolamento social, as limitações físicas impostas aos animais criados de forma
2 intensiva significam que o comportamento de movimentação é prejudicado (MCGREEVY,
3 2004). A restrição de movimentos é um desafio de extrema relevância se considerarmos que
4 cavalos ferais de vida livre percorrem em média 18 Km por dia e cavalos domésticos mantidos
5 a pasto cerca de 6,5 Km, em contraste com cavalos domésticos estabulados que, mesmo com
6 tempo de soltura em piquetes, percorrem menos de 1,6 Km por dia (BEAVER, 2019).

7 Em paralelo a restrição de movimentos imposta pela forma como os animais são
8 alojados, há a restrição de movimentos imposta por manejos que envolvem contenção física
9 como atendimentos veterinários, por exemplo, sendo comum o uso de troncos de contenção,
10 em geral construídos de postes sólidos (RILEY; CREGIER; FRASER, 2022). Todavia, para
11 uma espécie cuja principal estratégia de defesa é a fuga, esse tipo de manejo pode ser aversivo
12 mesmo para animais familiarizados com a prática, como observado no trabalho executado por
13 Vitale *et al.* (2013), cujos resultados indicam que a restrição de movimentos está associada ao
14 aumento da atividade simpática, mesmo em cavalos habituados.

15 O isolamento social e a restrição de movimento em conjunto com um ambiente
16 notoriamente pobre em estímulos sensoriais, limitam a capacidade do cavalo de engajar de
17 forma voluntária com seu ambiente e coespecíficos. A capacidade dos animais de engajar em
18 comportamentos voluntários, autogerados e/ou direcionados a objetivos é descrita como
19 agência, e tem sido o ponto central de desenvolvimentos recentes na ciência do bem-estar
20 animal (MELLOR *et al.*, 2020).

21 O "Modelo dos Cinco Domínios", considerado referência para avaliação do bem-estar
22 animal na atualidade, foi proposto em 1994 e posteriormente atualizado em 2001, 2004, 2009,
23 2012, 2015, 2017 e 2020 para incorporar desenvolvimentos atuais no pensamento científico
24 sobre bem-estar (MELLOR *et al.*, 2020). Esse modelo expressa dentro de cinco domínios
25 experiências positivas e negativas vividas pelos animais, sendo eles: (1) nutrição; (2) ambiente
26 físico; (3) saúde; (4) interações comportamentais; (5) estado mental (MELLOR;
27 BEAUSOLEIL, 2020). Os três primeiros domínios concentram-se principalmente em fatores
28 que perturbam características relacionadas à estabilidade interna do corpo. Em contraste, o foco
29 principal do Domínio 4 está na evidência comportamental da expressão de agência quando os
30 animais interagem com seu ambiente, animais não humanos e humanos (MELLOR *et al.*, 2020).

31 A agência demonstra as propensões intrínsecas dos animais de engajar ativamente com
32 seu ambiente físico, biótico e social. Esse engajamento ativo vai além do exigido por

necessidades momentâneas, tendo como finalidade permitir que os animais possam reunir conhecimento e aprimorar suas habilidades para no futuro responder de forma eficaz a desafios diversos (MELLOR; BEAUSOLEIL, 2020; ŠPINKA; WEMELSFELDER, 2018). Em condições naturais, os animais precisam engajar ativamente com o ambiente para prosperarem na sobrevivência e na reprodução (ŠPINKA, 2019).

Para animais sob cuidados humanos no ambiente doméstico, promover oportunidades que melhoram a capacidade de estes expressarem comportamentos relacionados com a agência, pode provocar efeitos positivos que melhoram o bem-estar. Por outro lado, a evidência comportamental de expressão prejudicada de agência quando os animais interagem com seu ambiente ou outros animais, está relacionada a efeitos negativos que comprometem o bem-estar (MELLOR *et al.*, 2020).

2.1.1 CAVALO PANTANEIRO: ORIGEM, CARACTERÍSTICAS ADAPTATIVAS E IMPORTÂNCIA NO CENÁRIO REGIONAL

Para identificar gargalos e aprimorar a forma como cavalos são criados e manejados, além dos conhecimentos gerais relacionados a espécie, é importante agregar conhecimento a respeito de particularidades que raças localmente adaptadas sob cuidados humanos, podem apresentar. O Pantaneiro é uma raça brasileira, difundida especialmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, onde teve origem (MCMANUS *et al.*, 2016), que descende de animais trazidos da Península Ibérica ao Brasil na época da colonização (EGITO *et al.*, 2016).

Os cavalos Ibéricos introduzidos no Pantanal Brasileiro multiplicaram-se, e após centenas de anos de seleção natural formaram um ecótipo adaptado às condições ecológicas desafiadoras deste bioma, marcado por períodos de águas e seca, com elevadas temperaturas (SANTOS *et al.*, 2020). Originou-se assim o cavalo Pantaneiro, reconhecido como raça pelo Ministério da Agricultura em 1972 (MCMANUS *et al.*, 2016).

Os animais da raça Pantaneiro apresentam características adaptativas que lhes permitem sobreviver e prosperar mesmo diante das adversidades ambientais, como: tolerância ao calor (SANTOS *et al.*, 2022), hábito alimentar adaptado aos recursos forrageiros locais, assim como, capacidade de pastear dentro d'água em áreas inundáveis (SANTOS *et al.*, 2016a), e resistência dos cascos à umidade (SANTOS *et al.*, 2016b). A adaptação ao ambiente local é uma característica valiosa que atribui ao cavalo Pantaneiro grande utilidade no manejo do gado de corte, considerada a principal atividade econômica da região (SANTOS *et al.*, 2020). Além

disso, estes animais representam importante meio de transporte para os habitantes locais, principalmente em regiões de difícil acesso no Pantanal (SANTOS *et al.*, 2013).

Conhecidos por sua multifuncionalidade, os cavalos Pantaneiros são, em geral, mediolíneos e possuem bom desenvolvimento torácico, o que os proporciona tanto velocidade na lida com o gado como resistência a longas caminhadas (MCMANUS *et al.*, 2008). Devido suas características morfofuncionais, há uma crescente participação de animais da raça em cavalgadas e práticas esportivas como Laço Técnico, Laço Comprido, “Team Penning” (apartação de determinados bois do rebanho) e “Ranching Sorting” (seleção de gado e direcionamento para cercados/currais) (SANTOS; TAKAHASHI, 2021).

Apesar das notáveis características adaptativas que atribuem a estes animais valor genético ímpar, essa raça quase chegou à extinção devido a uma série de fatores como doenças e cruzamentos indiscriminados com outras raças (SANTOS *et al.*, 2003). Todavia, a valorização do cavalo Pantaneiro nas últimas décadas levou a expansão no número de núcleos de criação no Pantanal, favorecendo a conservação da raça e possibilitando ampliação de mercado para outros estados e países (SANTOS *et al.*, 2023). Diante deste cenário, os criadores têm buscado melhorar a raça, assim como o manejo geral dos cavalos, o que impulsiona a busca por estratégias de manejo que preconizem o bem-estar animal.

2.2 RESPOSTA AO ESTRESSE

A falta de satisfação das necessidades comportamentais é um estressor recorrente para cavalos domésticos. Diante de um estressor em potencial, a defesa biológica coordenada pelo sistema nervoso central consiste em uma combinação de respostas fisiológicas (autônomicas e neuroendócrinas) e comportamentais ao estresse (MCGREEVY *et al.*, 2018). Os dois principais sistemas acionados em resposta ao estresse são: o sistema nervoso autônomo (SNA), com ênfase na ativação simpática do SNA, e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (HYYPÄÄ, 2005).

A resposta fisiológica ao estresse ocorre em dois estágios. No estágio 1, a estimulação da região posterior do hipotálamo resulta em sinais que ativam a medula das glândulas adrenais, provocando a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (MCGREEVY *et al.*, 2018). Estes hormônios atuam em vários sistemas do corpo para gerar resposta adaptativa e favorecem à disponibilização de oxigênio para os músculos (BOMBAIL, 2017; MOBERG; MENCH, 2000) (Figura 1).



Figura 1. Modelo padrão de resposta ao estresse. Fonte: Adaptado de McGreevy et al. (2018). Elaborado pela autora com recursos do Canva.

No estágio 2, o núcleo paraventricular do hipotálamo recebe informações que levam à secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que sinaliza à hipófise para liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Em seguida, o ACTH estimula o córtex das glândulas adrenais a liberar hormônios glicocorticóides, predominantemente cortisol em grandes mamíferos. Esses hormônios esteroides afetam o metabolismo tecidos para mobilizar recursos energéticos (MOBERG; MENCH, 2000; RILEY; CREGIER; FRASER, 2022) (Figura 1).

As respostas autonômicas e neuroendócrinas preparam o organismo para responder de maneira adequada e são respostas padrão, que ocorrem de forma similar independentemente do estressor. Em contrapartida, a resposta comportamental visa remover diretamente o estressor e proporciona ao cavalo a flexibilidade para responder apropriadamente de acordo com a natureza do estressor em questão (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017; RILEY; CREGIER; FRASER, 2022).

Nesse sentido, as respostas comportamentais ao estresse podem ser mais variadas do que as respostas fisiológicas e, embora no modelo padrão de resposta ao estresse luta e fuga sejam as respostas comportamentais que recebam maior destaque, é possível que os cavalos

adotem também reações passivas como estratégia para lidar com situações desafiadoras (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017).

As mudanças fisiológicas que compõem a resposta ao estresse podem ser mensuradas de forma não invasiva por meio de parâmetros como frequência respiratória, frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca. O monitoramento dos parâmetros cardíacos por meio de frequencímetros tornou-se popular nas últimas décadas, por aferir as alterações no batimento, e no funcionamento do sistema nervoso autônomo, especificamente no equilíbrio entre a atividade simpática e vagal (MCDUFFEE *et al.*, 2019; VON BORELL *et al.*, 2007).

A temperatura superficial também é um parâmetro de interesse, uma vez que, mudanças na temperatura da superfície estão associadas a mudanças no fluxo sanguíneo subjacente que ocorrem em resposta ao estresse, podendo ser mensuradas de forma não invasiva por meio de câmeras termográficas, ou termômetros infravermelhos (MOTA-ROJAS *et al.*, 2021; SOROKO; HOWELL, 2018; VERDUZCO-MENDOZA *et al.*, 2021).

Dentre as regiões de interesse usualmente avaliadas por meio da termografia infravermelha, destaca-se a região ocular, pois alterações na temperatura ocular e da área circundante têm sido associadas a procedimentos aversivos (MCGREEVY *et al.*, 2018; MOTA-ROJAS *et al.*, 2021). Por outro lado, embora menos utilizada, publicações recentes apontam que região auricular também pode ser informativa em contextos estressantes (MOTA-ROJAS *et al.*, 2021; VERDUZCO-MENDOZA *et al.*, 2021).

Mesmo diante da variedade de parâmetros fisiológicos que podem ser mensurados, nota-se que a avaliação da resposta ao estresse é mais robusta quando realizada a combinação de medidas fisiológicas e comportamentais (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017). Com relação a parâmetros comportamentais, a avaliação das expressões faciais merece atenção em virtude do seu potencial em refletir de forma mais confiável o estado interno do animal, quando comparado ao comportamento geral (DESCOVICH *et al.*, 2017).

Os Sistemas de Codificação de Ação Facial (FACS) fornecem uma metodologia sistemática de identificação e codificação de expressões faciais com base na musculatura facial subjacente e no movimento muscular, proporcionando uma estrutura em que, códigos designados como unidades de ação (AUs) representam a contração de um músculo facial específico, ou de um conjunto de músculos, e os movimentos faciais resultantes (LUNDBLAD *et al.*, 2021; WATHAN *et al.*, 2015). Descritores de ação (ADs) também são usados para movimentos faciais mais gerais, em que a base muscular não pode ser identificada ou é o

1 resultado de um conjunto muscular diferente (WATHAN *et al.*, 2015). O EquiFACS contém
2 todas as ações faciais que os cavalos podem produzir, e sua utilização foi bem-sucedida em
3 trabalho realizado com a finalidade de identificar expressões relevantes em equinos submetidos
4 a intervenções estressantes (LUNDBLAD *et al.*, 2021).

5 A diversidade de parâmetros usados como indicadores de estresse destaca a
6 complexidade dos efeitos que a exposição a estressores pode ter nos animais. Inclusive, em
7 condições em que o animal é exposto a múltiplos estressores ou a um único estressor
8 continuamente, possíveis efeitos prejudiciais em várias funções fisiológicas podem ocorrer.
9 Isso ocorre pois o organismo não consegue repor seus recursos biológicos, acumulando custos
10 biológicos e comprometendo o bem-estar (MCGREEVY *et al.*, 2018; MOBERG; MENCH,
11 2000).

12 Além do claro impacto que o estresse tem sobre o organismo, manejar animais
13 estressados pode ser mais arriscado, já que comportamentos relacionados ao estresse (agitação
14 e agressividade, por exemplo) podem oferecer risco para as pessoas envolvidas nos cuidados e
15 treinamento de equinos. Por estes motivos, há busca ativa na comunidade científica por
16 alternativas que possam reduzir o estresse.

17 18 2.3 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO ESTRESSE DE EQUINOS EM AMBIENTE 19 DOMÉSTICO

20
21 O conceito de enriquecimento ambiental refere-se a uma ampla gama de modificações
22 no ambiente de animais em cativeiro, ou de criação, que oferecem estimulação adequada e
23 facilitam a expressão de comportamento altamente motivado, promovendo emoções positivas
24 e melhorando o bem-estar dos animais (BOTREAU *et al.*, 2023).

25 A implementação prática do enriquecimento ambiental se dá por meio de estratégias
26 que, de forma geral, tem como objetivo aumentar a diversidade comportamental, reduzir a
27 frequência de comportamentos aberrantes, aumentar a variedade ou número de padrões
28 comportamentais típicos da espécie, aumentar a utilização positiva do ambiente e a capacidade
29 dos animais de lidar com desafios (YOUNG, 2003).

30 Categorizar o enriquecimento em diferentes grupos também é um componente chave da
31 implementação prática e pode dar uma indicação da função de cada item ou atividade. Em
32 geral, o enriquecimento pode ser subdividido em cinco categorias, que não são mutuamente

exclusivas: enriquecimento físico, enriquecimento social, enriquecimento sensorial, enriquecimento ocupacional ou cognitivo e enriquecimento alimentar (BLOOMSMITH; BRENT; SCHAPIRO, 1991; YOUNG; AZEVEDO; CIPRESTE, 2020).

O impacto de estratégias de enriquecimento ambiental em equinos especificamente, foi demonstrado por Lansade et al. (2014). Neste trabalho, foi observado que cavalos tratados com enriquecimento ambiental exibiram expressão reduzida de indicadores de estresse, apontando melhora no bem-estar. Além disso, a utilização de enriquecimento ambiental resultou em percepção mais positiva do ambiente, sugerindo diminuição dos níveis de estresse. Assim, a utilização do enriquecimento ambiental emerge como uma alternativa promissora para melhora da qualidade de vida de animais desta espécie.

2.3.1 Enriquecimento ambiental social

O enriquecimento social abrange a socialização de animais com membros da mesma espécie (coespecíficos) ou de espécies diferentes (heteroespecíficos), tanto em condições em que o contato direto é proporcionado (enriquecimento social com contato), quanto em condições em que não há contato (enriquecimento social sem contato), neste caso as interações são facilitadas através de comunicação visual, auditiva e olfativa (BAUMANS, 2005; BLOOMSMITH; BRENT; SCHAPIRO, 1991) (Figura 2).



Figura 2. Infográfico representando opções de enriquecimento ambiental social. Fonte: Elaborado pela autora com recursos do Canva, baseado em informações de Baumans (2005) e Bloomsmith, Brent e Schapiro (1991).

1 Proporcionar enriquecimento social com contato entre coespecíficos deve ser a principal
2 estratégia de enriquecimento social, uma vez que, interações sociais apropriadas entre membros
3 da mesma espécie são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e bem-estar de animais
4 sociais (BAUMANS, 2005). Nesse sentido, todas as espécies gregárias deveriam, idealmente,
5 ser mantidas em alojamento social, que consiste em espaço que permite o alojamento dos
6 indivíduos em pares ou em grupo e satisfaz as necessidades sociais dos animais por meio do
7 contato direto com coespecíficos (STEWART, 2017).

8 Em situações que exigem o alojamento individual dos animais, o enriquecimento social
9 sem contato entre coespecíficos pode ser considerado uma estratégia interessante. Neste caso,
10 o grau de contato social pode ser aumentado através da criação de canais para comunicação
11 visual, auditiva e olfativa (YOUNG, 2003) (Figura 4). Mesmo que animais nestas condições
12 não possam engajar em interações físicas normais específicas da espécie, eles ainda podem
13 permanecer conscientes da presença de coespecíficos nas proximidades e reagir aos sinais
14 sensoriais fornecidos por eles, dessa forma, as pistas sensoriais podem atuar como um substituto
15 para o contato direto (STEWART, 2017).

16 Enriquecimento social fornece fontes dinâmicas e imprevisíveis de estimulação,
17 podendo ser uma das formas mais duradouras e eficazes de enriquecimento para espécies
18 sociais (MILLS, 2010). Enquanto itens inanimados de enriquecimento são estáticos e mostram-
19 se interessantes apenas para atividades específicas, um parceiro social cria frequentemente
20 situações novas e imprevisíveis às quais o animal deve reagir, por este motivo, este pode ser
21 considerado o tipo de enriquecimento mais desafiador (BAUMANS, 2005).

22 23 2.3.1.1 Suporte e amortecimento social 24

25 Como espécie gregária, cavalos exibem algumas das habilidades sociais apontadas
26 como fundamentais para navegar em um ambiente social fluido e dinâmico (WATHAN *et al.*,
27 2015). Considerando o comportamento social de populações ferais, é possível notar que, se não
28 houvesse as pressões domésticas, os equinos viveriam em uma sociedade composta por vários
29 pequenos grupos que compartilham espaço e recursos, e aos quais a adesão permanece
30 relativamente estável ao longo do tempo (MCGREEVY, 2004; WATHAN *et al.*, 2015).

31 À vista disso, é natural que para equinos o enriquecimento social detenha grande
32 potencial, inclusive, manter cavalos em grupos é reconhecido como a forma mais adequada
33 para satisfazer necessidades físicas e comportamentais da espécie (HARTMANN;

SØNDERGAARD; KEELING, 2012). Esta informação está alinhada com evidências que apontam que mamíferos sociais compartilham um atributo distinto, descrito como suporte social, através do qual animais na companhia de membros da mesma espécie experimentam melhor bem-estar físico e psicológico (KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006; MCMILLAN, 2020).

A introdução de coespecíficos como método de enriquecimento ambiental também pode ser benéfica quando um animal enfrenta adversidades, aumentando sua capacidade de lidar com desafios, ao passo que, o suporte social possui efeitos amortecedores que mitigam o impacto negativo dos estressores sob bem-estar do indivíduo. Esse fenômeno, conhecido como amortecimento social, demonstra que a presença de um companheiro compatível tem o potencial de atenuar a resposta ao estresse e/ou permitir a recuperação mais rápida do indivíduo após um evento desafiador (KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006; RICCI-BONOT *et al.*, 2021).

O amortecimento social se dá, fisiologicamente, através da atenuação dos dois principais sistemas acionados em resposta ao estresse (sistema nervoso simpático, SNS; e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, HPA). A presença de um parceiro social pode diminuir a ativação do eixo HPA, resultando em níveis reduzidos de hormônios relacionados à resposta ao estresse, como o CRH, o ACTH e os glicocorticóides (HENNESSY; KAISER; SACHSER, 2009; RAULT, 2012). Com relação ao SNS, as evidências existentes demonstram que o suporte social pode exercer um impacto positivo no sistema cardiovascular, reduzindo a pressão arterial e a frequência cardíaca durante tarefas estressantes (MCMILLAN, 2020; RAULT, 2012).

Pesquisas emergentes sugerem que a oxitocina e os opioides endógenos podem estar por trás de alguns desses efeitos fisiológicos do amortecimento social, visto que, estes substratos participam do desenvolvimento e manutenção de laços sociais e podem atenuar as respostas fisiológicas ao estresse (HOOKER; ZOCCOLA; DICKERSON, 2021; WU, 2021). Por este motivo, são considerados uma peça-chave na elucidação das complexas associações entre suporte social e fisiologia, sendo apontados como prováveis mediadores do amortecimento social (HOSTINAR; SULLIVAN; GUNNAR, 2014; KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006).

Outros mediadores neuro-hormonais em potencial como adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina e prolactina também já foram citados na literatura, sendo em geral aceito que os efeitos de amortecimento social são provavelmente apoiados por vias neurobiológicas

múltiplas e potencialmente sobrepostas (HOSTINAR; SULLIVAN; GUNNAR, 2014; MCMILLAN, 2020).

O amortecimento social tem sido relatado em equinos tanto em situações em que o contato direto é proporcionado, quanto em situações em que não há contato (CHRISTENSEN *et al.*, 2008; RØRVANG; CHRISTENSEN, 2018; VISSER; ELLIS; VAN REENEN, 2008). No experimento conduzido por Christensen *et al.* (2008), realizado para investigar se a presença de um cavalo calmo influencia as reações de medo em cavalos inexperientes, os animais foram expostos a um estímulo repentino e assustador. Os resultados mostraram que cavalos inexperientes acompanhados de coespecíficos calmos reagiram menos ao estímulo do teste em termos de respostas comportamentais e de frequência cardíaca. Neste trabalho, os indivíduos puderam interagir e se movimentar livremente durante os testes realizados, ou seja, foi proporcionado o contato direto entre os animais. Esses resultados corroboram com os obtidos por Rørvang e Christensen (2018), em que a inclusão de um cavalo adulto habituado em grupos de cavalos jovens reduziu potencialmente as reações de medo.

Os benefícios de proporcionar parceiros sociais também foi relatado por Visser *et al.* (2008), ao avaliar cavalos jovens sendo estabulados pela primeira vez, um evento considerado estressante. Neste estudo, o alojamento em pares resultou em menor prevalência de estereotípias e demais comportamentos anormais em comparação com o alojamento individual. Além disso, os resultados demonstraram que o alojamento em pares pode contribuir para uma resposta adrenocortical mais equilibrada ao estresse, já que cavalos em estábulos individuais mostraram dessensibilização do eixo HPA em resposta a elevações de ACTH e cortisol induzidas pelo estresse. Ao alojar os animais em pares também foi proporcionando contato direto.

Já no estudo de Cooper *et al.* (2000), o aumento dos horizontes visuais reduziu significativamente padrões estabelecidos de movimentos estereotipados em cavalos estabulados, especialmente se eles proporcionassem oportunidades adicionais para ver ou interagir socialmente com cavalos vizinhos. Demonstrando que mesmo sem contato físico total, a presença de coespecíficos próximos e a facilitação de comunicação visual, olfativa e auditiva, pode ser vantajosa e reduzir respostas ao estresse.

Até mesmo o uso de recursos que imitam o contato visual com membros da mesma espécie, como espelhos, foi capaz de reduzir significativamente a incidência de estereotípias em cavalos estabulados, provavelmente por minimizar o isolamento social e/ou fornecer distração ambiental ou estímulos visuais adicionais (MCAFEE; MILLS; COOPER, 2002). O

uso de posters com a imagem de coespecíficos também foi testado recentemente, porém o efeito de amortecimento social deste tipo de recurso foi considerado inconsistente em equinos (RICCI-BONOT *et al.*, 2023). Este estudo demonstrou que o impacto do poster como potencial amortecedor social depende da natureza do evento estressante, sendo sua utilização ineficiente em contextos em que o evento estressante ocorre de forma abrupta.

A natureza do evento estressante também se mostrou relevante mesmo quando o contato físico com outro cavalo foi proporcionado. Ao investigar o impacto de diferentes fatores no amortecimento social em cavalos, Ricci-Bonot *et al.* (2021) observaram que a natureza do estímulo apresentado foi importante. Foi proposto que diante de eventos estressantes que ocorrem de forma gradativa, a presença de um companheiro pode atenuar as respostas comportamentais ao estresse durante o evento, ao passo que, diante de eventos abruptos o amortecimento pode manifestar-se apenas permitindo uma recuperação fisiológica mais rápida do indivíduo após o evento.

Mesmo diante das evidências, a utilização estratégica de parceiros sociais como enriquecimento ambiental social e as vantagens do amortecimento social em equinos tem sido pouco explorada na ciência animal, o que destaca a necessidade de novos estudos que abordem o uso dessa estratégia no manejo cotidiano de equinos.

2.3.2 Enriquecimento ambiental sensorial olfativo

Nos últimos anos a estimulação sensorial, prática que se baseia na utilização de estímulos projetados para desencadear um ou mais dos sentidos do animal, tem sido apontada como método de enriquecimento ambiental (WELLS, 2009). Embora o olfato seja uma modalidade sensorial negligenciada pela etologia aplicada e pelo bem-estar animal (NIELSEN *et al.*, 2015), pesquisas realizadas com espécies domésticas utilizando odores provenientes de animais e/ou plantas como estímulos olfativos, tem demonstrado interesse crescente no estudo do efeito da estimulação olfativa sobre o comportamento (ELLIS; WELLS, 2010; MURTAGH; FARNWORTH; BRILOT, 2020; RØRVANG; NICOVA; YNGVESSON, 2021; WILSON *et al.*, 2002).

Os estímulos olfativos podem ser apresentados de diferentes formas aos animais. De acordo com Clark e King (2008) as apresentações de odores podem ser classificadas como concentradas, semiconcentradas e dispersas. Enquanto a apresentação concentrada envolve fornecer o odor em um recipiente (pano, vasilhame e troncos de madeira), a semiconcentrada

envolve depositar o material que possui o odor dentro de uma bolsa, ou outro receptáculo semelhante, que é normalmente rasgado pelos animais, fazendo com que o odor seja dissipado pelo recinto por ação física. Já a apresentação dispersa refere-se ao preenchimento do recinto com o odor, isso pode ser feito por meio de sua aplicação em diversos itens presentes no recinto, ou aromatizando o ar através de difusores ou sprays.

Apresentações concentradas e semiconcentradas permitem que os animais tenham maior autonomia ao interagir com os estímulos olfativos, já apresentações dispersas não oferecem aos indivíduos a oportunidade de se afastar do odor, o que deve ser levado em consideração quanto forem utilizados odores que possam ser potencialmente aversivos (CLARK; KING, 2008).

2.3.2.1 Estimulação olfativa e o olfato equino

O sucesso da estimulação olfativa como método de enriquecimento ambiental pode depender da espécie sob análise (WELLS, 2009). Para equinos, uma espécie em que comunicação química é parte fundamental de sua interação social (GUARNEROS *et al.*, 2020), e que apresenta particularidades anatômicas que indicam um olfato particularmente bem desenvolvido (LANSADE; PICHARD; LECONTE, 2008), a estimulação olfativa detém potencial considerável.

O potencial de uma espécie obter informações olfativas é afetado pela estrutura nasal, assim como pelos padrões respiratórios (SASLOW, 2002). Equinos respiram exclusivamente pelo nariz, são capazes de mover grandes volumes de ar e estão entre os vertebrados terrestres com o maior número de receptores olfativos (MELLOR; BEAUSOLEIL, 2017; NIIMURA; MATSUI; TOUHARA, 2014; SASLOW, 2002). Além disso, por meio da ação de farejar são capazes intensificar a corrente de ar nas passagens nasais, o que resulta em contato mais íntimo entre odorantes e os receptores olfativos (FRASER, 2010).

Durante a inspiração, o odor transportado pelo ar entra através das narinas, que em equinos apresentam-se separadas, orientadas em direções divergentes, e possuem pelos finos e curtos que atuam na filtragem do ar. Em seguida, o ar chega as passagens nasais, que consistem em um par de cavidades nasais divididas pelo septo nasal que se estendem por 20 a 30 cm (SMITH, 2017).

As cavidades nasais são revestidas pela mucosa nasal e cobertas com um epitélio respiratório ciliado, essa mucosa inclui glândulas serosas, cujas secreções aquosas hidratam e

aquecem o ar que entra, bem como uma densa rede vascular que ajusta a temperatura à do corpo (LEBLANC, 2013). Dessa forma, as cavidades modificam as propriedades do ar inalado antes de atingir outras partes do trato respiratório, exercendo função termorreguladora.

As passagens nasais do cavalo contêm dois ossos cornetos firmemente enrolados que forçam o ar a circular sobre a maior área de superfície mucosa possível. Os cornetos dividem cada passagem nasal em meato dorsal, médio, ventral e comum (SMITH, 2017). Através do meato dorsal o ar inspirado é transferido para a área etmoidal, localizada na parte caudal da cavidade nasal. Nesta área estão localizados os cornetos etmoidais que, nesta espécie são pequenos, mas numerosos, aumentando a superfície olfativa (BUZEK *et al.*, 2022) (Figura 3).

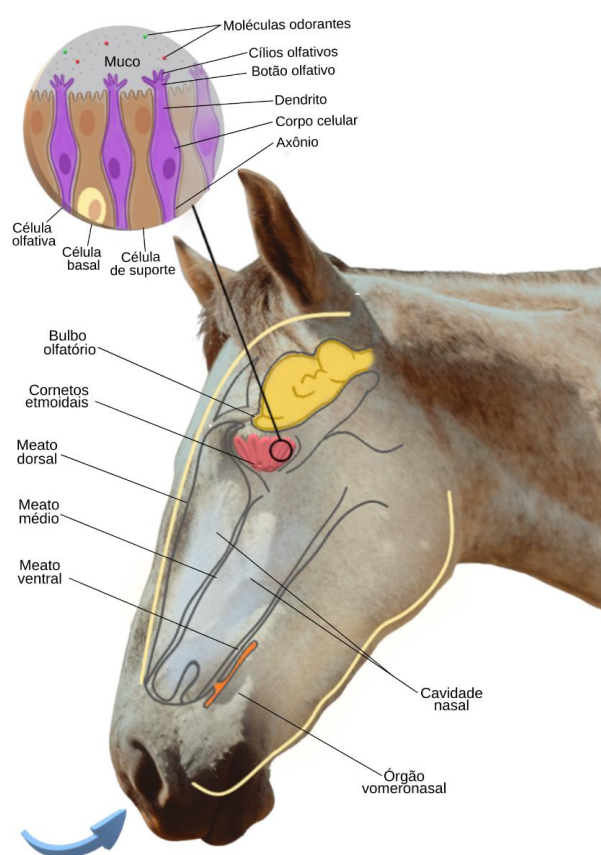


Figura 3. Visão geral de estruturas e células associadas ao sistema olfativo equino. Fonte: Elaborado pela autora, informações baseadas em Davies (2017) e Rorvang, Nielsen & McLean (2020).

De acordo com Kupke *et al.* (2016), o epitélio olfativo equino está localizado predominantemente em áreas caudodorsais dos cornetos nasais com declínio significativo na direção rostroventral, especialmente para o epitélio tipo a. Neste trabalho, foi identificado que existem dois subtipos epiteliais, designados como tipos a e b, que se assemelham aos descritos anteriormente em cães. O tipo a assemelha-se ao epitélio maduro, em contraste com o tipo b mais juvenil.

1 Em geral, o epitélio olfativo é composto por células olfativas (neurônios receptores
2 olfativos), células de suporte e células basais (KUPKE *et al.*, 2016) (Figura 3). Enquanto as
3 células de suporte circundam as células olfativas garantindo um ambiente iônico estabilizado,
4 as células basais dividem-se e diferenciam-se em células de suporte ou células olfativas
5 garantindo a renovação celular do epitélio olfativo (MEUNIER; RAMPIN, 2017; REECE;
6 ROWE, 2017).

7 As células olfativas são neurônios bipolares compostos por um corpo celular, um
8 dendrito e um axônio (KUPKE *et al.*, 2016). Na extremidade dendrítica desses neurônios há
9 um botão olfativo que dá origem a cílios olfativos que se espalham pela superfície da mucosa
10 olfativa (KUPKE *et al.*, 2016). Esses cílios são cercados por um muco que limita a toxicidade
11 do ambiente e realiza um papel importante ao tornar as moléculas odorantes lipofílicas mais
12 solúveis nesse gel hidrofílico (MEUNIER; RAMPIN, 2017), o que é essencial para que estas
13 moléculas cheguem até um receptor olfativo capaz de reconhecê-las.

14 Moléculas odorantes interagem com receptores acoplados à proteína G (GPCRs)
15 presentes na membrana dos cílios olfativos. Um odorante é capaz de ativar vários receptores, e
16 cada receptor é capaz de detectar mais de um odorante. Dessa forma, diferentes odores são
17 representados como diferentes combinações de receptores ativados. Esse mecanismo de
18 codificação combinatória por receptores é utilizado pelo sistema olfativo de mamíferos para
19 identificar e discriminar odorantes (KURIAN *et al.*, 2021; NIIMURA; MATSUI; TOUHARA,
20 2014).

21 A sinalização olfativa é iniciada quando os odorantes se ligam aos receptores, ativando
22 uma via de sinalização que produz um mensageiro intracelular. Este sinal bioquímico é
23 transduzido em sinal elétrico através da abertura de canais iônicos (KAUPP, 2010). Os
24 potenciais de ação gerados se propagam ao longo dos axônios dos neurônios olfativos que
25 formam fibras nervosas olfativas (nervo cranial 1 – CN I) e terminam no bulbo olfatório, onde
26 as extremidades terminais das fibras olfativas fazem sinapses com os dendritos das células
27 tufosas e mitrais, formando os glomérulos do bulbo olfatório (REECE *et al.*, 2015). O bulbo
28 olfatório é o primeiro local de processamento olfativo no sistema nervoso central (ROSS;
29 FLETCHER, 2019).

30 Os axônios de células mitrais e tufosas deixam o bulbo olfatório formando um grande
31 trato olfatório lateral e assim transmitem informações aos neurônios do córtex olfativo primário,
32 que redireciona a informação olfativa para diversas estruturas cerebrais envolvidas na memória,

aprendizado e emoções (hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo e córtex orbitofrontal) (LEBLANC, 2013; REECE *et al.*, 2015). Diferentemente de outras modalidades sensoriais, a informação olfativa ascende ipsilateralmente da área de detecção localizada na cavidade nasal para a área de percepção no cérebro (KOKOCIŃSKA-KUSIAK *et al.*, 2021).

Além do sistema olfatório convencional, o cavalo possui um sistema olfatório acessório (órgão vomeronasal–VNO) bem desenvolvido, sensível a partículas não voláteis e pouco voláteis, usuais em secreções corporais (BUZEK *et al.*, 2022; RØRVANG; NIELSEN; MCLEAN, 2020). O órgão vomeronasal consiste em um par de ductos de estrutura tubular, circundados por cartilagem e situados na base do septo nasal (LEE *et al.*, 2016; SINGH, 2018).

Na extremidade caudal, os ductos vomeronasais se apresentam fechados, porém na extremidade rostral se abrem nos canais incisivos, que em diversas espécies de mamíferos (inclusive cães, bovinos e suínos), conectam as cavidades nasal e oral através de aberturas no palato duro (BUZEK *et al.*, 2022; KOSTOV; ZAGORA, 2007; SINGH, 2018). No entanto, em equinos não há comunicação entre o VNO e a cavidade oral, mantendo-se apenas a conexão usual com a cavidade nasal (SINGH, 2018).

Os ductos vomeronasais são revestidos por epitélios sensoriais e não sensoriais. O epitélio vomeronasal não sensorial encontra-se na porção lateral do VNO, sendo composto por células ciliadas e células basais. Já o epitélio vomeronasal sensorial, encontra-se na porção medial do VNO sendo composto por células receptoras (neurônios sensoriais vomeronasais), células de suporte e células basais (LEE *et al.*, 2016).

As células receptoras do VNO são classificadas em dois tipos: células que expressam o receptor vomeronasal tipo 1 (V1R) ou células que expressam receptor vomeronasal tipo 2 (V2R) (YOKOSUKA, 2012). Em equinos foi observado que, as células receptoras do VNO foram positivas para proteína $G\alpha_{i2}$ (marcador de V1R), mas não para $G\alpha_o$ (marcador de V2R) (LEE *et al.*, 2016). Logo, nesta espécie, assim como observado em cães e bovinos (YOUNG; DIVISION, 2007), apenas V1R é expresso.

Após a ligação de uma molécula a um receptor V1R, a ativação da proteína G desencadeia cascatas bioquímicas que resultam na ativação do canal iônico e uma corrente de transdução despolarizante. Os potenciais de ação gerados são propagados ao longo do nervo vomeronasal até o bulbo olfatório acessório (KAUPP, 2010; MOHRHARDT *et al.*, 2018). Em espécies animais que possuem apenas V1R, as células receptoras que expressam V1R projetam axônios sobre toda a camada glomerular do bulbo olfatório acessório (YOKOSUKA, 2012). Os

1 sinais vomeronasais são processados no bulbo olfatório acessório e, em seguida, são
 2 retransmitidos diretamente para a amígdala, onde existem conexões para centros
 3 neuroendócrinos hipotalâmicos (MOHRHARDT *et al.*, 2018).

4 A ativação do órgão vomeronasal parece ser facilitada pela resposta de flehmen. Ao
 5 expressar a resposta de flehmen o cavalo estende o pescoço, levanta o nariz, abre levemente a
 6 boca e levanta o lábio superior (BEAVER, 2019) (Figura 4). Durante a expressão desse
 7 comportamento o escape de ar é reduzido, o que resulta no aumento da pressão do ar dentro da
 8 cavidade nasal, permitindo que o cavalo análise compostos pouco voláteis com maior precisão
 9 (RØRVANG; NIELSEN; MCLEAN, 2020).



22 Figura 4. Equino expressando resposta de Flehmen: (a) garanhão expressando resposta de Flehmen após
 23 estimulação olfativa com óleo essencial; (b) infográfico dos processos envolvidos durante a expressão da resposta
 24 Flehmen. Fonte: Elaborado pela autora, informações baseadas em Rorvang, Nielsen & McLean (2020).

25 Antigamente os sistemas olfativos principal e acessório era vistos como vias separadas,
 26 envolvidas na detecção de conjuntos distintos de pistas olfativas (SPEHR *et al.*, 2006).
 27 Acreditava-se que o sistema olfatório convencional era responsável exclusivamente pela
 28 percepção de odorantes voláteis, enquanto o sistema olfatório acessório era responsável pela

1 percepção de feromônios não voláteis (SCALIA; WINANS, 1975). No entanto, pesquisas mais
2 recentes apontam que os dois sistemas olfativos atuam de forma complementar (MARTÍNEZ-
3 GARCÍA *et al.*, 2009; SPEHR *et al.*, 2006).

4 5 2.3.2.2 Utilização de óleos essenciais para estimulação olfativa

6
7 Embora não sejam considerados relevantes biologicamente para muitos animais, óleos
8 essenciais e outros odores derivados de plantas podem ser capazes de melhorar o bem-estar de
9 certas espécies (WELLS, 2009). Enquanto alguns desses odores parecem induzir o relaxamento
10 e aliviar o estresse, outros parecem ter um efeito mais estimulante em animais (ELLIS; WELLS,
11 2010; GRAHAM; WELLS; HEPPEL, 2005; WON *et al.*, 2005).

12 Plantas possuem componentes químicos produzidos como parte do seu metabolismo que
13 podem ser classificados como metabólitos primários ou secundários. Os metabólitos primários,
14 como açúcares e lipídios, são encontrados em todas as plantas, enquanto metabólitos
15 secundários são encontrados apenas em alguns gêneros ou espécies, visto que, não são
16 componentes essenciais para o metabolismo das plantas (HASHEMI; DAVOODI, 2011).

17 Metabólitos secundários são utilizados como mecanismos de defesa da planta contra
18 microrganismos, insetos e herbívoros, e contribuem para os odores, sabores e cores específicos
19 (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Os óleos essenciais são compostos voláteis, formados
20 por plantas aromáticas como metabólitos secundários, geralmente extraídos por vapor ou
21 hidrodestilação (KRISHAN; NARANG, 2014).

22 A maior parte das pesquisas desenvolvidas com equinos focaram na utilização do óleo
23 essencial de lavanda. Este óleo essencial conhecido por seu efeito do tipo ansiolítico em animais
24 (DE SOUSA *et al.*, 2015), demonstrou ter o potencial de reduzir a intensidade das respostas ao
25 estresse em cavalos (FERGUSON; KLEINMAN; BROWNING, 2013; HEITMAN *et al.*, 2018;
26 POUTARAUD *et al.*, 2018). O uso deste tipo de estímulo olfativo tem o potencial de ajudar
27 animais a lidar com desafios impostos pelo ambiente doméstico e reduzir comportamentos
28 indesejados.

29 Segundo Ferguson *et al.* (2013) cavalos tratados com óleo essencial de lavanda
30 (*Lavandula angustifolia*) após resposta de estresse agudo induzida por estímulo auditivo
31 (buzina a ar), apresentaram significativa redução na frequência cardíaca. Já Heitman *et al.*

(2018) relataram que cavalos tratados com óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) durante o transporte os níveis de cortisol foram suprimidos.

No experimento conduzido por Poutaraud *et al.* (2018), os cavalos foram expostos a uma série estressores comuns no ambiente doméstico, como: isolamento social, nova área, novo objeto e aparição repentina de um objeto. Neste estudo a frequência cardíaca, posturas de alerta e defecações foram menores em cavalos tratados com lavanda (*Lavandula angustifolia*) antes dos testes de estresse. O óleo essencial de lavanda também modificou o cortisol salivar. A farmacocinética do linalol no plasma apresentou pico 20 minutos após a aplicação do óleo essencial de lavanda, confirmando assim o seu efeito. Um diferencial deste trabalho foi a diluição do óleo essencial em óleo vegetal e a aplicação com auxílio de um roll-on ao redor das narinas dos animais tratados. Do ponto de vista do enriquecimento ambiental, esse tipo de aplicação é questionável, não constituindo uma modificação no ambiente em si.

Em cavalos que não foram submetidos a um estressor externo, Baldwin *et al.* (2018) observaram que o uso do óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) aumentou o componente parassimpático da variabilidade da frequência cardíaca. Porém, este efeito não se manteve após a remoção do estímulo, denotando que seu uso deve ser considerado como uma solução de curto prazo. Nesse mesmo trabalho foi testado o óleo essencial de camomila (*Matricaria Recutita*), que não demonstrou efeito consistente de relaxamento no sistema nervoso autônomo.

Diferentemente dos demais estudos, em que o foco era testar a capacidade dos óleos essenciais de promover o relaxamento e aliviar o estresse, Rørvang *et al.* (2021) testaram o olfato de equinos, apresentando odores dos seguintes óleos: laranja (*Citrus sinensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), cedro (*Cedrus*) e lavanda (*Lavandula angustifolia*). Os resultados demonstraram que os cavalos foram capazes de detectar e distinguir os quatro odores. Cavalos jovens cheiram cedro por mais tempo do que cavalos velhos, e éguas prenhas cheiraram menos lavanda do que éguas não prenhas. Além disso, os animais mostraram maior interesse pelo óleo essencial de hortelã-pimenta, que evocou maior investigação. Neste trabalho, os comportamentos indicativos de aversão foram baixos.

Informações de extrema relevância foram trazidas por Rørvang *et al.* (2021) quanto a escolha e uso de óleos essenciais como enriquecimento olfativo, pois indica baixa aversão de equinos em relação a estes odores, ainda assim destacando que alguns deles podem ser mais ou menos adequados de acordo com a idade e o estado fisiológico. Outro ponto que merece

destaque é a forma de apresentação do estímulo aos animais, pois a apresentação concentrada utilizada permitiu que fosse observado o interesse dos animais em relação aos odores. Isso contrasta com a maioria dos estudos na literatura, que empregaram apresentações dispersas (BALDWIN; CHEA, 2018; FERGUSON; KLEINMAN; BROWNING, 2013; HEITMAN *et al.*, 2018; KOSIARA; HARRISON, 2021).

Embora os resultados publicados sejam promissores ainda existem lacunas relacionadas a esta área do conhecimento, e estudos realizados em diferentes contextos relacionados ao ambiente doméstico podem trazer um leque maior de possibilidades com relação a utilização do enriquecimento olfativo com odores à base de plantas.

REFERÊNCIAS

- BALDWIN, A. L.; CHEA, I. Effect of Aromatherapy on Equine Heart Rate Variability. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 46–50, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.213>>.
- BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. **ILAR Journal**, v. 46, n. 2, p. 162–170, 2005.
- BEAVER, B. V. **Equine behavioral medicine**. [s.l.: s.n.]1–397 p.
- BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617–633, 1994.
- BLOOMSMITH, M. A.; BRENT, L. Y.; SCHAPIRO, S. J. Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates. **Laboratory Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 372–377, 1991.
- BOMBAIL, V. The Role of Olfaction in Relation to Stress and Fear. *Em*: BIRTE LINDSTRØM NIELSEN. **Olfaction in Animal Behaviour and Welfare**. [s.l.] CABI Publishing, 2017. p. 136–150.
- BOTREAU, R.; LESIMPLE, C.; BRUNET, V.; VEISSIER, I. Environmental enrichment in ruminants and equines. **European Union Reference Centre for Animal Welfare**, v. 1, n. 1, p. 24, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.5281/zenodo.7685132>>.
- BUDZYŃSKA, M. Stress reactivity and coping in horse adaptation to environment. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 8, p. 935–941, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.05.010>>.
- BUZEK, A.; SERWAŃSKA-LEJA, K.; ZAWORSKA-ZAKRZEWSKA, A.; KASPROWICZ-POTOCKA, M. The Shape of the Nasal Cavity and Adaptations to Sniffing in the Dog (*Canis familiaris*) Compared to Other Domesticated Mammals: A Review Article. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2022.
- CEBALLOS, M. C.; SANT’ANNA, A. C. Evolução da ciência do bem-estar animal: Uma breve revisão sobre aspectos conceituais e metodológicos. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 16, n. August, p. 1, 2018.

- 1 CHRISTENSEN, J. W.; MALMKVIST, J.; NIELSEN, B. L.; KEELING, L. J. Effects of a calm
2 companion on fear reactions in naïve test horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 1, p.
3 46–50, 2008.
- 4 CLARK, F.; KING, A. J. A Critical Review of Zoo-based Olfactory Enrichment. *Em*: HURST,
5 J. L.; BEYNON, R. J.; ROBERTS, S. C.; WYATT, T. D. **Chemical Signals in Vertebrates**
6 **11**. [s.l.] Springer, 2008. p. 391–398.
- 7 COOPER, J. J.; ALBENTOSA, M. J. Behavioural adaptation in the domestic horse: Potential
8 role of apparently abnormal responses including stereotypic behaviour. **Livestock Production**
9 **Science**, v. 92, n. 2 SPEC. ISS., p. 177–182, 2005.
- 10 COOPER, J. J.; MCDONALD, L.; MILLS, D. S. The effect of increasing visual horizons on
11 stereotypic weaving: Implications for the social housing of stabled horses. **Applied Animal**
12 **Behaviour Science**, v. 69, n. 1, p. 67–83, 2000.
- 13 DAVIES, Z. **Equine Science**. 3rd. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2017. 480 p.
- 14 DE SOUSA, D. P.; DE ALMEIDA SOARES HOCAYEN, P.; ANDRADE, L. N.;
15 ANDREATINI, R. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal
16 models. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18620–18660, 2015.
- 17 DESCOVICH, K. A.; WATHAN, J.; LEACH, M. C.; BUCHANAN-SMITH, H. M.;
18 FLECKNELL, P.; FARNINGHAM, D.; VICK, S. J. Facial expression: An under-utilized tool
19 for the assessment of welfare in mammals. **Altex**, v. 34, n. 3, p. 409–429, 2017.
- 20 EGITO, A. A.; MCMANUS, C.; ALBUQUERQUE, M.S.M. SERENO, F. P. T. S.; SANTOS,
21 S. A.; PAIVA, S. R.; MARIANTE, A. S. Caracterização genética. *Em*: SANTOS, S. A.; SALIS,
22 S. M.; COMASTRI FILHO, J. A. **Cavalo Pantaneiro: rústico por natureza**. [s.l.] Brasília
23 DF: Embrapa SPI, 2016. p. 233–257.
- 24 ELLIS, S. L. H.; WELLS, D. L. The influence of olfactory stimulation on the behaviour of cats
25 housed in a rescue shelter. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 123, n. 1–2, p. 56–62, 2010.
- 26 FERGUSON, C. E.; KLEINMAN, H. F.; BROWNING, J. Effect of Lavender Aromatherapy
27 on Acute-Stressed Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 67–69, 2013.
28 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.014>>.
- 29 FRASER, A. F. **The Behaviour and Welfare of the Horse**. 2. ed. [s.l.] CABI Publishing, 2010.
30 270 p.

- 1 GRAHAM, L.; WELLS, D. L.; HEPPER, P. G. The influence of olfactory stimulation on the
2 behaviour of dogs housed in a rescue shelter. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 91, n. 1–
3 2, p. 143–153, 2005.
- 4 GUARNEROS, M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, O.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.; ARTEAGA, L. The
5 underexplored role of chemical communication in the domestic horse, *Equus caballus*. **Journal**
6 **of Veterinary Behavior**, v. 38, p. 89–95, 2020.
- 7 GUILLAUME, D.; MOUSSU, C.; DE GEOFFROY, F.; CHESNEAU, D.; KELLER, M.
8 Olfactory stimulation or inhibition of sexual behavior of stallions in non-breeding season.
9 **Physiology and Behavior**, v. 186, p. 1–9, 2018. Disponível em:
10 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.12.031>>.
- 11 HARTMANN, E.; SØNDERGAARD, E.; KEELING, L. J. Keeping horses in groups: A
12 review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 136, n. 2–4, p. 77–87, 2012. Disponível em:
13 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.004>>.
- 14 HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health
15 promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 3, p. 169–
16 180, 2011.
- 17 HAUSBERGER, M.; LESIMPLE, C.; HENRY, S. Detecting welfare in a non-verbal species:
18 Social/cultural biases and difficulties in horse welfare assessment. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021.
- 19 HEITMAN, K.; RABQUER, B.; HEITMAN, E.; STREU, C.; ANDERSON, P. The Use of
20 Lavender Aromatherapy to Relieve Stress in Trailered Horses. **Journal of Equine Veterinary**
21 **Science**, v. 63, p. 8–12, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.12.008>>.
- 22 HENNESSY, M. B.; KAISER, S.; SACHSER, N. Social buffering of the stress response:
23 Diversity, mechanisms, and functions. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 4, p. 470–
24 482, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.06.001>>.
- 25 HOOKER, E. D.; ZOCCOLA, P. M.; DICKERSON, S. S. Toward a biology of social support.
26 *Em: The Oxford Handbook of Positive Psychology*. [s.l.] Oxford University Press, 2021. p.
27 659–668.
- 28 HOSTINAR, C. E.; SULLIVAN, R. M.; GUNNAR, M. R. Psychobiological mechanisms
29 underlying the social buffering of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: A review of

- 1 animal models and human studies across development. **Psychological Bulletin**, v. 140, n. 1, p.
2 256–282, 2014.
- 3 HYYPPÄ, S. Endocrinal responses in exercising horses. **Livestock Production Science**, v. 92,
4 n. 2 SPEC. ISS., p. 113–121, 2005.
- 5 KAUPP, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities.
6 **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 188–200, 2010.
- 7 KIKUSUI, T.; WINSLOW, J. T.; MORI, Y. Social buffering: Relief from stress and anxiety.
8 **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1476, p.
9 2215–2228, 2006.
- 10 KOKOCIŃSKA-KUSIAK, A.; WOSZCZYŁO, M.; MIKOLAJ, Z.; MACIOCHA, J.;
11 BARŁOWSKA, K. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical
12 Applications. **Animals**, v. 11, p. 2463, 2021.
- 13 KÖNIG, U.; VISSER, E. K.; HALL, C. Indicators of stress in equitation. **Applied Animal**
14 **Behaviour Science**, v. 190, p. 43–56, 2017. Disponível em:
15 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2017.02.018>>.
- 16 KOSIARA, S.; HARRISON, A. P. The Effect of Aromatherapy on Equine Facial Expression,
17 Heart Rate, Respiratory Tidal Volume and Spontaneous Muscle Contractures in M. Temporalis
18 and M. Cleidomastoideus. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, n. 02, p. 87–103,
19 2021.
- 20 KOSTOV, D. L.; ZAGORA, S. Vomeronasal organ in domestic animals. **Bulgarian Journal**
21 **of Veterinary Medicine**, p. 53–57, 2007.
- 22 KRISHAN, G.; NARANG, A. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach.
23 **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 1, n. 4, p. 156–162, 2014.
- 24 KUPKE, A.; WENISCH, S.; FAILING, K.; HERDEN, C. Intranasal location and
25 immunohistochemical characterization of the equine olfactory epithelium. **Frontiers in**
26 **Neuroanatomy**, v. 10, n. OCT, p. 1–17, 2016.
- 27 KURIAN, S. M.; NARESSI, R. G.; MANOEL, D.; BARWICH, A. S.; MALNIC, B.;
28 SARAIVA, L. R. Odor coding in the mammalian olfactory epithelium. **Cell and Tissue**
29 **Research**, v. 383, n. 1, p. 445–456, 2021.

- 1 LANSADE, L.; PICHARD, G.; LECONTE, M. Sensory sensitivities: Components of a horse's
2 temperament dimension. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 3–4, p. 534–553,
3 2008.
- 4 LANSADE, L.; VALENCHON, M.; FOURY, A.; NEVEUX, C.; COLE, S. W.; LAYÉ, S.;
5 CARDINAUD, B.; LÉVY, F.; MARIE, M.; MOISAN, M.-P. Behavioral and transcriptomic
6 fingerprints of an enriched environment in horses (*Equus caballus*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p.
7 1–19, 2014.
- 8 LEBLANC, M. A. **The Mind of the Horse: An Introduction to Equine Cognition**. [s.l.]
9 Harvard University Press, 2013. 464 p.
- 10 LEE, K. H.; PARK, C.; KIM, J.; MOON, C.; AHN, M.; SHIN, T. Histological and lectin
11 histochemical studies of the vomeronasal organ of horses. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 361–
12 369, 2016.
- 13 LUNDBLAD, J.; RASHID, M.; RHODIN, M.; ANDERSEN, P. H. Effect of transportation and
14 social isolation on facial expressions of healthy horses. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, p. 1–17,
15 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.06.001>>.
- 16 MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; MARTÍNEZ-RICÓS, J.; AGUSTÍN-PAVÓN, C.; MARTÍNEZ-
17 HERNÁNDEZ, J.; NOVEJARQUE, A.; LANUZA, E. Refining the dual olfactory hypothesis:
18 Pheromone reward and odour experience. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 2, p. 277–
19 286, 2009.
- 20 MCAFEE, L. M.; MILLS, D. S.; COOPER, J. J. The use of mirrors for the control of stereotypic
21 weaving behaviour in the stabled horse. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 78, n. 2–4, p.
22 159–173, 2002.
- 23 MCDUFFEE, L.; MILLS, M.; MCNIVEN, M.; MONTELPARE, W. Establishing statistical
24 stability for heart rate variability in horses. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 32, p. 30–35,
25 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2019.05.003>>.
- 26 MCGREEVY, P.; CHRISTENSEN, J. W.; BORSTEL, U. K. von; MCLEAN, A. **Equitation**
27 **Science**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2018. 416 p.
- 28 MCGREEVY, P. D. **Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists**. [s.l.]
29 Saunders, An Imprint of Elsevier Limited, 2004. 366 p.

- 1 MCMANUS, C. M.; SANTOS, S. A.; DA SILVA, J. A.; LOUVANDINI, H.; DE ABREU, U.
2 G. P.; SERENO, J. R. B.; SILVA, A. da M. Body indices for the pantaneiro horse. **Brazilian**
3 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 362–370, 2008.
- 4 MCMANUS, C.; SANTOS, S. A.; PAIVA, S. R.; CANOZZI, M. E. A.; NETO, J. B.;
5 MARQUES, M. C. de A.; ABREU, U. G. P. de. Estudo populacional dos cavalos Pantaneiros
6 resgistrados no Brasil. *Em*: SANTOS, S. A.; SALIS, S. M.; COMASTRI FILHO, J. A. **Cavalo**
7 **Pantaneiro: rústico por natureza**. [s.l.] Brasília DF: Embrapa SPI, 2016. p. 109–122.
- 8 MCMILLAN, F. D. The Mental Health and Well-being Benefits of Social Contact and Social
9 Support in Animals. *Em*: **Mental Health and Well-being in Animals**. [s.l.] CABI Publishing,
10 2020. p. 96–110.
- 11 MELLOR, D. J.; BEAUSOLEIL, N. J. Equine welfare during exercise: An evaluation of
12 breathing, breathlessness and bridles. **Animals**, v. 7, n. 6, 2017.
- 13 MELLOR, D. J.; BEAUSOLEIL, N. J. Moving Beyond a Problem-based Focus on Poor Animal
14 Welfare Toward Creating Opportunities to Have Positive Welfare Experiences. *Em*: **Mental**
15 **Health and Well-being in Animals**. 2nd. ed. [s.l.] CABI Publishing, 2020. p. 50–66.
- 16 MELLOR, D. J.; BEAUSOLEIL, N. J.; LITTLEWOOD, K. E.; MCLEAN, A. N.;
17 MCGREEVY, P. D.; JONES, B.; WILKINS, C. The 2020 five domains model: Including
18 human–animal interactions in assessments of animal welfare. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1–24,
19 2020.
- 20 MEUNIER, N.; RAMPIN, O. The Nuts and Bolts of Olfaction. *Em*: NIELSEN, B. L. **Olfaction**
21 **in Animal Behaviour and Welfare**. [s.l.] CABI Publishing, 2017. p. 1–15.
- 22 MILLS, D. S. **The Encyclopedia of Applied Animal Behaviour and Welfare**. [s.l.] CABI
23 Publishing, 2010. 750 p.
- 24 MILLS, D. S.; RICCI-BONOT, C.; HALL, S. S. Mental Health Issues in the Horse. *Em*: **Mental**
25 **Health and Well-being in Animals**. 2. ed. [s.l.] CABI Publishing, 2020. p. 384.
- 26 MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **THE BIOLOGY OF ANIMAL STRESS: Basic Principles**
27 **and Implications for Animal Welfare**. [s.l.] CABI Publishing, 2000. 384 p.
- 28 MOHRHARDT, J.; NAGEL, M.; FLECK, D.; BEN-SHAUL, Y.; SPEHR, M. Signal detection
29 and coding in the accessory olfactory system Abbreviated. **Chemical Senses**, v. 43, n. 9, p.
30 667–695, 2018.

- 1 MOTA-ROJAS, D.; PEREIRA, A. M. F.; WANG, D.; MARTÍNEZ-BURNES, J.; GHEZZI,
2 M.; HERNÁNDEZ-AVALOS, I.; LENDEZ, P.; MORA-MEDINA, P.; CASAS, A.; OLMOS-
3 HERNÁNDEZ, A.; DOMÍNGUEZ, A.; BERTONI, A.; GERALDO, A. de M. Clinical
4 applications and factors involved in validating thermal windows used in infrared thermography
5 in cattle and river Buffalo to assess health and productivity. **Animals**, v. 11, n. 8, 2021.
- 6 MURTAGH, K.; FARNWORTH, M. J.; BRILOT, B. O. The scent of enrichment: Exploring
7 the effect of odour and biological salience on behaviour during enrichment of kennelled dogs.
8 **Applied Animal Behaviour Science**, v. 223, p. 104917, 2020.
- 9 NIELSEN, B. L.; JEZIERSKI, T.; BOLHUIS, J. E.; AMO, L.; ROSELL, F.; OOSTINDJER,
10 M.; CHRISTENSEN, J. W.; MCKEEGAN, D.; WELLS, D. L.; HEPPEL, P. Olfaction: An
11 overlooked sensory modality in applied ethology and animal welfare. **Frontiers in Veterinary**
12 **Science**, v. 2, n. DEC, p. 1–3, 2015.
- 13 NIIMURA, Y.; MATSUI, A.; TOUHARA, K. Erratum: Extreme expansion of the olfactory
14 receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene
15 groups in 13 placental mammals (Genome Research (2015) 25 (926)). **Genome Research**, v.
16 24, n. 9, p. 1485–1496, 2014.
- 17 POUTARAUD, A.; GUILLOTEAU, L.; GROS, C.; LOBSTEIN, A.; MEZIANI, S.; STEYER,
18 D.; MOISAN, M. P.; FOURY, A.; LANSADE, L. Lavender essential oil decreases stress
19 response of horses. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 2, p. 539–544, 2018.
20 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-017-0681-8>>.
- 21 RAULT, J. L. Friends with benefits: Social support and its relevance for farm animal welfare.
22 **Applied Animal Behaviour Science**, v. 136, n. 1, p. 1–14, 2012. Disponível em:
23 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.002>>.
- 24 REECE, W. O.; ERICKSON, H. H.; GOFF, J. P.; UEMURA, E. E. **Dukes' Physiology of**
25 **Domestic Animals**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2015. 760 p.
- 26 REECE, W. O.; ROWE, E. W. **Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals**.
27 [s.l.] Wiley-Blackwell, 2017. 572 p.
- 28 RICCI-BONOT, C.; ROMERO, T.; NICOL, C.; MILLS, D. Social buffering in horses is
29 influenced by context but not by the familiarity and habituation of a companion. **Scientific**
30 **Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021. Disponível em: <[https://doi.org/10.1038/s41598-021-](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88319-z)
31 [88319-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-88319-z)>.

- 1 RICCI-BONOT, C.; ROMERO, T.; NICOL, C.; MILLS, D. S. An inconsistent social buffering
2 effect from a static visual substitute in horses (*Equus caballus*): A pilot study. **Journal of**
3 **Veterinary Behavior**, v. 67, p. 8–16, 2023. Disponível em:
4 <<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2023.07.004>>.
- 5 RILEY, C. B. ; CREGIER, S. E. ;; FRASER, A. F. (Ed.). **Fraser's the Behaviour and Welfare**
6 **of the Horse**. [s.l.] CABI Publishing, 2022. 245 p.
- 7 RØRVANG, M. V.; CHRISTENSEN, J. W. Attenuation of fear through social transmission in
8 groups of same and differently aged horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 209, p.
9 41–46, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.10.003>>.
- 10 RØRVANG, M. V.; NICOVA, K.; YNGVESSON, J. Testing olfaction in equids : Age and
11 gestational stage affects olfactory interest. **Research Square**, p. 0–33, 2021.
- 12 RØRVANG, M. V.; NIELSEN, B. L.; MCLEAN, A. N. Sensory Abilities of Horses and Their
13 Importance for Equitation Science. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. September, p. 1–
14 17, 2020.
- 15 ROSS, J. M.; FLETCHER, M. L. Aversive learning-induced plasticity throughout the adult
16 mammalian olfactory system: insights across development. **Journal of Bioenergetics and**
17 **Biomembranes**, v. 51, n. 1, p. 15–27, 2019.
- 18 SANTOS, S. A.; CARVALHO DA SILVA, L. A.; SOARES DE PAULA, A. C. C. S. M.;
19 GARCIA, J. B. Uso do ambiente e hábito alimentar. *Em*: SANTOS, S. A.; SALIS, S. M.;
20 COMASTRI FILHO, J. A. **Cavalo Pantaneiro: rústico por natureza**. [s.l.] Brasília DF:
21 Embrapa SPI, 2016a. p. 313–345.
- 22 SANTOS, S. A.; DA SILVA, G. A.; DE REZENDE, A. S. C.; DE FARIA, D. A.; SORIANO,
23 B. M.; MCMANUS, C. Heat tolerance in Pantaneiro horses subjected to different exercise
24 regimes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 57, 2022.
- 25 SANTOS, S. A.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. D. S.; SERENO, J. R. B.; SILVA, J. A. da;
26 EGITO, A. A. do; ABREU, U. G. P. de; FILHO, J. A. C.; LARA, M. A. Estratégias de
27 conservação in situ do cavalo Pantaneiro. n. Corumbá: EMBRAPA, p. 29p, 2003.
- 28 SANTOS, S. A.; MCMANUS, C.; PAIVA, S. R.; MARIANTE, A. D. S.; SILVA, J. A. da;
29 EGITO, A. A. do; FILHO, J. A. C.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; ABREU, U. G. P. de.

- 1 Conservação e seleção. *Em*: SANTOS, S. A.; SALIS, S. M.; COMASTRI FILHO, J. A. **Cavalo**
2 **pantaneiro : rústico por natureza**. [s.l.] Brasília DF: Embrapa SPI, 2016b. p. 539–571.
- 3 SANTOS, S. A.; MCMANUS, C.; PAULA, F. De; ANÍBAL, J.; FILHO, C. Evolução
4 demográfica do cavalo Pantaneiro nos municípios de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.
5 **SIMPAN**, p. 138–141, 2013.
- 6 SANTOS, S. A.; PAIVA, S. R.; COMASTRI FILHO, J. A.; RAMOS, A. F.; JULIANO, R. S.;
7 LIMA, M. F. N. T. de; MCMANUS, C.; PÉRES, I. A. H. F. S.; ARAÚJO, A. M. de. Cavalo
8 Pantaneiro: uma raça multifuncional moldada pela natureza e pelo homem. *Em*: RIBEIRO, N.
9 L.; MEDEIROS, G. R.; GOMES, VAN L. C.; NASCIMENTO, G. V.; SANTOS, S. G. C. G.
10 **Cavalos & Jumentos do Brasil: Raças e ecótipos**. [s.l.] Campina Grande, PB : Instituto
11 Nacional do Semiárido, 2023. p. 109–136.
- 12 SANTOS, S. A.; PAIVA, S. R.; FILHO, J. A. C.; RAMOS, A. F.; JULIANO, R. S.;
13 NOGUEIRA, M. F.; PÉRES, I. A. H. F. S. Histórico, vivências e desafios do núcleo de
14 conservação do cavalo Pantaneiro of the conservation nuclei. **Revista Científica de Produção**
15 **Animal**, v. 22, n. 2, p. 67–72, 2020.
- 16 SANTOS, S. A.; TAKAHASHI, F. Pantaneiro, um cavalo de valor extraordinário: raça única e
17 multifuncional, adaptada aos extremos do ambiente, tem ótimo desempenho na lida do gado,
18 transporte, passeios e provas esportivas. **Ciência Pantanal**, v. 06, p. 12–15, 2021.
- 19 SARRAFCHI, A.; BLOKHUIS, H. J. Equine stereotypic behaviors: Causation, occurrence, and
20 prevention. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 8, n. 5,
21 p. 386–394, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2013.04.068>>.
- 22 SASLOW, C. A. Understanding the perceptual world of horses. **Applied Animal Behaviour**
23 **Science**, v. 78, n. 2–4, p. 209–224, 2002.
- 24 SCALIA, F.; WINANS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory
25 olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 161, n. 1, p. 31–55, 1975.
- 26 SINGH, B. **Dyce, Sack, and Wensing's Textbook of Veterinary Anatomy**. [s.l.] Saunders,
27 2018. 872 p.
- 28 SMITH, L. C. R. Surgical access to the nasal cavities in the horse. **Equine Veterinary**
29 **Education**, v. 29, n. 2, p. 70–71, 2017.

- 1 SOROKO, M.; HOWELL, K. Infrared Thermography: Current Applications in Equine
2 Medicine. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 60, p. 90- 96.e2, 2018. Disponível em:
3 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.002>>.
- 4 SPEHR, M.; SPEHR, J.; UKHANOV, K.; KELLIHER, K. R.; LEINDERS-ZUFALL, T.;
5 ZUFALL, F. Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory
6 olfactory systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 13, p. 1476–1484, 2006.
- 7 ŠPINKA, M. Animal agency, animal awareness and animal welfare. **Animal Welfare**, v. 28,
8 n. 1, p. 11–20, 2019.
- 9 ŠPINKA, M.; WEMELSFELDER, F. Environmental challenge and animal agency. **Animal**
10 **welfare**, p. 39–55, 2018.
- 11 STEWART, K. L. **Experimental Variables**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. 75–92 p.
- 12 VERDUZCO-MENDOZA, A.; BUENO-NAVA, A.; WANG, D.; MARTÍNEZ-BURNES, J.;
13 OLMOS-HERNÁNDEZ, A.; CASAS, A.; DOMÍNGUEZ, A.; MOTA-ROJAS, D.
14 Experimental applications and factors involved in validating thermal windows using infrared
15 thermography to assess the health and thermostability of laboratory animals. **Animals**, v. 11, n.
16 12, 2021.
- 17 VISSER, E. K.; ELLIS, A. D.; VAN REENEN, C. G. The effect of two different housing
18 conditions on the welfare of young horses stabled for the first time. **Applied Animal Behaviour**
19 **Science**, v. 114, n. 3–4, p. 521–533, 2008.
- 20 VITALE, V.; BALOCCHI, R.; VARANINI, M.; SGORBINI, M.; MACERATA, A.;
21 SIGHIERI, C.; BARAGLI, P. The effects of restriction of movement on the reliability of heart
22 rate variability measurements in the horse (*Equus caballus*). **Journal of Veterinary Behavior:**
23 **Clinical Applications and Research**, v. 8, n. 5, p. 400–403, 2013. Disponível em:
24 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2013.02.003>>.
- 25 VON BORELL, E.; LANGBEIN, J.; DESPRÉS, G.; HANSEN, S.; LETERRIER, C.;
26 MARCHANT-FORDE, J.; MARCHANT-FORDE, R.; MINERO, M.; MOHR, E.; PRUNIER,
27 A.; VALANCE, D.; VEISSIER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation
28 of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - A review. **Physiology and**
29 **Behavior**, v. 92, n. 3, p. 293–316, 2007.

- 1 WATHAN, J.; BURROWS, A. M.; WALLER, B. M.; MCCOMB, K. EquiFACS: The equine
2 facial action coding system. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–35, 2015.
- 3 WELLS, D. L. Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review.
4 **Applied Animal Behaviour Science**, v. 118, n. 1–2, p. 1–11, 2009.
- 5 WILSON, S. C.; MITLÖHNER, F. M.; MORROW-TESCH, J.; DAILEY, J. W.; MCGLONE,
6 J. J. An assessment of several potential enrichment devices for feedlot cattle. **Applied Animal
7 Behaviour Science**, v. 76, n. 4, p. 259–265, 2002.
- 8 WON, C. L.; JEONG, M. S.; CHUN, I. L.; HYEONG, B. P.; BUM, C. L. Stimulative and
9 sedative effects of essential oils upon inhalation in mice. **Archives of Pharmacal Research**, v.
10 28, n. 7, p. 770–774, 2005.
- 11 WU, A. Social buffering of stress – Physiological and ethological perspectives. **Applied
12 Animal Behaviour Science**, v. 239, n. May 2020, p. 105325, 2021. Disponível em:
13 <<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105325>>.
- 14 YOKOSUKA, M. Histological properties of the glomerular layer in the mouse accessory
15 olfactory Bulb. **Experimental Animals**, v. 61, n. 1, p. 13–24, 2012.
- 16 YOUNG, J. M.; DIVISION, B. J. T. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow,
17 but expanded in opossum. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 5, p. 212–215, 2007.
- 18 YOUNG, R. J. **Environmental Enrichment for Captive Animals**. [s.l.] Wiley-Blackwell,
19 2003. 228 p.
- 20 YOUNG, R. J.; AZEVEDO, C. S. de; CIPRESTE, C. F. Environmental enrichment: the creation
21 of opportunities for informal learning. *Em: Zoo animal learning and training*. [s.l.] John
22 Wiley & Sons Ltd., 2020. p. 101–118.

**ARTIGO 1: ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOCIAL REDUZ EXPRESSÕES
FACIAIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS A REPOSTA AO
ESTRESSE DE CURTA DURAÇÃO EM EQUINOS.**

Enriquecimento ambiental social reduz expressões faciais e parâmetros fisiológicos relacionados a resposta ao estresse de curta duração em equinos

Ana Caroline Bini de Lima ¹ * e Viviane Maria Oliveira dos Santos ¹

Programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brasil;

*Correspondência: carolinebini@hotmail.com

Resumo: O trabalho foi realizado para avaliar a capacidade do enriquecimento ambiental social sem contato facilitar o amortecimento social, e caracterizar a experiência emocional de cavalos submetidos ao manejo de contenção em tronco por meio da avaliação de parâmetros fisiológicos e expressões faciais. Foram avaliados equinos da raça Pantaneiro (n=11) em delineamento crossover com tratamento EAS (Enriquecimento ambiental social durante manejo de contenção em tronco) e tratamento IS (Isolamento social durante manejo de contenção em tronco). Parâmetros fisiológicos e expressões faciais (EquiFACS) foram avaliados ao longo dos 24 minutos que os animais permaneceram contidos. Quando os cavalos foram submetidos ao manejo enquanto em isolamento social (IS) a frequência cardíaca, respiratória e temperatura ocular foram maiores ($p<0,05$) do que quando acompanhados por um coespecífico (EAS). A frequência de expressões faciais associadas a resposta ao estresse como *dilatador de narinas* (AD38), *levantador de sobrancelha interna* (AU101), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1), *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104), também foram maiores ($p<0,05$) para IS em comparação com EAS. A avaliação das expressões faciais em conjunto com parâmetros fisiológicos proporciona resultados robustos de que, durante essa intervenção, os animais experimentaram estado emocional de valência negativa/aversiva e nível de agitação elevado. Nesse contexto, o enriquecimento ambiental social sem contato é capaz de facilitar o amortecimento social, resultando em redução de parâmetros indicadores de estresse, associados a alta agitação e valência negativa.

Palavras-chave: ação facial; amortecimento social; bem-estar equino; coespecífico; suporte social.

1. Introdução

Equinos enfrentam desafios inerentes ao ambiente doméstico, sendo constantemente submetidos a procedimentos e manejos que podem influenciar seu estado emocional ao limitar a expressão de comportamentos naturais da espécie. O uso de troncos de contenção, em geral construídos de postes sólidos é usual em manejos realizados para facilitar cuidados veterinários, palpação retal, exame ultrassonográfico, e outros procedimentos reprodutivos e sanitários [1]. Porém, esse tipo de intervenção impõe restrição de movimentos considerável, que, para uma espécie cuja principal estratégia de defesa é a fuga, pode ser aversiva até mesmo para animais habituados, e induzir uma resposta ao estresse de curta duração [2,3].

Embora pesquisas voltadas ao bem-estar animal tenham tradicionalmente focado na redução da ocorrência de experiências aversivas, pois podem resultar em condições pobres de bem-estar, alguns procedimentos potencialmente estressantes são inerentes às boas práticas de criação [4]. É o caso do manejo de contenção que, apesar de caracterizar um evento desafiador para equinos, facilita os cuidados e manutenção da saúde animal. Nesse contexto, se faz necessário a busca por alternativas que auxiliem cavalos a lidarem com desafios aos quais são rotineiramente expostos e promovam redução do estresse durante as intervenções.

A introdução de coespecífico, ou seja, um indivíduo da mesma espécie como método de enriquecimento ambiental social pode ser benéfica quando o animal enfrenta adversidades, pois o suporte social possui efeitos amortecedores que mitigam o impacto negativo dos estressores sob o bem-estar do indivíduo. Esse fenômeno conhecido como amortecimento social demonstra que a presença de um companheiro compatível tem o potencial

de atenuar a resposta ao estresse e/ou permitir a recuperação mais rápida do indivíduo após um evento desafiador [5,6].

O enriquecimento social abrange a socialização de animais com coespecíficos ou heteroespecíficos, tanto em condições em que o contato direto é proporcionado (enriquecimento social com contato), quanto em condições em que não há contato (enriquecimento social sem contato), neste caso sendo as interações facilitadas através de comunicação visual, auditiva e olfativa [7,8]. O enriquecimento social sem contato pode ser uma estratégia interessante pois, mesmo que animais não possam engajar em interações físicas normais específicas da espécie, eles ainda podem permanecer conscientes da presença de coespecíficos nas proximidades e reagir aos sinais sensoriais fornecidos por eles, assim as pistas sensoriais podem atuar como alternativa para o contato direto [9].

Para avaliar se a companhia de um coespecífico é capaz de promover o amortecimento social, é necessário o uso parâmetros indicadores de estresse. As mudanças fisiológicas que compõem a resposta ao estresse podem ser mensuradas objetivamente por meio de parâmetros não invasivos como frequência respiratória (FR) [10,11], frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) [12,13] e temperatura ocular por termografia infravermelha [14–16]. No entanto, essa avaliação é mais robusta quando realizada a combinação de medidas fisiológicas e comportamentais [17]. Nesse sentido, a avaliação das expressões faciais merece atenção em virtude do seu potencial em refletir de forma mais confiável o estado interno do animal, quando comparado ao comportamento geral [18].

Os Sistemas de Codificação de Ação Facial (FACS) fornecem uma metodologia sistemática de identificação e codificação de expressões faciais com base na musculatura facial subjacente e no movimento muscular [19,20]. Recentemente foi desenvolvido um FACS para equinos denominado EquiFACS, que fornece uma lista de todos os movimentos faciais que animais desta espécie podem produzir [19]. Inclusive, esta ferramenta foi utilizada com êxito recentemente em trabalho realizado com a finalidade de identificar expressões faciais relevantes produzidas por equinos submetidos a intervenções estressantes [21].

As expressões faciais também podem fornecer informações valiosas sobre a experiência emocional dos cavalos [18,22]. Através da abordagem dimensional, é possível caracterizar a experiência emocional em termos de valência (positiva/agradável/atraente ou negativa/desagradável/aversiva) e nível de agitação (alta ou baixa) [23,24]. Trabalhos realizados com equinos apontam que situações estressantes, em geral, levam a produção de expressões faciais que estão associadas a alto nível de agitação e valência negativa [21,25,26]. Todavia, a caracterização da experiência emocional de equinos submetidos à restrição de movimentos imposta pelo manejo de contenção em tronco, com e sem acesso a enriquecimento ambiental social, ainda precisa ser testada.

Este trabalho foi realizado para avaliar a capacidade do enriquecimento ambiental social sem contato facilitar o amortecimento social, e caracterizar a experiência emocional de cavalos submetidos ao manejo de contenção em tronco por meio da avaliação de parâmetros fisiológicos e expressões faciais. Espera-se que o enriquecimento social atenuar a resposta ao estresse de curta duração, resultando em redução de parâmetros indicadores de estresse, associados a alta agitação e valência negativa.

2. Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS, Campo Grande, Brasil) sob o protocolo nº 1.222/2022.

2.1. Animais, alojamento e habituação

Onze equinos da raça Pantaneiro (4 machos castrados e 7 fêmeas), com média de $6 \pm 2,6$ anos de idade, $326,4 \pm 23,7$ kg de peso corporal e escore de condição corporal (ECC)

5 [27], foram selecionados para participar deste experimento. Além dos onze animais ava-
liados, foi selecionado um macho castrado Pantaneiro com 16 anos, pesando 365,0 kg e
com ECC 6, para ser utilizado como companhia no tratamento enriquecimento ambiental
social (EAS). Os critérios para eleger este animal foram: não possuir parentesco e ser co-
nhecido por todos os animais avaliados, não possuir histórico de agressividade atípica ou
de interações agonísticas constantes com os animais avaliados, ser considerado pela
equipe local um animal calmo e cooperativo em atividades do cotidiano.

Os animais pertencem à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e man-
tidos na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), lo-
calizada no município de Terenos-MS (20° 26' 18" Sul, 54° 51' 24" Oeste), cujo clima é Aw
(savana tropical com invernos secos), segundo a classificação de Köppen [28]. Todos os
indivíduos selecionados foram mantidos desde o nascimento em grupos sociais, alojados
em piquetes com acesso *ad libitum* à pastagem (*Panicum maximum* cv. Tamani), sal mineral
e água, e permaneceram nessas condições durante o período experimental quando não
estavam sendo avaliados.

Antes do início do período experimental os animais passaram por habituação ao lo-
cal, aos equipamentos e aos procedimentos necessários para coleta de dados. Para tal, du-
rante uma semana os animais foram conduzidos ao tronco de contenção, onde permane-
ceram por 3 minutos, e foram expostos aos equipamentos e aos procedimentos que seriam
realizados ao longo do experimento. Os cavalos foram considerados aptos para uso
quando atendiam aos seguintes critérios: entrar no tronco sem apresentar qualquer tipo
de resistência e não demonstrar comportamento de aproximação ou evitação em relação
aos equipamentos durante os procedimentos.

O animal selecionado para ser utilizado como companhia no tratamento EAS já era
familiar com o local, mas também passou pela habituação. Porém, ao invés de ser contido
no tronco, era contido por meio de um cabresto no local onde permaneceria durante o
período experimental.

2.2. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o crossover com tratamento EAS (Enriquecimento am-
biental social durante manejo de contenção em tronco) e tratamento IS (Isolamento social
durante manejo de contenção em tronco). Os animais foram aleatoriamente designados
para que metade recebesse o tratamento IS primeiro e a outra metade recebesse o trata-
mento EAS primeiro. Todos os animais receberam ambos os tratamentos uma vez, com o
intervalo de uma semana entre os dois (Figura 1), no mesmo horário do dia (7h30 às
10h30).

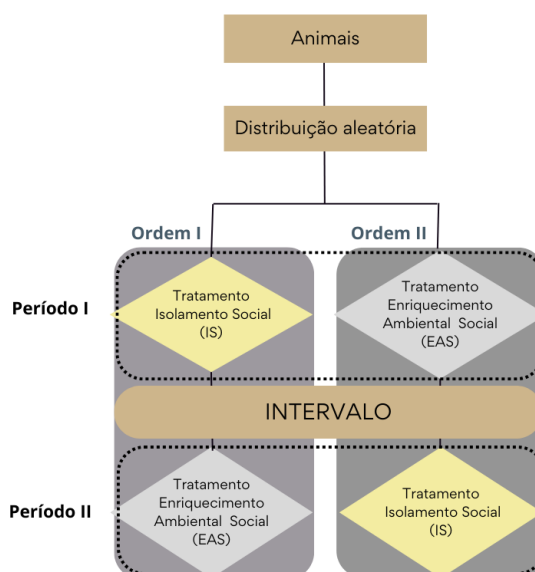


Figura 1. Diagrama do delineamento experimental.

2.3. Condições ambientais

O experimento foi conduzido no verão entre Janeiro e Fevereiro de 2022, logo, para caracterizar o ambiente ao qual os animais estavam expostos e descartar estresse térmico como possível fator de confundimento, foram monitorados os seguintes parâmetros microclimáticos: temperatura de bulbo seco do ar (Tbs, °C), temperatura de globo negro (Tgn, °C), temperatura de ponto de orvalho (Tpo, °C), temperatura de bulbo úmido do ar (Tbu, °C), umidade relativa do ar (UR%) e velocidade do vento (Vv, m/s).

As medidas foram tomadas em intervalos de 10 minutos, entre 7h00 e 11h00 nos dias de coleta, com auxílio de termo-higrômetros digitais (AK172®; AKSO, São Leopoldo, RS, Brasil), inseridos em abrigos meteorológicos. Para a temperatura de globo negro, foi utilizado o mesmo modelo de termo-higrômetro, encapsulado em bolas plásticas de PVC (15 cm de diâmetro), pintadas externamente com tinta de cor preto fosco, de acordo com o proposto por Souza *et al.* [29]. Os equipamentos foram alocados em pleno sol, e dentro da instalação onde os animais permaneceram durante os testes, a 1,50 m da superfície do solo, durante o período de insolação, considerando-se a variação da projeção da sombra e ângulo zenital.

A partir dos dados microclimáticos foram calculados: Carga térmica radiante (W/m²), conforme equação proposta por Esmay [30]; Índice de bulbo úmido e temperatura de globo (WBGT), conforme equação descrita por Schroter *et al.* [31]; Índice de conforto térmico (TCI) conforme equação proposta por Jones [32]. Com os dados obtidos foi possível caracterizar o ambiente e a condição de conforto térmico dos animais durante o período 1 e 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Ambiente térmico e índices bioclimáticos para caracterização do ambiente experimental.

Parâmetros	Período	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Temperatura do ar (°C)	1	24	38	31	3,6
	2	23	34	28	2,7
Umidade relativa (%)	1	48	87	67	10,9
	2	65	94	79	8,1
Carga térmica radiante (W/m ²)	1	452	643	532	50,6
	2	444	708	581	72,7
Índice de bulbo úmido e temperatura de globo – WBGT (°C)	1	22	34	28	3,4
	2	21	31	27	2,8
Índice de conforto térmico - TCI	1	147	163	155	4,8
	2	154	170	161	5,0

A temperatura do ar, umidade relativa e carga térmica radiante refletiram o esperado para região nesta época do ano, visto que, o clima Aw é caracterizado por verões chuvosos e com elevadas temperaturas [28]. Ainda assim, os valores médios obtidos para WBGT foram ≤ 28 °C, logo considera-se que houve baixo risco de estresse térmico [33,34].

Os valores médios obtidos para TCI excederam 130, o que pode indicar um ambiente desconfortável termicamente [32]. No entanto, os cavalos utilizados neste trabalho pertencem a uma raça nativa adaptada que demonstrou ser capaz de manter relativa homeostase, mesmo que o índice aplicado para avaliação do estresse térmico em equinos, o TCI tenha excedido a 130 [35].

2.4. Procedimento experimental

No período experimental os animais foram avaliados individualmente pela manhã, totalizando quatro animais por dia. No tratamento IS cada animal foi conduzido ao tronco de contenção, sendo este construído de postes sólidos e fixado em área coberta com laterais parcialmente fechadas, para restrição da movimentação e impedimento do contato físico ou visual com coespecíficos.

Para o tratamento EAS, cada animal foi conduzido ao mesmo tronco de contenção utilizado no tratamento IS, porém durante o período de sua permanência, um coespecífico conhecido foi proporcionado como companhia à 3 m de distância possibilitando comunicação visual, olfativa e auditiva (Figura 2). Por não ter sido proporcionado contato físico, o enriquecimento ambiental social testado no presente trabalho é caracterizado como enriquecimento ambiental social sem contato [7,8].

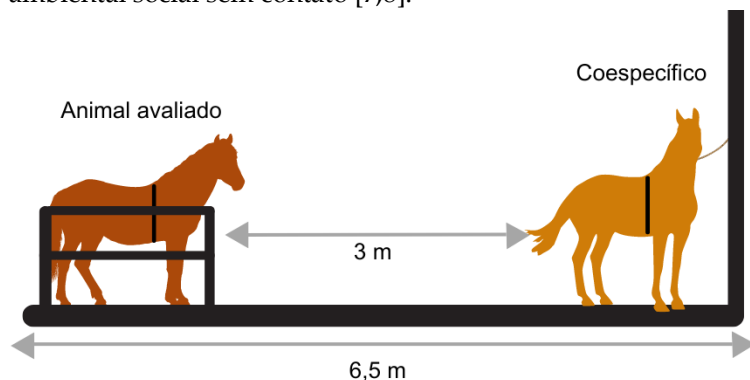


Figura 2. Configuração experimental da área para o teste, bem como a localização do animal avaliado e do coespecífico durante as coletas.

Durante a permanência no tronco de contenção os parâmetros TOT (temperatura ocular por termografia infravermelha), TAT (temperatura auricular por termômetro infravermelho) e FR (frequência respiratória) foram coletados pontualmente nos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4. Os parâmetros EF (expressões faciais) e FC/VFC (frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca) foram coletados continuamente, mas analisados somente nos intervalos de 5 minutos identificados como I1, I2 e I3 (Figura 3).

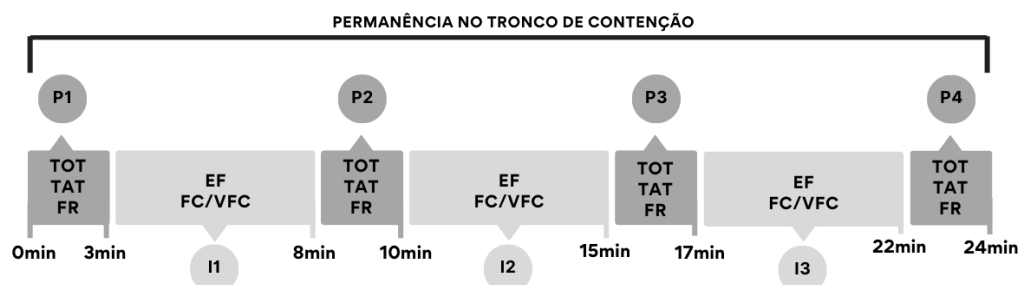


Figura 3. Procedimento experimental. TOT = temperatura ocular por termografia infravermelha; TAT = temperatura auricular por termômetro infravermelho; FR = frequência respiratória; EF = expressão facial; FC = frequência cardíaca; VFC = variabilidade da frequência cardíaca.

2.5. Parâmetros fisiológicos

2.5.1. Frequência cardíaca (FC) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

Os parâmetros FC e VFC foram mensurados com auxílio do transmissor de frequência cardíaca Polar H10 (Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia). O transmissor de frequência cardíaca foi fixado à cinta elástica e posicionado na região torácica entre o 4º e 5º espaço intercostal do lado esquerdo do tórax. A cinta foi embebida em água e ajustada no corpo dos animais 10 minutos antes do início da coleta de dados. Visando melhorar a transmissão dos sinais elétricos do corpo para os eletrodos, foi realizada limpeza dos pelos com água.

A FC e a gravação de vídeo para avaliação das expressões faciais foram iniciadas ao mesmo tempo para garantir que os intervalos no vídeo se relacionassem diretamente com os intervalos da FC e VFC. Os dados foram coletados e exportados por meio do App Elite HRV (Elite HRV, Asheville, NC, USA), e a análise dos dados foi realizada através do software Kubios HRV standard, versão 3.5.0 (Kubios Oy, Kuopio, Finlândia). Para análise, uma correção de artefato média foi aplicada para reduzir o erro em todo o conjunto

amostral, conforme metodologia de MCDUFFEE *et al.* [36], que permite correção menor ou igual a 15%. Das 33 amostras coletadas apenas 6 tiveram valor maior do que 5% sendo a maior porcentagem de artefatos corrigidos neste estudo 6,3%.

Intervalos de cinco minutos foram selecionadas para análise dos índices de VFC e média da frequência cardíaca. Para este estudo foram selecionados os seguintes índices de VFC referentes ao domínio da frequência: potência de baixa frequência (Low Frequency – LF, nu), potência de alta frequência (High Frequency – HF, nu) e razão de baixa frequência para alta frequência (LF/HF). A banda de baixa frequência (LF) foi definida em 0,04-0,15 Hz, enquanto a banda de alta frequência (HF) foi definida em 0,15-0,4 Hz [36].

A FC e VFC do coespecífico destinado ao tratamento EAS como parceiro social também foi monitorada durante o experimento, para caracterizar seu nível de agitação durante as coletas (Tabela 2).

Tabela 2. Respostas cardíacas do coespecífico destinado ao EAS como parceiro social, durante as coletas.

Parâmetros	Período	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Frequência cardíaca (bpm)	1	33,0	69,0	36,3	1,3
	2	31,0	50,0	34,6	1,5

Os valores médios de FC obtidos para o coespecífico se encontram dentro dos valores de referência (28 a 40 bpm) estabelecidos para equinos adultos em repouso e expostos a ambientes com temperaturas entre 22°C e 36°C [37,38]. A média e o desvio padrão indicam que o animal permaneceu predominantemente calmo, com baixo nível de agitação durante as coletas.

2.5.2. Frequência respiratória (FR)

A frequência respiratória, mensurada em movimentos por minuto (mpm), foi realizada através da contagem dos movimentos do flanco por 30 segundos. Os valores foram multiplicados por dois para determinar a frequência respiratória/min.

2.5.3. Temperatura ocular por termografia infravermelha (TOT)

Para este procedimento, todos os animais passaram por higienização da face 15 minutos antes do início das coletas afim de evitar artefatos que pudessem afetar a medição da temperatura.

Imagens termográficas oculares foram registradas para mensuração da temperatura superficial na região do canto medial, como proposto por Kim e Cho [39]. As imagens foram coletadas do lado esquerdo em um ângulo de 90° graus do plano sagital do animal, a 0,5m de distância, em local livre de exposição à luz solar direta.

O equipamento utilizado foi a câmera termográfica (S60, Caterpillar FLIR câmera, Vernon Hills, IL, USA) com resolução térmica de 80x60 pixels, resolução visual de 640x480 e sensibilidade térmica de 150 mK. A emissividade foi ajustada em 0,98, valor correspondente ao utilizado para a pele de mamíferos [40,41].

O software FLIR tools, versão 6.4.18039.1003 (FLIR Systems Inc, Oregon, EUA) foi usado para análise das imagens termográficas. A distância em que as imagens foram registradas, bem como temperatura e umidade, foram incluídas no software, que corrige eventuais variações ambientais.

2.5.4. Temperatura auricular por termômetro infravermelho (TAT)

A TAT foi aferida por meio de termômetro digital portátil com dispositivo de luz infravermelha (Mult Temp Portátil, Incoterm, Porto Alegre, RS, Brasil), direcionado no ponto central da cavidade auricular, sob a orelha esquerda do animal, à uma distância de 0,3m.

2.6. Parâmetros faciais

2.6.1. Gravação de vídeo

Para avaliação dos parâmetros faciais, durante todo o período em que o animal permaneceu no troco de contenção, gravações de vídeo foram realizadas usando a câmera digital Canon EOS SL3 (Canon Inc., São Paulo, SP, Brasil). A resolução foi definida para 1080p a 30 fps e os vídeos foram exportados no formato mp4. A câmera foi posicionada à 1,5m de distância com um ângulo de aproximadamente 45° graus do plano medial do cavalo.

2.6.2. Processamento e codificação de vídeos com sistema de codificação de ação facial equina (EquiFACS)

O EquiFACS, conforme descrito por Wathan *et al.* [19] foi utilizado para codificação de expressões faciais em todos os vídeos. Para este trabalho foram selecionadas 4 unidades de ação (AUs) e 7 descritores de ação (ADs) e um código de visibilidade (CV) (Tabela 3), que correspondem a expressões faciais que demonstraram ser relevantes para avaliação de equinos expostos a estressores em trabalhos realizados anteriormente [21,42,43].

Tabela 3. Códigos pertencentes ao EquiFACS selecionados para codificação de expressões faciais em vídeos de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco).

Código	Crítérios mínimos para codificar
I. Unidade de ação (AU)	
Levantador da pálpebra superior (AU5)	Um aumento na abertura do olho causado pela elevação da pálpebra superior
Meia piscada (AU47)	Ambas as pálpebras devem se mover juntas para cobrir o olho, e essa ação deve ser revertida em meio segundo
Piscada (AU145)	Redução na abertura do olho
Levantador do canto interno (AU101)	Movimento dorsal da pele acima da região interna do olho
II. Descritores de ação (AD)	
Aumento do branco dos olhos (AD1)	Um aumento na porcentagem de esclera branca visível
Exposição da língua (AD19)	A língua é exposta e vai além dos dentes
Dilatador de narinas (AD38)	Um aumento na abertura da narina
Bocejo (AD76)	Crítérios mínimos para codificar não descritos
Mastigação (AD81)	Crítérios mínimos para codificar não descritos
Orelhas para frente (EAD101)	Rotação rostral do pavilhão auricular
Rotador de orelhas/Orelhas para trás (EAD104)	O pavilhão auricular rotaciona caudalmente
Face Inteira Não Visível (CV73)	Toda a face está fora de vista ou não pode ser vista claramente

Para codificação foram selecionados cliques de 5 minutos de duração obtidos durante o período de permanência dos animais no tronco de contenção (I1, I2 e I3). Todos os vídeos foram observados por um único codificador certificado pelo EquiFACS com concordância interobservador >70% em comparação com codificadores experientes. Para observação, uma lista com os códigos selecionados foi inserida no software BORIS versão 6.0.6 (Friard and Gamba, Universidade de Turin, Turin, Itália). Os cliques foram observados pela primeira vez em velocidade normal e em seguida, ao longo de pelo menos três vezes novamente em câmera lenta ou em frame-by-frame para observação de cada uma das três regiões da face do cavalo (orelhas, face superior e face inferior).

Foi registrada a frequência por minuto de cada um dos códigos selecionados, com exceção do CV73, para o qual foi registrado a duração em segundos. O CV73 foi usado

para denotar por quanto tempo a face inteira não estava visível para codificação. Dessa forma, foi possível monitorar por quanto tempo a face estava em posição visível para codificação, ou não, em cada intervalo de 5 minutos. Para cálculo da frequência por minuto dos AUs e ADs apenas o tempo em que face estava em posição visível para codificação foi considerado, conforme a equação:

$$\text{Frequência por minuto AU ou AD} = \text{N}^\circ \text{ total de registros} \div 5\text{min} - \text{CV73}$$

Dentre 66 clipes de 5 minutos selecionados, a face esteve em posição visível para codificação em 61 por período ≥ 4 minutos, em 4 por período $\geq 3,5$ minutos e em apenas 1 por período de 2,75 minutos.

2.7. Descrição estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 4.1.0 (2021-06-29), RStudio, Inc.). As funções e os pacotes utilizados foram apresentados no formato ‘pacote::função’ correspondente à linguagem de programação em R. Para todos os testes foi considerada significância de 5%.

Inicialmente, foi feita uma análise inferencial para identificar diferenças entre os tratamentos (IS vs EAS) e ao longo do tempo (P1 vs P2 vs P3 vs P4 ou I1 vs I2 vs I3). Foram conduzidos modelos lineares multinível (lme4::lmer) para as seguintes variáveis resposta em que os resíduos do modelo apresentaram aderência à normalidade pelo teste de Cramer-Von Mises (nortest::cvm.test): FC média, LF, HF, LF/HF, temperatura auricular, levantador da sobrancelha interna (AU101), dilatação da narina (AD38) e meia piscada (AU47). Já as variáveis orelhas para frente (EAD101), orelhas para trás (EAD104) só atingiram tal condição após transformação Box-Cox (car::powerTransform).

Para as variáveis de contagem (frequência respiratória) foi usado um modelo linear generalizado multinível ajustado pela distribuição de Poisson. A interação de pontos de coleta ou intervalos com tratamentos, os períodos e a ordem foram usados como efeitos fixos da modelagem, bem como os cavalos foram usados como efeitos aleatórios para controlar a variação individual. A comparação múltipla no post-hoc test foi conduzida com o procedimento de Bonferroni (lsmeans::lsmeans e multcomp::cld) [44].

As variáveis temperatura do ocular, levantador da pálpebra (AU5), piscada (AU145), aumento do branco dos olhos (AD1), exposição da língua (AD19), mastigação (AD81) e bocejo (AD76) não atingiram aderência à normalidade mesmo após transformações, impossibilitando sua modelagem. Portanto, a comparação entre cada tratamento em um mesmo tempo foi feita com o teste de Wilcoxon pareado bicaudal (stats::wilcox.test) e a comparação ao longo do tempo para cada tratamento foi feita com teste de Friedman (stats::friedman.test e PMCMRplus::frdAllPairsNemenyiTest).

Os resultados foram ilustrados com gráficos de caixa (ggplot2::ggplot e ggplot2::geom_boxplot). Resultados de variáveis que atingiram aderência à normalidade estão apresentados nas tabelas como média e desvio padrão (Média $\pm$ DP), enquanto resultados de variáveis que não atingiram aderência à normalidade estão apresentados como mediana e amplitude interquartil [(Mediana(IQR))].

Posteriormente, foi feita uma análise exploratória. Para analisar a dinâmica múltipla entre as expressões faciais avaliadas neste experimento foi conduzida uma análise de componentes principais (PCA) baseada em uma matriz de correlação (stats::princomp). O número ótimo de componentes principais (PC) a serem retidos na PCA foi determinado pela análise paralela de Horn (‘psych::fa.parallel’) [45]. Como critério para determinar associação entre cada variável e o PC foram usados os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que -0,40 [46]. Para ilustrar tais resultados foram feitos dois biplots colorindo as observações de acordo com os tratamentos para uma análise qualitativa (julgamento visual) de sua distribuição.

3. Resultados

3.1. Parâmetros fisiológicos

A FC média dos animais quando em isolamento social foi maior em relação à quando foram avaliados em ambiente com enriquecimento social no intervalo 3 (I3) ($P<0,05$). As variáveis, LF, HF e LF/HF não diferiram entre os tratamentos ou entre os intervalos (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos parâmetros cardíacos de equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos.

Parâmetros	Tratamentos	Intervalos		
		I1	I2	I3
FC média (bpm)	IS	39,3±6,7	40,5±7,4	41,5±8,9 ^A
	EAS	38,3±3,4	38,2±3,5	38,0±3,9 ^B
LF (nu)	IS	51,3±10,3	61,3±11,8	59,3±15,2
	EAS	51,0±15,7	51,5±19,0	54,6±19,7
HF (nu)	IS	48,7±10,3	38,7±11,8	40,6±15,2
	EAS	49,0±15,7	48,5±19,0	45,4±19,7
LF/HF	IS	1,1±0,5	1,8±0,9	1,8±1,1
	EAS	1,2±0,8	1,4±0,9	1,6±1,3

Parâmetros: FC: frequência cardíaca média; LF: potência de baixa frequência (Low Frequency); HF: potência de alta frequência (High Frequency); LF/HF: razão de baixa frequência para alta frequência. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo ($p<0,05$), sendo que A>B.

A frequência respiratória do tratamento IS diferiu ($P<0,05$) ao longo dos pontos de coleta. Os maiores valores foram observados em P2 e P4, pontos de coleta em que a FR foi maior para o tratamento IS comparado ao EAS ($P<0,05$) (Figura 4 e Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio-padrão ou mediana e amplitude interquartil dos parâmetros fisiológicos de equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo dos quatro pontos de coleta.

Parâmetros	Tratamentos	Pontos de coleta			
		P1	P2	P3	P4
FR (mpm)	IS	23,6±9,9 ^{cb}	28,7±13,0 ^{baA}	22,2±9,4 ^c	29,8±12,6 ^{aA}
	EAS	21,5±7,0	19,3±6,1 ^B	21,5±5,5	22,2±7,9 ^B
TAT (°C)	IS	31,9±1,0	32,0±1,0	32,3±1,3	32,5±1,2
	EAS	32,1±0,9	32,4±0,8	32,4±0,8	32,3±0,6
TOT (°C)	IS	30,9(0,9) ^{ab}	31,0(1,6) ^b	31,5(1,1) ^{ab}	32,0(0,8) ^a
	EAS	30,1(1,9)	30,6(1,0)	30,9(1,1)	31,3(0,8)

Parâmetros: FR: frequência respiratória; TAT: temperatura auricular por termômetro infravermelho; TOT: temperatura ocular por termografia infravermelha. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos pontos de coleta para um mesmo tratamento ($p<0,05$), sendo que a>b; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo ($p<0,05$), sendo que A>B.

A temperatura auricular não foi influenciada pelos tratamentos ou pontos de coleta (Tabela 5). A temperatura ocular não diferiu entre os tratamentos, no entanto, para o IS

houve aumento da temperatura do ponto de coleta P2 para o P4 (P<0,05) (Figura 4 e Tabela 5).

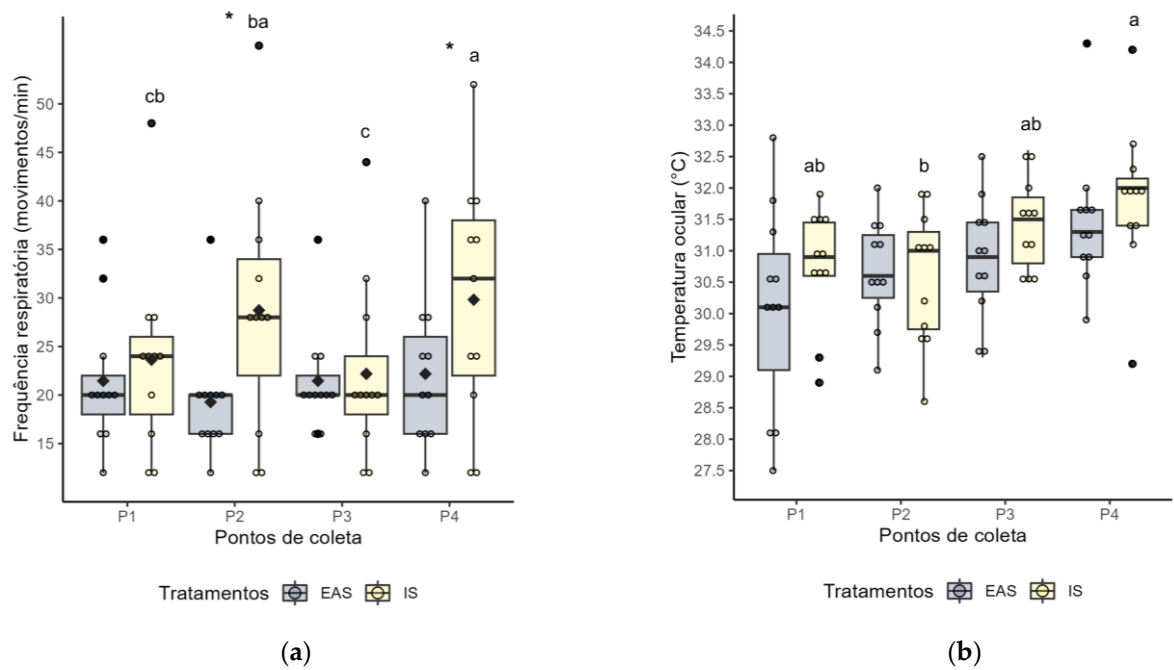


Figura 4. Gráficos de caixas: (a) Frequência respiratória (movimentos/min); (b) Temperatura ocular (°C) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de quatro pontos de coleta. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos pontos de coleta para um mesmo tratamento (p<0,05), sendo que a>b; * indica diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo tempo (p<0,05); o losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e azul) representa um animal; e cada círculo preto indica um outlier.

3.2. Parâmetros faciais

A frequência dos descritores de ação facial *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104) foi maior para o IS em relação EAS (P<0,05) nos três intervalos (Figura 5 e Tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio-padrão ou mediana e amplitude interquartil da frequência por minuto dos parâmetros faciais expressos por equinos enquanto nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos.

Parâmetros	Tratamentos	Intervalos		
		I1	I2	I3
Orelhas para frente (EAD101)	IS	9,3±5,9 ^A	10,7±6,6 ^A	12,0±6,3 ^A
	EAS	6,3±4,8 ^B	5,5±4,0 ^B	6,2±2,9 ^B
Orelhas para trás (EAD104)	IS	9,3±5,6 ^A	10,9±6,5 ^A	11,7±6,3 ^A
	EAS	6,5±4,7 ^B	5,8±4,1 ^B	6,3±3,1 ^B
Levantador da sobrancelha interna (AU101)	IS	6,4±3,0 ^A	6,3±2,2 ^A	5,9±2,3 ^A
	EAS	5,0±2,6 ^B	4,2±2,1 ^B	4,0±3,0 ^B
Meia piscada (AU47)	IS	11,0±5,2	13,3±6,6	12,8±6,0
	EAS	10,3±4,9	10,9±4,7	10,0±3,9
Piscada (AU145)	IS	13,9(3,9)	14,4(9,2)	12,1(8,5)
	EAS	16,0(6,5) ^{ab}	16,4(7,1) ^a	13,0(4,6) ^b

Levantador da pálpebra (AU5)	IS	1,2(1,4) ^A	1,7(1,7) ^A	1,5(2,1) ^A
	EAS	0,6(0,6) ^B	0,6(0,9) ^B	0,2(0,5) ^B
Aumento do branco dos olhos (AD1)	IS	2,3(2,2) ^A	1,7(2,3) ^A	1,4(2,3)
	EAS	1,0(1,2) ^B	0,5(1,7) ^B	0,4(1,1)
Dilatação da narina (AD38)	IS	19,9±13,8 ^A	18,5±10,8 ^A	21,7±13,1 ^A
	SS	11,9±9,2 ^B	11,7±7,4 ^B	10,2±9,5 ^B
Bocejo (AD76)	IS	0,0(0,4)	0,3(0,4)	0,0(0,2)
	EAS	0,4(0,8)	0,0(0,4)	0,0(0,1)
Mastigação (AD81)	IS	0,9(1,8)	1,2(1,7)	0,5(0,6)
	EAS	1,2(1,3)	0,6(1,3)	0,2(0,6)
Exposição da língua (AD19)	IS	0,7(5,5)	1,9(3,2)	1,2(2,9)
	EAS	2,0(3,4)	2,7(4,5)	0,4(1,6)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos intervalos para um mesmo tratamento (p<0,05), sendo que a>b; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo (p<0,05), sendo que A>B.

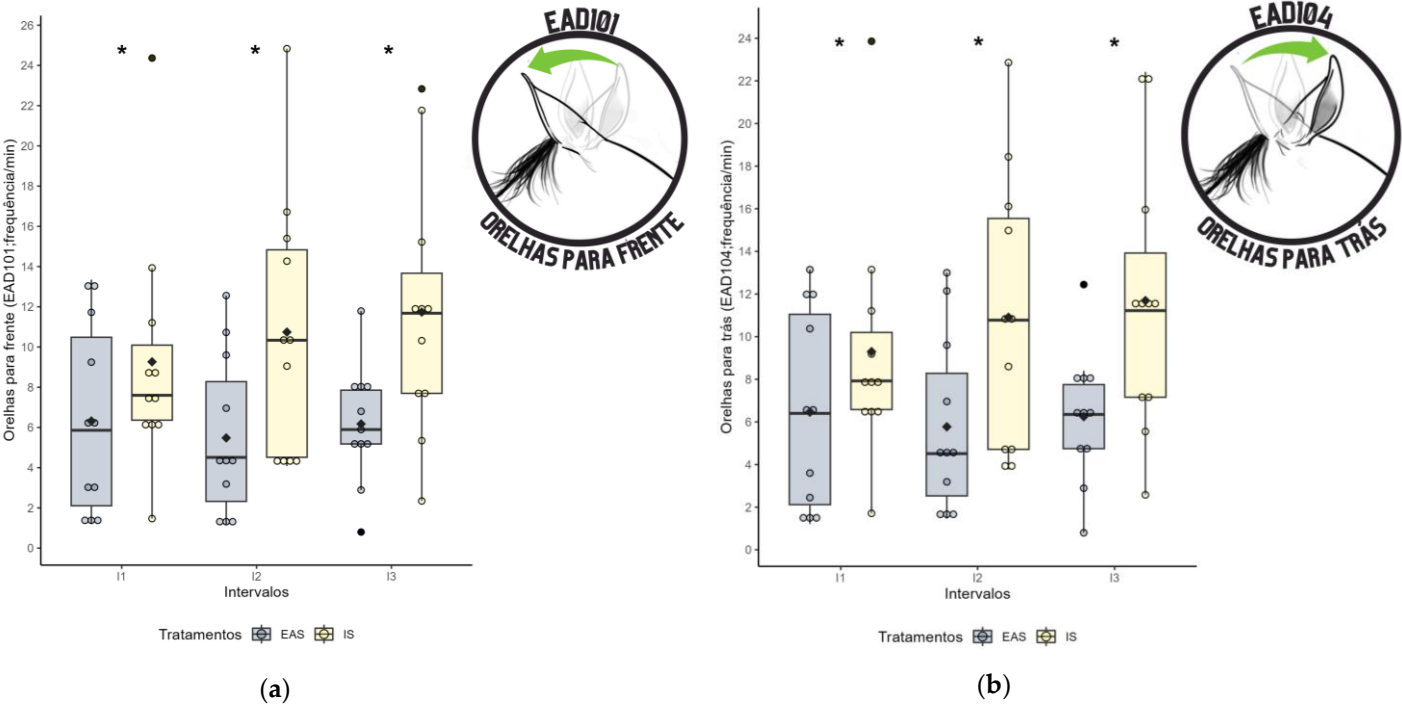


Figura 5. Gráficos de caixas: (a) Descritor de ação facial *orelhas para frente* (EAD101; frequência/min); (b) Descritor de ação facial *orelhas para trás* (EAD104; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos. * indica diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo tempo (p<0,05); o losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e azul) representa um animal; e cada círculo preto indica um outlier.

A frequência da unidade de ação facial *levantador da sobrancelha interna* (AU101) foi maior para o tratamento IS em relação ao tratamento EAS (P<0,05) nos três intervalos (Figura 6 [a] e Tabela 6). Para a unidade de ação facial *piscada* (AU145) foi observada diferença (P<0,05) ao longo dos intervalos para o EAS, sendo a maior frequência observada no I2 e a

menor no I3 (Figura 6 [b] e Tabela 6). Por sua vez, a frequência da unidade de ação facial *levantador da pálpebra* (AU5) foi maior para o tratamento IS em relação ao EAS ($P<0,05$) nos três intervalos (Figura 6 [c] e Tabela 6). Enquanto para o descritor de ação facial *aumento do branco dos olhos* (AD1) a frequência foi maior para o tratamento IS em relação ao tratamento EAS ($P<0,05$) nos intervalos I1 e I2 apenas (Figura 6 [d] e Tabela 6).

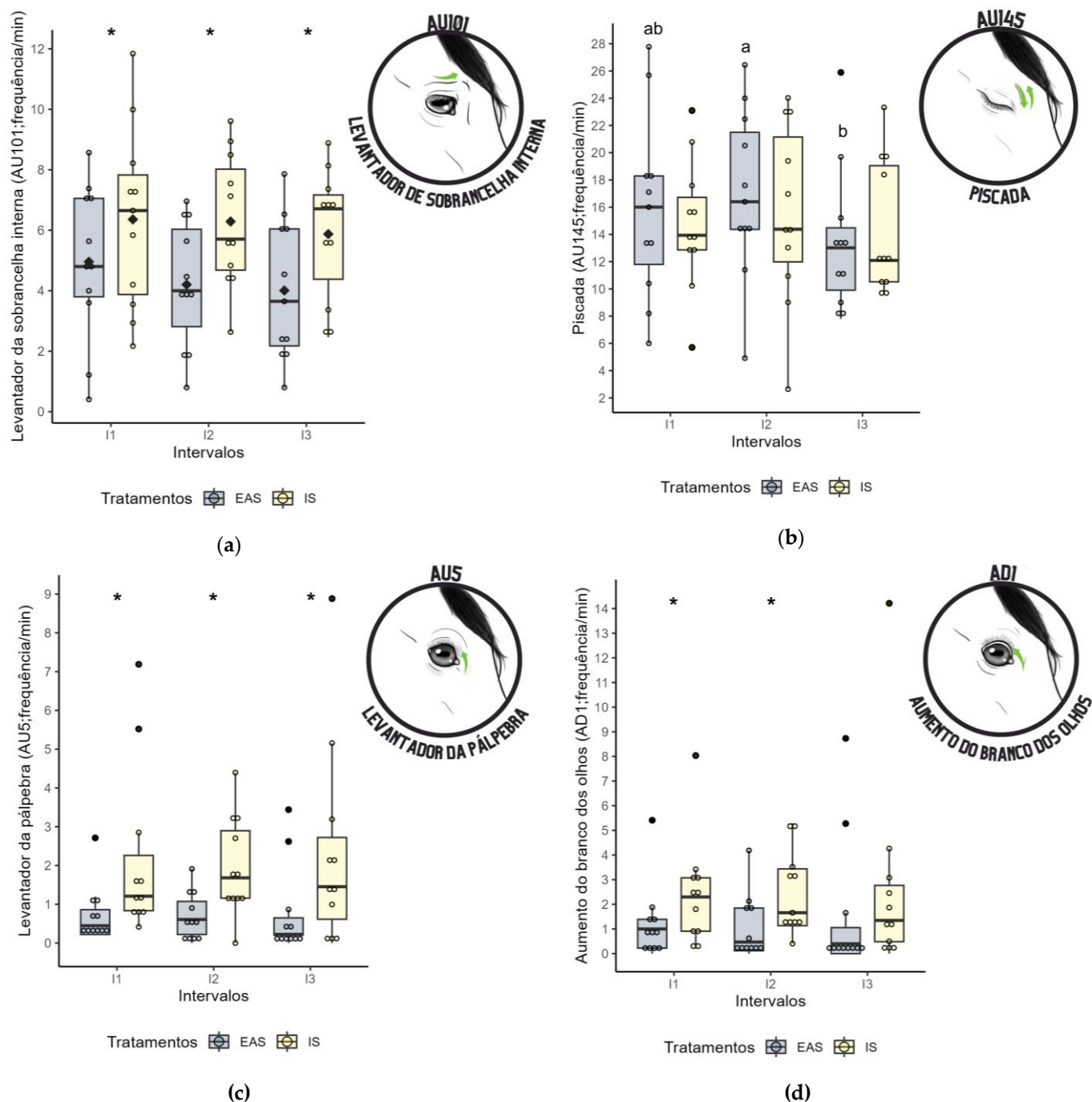


Figura 6. Gráficos de caixas: (a) Unidade de ação facial *levantador da sobrancelha interna* (AU101; frequência/min); (b) Unidade de ação facial *piscada* (AU145; frequência/min); (c) Unidade de ação facial *levantador da pálpebra* (AU5; frequência/min); (d) Descritor de ação facial *aumento do branco dos olhos* (AD1; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos; Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos pontos de coleta para um mesmo tratamento ($p<0,05$), sendo que $a>b$; * indica diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um

mesmo tempo ($p < 0,05$); o losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e azul) representa um animal; e cada círculo preto indica um outlier.

A frequência do descritor de ação facial *dilatação da narina* (AD38) foi maior para o tratamento IS em relação ao tratamento EAS ($P < 0,05$) nos três intervalos (Figura 7 e Tabela 6).

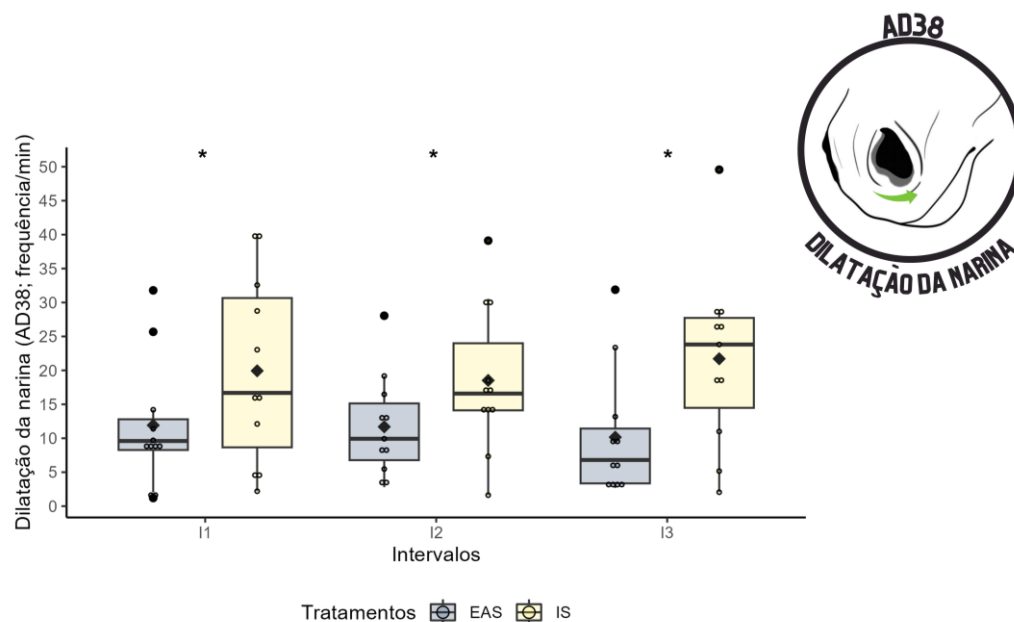


Figure 7. Gráficos de caixas do descritor de ação *dilatação da narina* (AD38; frequência/min) nos tratamentos isolamento social (IS) e enriquecimento ambiental social (EAS) ao longo de três intervalos. * indica diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo tempo ($p < 0,05$); o losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e azul) representa um animal; e cada círculo preto indica um outlier.

A análise paralela de Horn indicou a retenção do primeiro e segundo PC de um total de 5 PC gerados pela PCA, portanto apenas esses foram analisados. O valor de carga da PCA indica o nível de associação entre a variável e um determinado PC, sendo que o valor de carga mais distante de zero indica maior nível de associação positiva (1,00) ou negativa (-1,00). Portanto, o conjunto de variáveis associadas positivamente com um PC apresentam uma dinâmica semelhante entre si, sendo que todas aumentam ou diminuem concomitantemente.

As associações foram determinadas por um ponto de corte do valor de carga de 0,40 positivo ou negativo. O PC1 explicou sozinho quase a metade (42,2%) da variação total dos dados, sendo que *orelhas para frente* (EAD101), *orelhas para trás* (EAD104), *levantador da sobrancelha interna* (AU101), *meia piscada* (AU47), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1), *dilatação da narina* (AD38) mostraram associação positiva (valores de carga $> 0,40$) com o PC1 (Tabela 7). Desta forma, a diminuição ou aumento destas expressões faciais ocorreu concomitantemente considerando os tratamentos. *Orelhas para trás* (EAD104) mostrou o valor de carga mais distante de zero no PC1, que pode ser interpretado como a expressão facial com maior variação (importância) no PC1.

Bocejo (AD76), *mastigação* (AD81) e *exposição da língua* (AD19) mostraram associação positiva (valores de carga $> 0,40$) com o PC1 e PC2. Já a *piscada* (AU145) foi a única expressão facial que mostrou associação positiva apenas com o PC2 (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de carga, autovalores e variância da análise de componentes principais (PC = componente principal; em negrito estão os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que -0,40 indicando associação da variável com o PC).

Variáveis	PC1	PC2
Orelhas para frente (EAD101)	0,809	-0,134
Orelhas para trás (EAD104)	0,814	-0,127
Levantador da sobrancelha interna (AU101)	0,745	-0,109
Meia piscada (AU47)	0,613	-0,124
Piscada (AU145)	0,070	0,417
Levantador da pálpebra (AU5)	0,757	-0,390
Aumento do branco dos olhos (AD1)	0,742	-0,349
Dilatação da narina (AD38)	0,594	-0,386
Bocejo (AD76)	0,442	0,753
Mastigação (AD81)	0,648	0,664
Exposição da língua (AD19)	0,544	0,663
Autovalores	4,641	2,104
Variância	42,187	19,123
Variância cumulativa	42,187	61,311

A Figura 8 separa as avaliações dos cavalos no tratamento isolamento social (IS) e no tratamento enriquecimento ambiental social (EAS) com cores diferentes. Uma das informações dessa figura é o centroide (círculo maior) que indica o centro de massa dado pelo polígono (forma geométrica) formado com a interpolação das avaliações (círculos menores) de uma mesma cor. Por um julgamento visual, os centróides de ambos os tratamentos se encontram separados indicando que as expressões faciais conseguiram separar os tratamentos.

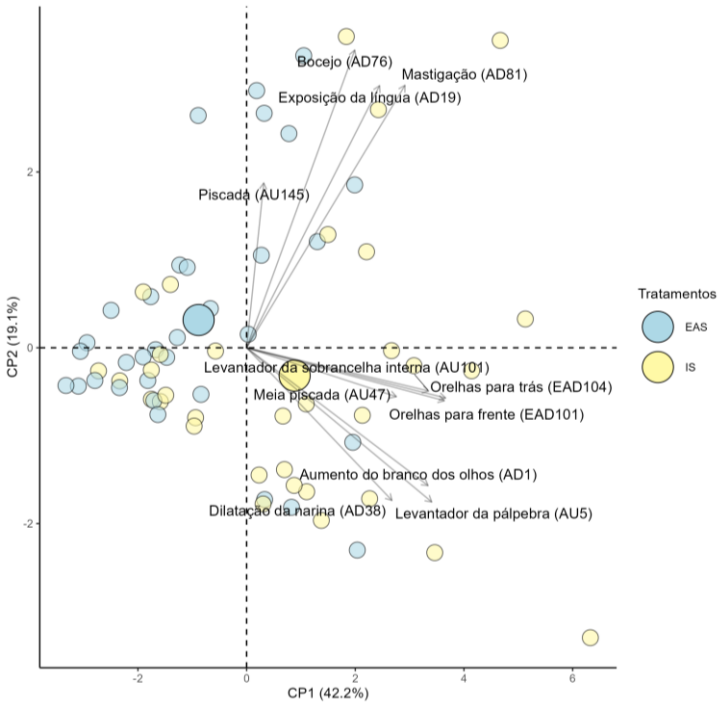


Figura 8. Biplot bidimensional da análise de componentes principais com as expressões faciais e as observações separadas por tratamento (Círculos menores indicam cada avaliação e círculos maiores

representam o centroide de cada tratamento; centroide indica o centro de massa dado pelo polígono formado com a interpolação dos círculos menores de uma mesma cor; as setas indicam os vetores de cada uma das expressões faciais).

Ademais, o centróide do tratamento isolamento social está localizado no quadrante direito inferior onde estão os vetores de *orelhas para frente* (EAD101), *orelhas para trás* (EAD104), *levantador da sobrancelha interna* (AU101), *meia piscada* (AU47), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1) e *dilatação da narina* (AD38), sugerindo maior ocorrência dessas expressões faciais no tratamento isolamento social. Tais resultados exploram uma possível dinâmica múltipla das expressões faciais que foram capazes de distinguir tratamentos nas análises inferenciais prévias.

4. Discussão

Neste estudo foi investigado se a utilização do enriquecimento ambiental social sem contato poderia facilitar o amortecimento social, reduzindo respostas fisiológicas e expressões faciais associadas ao estresse de curta duração em equinos. Por se tratar de uma intervenção potencialmente aversiva e estressante realizada com frequência em centros equestres, a contenção em tronco foi eleita para este estudo, aumentando sua relevância para o bem-estar de cavalos domésticos.

Em geral, a resposta fisiológica ao estresse pode ser caracterizada por elevação nas frequências cardíaca e respiratória, que ocorrem em função do aumento na atividade simpática [17,47,48]. Os valores médios de frequência cardíaca obtidos em ambos os tratamentos se encontram dentro ou bem próximos aos valores de referência (28 a 40 bpm) estabelecidos para equinos adultos em repouso e condições ambientais semelhantes às do presente estudo (22°C a 36°C) [37,38]. Todavia, as respostas cardíacas obtidas são consistentes com as observadas em estudos anteriores em que cavalos foram expostos a eventos estressantes que incluíam restrição de movimento [49–51].

O maior valor obtido para frequência cardíaca, registrado no I3 para o tratamento IS (41,5 bpm), foi semelhante ao relatado por Fenner *et al.* [52] (46,28 bpm) ao submeter cavalos em restrição de movimento ao uso de equipamento restritivo (focinheira apertada) capaz de provocar respostas fisiológicas ao estresse e inibir a expressão de comportamentos orais. Valores próximos a 40 bpm também foram relatados por Yarnell *et al.* [49], em cavalos cooperativos durante procedimento aversivo envolvendo restrição de movimento e estímulo auditivo desagradável (tosa).

O aumento discreto e gradativo da frequência cardíaca que resultou no pico observado no I3 para o tratamento IS pode ser justificado pelos cavalos estarem parados durante o manejo, pois a ausência de atividade física colabora para valores mais próximos aos de referência obtidos em animais em repouso [37,38]. A natureza do estressor também deve ser considerada, uma vez que, respostas mais acentuadas geralmente ocorrem diante de estressores apresentados de forma abrupta [6,53], o que não foi o caso deste estudo. Outro fator a ter contribuído, é a habituação dos animais ao procedimento, visto que, este processo resulta em diminuição da resposta ao estímulo [54,55]. Todos os animais foram cooperativos durante o manejo e nenhum demonstrou resistência ao entrar ou sair do tronco de contenção.

No mesmo intervalo (I3), a frequência cardíaca foi menor quando a companhia de um coespecífico foi proporcionada como enriquecimento social (EAS). Essa resposta está alinhada com as evidências de que o suporte social pode exercer impacto positivo no sistema cardiovascular, reduzindo a frequência cardíaca durante tarefas estressantes em diversas espécies [4], inclusive menor frequência cardíaca foi relatada em equinos expostos a um estímulo assustador [56], submetidos a transporte [50] quando na companhia de um coespecífico.

Para frequência respiratória foi observado que, os animais quando tratados com enriquecimento social mantiveram valores médios constantes e próximos aos valores de referência (10 a 20 mpm, [37,38]) ao longo do tempo. Porém, quando isolados demonstraram frequência respiratória inconstante, oscilando ao longo do tempo com valores mais distantes aos de referência, sendo o maior valor registrado quando o tempo de contenção

esteve próximo à 20 min. Concomitante, o maior valor para frequência cardíaca foi registrado. Os resultados demonstram que o manejo de contenção foi capaz de induzir respostas fisiológicas ao estresse e que estas, por sua vez, foram atenuadas quando os animais tiveram a companhia de um coespecífico, sugerindo a ocorrência de amortecimento social.

Alterações na temperatura ocular têm sido associadas a procedimentos aversivos e/ou negativos, e reconhecidas como resposta ao estresse em mamíferos ocasionadas por alterações simpáticas mediadas no fluxo sanguíneo [57,58]. Mudanças significativas ao longo do tempo devido a oscilações acentuadas para temperatura ocular foram observadas quando os animais estavam sozinhos durante a contenção em tronco (IS). Em contraste, quando acompanhados (EAS), a temperatura ocular apresentou insignificante variação ao longo do tempo.

A escala de aumento na temperatura ocular observada (1,0 °C do P2 ao P4 [IS]) é consistente com eventos estressantes reportados em outros estudos como cateterismo jugular de vacas leiteiras (0,9 °C) [59] e uso de equipamento restritivo (focinheira apertada) em cavalos em restrição de movimento (0,4 °C) [51]. O aumento da temperatura ocular no tratamento IS resultou em um pico que ocorreu concomitante aos picos observados para as frequências cardíaca e respiratória, sugerindo que, ao longo do tempo as respostas fisiológicas ao estresse se intensificaram. Logo, o tempo pode ser um fator determinante para intensificação da ação deste tipo de estressor, o que já foi relatado por Vollenhoven *et al.* [3], em que a resposta ao estresse foi acentuada em éguas após restrição de movimentos prolongada em troncos de contenção.

Esse padrão de elevação na temperatura diante de um estressor ocorre possivelmente como resultado do aumento da dilatação dos vasos sanguíneos oculares, e do aumento da atenção/orientação visual [49]. Em linha com esta informação, no presente estudo, expressões faciais relacionadas aos olhos que proporcionam aumento do campo visual, foram codificadas com maior frequência em cavalos isolados. O *levantador da pálpebra superior* (AU5) representa um aumento na abertura ocular causado pela elevação da pálpebra superior que pode resultar na exposição da esclera, representado pelo descritor de ação facial *aumento do branco dos olhos* (AD1) [19]. Em cavalos, o *levantador da pálpebra superior* (AU5) e o *aumento do branco dos olhos* (AD1) têm sido associados ao estresse durante o transporte ou quando em isolamento social [21]. Além disso, uma correlação da microexpressão do *aumento do branco dos olhos* (AD1) com a orientação da atenção também foi reportada na espécie [60].

Tem sido sugerido que aumento da exposição da esclera esteja mais associado ao aumento do nível de agitação do que à valência emocional, uma vez que, essa expressão foi identificada em contextos associados tanto à estados emocionais positivos quanto negativos de elevada agitação em equinos [25] e bovinos [61]. Ademais, é sugerido que o aumento da expressão *aumento do branco dos olhos* (AD1) pode indicar forte agitação, porque os axônios simpáticos inervam o músculo envolvido na elevação da pálpebra superior [60,62].

A unidade de ação *levantador da sobrancelha interna* (AU101) também foi expressa com maior frequência por cavalos quando isolados. Essa unidade de ação é caracterizada por um movimento dorsal da pele acima da região interna do olho [19] e atribuí ao olho um formato triangular que, em geral, é empiricamente associado a dor e já foi inclusive inserido como parâmetro facial em algumas ferramentas desenvolvidas para avaliação de dor em equinos [63,64]. Porém, com o desenvolvimento do EquiFACS, tornou-se possível codificar movimentos faciais de forma confiável a partir de sequências de vídeo. Em trabalhos realizados com este sistema, os resultados obtidos para *levantador da sobrancelha interna* (AU101) foram inconsistentes [65] ou demonstraram que essa AU foi incapaz de prever dor [66].

Utilizando EquiFACS no contexto de manejos potencialmente estressantes (transporte e isolamento social), *levantador da sobrancelha interna* (AU101) foi identificada como uma unidade ação facial relevante [21]. Assim como Lundblad *et al.* [21], no presente estudo foram recrutados animais percebidos como saudáveis e que foram utilizados como seu próprio controle, logo, o risco de presença de dor pode ser considerado baixo, o

diferencial é que foram codificadas sequências de vídeos mais longos. Logo, os resultados obtidos reforçam a importância desta expressão facial para identificação de estresse em cavalos submetidos a isolamento social e demonstram que o enriquecimento social pode influenciar a expressão desta AU.

Contrapondo as demais expressões relacionadas aos olhos, que foram expressas com maior frequência quando os cavalos estavam isolados durante o manejo, a expressão *piscada* (AU145) demonstrou padrão distinto diferindo ao longo do tempo apenas quando os cavalos que estavam na companhia de um coespecífico. A taxa de piscada espontânea tem sido usada como um indicador de estresse em equinos [21,42,67,68], porém os resultados reportados até o momento têm sido inconsistentes, visto que tanto o aumento [21], quanto a diminuição de piscadas foram observados em cavalos isolados socialmente [42]. No presente estudo, não foram observadas diferenças na expressão dessa ação facial dos cavalos quando isolados. Além disso, o padrão observado quando receberam enriquecimento social, com aumento da frequência no I2 seguido por redução do I3, foi oposto ao descrito por Mott *et al.* [68], em que cavalos expostos a um evento estressante demonstraram diminuição, seguida por aumento na taxa de piscada.

O padrão observado para piscada neste estudo pode estar ligado aos mecanismos neurobiológicos subjacentes ao amortecimento social que, embora ainda não tenham sido plenamente elucidados, apontam que, as interações sociais podem levar à liberação de ocitocina na amígdala, a qual tem efeito positivo na transmissão de dopamina no núcleo accumbens, considerado a principal estrutura do corpo estriado ventral [5,69]. A taxa de piscada espontânea é mediada pela ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no corpo estriado, logo, o aumento da dopamina nessa região do cérebro durante a apresentação de recompensas ou eventos positivos, como as interações sociais, poderia induzir aumento desta expressão facial [68]. Embora, estes processos expliquem parcialmente os resultados observados, há necessidade de mais informações a respeito, em especial, estudos que relacionem esta unidade de ação facial ao amortecimento social.

Os cavalos quando isolados durante o manejo dilataram a narina com maior frequência do que quando receberam enriquecimento social. A abertura da narina pode mudar de diâmetro dependendo do estado fisiológico e psicológico do animal, sendo narinas dilatadas, em geral, relacionadas a postura de alerta [70], atenção e evitação [71], e dor [65,66]. Essa expressão facial está associada a investigação olfativa, permitindo que o cavalo agregue informações a respeito do ambiente quando em estado de alerta e atenção [70,72], assim como está associada ao aumento da frequência respiratória que ocorre em eventos estressantes em decorrência da ativação simpática, preparando o organismo para possível resposta de luta ou fuga [48,55]. Não surpreendentemente, descobertas prévias associam a *dilatação da narina* (AD38) a intervenções estressantes como transporte, isolamento social [21] e permanência em tronco de contenção [73] em experimentos realizados com equinos. Logo, os resultados aqui observados corroboram com achados anteriores e são suportados pelas respostas fisiológicas discutidas anteriormente, visto que, os maiores valores registrados para frequência respiratória também foram observados nos animais avaliados quando em isolamento.

A posição e o padrão de movimentação das orelhas têm sido associados a estados emocionais em animais com orelhas móveis, como equinos [22,71,74]. A movimentação das orelhas diferiu entre os tratamentos de forma que, os cavalos quando isolados movimentaram as orelhas para frente e para trás com maior frequência do que quando manejados na companhia de um coespecífico. Ademais, os valores de frequência por minuto para *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104) foram semelhantes, indicando que, provavelmente estes descritores estavam sendo expressos juntos. Esse padrão de movimentação está em linha com o descrito por Lundblad *et al.* [21], que reportaram aumento no índice de movimento "ear flicker", usado para descrever se, *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104) estavam ocorrendo juntos em intervalo de um segundo durante o estresse por transporte e isolamento social. Uma provável causa dos movimentos seria o aumento na percepção dos arredores devido à agitação e ou estado de alerta provocados pelo isolamento social.

É possível que este padrão de movimento das orelhas, descrito por meio dos descritores de ação facial *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104), seja um equivalente as “orelhas assimétricas” reportados na literatura, um padrão de comportamento apontado como provável indicador de experiências emocionais negativas [71,74]. Foi demonstrado que orelhas assimétricas poderiam refletir emoções de valência negativa em cavalos submetidos a procedimento fixo de escovação, capaz de induzir reações de evitação [75]. No trabalho de Lansade *et al.* [75], em conjunto com as orelhas assimétricas foram observadas com maior frequência expressões como olhos bem abertos e exposição da esclera. Assim, para elucidar como a posição e o movimento das orelhas podem estar associados ao estado emocional, é importante observar em conjunto outras expressões faciais.

Para analisar a dinâmica múltipla entre as expressões faciais avaliadas neste estudo foi conduzida uma análise de componentes principais. Uma associação positiva com o PC1 foi observada para as expressões *orelhas para frente* (EAD101), *orelhas para trás* (EAD104), *levantador da sobrançelha interna* (AU101), *meia piscada* (AU47), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1) e *dilatação da narina* (AD38), demonstrando que estas expressões apresentaram dinâmica semelhante entre si, aumentando ou diminuindo concomitantemente, considerando os tratamentos. Ademais, os resultados da PCA corroboraram com os resultados obtidos nas análises inferenciais prévias, sugerindo maior ocorrência dessas expressões no tratamento isolamento social.

Em contraste, o centroide do tratamento enriquecimento ambiental social localizado no quadrante positivo do PC2, indica menor ocorrência de expressões relacionadas a resposta ao estresse em cavalos quando acompanhados por um coespecífico. *Piscada* (AU145) foi a única expressão facial que mostrou associação positiva apenas com o PC2, demonstrando que esta expressão de fato, se comportou de forma antagônica as demais expressões consideradas relevantes em contextos estressantes. Isso pode implicar que esta unidade de ação seja relevante para o estudo do amortecimento social em cavalos.

As expressões relacionadas a movimentos orais como *bocejo* (AD76), *mastigação* (AD81) e *exposição da língua* (AD19) embora não tenham diferido entre os tratamentos na etapa inferencial, na PCA mostraram associação positiva com o PC1 e PC2, apresentando dinâmica semelhante entre si. O comportamento dessas expressões está alinhado com descrições prévias relatando que o bocejo pode ocorrer de forma intermitente com mastigação e exposição da língua [43]. Além disso, estes movimentos orais são considerados parte do conjunto de respostas autonômicas que ocorrem após um pico de atividade simpática [43], em decorrência da diminuição na atividade simpática e correspondente ativação do sistema nervoso parassimpático [55], o que justifica a associação positiva com ambos PCs. Compreender esse aspecto pode ajudar a elucidar as características distintas de expressões faciais utilizadas como indicadores de estresse, sendo plausível que algumas ocorram durante pico de atividade simpática, enquanto outras ocorram após, o que pode ser relevante para identificar as expressões mais adequadas para utilização, de acordo com o contexto e o tipo de estressor. Neste estudo, o estressor ao qual os animais foram expostos demonstrou ter efeito gradativo, e o pico da atividade simpática parece ter ocorrido no último intervalo de coleta/observação, o que pode explicar a ausência de significância para estas variáveis, já que não houve coletas após o pico.

Este estudo demonstra que o manejo de contenção em tronco é capaz de induzir uma resposta ao estresse mesmo em animais habituados, em especial quando encontram-se isolados. Quando os cavalos foram submetidos a este manejo em isolamento social foram observadas alterações importantes em parâmetros fisiológicos como aumento da frequência cardíaca, respiratória e temperatura ocular, confirmando que esta intervenção provocou perturbações no equilíbrio simpático-vagal e apontando aumento no nível de agitação. Em paralelo, foi observado aumento da frequência de várias expressões faciais associadas a resposta ao estresse, como *dilatador de narinas* (AD38), *levantador da sobrançelha interna* (AU101), *levantador da pálpebra* (AU5), *aumento do branco dos olhos* (AD1), *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104). Esse conjunto de expressões tem sido associadas tanto um aumento no nível de agitação quanto a experiências emocionais de valência

negativa. Logo, os resultados obtidos indicam que estes animais experimentaram um estado emocional de valência negativa/aversiva, e nível de agitação elevado.

Em conjunto, os parâmetros fisiológicos e faciais avaliados neste estudo apontam que a utilização de um coespecífico de forma estratégica como o enriquecimento ambiental social sem contato durante o manejo de contenção em tronco pode facilitar o amortecimento social, caracterizado pela mitigação de respostas ao estresse. Alguns pontos chave podem ter colaborado para o resultado obtido, e estão em concordância com publicações anteriores. Sendo eles a utilização de um parceiro calmo [56] e a oportunidade de socialização através de comunicação visual, auditiva e olfativa, uma vez que, modalidades sensoriais relevantes para interações sociais entre indivíduos da espécie são, em geral, importantes para mediação do amortecimento social [47,71,72,76].

O manejo de contenção em tronco, embora possa caracterizar uma experiência negativa, faz parte de procedimentos e práticas estressantes inerentes às boas práticas de criação. Neste contexto, o enriquecimento social oferece oportunidade para os animais lidarem com sucesso com esse estressor, o que impacta positivamente seu bem-estar. Além disso, o enriquecimento social é vantajoso para os profissionais envolvidos, pois animais mais calmos possibilitam manejos mais rápidos, eficientes e seguros.

5. Conclusão

O manejo de contenção em tronco induz resposta ao estresse mesmo em animais habituados, em especial quando encontram-se isolados. A avaliação das expressões faciais em conjunto com parâmetros fisiológicos proporciona resultados robustos de que durante essa intervenção os animais experimentam estado emocional de valência negativa/aversiva e nível de agitação elevado. Nesse contexto, a utilização de um coespecífico como enriquecimento ambiental social sem contato se mostra uma estratégia eficaz para mitigar o estresse induzido pelo manejo. Portanto, esta prática pode facilitar o amortecimento social em cavalos Pantaneiros submetidos a estresse de curta duração.

Referências

1. RILEY, C.B.; CREGIER, S.E.; FRASER, A.F. (Ed.) *Fraser's the Behaviour and Welfare of the Horse.*; CABI Publishing, 2022;
2. Vitale, V.; Balocchi, R.; Varanini, M.; Sgorbini, M.; Macerata, A.; Sighieri, C.; Baragli, P. The Effects of Restriction of Movement on the Reliability of Heart Rate Variability Measurements in the Horse (*Equus Caballus*). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **2013**, 8, 400–403, doi:10.1016/j.jveb.2013.02.003.
3. Vollenhoven, E. van; Fletcher, L.; Page, P.C.; Ganswindt, A.; Grant, C.C. Heart Rate Variability in Healthy, Adult Pony Mares During Transrectal Palpation of the Reproductive Tract by Veterinary Students. *J Equine Vet Sci* **2017**, 58, 68–77, doi:10.1016/j.jevs.2017.08.013.
4. Rault, J.L. Friends with Benefits: Social Support and Its Relevance for Farm Animal Welfare. *Appl Anim Behav Sci* **2012**, 136, 1–14, doi:10.1016/j.applanim.2011.10.002.
5. Kikusui, T.; Winslow, J.T.; Mori, Y. Social Buffering: Relief from Stress and Anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2006**, 361, 2215–2228, doi:10.1098/rstb.2006.1941.
6. Ricci-Bonot, C.; Romero, T.; Nicol, C.; Mills, D. Social Buffering in Horses Is Influenced by Context but Not by the Familiarity and Habituation of a Companion. *Sci Rep* **2021**, 11, 1–10, doi:10.1038/s41598-021-88319-z.
7. Baumans, V. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. *ILAR J* **2005**, 46, 162–170, doi:10.1093/ilar.46.2.162.
8. Bloomsmith, M.A.; Brent, L.Y.; Schapiro, S.J. Guidelines for Developing and Managing an Environmental Enrichment Program for Nonhuman Primates. *Lab Anim Sci* **1991**, 41, 372–377.
9. Stewart, K.L. *Experimental Variables*; Elsevier Inc., 2017; ISBN 9780128023662.

10. Tateo, A.; Padalino, B.; Boccaccio, M.; Maggiolino, A.; Centoducati, P. Transport Stress in Horses: Effects of Two Different Distances. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **2012**, *7*, 33–42, doi:10.1016/j.jveb.2011.04.007.
11. Ferguson, C.E.; Kleinman, H.F.; Browning, J. Effect of Lavender Aromatherapy on Acute-Stressed Horses. *J Equine Vet Sci* **2013**, *33*, 67–69, doi:10.1016/j.jevs.2012.04.014.
12. Visser, E.K.; Van Reenen, C.G.; Van der Werf, J.T.N.; Schilder, M.B.H.; Knaap, J.H.; Barneveld, A.; Blokhuis, H.J. Heart Rate and Heart Rate Variability during a Novel Object Test and a Handling Test in Young Horses. *Physiol Behav* **2002**, *76*, 289–296, doi:10.1016/S0031-9384(02)00698-4.
13. von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S.; Leterrier, C.; Marchant-Forde, J.; Marchant-Forde, R.; Minero, M.; Mohr, E.; Prunier, A.; et al. Heart Rate Variability as a Measure of Autonomic Regulation of Cardiac Activity for Assessing Stress and Welfare in Farm Animals - A Review. *Physiol Behav* **2007**, *92*, 293–316, doi:10.1016/j.physbeh.2007.01.007.
14. Mota-Rojas, D.; Pereira, A.M.F.; Wang, D.; Martínez-Burnes, J.; Ghezzi, M.; Hernández-Avalos, I.; Lendez, P.; Mora-Medina, P.; Casas, A.; Olmos-Hernández, A.; et al. Clinical Applications and Factors Involved in Validating Thermal Windows Used in Infrared Thermography in Cattle and River Buffalo to Assess Health and Productivity. *Animals* **2021**, *11*, doi:10.3390/ani11082247.
15. Soroko, M.; Howell, K. Infrared Thermography: Current Applications in Equine Medicine. *J Equine Vet Sci* **2018**, *60*, 90–96.e2, doi:10.1016/j.jevs.2016.11.002.
16. Verduzco-mendoza, A.; Bueno-nava, A.; Wang, D.; Martínez-burnes, J.; Olmos-hernández, A.; Casas, A.; Domínguez, A.; Mota-rojas, D. Experimental Applications and Factors Involved in Validating Thermal Windows Using Infrared Thermography to Assess the Health and Thermostability of Laboratory Animals. *Animals* **2021**, *11*, doi:10.3390/ani11123448.
17. König, U.; Visser, E.K.; Hall, C. Indicators of Stress in Equitation. *Appl Anim Behav Sci* **2017**, *190*, 43–56, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.018.
18. Descovich, K.A.; Wathan, J.; Leach, M.C.; Buchanan-Smith, H.M.; Flecknell, P.; Farningham, D.; Vick, S.J. Facial Expression: An under-Utilized Tool for the Assessment of Welfare in Mammals. *ALTEX* **2017**, *34*, 409–429, doi:10.14573/altex.1607161.
19. Wathan, J.; Burrows, A.M.; Waller, B.M.; McComb, K. EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–35, doi:10.1371/journal.pone.0131738.
20. Waller, B.M.; Julle-Daniere, E.; Micheletta, J. Measuring the Evolution of Facial ‘Expression’ Using Multi-Species FACS. *Neurosci Biobehav Rev* **2020**, *113*, 1–11, doi:10.1016/j.neubiorev.2020.02.031.
21. Lundblad, J.; Rashid, M.; Rhodin, M.; Andersen, P.H. Effect of Transportation and Social Isolation on Facial Expressions of Healthy Horses. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0241532.
22. Maurício, L.S.; Leme, D.P.; Hötzel, M.J. How to Understand Them? A Review of Emotional Indicators in Horses. *J Equine Vet Sci* **2023**, *126*, 104249, doi:10.1016/j.jevs.2023.104249.
23. Mendl, M.; Burman, O.H.P.; Paul, E.S. An Integrative and Functional Framework for the Study of Animal Emotion and Mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2010**, *277*, 2895–2904, doi:10.1098/rspb.2010.0303.
24. Russell, J.A. Core Affect and the Psychological Construction of Emotion. *Psychol Rev* **2003**, *110*, 145–172, doi:10.1037/0033-295X.110.1.145.
25. Ricci-Bonot, C.; Mills, D.S. Recognising the Facial Expression of Frustration in the Horse during Feeding Period. *Appl Anim Behav Sci* **2023**, *265*, 105966, doi:10.1016/j.applanim.2023.105966.
26. Bradshaw-Wiley, E.; Randle, H. The Effect of Stabling Routines on Potential Behavioural Indicators of Affective State in Horses and Their Use in Assessing Quality of Life. *Animals* **2023**, *13*, 1–16, doi:10.3390/ani13061065.

27. Henneke, D.R.; Potter, G.D.; Kreider, J.L.; Yeates, B.F. Relationship between Condition Score, Physical Measurements and Body Fat Percentage in Mares. *Equine Vet J* **1983**, *15*, 371–372. 775
776
28. Souza, A. de; Abreu, M.C.; de Oliveira-Júnior, J.F.; Aristone, F.; Fernandes, W.A.; Aviv-Sharon, E.; Graf, R. Climate Regionalization in Mato Grosso Do Sul: A Combination of Hierarchical and Non-Hierarchical Clustering Analyses Based on Precipitation and Temperature. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2022**, *65*, doi:10.1590/1678-4324-2022210331. 777
778
779
780
29. Souza, C.F.; Tinôco, I.F.F.; Baêta, F.C.; Ferreira, W.P.M.; Silva, R.S. Avaliação de Materiais Alternativos Para Confecção Do Termômetro de Globo. *Ciência e Agrotecnologia* **2002**, *26*, 157–164. 781
782
30. ESMAY, M.L. *Principles of Animal Environment*; Westport: AVI Publisher, 1979; 783
31. Schroter, R.C.; Marlin, D.J.; Jeffcott, L.B. Use of the Wet Bulb Globe Temperature (WBGT) Index to Quantify Environmental Heat Loads during Three-Day-Event Competitions. *Equine Vet J Suppl* **1996**, *22*, 3–6, doi:10.1111/j.2042-3306.1996.tb05025.x. 784
785
786
32. JONES, S. Horseback Riding in the Dog Days. *Animal Science e-News* **2009**, *2*, 3–4. 787
33. Purswell, J.L.; Gates, R.S.; Lawrence, L.M.; Davis, J.D. Thermal Environment in a Four-Horse Slant-Load Trailer. *Trans ASABE* **2010**, *200*, 1885–1894, doi:10.1016/j.buildenv.2021.107984. 788
789
34. Tantasavasdi, C.; Srisuwan, W.; Inprom, N. Effect of Opening on Environmental Conditions of a Naturally Ventilated Stable in Thailand. *Build Environ* **2021**, doi:10.1016/j.buildenv.2021.107984. 790
791
35. Santos, S.A.; da Silva, G.A.; de Rezende, A.S.C.; de Faria, D.A.; Soriano, B.M.; McManus, C. Heat Tolerance in Pantaneiro Horses Subjected to Different Exercise Regimes. *Pesqui Agropecu Bras* **2022**, *57*, doi:10.1590/S1678-3921.PAB2022.V57.02955. 792
793
794
36. McDuffee, L.; Mills, M.; McNiven, M.; Montelpare, W. Establishing Statistical Stability for Heart Rate Variability in Horses. *Journal of Veterinary Behavior* **2019**, *32*, 30–35, doi:10.1016/j.jveb.2019.05.003. 795
796
37. Feitosa, F.L.F. *Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico*; São Paulo: Roca, 2004; 797
38. Santos, S.A.; da Silva, L.A.C.; McManus, C.; Ítavo, C.C.B.F.; Barbosa, B.R.P.; Silva, G.A. da S.; Egito, A.A. do Termorregulação e Tolerância Ao Calor. In *Cavalo Pantaneiro: rústico por natureza*; Santos, S.A., Salis, S.M., Comastri Filho, J.A., Eds.; Brasília DF: Embrapa SPI, 2016; pp. 259–277. 798
799
800
39. Kim, S.M.; Cho, G.J. Validation of Eye Temperature Assessed Using Infrared Thermography as an Indicator of Welfare in Horses. *Applied Sciences (Switzerland)* **2021**, *11*, doi:10.3390/app11167186. 801
802
40. Steketee, J. Spectral Emissivity of Skin and Pericardium, Physics in Medicine and Biology. *Phys. Med. Biol.* **1973**, *18*, 686–694. 803
804
41. Thompson, C.L.; Scheidel, C.; Glander, K.E.; Williams, S.H.; Vinyard, C.J. *An Assessment of Skin Temperature Gradients in a Tropical Primate Using Infrared Thermography and Subcutaneous Implants*; Elsevier, 2017; Vol. 63; ISBN 6163312090. 805
806
807
42. Merkies, K.; Ready, C.; Farkas, L.; Hodder, A. Eye Blink Rates and Eyelid Twitches as a Non-Invasive Measure of Stress in the Domestic Horse. *Animals* **2019**, *9*, doi:10.3390/ani9080562. 808
809
43. Torcivia, C.; McDonnell, S. Equine Discomfort Ethogram. *Animals* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/ani11020580. 810
44. Kutner, M.H.; Nachtsheim, C.J.; Neter, J.; Li, W. *Applied Linear Statistical Models*; 5th ed.; McGraw-Hill/Irwin: New York, NY, USA, 2004; 811
812
45. Preacher, K.J.; MacCallum, R.C. Repairing Tom Swift's Electric Factor Analysis Machine. *Understanding Statistics* **2003**, *2*, 13–43, doi:10.1207/s15328031us0201_02. 813
814
46. Hair, J.F.; Babin, B.J.; Black, W.C.; Anderson, R.E. *Multivariate Data Analysis*; 7th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, NJ, USA, 2014; 815
816
47. Wu, A. Social Buffering of Stress – Physiological and Ethological Perspectives. *Appl Anim Behav Sci* **2021**, *239*, 105325, doi:10.1016/j.applanim.2021.105325. 817
818

48. Stewart, M.; Webster, J.R.; Schaefer, A.L.; Cook, N.J.; Scott, S.L. Infrared Thermography as a Non-Invasive Tool to Study Animal Welfare. *Animal Welfare* **2005**, *14*, 319–325, doi:10.1017/s096272860002964x. 819–820
49. Yarnell, K.; Hall, C.; Billett, E. An Assessment of the Aversive Nature of an Animal Management Procedure (Clipping) Using Behavioral and Physiological Measures. *Physiol Behav* **2013**, *118*, 32–39, doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.013. 821–823
50. Kay, R.; Hall, C. The Use of a Mirror Reduces Isolation Stress in Horses Being Transported by Trailer. *Appl Anim Behav Sci* **2009**, *116*, 237–243, doi:10.1016/j.applanim.2008.08.013. 824–825
51. Fenner, K.; Yoon, S.; White, P.; Starling, M.; McGreevy, P. The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0154179. 826–827
52. Fenner, K.; Yoon, S.; White, P.; Starling, M.; McGreevy, P. The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0154179. 828–829
53. Leiner, L.; Fendt, M. Behavioural Fear and Heart Rate Responses of Horses after Exposure to Novel Objects: Effects of Habituation. *Appl Anim Behav Sci* **2011**, *131*, 104–109, doi:10.1016/j.applanim.2011.02.004. 830–831
54. McLean, A.N.; Christensen, J.W. The Application of Learning Theory in Horse Training. *Appl Anim Behav Sci* **2017**, *190*, 18–27, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.020. 832–833
55. McGreevy, P.; Christensen, J.W.; Borstel, U.K. von; McLean, A. *Equitation Science*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2018; 834–835
56. Christensen, J.W.; Malmkvist, J.; Nielsen, B.L.; Keeling, L.J. Effects of a Calm Companion on Fear Reactions in Naïve Test Horses. *Equine Vet J* **2008**, *40*, 46–50, doi:10.2746/042516408X245171. 836–837
57. Ijichi, C.; Evans, L.; Woods, H.; Yarnell, K. The Right Angle: Validating a Standardised Protocol for the Use of Infra-Red Thermography of Eye Temperature as a Welfare Indicator. *Animal Welfare* **2020**, *29*, 123–131, doi:10.7120/09627286.29.2.123. 838–840
58. Pierard, M.; Hall, C.; König von Borstel, U.; Averis, A.; Hawson, L.; McLean, A.; Nevison, C.; Visser, K.; McGreevy, P. Evolving Protocols for Research in Equitation Science. *Journal of Veterinary Behavior* **2015**, *10*, 255–266, doi:10.1016/j.jveb.2015.01.006. 841–843
59. Stewart, M.; Webster, J.R.; Verkerk, G.A.; Schaefer, A.L.; Colyn, J.J.; Stafford, K.J. Non-Invasive Measurement of Stress in Dairy Cows Using Infrared Thermography. *Physiol Behav* **2007**, *92*, 520–525, doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.034. 844–846
60. Tomberg, C.; Petagna, M.; Selliers de Moranville, L.-A. Horses (*Equus Caballus*) Facial Micro - Expressions : Insight into Discreet Social Information. *Sci Rep* **2023**, 1–15, doi:10.1038/s41598-023-35807-z. 847–848
61. Lambert (Proctor), H.S.; Carder, G. Looking into the Eyes of a Cow: Can Eye Whites Be Used as a Measure of Emotional State? *Appl Anim Behav Sci* **2017**, *186*, 1–6, doi:10.1016/j.applanim.2016.11.005. 849–850
62. Klein, B.G. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*; Sixth Edit.; Elsevier, 2020; 851
63. Dalla Costa, E.; Minero, M.; Lebelt, D.; Stucke, D.; Canali, E.; Leach, M.C. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0092281. 852–854
64. Glerup, K.B.; Forkman, B.; Lindegaard, C.; Andersen, P.H. An Equine Pain Face. *Vet Anaesth Analg* **2015**, *42*, 103–114, doi:10.1111/vaa.12212. 855–856
65. Rashid, M.; Silventoinen, A.; Glerup, K.B.; Andersen, P.H. Equine Facial Action Coding System for Determination of Pain-Related Facial Responses in Videos of Horses. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–18, doi:10.1371/journal.pone.0231608. 857–859
66. Ask, K.; Rhodin, M.; Rashid-Engström, M.; Hernlund, E.; Andersen, P.H. Changes in the Equine Facial Repertoire during Different Orthopedic Pain Intensities. *Sci Rep* **2022**, 1–11, doi:10.1038/s41598-023-50383-y. 860–861

67. Lelláková, M.; Pavlak, A.; Lešková, L.; Florián, M.; Skurková, L.; Mesarčová, L.; Kottferová, L.; Takáčová, D.; Kottferová, J. Monitoring Blinks And Eyelid Twitches In Horses To Assess Stress During The Samples Collection Process. *Journal of Applied Animal Welfare Science* **2023**, *26*, 530–539, doi:10.1080/10888705.2021.2008249.
68. Mott, R.O.; Hawthorne, S.J.; McBride, S.D. Blink Rate as a Measure of Stress and Attention in the Domestic Horse (*Equus Caballus*). *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-78386-z.
69. Hostinar, C.E.; Sullivan, R.M.; Gunnar, M.R. Psychobiological Mechanisms Underlying the Social Buffering of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis: A Review of Animal Models and Human Studies across Development. *Psychol Bull* **2014**, *140*, 256–282, doi:10.1037/a0032671.
70. Waring, G.H. *Horse Behavior*; 2nd ed.; Elsevier Science, 2003;
71. Wathan, J.; Proops, L.; Grounds, K.; McComb, K. Horses Discriminate between Facial Expressions of Conspecifics. *Sci Rep* **2016**, *6*, 1–11, doi:10.1038/srep38322.
72. Bini de Lima, A.C.; Sebastião da Fé, V.C.; Palermo Hernandez, M.S.; Oliveira dos Santos, V.M. Olfactory Stimulation as Environmental Enrichment for Domestic Horses — A Review. *Animals* **2023**, *13*, 0–14.
73. Carmo, L.G.; Werner, L.C.; Michelotto, P. V.; Daros, R.R. Horse Behavior and Facial Movements in Relation to Food Rewards. *PLoS One* **2023**, *18*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0286045.
74. Hall, C.; Randle, H.; Pearson, G.; Preshaw, L.; Waran, N. *Assessing Equine Emotional State*; Elsevier B.V., 2018; Vol. 205; ISBN 1158485212.
75. Lansade, L.; Nowak, R.; Lainé, A.-L.; Leterrier, C.; Bonneau, C.; Parias, C.; Bertin, A. Facial Expression and Oxytocin as Possible Markers of Positive Emotions in Horses. *Sci Rep* **2018**, *8*, 1–11, doi:10.1038/s41598-018-32993-z.
76. Yeon, S.C. Acoustic Communication in the Domestic Horse (*Equus Caballus*). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **2012**, *7*, 179–185, doi:10.1016/j.jveb.2011.08.004.

**ARTIGO 2: ENRIQUECIMENTO OLFATIVO COM ÓLEO ESSENCIAL DE
LAVANDA INFLUENCIA EXPRESSÕES FACIAIS E PARÂMETROS
FISIOLÓGICOS DE EQUINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE DE CURTA
DURAÇÃO**

Enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda influencia expressões faciais e parâmetros fisiológicos de equinos submetidos a estresse de curta duração

Ana Caroline Bini de Lima ¹ * e Viviane Maria Oliveira dos Santos ¹

Programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brasil;

*Correspondência: carolinebini@hotmail.com

Resumo: O trabalho foi realizado para avaliar a capacidade do enriquecimento sensorial olfativo com óleo essencial de lavanda reduzir respostas ao estresse, e caracterizar a experiência emocional de cavalos submetidos ao manejo de contenção em tronco e isolamento social por meio da avaliação de parâmetros fisiológicos e comportamentais. Foram avaliados equinos da raça Pantaneiro (n=7) em delineamento crossover com tratamento lavanda (óleo essencial de *Lavandula angustifolia*) e tratamento controle (triglicérides de ácido cáprico e caprílico, TACC). Parâmetros fisiológicos (temperatura ocular por termografia infravermelha – TOT; temperatura auricular por termômetro infravermelho – TAT; frequência respiratória – FR; frequência cardíaca – FC; variabilidade da frequência cardíaca – VFC) e comportamentais (comportamento geral e expressões faciais) foram avaliados ao longo dos 24 minutos que os animais permaneceram contidos. A FC foi menor para o tratamento lavanda em comparação ao controle após a estimulação olfativa ($p<0,05$). Paralelamente, foi observado aumento da TOT ($p<0,05$) para o tratamento lavanda. A frequência de expressões faciais associadas a resposta ao estresse como, *dilatador de narinas* (AD38), *mastigação* (AD81), *exposição da língua* (AD19) e *piscada* (AU145), também foram menores ($p<0,05$) para lavanda. O manejo de contenção em tronco associado ao isolamento social induz resposta ao estresse mesmo em animais habituados. Nesse contexto, o enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda se mostrou uma estratégia eficaz para atenuar o estresse de curta duração induzido pelo manejo, resultando em redução de parâmetros indicadores de estresse, associados a alta agitação e valência negativa.

Palavras-chave: Bem-estar; comportamento; enriquecimento sensorial; estímulo olfativo.

1. Introdução

A implementação de estratégias de enriquecimento ambiental tem se tornado cada vez mais comum em centros equestres, refletindo a crescente preocupação com o bem-estar animal. O termo enriquecimento ambiental engloba uma série de modificações realizadas no ambiente de animais mantidos sob cuidados humanos, com o propósito de fornecer estimulação adequada e facilitar a expressão de comportamentos altamente motivados [1,2]. Essas modificações resultam em um ambiente interativo e complexo, o que pode melhorar consideravelmente a qualidade de vida dos animais. Para facilitar a aplicação prática, o enriquecimento ambiental normalmente é dividido em cinco categorias não mutuamente exclusivas: enriquecimento físico, enriquecimento social, enriquecimento sensorial, enriquecimento ocupacional ou cognitivo e enriquecimento alimentar [3–5].

A estimulação sensorial, prática que se baseia na utilização de estímulos projetados para desencadear uma ou mais modalidades sensoriais do animal, tem sido explorada como método de enriquecimento sensorial [6]. Para equinos a estimulação olfativa é particularmente interessante, pois o uso de estímulos olfativos pode aumentar a diversidade comportamental, e a capacidade dos animais de lidar com desafios, assim como, estimular comportamentos típicos da espécie [7]. Além disso, odores são relativamente baratos, fáceis de armazenar e podem tornar-se dinâmicos no tempo e no espaço, conferindo aspecto de novidade [8]. Logo, além dos benefícios que pode conferir aos animais, o enriquecimento sensorial olfativo é notável do ponto de vista prático.

Atualmente o uso de odores biologicamente irrelevantes à base de plantas, em especial óleos essenciais, tem expandido [7,9–11]. Os óleos essenciais são compostos voláteis, formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários, geralmente obtidos por vapor ou hidrodestilação [12]. O óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) tem sido o mais empregado em pesquisas desenvolvidas com equinos. Este óleo essencial conhecido por seu efeito do tipo ansiolítico em modelos animais [13], demonstrou ser capaz de atenuar a resposta ao estresse de cavalos expostos a diferentes tipos de estressores [9,14,15]. Todavia, para que seja possível a utilização segura e eficiente do enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda, se faz necessário a realização de novas pesquisas em diferentes contextos relacionados a desafios usuais enfrentados por equinos no ambiente doméstico.

O manejo de contenção em tronco representa um contexto relevante, em o que uso dessa estratégia de enriquecimento ainda precisa ser testado. Esse manejo é realizado rotineiramente para facilitar cuidados veterinários, palpação retal, exame ultrassonográfico e outros procedimentos reprodutivos [16]. Porém, estudos demonstram que a restrição de movimentos imposta pelo tronco de contenção pode ser aversiva até mesmo para equinos habituados, sendo capaz de induzir resposta ao estresse de curta duração [17,18]. Ademais, é comum que os cavalos sejam privados da companhia de um coespecífico durante o período de permanência no tronco, tornando o procedimento mais desafiador, visto que o isolamento social impacta negativamente animais gregários [19–22].

Para avaliar o efeito do óleo essencial de lavanda em cavalos, trabalhos realizados anteriormente focaram principalmente no uso de parâmetros fisiológicos como frequência respiratória (FR) [14], frequência cardíaca (FC) [9,14,15,23], variabilidade da frequência cardíaca (VFC) [23] e cortisol [9,15]. Com relação a parâmetros comportamentais, foram eleitos em especial comportamentos gerais considerados indicadores de estresse [9,14]. Entretanto, parâmetros como temperatura ocular por termografia infravermelha e expressões faciais também podem fornecer informações valiosas sobre a capacidade do óleo essencial atenuar a resposta ao estresse e a experiência emocional do animal durante o procedimento [19,24–26].

As experiências emocionais podem ser classificadas de acordo com seu nível de agitação (alta ou baixa) e sua valência (positiva/agradável/atraente ou negativa/desagradável/aversiva) [27,28]. Em geral, situações estressantes levam a produção de expressões faciais que estão associadas a alto nível de agitação e valência negativa em equinos [19,29,30]. Essas expressões podem ser avaliadas de forma robusta por meio do Sistema de Codificação de Ação Facial Equina (EquiFACS) que, fornece uma lista de todos os movimentos faciais que animais cavalos podem produzir, e tornou possível a identificação e codificação de expressões faciais com base na musculatura facial subjacente e no movimento muscular [31,32].

Recentemente, o EquiFACS foi utilizado com sucesso em trabalho realizado com o objetivo de identificar expressões faciais relevantes produzidas por equinos submetidos a transporte e isolamento social, ambas intervenções consideradas potencialmente estressantes [19]. No entanto, o uso desta ferramenta em conjunto com parâmetros fisiológicos para investigar a resposta de cavalos recebendo enriquecimento sensorial olfativo durante procedimentos estressantes, ainda precisa ser testada.

Este trabalho foi realizado para avaliar a capacidade do enriquecimento sensorial olfativo com óleo essencial de lavanda reduzir respostas ao estresse, e caracterizar a experiência emocional de cavalos submetidos ao manejo de contenção em tronco, e isolamento social por meio da avaliação de parâmetros fisiológicos (temperatura ocular por termografia infravermelha, temperatura auricular por termômetro infravermelho, frequência respiratória, frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca) e comportamentais (comportamento geral e expressões faciais). Espera-se que, o enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda atenuar a resposta ao estresse de curta duração, resultando em redução de parâmetros indicadores de estresse, associados a alta agitação e valência negativa.

2. Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS, Campo Grande, Brasil) sob o protocolo nº 1.222/2022.

2.1. Animais, alojamento e habituação

Sete equinos da raça Pantaneiro (4 machos castrados e 3 fêmeas) com em média $5 \pm 1,0$ anos de idade, $330,8 \pm 16,5$ kg de peso corporal e escore de condição corporal (ECC) 5 de acordo com Henneck *et al.* [33], foram selecionados para participar deste experimento. Os animais pertencem à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e são mantidos na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), localizada no município de Terenos-MS ($20^\circ 26' 18''$ Sul, $54^\circ 51' 24''$ Oeste), cujo clima é Aw (savana tropical com invernos secos), segundo a classificação de Köppen [34]. Todos os indivíduos selecionados foram mantidos desde o nascimento em grupos sociais, alojados em piquetes da propriedade com acesso *ad libitum* à pastagem (*Panicum maximum* cv. Tamani), sal mineral e água, e permaneceram nessas condições durante o período experimental quando não estavam sendo avaliados.

Antes do início do período experimental os animais passaram por habituação ao local, aos equipamentos e procedimentos necessários para coleta de dados. Para tal, durante uma semana os animais foram conduzidos ao tronco de contenção, onde permaneceram por 3 minutos, e expostos aos equipamentos e procedimentos que seriam realizados ao longo do experimento. Os cavalos foram considerados aptos para uso quando atendiam aos seguintes critérios: entrar no tronco sem apresentar qualquer tipo de resistência e não demonstrar comportamento de aproximação ou evitação em relação aos equipamentos durante os procedimentos.

2.2. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o crossover com tratamento lavanda (óleo essencial de *Lavandula augustifolia*) e tratamento controle (triglicérides de ácido cáprico e caprílico, TACC). Os equinos foram aleatoriamente designados para que metade recebesse o tratamento lavanda primeiro e a outra metade recebesse o tratamento controle primeiro (Figura 1). Todos os animais receberam ambos os tratamentos uma vez, com o intervalo de uma semana entre os dois (Figura 1), no mesmo horário do dia (7h30 às 10h30) permitindo assim que cada cavalo servisse como seu próprio controle.

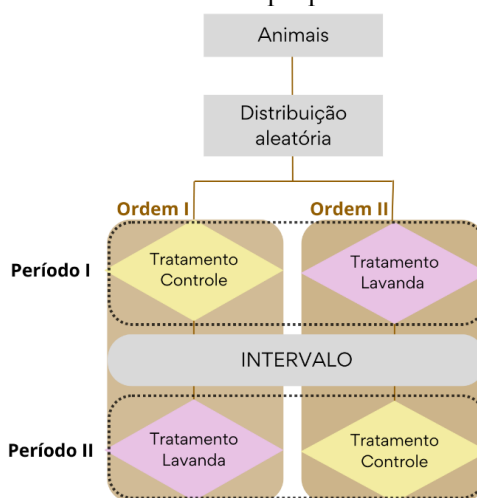


Figura 1. Diagrama do delineamento experimental.

O óleo essencial de lavanda utilizado no estudo foi o Lavanda 40/42 GT França (Lote LZ2384) (*Lavandula augustifolia*) fornecido pela empresa Laszlo® (Belo Horizonte, MG, Brasil). De acordo com a descrição do fabricante os principais componentes presentes no

produto foram: linalool 48-52%, acetato de linalila 40-44%, acetato de lavandulila <1%, acetato de bornila <1%, terpinen-4-ol <1%, β -cariofileno <1%, cânfora <1%.

Os triglicérides de ácido cáprico e caprílico são triglicérides de cadeia média (TCM). Esse produto de origem vegetal, foi escolhido como controle neste estudo por ser caracterizado como incolor e inodoro [35], e popularmente utilizado como carreador de óleos essenciais por não interferir no odor de formulações. Foi utilizado os TACC (CRODAMOL GTCC) (Lote 19.0074-0190213) comercializado pela Biovital® (São Paulo, SP, Brasil). De acordo com a descrição do fabricante os principais componentes presentes no produto foram: C6 0-2%, C8 50-80%, C10 20-50%, C12 0-3%, C14 0-1%.

2.3. Condições ambientais

O experimento foi conduzido no verão em Fevereiro de 2022, e, para caracterizar o ambiente ao qual os animais estavam expostos e descartar estresse térmico como possível fator de confundimento, foram monitorados os parâmetros microclimáticos: temperatura de bulbo seco do ar (Tbs, °C), temperatura de globo negro (Tgn, °C), temperatura de ponto de orvalho em (Tpo, °C), temperatura de bulbo úmido do ar (Tbu, °C), umidade relativa do ar (UR%) e velocidade do vento (Vv, m/s).

As medidas foram tomadas em intervalos de 10 minutos, entre 7h00 e 11h00 nos dias de coleta, com auxílio de termo-higrômetros digitais (AK172®; AKSO, São Leopoldo, RS, Brasil), inseridos em abrigos meteorológicos. Para a temperatura de globo negro, foi utilizado o mesmo modelo de termo-higrômetro encapsulado em bolas plásticas de PVC (0,15 cm de diâmetro), pintadas externamente com tinta de cor preto fosco de acordo com o proposto por Souza *et al.* [36]. Os equipamentos foram alocados em dois locais: em pleno sol, e dentro da instalação onde os animais permaneceram durante os testes, a 1,50 m da superfície do solo, durante o período de insolação, considerando-se a variação da projeção da sombra e ângulo zenital.

A partir dos dados microclimáticos foram calculados: Carga térmica radiante (W/m^2), conforme equação proposta por Esmay [37]; Índice de bulbo úmido e temperatura de globo (WBGT), conforme equação descrita por Schroter *et al.* [38]; Índice de conforto térmico (TCI) conforme equação proposta por Jones [39]. Com os dados obtidos foi possível caracterizar o ambiente ao qual os animais estavam expostos e a condição de conforto térmico dos animais durante o período 1 e 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Ambiente térmico e índices bioclimáticos para caracterização do ambiente experimental.

Parâmetros	Período	Mínimo	Máximo	Médio	Desvio padrão
Temperatura do ar (°C)	1	26	37	30	2,7
	2	23	33	28	2,7
Umidade relativa (%)	1	51	82	67	8,5
	2	54	93	74	11,2
Carga térmica radiante (W/m^2)	1	466	542	502	20,1
	2	453	533	495	21,7
Índice de bulbo úmido e temperatura de globo - WBGT (°C)	1	23	33	27	2,4
	2	21	29	25	2,2
Índice de conforto térmico - TCI	1	144	162	154	5,0
	2	145	167	157	6,8

A temperatura do ar, umidade relativa e carga térmica radiante refletem o esperado para região nesta época do ano, visto que, o clima Aw é caracterizado por verões chuvosos e com temperaturas altas [34]. Ainda assim, os valores médios obtidos para WBGT foram <28 °C, logo considera-se que houve baixo risco de estresse térmico [40,41].

Os valores médios obtidos para TCI excederam 130, o que pode indicar um ambiente desconfortável termicamente [39]. No entanto, os cavalos utilizados neste trabalho pertencem a uma raça nativa adaptada que demonstrou ser capaz de manter relativa

homeostase, mesmo que o índice aplicado para avaliação do estresse térmico em equinos (TCI) tenha excedido a 130 [42].

2.4. Procedimento experimental

No período experimental, os animais foram avaliados individualmente no período da manhã, totalizando quatro animais por dia. Para o manejo, cada animal foi conduzido ao tronco de contenção, sendo este construído de postes sólidos e fixado em área coberta com laterais parcialmente fechadas, para restrição da movimentação e impedimento do contato físico ou visual com coespecíficos (isolamento social). Após 10 minutos foi administrado o tratamento lavanda ou controle.

As amostras de odores foram preparadas em um laboratório próximo a área experimental, imediatamente antes da apresentação do estímulo olfativo, colocando um papel de filtro em placa de petri e adicionando 10 gotas (~ 0,5 mL) do óleo essencial usando o aplicador integrado no frasco. Uma vez pronta, a amostra foi ofertada à frente do animal à 0,5 m de distância durante 5 minutos para estimulação olfativa. Durante este período foi adotado pela pesquisadora uma expressão facial neutra para evitar possível influência sobre o comportamento (Figura 2).

A forma de apresentação do estímulo olfativo adotada neste estudo é caracterizada como concentrada, pois envolve fornecer o odor em um recipiente, esse tipo de apresentação permite que os animais tenham maior autonomia ao interagir com os estímulos olfativos [43]. Mesmo diante da restrição de movimento imposta pelo tronco de contenção, foram preservadas a mobilidade do pescoço e cabeça e os animais tinham liberdade para interagir ou não com o estímulo olfativo.



Figura 2. Preparação da amostra e estimulação olfativa através de apresentação concentrada do óleo essencial de lavanda, ou TACC.

Parâmetros fisiológicos e comportamentais foram avaliados antes, durante e após a apresentação do estímulo olfativo. Durante a permanência no tronco de contenção os parâmetros TOT (temperatura ocular por termografia infravermelha), TAT (temperatura auricular por termômetro infravermelho) e FR (frequência respiratória) foram coletados em momentos pontuais descritos como pontos de coleta P1, P2, P3 e P4. Já os parâmetros EF/COMP (expressões faciais e comportamentos gerais), e a FC/VFC (frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca) foram coletados continuamente, mas analisados somente nos intervalos de 5 minutos identificados como I1, I2 e I3 (Figura 3).



Figura 3. Procedimento experimental. TOT = temperatura superficial por termografia infravermelha; TAT = temperatura auricular por termômetro infravermelho; FR = frequência respiratória; EF = expressão facial; COMP = comportamentos gerais; FC = frequência cardíaca; VFC = variabilidade da frequência cardíaca.

2.5. Parâmetros fisiológicos

2.5.1. Frequência cardíaca (FC) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

Os parâmetros FC e VFC foram mensurados com auxílio do transmissor de frequência cardíaca Polar H10 (Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia). O transmissor de frequência cardíaca foi fixado à cinta elástica e posicionado na região torácica entre o 4º e 5º espaço intercostal do lado esquerdo do tórax. A cinta foi embebida em água e ajustada no corpo dos animais 10 minutos antes do início da coleta de dados. Visando melhorar a transmissão dos sinais elétricos do corpo para os eletrodos, foi realizada limpeza dos pelos com água.

A FC e a gravação de vídeo para avaliação das expressões faciais e comportamentos gerais foram iniciadas ao mesmo tempo para garantir que os intervalos no vídeo se relacionassem diretamente com os intervalos da FC e VFC. Os dados foram coletados e exportados através do App Elite HRV (Elite HRV, Asheville, NC, USA), e a análise dos dados foi realizada através do software Kubios HRV standard, versão 3.5.0 (Kubios Oy, Kuopio, Finlândia). Para análise, uma correção de artefato média foi aplicada para reduzir o erro em todo o conjunto amostral, conforme metodologia de MCDUFFEE *et al.* [44], que permite correção menor ou igual a 15%. Todas as 14 amostras tiveram porcentagem de artefatos corrigidos menor do que 5%.

Intervalos de cinco minutos foram selecionadas para análise dos índices de VFC e média da frequência cardíaca. Para este estudo foram selecionados os seguintes índices de VFC referentes ao domínio da frequência: potência de baixa frequência (Low Frequency – LF, nu), potência de alta frequência (High Frequency – HF, nu) e razão de baixa frequência para alta frequência (LF/HF). A banda de baixa frequência (LF) foi definida em 0,04-0,15 Hz, enquanto a banda de alta frequência (HF) foi definida em 0,15-0,4 Hz [44].

2.5.2. Frequência respiratória (FR)

A frequência respiratória, mensurada em movimentos por minuto (mpm), foi realizada através da contagem dos movimentos do flanco por 30 segundos. Os valores foram multiplicados por dois para determinar a frequência respiratória/min.

2.5.3. Temperatura ocular por termografia infravermelha (TOT)

Para este procedimento, todos os animais passaram por higienização da face 15 minutos antes do início das coletas afim de evitar artefatos que pudessem afetar a medição da temperatura. Imagens termográficas oculares foram registradas para mensuração da temperatura superficial na região do canto medial, como proposto por Kim e Cho [45]. As imagens foram coletadas do lado esquerdo em um ângulo de 90º graus do plano sagital do animal, a 0,5m de distância, em local livre de exposição à luz solar direta.

O equipamento utilizado foi a câmera termográfica (S60, Caterpillar FLIR câmera, Vernon Hills, IL, USA) com resolução térmica de 80x60 pixels, resolução visual de 640x480 e sensibilidade térmica de 150 mK. A emissividade foi ajustada em 0,98, valor correspondente ao utilizado para a pele de mamíferos [46,47].

O software FLIR tools, versão 6.4.18039.1003 (FLIR Systems Inc, Oregon, EUA) foi usado para análise das imagens termográficas. A distância em que as imagens foram registradas, bem como temperatura e umidade, foram incluídas no software, que corrige eventuais variações ambientais.

2.5.4. Temperatura auricular por termômetro infravermelho (TAT)

A TAT foi aferida por meio de termômetro digital portátil com dispositivo de luz infravermelha (Mult Temp Portátil, Incoterm, Porto Alegre, RS, Brasil), direcionado no ponto central da cavidade auricular, sob a orelha esquerda do animal, à uma distância de 0,3m.

2.6. Parâmetros comportamentais

2.6.1. Gravação de vídeo

Para avaliação dos parâmetros faciais, durante todo o período que o animal permaneceu no troco de contenção gravações de vídeo foram realizadas usando a câmera digital Canon EOS SL3 (Canon Inc., São Paulo, SP, Brasil). A resolução foi definida para 1080p a 30 fps e os vídeos foram exportados no formato mp4. A câmera foi posicionada à 1,5m de distância com um ângulo de aproximadamente 45° graus do plano medial do cavalo.

2.6.2. Processamento e codificação de vídeos com sistema de codificação de ação facial equina (EquiFACS)

O EquiFACS, conforme descrito por Wathan *et al.* [48] foi utilizado para codificação de expressões faciais em todos os vídeos. Para este trabalho foram selecionadas 4 unidades de ação (AUs) e 6 descritores de ação (ADs) e um código de visibilidade (CV) (Tabela 2), que correspondem a expressões faciais que demonstraram ser relevantes para avaliação de equinos expostos a estressores em trabalhos realizados anteriormente [19,49,50].

Tabela 2. Códigos pertencentes ao EquiFACS selecionados para codificação de expressões faciais em vídeos de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco e isolamento social).

Código	Crítérios mínimos para codificar
I. Unidade de ação (AU)	
Levantador da pálpebra superior (AU5)	Um aumento na abertura do olho causado pela elevação da pálpebra superior
Meia piscada (AU47)	Redução na abertura do olho
Piscada (AU145)	Ambas as pálpebras devem se mover juntas para cobrir o olho, e essa ação deve ser revertida em meio segundo
Levantador do canto interno (AU101)	Movimento dorsal da pele acima da região interna do olho
II. Descritores de ação (AD)	
Aumento do branco dos olhos (AD1)	Um aumento na porcentagem de esclera branca visível
Exposição da língua (AD19)	A língua é exposta e vai além dos dentes
Dilatador de narinas (AD38)	Um aumento na abertura da narina
Mastigação (AD81)	Crítérios mínimos para codificar não descritos
Orelhas para frente (EAD101)	Rotação rostral do pavilhão auricular
Rotador de orelhas/orelhas para trás (EAD104)	O pavilhão auricular rotaciona caudalmente
Face Inteira Não Visível (CV73)	Toda a face está fora de vista ou não pode ser vista claramente

Para codificação foram selecionados cliques de 5 minutos obtidos antes, durante e após a estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente). Todos os vídeos foram observados por um único codificador certificado pelo EquiFACS com concordância interobservador >70% em comparação com codificadores experientes. Para observação, uma lista com os códigos selecionados foi inserida no software BORIS versão 6.0.6 (Friard and Gamba, Universidade de Turin, Turin, Itália). Os cliques foram observados pela primeira vez em velocidade normal e em seguida, ao longo de pelo menos três vezes novamente em câmera lenta ou em frame-by-frame para observação de cada uma das três regiões da face do cavalo (orelhas, face superior e face inferior).

Foi registrada a frequência por minuto de cada um dos códigos selecionados, com exceção do CV73, para o qual foi registrado a duração em segundos. O CV73 foi usado para denotar por quanto tempo a face inteira não estava visível para codificação. Dessa forma, foi possível monitorar por quanto tempo a face estava em posição visível para

codificação, ou não, em cada intervalo de 5 minutos. Para cálculo da frequência por minuto dos AUs e ADs apenas o tempo em que face estava em posição visível para codificação foi considerado, conforme a equação:

$$\text{Frequência por minuto AU ou AD} = \text{N}^\circ \text{ total de registros} \div 5\text{min} - \text{CV73}$$

Dentre 42 clipes de 5 minutos selecionados, a face esteve em posição visível para codificação em 19 por período ≥ 4 minutos, em 22 por período ≥ 3 minutos e em apenas 1 por período de 2,4 minutos.

2.6.3. Processamento de vídeos e avaliação de comportamentos gerais

O etograma utilizado foi baseado no etograma proposto por Torcivia e McDonnell [50] para avaliação comportamental de desconforto em cavalos doméstico, e no etograma usado por Rørvang *et al.* [10] para investigação das habilidades olfativas de cavalos domésticos, tendo em vista que os animais neste estudo foram submetidos a intervenções ligadas a estresse e desconforto, e expostos a estímulos olfativos (Tabela 3).

Tabela 3. Etograma descritivo para avaliação comportamental de cavalos submetidos a estresse de curta duração (manejo de contenção em tronco e isolamento social).

Comportamento	Descrição
Cavar	Protação um membro anterior e retração do casco ao longo ou acima do substrato enquanto faz a varredura caudalmente, geralmente em séries rítmicas
Autocatação	Mordiscar, esfregar e/ou morder uma área do corpo, esfregar uma parte do corpo em outra ou contra um objeto
Defecar	Evacuação de fezes
Comportamento direcionado ao estímulo olfativo	
Farejar	Focinho próximo (menos de 12 cm) ou em contato direto com o recipiente contendo o odor

Para avaliação dos comportamentos dispostos no etograma, foram selecionados clipes de 5 minutos de duração obtidos antes, durante e após a estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente). O comportamento “farejar” pôde ser avaliado somente no I2, durante a estimulação olfativa. Todos os vídeos foram avaliados por um único observador. Para tal, o etograma foi inserido no software BORIS versão 6.0.6 (Friard and Gamba, Universidade de Turin, Turin, Itália).

Amostragem focal contínua foi usada para avaliar os comportamentos de cada cavalo. Para o comportamento defecar foi avaliada a ocorrência (presença ou ausência), enquanto para os comportamentos “cavar” e “autocatação” foi avaliada a frequência ao longo dos intervalos de 5 minutos (I1, I2 e I3). Para o comportamento “farejar”, foi avaliada a duração em segundos do comportamento somente no I2, quando os animais estavam expostos ao estímulo olfativo.

2.7. Descrição estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 4.1.0 (2021-06-29), RStudio, Inc.). As funções e os pacotes utilizados foram apresentados no formato ‘pacote::função’ correspondente à linguagem de programação em R. Para todos os testes foi considerada significância de 5%.

A priori, foi realizada uma análise inferencial para identificar diferenças entre os tratamentos (controle vs lavanda) e ao longo do tempo (P1 vs P2 vs P3 vs P4 ou I1 vs I2 vs I3). Foram conduzidos modelos lineares multinível (lme4::lmer) para as seguintes variáveis resposta em que os resíduos do modelo apresentaram aderência à normalidade pelo teste de Cramer-Von Mises (nortest::cvm.test): FC média, LF, HF, LF/HF, frequência

respiratória, temperatura auricular, temperatura ocular, farejar, *levantador da pálpebra superior* (AU5), *levantador do canto interno* (AU101), *dilatador de narinas* (AD38), *orelhas para frente* (EAD101), *orelhas para trás* (EAD104), *exposição da língua* (AD19), *mastigação* (AD81), *piscada* (AU145), *aumento do branco dos olhos* (AD1) e *meia piscada* (AU47).

Para as variáveis de contagem (autocatação e cavar) foi usado um modelo linear generalizado multinível ajustado pela distribuição de Poisson e para a variável dicotômica (defecar) foi conduzido um modelo de regressão logística multinível. A interação de pontos de coleta/intervalos com tratamentos, os períodos e a ordem foram usados como efeitos fixos da modelagem, bem como os cavalos foram usados como efeitos aleatórios para controlar a variação individual. Exclusivamente para farejar, os tratamentos, os períodos e a ordem foram usados como efeitos fixos e os cavalos foram usados como efeitos aleatórios porque essa variável foi coletada apenas em um intervalo (I2).

A comparação múltipla no post-hoc test foi conduzida com o procedimento de Bonferroni (lsmeans::lsmeans e multcomp::cld) [51]. Os resultados foram ilustrados com gráficos de caixa (ggplot2::ggplot e ggplot2::geom_boxplot) e estão apresentados nas tabelas como média e desvio padrão (Média±DP).

Posteriormente, foi feita uma análise exploratória. Para analisar a dinâmica múltipla entre as expressões faciais que se mostraram capazes de diferenciar tratamentos ou intervalos pela etapa inferencial (modelagem), foi conduzida uma análise de componentes principais (PCA) baseada em uma matriz de correlação (stats::princomp). O número ótimo de componentes principais (PC) a serem retidos na PCA foi determinado pela análise paralela de Horn ('psych::fa.parallel') [52]. Como critério para determinar associação entre cada variável e o PC foram usados os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que -0,40 [53]. Para ilustrar tais resultados foram feitos dois biplots colorindo as observações de acordo com os tratamentos e com os intervalos para uma análise qualitativa (julgamento visual) de sua distribuição.

3. Resultados

3.1. Parâmetros fisiológicos

A FC média do tratamento lavanda foi menor em relação ao tratamento controle após estimulação olfativa (I3) ($P < 0,05$). Já as variáveis, LF, HF e LF/HF não diferiram entre os tratamentos ou entre os intervalos (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos parâmetros cardíacos de equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).

Parâmetros	Tratamentos	Intervalos		
		I1	I2	I3
FC média (bpm)	Controle	49,4±5,7	47,8±5,2	49,5±6,2 ^A
	Lavanda	46,7±3,6	48,2±8,5	45,5±5,5 ^B
LF (nu)	Controle	55,1±8,2	59,1±12,3	57,6±14,0
	Lavanda	58,1±13,4	60,9±10,2	58,2±11,9
HF (nu)	Controle	44,9±8,21	40,8±12,3	42,3±14,0
	Lavanda	41,9±13,4	39,0±10,2	41,8±11,9
LF/HF	Controle	1,3±0,4	1,65±0,8	1,64±1,0
	Lavanda	1,7±1,2	1,73±0,8	1,57±0,7

FC: frequência cardíaca média; LF: potência de baixa frequência (Low Frequency); HF: potência de alta frequência (High Frequency); LF/HF: razão de baixa frequência para alta frequência. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo ($p < 0,05$), sendo que A>B.

Não houve diferença entre os tratamentos, ou entre os pontos de coleta para o parâmetro temperatura auricular, assim como, para frequência respiratória (Tabela 5).

Houve aumento da temperatura ocular do ponto de coleta P3 para o P4 ($P<0,05$) quando os cavalos receberam o tratamento lavanda, enquanto no controle todos os pontos foram estatisticamente equivalentes (Figura 4 e Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos parâmetros fisiológicos de equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes (P1 e P2) e após estimulação olfativa (P3 e P4).

Parâmetros	Tratamentos	Pontos de coleta			
		P1	P2	P3	P4
FR (mpm)	Controle	31,0±9,7	31,0±9,7	31,0±9,7	28,0±7,7
	Lavanda	25,0±5,4	28,0±10,8	27,0±9,7	33,0±9,1
TAT (°C)	Controle	32,9±0,7	32,9±0,7	33,3±0,8	33,2±0,7
	Lavanda	32,9±1,4	33,1±1,0	32,9±1,2	33,2±1,6
TOT (°C)	Controle	31,3±1,6	31,8±1,09	30,9±1,71	31,8±1,5
	Lavanda	31,1±1,1 ^{ab}	31,0±1,8 ^{ab}	30,4±1,9 ^b	32,3±1,6 ^a

Parâmetros: FR: frequência respiratória; TAT: temperatura auricular por termômetro infravermelho; TOT: temperatura ocular por termografia infravermelha. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos pontos de coleta para um mesmo tratamento ($p<0,05$), sendo que $a>b$.

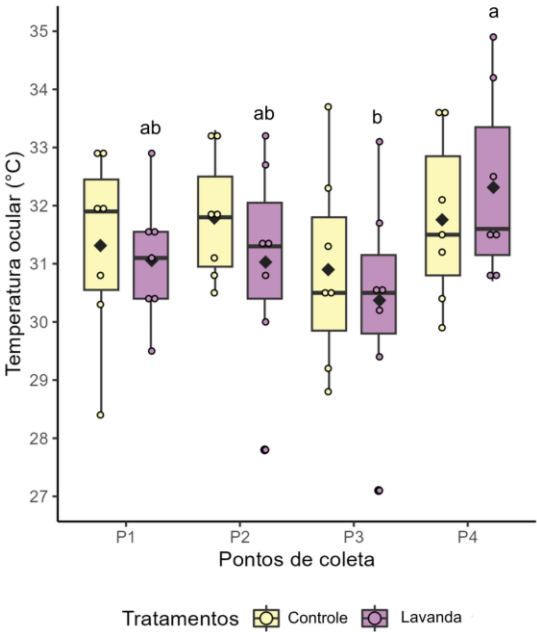


Figura 4. Gráfico de caixas da temperatura do ocular (°C) nos tratamentos controle e lavanda antes (P1 e P2) e após estimulação olfativa (P3 e P4). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos pontos de coleta para um mesmo tratamento ($p<0,05$), sendo que $a>b$; losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e roxo) representa um animal; cada círculo cinza indica um outlier.

3.2. Parâmetros comportamentais

Não houve diferença entre os tratamentos ou entre os intervalos para os seguintes comportamentos avaliados: farejar, autocatção, cavar e defecar (Tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio-padrão de parâmetros comportamentais apresentados por equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).

Parâmetros	Tratamentos	Intervalos		
		I1	I2	I3
Farejar ^d	Controle	-	21,1±21,9	-
	Lavanda	-	21,2±23,3	-
Autocatação ^f	Controle	1,4±2,3	1,6±1,7	2,7±2,6
	Lavanda	2,6±2,1	2,0±1,5	1,6±1,7
Cavar ^f	Controle	0,0±0,0	0,1±0,4	0,3±0,5
	Lavanda	0,3±0,8	0,1±0,4	0,1±0,4
Defecar ^o	Controle	0,4±0,5	0,1±0,4	0,1±0,4
	Lavanda	0,0±0,0	0,3±0,5	0,1±0,4

- = não avaliado; d = duração em segundos; f= frequência em 5 minutos; o = ocorrência (presença ou ausência).

Não houve diferença entre os tratamentos ou entre os intervalos para as expressões faciais *aumento do branco dos olhos* (AD1), *levantador da pálpebra superior* (AU5), *levantador do canto interno* (AU101), *meia piscada* (AU47), *orelhas para frente* (EAD101) e *orelhas para trás* (EAD104) (Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio-padrão da frequência por minuto de parâmetros faciais expressos por equinos enquanto nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente).

Parâmetros	Tratamentos	Intervalos		
		I1	I2	I3
Orelhas para frente (EAD101)	Controle	14,0±4,6	12,3±3,6	12,7±3,6
	Lavanda	13,6±2,3	11,9±2,6	10,7±3,9
Orelhas para trás (EAD104)	Controle	14,4±4,6	12,2±3,5	12,7±3,6
	Lavanda	13,8±2,2	11,7±2,9	10,9±4,0
Levantador da sobrancelha interna (AU101)	Controle	8,2±1,6	8,4±3,3	9,8±4,4
	Lavanda	9,2±1,7	9,3±3,0	7,8±2,7
Meia piscada (AU47)	Controle	15,4±6,0	14,3±5,1	16,0±7,7
	Lavanda	18,2±7,2	18,0±8,9	17,1±9,3
Piscada (AU145)	Controle	9,2±3,9^b	10,8±4,8^b	15,0±3,0^{Aa}
	Lavanda	11,0±3,7	11,0±2,3	11,9±1,7^B
Levantador da pálpebra (AU5)	Controle	1,2±1,0	0,9±0,6	1,4±1,2
	Lavanda	1,4±0,6	1,3±1,3	1,1±0,7
Aumento do branco dos olhos (AD1)	Controle	4,6±1,8	3,9±2,7	5,1±4,3
	Lavanda	5,5±4,1	5,6±5,4	3,6±2,9
Dilatação da narina (AD38)	Controle	27,5±10,2	27,6±9,0	30,5±10,1^A
	Lavanda	23,9±3,3	23,3±4,1	22,6±5,7^B
Mastigação (AD81)	Controle	1,4±1,3	1,5±0,7	2,1±1,1^A
	Lavanda	1,6±1,1	0,7±0,5	1,1±0,9^B

Exposição da língua (AD19)	Controle	5,1±7,1	4,5±3,8	6,2±5,3 ^A
	Lavanda	4,0±4,4	1,9±2,1	2,7±2,6 ^B

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos intervalos para um mesmo tratamento (p<0,05), sendo que a>b; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo (p<0,05), sendo que A>B.

Houve aumento da unidade de ação *piscada* (AU145) do intervalo I2 para I3 (P<0,05) no controle, enquanto para o tratamento lavanda todos os intervalos foram estatisticamente equivalentes. Ademais, em I3 houve um valor maior de *piscada* (AU145) para o tratamento controle em relação ao tratamento lavanda (P<0,05) (Figura 5 e Tabela 7).

No intervalo I3 os valores obtidos para as expressões *dilatação da narina* (AD38), *mastigação* (AD81) e *exposição da língua* (AD19) foram maiores no tratamento controle (P<0,05), porém não houve diferença entre os intervalos para cada tratamento (Figura 5 e Tabela 7).

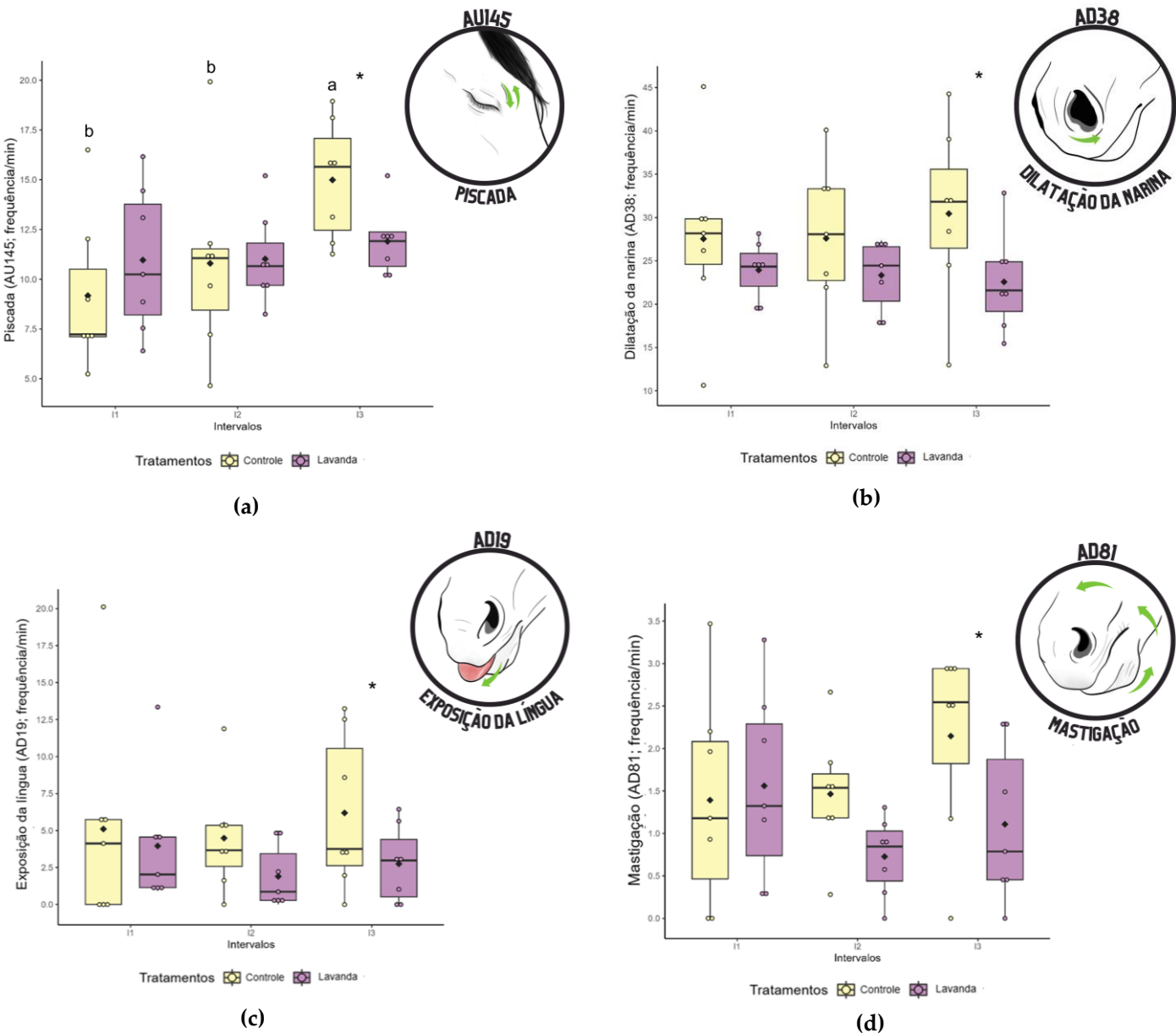


Figura 5. Gráficos de caixas: (a) *Piscada* (AU145; frequência/min); (b) *Dilatação da narina* (AD38; frequência/min); (c) *Exposição da língua* (AD19; frequência/min); (d) *Mastigação* (AD81; frequência/min) nos tratamentos controle e lavanda antes, durante e após estimulação olfativa (I1, I2 e I3, respectivamente). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa do post-hoc test ao longo dos intervalos para um mesmo tratamento (p<0,05), sendo que a>b; * indica diferença

estatística significativa do post-hoc test entre os tratamentos em um mesmo intervalo ($p < 0,05$); o losango preto indica a média; cada círculo colorido com as cores dos tratamentos (amarelo e roxo) representa um animal; e cada círculo cinza indica um outlier.

A análise paralela de Horn indicou a retenção do primeiro PC de um total de 4 PC gerados pela PCA, portanto apenas esse PC foi analisado. O valor de carga da PCA indica o nível de associação entre a variável e um determinado PC, sendo que o valor de carga mais distante de zero indica um maior nível de associação positiva (1,00) ou negativa (-1,00). Portanto, o conjunto de variáveis associadas positivamente com um PC apresentam dinâmica semelhante entre si, sendo que todas aumentam ou diminuem concomitantemente.

No presente estudo as associações foram determinadas por um ponto de corte do valor de carga de 0,40 positivo ou negativo. O PC1 explicou sozinho quase a metade (49,4%) da variação total dos dados. A *exposição da língua* (AD19), *mastigação* (AD81) e *piscada* (AU145) mostraram associação positiva (valores de carga $> 0,40$) com o PC1, enquanto *dilatação da narina* (AD38) mostrou associação negativa com o PC1 (Tabela 8). Desta forma, a diminuição ou aumento de *exposição da língua* (AD19), *mastigação* (AD81) e *piscada* (AU145) ocorreu concomitantemente considerando todos os intervalos e tratamentos, enquanto *dilatação da narina* (AD38) ocorreu de forma inversa. *Exposição da língua* (AD19) mostrou o valor de carga mais distante de zero no PC1, que pode ser interpretado como a expressão facial com maior variação (importância) no PC1.

Tabela 8. Valores de carga, autovalores e variância da análise de componentes principais (PC = componente principal; # indica o PC indicado a ser retido pela análise paralela de Horn; em negrito estão os valores de carga maiores que 0,40 ou menores que -0,40 indicando associação da variável com o PC).

Variáveis	PC1#	PC2
Exposição da língua (AD19)	0,932	0,142
Mastigação (AD81)	0,842	0,472
Piscada (AU145)	0,459	-0,435
Dilatação da narina (AD38)	-0,433	0,762
Autovalores	1,975	1,013
Variância	49,393	25,333
Variância cumulativa	49,393	74,726

Apesar da análise paralela de Horn indicar reter apenas o PC1, foi necessário usar o PC2 para estabelecer um plano cartesiano (eixo de abscissas e ordenadas) para ilustrar os resultados da PCA. A Figura 6a separa as avaliações dos cavalos nos tratamentos controle e lavanda com cores diferentes. Uma das informações dessa figura é o centróide (círculo maior) que indica o centro de massa dado pelo polígono (forma geométrica) formado com a interpolação das avaliações (círculos menores) de uma mesma cor. Por um julgamento visual, os centróides de ambos os tratamentos se encontram separados indicando que as expressões faciais conseguiram separar os tratamentos. Ademais, o centróide do tratamento controle está localizado nos quadrantes direito superior onde estão os vetores de *exposição da língua* (AD19), *mastigação* (AD81), sugerindo uma maior ocorrência dessas expressões faciais no tratamento controle.

A Figura 6b apresenta os intervalos de coleta distinguidos por cores. O centróide do I2 está mais distante do centróide do I1 e I3 por um julgamento visual, o que pode sugerir uma diferença de I2 dos demais intervalos. Apesar disso, os centróides de todos os intervalos ainda se encontram pouco separados. Além disso, o centróide dos intervalos I1 e I3 estão localizados nos quadrantes onde também estão os vetores de *exposição da língua*

(AD19), *mastigação* (AD81) e *dilatação da narina* (AD38), o que sugere uma maior ocorrência dessas expressões faciais nos intervalos I1 e I3 em relação I2. Tais resultados exploram possível dinâmica múltipla das expressões faciais que foram capazes de distinguir tratamentos ou intervalos nas análises inferenciais prévias (modelagem).

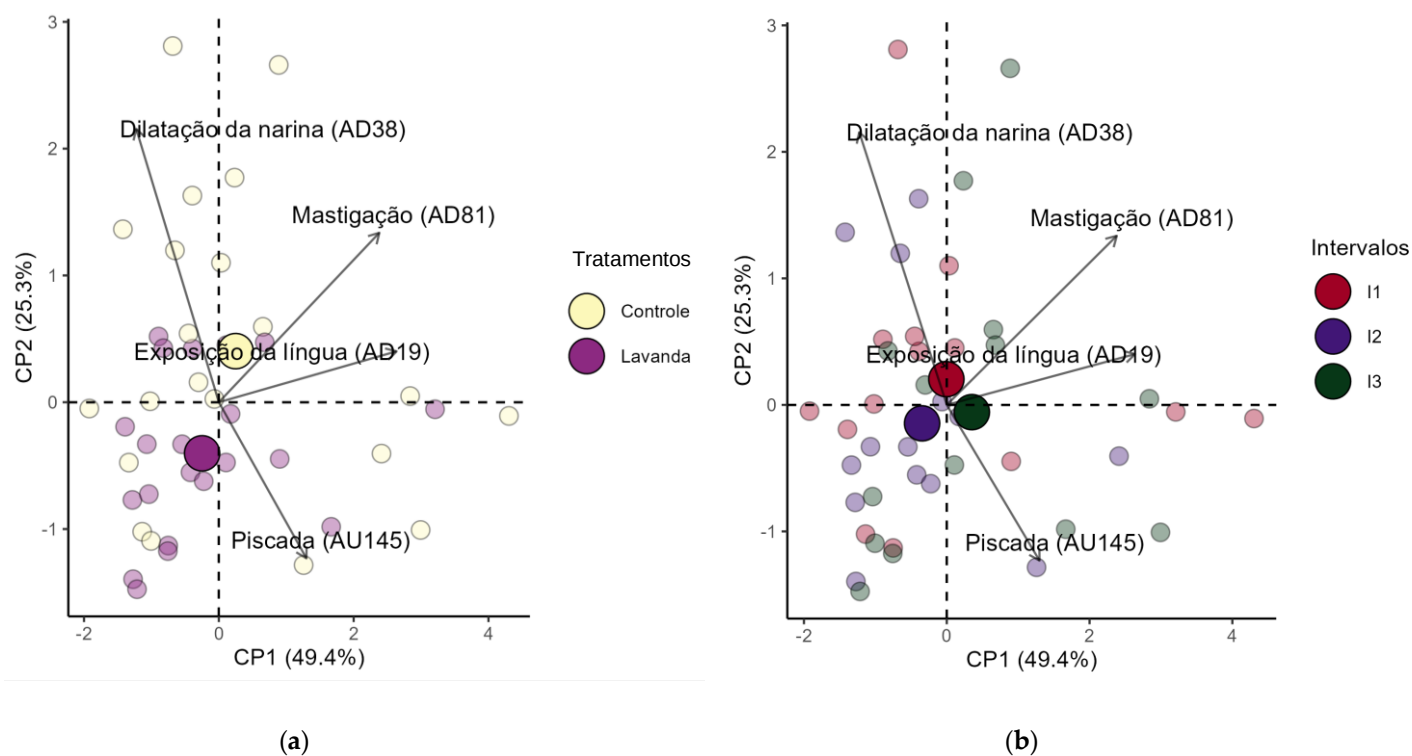


Figura 6. Biplot bidimensional da análise de componentes principais com as expressões faciais e os indivíduos separados por tratamento (a) ou por intervalos (b) (Círculos menores indicam cada avaliação e círculos maiores representam o centroide de cada tratamento ou intervalo; centroide indica o centro de massa dado pelo polígono formado com a interpolação dos círculos menores de uma mesma cor; as setas indicam os vetores de cada uma das expressões faciais).

4. Discussão

Neste estudo foi investigado se a utilização do óleo essencial de lavanda como enriquecimento ambiental sensorial seria capaz de promover a redução de respostas fisiológicas e comportamentais associadas ao estresse de curta duração, em equinos submetidos ao manejo de contenção em tronco e isolamento social. Para uma espécie gregária como o cavalo, a formação de laços sociais tem importante valor de sobrevivência devido à vigilância mútua e a proteção contra predadores. Logo intervenções que envolvam isolamento social podem ter impacto negativo importante [54,55]. Em paralelo, a restrição de movimentos imposta pelo manejo de contenção em tronco impede que cavalos utilizem sua principal estratégia de defesa, a fuga, o que faz com que este tipo de intervenção possa ser aversivo mesmo para animais habituados [17]. Em conjunto, o manejo de contenção em tronco e o isolamento social representam dois estressores relevantes aos quais equinos são inevitavelmente expostos em centros equestres para facilitar cuidados veterinários e procedimentos reprodutivos, o que justifica a escolha destes procedimentos e denota a relevância deste estudo para o bem-estar de cavalos domésticos.

Diante de um estressor em potencial, a defesa biológica coordenada pelo sistema nervoso central consiste em uma combinação de respostas fisiológicas e comportamentais, sendo as fisiológicas caracterizadas, em parte, por elevações na frequência cardíaca e respiratória, que ocorrem em função de aumento na atividade simpática [56–59]. Durante todo o período de permanência no tronco de contenção os valores obtidos em ambos os tratamentos para frequência cardíaca e respiratória, permaneceram acima dos valores de

referência (FC 28 a 40 bpm; FR 10 a 20 mpm) estabelecidos para equinos adultos em repouso e condições ambientais semelhantes às do presente estudo (22°C a 36°C) [60,61]. Ainda que relatos da frequência respiratória sejam escassos em condições semelhantes, dificultando comparações, as respostas cardíacas obtidas são consistentes com as observadas em estudos, em que cavalos foram expostos a eventos estressantes que incluíam restrição de movimentos [62–64].

Mesmo acima da referência, os valores observados para FC não se distanciaram destes de forma tão discrepante, corroborando com trabalhos anteriores. Valores próximos a 40 bpm foram relatados por Yarnell *et al.* [62], em cavalos cooperativos durante um procedimento aversivo envolvendo restrição de movimentos e estímulo auditivo desagradável (tosa). Assim como por Fenner *et al.* [65], ao submeter cavalos em restrição de movimentos ao uso de um equipamento restritivo (focinheira apertada), e Vollenhoven *et al.* [18] ao submeter éguas experientes a palpação transretal. Esses resultados sugerem que, em condições em que há restrição de movimentos, a ausência de atividade física pode colaborar para elevações mais discretas na FC. Outro fator que pode ter contribuído para o aumento discreto, é a utilização de animais habituados ao procedimento.

Embora os resultados apontem que o manejo de contenção em conjunto com isolamento tenha sido capaz de induzir resposta fisiológica ao estresse, essa resposta parece ter sido atenuada após a estimulação olfativa com óleo essencial de lavanda (I3). No intervalo I3 a frequência cardíaca foi menor para o tratamento lavanda, resultado que está de acordo com as evidências que esse óleo essencial tem potencial de reduzir a intensidade das respostas ao estresse em cavalos [9,14]. Menor frequência cardíaca foi relatada em equinos expostos a uma série de eventos estressantes [9] e a estímulo auditivo repentino (buzina de ar) [14], quando utilizado o óleo essencial de lavanda. Vale ressaltar que, em trabalho conduzido por Ferguson *et al.* [14], apesar de ter sido evidenciada a redução da frequência cardíaca não foi observada diferença para frequência respiratória, semelhantemente aos resultados aqui demonstrados, sugerindo que parâmetros cardíacos podem ser mais sensíveis para monitorar mudanças provocadas pela inalação do óleo essencial.

Elevações na temperatura ocular têm sido associadas a procedimentos aversivos e reconhecidas como uma resposta ao estresse em mamíferos, ocasionadas por alterações simpática mediadas no fluxo sanguíneo [66,67]. Os animais apresentaram aumento na temperatura ocular após a estimulação olfativa com óleo essencial de lavanda, no entanto, devido a este aumento ter ocorrido concomitantemente a uma redução da frequência cardíaca é improvável que esteja relacionado a aumento da atividade simpática, e isto é apoiado também pela redução (não significativa) no parâmetro LF/HF, utilizado usualmente como um indicador de equilíbrio autonômico. Esse aumento na temperatura pode ter ocorrido como resultado do aumento da dilatação dos vasos sanguíneos oculares provocado pela estimulação olfativa, uma vez que, há relatos suportando que o óleo essencial de lavanda, quando inalado, induz vasodilatação [68,69].

Em linha com os resultados fisiológicos obtidos, as expressões faciais associadas a resposta ao estresse foram expressas em menor frequência após enriquecimento olfativo com óleo essencial de lavanda. A baixa expressão do descritor de ação facial *dilação da narina* (AD38) previamente associado a intervenções consideradas estressantes para equinos como transporte, isolamento social [19] e permanência em tronco de contenção [70], pode indicar menor nível de agitação, pois cavalos dilatam a narina com mais frequência em contextos que envolvem maior nível de agitação como quando em estado de alerta e atenção, para agregar informações a respeito do ambiente por meio da investigação olfativa [7,71], ou em decorrência da ativação simpática, que resulta em aumento da frequência respiratória preparando o organismo para uma possível resposta de luta ou fuga [58,59].

Igualmente, as expressões relacionadas a movimentos orais foram inferiores quando os indivíduos receberam tratamento lavanda. As expressões *exposição da língua* (AD19) e *mastigação* (AD81) são consideradas parte do conjunto de respostas autonômicas que ocorrem após um pico de atividade simpática provocada por evento estressante [50], em decorrência da diminuição na atividade simpática e correspondente ativação do sistema

nervoso parassimpático, que prioriza os processos digestivos e produção de saliva [59]. Logo, expor a língua e mastigar podem estar associados a transição da boca seca experimentada pelos animais como consequência da ativação simpática, para salivação associada à atividade parassimpática [72,73].

A *exposição da língua* (AD19) foi identificada como um descritor de ação facial relevante por Lundblad *et al.* [19] ao avaliar a expressão facial de cavalos submetidos a transporte e isolamento social utilizando EquiFACS, e apontada pelos autores como mecanismo de enfrentamento em cavalos submetidos a estresse. Já a *mastigação* (AD81), também descrita como “mastigação não nutritiva”, visto que, em contextos estressantes essa expressão ocorre sem que haja presença de alimento, tem sido utilizada como um indicador de estresse em diferentes contextos [30,72,74]. Aumento da mastigação foi observado em cavalos confinados durante a noite, o que foi considerado um indicativo de elevação dos níveis de estresse e estado afetivo negativo por Bradshaw-Wiley e Randle [30]. Por sua vez, Kydd *et al.* [74] relataram que cavalos manuseados por amadores apresentaram mais movimentos orais (lamber e mastigar) do que cavalos manuseados por profissionais, demonstrando que amadores são mais propensos a provocar aumento do estresse. Nesse sentido, os resultados aqui obtidos para estas expressões faciais indicam que, ao passar pelo tratamento controle os animais experimentaram maior nível de estresse e, consequentemente estado emocional negativo. Já ao passar pelo tratamento lavanda o estresse induzido pelo manejo e a experiência negativa foram atenuados.

A expressão *piscada* (AU145) aumentou ao longo do tempo e foi significativamente maior após a estimulação olfativa quando cavalos passaram pelo tratamento controle. Em equinos, a taxa de piscada espontânea tem sido usada como indicador de estresse [19,49,75,76], pois é mediada pela ativação dos receptores de dopamina D1 e D2 no corpo estriado, e o estresse aumenta os níveis de dopamina nesta região do cérebro [75]. Resultados publicados até o momento, com cavalos submetidos a isolamento social como intervenção estressante, têm sido contrastantes. De fato, tanto o aumento [19], quanto a diminuição de piscadas [49] foram relatados nesse contexto. Os resultados obtidos denotam aumento da frequência de piscadas, corroborando com Lundblad *et al.* [19], em que os cavalos permaneceram em isolamento social por um período de 15 a 30 minutos, semelhante ao realizado no presente estudo (24 minutos). Esses resultados contrastam com os de Merkies *et al.* [49] que demonstraram uma redução na frequência de piscadas em cavalos que permaneceram em isolamento por apenas 3 minutos.

As expressões faciais citadas anteriormente mostram-se relevantes para diferenciar os tratamentos e intervalos estudados, todavia, para uma interpretação mais robusta dos resultados é fundamental observá-las em conjunto. Para tal, foi conduzida uma análise de componentes principais com o intuito de analisar a dinâmica múltipla entre as expressões faciais de interesse. Uma associação positiva com o PC1 foi observada para as expressões *exposição da língua* (AD19), *mastigação* (AD81) e *piscada* (AU145), demonstrando que estas expressões apresentaram dinâmica semelhante entre si, aumentando ou diminuindo concomitantemente considerando os tratamentos. Ademais, os resultados da PCA corroboraram com os resultados obtidos nas análises inferenciais prévias, sugerindo maior ocorrência dessas expressões no tratamento controle.

A *dilatação da narina* (AD38) também pareceu ocorrer de forma mais acentuada no tratamento controle, porém essa expressão se comportou de forma antagônica as demais expressões. Essa discrepância pode ser explicada pela posição dos centroides para os intervalos I1, I2 e I3, pois a *dilatação da narina* (AD38) parece ocorrer principalmente no I1 (antes da estimulação), *piscada* (AU145) na transição entre I2 e I3 (durante e após estimulação), e *mastigação* (AD81) e *exposição da língua* (AD19) no I3 (após estimulação). De fato, espera-se que a *dilatação da narina* (AD38) ocorra logo que o animal é exposto ao estressor, por esta fazer parte das respostas que preparam o organismo para possível luta ou fuga, marcando o início da ativação simpática, subsequentemente como consequência dessa ativação espera-se a *piscada* (AU145), e pôr fim a *mastigação* (AD81) e *exposição da língua* (AD19), sinalizando a resolução do pico de atividade simpática provocada pelo evento estressante.

Juntamente, os parâmetros fisiológicos e faciais avaliados neste estudo apontam que o manejo de contenção em tronco e o isolamento social são capazes de induzir respostas ao estresse mesmo em animais habituados. A maior frequência cardíaca associada a maior frequência de expressões faciais ligadas a resposta ao estresse, como *dilatador de narinas* (AD38), *piscada* (AU145), *exposição da língua* (AD19) e *mastigação* (AD81), observadas em cavalos quando submetidos ao tratamento controle, apontam que os animais experimentaram um estado emocional de valência negativa/aversiva e nível de agitação elevado. Enquanto os parâmetros faciais foram de grande valia para compreensão da percepção e resposta de equinos diante dos estressores utilizados, os comportamentos gerais não foram influenciados, o que evidencia proposições que, a utilização de sinais comportamentais mais sutis, como expressões faciais, pode refletir de forma mais confiável o estado interno do animal [77] e ajudar a compreender o estado emocional do cavalo [78].

Apesar do desafio imposto pelo manejo, a aplicação da estimulação olfativa com óleo essencial de lavanda como enriquecimento ambiental sensorial foi capaz de atenuar respostas fisiológicas e faciais ao estresse, mostrando-se como alternativa viável diante de manejos estressantes e indispensáveis devido a seu papel em facilitar cuidados e manutenção da saúde e reprodução de cavalos domésticos. É importante destacar que foi possível reduzir o estresse mesmo realizando uma exposição de curta duração ao estímulo olfativo (5 minutos), por meio de apresentação concentrada, o que permitiu que os cavalos tivessem autonomia para interagir ou não com o estímulo olfativo. Esse tipo de apresentação contrapõe apresentações dispersas que não oferecem aos indivíduos a oportunidade de se afastar do odor e, até o presente momento, haviam sido a principal forma de apresentação explorada em experimentos conduzidos com cavalos [9,14,15].

Além dos benefícios evidenciados, não foram observadas respostas adversas ou aversão ao óleo essencial de lavanda, visto que, o tempo que os cavalos permaneceram farejando o recipiente foi semelhante ao observado no tratamento controle com a utilização de um produto inodoro (TACC). Esse resultado implica que os cavalos não evitaram investigar a lavanda, e ser plausível que a oferta de um recipiente para investigação olfativa, mesmo na ausência de um estímulo olfativo saliente, pode ser atrativa pois oferece ao cavalo uma oportunidade de engajar com um heteroespecífico conhecido. Além disso, a duração do comportamento farejar foi de aproximadamente 20 segundos, correspondente ao reportado por Rørvang *et al.* [10], que também não observou aversão utilizando óleo essencial de lavanda em quantidade e apresentação análogas as do presente estudo. Ainda assim, estudos futuros devem investigar o efeito de exposições frequentes ao óleo sobre a consistência das respostas, as vantagens e desvantagens da utilização a longo prazo.

5. Conclusões

O manejo de contenção em tronco associado ao isolamento social induz resposta ao estresse mesmo em animais habituados. Os parâmetros fisiológicos e expressões faciais avaliados proporcionaram resultados consistentes de que durante essa intervenção os animais experimentaram estado emocional de valência negativa/aversiva e nível de agitação elevado. Nesse contexto, a aplicação da estimulação olfativa com óleo essencial de lavanda se mostra uma estratégia de enriquecimento eficaz para atenuar o estresse de curta duração induzido pelo manejo, resultando em redução de parâmetros indicadores de estresse, associados a alta agitação e valência negativa.

Referências

- Bachetti, S.; Viol, L.Y.; Viana-junior, A.B.; Young, R.J.; Azevedo, C.S. De Global Overview of Environmental Enrichment Studies : What Has Been Done and Future Directions. **2024**, 1–17.
- Botreau, R.; Lesimple, C.; Brunet, V.; Veissier, I. Environmental Enrichment in Ruminants and Equines. *European Union Reference Centre for Animal Welfare* **2023**, 1, 24.
- Bloomsmith, M.A.; Brent, L.Y.; Schapiro, S.J. Guidelines for Developing and Managing an Environmental Enrichment Program for Nonhuman Primates. *Lab Anim Sci* **1991**, 41, 372–377.

4. Young, R.J.; Azevedo, C.S. de; Cipreste, C.F. Environmental Enrichment: The Creation of Opportunities for Informal Learning. In *Zoo animal learning and training*; John Wiley & Sons Ltd., 2020; pp. 101–118.
5. Young, R.J. *Environmental Enrichment for Captive Animals*; Wiley-Blackwell, 2003;
6. Wells, D.L. Sensory Stimulation as Environmental Enrichment for Captive Animals: A Review. *Appl Anim Behav Sci* **2009**, *118*, 1–11, doi:10.1016/j.applanim.2009.01.002.
7. Bini de Lima, A.C.; Sebastião da Fé, V.C.; Palermo Hernandez, M.S.; Oliveira dos Santos, V.M. Olfactory Stimulation as Environmental Enrichment for Domestic Horses — A Review. *Animals* **2023**, *13*, 0–14.
8. Nielsen, B.L.; Jezierski, T.; Bolhuis, J.E.; Amo, L.; Rosell, F.; Oostindjer, M.; Christensen, J.W.; McKeegan, D.; Wells, D.L.; Hepper, P. Olfaction: An Overlooked Sensory Modality in Applied Ethology and Animal Welfare. *Front Vet Sci* **2015**, *2*, 1–3, doi:10.3389/fvets.2015.00069.
9. Poutaraud, A.; Guilloteau, L.; Gros, C.; Lobstein, A.; Meziani, S.; Steyer, D.; Moisan, M.P.; Foury, A.; Lansade, L. Lavender Essential Oil Decreases Stress Response of Horses. *Environ Chem Lett* **2018**, *16*, 539–544, doi:10.1007/s10311-017-0681-8.
10. Rørvang, M.V.; Nicova, K.; Yngvesson, J. Testing Olfaction in Equids : Age and Gestational Stage Affects Olfactory Interest. *Res Sq* **2021**, 0–33.
11. Wells, D.L.; Hepper, P.G. The Role of Olfaction in Animal Housing and as Enrichment. In *Olfaction in Animal Behaviour and Welfare*; Nielsen, B.L., Ed.; CABI Publishing, 2017; pp. 151–160.
12. Krishan, G.; Narang, A. Use of Essential Oils in Poultry Nutrition: A New Approach. *J Adv Vet Anim Res* **2014**, *1*, 156–162, doi:10.5455/javar.2014.a36.
13. De Sousa, D.P.; De Almeida Soares Hocayen, P.; Andrade, L.N.; Andreatini, R. A Systematic Review of the Anxiolytic-like Effects of Essential Oils in Animal Models. *Molecules* **2015**, *20*, 18620–18660, doi:10.3390/molecules201018620.
14. Ferguson, C.E.; Kleinman, H.F.; Browning, J. Effect of Lavender Aromatherapy on Acute-Stressed Horses. *J Equine Vet Sci* **2013**, *33*, 67–69, doi:10.1016/j.jevs.2012.04.014.
15. Heitman, K.; Rabquer, B.; Heitman, E.; Streu, C.; Anderson, P. The Use of Lavender Aromatherapy to Relieve Stress in Trailered Horses. *J Equine Vet Sci* **2018**, *63*, 8–12, doi:10.1016/j.jevs.2017.12.008.
16. RILEY, C.B.; CREGIER, S.E.; FRASER, A.F. (Ed.) *Fraser's the Behaviour and Welfare of the Horse*; CABI Publishing, 2022;
17. Vitale, V.; Balocchi, R.; Varanini, M.; Sgorbini, M.; Macerata, A.; Sighieri, C.; Baragli, P. The Effects of Restriction of Movement on the Reliability of Heart Rate Variability Measurements in the Horse (Equus Caballus). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **2013**, *8*, 400–403, doi:10.1016/j.jveb.2013.02.003.
18. Vollenhoven, E. van; Fletcher, L.; Page, P.C.; Ganswindt, A.; Grant, C.C. Heart Rate Variability in Healthy, Adult Pony Mares During Transrectal Palpation of the Reproductive Tract by Veterinary Students. *J Equine Vet Sci* **2017**, *58*, 68–77, doi:10.1016/j.jevs.2017.08.013.
19. Lundblad, J.; Rashid, M.; Rhodin, M.; Andersen, P.H. Effect of Transportation and Social Isolation on Facial Expressions of Healthy Horses. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0241532.
20. Henderson, A.J.Z. Don't Fence Me in: Managing Psychological Well Being for Elite Performance Horses. *Journal of Applied Animal Welfare Science* **2007**, *10*, 309–329, doi:10.1080/10888700701555576.
21. Yarnell, K.; Hall, C.; Royle, C.; Walker, S.L. Domesticated Horses Differ in Their Behavioural and Physiological Responses to Isolated and Group Housing. *Physiol Behav* **2015**, *143*, 51–57, doi:10.1016/j.physbeh.2015.02.040.
22. McMillan, F.D. The Mental Health and Well-Being Benefits of Social Contact and Social Support in Animals. In *Mental Health and Well-being in Animals*; CABI Publishing, 2020; pp. 96–110.
23. Baldwin, A.L.; Chea, I. Effect of Aromatherapy on Equine Heart Rate Variability. *J Equine Vet Sci* **2018**, *68*, 46–50, doi:10.1016/j.jevs.2018.05.213.

24. Mota-Rojas, D.; Pereira, A.M.F.; Wang, D.; Martínez-Burnes, J.; Ghezzi, M.; Hernández-Avalos, I.; Lendez, P.; Mora-Medina, P.; Casas, A.; Olmos-Hernández, A.; et al. Clinical Applications and Factors Involved in Validating Thermal Windows Used in Infrared Thermography in Cattle and River Buffalo to Assess Health and Productivity. *Animals* **2021**, *11*, doi:10.3390/ani11082247.
25. Rashid, M.; Silventoinen, A.; Glerup, K.B.; Andersen, P.H. Equine Facial Action Coding System for Determination of Pain-Related Facial Responses in Videos of Horses. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–18, doi:10.1371/journal.pone.0231608.
26. Hall, C.; Randle, H.; Pearson, G.; Preshaw, L.; Waran, N. Assessing Equine Emotional State. *Appl Anim Behav Sci* **2018**, *205*, 183–193, doi:10.1016/j.applanim.2018.03.006.
27. Mendl, M.; Burman, O.H.P.; Paul, E.S. An Integrative and Functional Framework for the Study of Animal Emotion and Mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2010**, *277*, 2895–2904, doi:10.1098/rspb.2010.0303.
28. Russell, J.A. Core Affect and the Psychological Construction of Emotion. *Psychol Rev* **2003**, *110*, 145–172, doi:10.1037/0033-295X.110.1.145.
29. Ricci-Bonot, C.; Mills, D.S. Recognising the Facial Expression of Frustration in the Horse during Feeding Period. *Appl Anim Behav Sci* **2023**, *265*, 105966, doi:10.1016/j.applanim.2023.105966.
30. Bradshaw-Wiley, E.; Randle, H. The Effect of Stabling Routines on Potential Behavioural Indicators of Affective State in Horses and Their Use in Assessing Quality of Life. *Animals* **2023**, *13*, 1–16, doi:10.3390/ani13061065.
31. Wathan, J.; Burrows, A.M.; Waller, B.M.; McComb, K. EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–35, doi:10.1371/journal.pone.0131738.
32. Waller, B.M.; Julle-Daniere, E.; Micheletta, J. Measuring the Evolution of Facial ‘Expression’ Using Multi-Species FACS. *Neurosci Biobehav Rev* **2020**, *113*, 1–11, doi:10.1016/j.neubiorev.2020.02.031.
33. Henneke, D.R.; Potter, G.D.; Kreider, J.L.; Yeates, B.F. Relationship between Condition Score, Physical Measurements and Body Fat Percentage in Mares. *Equine Vet J* **1983**, *15*, 371–372.
34. Souza, A. de; Abreu, M.C.; de Oliveira-Júnior, J.F.; Aristone, F.; Fernandes, W.A.; Aviv-Sharon, E.; Graf, R. Climate Regionalization in Mato Grosso Do Sul: A Combination of Hierarchical and Non-Hierarchical Clustering Analyses Based on Precipitation and Temperature. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2022**, *65*, doi:10.1590/1678-4324-2022210331.
35. Lee, Y.Y.; Tang, T.K.; Chan, E.S.; Phuah, E.T.; Lai, O.M.; Tan, C.P.; Wang, Y.; Ab Karim, N.A.; Mat Dian, N.H.; Tan, J.S. Medium Chain Triglyceride and Medium-and Long Chain Triglyceride: Metabolism, Production, Health Impacts and Its Applications—a Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2022**, *62*, 4169–4185, doi:10.1080/10408398.2021.1873729.
36. Souza, C.F.; Tinôco, I.F.F.; Baêta, F.C.; Ferreira, W.P.M.; Silva, R.S. Avaliação de Materiais Alternativos Para Confecção Do Termômetro de Globo. *Ciência e Agrotecnologia* **2002**, *26*, 157–164.
37. ESMAY, M.L. *Principles of Animal Environment*; Westport: AVI Publisher, 1979;
38. Schroter, R.C.; Marlin, D.J.; Jeffcott, L.B. Use of the Wet Bulb Globe Temperature (WBGT) Index to Quantify Environmental Heat Loads during Three-Day-Event Competitions. *Equine Vet J Suppl* **1996**, *22*, 3–6, doi:10.1111/j.2042-3306.1996.tb05025.x.
39. JONES, S. Horseback Riding in the Dog Days. *Animal Science e-News* **2009**, *2*, 3–4.
40. Purswell, J.L.; Gates, R.S.; Lawrence, L.M.; Davis, J.D. Thermal Environment in a Four-Horse Slant-Load Trailer. *Trans ASABE* **2010**, *200*, 1885–1894, doi:10.1016/j.buildenv.2021.107984.
41. Tantasavasdi, C.; Srisuwan, W.; Inprom, N. Effect of Opening on Environmental Conditions of a Naturally Ventilated Stable in Thailand. *Build Environ* **2021**, doi:10.1016/j.buildenv.2021.107984.

42. Santos, S.A.; da Silva, G.A.; de Rezende, A.S.C.; de Faria, D.A.; Soriano, B.M.; McManus, C. Heat Tolerance in Pantaneiro Horses Subjected to Different Exercise Regimes. *Pesqui Agropecu Bras* **2022**, *57*, doi:10.1590/S1678-3921.PAB2022.V57.02955.
43. Clark, F.; King, A.J. A Critical Review of Zoo-Based Olfactory Enrichment. In *Chemical Signals in Vertebrates 11*; Hurst, J.L., Beynon, R.J., Roberts, S.C., Wyatt, T.D., Eds.; Springer, 2008; pp. 391–398.
44. McDuffee, L.; Mills, M.; McNiven, M.; Montelpare, W. Establishing Statistical Stability for Heart Rate Variability in Horses. *Journal of Veterinary Behavior* **2019**, *32*, 30–35, doi:10.1016/j.jveb.2019.05.003.
45. Kim, S.M.; Cho, G.J. Validation of Eye Temperature Assessed Using Infrared Thermography as an Indicator of Welfare in Horses. *Applied Sciences (Switzerland)* **2021**, *11*, doi:10.3390/app11167186.
46. Steketee, J. Spectral Emissivity of Skin and Pericardium, Physics in Medicine and Biology. *Phys. Med. Biol.* **1973**, *18*, 686–694.
47. Thompson, C.L.; Scheidel, C.; Glander, K.E.; Williams, S.H.; Vinyard, C.J. *An Assessment of Skin Temperature Gradients in a Tropical Primate Using Infrared Thermography and Subcutaneous Implants*; Elsevier, 2017; Vol. 63; ISBN 6163312090.
48. Wathan, J.; Burrows, A.M.; Waller, B.M.; McComb, K. EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–35, doi:10.1371/journal.pone.0131738.
49. Merckies, K.; Ready, C.; Farkas, L.; Hodder, A. Eye Blink Rates and Eyelid Twitches as a Non-Invasive Measure of Stress in the Domestic Horse. *Animals* **2019**, *9*, doi:10.3390/ani9080562.
50. Torcivia, C.; McDonnell, S. Equine Discomfort Ethogram. *Animals* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/ani11020580.
51. Kutner, M.H.; Nachtsheim, C.J.; Neter, J.; Li, W. *Applied Linear Statistical Models*; 5th ed.; McGraw-Hill/Irwin: New York, NY, USA, 2004;
52. Preacher, K.J.; MacCallum, R.C. Repairing Tom Swift's Electric Factor Analysis Machine. *Understanding Statistics* **2003**, *2*, 13–43, doi:10.1207/s15328031us0201_02.
53. Hair, J.F.; Babin, B.J.; Black, W.C.; Anderson, R.E. *Multivariate Data Analysis*; 7th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, NJ, USA, 2014;
54. VanDierendonck, M.C.; Spruijt, B.M. Coping in Groups of Domestic Horses - Review from a Social and Neurobiological Perspective. *Appl Anim Behav Sci* **2012**, *138*, 194–202, doi:10.1016/j.applanim.2012.02.007.
55. Hartmann, E.; Søndergaard, E.; Keeling, L.J. Keeping Horses in Groups: A Review. *Appl Anim Behav Sci* **2012**, *136*, 77–87, doi:10.1016/j.applanim.2011.10.004.
56. Wu, A. Social Buffering of Stress – Physiological and Ethological Perspectives. *Appl Anim Behav Sci* **2021**, *239*, 105325, doi:10.1016/j.applanim.2021.105325.
57. König, U.; Visser, E.K.; Hall, C. Indicators of Stress in Equitation. *Appl Anim Behav Sci* **2017**, *190*, 43–56, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.018.
58. Stewart, M.; Webster, J.R.; Schaefer, A.L.; Cook, N.J.; Scott, S.L. Infrared Thermography as a Non-Invasive Tool to Study Animal Welfare. *Animal Welfare* **2005**, *14*, 319–325, doi:10.1017/s096272860002964x.
59. McGreevy, P.; Christensen, J.W.; Borstel, U.K. von; McLean, A. *Equitation Science*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2018;
60. Feitosa, F.L.F. *Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico*; São Paulo: Roca, 2004;
61. Santos, S.A.; da Silva, L.A.C.; McManus, C.; Ítavo, C.C.B.F.; Barbosa, B.R.P.; Silva, G.A. da S.; Egito, A.A. do Termorregulação e Tolerância Ao Calor. In *Cavalo pantaneiro : rústico por natureza*; Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2016; pp. 259–277.
62. Yarnell, K.; Hall, C.; Billett, E. An Assessment of the Aversive Nature of an Animal Management Procedure (Clipping) Using Behavioral and Physiological Measures. *Physiol Behav* **2013**, *118*, 32–39, doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.013.

63. Kay, R.; Hall, C. The Use of a Mirror Reduces Isolation Stress in Horses Being Transported by Trailer. *Appl Anim Behav Sci* **2009**, *116*, 237–243, doi:10.1016/j.applanim.2008.08.013. 794
795
64. Fenner, K.; Yoon, S.; White, P.; Starling, M.; McGreevy, P. The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0154179. 796
797
65. Fenner, K.; Yoon, S.; White, P.; Starling, M.; McGreevy, P. The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0154179. 798
799
66. Ijichi, C.; Evans, L.; Woods, H.; Yarnell, K. The Right Angle: Validating a Standardised Protocol for the Use of Infra-Red Thermography of Eye Temperature as a Welfare Indicator. *Animal Welfare* **2020**, *29*, 123–131, doi:10.7120/09627286.29.2.123. 800
802
67. Pierard, M.; Hall, C.; König von Borstel, U.; Averis, A.; Hawson, L.; McLean, A.; Nevison, C.; Visser, K.; McGreevy, P. Evolving Protocols for Research in Equitation Science. *Journal of Veterinary Behavior* **2015**, *10*, 255–266, doi:10.1016/j.jveb.2015.01.006. 803
804
805
68. Koto, R.; Imamura, M.; Watanabe, C.; Obayashi, S.; Shiraiishi, M.; Sasaki, Y.; Azuma, H. Linalyl Acetate as a Major Ingredient of Lavender Essential Oil Relaxes the Rabbit Vascular Smooth Muscle through Dephosphorylation of Myosin Light Chain. *J Cardiovasc Pharmacol* **2006**, *48*, 850–856, doi:10.1097/01.fjc.0000238589.00365.42. 806
807
808
69. Nagai, K.; Horii, Y.; Fujisaki, Y.; Fuyuki, R.; Misonou, Y. Effects of Olfactory Stimulation with Scents of Grapefruit and Lavender Essential Oils on the Skeletal Muscle Sympathetic Nerve and Muscle Blood Flow in Rats. *Flavour Fragr J* **2018**, *33*, 135–143, doi:10.1002/ffj.3417. 809
810
811
70. Carmo, L.G.; Werner, L.C.; Michelotto, P. V.; Daros, R.R. Horse Behavior and Facial Movements in Relation to Food Rewards. *PLoS One* **2023**, *18*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0286045. 812
813
71. Waring, G.H. *Horse Behavior*; 2nd ed.; Elsevier Science, 2003; 814
72. Lie, M.; Newberry, R.C. Horse Communication: What Does Non-Nutritive Chewing Mean? In Proceedings of the Proceedings of the International Society for Equitation Science Conference; Rome, Italy, 2018. 815
816
73. von Borstel, U.U.K.; Duncan, I.J.H.; Lundin, M.C.; Keeling, L.J. Fear Reactions in Trained and Untrained Horses from Dressage and Show-Jumping Breeding Lines. *Appl Anim Behav Sci* **2010**, *125*, 124–131, doi:10.1016/j.applanim.2010.04.015. 817
818
819
74. Kydd, E.; Padalino, B.; Henshall, C.; McGreevy, P. An Analysis of Equine Round Pen Training Videos Posted Online: Differences between Amateur and Professional Trainers. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0184851. 820
821
822
75. Mott, R.O.; Hawthorne, S.J.; McBride, S.D. Blink Rate as a Measure of Stress and Attention in the Domestic Horse (*Equus Caballus*). *Sci Rep* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-78386-z. 823
824
76. Lelláková, M.; Pavlak, A.; Lešková, L.; Florián, M.; Skurková, L.; Mesarčová, L.; Kottferová, L.; Takáčová, D.; Kottferová, J. Monitoring Blinks And Eyelid Twitches In Horses To Assess Stress During The Samples Collection Process. *Journal of Applied Animal Welfare Science* **2023**, *26*, 530–539, doi:10.1080/10888705.2021.2008249. 825
826
827
77. Descovich, K.A.; Wathan, J.; Leach, M.C.; Buchanan-Smith, H.M.; Flecknell, P.; Farningham, D.; Vick, S.J. Facial Expression: An under-Utilized Tool for the Assessment of Welfare in Mammals. *ALTEX* **2017**, *34*, 409–429, doi:10.14573/altex.1607161. 828
829
830
78. Hall, C.; Randle, H.; Pearson, G.; Preshaw, L.; Waran, N. Assessing Equine Emotional State Carol Hall. *Appl Anim Behav Sci* **2018**, *205*, 183–193. 831
832
833

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2
3 Diante dos diversos estressores aos quais equinos são expostos no ambiente doméstico
4 se faz necessária a busca por alternativas que possam auxiliar na redução do estresse e aumentar
5 a capacidade dos animais de lidar com desafios, a fim de melhorar a qualidade de vida dos
6 animais e minimizar efeitos deletérios sob o organismo. A partir dos estudos realizados nesta
7 tese, proporcionar um coespecífico calmo, como enriquecimento social, ou mesmo realizar
8 estimulação olfativa com óleo essencial de lavanda, como enriquecimento sensorial, pode
9 atenuar a resposta ao estresse, reduzindo os efeitos negativos da exposição a estressores comuns
10 como isolamento social e restrição de movimento e impactando positivamente o bem-estar
11 animal.

12 Nesse contexto, o uso de parâmetros fisiológicos não invasivos em conjunto com a
13 avaliação de expressões faciais se mostrou um método bem-sucedido, levando a resultados
14 robustos que permitiram a avaliação da resposta ao estresse e a caracterização da experiência
15 emocional dos animais durante o manejo, e a aplicação de diferentes estratégias de
16 enriquecimento.

17 Com base nas observações promissoras da utilização do enriquecimento ambiental
18 sensorial e social sobre o bem-estar de equinos em condições de estresse de curta duração
19 obtidas nesta tese, recomenda-se a implantação de ambas as estratégias em centros equestres.

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30