

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA – PPGZOO

Ritmo diário da atividade locomotora em uma arraia amazônica,
***Potamotrygon wallacei* (CHONDRICHTHYES:**
POTAMOTRYGONIDAE)

Natasha Moura dos Reis

Manaus, Amazonas

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA – PPGZOO

Ritmo diário da atividade locomotora em uma arraia amazônica,
***Potamotrygon wallacei* (CHONDRICHTHYES:**
POTAMOTRYGONIDAE)

Discente: Natasha Moura dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Jaydione Luiz Marcon

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Billalba Carvalho (UFRB)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, área de concentração Fisiologia e Comportamento Animal.

Manaus, Amazonas

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R375r Reis, Natasha Moura dos
Ritmo diário da atividade locomotora em uma arraia amazônica,
Potamotrygon wallacei (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) /
Natasha Moura dos Reis . 2023
57 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jaydione Luiz Marcon
Coorientadora: Thaís Billalba Carvalho
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Análise de Cosinor. 2. Atividade. 3. Comportamento de peixes.
4. Ritmo circadiano. 5. Arraias de água doce. I. Marcon, Jaydione
Luiz. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

O presente estudo objetivou caracterizar o ritmo diário da atividade locomotora e os efeitos deste sobre os parâmetros comportamentais na arraia cururu, *Potamotrygon wallacei*, em ambiente artificial. Os resultados em conjunto indicam que *P. wallacei* apresenta um padrão rítmico diurno, refutando nossa hipótese inicial de uma atividade locomotora predominantemente noturna.

Palavras-chave: análise de Cosinor, atividade, comportamento de peixes, ritmo circadiano, repouso, arraias de água doce.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

João Guimarães Rosa

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao universo por ter colocado tanta gente admirável e inspiradora em meu caminho. Agradeço a minha querida Professora Cristina Motta Buhrnheim por ter sido minha fonte primária de inspiração e educação acadêmica e científica, por ter me introduzido aos estudos com peixes, que cada vez mais atiaça minha curiosidade, e por ter me apoiado em minhas decisões.

Agradeço ao meu orientador Jaydione Luiz Marcon que, mesmo não podendo, aceitou me orientar e me apresentou ao objeto de estudo ao qual estou fascinada. Agradeço a ele também por não ter desistido de mim, até mesmo quando eu queria, por ter me dado forças e ter sido forte por nós dois.

Agradeço a minha coorientadora Thaís Billalba Carvalho por todo suporte e base na área de comportamento animal, o qual eu nunca havia tido contato, por ter feito isto com maestria e da forma mais simples e encantadora que alguém já me ensinou.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Sávio Teixeira de Moura e a equipe do Laboratório de Tecnologia Aplicada à Aquicultura e Pesca, da Universidade Federal do Maranhão (TECAAP/UFMA) por ter cedido o seu software (Track Fish v0.4) e contribuído muito com nosso trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Ronis Da Silveira pelo suporte e cuidado com meu trabalho no período em que foi orientador interino.

Agradeço a todos do Laboratório de Estudos de Fisiologia e Comportamento de Animais Aquáticos (LEFCAQ-UFAM) por terem por compartilharem suas experiências em conjunto e individualmente colaborando para o meu crescimento profissional e pessoal.

Obrigada a minha parceira de trabalho Lara de Jesus da Silva por compartilhar seu conhecimento, causos e companhia enquanto cuidávamos de nossas arraias e por revezar este cuidado comigo quando eu não podia estar presente.

O meu muito obrigada aos Professores Cíntia Cornelius Frische e Fabrício Beggiano Baccaro, pela colaboração e comprometimento com o programa, mas acima de tudo com as pessoas que fazem parte dele. Obrigada Gildázio Costa pelo seu comprometimento e cuidado com todo o processo que envolve um mestrado.

E por fim, dedico meu trabalho ao professor Marcelo Menin (*in memoriam*) que, mesmo sem me conhecer bem, abriu as portas do PPGZOO para mim e me integrou ao programa e ao meu grupo de estudo e trabalho, me apresentou a algumas das pessoas incríveis citadas acima e fez a diferença no mundo com sua personalidade única e colaborativa. **MUITO OBRIGADA!**

Resumo

Os diferentes organismos, incluindo vertebrados, realizam atividades rotineiras durante seus ciclos de vida que podem variar ritmicamente de forma diária ou sazonal. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar o ritmo diário da atividade locomotora e os efeitos deste sobre as variáveis comportamentais na arraia cururu, *Potamotrygon wallacei*, em ambiente artificial. Para isso, 10 arraias foram distribuídas individualmente em aquários experimentais (volume de 100 L) e submetidas a gravações contínuas de sua atividade diária por três dias consecutivos. A partir da análise das filmagens realizadas, foi elaborado um etograma com a descrição das unidades comportamentais. Dez unidades foram identificadas (n=10), sendo nove relacionadas à atividade (natação e movimento com e sem deslocamento) e uma ao repouso. De posse destas unidades, foi realizada a quantificação da frequência, analisando-se os primeiros 10 minutos de cada hora, totalizando 120 horas de observação. Para melhor visualização da atividade, todas as unidades voltadas a essa manifestação comportamental foram agrupadas, constituindo-se dois grupos: atividade e repouso. Além destas, duração (s), distância percorrida (cm) e a velocidade média (cm/s), também foram avaliadas a partir do uso de um software (Fish Track v0.4), que quantificou as mesmas durante um período completo de 24 horas de um dia. A existência de um padrão rítmico foi testada utilizando o método de Cosinor, que define acrofases (períodos de pico) para as variáveis analisadas. Os resultados obtidos para os três dias agrupados revelaram uma acrofase para a atividade às 12:36h e para o repouso às 23:29h. A duração, distância percorrida e a velocidade média também demonstraram acrofases que indicam maior atividade locomotora no período fótico do dia. Estes resultados em conjunto indicam que *P. wallacei* apresenta um padrão rítmico diurno, contrastando com a nossa hipótese inicial de uma atividade locomotora predominantemente noturna. Investigações futuras em ambiente natural seriam desejáveis para corroborar os achados obtidos no presente estudo em relação ao padrão rítmico da atividade locomotora para a arraia cururu.

Palavras-chave: análise de Cosinor, atividade, comportamento de peixes, ritmo circadiano, repouso, arraias de água doce.

Abstract

Different organisms, including vertebrates, perform routine activities during their life cycles that may vary rhythmically on a daily or seasonal basis. Thus, the present study aimed to characterize the daily rhythm of locomotor activity and its effects on behavioral parameters in the cururu stingray, *Potamotrygon wallacei*, in an artificial environment. For this, 10 stingrays were individually distributed in experimental aquariums (100 L volume) and submitted to continuous recordings of their daily activity for three consecutive days. Based on these video analyses, an ethogram was created with the description of the behavioral units. Ten units were identified (n=10), nine related to activity (swimming and movement with and without displacement) and one to rest. With these units in hand, the frequency was quantified, analyzing the first 10 minutes of each hour, totaling 120 hours of observation. For a better visualization of the activity, all units focused on this behavioral manifestation were grouped, constituting two groups: total activity and rest. In addition, the duration (s), distance traveled (cm) and average speed (cm/s) were also evaluated using a software (Fish Track v0.4), which quantified them during a complete period of 24 hours of a day. The existence of a rhythmic pattern was assessed and confirmed by using the Cosinor method, which defined the acrophases (peak periods) for the analyzed variables. The results obtained for the three grouped days revealed an acrophase for activity at 12:36h and for rest at 23:29h. The duration, distance traveled, and average speed also showed acrophases that indicate greater locomotor activity in the photic period of the day. These results together indicate that *P. wallacei* presents a diurnal rhythmic pattern, contrasting with the initial hypothesis of this study, of a predominantly nocturnal locomotor activity. Future investigations in a natural environment would be desirable to corroborate the findings obtained in the present study in relation to the rhythmic pattern of locomotor activity for the cururu stingray.

Keywords: Cosinor analysis, activity, fish behavior, circadian rhythm, rest, freshwater stingrays.

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras	10
Índice de Tabelas.....	14
1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	19
3. Hipótese alternativa	19
4. Material e Métodos.....	19
4.1. Área de coleta e aclimação das arraias.....	19
4.2. Protocolo experimental	23
4.3. Medida da luminosidade (lux)	25
4.4. Análise comportamental	26
4.5. Análises estatísticas	28
5. Resultados.....	29
6. Discussão	45
7. Considerações finais.....	50
8. Referências	50

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa mostrando o arquipélago de Mariuá, Barcelos – AM	20
Figura 2. Arraias recém-chegadas de Barcelos acomodadas em caçapas com água do Rio Negro.....	21
Figura 3. Caixas de PVC e piscinas de lona utilizadas no período de aclimação das arraias.....	21
Figura 4. Procedimento de estabilização da temperatura da água nas caçapas antes da transferência das arraias para os tanques e piscinas de aclimação.....	22
Figura 5. Aquários experimentais demonstrando o revestimento das faces laterais e do fundo com adesivo na coloração azul, bem como sua face anterior dividida em quadrantes equidistantes	24
Figura 6. Demonstração do funcionamento do programa Fish Track v0.4 medindo a atividade locomotora mostrando, em verde, o rastro da distância percorrida.....	27
Figura 7. Parâmetros avaliados na análise de Cosinor. (Modificado de Cornelisen, 2014).....	27
Figura 8. Representação do período diário dividido em 12 horas de luz (ZT0 a ZT11) e 12 horas de escuro (ZT12 a ZT23). ZT= tempo <i>zeitgeber</i>	28
Figura 9. Animal ondula as nadadeiras podendo mexer seu corpo para a direita ou esquerda sem sair do lugar de origem, indicando um movimento sem deslocamento.....	30
Figura 10. O animal realiza movimento com a nadadeira se deslocando do seu ponto de origem, indicando um movimento com deslocamento.....	31
Figura 11. A cauda do animal balança rapidamente de um lado para o outro caracterizando o movimento caudal.....	31
Figura 12. Imagens noturnas do deslocamento vertical da arraia, da superfície até o fundo do aquário.....	32
Figura 13. O animal se desloca horizontalmente com ondulação da nadadeira de um extremo ao outro do aquário, caracterizando a natação horizontal.....	33

Figura 14. O animal movimenta seu corpo para trás, caracterizando a natação retrógrada	33
.....	
Figura 15. A arraia se desloca na face no aquário, com natação vertical	34
.....	
Figura 16. O animal se inclina mostrando a parte ventral anterior caracterizando o movimento inclinado. Visão frontal e lateral	34
.....	
Figura 17. Arraia em repouso no fundo do aquário	35
.....	
Figura 18. Análise do Cosinor para o total de atividade exibida pela arraia cururu (<i>P. wallacei</i>). (A) primeiro dia de experimento (n=10), (B) segundo dia de experimento (n=10), (C) terceiro dia de experimento (n=10), (D) e nos três dias juntos (n=30). A circunferência representa os ZTs com destaque para o período de acrofase. A linha simples representa o período fótico do dia e linha dupla o período não fótico. Os gráficos abaixo da circunferência representam as variações individuais registradas ao longo do dia	36
.....	
Figura 19. Análise do Cosinor para o repouso exibido pela arraia cururu (<i>P. wallacei</i>). (A) primeiro dia de experimento (n=10), (B) segundo dia de experimento (n=10), (C) terceiro dia de experimento (n=10), (D) e nos três dias juntos (n=30)	37
.....	
Figura 20. Frequência de atividade (A) e repouso (B) exibida pela arraia cururu (<i>P. wallacei</i>). Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam significado diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha clara senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm EP	38
.....	
Figura 21. Frequência de atividade total (A) e repouso (B) da arraia cururu (<i>P. wallacei</i>) nos três dias de experimento, em relação ao período claro (linha azul) e escuro (linha preta) do dia. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os períodos de claro e escuro no mesmo dia (ANOVA de duas vias). Valores expressos como média \pm EP	39
.....	
Figura 22. Análise do Cosinor para a distância percorrida (cm) registrada para a arraia cururu (<i>P. wallacei</i>) durante o período de 24 horas de um	40

dia.....

Figura 23. Distância percorrida (cm) por indivíduos da arraia cururu ao longo do dia em ambiente artificial. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha tracejada senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm

EP..... 41

Figura 24. Análise do Cosinor para a duração (s) da atividade (A) e de repouso (B) exibida pela arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia..... 42

Figura 25. Tempo de duração (s) da atividade (A) e repouso (B) registrados para a arraia cururu durante o período de 24 horas de um dia. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam significado diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha tracejada senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm EP..... 43

Figura 26. Análise do Cosinor para a velocidade média (cm/s) registrada para a arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia. A circunferência representa os ZTs com destaque para o período de acrofase. A linha simples representa o período fótico do dia e linha dupla o período não fótico. O gráfico abaixo da circunferência representa as variações individuais registradas ao longo do dia..... 44

Figura 27. Velocidade média (cm/s) registrada para a arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os ZT ($p > 0,05$; ANOVA de uma via). Valores expressos como média \pm EP..... 45

Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos mensurados na água das caixas e piscinas contendo os indivíduos da arraia cururu (<i>P. wallacei</i>) durante o período de aclimação	23
Tabela 2. Dados biométricos dos indivíduos da arraia cururu (<i>P. wallacei</i>) utilizados no experimento	24
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos mensurados na água dos aquários durante o experimento com os indivíduos da arraia cururu (<i>P. wallacei</i>)	25

1. Introdução

Os diferentes organismos, incluindo os vertebrados, realizam atividades rotineiras durante seus ciclos de vida, que incluem ações simples como o ato de se deslocar, de forragear para adquirir alimentos, dormir e acordar, além de ações voltadas à reprodução e perpetuação da espécie. Em todos os organismos estas funções vitais acabam sendo orientadas de forma cíclica e acionadas em decorrência de estímulos ambientais que podem variar de forma diária ou sazonal (Laposky et al., 2008). Estes estímulos ambientais acabam exercendo padrões de ritmicidade nas funções biológicas que, por sua vez, são regulados por mecanismos endógenos capazes de prever o momento ideal e sincronizar essas atividades com as condições oferecidas pelo ambiente. (Schwartz e Daan, 2017).

Esta sincronização permite que os processos biológicos adquiram a ritmicidade necessária para que se coordenem temporalmente, entre si e com os ciclos ambientais (Bell-Pedersen et al., 2005). O mecanismo endógeno, também conhecido como relógio biológico é um sistema complexo de reguladores intracelulares, osciladores endógenos e genes capazes de ajustar as respostas fisiológicas e comportamentais dos seres vivos às mudanças recorrentes no ambiente. Este sistema de adaptação proporcionou aos organismos vivos o aperfeiçoamento de seus processos biológicos (Aschoff, 1981; Vera et al., 2009) e uma adaptação valiosa ao longo do tempo.

Os ciclos fisiológicos, como as flutuações hormonais e dos parâmetros sanguíneos, assim como o comportamento animal, podem ser influenciados pelo sol, pela lua, pelas marés e pelas diferentes estações do ano, apresentando um ritmo que pode ser classificado de acordo com a sua periodicidade. Os ritmos ultradianos se repetem em intervalos de até 20 horas, os circadianos em intervalos de 20 até 28 horas, enquanto os ritmos infradianos ocorrem em intervalos maiores do que 28 horas (Herrero et al., 2003; Schulz e Leuchtenberger, 2006).

As mudanças ambientais podem atuar como sincronizadores (*zeitgeber*) desses ritmos. Um *zeitgeber* é um fator ambiental (temperatura, umidade, luminosidade, pH da água, salinidade em ambientes estuarinos, entre outros) que promove o prolongamento dos ritmos biológicos. A importância de cada tipo de *zeitgeber* depende das características de cada espécie e de sua relação com o ambiente (Marques, 2003).

Ciclos diários de luz são pistas ambientais poderosas que têm um grande impacto em uma ampla gama de comportamentos e processos fisiológicos essenciais para a vida

(Carlson e Gross, 2018). A maioria dos seres vivos, incluindo os diversos grupos de vertebrados (Vera et al., 2007, 2009; Hayasaka et al., 2010; Cruz, 2007; Bano-Otalora e Piggins, 2017), pode perceber as flutuações da luz ao longo do dia, graças à presença de fotorreceptores e fotopigmentos que evoluíram no sentido de captar essa informação fótica fornecida pelo ambiente (Davies et al., 2012).

Durante o ciclo claro/escuro ocorre a atividade locomotora diária que pode ser regida, ou não, pelo ritmo circadiano da espécie. Essa ritmicidade é investigada em peixes teleósteos e os classifica de acordo com os intervalos de pico da atividade locomotora. Indivíduos das espécies como *Carassius auratus* (Iigo et al., 1994; Iigo e Tabata, 1996; López-Olmeda et al., 2006), *Danio rerio* (Hurd et al., 1998; Blanco-Vives e Sánchez-Vázquez, 2009) e *Piaractus brachypomus* (Baras, 2000) são predominantemente diurnas e apresentam o pico de sua atividade registrado no período claro do dia. Por outro lado, indivíduos de espécies como *Tinca tinca* (Herrero et al., 2003), *Solea senegalensis* (Bayarri et al., 2004; López-Olmeda, 2016) e *Anguilla anguilla* (López-Olmeda et al., 2012), apresentam maior atividade locomotora no período de escuridão, sendo estas espécies classificadas como predominantemente noturnas. Há também espécies cujos indivíduos não apresentam um padrão rítmico de atividade definido, sendo conhecidas como arrítmicas, como o tubarão *Galeorhinus galeus* (Kelly et al., 2020). Entre as espécies de elasmobrânquios investigados, os padrões rítmicos observados são, geralmente, crepuscular/noturno (Garrone-Neto e Uieda, 2012; Kelly et al., 2019; Kelly et al., 2020). No entanto, estudos comportamentais relacionando os ciclos claro/escuro com a atividade locomotora são ainda muito restritos no grupo, quando comparados aos teleósteos, especialmente em espécies de água doce (Rojas, 2019).

Sabe-se que a atividade locomotora em peixes pode ser estimulada por outros fatores, como a temperatura, disponibilidade de alimentos, predação e época reprodutiva (Biswas e Takeuchi, 2002; Shibuya et al., 2012; Thonhauser, 2018). Apesar disso, a ocorrência de uma maior atividade locomotora em determinadas horas do dia parece ser característica de cada espécie e associada a uma herança genética, ou ainda depender de fatores sensoriais, como a fotosensibilidade (Oliveira et al., 2009). Além de fatores ambientais, o comportamento é modulado por fatores intrínsecos que atuam de forma direta nas respostas comportamentais e seus efeitos são associados ao estado fisiológico do indivíduo (Ventueri e Bernadino, 1999).

Compreender os ritmos de atividade de uma espécie é um primeiro passo importante para identificar o valor adaptativo por trás desses padrões (Kelly et al., 2020), principalmente quando se trata de um bioma altamente diverso como a bacia Amazônica. Essa região contém espécies de peixes com diferentes hábitos e características comportamentais e fisiológicas, que a tornam extremamente interessante para estudos ligados aos ritmos diários ou sazonais de atividade locomotora, como as migrações tróficas e reprodutivas (“piracemas”) executadas por diversas espécies de teleosteos, como os characiformes (tambaqui, pacus, matrinxã, curimatã, entre outros) e siluriformes (maparás, surubins, douradas, entre outros) (Goulding, 1980; Araújo-Lima e Ruffino, 2003; Gleiss et al., 2017). Além disso, nos permite compreender como os animais exploram seu habitat, já que o uso espacial do ambiente está ligado com o ritmo da atividade locomotora e as pistas fóticas dadas ao longo do dia (Carlson e Gross, 2018).

Outro grupo igualmente diverso, em se tratando de elasmobrânquios de água doce, é a Família Potamotrygonidae, que foi subdividida em duas subfamílias, Potamotrygoninae, constituída por quatro gêneros exclusivos de ambientes de água doce (*Paratrygon*, *Plesiotrygon*, *Potamotrygon* e *Heliotrygon*) e Stiracurinae, representada pelo gênero *Styracura*, que contém duas espécies válidas de origem marinha (Carvalho et al., 2016a). As arraias de água doce são predadoras carnívoras de grande importância ecológica dentro da ictiofauna amazônica, contribuindo para o equilíbrio e a dinâmica destes ambientes aquáticos (Shibuya, 2009).

Dentre as espécies desse grupo, a que se destaca, pelo seu menor tamanho entre os potamotrigonídeos, com largura de disco máxima de 310 mm e policromatismo individual, é *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa & Araújo, 2016, conhecida popularmente como arraia cururu. Esta espécie é endêmica da bacia do médio Rio Negro e encontrada entre os folhiços ou nas regiões areno-argilosas das áreas de florestas alagadas (igapós) existentes ao longo do Arquipélago do Mariuá, o maior complexo de ilhas fluviais do mundo (Araújo, 1998; Carvalho et al., 2016b). Os picos de crescimento dessa espécie estão relacionados com o período de seca dos rios, pois é quando há uma maior disponibilidade de alimentos (Duncan et al., 2016). No geral, as fêmeas são maiores que os machos e chegam a pesar 1000g, sendo a longevidade da espécie estimada em 14 anos (Freire, 2015). Segundo Shibuya et al. (2009), a arraia cururu possui sua dieta baseada em crustáceos, larvas de insetos e pequenos peixes.

Os eventos do ciclo reprodutivo são regulados pelo pulso de inundação da bacia do médio Rio Negro (Araújo, 1998; Marcon et al., 2021; Morales-Gamba et al., 2021) e o parto ocorre durante a seca e início da enchente dos rios, quando mais de 40% das fêmeas adultas estão grávidas. Os neonatos e jovens dessa espécie já representaram mais de 50% da quantidade anual de arraias legalmente exportadas para o mercado internacional de peixes ornamentais, a partir de Manaus (Duncan et al., 2016). Apesar de não ser considerada um recurso alimentício, a arraia cururu encontra em seu pequeno porte e em sua rusticidade no manejo, como resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (Pastório, 2014) e um fácil controle parasitário (Lemos, 2011), forte potencial para o mercado ornamental.

Apesar da reconhecida importância biológica e potencial comercial que a arraia cururu apresenta, ainda são observadas lacunas na literatura em relação aos ritmos diários da atividade locomotora para a espécie em foco e para a Família Potamotrygonidae como um todo. O desconhecimento dos ritmos diários comportamentais e fisiológicos, podem acarretar perda da qualidade de vida do animal, menor expectativa de vida e, conseqüentemente, em maior retirada de indivíduos de seu habitat natural, impactando a cadeia trófica e o ecossistema de origem destes animais. Outra contribuição deste estudo é oferecer bases comportamentais que ajudem a entender como esta espécie explora seu ambiente e o porquê da sua especificidade, já que são encontradas somente em igapós, acrescentando conhecimento à biologia desta espécie.

Portanto, a avaliação da influência das fases de claro e escuro sobre a atividade locomotora poderá demonstrar, pela primeira vez, a importância do ritmo circadiano de atividade na manifestação dos aspectos comportamentais desta espécie de arraia de água doce em ambiente artificial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o ritmo diário da atividade locomotora e os efeitos deste sobre as variáveis comportamentais na arraia cururu, *Potamotrygon wallacei*, em ambiente artificial.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever a atividade locomotora da arraia cururu em ambiente artificial;
- Identificar a existência de um padrão comportamental rítmico diário para a espécie;
- Testar se as variáveis relacionadas à atividade locomotora coincidem com o pico de atividade diária da espécie.

3. Hipótese alternativa

Espera-se que a arraia cururu apresente maior atividade locomotora durante o período não fótico (noturno) do dia.

4. Material e Métodos

4.1. Área de coleta e aclimatação das arraias.

Para a realização do experimento proposto, exemplares da arraia cururu (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo 2016), com largura de disco entre 12 e 16 cm foram coletados no Igarapé do Zamula (0°50'28" S, 62°46'5" W), no Arquipélago do Mariuá, região da bacia do médio Rio Negro, próximo ao município de Barcelos, AM (Figura 1). A coleta foi realizada com a colaboração de pescadores locais durante o período noturno, que utilizaram lanternas de cabeça e instrumentos de captura rápida (rapiché e remo) visando minimizar o estresse e possíveis ferimentos originados pela manipulação dos animais (Oliveira et al., 2012). Este estudo dispõe de autorização prévia (Sisbio nº 18285-1) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para a coleta das arraias no Arquipélago do Mariuá, em Barcelos (AM) e foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética para o uso de animais em animais em Pesquisa da Universidade Federal das Amazonas (Protocolo CEUA/UFAM # 002/2017).

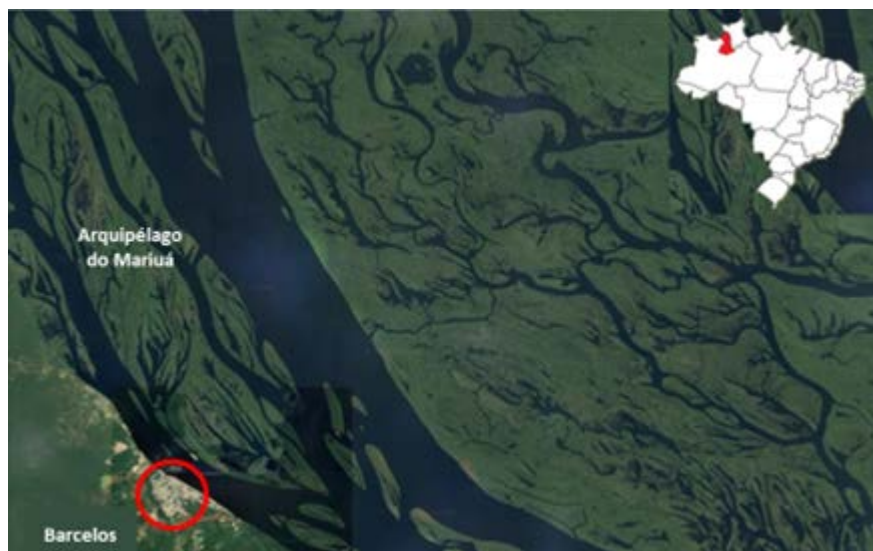


Figura 1. Mapa mostrando o Arquipélago de Mariuá, Barcelos - AM.

As arraias foram transportadas para Barcelos e, depois, para Manaus em monoblocos de PVC (caçapas) contendo água proveniente do Rio Negro (Figura 2), por via fluvial em barco regional, com duração média de 24 horas. Em Manaus, foram transportadas até o Laboratório Experimental de Fisiologia e Comportamento de Animais Aquáticos (LEFCAQ), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram acomodados em grupos de três a seis indivíduos, em caixas de polietileno de 500L e piscinas de lona com volume de 400 litros, respectivamente, dotadas de sistema de filtro biológico e aeração constante (Figura 3). Ao realizar a transferência das arraias para as caixas e piscinas, as caçapas de origem foram mantidas de 10 a 15 minutos acima d'água a fim de estabilizar a temperatura nos dois compartimentos e, com isso, evitar algum tipo de desconforto para os animais (Figura 4).



Figura 2. Arraias recém-chegadas de Barcelos acomodadas em caçapas com água do Rio Negro.

Figura 3. Caixas de PVC e piscinas de lona utilizadas no período de aclimação das arraias.



Figura 4. Procedimento de estabilização da temperatura da água nas caçapas antes da transferência das arraias para os tanques e piscinas de aclimação.

Uma vez transferidas para os tanques ou piscinas, as arraias passaram por um período de 40 dias de aclimação, para que pudessem se recuperar do estresse da coleta e transporte, e serem alimentadas para ganhar peso e reestabelecerem sua forma saudável, antes de serem utilizadas nos experimentos. Assim, as arraias receberam alimentação diária em períodos diferentes e aleatórios ao longo do dia, a fim de se evitar o condicionamento nos momentos que antecedem a alimentação. A alimentação das arraias foi baseada em pequenos pedaços de peixes condizentes com o tamanho de sua boca, além de minhocas e camarões vivos (Shibuya et al., 2009) coletados semanalmente na Estação de Piscicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus.

Durante o período de aclimação, os parâmetros físico-químicos da água (amônia total, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido e temperatura) foram mensurados (Tabela 1) com o uso de um aparelho multiparamétrico (AK88, Akso, São Leopoldo, Brasil). Além disso, a cada dia, foi realizada a troca de 30% do volume útil de água em cada caixa e piscina de aclimação, para a eliminação de sobras de alimento, fezes, muco e quaisquer outros resíduos, com o objetivo de manter a qualidade da água e o bem-estar dos animais até a realização dos experimentos.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos mensurados na água das caixas e piscinas contendo os indivíduos da arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de aclimação (n= 40).

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Mín.	Máx.
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	23,2	2,7	15,2	31,3
pH (unidade)	7,3	0,1	7,1	7,5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	26,8	0,1	26,7	27,0
Oxigênio (mg/L)	5,3	0,1	5,2	5,5
Amônia total (mg/L)	0,2	0,1	0,0	0,4

4.2. Protocolo experimental

Para a condução do experimento, foram utilizados aquários de vidro com dimensões de 45cm x 80cm x 38cm (comprimento x largura x altura) preenchidos com volume de 100 L de água, com as faces laterais revestidas com adesivo na cor azul (Figura 5), a fim de minimizar perturbações externas e/ou contato visual entre os indivíduos dispostos em aquários situados lateralmente. Como não existem informações sobre o efeito das cores do ambiente no bem-estar de espécies de arraias de água doce, a escolha da cor azul foi baseada no estudo de Volpato e Barreto (2001), que definiu essa coloração como a menos estressante para uma espécie de ciclídeo (*Oreochromis niloticus*). A face anterior dos aquários foi dividida em quadrantes iguais de 5cm² equidistantes para facilitar a mensuração manual do deslocamento durante o período de filmagem de cada arraia (Figura 5). No entanto, este parâmetro acabou sendo mensurado por um programa de computador (Fish Track v0.4; ver adiante).

Antes do início do experimento, 10 indivíduos da arraia cururu de ambos os sexos, foram coletados aleatoriamente dos tanques de aclimação e anestesiados com uma solução de eugenol de 75mg/L (Lima et al., 2021) para o registro da largura de disco (cm) e do peso (gramas) (Tabela 2), com o intuito de evitar o uso de animais com dimensões e massas discrepantes entre si nos ensaios experimentais.



Figura 5. Aquários experimentais demonstrando o revestimento das faces laterais e do fundo com adesivo na coloração azul, bem como sua face anterior dividida em quadrantes equidistantes.

Tabela 2. Dados biométricos dos indivíduos da arraia cururu (*P. wallacei*) utilizados no experimento (n=10).

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Mín.	Máx.
Massa (g)	124,1	18,8	67,6	180,6
Largura do disco (cm)	14,5	0,8	13,5	15,8

Após a biometria, cada arraia (n=10) foi transferida e mantida por 72 horas (três dias consecutivos) em seu respectivo aquário, para realização do registro contínuo do comportamento de locomoção. Os registros em vídeo foram obtidos com o uso de um sistema de filmagem contendo luz infravermelha (para filmagem noturna) dotado de câmeras digitais (câmeras de segurança Intelbras VHD1010BG4, Brasil) conectadas a um módulo de vídeo DVR (Digital vídeo recorder) e posicionadas perpendicularmente a 1,5 m de distância em relação à face frontal dos aquários. Os ensaios, independentes entre si, somaram 216 horas (9 dias) de gravação.

Durante a condução dos experimentos, foi adotado um fotoperíodo regular de 12h claro: 12h escuro (Vera et al., 2006), no qual as luzes do laboratório foram acesas pontualmente em todos os dias às 06:00 horas da manhã e desligadas às 18:00 horas da

noite, por meio do controle de um temporizador automático. Nesse período, os procedimentos de alimentação e renovação de água não foram realizados a fim de minimizar a presença humana durante as gravações e a influência desta no comportamento dos animais. Os parâmetros físico-químicos da água, como a concentração de oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, pH e temperatura, foram mensurados com um aparelho multiparamétrico (AK88, Akso, São Leopoldo, Brasil). A concentração (mg/L) de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foi determinada por meio do uso do kit comercial LabconTest, de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante (Tabela 3).

Ao término de cada um dos três ensaios experimentais, o grupo de arraias utilizado foi devolvido para piscinas específicas de manutenção devidamente identificadas na área de aclimação, para evitar que houvesse repetição no uso dos animais nos experimentos subsequentes.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos mensurados na água dos aquários durante as 72 horas de experimento com os indivíduos da arraia cururu (*P. wallacei*) (n=30).

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Mín.	Máx.
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	32,4	4,0	20,4	44,5
pH (unidade)	7,6	0,1	7,3	7,9
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	26,5	0,2	26,1	27,0
Oxigênio (mg/L)	6,5	0,3	5,7	7,3
Amônia total (mg/L)	0,2	0,1	0,1	0,5

4.3. Medida da luminosidade (lux)

Antes de cada ensaio do experimento foram realizadas medidas da intensidade luminosa com luxímetro digital (Minipa MLM1011, São Paulo, Brasil) em pontos dentro do laboratório utilizado para a condução dos experimentos. Com o intuito de aproximar a intensidade luminosa laboratorial daquela em que os animais são normalmente encontrados nos ambientes de igapó (Carvalho et al., 2016), foram utilizadas telas pretas do tipo sombrite para minimizar a passagem de luz direta incidente sobre os aquários. Foram obtidos valores (média \pm DP) de luminosidade equivalentes a $54,8 \pm 7,5$ (45,3 - 90,3) lux entre os diferentes ensaios experimentais.

4.4. Análise comportamental

Os etogramas são listas de unidades comportamentais descritas objetivamente, uma a uma, para facilitar a identificação do comportamento de uma determinada espécie (Gonçalves de Freitas e Nishida, 2011). Existem etogramas para diversas categorias de comportamento (Teresa e Gonçalves de Freitas, 2003; Rojas, 2019) que demonstram a importância do uso dessa ferramenta nos estudos de comportamento animal.

De posse das filmagens obtidas no experimento, foi elaborado o etograma da atividade locomotora, para descrição das unidades comportamentais, a partir da observação dos primeiros 10 minutos de cada hora de um dia (24 horas) dos vídeos resultantes dos ensaios, totalizando 240 minutos de observação por animal. Os vídeos analisados foram escolhidos de forma aleatória de modo que cada arraia tivesse 24 horas analisadas dentro do experimento. Os momentos em que havia registro de presença humana no laboratório não foram analisados. A categoria comportamental de atividade locomotora foi composta por unidades associadas à natação e ao repouso, sendo também descritos padrões motores que envolvem a realização de movimento sem deslocamento, conforme realizado por Rojas (2019).

As unidades comportamentais descritas no etograma foram quantificadas, quanto a frequência (números de vezes em que a unidade é realizada) utilizando os primeiros 10 minutos de cada hora, dos três dias de gravação, totalizando 120 horas. Essas unidades foram separadas em dois grupos: repouso e aquelas relacionadas à atividade geral (movimento e natação), a fim de verificar os picos durante as 24 horas de gravação de cada dia.

Além da frequência, a duração (s), a velocidade média (cm/s) e a distância percorrida (cm) também foram avaliadas em relação à atividade geral e ao repouso, sendo para essas unidades, considerado o tempo do primeiro dia (24 horas) de observação. Para tanto, foi utilizado o software Fish Track v0.4, desenvolvido pelo Laboratório de Tecnologia Aplicada à Aquicultura e Pesca, da Universidade Federal do Maranhão (TECAAP/UFMA), sob a coordenação do Professor Doutor Rodrigo Sávio Teixeira de Moura. O software utiliza técnicas de detecção de objetos e de movimento para identificar os organismos estudados, fazendo o rastreamento da sua trajetória em tempo real e produzindo assim informações relativas à movimentação (Figura 6). Os dados obtidos para cada unidade comportamental foram organizados para a obtenção

dos parâmetros estatísticos descritivos (média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo).



Figura 6. Demonstração do funcionamento do programa Fish Track v0.4 medindo a atividade locomotora mostrando, em verde, o rastro da distância percorrida.

Para testar a ritmicidade das variáveis comportamentais foi utilizada a análise de Cosinor (Cornellisen, 2014), que ajusta os dados para uma função sinusoidal permitindo a avaliação de valores como o mesor (valor médio ajustado pelo ritmo), a acrofase (fase mais alta) e a amplitude (diferença entre o valor máximo e o mesor) que devem ser avaliados ao analisar as variações de ritmos (Figura 7).

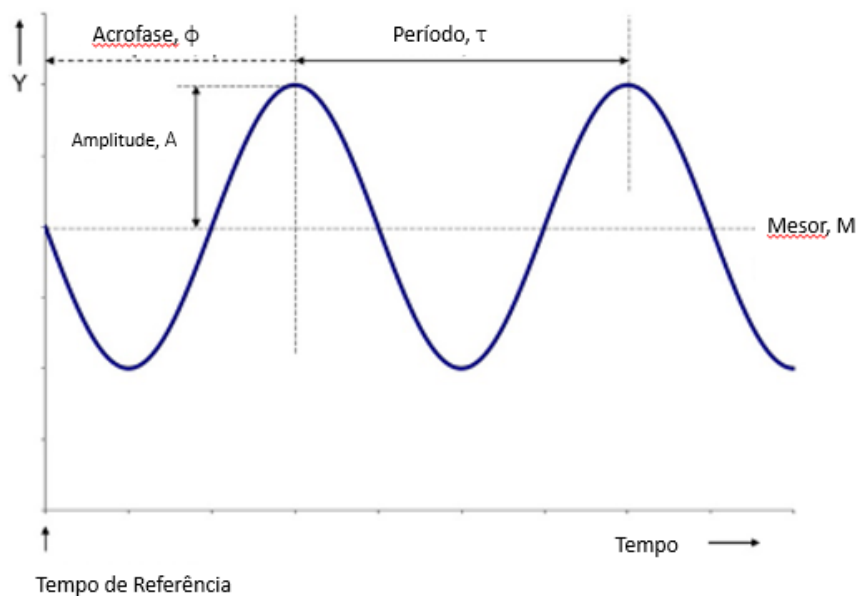


Figura 7. Parâmetros avaliados na análise de Cosinor (Modificado de Cornellsen, 2014).

Com o intuito de dividir as fases regulares de claro e escuro, no período de 24 horas durante o experimento, foram definidos os *tempos zeitgeber* (sincronizador, ZT), sendo ZT0 = 6:00h, definido como o momento em que as luzes foram acesas e ZT12 = 18:00h, definido como o momento em que as luzes foram apagadas (Figura 8).

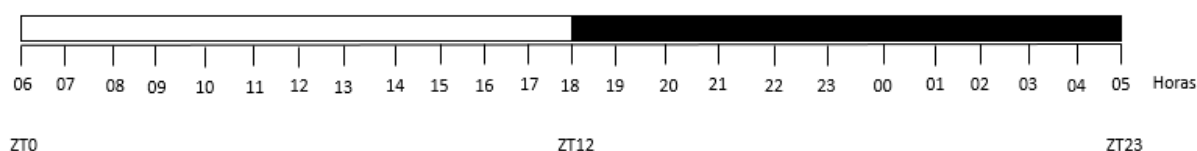


Figura 8. Representação do período diário dividido em 12 horas de luz (ZT0 a ZT11) e 12 horas de escuro (ZT12 a ZT23). ZT= *tempo zeitgeber*.

4.5. Análises estatísticas

Para identificar o padrão rítmico da atividade locomotora diária, baseados na frequência encontrada nas unidades comportamentais, o conjunto de dados obtidos foi testado por meio da análise de Cosinor. Para isso, foi utilizada a fórmula da função Cosinor ($Y = M + A * [\text{Cos}(\Omega t + \Phi)]$), onde M é mesor, A é amplitude, Ω é frequência angular (3600/24h para ritmos diários) e Φ é acrofase, conforme descrito por Carlson e Gross (2018) e Blanco-Vives e Sánchez-Vázquez (2009).

Para testar as diferenças entre as médias da frequência e duração das unidades comportamentais obtidas em cada *zeitgeber*, foi aplicado o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste *à posteriori* de Duncan. Para a comparação da frequência de atividade total e de repouso entre os dias de observação e o período claro e escuro foi utilizado o teste de ANOVA de duas vias. Foi considerado o nível de significância estatístico de 95% ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram expressos como a média \pm EP (erro padrão da média).

5. Resultados

Foi elaborado o etograma da atividade locomotora de *Potamotrygon wallacei* (Quadro 1), sendo descritas oito unidades comportamentais referentes a atividade dos animais (movimento com e sem deslocamento) e uma unidade correspondendo ao repouso. Das oito unidades comportamentais vinculadas à atividade, uma unidade (natação diagonal) não foi observada durante os 10 minutos de cada ZT, além da unidade “natação retrógrada” que ocorreu em número insuficiente para ser quantificada. Portanto, essas duas unidades comportamentais não foram consideradas na quantificação da frequência e da duração.

Considerando os três dias analisados nos ensaios, a unidade comportamental de atividade mais observada foi o movimento com deslocamento (4015 observações), seguido do movimento sem deslocamento (3799 observações) e inclinado (2804 observações).

Quadro 1. Etograma da atividade locomotora de *Potamotrygon wallacei*.

Unidade comportamental	Descrição
Movimento sem deslocamento	Animal ondula as nadadeiras e vira o corpo em diferentes direções, mas sem deslocamento (Figura 9).
Movimento com deslocamento	Animal ondula as nadadeiras e vira o corpo em diferentes direções com deslocamento total ou parcial do lugar de início (Figura 10).
Movimento caudal	Animal permanece parado e movimenta a cauda de modo alternado (para os lados direito/esquerdo) (Figura 11).
Natação diagonal	Animal se desloca em trajetória diagonal (Figura 12).

Natação horizontal	Animal se desloca em trajetória linear e horizontal com ondulação das nadadeiras (disco) no sentido anterior-posterior do corpo (Figura 13).
Natação retrógrada	Animal se desloca em trajetória linear e horizontal para trás com ondulação das nadadeiras no sentido posterior-anterior do corpo (Figura 14).
Natação vertical	Animal se desloca em trajetória linear e vertical do fundo para a superfície da água apoiado nas paredes do aquário (Figura 15).
Inclinado	Animal ondula as nadadeiras e realiza pequenos movimentos de inclinação da região anterior ($\pm 90^0$) (Figura 16).
Repouso	Animal permanece parado, sendo observado somente movimento do olho e/ou espiráculo (Figura 17).

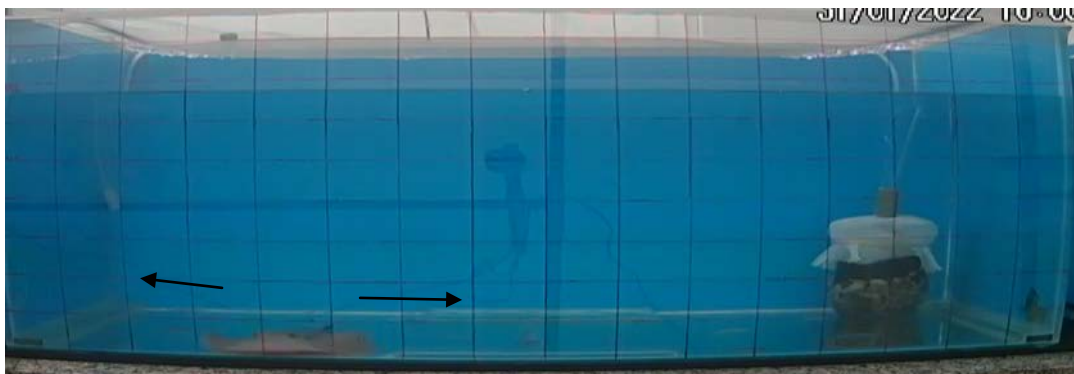


Figura 9. Animal ondula as nadadeiras podendo mexer seu corpo para a direita ou esquerda sem sair do lugar de origem, indicando um movimento sem deslocamento.



Figura 10. O animal realiza movimento com a nadadeira se deslocando do seu ponto de origem, indicando um movimento com deslocamento.



Figura 11. A cauda do animal balança rapidamente de um lado para o outro caracterizando o movimento caudal.

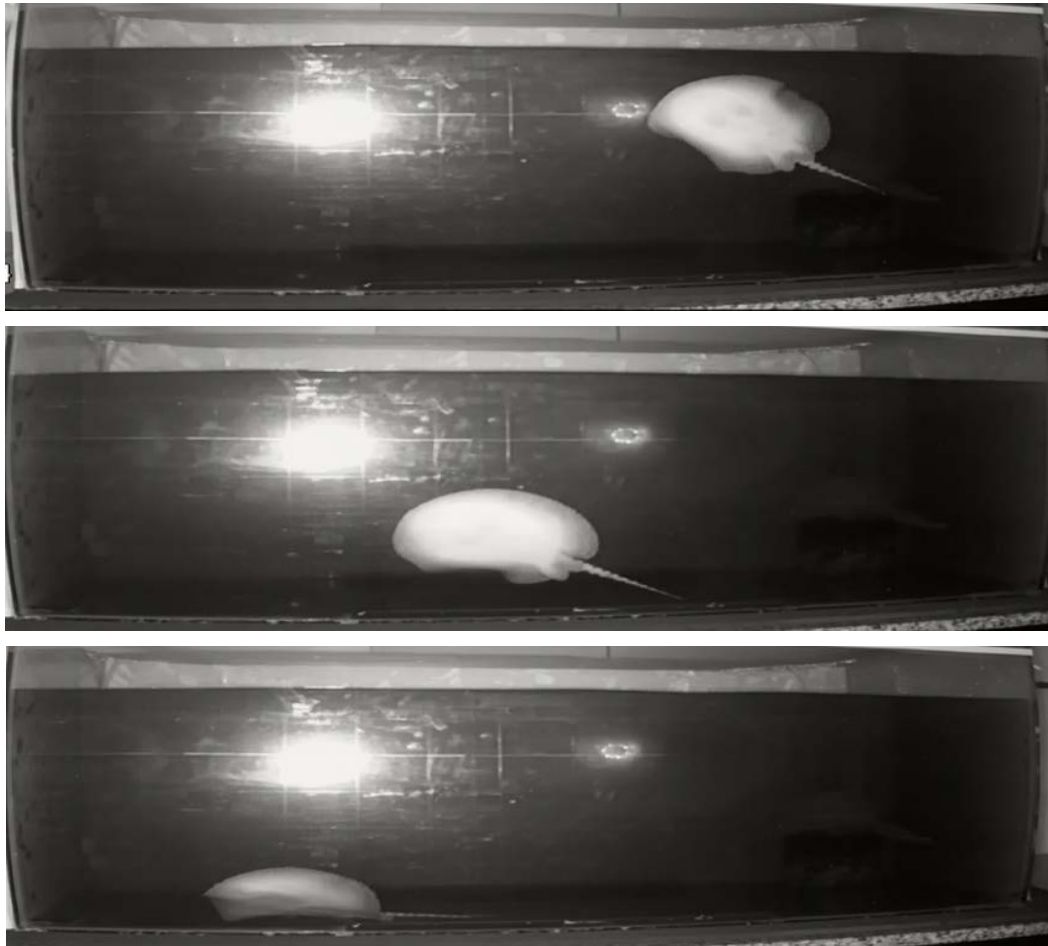


Figura 12. Imagens noturnas do deslocamento vertical da arraia, da superfície até o fundo do aquário.

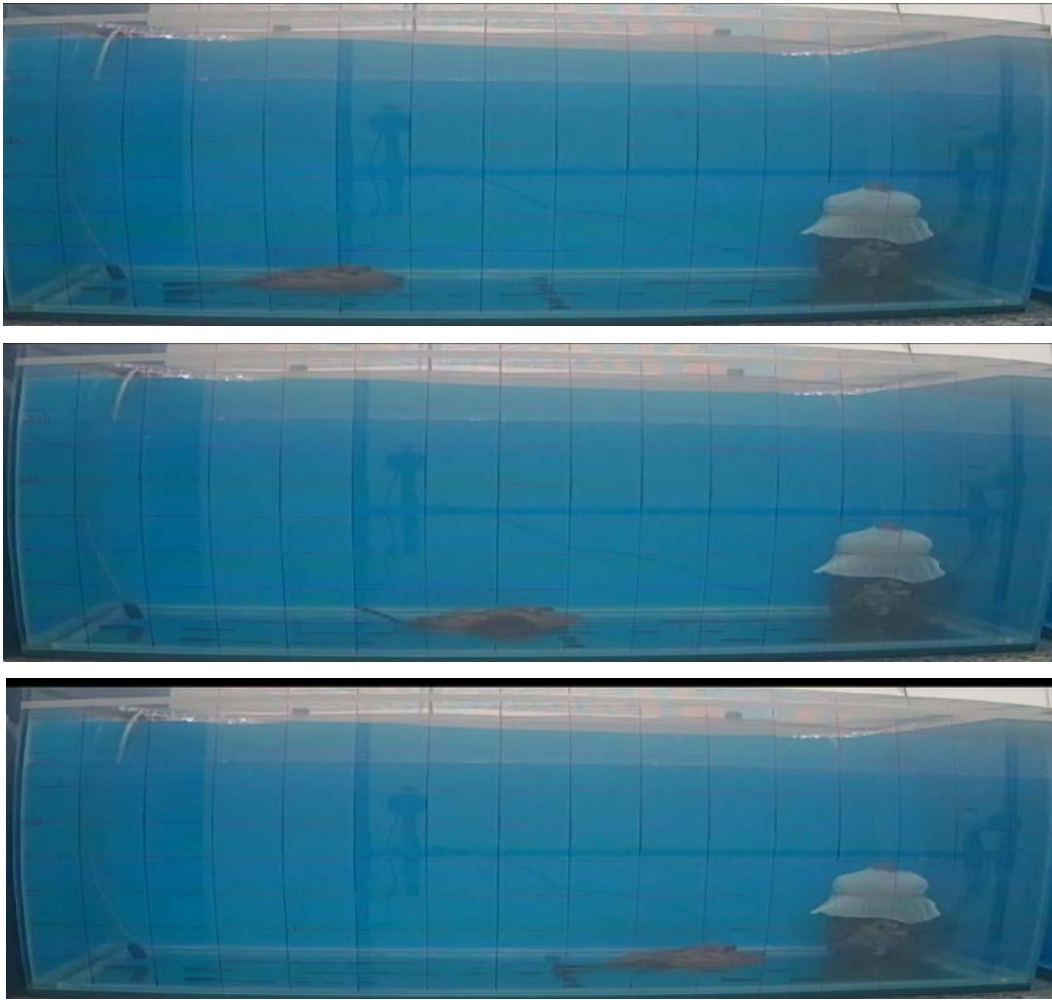


Figura 13. O animal se desloca horizontalmente com ondulação da nadadeira de um extremo ao outro do aquário, caracterizando a natação horizontal.



Figura 14. O animal movimenta seu corpo para trás, caracterizando a natação retrógrada.

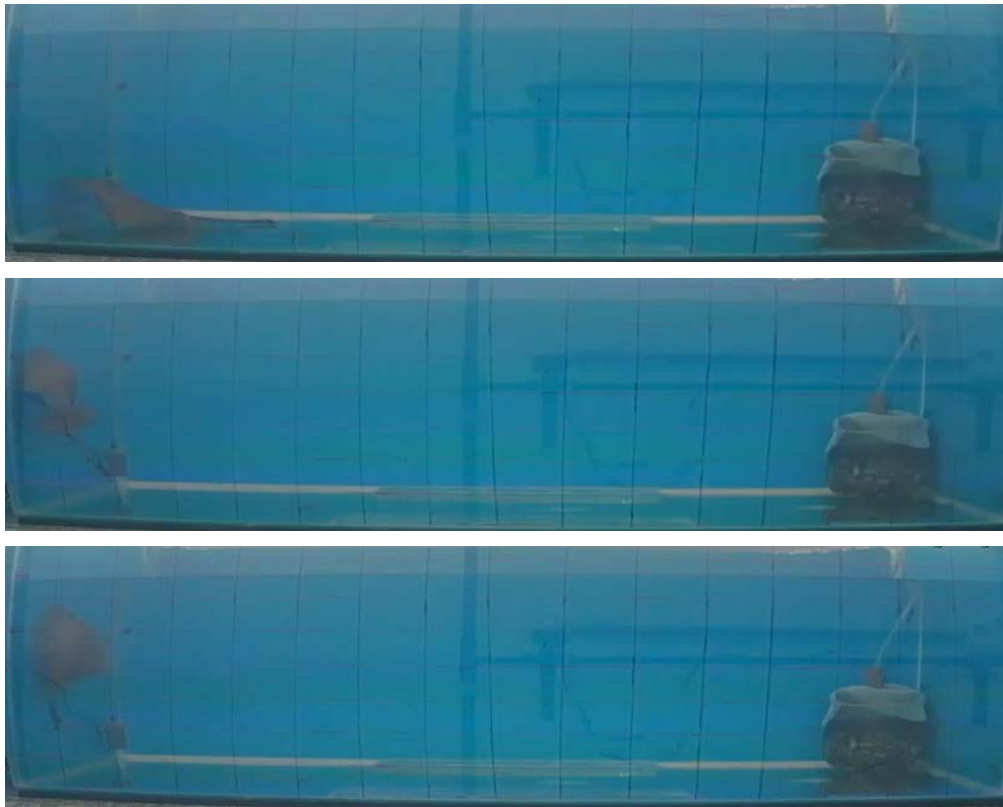


Figura 15. A arraia se desloca na face no aquário, com natação vertical.

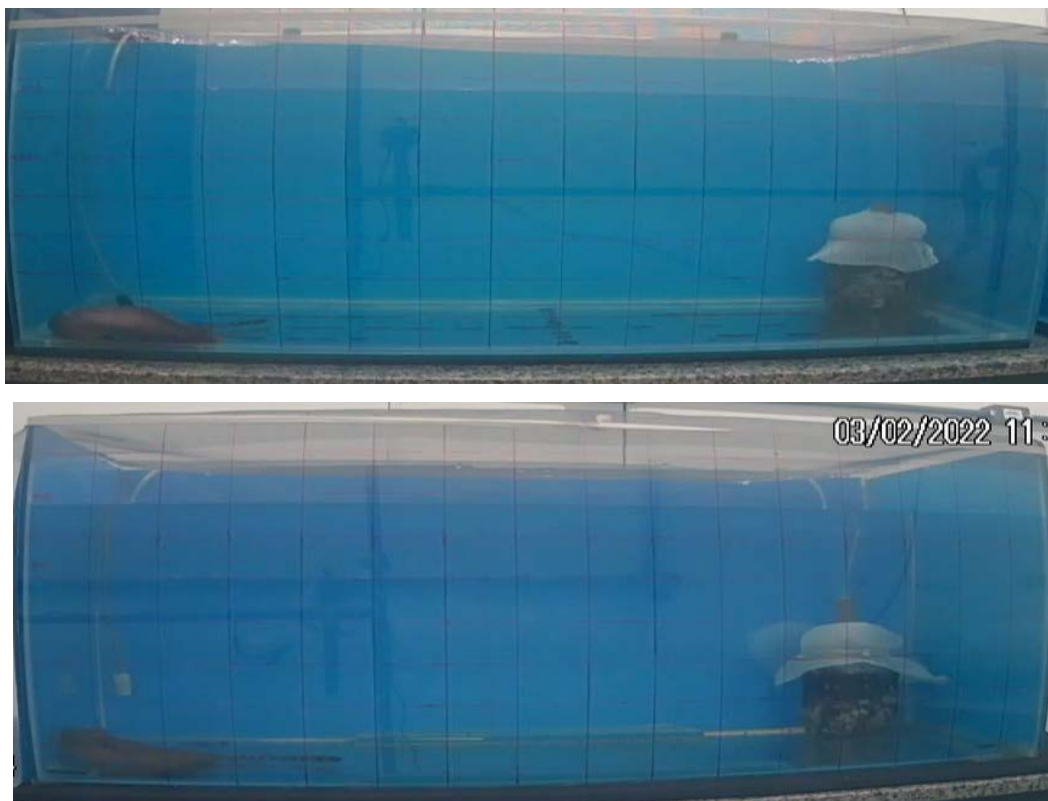


Figura 16. O animal se inclina mostrando a parte ventral anterior caracterizando o movimento inclinado. Visão frontal e lateral.



Figura 17. Arraia em repouso no fundo do aquário.

As análises resultantes do Cosinor mostram que a atividade locomotora e o repouso possuem um padrão rítmico diário dentro das 36 horas observadas. A acrofase da atividade locomotora no primeiro e no segundo dia foi identificada dentro do ZT6 (12h) (Figura 18A e 18B). No terceiro dia a acrofase ocorreu dentro do ZT7 (13h) (Figura 18C), no entanto se manteve no intervalo entre o ZT5 (11h) e ZT7 (13h) ($p < 0,001$) observado nos dias anteriores. Quando os três dias foram analisados conjuntamente ($n=30$), a acrofase se manteve em ZT6, demonstrando um ritmo diário consistente (Figura 18D).

Para o repouso foi observado um ritmo diário noturno com acrofase no primeiro, no segundo e no terceiro dia dentro do ZT17 (23h) (Figura 19A, 19B e 19C) e no mesmo intervalo ($p < 0,001$). Quando os três dias foram analisados conjuntamente ($n=30$), a acrofase se manteve em ZT17, demonstrando um ritmo diário consistente e complementar ao da atividade locomotora (Figura 19D).

Total de atividade

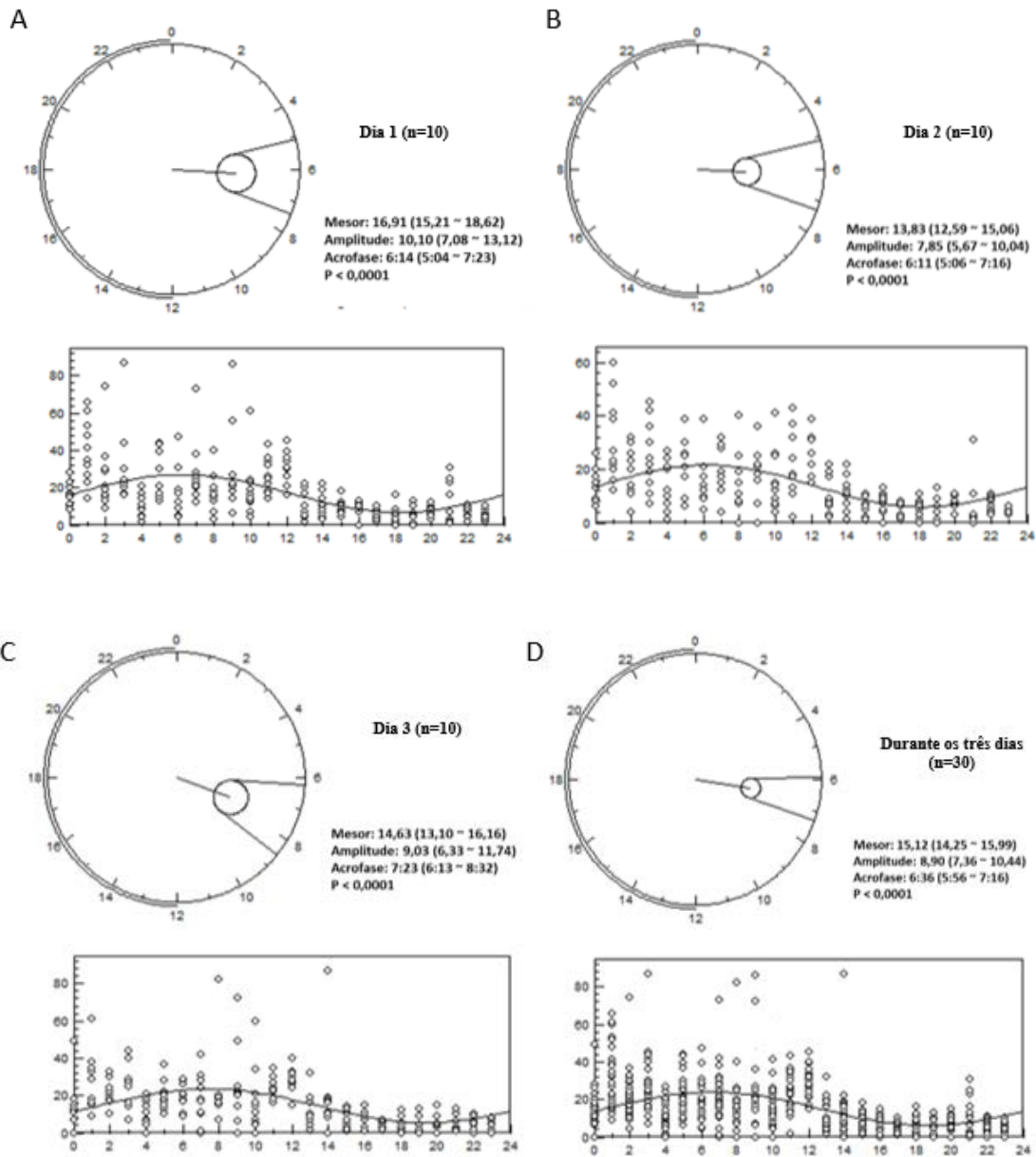


Figura 18. Análise do Cosinor para o total de atividade exibida pela arraia cururu (*P. wallacei*). (A) primeiro dia de experimento (n=10), (B) segundo dia de experimento (n=10), (C) terceiro dia de experimento (n=10), (D) e nos três dias agrupados (n=30). A circunferência representa os ZTs com destaque para o período de acrofase. A linha simples representa o período fótico do dia e linha dupla o período não fótico. Os gráficos abaixo da circunferência representam as variações individuais registradas ao longo do dia.

Repouso

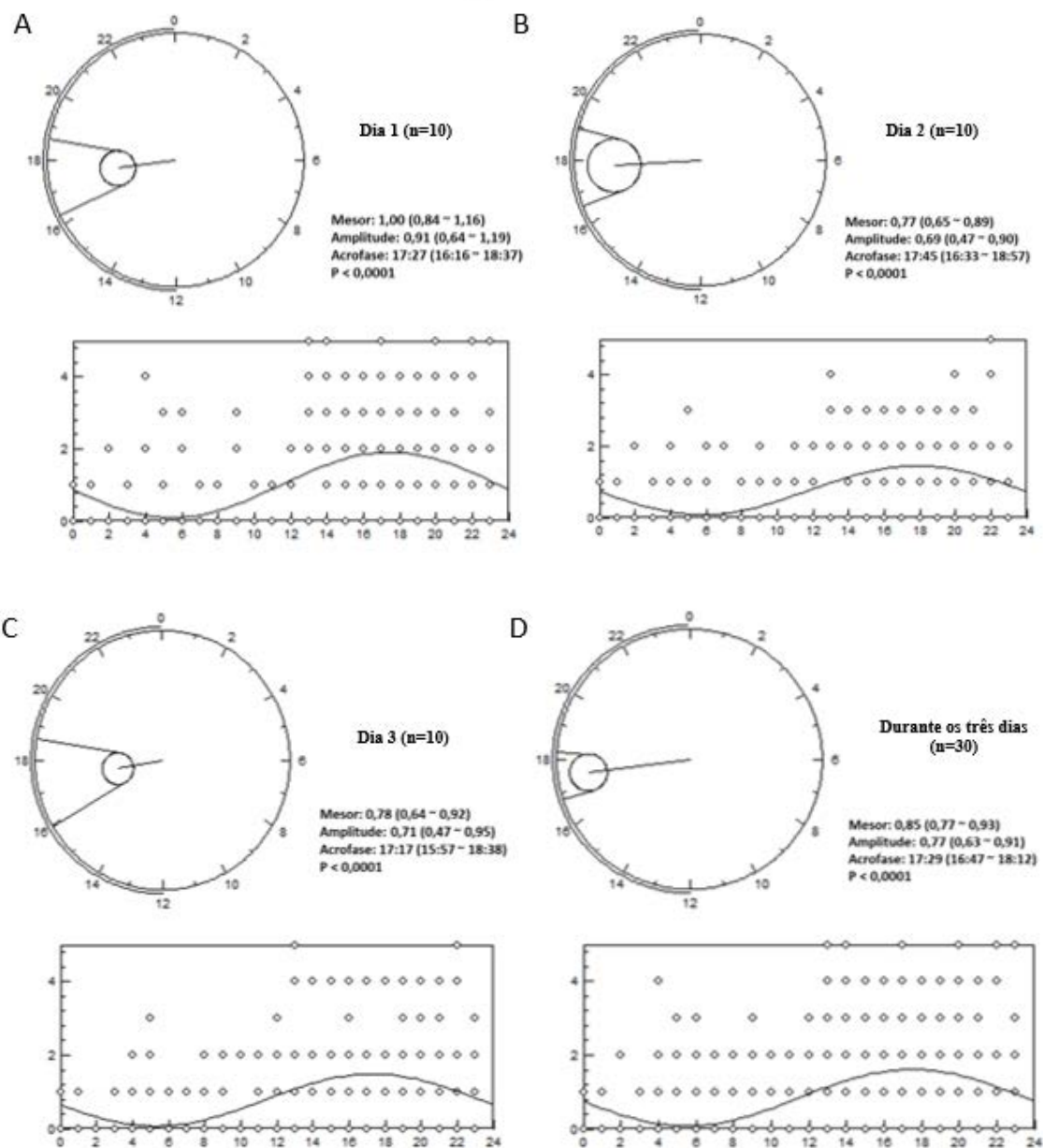


Figura 19. Análise do Cosinor para o repouso exibido pela arraia cururu (*P. wallacei*). (A) primeiro dia de experimento (n=10), (B) segundo dia de experimento (n=10), (C) terceiro dia de experimento (n=10), (D) e nos três dias juntos (n=30).

Contribuindo com a análise do Cosinor, a comparação entre os ZTs ao longo do dia demonstrou que a arraia cururu apresenta maior atividade durante a fase clara, enquanto o repouso teve o seu pico registrado no período escuro (Figura 20), em ambiente artificial.

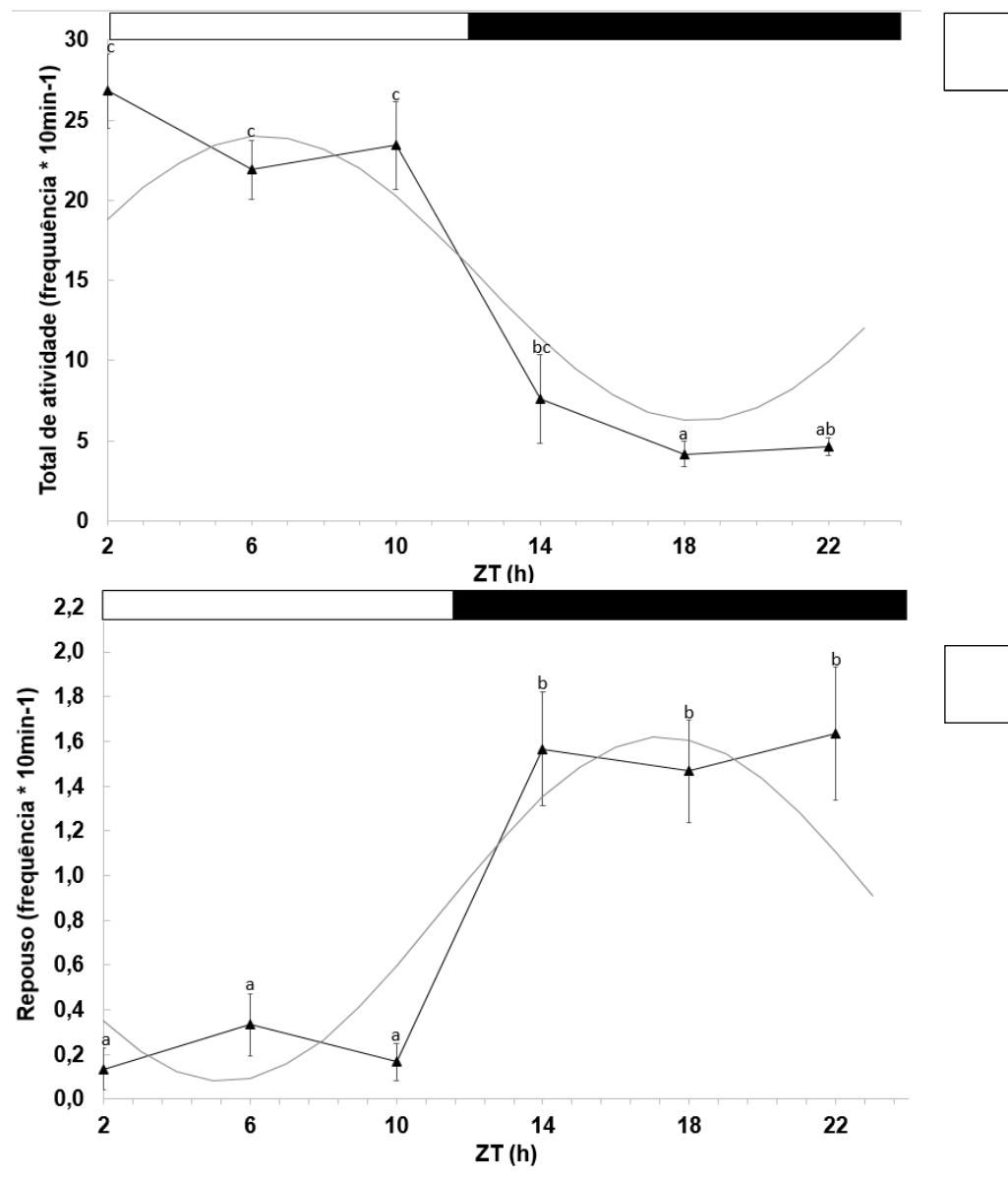


Figura 20. Frequência de atividade (A) e repouso (B) exibida pela arraia cururu (*P. wallacei*). Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam significadas diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha clara senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise

Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm EP.

Na comparação entre os períodos de claro e escuro do dia relacionados à frequência de atividade e de repouso, nos diferentes dias de experimento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$), sendo os períodos de atividade e repouso mais frequentes registrados durante o dia e a noite, respectivamente (Figura 21). Não houve interação significativa entre as fases do dia (claro/escuro) e os dias de experimento ($p > 0,05$).

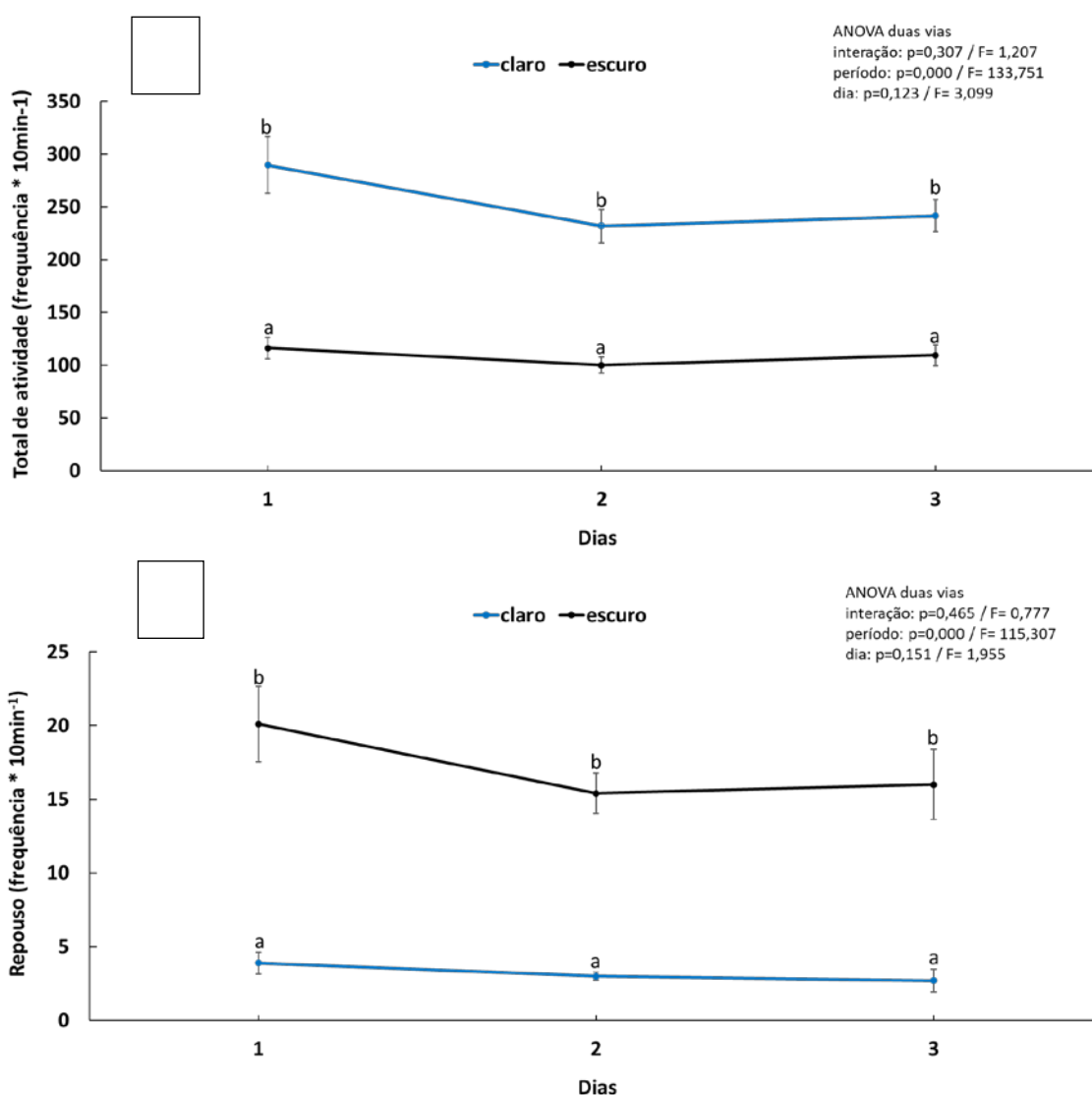


Figura 21. Frequência de atividade total (A) e repouso (B) da arraia cururu (*P. wallacei*) nos três dias de experimento, em relação ao período claro (linha azul) e escuro (linha preta) do dia. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas

($p < 0,05$) entre os períodos de claro e escuro no mesmo dia (ANOVA de duas vias). Valores expressos como média \pm EP.

Nas variáveis analisadas pelo programa Fish Track v0.4, como a distância percorrida (cm), a duração (s) e a velocidade média (cm/s), houve diferença nas acrofases em relação frequência da atividade total e do repouso, o que pode ser decorrente do tempo utilizado para a quantificação das respectivas variáveis, sendo maior (24 horas) para as variáveis analisadas pelo programa do que o intervalo utilizado para a análise da frequência (10 min de cada hora, totalizando 120 horas).

No entanto para a distância percorrida (cm), foi observado maior deslocamento das arraias no período claro ($p = 0,002$) (Figura 22), seguindo o ritmo encontrado para atividade locomotora, com a acrofase dentro do ZT4 (10h).

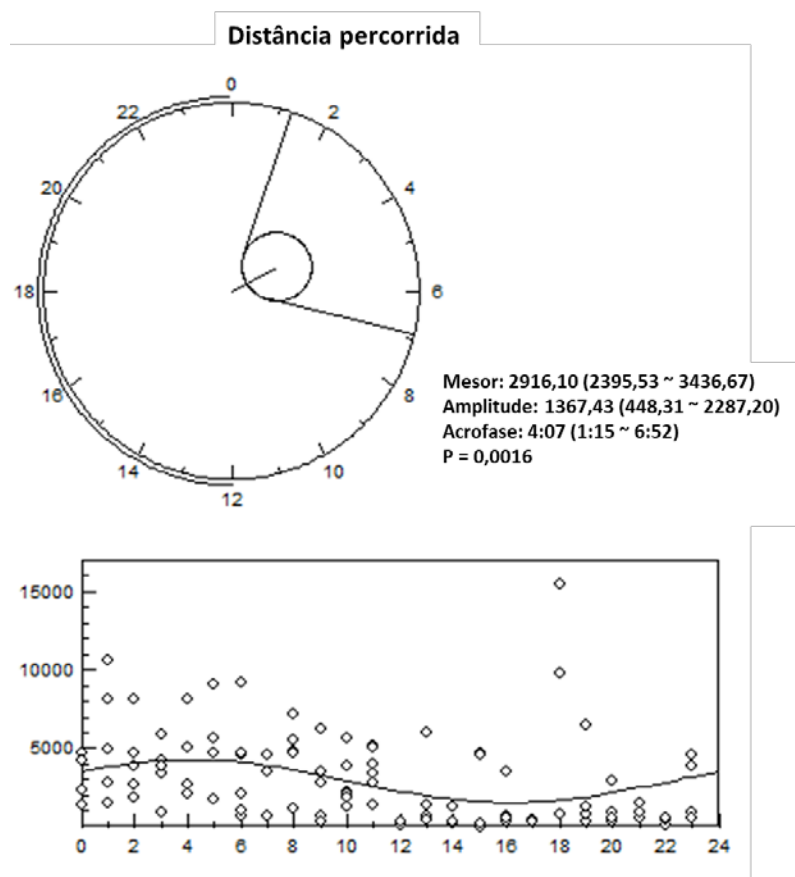


Figura 22. Análise do Cosinor para a distância percorrida (cm) registrada para a arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia.

Na comparação entre os ZT, a distância percorrida (cm) foi maior entre os ZT 2 e ZT6 e diminuiu com no início do período escuro (ZT12). Não houve diferenças significativas entre os outros horários do dia (Figura 23).

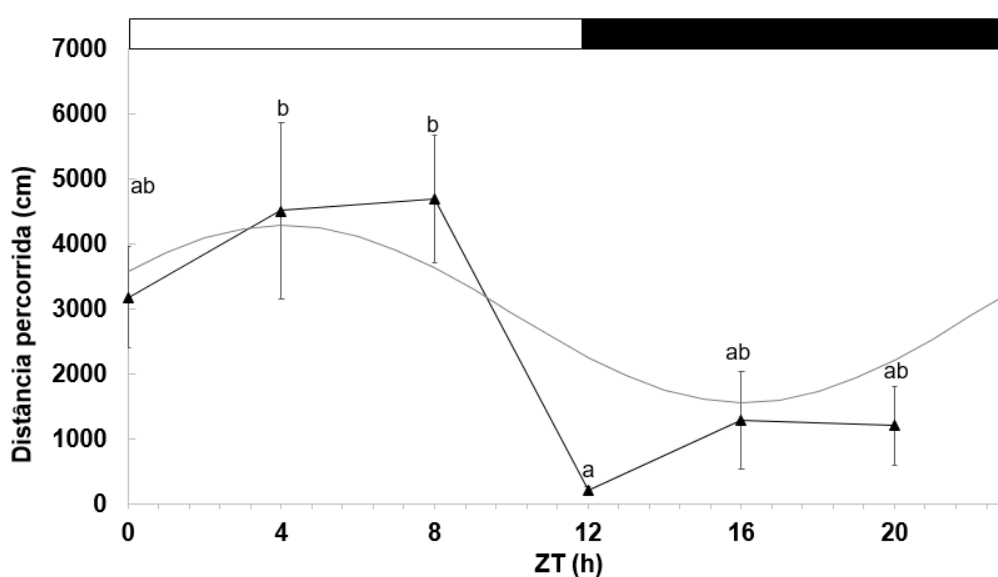


Figura 23. Distância percorrida (cm) por indivíduos da arraia cururu ao longo do dia em ambiente artificial. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha tracejada senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm EP.

A duração da atividade (s) foi maior também na fase clara ($p < 0,05$), coincidindo com o intervalo da acrofase registrado para a distância percorrida. Já, o tempo de duração do repouso mostrou ritmo contrário ao de atividade, com acrofase no período escuro ZT 16 (22 h) ($p < 0,05$) e coincidente com a frequência encontrada para esta mesma unidade comportamental (Figura 24).

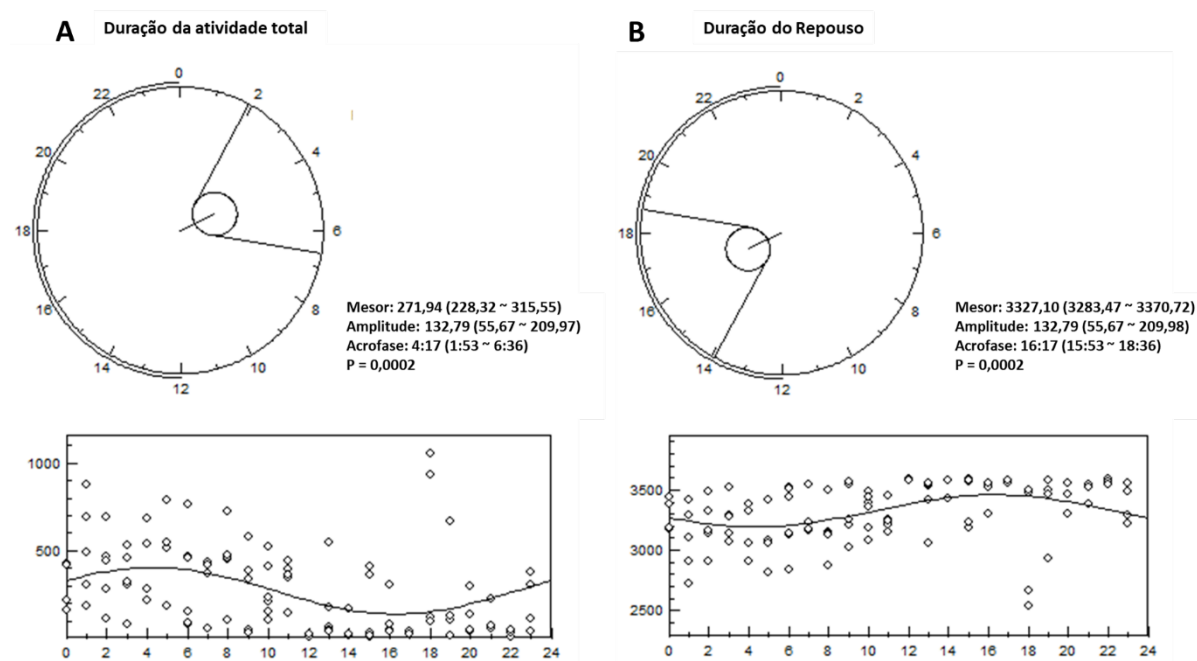


Figura 24. Análise do Cosinor para a duração (s) da atividade (A) e de repouso (B) exibida pela arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia.

A atividade das arraias teve maior duração nos ZT que pertencem ao período claro do dia, sendo significativa apenas no ZT12, em relação ao intervalo ZT4 e ZT8. Já a duração do repouso se mostrou maior durante o período noturno ($p < 0,05$), com acrofase em ZT16 e elevação próximo ao início do período de escuro (Figura 25).

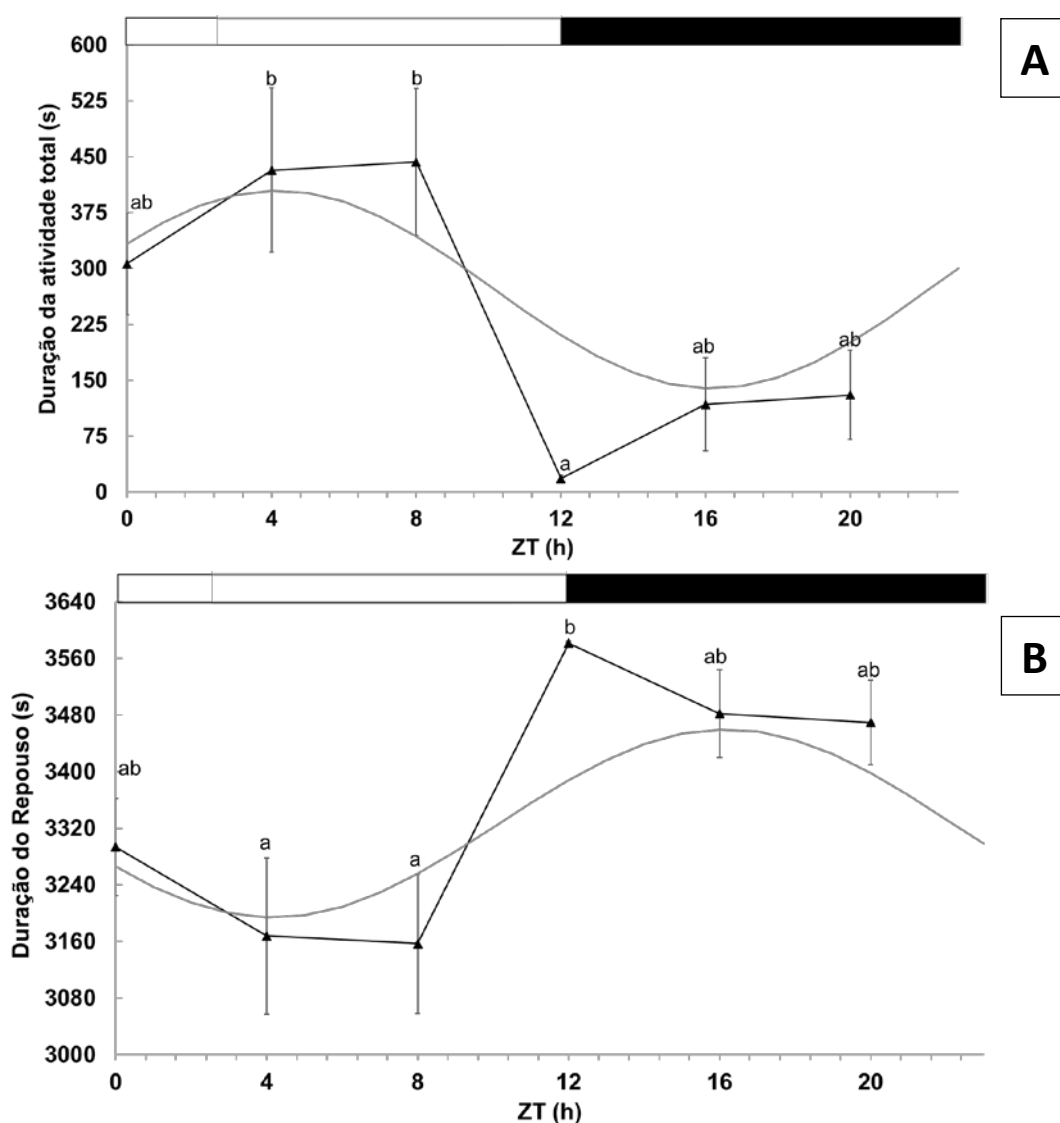


Figura 25. Tempo de duração (s) da atividade (A) e repouso (B) registrados para a arraia cururu durante o período de 24 horas de um dia. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Letras diferentes indicam

significadas diferenças entre os ZTs (teste de Duncan, $p < 0,05$). A linha tracejada senoidal representa o ajuste a um ritmo calculado pela análise Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores expressos como média \pm EP.

Assim como a duração e a distância percorrida, a velocidade média também demonstrou um ritmo diurno, com acrofase em ZT5 ($p < 0,05$). O intervalo em que se registrou a acrofase desta variável coincidiu com a duração da atividade e a distância percorrida pela arraia cururu ao longo de um dia (Figura 26). Contudo, não foram registradas diferenças significativas entre os diferentes ZT ao longo do dia. (Figura 27).

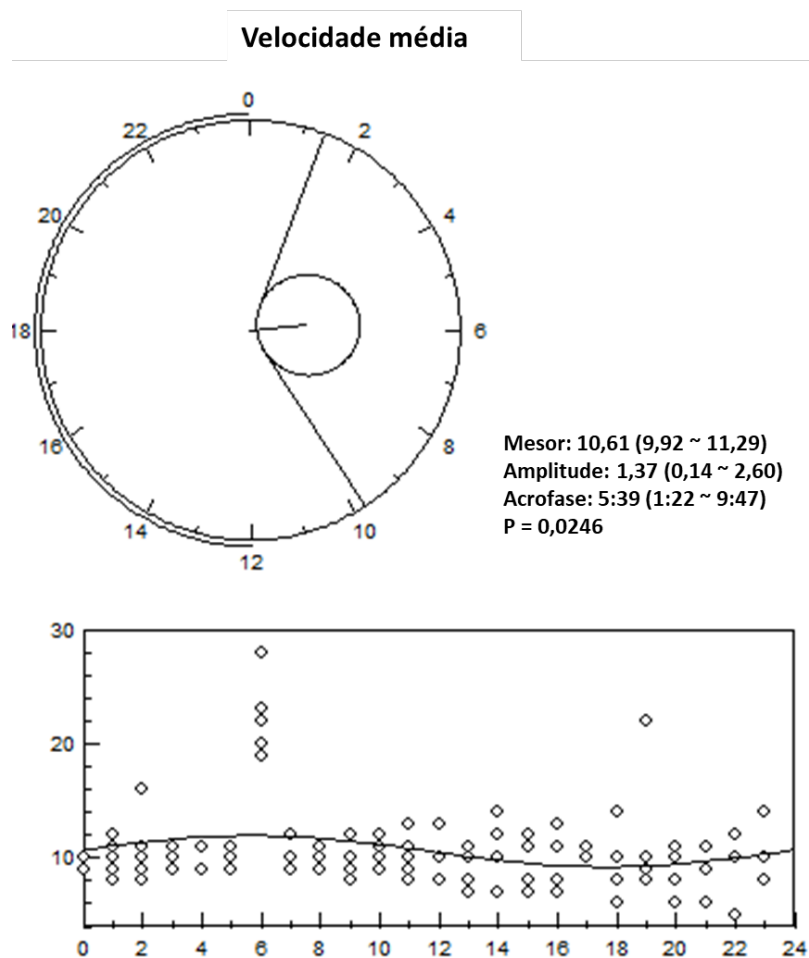


Figura 26. Análise do Cosinor para a velocidade média (cm/s) registrada para a arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia. A circunferência

representa os ZTs com destaque para o período de acrofase. A linha simples representa o período fótico do dia e linha dupla o período não fótico. O gráfico abaixo da circunferência representa as variações individuais registradas ao longo do dia.

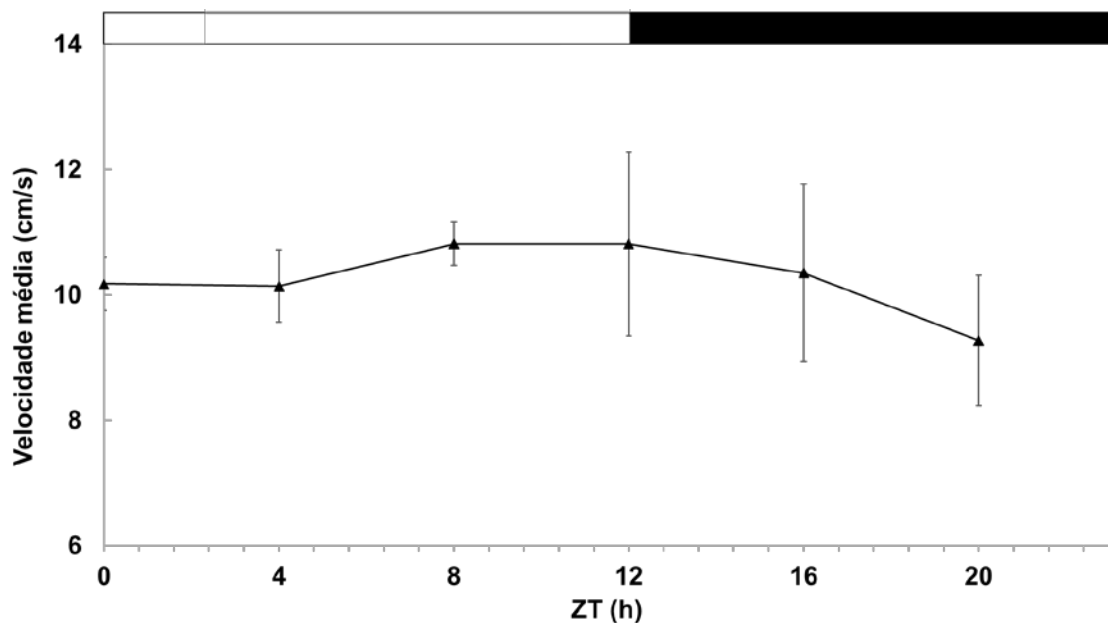


Figura 27. Velocidade média (cm/s) registrada para a arraia cururu (*P. wallacei*) durante o período de 24 horas de um dia. Barras brancas e pretas representam período de luz e escuro, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os ZT ($p > 0,05$; ANOVA de uma via). Valores expressos como média \pm EP.

6. Discussão

A exibição da atividade locomotora em peixes está diretamente relacionada com outras categorias comportamentais, tais como, interação social, disponibilidade de alimento, reprodução e dispersão espacial (Shibuya et al., 2009; 2012; Rojas, 2019). Assim, torna-se relevante a descrição desse comportamento, pois permite a análise de como os animais exibem padrões motores modulados por diferentes estímulos em ambiente natural ou artificial, característica que pode ser espécie-específica.

Estudos abordando a descrição do comportamento em potamotrigonídeos já ocorreram antes deste (Shibuya et al., 2012; Thonhauser, 2008; Rojas, 2019; Garrone-Neto e Uieda, 2012), entretanto, nenhum com abordagem direcionada a atividade locomotora. Ainda assim, algumas unidades comportamentais, como os movimentos com e sem deslocamento, natação vertical, natação horizontal e inclinado, foram descritos para *P. magdalanae* mantida em cativeiro (Rojas, 2019) e *P. motoro* em relação ao comportamento alimentar (Shibuya et al., 2009; 2012). Já em relação a outros elasmobrânquios, temos os tubarões *Hexanchus griseus* (Andrews et al., 2009), *Negaprion brevirostris* (Sundstrom et al., 2001) e *Carcharhinus plumbeus* (Medved e Marshall, 1983) que expressam ritmo diário de atividade associados diretamente com a natação vertical. As outras unidades comportamentais de atividade identificadas e não discutidas até aqui (natação diagonal, natação horizontal na superfície, natação retrógrada e movimento caudal) não encontram precedentes na literatura para elasmobrânquios e grupos próximos.

A atividade locomotora diária para *P. wallacei* encontrada neste estudo mostra uma acrofase dentro do ZT6 (12h) nos três dias analisados, confirmando o pico da atividade locomotora no período claro do dia. Este ritmo vai na contramão do que é sugerido para diversas espécies de elasmobrânquios (Cartamil et al., 2003; Andrews et al., 2009; Gleiss et al., 2013; Hammershlag et al., 2017; Kelly et al., 2020) que mostram um padrão locomotor crepuscular e/ou noturno, embora existam espécies diurnas e arrítmicas. Kelly et al. (2020) documentaram uma diversidade de ritmos de atividade locomotora diária em tubarões. Exemplares de espécies bombeadoras bucais (*Heterodontus portusjacksoni* e *Cephaloscyllium isabellum*) mostraram um ritmo de atividade noturna, enquanto espécies de nado rápido (ventiladores ram), apresentaram padrões diurnos (*Mustelus lenticulatus* e *Squalus acanthias*) e arrítmicos (*Galeorhinus galeus*). Padrões de atividade noturna também foram encontrados para *Hexanchus griseus* (Andrews et al., 2009). Essa espécie se desloca verticalmente, e demonstra uma variação da profundidade de nado em relação aos períodos do dia, ocupando maiores profundidades durante o dia.

Para as arraias de água doce, estudos com comportamento associado à alimentação (Soares et al., 1999; Marquéz-Velasquez et al., 2019) e ecologia espacial (Garrone-Neto e Uieda, 2012) sugerem a existência de um ritmo noturno para *Raja agassizii*, *Potamotrygon magdalanae*, *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*. Embora estes estudos não sejam relacionados diretamente com padrão locomotor diário,

nos ajudam a compreender como estes fatores podem influenciar na locomoção das arraias e como estas exploram o seu hábitat. Além disso, estudos preliminares com arraia cururu indicaram maior frequência de natação no período de claro (Ferreira-Bisneto, 2012), sendo necessária a análise do Cosinor para a identificação da acrofase e determinação do ritmo diário, conforme confirmado no presente estudo.

Já o repouso mostrou uma acrofase no ZT17 (23h) durante os três dias consecutivos, o que evidencia uma maior frequência de repouso na fase escura do dia. Este comportamento, principalmente quando prolongado, é descrito para elasmobrânquios (Kelly et al., 2019; Kavanau, 1998; Karmanova et al., 1981) como um possível estado de latência e sono que funciona associado à fisiologia respiratória de tubarões, na qual bombeadores bucais tendem a permanecer mais tempo parados, pois o bombeamento lhes permite isso, enquanto os ventiladores ram precisam estar em natação constante (Kelly et al., 2019). Ademais, o repouso também pode indicar uma pausa longa entre uma atividade e outra.

Para as arraias, o que sabemos é que a espécie marinha *Dasyatis pastinaca* reduz sua atividade locomotora durante a noite (Karmanova et al., 1981), indo ao encontro do observado para *P. wallacei*, que aumenta sua condição de repouso na fase escura do dia. Nesse contexto, o pico de repouso (acrofase) encontrado no presente estudo é condizente com o período relatado por pescadores ornamentais e pesquisadores em campo, que realizam as coletas de *P. wallacei* nas áreas de igapó com início após o anoitecer (~19:00h) e término entre 23:00h e 01:00h da madrugada (J.L. Marcon, dados não publicados). De forma contrária, indivíduos da arraia *Dasyatis lata* estudados no sudeste da baía de Kaneohe (Havaí) demonstraram atividade reduzida com movimentos não detectáveis durante o dia e movimentos mais extensos à noite (Cartamil et al., 2003).

Os períodos de atividade e repouso encontrados neste estudo demonstram uma sincronia na transição de uma fase para outra, onde a fase de decaimento da atividade locomotora ocorre de ZT10 (16:00h) para ZT14 (20:00h), com um aumento do repouso neste mesmo intervalo, rumo a sua fase de pico, sugerindo que o crepúsculo pode desempenhar um papel importante na virada desses comportamentos no ambiente natural. Isto também se confirma quando os dados foram analisados em período claro e escuro durante os três dias dos ensaios, mostrando um evidente padrão de atividade diurna e repouso noturno, independente do dia analisado. Importante salientar que o repouso não cessa no período de atividade do animal e que o mesmo ocorre com a

atividade no pico do repouso, eles apenas reduziram a frequência encontrada. Isto significa que os picos de atividade e repouso não anulam a manifestação um da outra.

A distância percorrida mostrou sua acrofase no ZT4 (10:07h), intervalo que inclui o pico de atividade encontrado. Ela foi reduzida no intervalo entre os ZT8 (14:00h) e ZT12 (18:00h), em que foi quase cessada, e retomada a partir daí até o ZT16 (22:00h), mas sem retornar ao seu pico. É provável que esta interrupção na distância tenha sido causada pelo desligamento abrupto das luzes, porém isto não descarta a influência crepuscular na alternância dos comportamentos, já que a mesma mostrava uma redução antes do apagar das luzes. Tem sido observado que a distância percorrida por tubarões em determinado período do dia concorda com o padrão de atividade locomotora encontrado para estas espécies, ou seja, espécies diurnas percorrem maior distância durante o dia e vice-versa. Mesmo quando o regime de luz é alternado, a distância percorrida se apresentou como um espelho da porcentagem de atividade em *H. portusjacksoni* e *C. isabellum* (Kelly et al., 2020).

A duração da atividade encontrada teve sua acrofase em ZT4 (10:17h) e o repouso em ZT16 (22:17h), confirmando o ritmo diurno para a atividade e noturno para o repouso. Entre os ZT8 (14:00h) e ZT12 (18:00h), houve o decaimento da atividade e a elevação do repouso, com picos no ZT12 e retornando depois, mas sem voltar a acrofase, indicando o mesmo que ocorreu com a distância em relação ao apagar das luzes e o papel do crepúsculo.

Já a velocidade média apresentou acrofase no ZT5 (11:39min.), dentro do intervalo do pico de atividade diurna, confirmando o ritmo de fase clara observado para *P. wallacei*. Contudo, a ausência de diferenças na velocidade média entre os ZTs pode estar relacionada ao grau intermediário de sedentarismo relatado para a arraia cururu, em comparação a outras espécies potamotrigonídeos (Duncan et al., 2015), já que durante o período do dia foram identificados momentos tanto de repouso, quanto de atividade. Kelly et al. (2020) observaram que *M. lenticulatus*, um ventilador ram, nada constantemente, mas apresenta maior velocidade durante o dia, fase em que o seu ritmo foi identificado. Já a espécie *H. griseus* apresenta uma maior velocidade média vertical durante a noite, quando evita a proximidade com predadores (Andrews et al., 2009)

Nos elasmobrânquios, a atividade locomotora pode ser influenciada por diversos fatores, como sazonalidade (Shepard et al., 2006), comportamento alimentar (Soares et al., 2009; Corcoran et al., 2013; Marqués-Velásquez et al. 2019) sexo, tamanho e metabolismo do animal (Andrews et al., 2009; Garrone-Neto e Uieda, 2012; Kelly et al.,

2019; 2020). O presente estudo adiciona ao conhecimento existente uma descrição comportamental inédita para arraiais de água doce em ambiente artificial e abre portas para novas pesquisas em comportamento de elasmobrânquios dulcícolas. A atividade locomotora também nos diz muito sobre como cada animal pode explorar seu hábitat e, conseqüentemente, nos faz entender o porquê da especificidade de algumas espécies com o seu ambiente. Em um estudo com *P. falkneri* e *P. motoro*, Garrone-Neto e Uieda (2012) demonstraram que o uso do espaço destas espécies depende do tamanho (fase de vida) de cada indivíduo, mas que também está relacionado com a alimentação e estratégias para evitar predadores.

Entender o padrão comportamental de locomoção diária contribui para uma melhor compreensão de como esta espécie utiliza os recursos do meio em prol de sua sobrevivência, além de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de conservação, já que seu ambiente sofre constante degradação. Os resultados obtidos em conjunto no presente trabalho indicam que *P. wallacei* apresenta um padrão rítmico de atividade locomotora diurno e contrastam com a hipótese inicial de um ritmo predominantemente noturno, como sugerido para outras espécies de arraiais de água doce (Karmanova et al., 1981), mostrando que a diversidade no ritmo da atividade locomotora nesses organismos pode ser maior do que se conhece.

Vale ressaltar que este estudo foi realizado em laboratório e, portanto, o perfil de atividade pode ser diferente em ambiente natural, devido a limitação de estímulos e recursos disponíveis no contexto artificial. Reeb (2002) relata que espécies de água doce são mais propensas em alternar entre o dia e a noite dependendo da disponibilidade de alguns recursos ambientais como alimento e temperatura, isso porque são espécies que apresentam maior plasticidade do que as marinhas. Em seu estudo com tubarões, Kelly et al. (2020) mostra que estudos em laboratório nos permitem manter um controle ambiental e assim avaliar a presença de um padrão rítmico de atividade locomotora de origem endógena.

Diferentes respostas comportamentais para indivíduos da mesma espécie observados em ambiente natural e artificial já foram relatadas para alguns teleósteos (Koeck et al., 2013; Latchem et al., 2021), no entanto, não foram encontrados trabalhos que evidenciem esse efeito em elasmobrânquios. Nossos achados também apontam que o crepúsculo possui um papel importante na virada dos comportamentos antagônicos, ainda que não tenha sido o ritmo encontrado para *P. wallacei*. Nesse contexto, investigações futuras seriam desejáveis para corroborar os resultados obtidos no

presente estudo, em relação ao padrão rítmico da atividade locomotora exibido pela arraia cururu em ambiente natural.

7. Considerações finais

Este estudo demonstrou que *P. wallacei* exibiu um ritmo de atividade locomotora diurna em ambiente artificial, divergindo da hipótese inicial do estudo e daquilo que tem sido sugerido para esta e outras espécies de arrais de água doce. Além disso, fornece evidências de que o período crepuscular pode desempenhar um papel importante na transição das fases de atividade e repouso no ambiente natural. Estudos adicionais em ambiente natural são desejáveis para corroborar ou contrastar os achados obtidos no presente estudo em relação ao padrão rítmico da atividade locomotora para a arraia cururu e, se há entre os potamotrigonídeos, espécies com padrão similar, noturno, ou ainda arrítmicas.

8. Referências

- Andrews, K.S., Williams, G.D.; Farrer, D.; Tolimieri, N.; Harvey, C.J., 2009. Diel activity patterns of sixgill sharks, *Hexanchus griseus*: the ups and downs of an apex predator. *Animal Behaviour*, 78: 525–536.
- Araújo, M.L.G., 1998. *Biologia de Potamotrygon sp. C* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no Médio Rio Negro, Amazonas. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, Brasil. 171p.
- Araújo-Lima, C.A.R.M.; Ruffino, M.L., 2003. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: *Migratory fishes of South America*. Carolsfeld, J.; Harvey, B; Ross, C.; Baer, A. (Eds.) Canadá. pp. 233-302.

- Aschoff, J., 1981. A survey of biological rhythms. In: Handbook of behavioral neurobiology. Vol 4. Biological rhythms. J. Aschoff (Ed.). Plenum, New York. pp. 3-10.
- Bano-Otalora, B.; Piggins, H.D., 2017. The Mammalian Neural Circadian System: from molecules to behavior. In: Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour. V. Kumar (Ed.), Springer. New Delhi. pp. 257-275.
- Baras, E., 2000. Day-night alternation prevails over food availability in synchronizing the activity of *Piaractus brachypomus* (Characidae). Aquatic Living Resources, 13: 115-120.
- Bayarri, M.J.; Muñoz-Cueto, J.A.; López-Olmeda, J.F.; Vera, L.M.; Rol de Lama, M.A.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2004. Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). Physiology & Behavior, 81: 577-583.
- Bell-Pedersen, D.; Cassone, V.M.; Earnest, D.J.; Golden, S.S.; Hardin, P.E.; Thomas, T.L. and Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. Nature Reviews Drug Discovery, 1-13.
- Biswas, A.K.; Takeuchi, T., 2002. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed adult tilapia *Oreochromis niloticus*: Part II. Fisheries Science, Tokyo, V.68, n.3, pp. 543-553.
- Blanco-Vives, B.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Synchronization to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. Physiology & Behavior, 98: 268-275.
- Cartamil, D.P.; Vanudo, J.J.; Lowe, C.G.; Wetherbee, B.M.; Holland, K.N., 2003. Diel movement patterns of the Hawaiian stingray, *Dasyatis lata*: implications for ecological interactions between sympatric elasmobranch species. Marine Biology, 142: 841-847.
- Carvalho, M.R., 2016. *Potamotrygon rex*. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the middle and upper Rio Tocantins, Brazil, closely allied to *Potamotrygon henlei* (Castelnau, 1855). Zootaxa, 4150 (5): 537-565.
- Carvalho, M.R.; Loboda, T. S.; Da Silva, J. P. C. B., 2016a. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, *Styracura*, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941) (Chondrichthyes: Myliobatiformes). Zootaxa, 4175 (3): 201-221.

- Carvalho, M.R.; Rosa, R.S.; Araújo, M.L.G. 2016b. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of *Potamotrygon*. *Zootaxa*, 4107: 566-586.
- Carlson, B.M. e Gross, J.B., 2018. Characterization and comparison of activity profiles exhibited by the cave and surface morphotypes of the blind Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 208: 114–129.
- Corcoran, M.J.; Wetherbee, B.M.; Shivji, M.S.; Potenski, M.D.; Chapman, D.D.; Harvey, G.M., 2013. Supplemental feeding for ecotourism reverses diel activity and alters movement patterns and spatial distribution of the southern stingray, *Dasyatis americana*. *PlosOne*, 8(3) e59235.
- Cornellisen, G., 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11:16
- Cruz, J.G.P., 2007. Ritmo circadiano e atividade locomotora em *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae). *Biotemas*, 20 (3): 55-61.
- Davies, W.I.L.; Turton, M.; Peirson, S.N.; Follet, B.K.; Halford, S.; Garcia-Fernandez, J.M.; Sharp, P.J.; Hankins, M.W.; Foster, R.G., 2012. Vertebrate ancient opsin photopigment spectra and the avian photoperiodic response. *Biology Letters*, 8: 291–294
- Duncan, W.P.; Silva, M.I.; Fernandes, M.N., 2015. Gill dimensions in near term embryos of Amazonian freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) and their relationship to the lifestyle and habitat of neonatal pups. *Neotropical Ichthyology*, 13: 123-136.
- Duncan, W.P.; Shibuya, A.; Araújo, M.L.G.; Zuanon, J., 2016. Biologia e história natural de *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) na bacia do rio Negro, Amazônia central, Brasil. In. Lasso, C. A., R. S. Rosa, M. A. Morales-Betancourt, D. Garrone-Neto e M. Carvalho (Eds.). 2016. XV. Rayas de aguadulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina, pp. 289-302.
- Ferreira-Bisneto, P.G., 2012. Ritmo circadiano da atividade locomotora em arraia cururu, *Potamotrygon* cf. *hystrix*. Trabalho de Monografia. Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.
- Freire, G. M., 2015. Idade, crescimento e mortalidade da arraia-cururu (*Potamotrygon* sp.) no Médio Rio Negro. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. 31p.

- Garrone Neto, D.; Uieda, V.S., 2012. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 81-88.
- Gleiss, A.C.; Wright, S.; Liebsch, N., Wilson, R.P., Norman, B., 2013. Contrasting diel patterns in vertical movement and locomotor activity of whale sharks at Ningaloo Reef. *Marine Biology*, 160(11): 2981–92.
- Gleiss, A.C.; Morgan, D.L.; Whitty, J.M.; Keleher, J.J.; Fossette, S.; Hays, G.C., 2017. Are vertical migrations driven by circadian behaviour? Decoupling of activity and depth use in a large riverine elasmobranch, the freshwater sawfish (*Pristis pristis*) *Hydrobiologia*, 787:181–191.
- Gonçalves de Freitas, E.; Nishida, S.M., 2011. Métodos de Estudo do Comportamento: *In: Comportamento Animal*. Yanamoto, M.E., Volpato, G.L. (Org.) Editora da UFRN. Natal, RN. 2ª edição. pp. 47-85.
- Goulding, M., 1980. The fishes and the forest: Explorations in Amazonian natural history. Berkeley & Los Angeles: University of California Press.
- Hayasaka, N.; LaRue, S.I.; Green, C.B., 2010. Differential contribution of rod and cone circadian clocks in driving retinal melatonin rhythms in *Xenopus*. *PLoSOne*, 5: e15599
- Hammerschlag, N.; Skubel, R.; Calich, H.; Nelson, E.; Shiffman, D.; Wester, J.; Macdonald, C.C.; Cain, S.; Jennings, L.; Enchelmaier, A.; Gallagher, A.J., 2017. Nocturnal and crepuscular behavior in elasmobranchs: a review of movement, habitat use, foraging, and reproduction in the dark. *Bulletin of Marine Science*, 93: 355-374.
- Herrero, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2003. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tech (*Tinca tinca*). *Chronobiology International*, 20: 1001-1017.
- Hurd, M.W.; Debruyne, J.; Straume, M.; Cahill, G.M., 1998. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 65: 465-472.
- Iigo, M.; Kezuka, H.; Suzuki, T.; Tabata, M.; Ainda, K., 1994. Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 18: 563-569.
- Iigo, M.; Tabata, M., 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiology & Behavior*, 60: 775-781.

- Kavanau, J.L., 1998. Vertebrates that never sleep: implications for sleep's basic function. *Brain Research Bulletin*, 46(4): 269–79.
- Karmanova, I.; Belich, A.; Lazarev, S., 1981. An electrophysiological study of wakefulness and sleeplike states in fish and amphibians. In: Laming PR, editor. *Brain mechanisms of behaviour in lower vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 181–202.
- Kelly, M.L.; Collin, S.P.; Hemmi, J.M.; Lesku, J.A., 2019. Evidence for sleep in sharks and rays: behavioural, physiological, and evolutionary considerations. *Brain, Behavior and Evolution*, 94: 37–50
- Kelly, M.L.; Murray, E.R.P.; Kerr, C.C.; Radford, C.A.; Collin, S.P.; Lesku, J.A.; Hemmi, J.M., 2020. Diverse activity rhythms in sharks (Elasmobranchii). *Journal of Biological Rhythms*, 35(5):_476-488.
- Koeck, B.; Alós, J.; Caro, A.; Neveu, R.; Crec'hriou, R.; Saragoni, G.; Lenfant, P., 2013. Contrasting fish behavior in artificial seascapes with implications for resources conservation. *PLoS One*, 8(7): e69303.
- Laposky, A.D.; Bass, J.; Kohsaka, A.; Turek, F.W., 2008. Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Letters*, 582:142-151.
- Latchem, E.; Madliger, C.L.; Abrams, A.E.I.; Cooke, S.J., 2021. Does artificial light at night alter the subsequent diurnal behavior of a teleost fish? *Water, Air & soil pollution* 232:71.
- Lemos, J.R.G., 2011. Índices parasitários e parâmetros fisiológicos de arraias cururu (*Potamotrygon cf. histrix*) exportadas como peixes ornamentais: ferramentas para avaliação do estado de saúde da espécie. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas. 78p.
- Lima, C.L., Morales-Gamba, R. D., Malcher, T.S.M., Barcellos, J.F.M., Heinzmann, B.M., Schmidt, D., Baldisserotto, B., Marcon, J.L., 2021. Eugenol and *Lippia alba* essential oils as effective anesthetics for the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 47: 2101–2120.
- López-Olmeda, J.F.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 144: 180-187.

- López-Olmeda, J.F.; López-García, I.; Sánchez-Muros, M.J.; Blanco-Vives, B.; Aparicio, R.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2012. Daily rhythms of digestive physiology, metabolism and behavior in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture International*, 20: 1085–1096.
- López-Olmeda, J.F.; Pujante, I.M.; Costa, L.S.; Galal-Khallaf, A.; Mancera, J.M.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2016. Daily rhythms in the somatotropic axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): the time of day influences the response to GH administration. *Chronobiology International*, 33(3): 257-67.
- Marcon, J.L., Morales-Gamba, R.D., Barcellos, J.F.M., Araújo, M.L.G., 2021. Sex steroid hormones and the associated morphological changes in the reproductive tract of free-living males of the cururu stingray *Potamotrygon wallacei*. *General and Comparative Endocrinology*, 309: 113786.
- Marques, M.D., 2003. Mecanismos de temporização em unicelulares, plantas e invertebrados. In: *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. N. Marques; L. Menna-Barreto (orgs.). 3ª ed. São Paulo: EDUSP. pp.61-133.
- Márquez-Velásquez, V.; Rosa, R.S.; Galindo, E.; Navia, A. F., 2019. Feeding habits and ecological role of the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* (Duméril 1865) (Myliobatiformes: Potamotrygonidae), combining gut-content and stable isotope analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 102:1119–1136.
- Medved, R.; Marshall, J.A., 1983. Short-Term Movements of young sandbar sharks, *Carcharhinus plumbeus* (Pisces, Carcharhinidae). *Bulletin of Marine Science*, 33: 87-93.
- Morales-Gamba, R.D.; Araújo, M.L.G.; Barcellos, J.F.; Marcon, J.L., 2021. Follicular growth and sex steroids in adult females of the endemic Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Environmental Biology of Fishes*, 104: 1665-1672.
- Oliveira, A.T.; Lemos, G.J.R.; Santos, C.Q.M.; Araújo, G.M.L.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L., 2012. Procedimentos de Manuseio e de Colheita do Sangue em Arraias de Água Doce. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amapá, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Oliveira, C.; Garcia, E.M.; López-Olmeda, J.F.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Daily and circadian melatonin release *in vitro* by the pineal organ of two nocturnal teleost

- species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, 153: 297-302.
- Pastório, P.C.C., 2014. Respostas fisiológicas à hipóxia gradual em neonatos e juvenis da arraia cururu *Potamotrygon cf. hystrix*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 49pp.
- Reebs, S. G. 2002. Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *RevFishBiol Fisher*, 12: 349-371.
- Rojas, J.G.P., 2019. Tools for assessing animal welfare of the freshwater stingray, *Potamotrygon magdalenae*, in captivity. Dissertação de Mestrado, Universidad Nacional de Colombia, Colômbia. 99pp.
- Shepard, E.L.; Ahmed, M.Z.; Southall, E.J.; Witt, M.J.; Metcalfe J.D.; Sims, D.W., 2006. Diel and tidal rhythms in diving behaviour of pelagic sharks identified by signal processing of archival tagging data. *Marine Ecology Progress Series*, 328: 205–13.
- Schulz, U.H.; Leuchtenberger, C., 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Brazilian Journal of Biology*, 66: 565-574.
- Schwartz, W.J.; Daan, S., 2017. Origins: A Brief Account of the Ancestry of Circadian Biology. In: *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. V. Kumar (Ed.), Springer. New Delhi. p.3-22.
- Shibuya, A.; Araújo, M.L.G.; Zuanon, J.A.S., 2009. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4: 466 – 475.
- Shibuya, A., 2009. Morfologia funcional dos mecanismos de alimentação em raias Myliobatoidei, com ênfase em espécies de Potamotrygonidae do médio rio Negro. Tese de doutorado, INPA, Manaus, Amazonas, 142 pg.
- Shibuya, A.; Zuanon, J.; Tanaka, S., 2012. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 189-196.
- Soares, L., Vazzoler, A., Correa, A., 1999. Diel feeding chronology of the skate *Raja agassizii* (Mulier & Henle) (Pisces, Elasmobranchii) on the continental shelf of Ubatuba, Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16: 201-212.

- Sundstrom, L.F.; Gruber, S.H.; Clermont, S.M.; Correia, J.P.S.; Marignac, J.R.C.; Morrissey, J.F.; Lowrance, C.R.; Thomassen, L. & Oliveira, M.T., 2001. Review of elasmobranch behavioral studies using ultrasonic telemetry with special reference to the lemon shark, *Negaprion brevirostris*, around Bimini Islands, Bahamas. *Environmental Biology of Fishes*, 60: 225–250.
- Teresa F.B., Gonçalves-de-Freitas E., 2003. Interação agonística em *Geophagus surinamensis* (Teleostei, Cichlidae). *Revista de Etologia*, 5: 121-6.
- Thonhauser, K.E., 2008. Aspects of social and discrimination learning in freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri*. Dissertação de Mestrado. Universität Graz, Alemanha. 75pp.
- Ventueri, R.; Bernardino, G., 1999. Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, 55(9): p. 39-49.
- Vera, L.M.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2006. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology & Behavior*, 88: 167-172.
- Vera, L.M.; De Pedro, N.; Gómez-Milán, E.; Delgado, M.J.; Sánchez-Muros, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J., 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & Behavior*, 90: 518-524.
- Vera, L.M.; Cairns, L.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Migaud, H., 2009. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chronobiology International*, 26: 666-681.
- Volpato, G.L.; Barreto, R.E., 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1041–1045.