

VOLUME 3, NÚMERO 2, 2002/2003

ISSN 1519-1982

# ***BIOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL***



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

SÃO CRISTÓVÃO

**BIOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

**REITOR:** José Fernandes de Lima

**VICE-REITOR:** Josué Modesto dos Passos Subrinho

**COMISSÃO EDITORIAL (UFS)**

Angelo Roberto Antonioli

Arie Fitzgerald Blank

Carlos Dias da Silva Júnior

Celso Morato de Carvalho  
(Editor)

Jeane Carvalho Vilar  
(Co-editor)

Josemar Sena Batista

Murilo Marchioro

**COMISSÃO EDITORIAL  
ASSOCIADA**

Adriano Vicente – Universidade  
Federal de Pernambuco, UFPE

Edson Fontes de Oliveira –  
Universidade Estadual de  
Maringá/Nupelia

Everton Amancio – Conselho  
Nacional de Desenvolvimento  
Científico e tecnológico, CNPq

Francisco Filho de Oliveira –  
Universidade Federal da  
Paraíba, UFPB

**COMISSÃO DE REDAÇÃO**

Celso Morato de Carvalho

Jeane Carvalho Vilar

Murilo Marchioro

*Biologia Geral e Experimental* é indexada nas Bases de Dados: Latindex, Biosis Previews, Biological Abstracts e Zoological Record.

ENDEREÇO/ADDRESS: *Biologia Geral e Experimental*, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFS,  
Av. Mal. Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, S. Cristóvão, Se; CEP 49100-000; e-mail: [jcvilar@bol.com.br](mailto:jcvilar@bol.com.br) ou [cmorato@bol.com.br](mailto:cmorato@bol.com.br).

Aceita-se permuta/Exchange is accepted.

## SUMÁRIO

- Avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae) em ratas Wistar. 5 – 8  
*Ricardo Sher, Anna Carolina do Valle Conceição, Silmara de Moraes Pantaleão, Éden Ribeiro Freire, Simone Andrade Farias & Luciana Almeida Umbelino*
- Ação da melatonina sobre as correntes macroscópicas de células H.Ep.-2. 9 – 17  
*Paloma Lys de Medeiros, Marcelo Moraes Valença, Silene Carneiro do Nascimento, Cláudio Gabriel Rodrigues, Carlos Manuel Machado Carneiro, Murilo Marchioro & Catão Temístocles de Freitas Barbosa*
- Inconsistencies in the morphology of some individuals of the genus *Terpsinoe* (Ehremberg) (Biddulphiaceae). 18 – 20  
*Clóvis R. P. Franco*
- Influência da massa corporal e da temperatura no deslocamento e na vocalização de três espécies de anuros do cerrado. 21 – 24  
*Daniel Oliveira Mesquita & Helga Correa Wiederhercker*
- Aspectos taxonômicos e ecológicos de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Crotalinae) do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. 25 – 32  
*Renato Gomes Faria & Vera Lúcia de Campos Brites*
- Aspectos taxonômicos e ecológicos de uma população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (Serpentes, Viperidae) das regiões do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. 33 – 38  
*Daniel Oliveira Mesquita & Vera Lúcia de Campos Brites*
- Incubation period and hatching of the Spix's whiptail lizard (*Cnemidophorus ocellifer*) in captivity. 39 – 40  
*Ivan F. Souza, R. S. Ribeiro & Nelson Jorge da Silva Júnior*
- Efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae). 41 – 46  
*Marlucia Cruz de Santana, Silvio Lopes Teixeira & José Everaldo Gomes*
- Considerações sobre os métodos quantitativos na pesquisa biológica. 47 – 53  
*Jeane Carvalho Vilar & Celso Morato de Carvalho*

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 5-8

26.iii.2003

## AVALIAÇÃO DO EFEITO TERATOGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *HYPTIS PECTINATA* (L.) POIT. (LAMIACEAE) EM RATAS WISTAR

Ricardo Sher<sup>1</sup>

Anna Carolina do Valle Conceição<sup>2</sup>

Silmara de Moraes Pantaleão<sup>2</sup>

Éden Ribeiro Freire<sup>2</sup>

Simone Andrade Farias<sup>2</sup>

Luciana Almeida Umbelino<sup>3</sup>

### RESUMO

O efeito teratogênico do extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (sambacaitá) foi testado em ratas Wistar gestantes. Os parâmetros utilizados para avaliação deste efeito foram: peso corporal, peso dos ovários, número de corpos lúteos e número de implantes por rata grávida. Os fetos foram pesados, medidos e analisados quanto à presença de malformações. Os resultados mostraram que o extrato aquoso de sambacaitá nas doses administradas (125, 250 e 500mg/Kg; v.o.) não teve efeito sobre a capacidade reprodutiva das ratas nem alterou a evolução dos embriões.

**Palavras-chave:** *Hyptis pectinata*, efeito teratogênico.

### ABSTRACT

The teratogenic effect of an aqueous extract of *Hyptis pectinata* (sambacaitá) was tested on pregnant Wistar rats. The parameters used were: corporal weight, ovarian weight, number of corpora lutea and number of implants per pregnant rat. The fetuses were weighed, measured and analysed for the presence of abnormalities. Results showed that the aqueous extract, in the administered doses (125, 250 and 500mg/kg; v.o.) did not interfere in the reproductive capacity nor alter the development of the embryos.

**Key words:** *Hyptis pectinata*, teratogenic effect.

### INTRODUÇÃO

A utilização de plantas em diversas terapias ou na alimentação é uma prática bastante difundida no Brasil. As plantas sintetizam metabólitos primários (e.g. carboidratos, aminoácidos, purinas e pirimidinas) e secundários (toxinas). As toxinas podem estar presentes em grandes quantidades nas plantas, como mecanismo de defesa. As plantas são amplamente utilizadas como medicamento natural, porém sem a correta avaliação da toxicidade de seus componentes, principalmente os efeitos teratogênicos.

Alterações no desenvolvimento embrio-fetal e malformações podem ser decorrentes da exposição materna a toxinas, de agentes mutagênicos que alteram o material genético das células germinativas ou agentes teratogênicos que danificam os tecidos somáticos do organismo em desenvolvimento (Fraser & Nora, 1986). Vários fatores contribuem para a teratogenicidade de um agente: a natureza química e física deste, a dose e o estágio do desenvolvimento embrionário em que é administrado, o genótipo da mãe e do embrião e as interações com outros agentes. Quando estes agentes atuam na fase de fecundação-

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

<sup>2</sup> Departamento de Diologia, Universidade Federal de Sergipe.

<sup>3</sup> Departamento de Enfermagem, Universidade Federal de Sergipe.

implantação (0-7 dias) em humanos, seus efeitos prováveis são o aborto ou a reabsorção; na fase embrionária (18-55 dias), o embrião sofre alterações profundas da morfogênese; na fase fetal (56 dias-termo), os efeitos prováveis são a toxicidade, retardo no crescimento e alterações no sistema nervoso central (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

Devido às propriedades analgésicas e antiinflamatórias de *H. pectinata*, esta planta é muito utilizada como fitoterápica no nordeste brasileiro (Bispo *et al.*, 2001) e julgamos de interesse verificar também se possui ação teratogênica.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material Botânico:** Foram utilizadas as folhas de *Hyptis pectinata*, coletadas na horta comunitária da UFS. A planta foi identificada no Departamento de Biologia da UFS (exsicata nº 02626-UFS).

**Preparação do extrato aquoso:** As folhas foram secadas durante dois dias em estufa a 40° C, e trituradas em moinho até a obtenção de um polvilho. A extração foi feita por decocção de 200g do pó em 1 litro de água destilada. Após filtração, o extrato foi evaporado em placa quente.

**Animais:** Foram utilizados ratos Wistar adultos (3 meses). Os animais foram acasalados (4 fêmeas: 1 macho) e o 1º dia de gestação foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As ratas foram pesadas em diferentes dias de gestação (1º, 10º, 16º, 18º e 20º) e mantidas em caixas plásticas com comida e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram sacrificados no 20º dia de gestação, por deslocamento da coluna cervical.

**Grupos Experimentais:** Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais e tratados do 5º ao 15º dias de gestação. O grupo controle recebeu apenas

água destilada. Os demais grupos receberam o extrato aquoso de *H. pectinata*, respectivamente (125, 250 e 500 mg/kg; v.o.).

**Avaliação Teratogênica:** Após sacrificadas, as ratas foram laparotomizadas para remoção da placenta, ovários e cornos uterinos. As placentas e os ovários foram pesados e registrado o número de corpos lúteos. Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente para contar e examinar morfológicamente os fetos. O sexo dos fetos foi determinado por inspeção pélvica. Os fetos foram pesados em balança de precisão e registradas as medidas crânio-caudal e encefálica com paquímetro.

**Análise Estatística:** Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para verificar associação entre as variáveis sexo e tratamentos; número de implantes e tratamentos. O nível de significância foi de 5% (Zar, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da gestação dos animais não houve diferenças significativas no peso das ratas entre todos os grupos experimentais (ANOVA:  $F_{0,05;3;100}=1,97$ ;  $p>0,10$ ). Esta variável foi significativamente diferente entre os dias de gestação (ANOVA:  $F_{0,05;4;100}=21,22$ ;  $p<0,0005$ ), fato esperado devido ao ganho normal de peso que ocorre durante uma gestação, entretanto a variação do peso das ratas foi proporcional entre os tratamentos e dias de gestação (ANOVA:  $F_{0,05;12;100}=0,38$ ;  $p>0,25$ ). A tabela 1 mostra o efeito do extrato aquoso de *H. pectinata* no peso das ratas em diferentes dias de gestação.

Na análise de efeitos lesivos sobre embriões em fase de desenvolvimento é importante verificar se as condições fisiológicas, relacionadas com a reprodução, encontram-se preservadas. Para isso,

Tabela 1. Efeito do extrato aquoso (EA) de *H. pectinata* no peso das ratas em diferentes dias da gestação.

Tratamento (mg/kg)	Média ± EP				
	1º	10º	16º	18º	20º
Controle	190,50±17,35	217,66±12,64	242,50±8,72	258,16±9,00	258,16±11,68
EA (125)	202,33±14,82 <sup>a</sup>	213,83±6,96 <sup>a</sup>	238,16±6,39 <sup>a</sup>	249,83±7,26 <sup>a</sup>	264,16±6,87 <sup>a</sup>
EA (250)	189,50±17,41 <sup>a</sup>	210,00±14,59 <sup>a</sup>	226,16±18,46 <sup>a</sup>	231,00±18,06 <sup>a</sup>	247,83±16,44 <sup>a</sup>
EA (500)	166,83±3,1 <sup>a</sup>	204,66±13,18 <sup>a</sup>	224,16±3,66 <sup>a</sup>	250,33±7,22 <sup>a</sup>	253,83±8,28 <sup>a</sup>

EP = erro padrão; <sup>a</sup> p>0,05 comparado com o controle. ANOVA com dois fatores seguido pelo teste de Tukey.

utilizam-se critérios como o peso dos ovários, número de corpos lúteos, número de implantes e índice de implantação que estabelece as falhas ocorridas durante o processo de implantação (Almeida *et al.*, 1999). Neste trabalho os resultados mostram que o extrato aquoso de *H. pectinata* não alterou o peso dos ovários das ratas, quando comparado ao grupo controle (Tukey: EA125, q<sub>0,05;4;20</sub>=2,35; EA250, q<sub>0,05;4;20</sub>=2,21 e EA500, q<sub>0,05;4;20</sub>=0; p>0,05 para todas as comparações). Foi observado também que não houve diferença significativa no número de corpos lúteos dos ovários entre os tratamentos (ANOVA: F<sub>0,05;3;20</sub>=1,202; p>0,25. Tabela 2); indicação indireta de que a função do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, relacionado ao processo de ovulação, está mantida em todos os grupos (Scher *et al.*, 1996). Finalmente, foi constatado que o número de implantes por rata não está associado aos diferentes tratamentos (Qui-quadrado:  $\chi^2_{0,05;15}=7,25$ ; p>0,9), bem como ao sexo dos fetos (Qui-quadrado:  $\chi^2_{0,05;15}=3,65$ ; p>0,995).

A avaliação do crescimento fetal é importante uma vez que recém-nascidos hipo ou hipertróficos apresentam mortalidade perinatal maior que os eutróficos (Benedetti & Capurro, 1981). Além disso, muitos agentes químicos são acumulados na placenta e a concentração do agente é mais alta no cordão umbilical do que no soro materno (Ruisánchez *et al.*, 1993). Deste modo, para avaliar o crescimento fetal, foram utilizados como parâmetros as medidas cefálica e crânio-caudal, bem como o peso corporal dos fetos. O extrato aquoso de *H. pectinata* não ocasionou anormalidades no tamanho dos fetos, uma vez que

Tabela 2. Efeito do extrato aquoso (EA) de *H. pectinata* no peso dos ovários e número de corpos lúteos dos ovários direito e esquerdo de ratas.

Tratamentos (mg/kg)	Média ± EP	
	Peso dos Ovários (g)	Nº de Corpos Lúteos
Controle	0,118±0,011	10,66±1,021
EA (125)	0,148±0,011 <sup>a</sup>	11,16±0,477 <sup>a</sup>
EA (250)	0,090±0,014 <sup>a</sup>	12,66±0,421 <sup>a</sup>
EA (500)	0,118±0,014 <sup>a</sup>	10,50±1,335 <sup>a</sup>

EP = erro padrão; <sup>a</sup> p>0,05 comparado com o controle. ANOVA, teste de Tukey.

não foram constatadas diferenças significantes no comprimento do corpo (ANOVA: F<sub>0,05;3;20</sub>=0,14; p>0,25. Tabela 3) e no comprimento do encéfalo das ninhadas (ANOVA: F<sub>0,05;3;20</sub>=1,59; p>0,10 Tabela 3). Não houve variação significativa também no peso corporal da ninhada entre os tratamentos (ANOVA: F<sub>0,05;3;20</sub>=0,188; p>0,25 Tabela 4). O peso das placentas foi tomado como medida indireta de desenvolvimento embrionário normal. Não houve diferenças significativas no peso das placentas entre os grupos experimentais (ANOVA: F<sub>0,05;3;20</sub>=0,488; p>0,25 Tabela 4).

O índice de reabsorção indica o número de mortes embrionárias e os nossos resultados com relação a estes parâmetros foram muito baixos em todos os tratamentos, indicando que a administração do extrato aquoso de *H. pectinata* não afetou as condições intra-uterinas para o crescimento e desenvolvimento do embrião. Também não foram observadas malformações congênitas nas ninhadas estudadas. Estes resultados indicam que o extrato aquoso de *H. pectinata* não apresenta atividade teratogênica.

Tabela 3. Efeito do extrato aquoso (EA) de *Hyptis pectinata* no comprimento do encéfalo e distância crânio-caudal dos fetos de ratas.

Tratamentos (mg/kg)	Média ± EP (mm)	
	Tamanho do Encéfalo	Distância Crânio-caudal
Controle	7,50±0,416	29,49±0,334
EA (125)	8,34±0,242 <sup>a</sup>	29,20±0,668 <sup>a</sup>
EA (250)	8,14±0,225 <sup>a</sup>	28,96±1,638 <sup>a</sup>
EA (500)	8,03±0,12 <sup>a</sup>	28,63±1,059 <sup>a</sup>

EP = erro padrão; ANOVA: <sup>a</sup>p>0,05.Tabela 4. Efeito do extrato aquoso (EA) de *Hyptis pectinata* no peso das placentas e dos fetos de ratas.

Tratamentos (mg/kg)	Média ± EP	
	Peso dos Fetos (g)	Peso das Placentas (g)
Controle	2,64±0,139	0,33±0,018
EA (125)	2,57±0,133 <sup>a</sup>	0,39±0,08 <sup>a</sup>
EA (250)	2,47±0,26 <sup>a</sup>	0,29±0,086 <sup>a</sup>
EA (500)	2,47±0,17 <sup>a</sup>	0,37±0,05 <sup>a</sup>

EP = erro padrão; ANOVA: <sup>a</sup>p>0,05.

**Agradecimentos:** Ao Departamento de Morfologia da UFS pelo apoio logístico, ao Prof. Ângelo Roberto Antonioli pelo fornecimento do extrato, à Ana Denise Costa de Santana pelo suporte técnico e a Jeane Carvalho Vilar pelo auxílio na análise estatística dos dados

## REFERÊNCIAS

- Almeida, M.E., M.A. Brandão, M.O. Guerra & V.M. Peters, 1999. Avaliação preliminar do efeito interceptivo do Lapachol em ratas Wistar. **Bol. Centr. Biol. Reprod.** 18: 37-48.
- Benedetti, W.L. & H. Capurro, 1981. Crescimento fetal y placentário. *In:* Carrera, J. M. **Biología y Ecología Fetal.** Salvat. Barcelona 916p.
- Bispo, M.D., R.H.V. Mourão, E.M. Franzotti, K.B.R. Bomfim, M. de F. Arrigoni-Blank, M.P.N. Moreno, M. Marchioro & A.R. Antonioli, 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **J. Ethnopharmacology** 76: 81-86.
- Fraser, F.C. & J.J. Nora, 1986. **Genética Humana.** 2<sup>a</sup> ed. Guanabara, Rio de Janeiro.
- Rabello-Gay, M.N., M.A.R. Rodrigues & R. Monteleone-Neto, 1991. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.** Soc. Bras. Genética, Ribeirão Preto, São Paulo.
- Ruisánchez, N., C. Conde, A.R. Ortiz, J.J. Lence. & S. Ramos, 1993. Efectos trasplacentarios del condensado del humo de cigarrillos negros sobre el genoma de roedores. **Rev. Cubana Oncol.** 9(1): 21-24.
- Scher, R., V.M. Peters & M.O. Guerra, 1996. Evolução da gestação e crescimento fetal em fêmeas descendentes de ratas tratadas com progesterona durante a lactação. **Rev. Ciênc. Biom.** 7: 7-16.
- Vargas, V.M.F., R.R. Guidobono & J.A.P. Henriques, 1991. Genotoxicity of plant extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 86(11): 67-70.
- Zar, J.H., 1996. **Biostatistical Analysis.** 3rd ed. Prentice-Hall, New Jersey 662p+Tabs.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 9-17

26.iii.2003

## AÇÃO DA MELATONINA SOBRE AS CORRENTES MACROSCÓPICAS DE CÉLULAS H.Ep.-2

*Paloma Lys de Medeiros<sup>1</sup>*

*Marcelo Moraes Valença<sup>2</sup>*

*Silene Carneiro do Nascimento<sup>3</sup>*

*Cláudio Gabriel Rodrigues<sup>4</sup>*

*Carlos Manuel Machado Carneiro<sup>4</sup>*

*Murilo Marchioro<sup>5</sup>*

*Catão Temístocles de Freitas Barbosa<sup>5</sup>*

### RESUMO

Foram estudados os efeitos da melatonina (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 7.50 e 10.0 mg/ml) sobre a proliferação celular e na expressão das correntes de células inteiras dependentes da voltagem (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) sobre as células H.Ep.-2. Foi também analisada a atividade citotóxica da melatonina sobre a modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2. Os registros mostraram dois tipos de correntes: o tipo R é caracterizado por fraca dependência de voltagem para valores negativos; o tipo S mostrou forte retificação para potenciais hiperpolarizados. Na concentração de 10.0 mg/ml a melatonina aumentou a amplitude média de ambos os tipos de correntes; na concentração de 5.0 mg/ml somente correntes do tipo R foram expressas. A melatonina mostrou efeito inibitório sobre a proliferação *in vitro* de células H.Ep.-2. Na concentração de 10.0 mg/ml a melatonina induziu aumento macroscópico nas correntes R e S.

**Palavras-chave:** células H.Ep.-2; melatonina; eletrofisiologia; patch-clamp.

### ABSTRACT

The effects of melatonin (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 7.50 e 10.0 mg/ml) on cell proliferation and in the expression of voltage-dependent whole-cell currents (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) were studied. The effect of melatonin cytotoxic activity on the electrophysiologic modulation of H.Ep.-2 cells was also studied. Recordings showed two types of currents: the R-type was characterized by a weak voltage-dependence for negative values; the S-type showed strong rectification for hyperpolarized potentials. A melatonin concentration of 10.0 mg/ml increased the mean amplitude of both types of currents; at a concentration of 5.0 mg/ml only R-type currents were expressed. Melatonin showed an inhibitory effect on the proliferation *in vitro* of H.Ep.-2 cells. A melatonin concentration of 10.0 mg/ml induced a macroscopic increase of R and S currents.

**Key words:** H.Ep.-2 cells; melatonin; electrophysiology; patch-clamp

### INTRODUÇÃO

A glândula pineal é considerada um temporizador do meio interno, estando envolvida na regulação de várias funções fundamentais (Hardeland *et al.*, 1994; Wahab *et al.*, 2000). A melatonina, *N*-acetil-5-metoxitriptamina, principal hormônio da

glândula pineal pode ser produzida por todos os animais (Poeggeler *et al.*, 1991) talvez devido a habilidade de sequestrar radicais livres, pela alta lipofilidade e fácil difusibilidade nos compartimentos celulares (Reiter *et al.*, 1994).

Estudos recentes revelaram alterações eletrofisiológicas e funcionais promovidas pela

<sup>1</sup> Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup> Departamento de Neuropsiquiatria do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>3</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>4</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>5</sup> Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.



melatonina sobre uma linhagem de células conhecida como carcinoma epidermóide da cérvix uterina, células HeLa (Klein *et al.*, 1999). As células H.Ep.-2 fazem parte da linhagem de células derivadas do carcinoma epidermóide e apresentam características bastante similares às das células HeLa, como crescimento rápido e formação de monocamadas (Moore *et al.*, 1955). Para contribuir com informações que possam elucidar o mecanismo pelo qual o hormônio melatonina suprime o crescimento das células tumorais, investigamos os efeitos da melatonina sobre a proliferação celular e sobre a modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2.

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Células:** As células H.Ep.-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Nº.: CR023) e mantidas pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

**Droga:** A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina ( $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ), foi adquirida da Companhia Química Sigma e dissolvida em 0,5 % de etanol.

**Condições da cultura e viabilidade celular:** Foi utilizado o meio de cultura DMEM (SIGMA), suplementado com 1% (v/v) de soro fetal bovino (GIBCO), 1% (p/v) de glutamina 2,0 mM (SIGMA) e 1% (p/v) de uma solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml) (Nascimento, 1993). As células foram tripsinizadas e contadas (Benchimol *et al.*, 1996), obtendo-se uma suspensão de  $5.10^4$  células/ml, 24 horas antes do início do experimento.

Após cada tripsinização, foi determinada a viabilidade celular pelo teste de exclusão do Azul Tripán (MERCK) 0,4 % p/v, em PBS, numa proporção de 1:10 (corante: amostra da suspensão celular), que permite determinar a porcentagem de células vivas e mortas (Weisenthal, 1983). A contagem das células foi realizada através de um microscópio invertido

LEITZ. Para os testes de citotoxicidade e o estudo da modulação eletrofisiológica das células H.Ep.-2 sob ação do hormônio melatonina, foram utilizadas preparações celulares cuja viabilidade se encontrava acima de 95%.

**Determinação da atividade citotóxica:** Para determinação da citotoxicidade (Geran *et al.*, 1972) com células H.Ep.-2, foi preparada uma suspensão de  $5 \times 10^4$  células/ml de meio e distribuída em placas de cultura com 96 poços. Estas placas foram incubadas a 37° C em estufa (Sedas, Milão-Itália) com atmosfera de 5 % de  $CO_2$ . Após 24 horas, o hormônio foi adicionado às células, nas seguintes concentrações: 1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 5.00, 7.50, 10.00 mg/ml. Cada concentração foi testada em quadruplicata. O meio de cultura sem suplemento foi utilizado como controle. Setenta e duas horas após a incubação das células com a melatonina, foi adicionado 25 ml de Brometo[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT ou sal tetrazólio - SIGMA) a 5% em PBS (p/v), a cada poço, e a placa foi reincubada a 37° C por mais duas horas. Ao término deste período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT, foi aspirado dos poços e 100 ml de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolução dos cristais formazan. A leitura óptica foi realizada em um registrador automático de placas modelo 3550 BIO-RAD a 595 nm. O ensaio colorimétrico do MTT baseia-se na capacidade que as células vivas têm de transformar o sal tetrazólio solúvel, de cor amarela, em um precipitado de formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação de uma enzima mitocondrial, a succinil desidrogenase (Hess & Pearse, 1963; Mosman, 1983).

**Descrição da técnica de patch-clamp:** A técnica de patch-clamp foi utilizada de acordo com a descrição de Hamill *et al.* (1981). Os registros de correntes foram obtidos através de micropipeta, na configuração de célula inteira ou “whole-cell”, preenchida com uma solução salina (solução interna). Esta solução banha um eletrodio de Ag/AgCl conectado a um amplificador

de patch (List EPC8 - HEKA Elektronik), acoplado a um computador IBM compatível (PC 486) através de um conversor A/D (Lab PC +, National Instruments). O registro direto (on-line) foi feito com software "Whole Cell Program" (WCP, John Dempster, 2000); a micropipeta foi direcionada até a célula com a ajuda de um micromanipulador MX3 (Narishige, Japão). Após o contato da ponta da micropipeta com a membrana celular, a resistência elétrica medida através de um pulso de 10 mV, foi monitorada até que atingisse valores da ordem de 3 a 15 Gigaohms (selo Gigaohmico). A partir do selo, a configuração "whole-cell" foi obtida por sucções rápidas. A solução interna (mM) foi composta por : KCl 150; CaCl<sub>2</sub> 3,81; MgCl<sub>2</sub> 0,112; EGTA 5, tamponada com HEPES 10 e pH ajustado para 7,4 com KOH. Para a determinação da concentração de Ca<sup>2+</sup> livre, fixada em 2 x10<sup>-7</sup> M, foi utilizado o programa "MaxChelator".

As células H.Ep.-2 foram cultivadas em placas de 6 poços com lamínulas de vidro redondas (THERMANOXÒ) para facilitar a aderência e formação de monocamadas. O protocolo de cultivo foi mantido como descrito anteriormente. Setenta e duas horas após a incubação das células com melatonina, procedeu-se a troca do meio de cultivo por solução externa (Hank's Balanced Salt Solution) com a seguinte composição (mM): NaCl 140; KCl 4,6; MgCl 1; CaCl 1,6; glicose 10; NaHCO<sub>3</sub> 5 e HEPES 10; em um pH de 7,4 ajustado com NaOH. As soluções externa e interna foram filtradas com membranas (MILLIPORE), tipo GS, de éster de celulose, com poros de 0,22 mm. As resistências de acesso das micropipetas de patch-clamp foram de 4-6 MegaOhms.

**Análise Estatística:** Foi utilizada a análise de variância com um fator (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5%

### O efeito da melatonina no crescimento das células H. Ep.-2

Houve diferença significativa no crescimento das células da linhagem do carcinoma epidermóide de laringe (H.Ep.-2) sob a influência da melatonina por um período de três dias (ANOVA: F005;7;56=5.87, p<0.05).

A melatonina (1.25, 1.88, 2.50, 3.75, 5.00 e 7.50 mg/ml) inibiu a proliferação das células (H.Ep.-2) quando comparadas ao controle (Tukey: q<sub>0.05;56;8</sub>=6.27, p<0.05; q<sub>0.05;56;8</sub>=7.29, p<0.05; q<sub>0.05;56;8</sub>=5.42, p<0.05; q<sub>0.05;56;8</sub>=5.59, p<0.05; q<sub>0.05;56;8</sub>=6.78, p<0.05; q<sub>0.05;56;8</sub>=6.44, p<0.05, respectivamente) (Figura 1). O crescimento celular observado na dose de 10 mg/ml, pode estar relacionado com a expressão de proteínas e fatores de crescimento envolvidos na proliferação; ou mesmo, com uma diminuição ou ausência da expressão de receptores essenciais a ação inibitória da melatonina.

A ação antiproliferativa *in vitro* dos indóis da pineal foi estudada sobre diversas linhagens de células tumorais, como melanomas (B16), sarcomas (S180), células semelhante a macrófagos (PUS), fibroblastos (3T3) e coriocarcinomas (JAR). As células foram examinadas pela mensuração da incorporação de timidina tritiada pelas células tumorais, onde a potência inibitória dos indóis foi encontrada na seguinte ordem: metoxitriptamina > melatonina = metoxitriptofol = hidroxitriptofol = ácido metoxindolacético > serotonina = ácido hidroxindolacético (Sze *et al.*, 1993). O efeito inibitório da melatonina também foi descrito como inibidor do crescimento de células tumorais mamárias e das células do câncer de próstata (Marelli *et al.*, 2000; Hill & Blask, 1988; Cos & Sánchez-Barceló, 1994).

O efeito adverso dos indóis sobre a viabilidade celular também foi investigado (Sze *et al.*, 1993). Estudos recentes revelaram que as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e T47D) não foram inibidas pelo hormônio melatonina e o tratamento

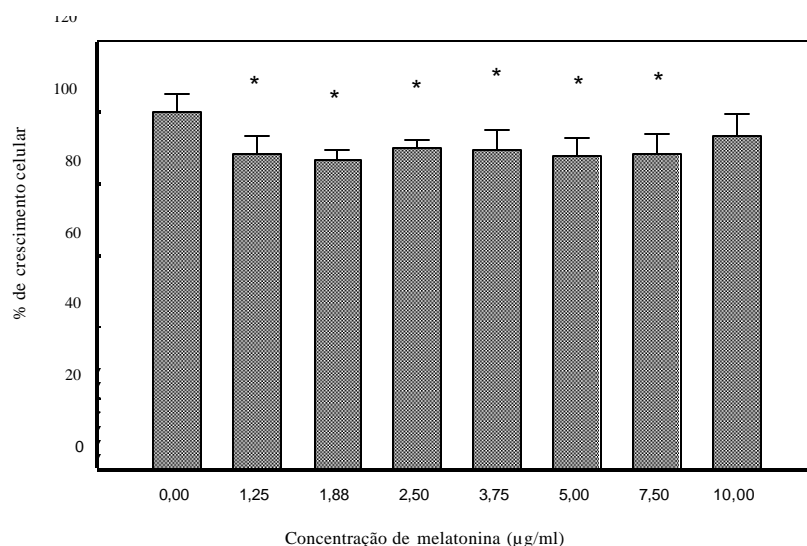


Figura 1 - Efeito da melatonina sobre a proliferação celular *in vitro* nas células do carcinoma epidermóide de laringe (H.E.p-2). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).

seqüencial com melatonina e ácido retinóico, induzindo apoptose nas células tumorais MCF-7, não é capaz de suprimir a proliferação celular, devido a ausência de estimulação dos receptores do ácido retinóico pela não utilização prévia da melatonina (Papazisis *et al.*, 1998; Eck *et al.*, 1998).

Nossos resultados estão de acordo com os efeitos antiproliferativos descritos para os indóis, exceto na dose de 10 mg/ml. Entretanto, o mecanismo pelo qual o hormônio suprime o crescimento das células tumorais não está elucidado, necessitando de mais pesquisas para demonstrar o papel anticancerígeno da melatonina.

#### **Alterações eletrofisiológicas induzidas pela melatonina sobre células H.Ep.-2 em cultura**

Diferentes correntes de célula inteira induzidas em H.Ep.-2 foram registradas (Figuras 2A e 2B): correntes do tipo R, caracterizadas por uma fraca dependência de voltagem para valores negativos (Figura 2C) e correntes do tipo S, que mostraram uma forte retificação para potenciais hiperpolarizados

(Figura 2D). Uma vez que o etanol (0,5 %) foi utilizado para a diluição da melatonina, foi preciso testarmos os efeitos desse agente sobre as correntes macroscópicas dos tipos R e S. O etanol reduziu a amplitude média dos dois tipos de correntes, sem, entretanto, alterar sua dependência de voltagem (Figura 2C e 2D).

A ação da melatonina (5.0, 10.0 e 15.0 mg/ml) sobre as correntes de células inteiras em H.Ep.-2 está ilustrada na Figura 3. A amplitude média de corrente dos tipos R e S alcançaram os seus valores máximos na concentração de 10.0 mg/mL de melatonina, enquanto os outros valores de concentração (5.0 e 15.0 mg/ml) não foram significativamente diferentes do controle ( $p > 0.05$ ).

Esses dados reforçam os resultados da ação proliferativa da melatonina numa dose específica sobre as células H.Ep.-2. Provavelmente a dose de 10.0 mg/ml represente a resposta mais efetiva do crescimento celular sobre as células estudadas, por ativar as correntes do tipo R e S (independente e dependente de voltagem respectivamente).

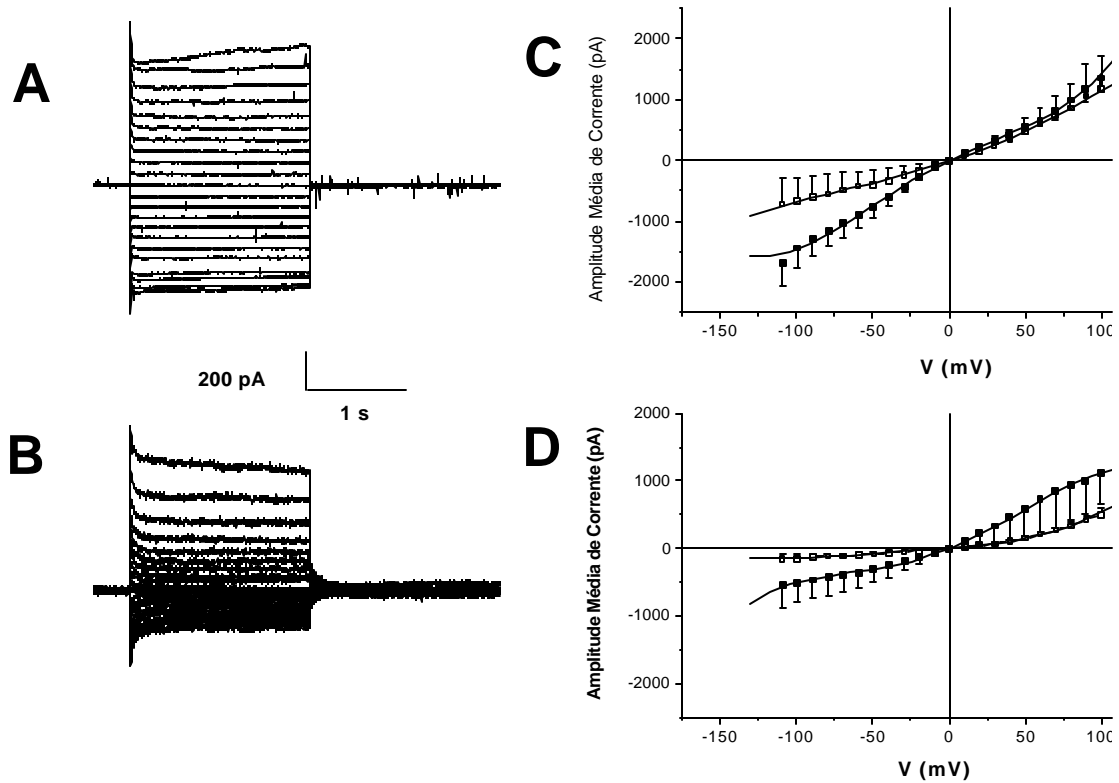


Figura 2 – Curvas corrente *versus* voltagem (I-V) para os diferentes tipos de correntes de célula inteira. A e B, registros das correntes do tipo R e S, em células individuais, ativadas a partir de 0 mV na faixa entre +110 mV a -110 mV, em intervalos de pulsos de 10 mV; C e D, curvas I-V para as correntes do tipo R e S nas condições controles sem álcool (■, n = 3 e n = 5, respectivamente) e controles com álcool (□, n = 5 para ambos).

Trabalhos recentes demonstram que vários canais iônicos expressos em células de tumores participam diretamente de sua proliferação: i) Os canais de  $K^+$ , presentes em células de câncer de mama humano, glioma C6 de humanos e ratos; adenocarcinoma colônico de humanos; próstata de rato e de mieloma humanos RPMI-8226 (Grimes *et al.*, 1995; Woodfork *et al.*, 1995; Skryma *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2000; Malhi *et al.*, 2000; Rouzair-Dubois *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2000; Rane, 2000; Ranson & Sontheimer, 2001); ii) os canais de cálcio de células de câncer de tumor prostático humano, carcinomas renal e pancreatobiliar, mieloma e próstata humana (Viglione *et al.*, 1995;

Kohn *et al.*, 1996; Wasilenko *et al.*, 1996); iii) canais de cloreto de células de câncer de mama humana; colon T84, mielomas, astrocitomas humano e glioma C6 de rato (Levitan & Garber, 1995; Chou *et al.*, 1995; Ulich *et al.*, 1995; Rouzair-Dubois *et al.*, 2000); e iv) canais de sódio de células de câncer de mama humana, pulmão e próstata de ratos (Grimes *et al.*, 1995; Blandino *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 2000).

As junções comunicantes ou “gap junctions” também têm uma participação efetiva na proliferação celular. A expressão das junções regula o ciclo celular em tecidos normais e a ausência destas junções é observada entre as células de tumores (Grossman *et al.*, 1994; Laird *et al.*, 1999). É importante salientar

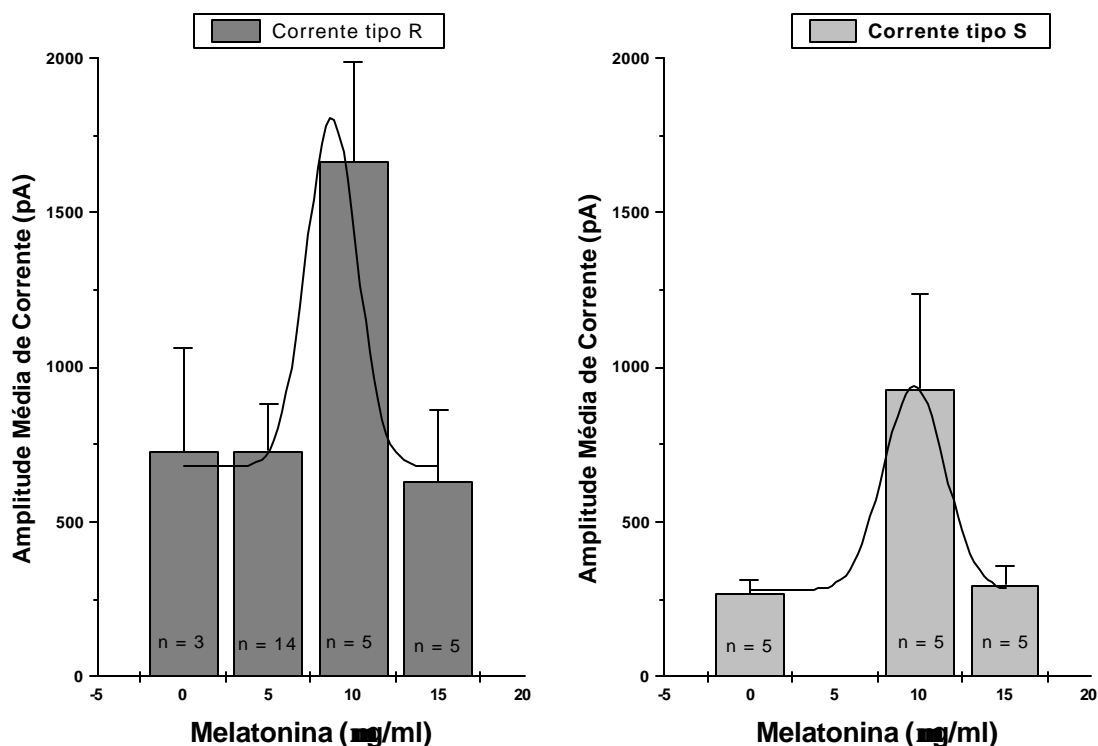


Figura 3 – Amplitude média de corrente de célula inteira em resposta a um pulso de voltagem variando de 0 mV para +70 mV para as correntes do tipo R (lado esquerdo) e do tipo S (lado direito), em diferentes concentrações de melatonina.

que entre todos os tipos de canais iônicos expressos em células excitáveis e não excitáveis, os canais de  $K^+$  são os mais diversificados do ponto de vista estrutural e funcional (Hille, 1992).

Além do câncer existem várias doenças genéticas humanas relacionadas às mutações de genes estruturais de canais iônicos, como a paralisia periódica hipercalemica familiar e a fibrose cística. A primeira é causada pelos canais de  $Na^+$  do músculo esquelético, o qual permanece aberto por um período muito longo na presença de altas concentrações de potássio extracelular; a segunda ocorre quando os canais de cloreto perdem sua regulação (Hille, 1992).

Estudos realizados por Klein *et al.*, (1999) demonstraram que células de HeLa com semelhanças às H.Ep-2 expressam dois tipos de canais permeáveis

ao  $K^+$ : canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  (independente de voltagem) e canais de  $K^+$  retificadores para o interior, independente de  $Ca^{2+}$  (Diaz, *et al.*, 1995; Sauvé *et al.*, 1990, Sauvé 1986). Outros estudos vêm demonstrando que a ação de substâncias inibidoras dos canais de  $K^+$  são capazes também de inibir a proliferação de linfócitos T e B e das células de gordura marrom em cultura de tecidos normais (Woodfork *et al.*, 1995). A inibição da proliferação celular, através de substâncias inibidoras dos canais de  $K^+$ , tem sido estudada também em células tumorais de linfomas e carcinomas podendo eventualmente ser utilizado no tratamento do câncer (Woodfork *et al.*, 1995, Grimes *et al.*, 1995; Skryma *et al.*, 1997, Bianchi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Meyer & Heinemann, 1998).

## REFERÊNCIAS

- Benchimol, M. 1996. *In*: Benchimol, M., C.S. Attias & T.U. Carvalho. **Métodos de estudo da célula** Editora Eletrônica-FENORTE/UENF, Rio de Janeiro.
- Bianchi, L. B. Wible, A. Arcangeli, M. Tagliatela, F. Morra, P. Castaldo, O. Crociani, B. Rosati, L. Faravelli, M. Olivotto & E. Wanke, 1998. Herg encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: aq selective advantage for cancer cells? **Can. Res.** 58:815-822.
- Blandino, J.K.W., M.P. Viglione, W.A. Bladley, H.K. Oie & Y.I. Kim. 1995. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potential and inhibition by Lambert-Eaton syndrome. **J. Memb. Biol.** 143:153-163.
- Chou, C.Y., M.R. Shen & S.N. Wu. 1995. Volume-sensitive chloride channels associated with human cervical carcinogenesis. **Can. Res.** 55:6077-6083.
- Cos, S. & E.J. Sánchez-Barceló. 1994. Differences between pulsative or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. **Can. Lett.** 85: 105-109.
- Diaz, M. & F.V. Sepulveda. 1995. Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in HeLa cells. **Pflugers Arch.** 430: 168-180.
- Eck, K.M. L. Yuan, L. Duffy, P.T. Ram, S. Ayettey, I. Chen, C.S. Cohn, J.C. Reed & S.M. Hill. 1998. A sequential treatment regimen with melatonin and *all-trans* retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. **Brit. J. Cancer** 77: (12) 2129-2137.
- Fraser, S.P., J.A. Grimes & M.B.A. Djamgoz. 2000. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: Comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. **Prostate** 44:61-76.
- Geran, R.I., N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Schumacher & B.J. Abbott. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Can. Chemother. Rep.** 3 (2), part 3.
- Grimes, J.A., S.P. Fraser, G.J. Stephens, J.E.G. Downing, M.E. Laniado, C.S. Forster, P.D. Abel & M.B.A. Djamgoz. 1995. Differential expression of voltage-activated Na<sup>+</sup> currents in two prostatic tumor cell lines: contribution to invasiveness in vitro. **FEBS Letters** 369:290-294.
- Grossman, H.B., M. Liebert, I.W. Lee, & S. W. Lee. 1994. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. **Can. Res.** 54:3062-3065.
- Hamill, O.P., A. Marty & E. Neher. 1981. Improved Patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch.** 391: 85-100.
- Hardeland, R., B. Poeggeler, I. Balzer & G. Behrmann. 1994. A hypothesis on the evolutionary origins of photoperiodism based on circadian rhythmicity of melatonin in phylogenetically distant organisms, pp. *In*: (C. Guntenbrunner, G. Hildebrandt & R. Moog, Ed.). **Chronobiol. & Chronomed** Peter Sang Verlag, Frankfurt.
- Hess, R. & A.G.E. Pearse. 1963. Pathways of reduced pyridine nucleotide oxidation in rat-brain homogenate demonstrated by a tetrazolium method. **Biochim. Biophys. Acta** 71: 285-294.
- Hill, S.M. & D.E. Blask. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Res.** 48: 6121.
- Hille, B. 1992. *Ionic channels and excitable membranes*, 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. USA.
- Karasek, M. & M. Pawlikowski, 1999. Antiproliferative effects of melatonin and CGP 52608. **Biol. Sign. Receptors** 8: (1-2) 75-78.
- Kholer R., C. Degenhardt, M. Kuhn, N. Runkel, M. Paul & J. Hoyer. 2000. Expression and function of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. **Circul. Res.** 87:496-503.
- Klein, H., L. Garneau, M. Coady, G. Lemay, J.Y. Lapointe & R. Sauvé. 1999. Molecular characterization of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from HeLa Cells. **J. Memb. Biol.** 167. 43-52.
- Kohn, E.C., E. Reed, G. Sarosy, M. Christian, C.J. Link, K. Cole, W.D. Figg, P.A. Davis, J. Jacob, B. Goldspiel & L.A. Liotta. 1996. Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. **Can. Res.** 56:569-573.
- Laird, D.W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H.T. Huynh, G.D. Carystinos & M.A. Alaoui-Jamali. 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an

- independent marker for breast tumors. **Can. Res.** 59:4104-4110.
- Levitan, I. & S.S.Garber. 1995. Voltage-dependent inactivation of volume-regulated Cl<sup>-</sup> current in human T84 colonic and B cell myeloma cell lines. **Pflügers Arch.** 431:297-299.
- Malhi, H., A.N.Irani, P.Rajvanshi, S.O.Suadiciani, D.C.Spray, T.V.McDonald & S.Gupta. 2000. K(ATP) channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines: Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. **J. Biol. Chem.** 275:26050-26057.
- Marelli, M.M.; P.Limonta; R.Maggi; M.Motta & R.M. Moretti. 2000. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. **Prostate** 45: (3) 238-244.
- Meyer, R. & S.H.Heinemann. 1998.Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. **J. Physiol.** 508:49-56.
- Moore, A.E., L.Sabachewsky & H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of permanent lines of human cancer cells. **Cancer Res.** 15: (9) 598-605.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65: 55-63.
- Nascimento, S.C. 1993. Recherche de l'activite antitumorale de produits de synthese ou d'origine naturelle. Utilisation du Samba pour l'analyse de modifications cellulaires induites. **Tese de doutorado - não publicada** - Universite Joseph Fourier.
- Papazisis, K.T., D.Kouretas, G.D.Geromichalos, E.Sivridis, O.K.Tsekrelis, K.A.Dimitriadis & A. H. Kortsaris. 1998. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. **J. of Pineal Res.** 25: (4) 211-218.
- Poeggeler, B., I.Balzer, R.Hardeland & A. Lerchl. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Naturwissenschaften** 78: 268-269.
- Rane, S.G. 2000. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 16:457-463.
- Ranson, C.B. & H.Sontheimer. 2001. BK channels in human glioma cells. **J. Neurophysiol.** 85:790-803.
- Reiter, R.J., D.X.Tan, B.Poeggeler, A.Menedez-Pelaez, L.D.Chen & S. Saarela. 1994. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. **Ann. New York Acad. Sci.** 719: 1-12.
- Rouzaire-Dubois, B., J.B.Milandri, S.Bostel & J.M.Dubois. 2000. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 gliomas cells. **Pflügers Arch.** 440:881-888.
- Sauvé, R., A.Diarra, M.Chahine, C.Simoneau, L.Garneau & G. Roy. 1990. Single-channel and fura-2 analysis of internal Ca<sup>2+</sup> oscillations in HeLa cells: Contribution of the receptor-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and effect of internal pH. **Pfluegers Arch.** 416: 43-52.
- Sauvé, R., C.Simoneau, R.Monette & G. Roy. 1986. Single-channel analysis of the potassium permeability in HeLa cancer cells: Evidence for a calcium-activated potassium channel of small unitary conductance. **J. Memb. Biol.** 96: 199-208.
- Shen, A. Y.; H.F.Li & S.I. Lu. 1999. Cytotoxicity studies of 2-hydroxymethyl-1-naphthol diacetate on K<sup>+</sup> currents in neoplastic plasma cells. **Drug Develop. Res.** 47:1-8.
- Skryma, R.N., N.B.Prevarskaya, L.Duffy-Barbe, M.F.Odessa, J.Audin & B.Dufy. 1997. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: Involvement in cell proliferation. **Prostate** 33:112-122.
- Sze, S.F., T.B.Ng & W.K. Liu. 1993. Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. **J. Pineal Res.** 14: 27-33.
- Ullrich, N., G.Y.Gillespie & H.Sontheimer. 1995. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. **Neuroreport** 7:343-347.
- Viglione, M.P., T.J.O'Shaughnessy & Y.I.Kim. 1995. Inhibition of calcium currents and exocytosis by Lambert-Eaton syndrome antibodies in human lung cancer cells. **J. Physiol.** 488:303-317.
- Wahab, M.H.A., E.E.M.S.Akoul & A.H. Abdel-Aziz. 2000. Modulatory effect of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Tumori** 86: (2) 157-162.
- Wang, S., Z.Melkounian, K.A.Woodfork, C.Cather, A. G.Davidson, W.F.Wonderlin & J.S. Strbl. 1998. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **J. Cell. Physiol.** 176:456-464.

- Wasilenko, W.J., A.J.Palad, K.D Somers, P.F.Blackmore, E.C.Kohn, J.S.Rhim, G.L.Wright Jr. & P.F.Schellhammer. 1996. Effects of the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole on the proliferation and invasiveness of human prostate tumor cell lines. **Int. J. Can.** 68:259-264.
- Weisenthal, L.M., J.A.Marsden, P.L.Dill & C.K.Macaluso. 1983. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Can. Res.** 43: 749-757.
- Woodfork, K.A.; W.F.Wonderlin; V.A.Peterson; J.S.Strobl. 1995. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. **J. Cell. Physiol.** 162:163-171.

Aceito: 3.x.2001



# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 18-20

26.iii.2003

## INCONSISTENCIES IN THE MORPHOLOGY OF SOME INDIVIDUALS OF THE GENUS *TERPSINOE* (EHREMBERG) (BIDDULPHIACEAE)

Clóvis R. P. Franco<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The fine structure of *Terpsinoe* sp., a diatom from the coastal region of Sergipe, Brazil is described.

**Key words:** Sergipe, diatom, *Terpsinoe*, rimoportula.

### RESUMO

Descreve-se a estrutura fina de *Terpsinoe* sp., diatomácea da região costeira de Sergipe, Brasil.

**Palavras chave:** Sergipe, diatomácea, *Terpsinoe*, rimoportula.

### INTRODUCTION

*Terpsinoe* Ehr. is a very distinctive genus with a precise ecological distribution. Its structure and ecology are very close to its relative *Hydrosera* Wall (Round *et al.*, 1990).

The valvar structure of the specimens in the material presented in this paper was examined by light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). Some inconsistencies found are briefly described.

A plankton net with a mesh size of 60 µm was used. Specimens were preserved in 4% buffered formalin. For permanent slides preparation, the material was rinsed with distilled water to remove salts, and oxidized boiling for one hour in 30% hydrogen peroxide to remove organic matter. For electron microscopy (SEM), the oxidized material was washed in deionized distilled water.

Approximately 40 specimens were observed under the electron microscope JEOL JEM-1200, at the University of Rhode Island, United States.

### MATERIAL AND METHODS

Specimens examined in this study were collected monthly during one year, at the Piauí-Fundo-Real estuarine system, in the coastal region of Sergipe, northeast Brazil.

### RESULTS AND DISCUSSION

Dimensions: 40-150 µm length of apical axis, 35-55 µm length of perivalvar axis.

Bipolar cells, rectangular in girdle view, with characteristic pseudosepta; undulate in valve view.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

Valves, with variable number of undulations (4-8 observed) and slightly capitate apices terminating in pseudocelli (Fig. 1).

Valve face and mantle covered with a very silicified meshwork with openings of variable sizes, having the margins covered with rows of spines. Externally on the valve face no areolar structure was clearly divided. Siliceous outgrowths were noticeable inside of these openings (Fig. 2). The meshwork is comparable to the coarse areolation covering the valve face and mantle of *Hydrosera* (Round *et al.*, 1990).

A conspicuous feature was observed off-centre over the valve face, an apparently unknown process, designated here as a “receded-process” (Fig. 2), because of its position, surrounded by the meshwork.

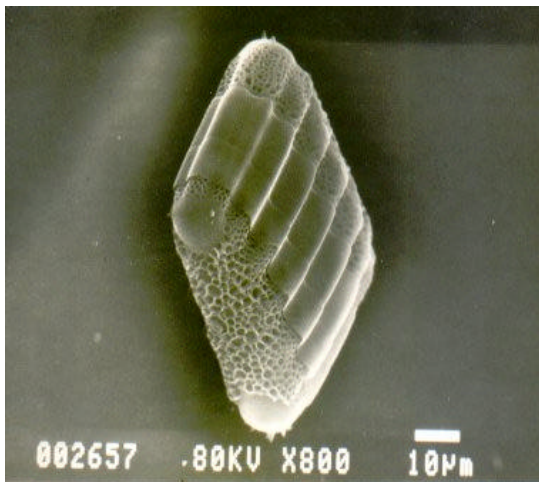


Figure 1. *Terpsinoe* sp. External valvar structure.

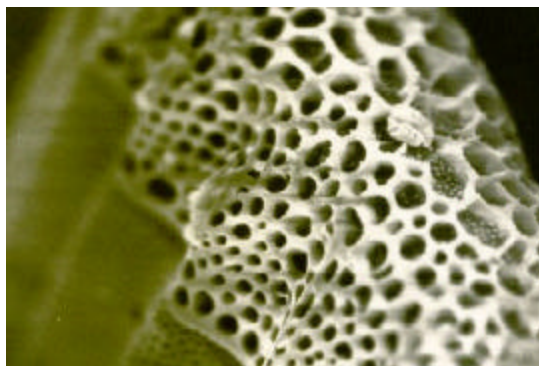


Figure 2. *Terpsinoe* sp. “receded-process”

Probably, this process has a short stalk underneath the enlarged upper part, but internally on the valve face, no openings or projections were noticed (Fig. 3). No rimoportulae were observed internally as well as externally on the valve face, what is a characteristic of this genus (see Round *et al.* 1990).

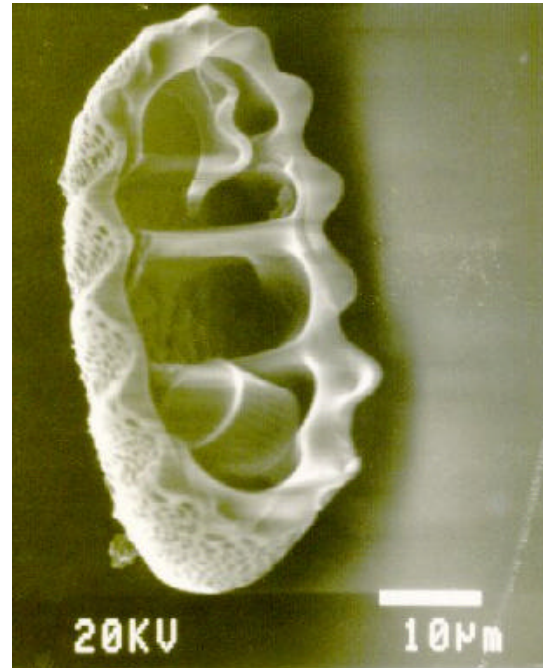


Figure 3. *Terpsinoe* sp. Internal valvar structure.

The pseudocelli seems to be finely ‘porate’ and are covered with small spines. Two large spines (up to 1,5 μm), visible in LM, were placed well apart in the pseudocelli, diverging from the origin in an angle (Figs. 4 and 5). Although, these large spines were absent in few of the cells observed (Fig. 6). Similar spines were observed in the genus *Hydrosera* Wall. (Ricard, 1987 and Round *et al.*, 1990) placed around the outer rim of the pseudocelli.

Girdle finely areolated, with the punctate type of areolae arranged in a quincunx (Figs. 1 and 5). No similar processes or spines were observed in *T. americana* (Bail.) Ralfs and *T. musica* Ehr., common species in the study area.

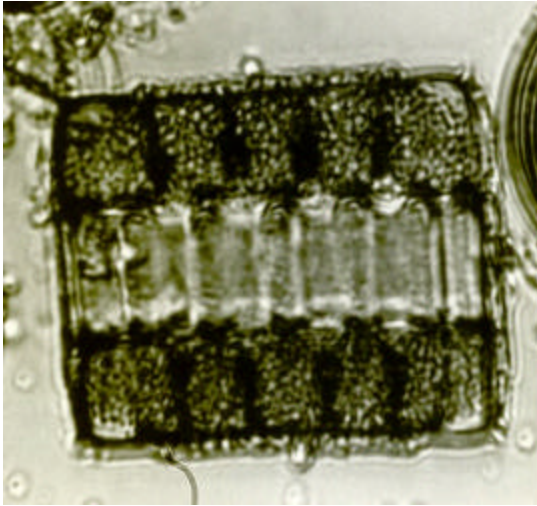


Fig 4. *Terpsinoe* sp. Pseudocelli with large spines (LM observation)

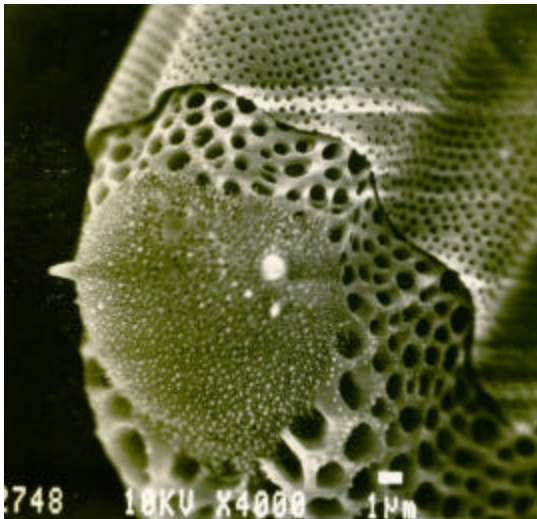


Figure 5. *Terpsinoe* sp. Pseudocelli with large spines

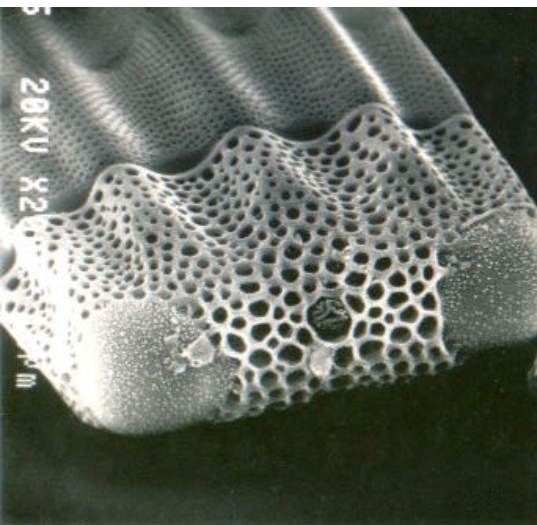


Figure 6. *Terpsinoe* sp. Pseudocelli without large spines

The description of the genus (Ehrenberg 1843) did not mention processes or spines (*Terpsinoe*, Musikthierchen.. Tafel III. iv. 1. vii. 30). In Schmidts Atlas (1874-1959), clear drawings of *Terpsinoe* spp. (Taf. 199, 1-8, 9-13; Taf. 200, 1-6, 7-8, 15-19), are also deprived of such structures.

The diatom in Van Heurk (1899: 453, Fig.177), *Terpsinoe* (*Pleurodesmium*) *Brebissonii*, shows similar features as those for the cell described here. However, no spines or processes were observed.

*Terpsinoe* sp. was found in coastal waters ranging from euhaline to oligohaline. Considering the relatively large number of cells studied and the observations presented here, further investigation is necessary in order to characterize this genus.

#### REFERENCES

- Ehrenberg, C. G. 1843. Verbreitung und Einfluss des mikroskopien Lebens in Sud- und Nord-Amerika. **Abhandl. Konigl. Akad. Wiss Berl.** 1841: 291-445 4Taf.
- Ricard, M. 1987. **Diatomophycees, Atlas du Phytoplankton Marin** (ed. A. Sournia). II. Paris, Edition du CNRS 127p.
- Round, F. E., R. M. Crawford and D. G. Mann 1990. **The Diatoms, Biology and Morphology of the genera.** Cambridge University Press 747p.
- Schmidt, A. *et al.* 1874-1959. **Atlas der Diatomaceekunde.** Liepzig, R. Reisl. Aschersleben 472pls.
- Van Heurk, H. 1899. **Traite de Diatomees.** Anvers, Belgium, 574p. 35pls.

Aceito: 17.xii.2001

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 21-24

26.iii.2003

## INFLUÊNCIA DA MASSA CORPORAL E DA TEMPERATURA NO DESLOCAMENTO E NA VOCALIZAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE ANUROS DO CERRADO

Daniel Oliveira Mesquita<sup>1</sup>

Helga Correa Wiederhercker<sup>2</sup>

### RESUMO

Estudou-se a influência da massa corporal e da temperatura do ar no deslocamento e vocalização de *Bufo paracnemis*, *Bufo rufus* e *Leptodactylus ocellatus*. As correlações entre massa corporal e deslocamentos não foram significantes, indicando que a ocupação de áreas para vocalizações independem do tamanho do animal. As demais correlações não significantes podem estar relacionadas ao limiar crítico de temperatura para atividade e reduzido número de indivíduos na área de estudo.

**Palavras-chave:** anuros, vocalização.

### ABSTRACT

The influence of body weight and air temperature on the movement and vocalization of *Bufo paracnemis*, *Bufo rufus* and *Leptodactylus ocellatus* were studied. The correlation between body weight and movement was not significant, suggesting that the occupation of a site for vocalization is not dependent on the size of the animal. The other non-significant correlations could be related to a critical threshold for temperature for activities and to the reduced number of individuals in the area.

**Key-words:** anuran, vocalization.

### INTRODUÇÃO

O cerrado é um bioma relativamente rico em espécies de anuros, 38 conhecidas somente para o Distrito Federal (Colli *et al.*, in press), entretanto, pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva destas espécies. Vários fatores podem influenciar a duração do período reprodutivo e o comportamento de uma espécie de anuro, tais como clima, sazonalidade, competição e densidade. Os padrões temporais de reprodução dos anuros estão distribuídas em duas categorias: explosiva e prolongada (Wells, 1977). A reprodução explosiva caracteriza-se por um grande número de indivíduos ativos durante um curto espaço

de tempo. Neste caso, o sucesso do acasalamento depende da capacidade do macho em encontrar as fêmeas. Na reprodução prolongada, o período em que ocorrem os acasalamentos é maior, porém apenas uma parte dos indivíduos está ativa a cada dia. Neste caso, a atração das fêmeas pelos machos vai depender da sua capacidade de atraí-las para o local em que está vocalizando, competindo por postos melhores, tentando evitar a proximidade de outros machos (McVey *et al.*, 1981; Wells, 1977; Emlen & Oring, 1977)

Os anuros que têm reprodução prolongada utilizam a vocalização para atração das fêmeas até seus postos, determinando que a capacidade de

<sup>1</sup> Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Brasília. 70910-900.

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Brasília. 70910-900.

vocalização destes machos, o tamanho e o tempo de vocalização podem ser fatores determinantes do sucesso reprodutivo (Woolbright, 1983; Wells, 1977).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da massa corporal e da temperatura no deslocamento e vocalização de *Bufo paracnemis*, *Bufo rufus* e *Leptodactylus ocellatus* em uma lagoa localizada na Reserva do Roncador - RECOR - IBGE, Distrito Federal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram coletados em uma lagoa formada por uma barragem no Córrego Monjolo, na Reserva Ecológica do IBGE (15° 55' S e 47° 51' W), situada a 35 Km ao sul do centro de Brasília. A lagoa, bem como a pequena ilha no seu interior, foram mapeadas utilizando-se marcas a cada 3 metros em sua margem. Os animais eram capturados, marcados e anotados os dados referentes a dia de captura, hora, local e massa corporal, sendo devolvidos no mesmo local da captura. A temperatura do ambiente foi registrada em cada uma das visitas feitas na lagoa (três vezes por noite). Os dados foram coletados entre os dias 26 e 31/09/98. Os dados de deslocamento foram coletados quando o indivíduo era capturado pelo menos duas vezes, através da união dos pontos, obtendo seus deslocamentos em relação à margem.

Quando estes animais estavam vocalizando, coletou-se o número de vocalizações a cada 10 minutos (*B. rufus*) e o tempo de cada vocalização (*B. paracnemis*). Os métodos de coletas não foram os mesmos porque o tempo de cada vocalização de *B. rufus* era muito curto, ao contrário de *B. paracnemis*. Para a análise dos dados foram feitas correlações entre massa corporal e vocalizações, massa corporal e deslocamento e temperatura do ar e número de indivíduos, utilizando-se o programa SYSTATFPU.5.2.1 para Macintosh.

## RESULTADOS

Foram marcados 10 indivíduos de *Bufo paracnemis* (um destes já estava marcado em levantamento anterior, realizado em 1997), com massa variando entre 105-700g; 17 indivíduos de *Bufo rufus*, com massa entre 30-102g e 11 indivíduos de *Leptodactylus ocellatus*, com massa entre 25-150g.

A análise da massa corporal e deslocamento de *Bufo paracnemis* ( $r=0.22$ ,  $p=0.64$ ), *Bufo rufus* ( $r=0.50$ ,  $p=0.14$ ) e *Leptodactylus ocellatus* ( $r=-0.073$ ,  $p=0.88$ ) mostrou que não há correlação entre a massa corporal e o deslocamento (Fig. 1). Nestas correlações utilizaram-se indivíduos recapturados pelo menos duas vezes: 7 indivíduos de *B. paracnemis*, 10 *B. rufus* e 7 *L. ocellatus*.

O deslocamento médio dos indivíduos de *B. paracnemis* variou de 0 a 54m, 0 a 90m em *B. rufus* e 0 a 30m em *L. ocellatus*.

Não houve correlação significativa entre a temperatura do ar e o número de indivíduos das três espécies presentes na lagoa: *B. paracnemis* ( $r=-0.31$ ,  $p=0.69$ ), *B. rufus* ( $r=-0.83$ ,  $p=0.17$ ) e *L. ocellatus* ( $r=-0.37$ ,  $p=0.63$ ) (Fig. 2).

Não houve correlação significativa entre as vocalizações e a massa corporal dos dois bufonídeos: *B. paracnemis* ( $r=0.25$ ,  $p=0.59$ ) e *B. rufus* ( $r=-0.37$ ,  $p=0.63$ ) (Fig. 3).

Além das 3 espécies estudadas, foram registradas as presenças de *Hyla minuta*, *Hyla albopunctata*, *Scinax fuscovarius* e *Leptodactylus labyrinthicus* na área de estudo.

## DISCUSSÃO

Os resultados não significantes não indicam necessariamente que estas espécies não apresentem comportamento territorial no sentido de defender uma área fixa de outros indivíduos (McVey *et al.*, 1981). Existem estudos sobre *B. paracnemis* indicando que

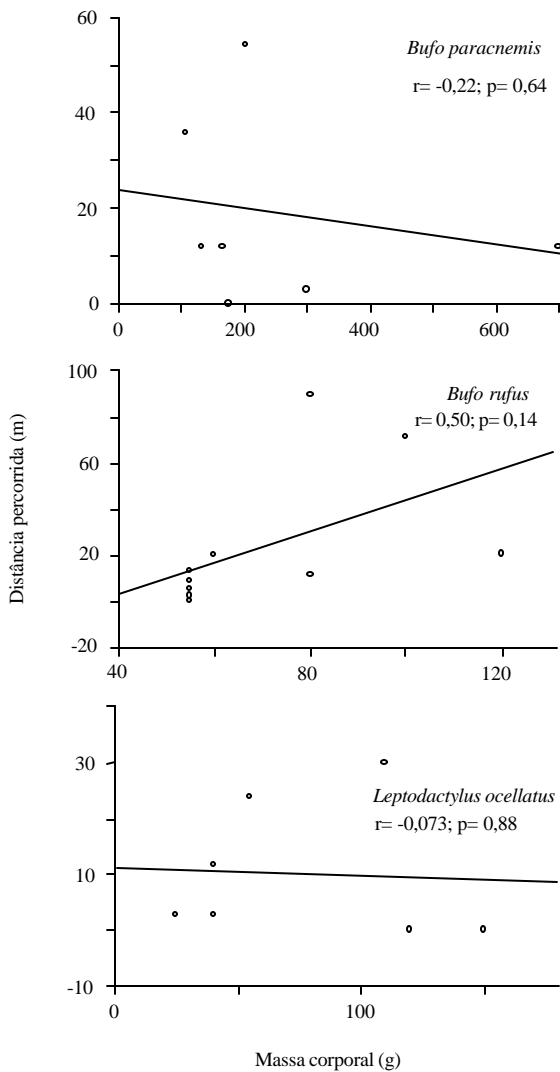


Figura 1. Correlação entre massa corporal (g) e distância percorrida (m) pelos exemplares de *Bufo paracnemis*, *Bufo rufus* e *Leptodactylus ocellatus*, lagoa no Córrego Monjolo, RECOR - IBGE.

os indivíduos vocalizam na sua área durante uma noite, porém não apresentam fidelidade de permanência, mudando de local em outras noites (Perotti, 1994). Esta característica pode ser considerada intermediária entre os comportamentos territoriais em que machos procuram posições mais atrativas para as fêmeas (típicos de reprodução prolongada) e a busca ativa dos machos pelas fêmeas (típico de reprodução explosiva) (Wells, 1977).

A correlação não significativa entre a distância percorrida e a massa corporal dos indivíduos das três

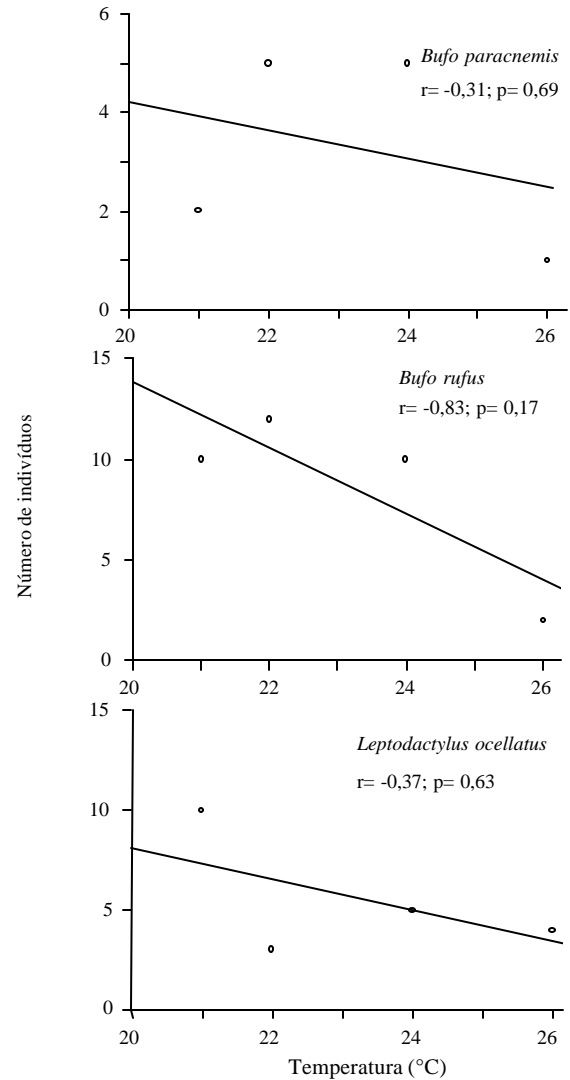


Figura 2. Correlação entre temperatura (°C) e número de indivíduos de *Bufo paracnemis*, *Bufo rufus* e *Leptodactylus ocellatus*, lagoa no Córrego Monjolo, RECOR - IBGE.

espécies estudadas, podem indicar que machos maiores não apresentem preferência de ocupação de áreas durante as vocalizações, como pode ocorrer em outros vertebrados. Por exemplo, Rintamäki (1995) observou que os machos menores de *Tetrao tetrix* (Aves, Tetraonidae) procuravam porções do ambiente não ocupadas como forma de diminuir a competição com machos dominantes. Gittins (1980) descreveu que os machos menores de *Bufo bufo* que chegavam primeiro aos sítios de vocalização aumentavam suas chances de acasalamento.

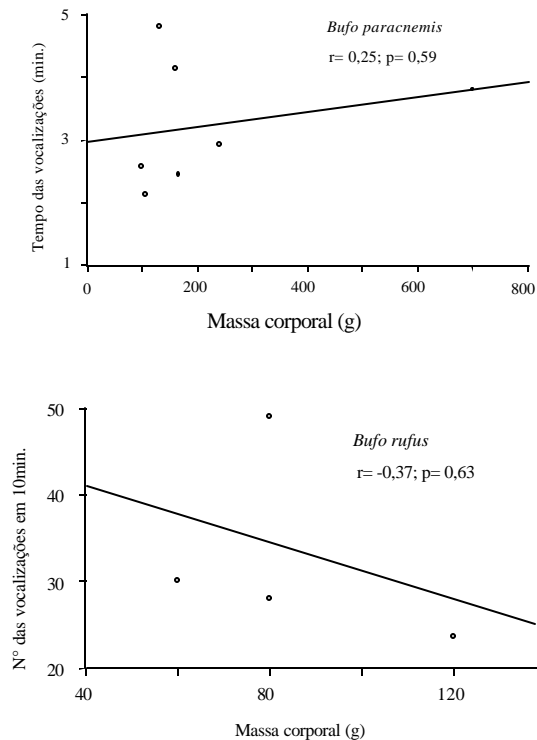


Figura 3. Correlação entre massa corporal (g) e vocalizações de *Bufo paracnemis* e *Bufo rufus*, lagoa no Córrego Monjolo, RECOR - IBGE.

Não houve também relações significativas entre temperatura do ar e número de indivíduos, ao contrário de *Bufo bufo*, nos quais o número de indivíduos aumentava com o aumento da temperatura do ar (Gittins *et al.*, 1980). A causa da não significância destas variáveis, observado neste estudo, talvez tenha sido devido à temperatura ambiente (21-26°C) não ter atingido níveis críticos para a atividade destes animais no período estudado.

Os machos das espécies que apresentam reprodução prolongada, utilizam a vocalização para atração das fêmeas, assim a capacidade de vocalização destes machos pode ser um fator determinante do sucesso reprodutivo (Wells, 1977). Entretanto, no presente trabalho não foram encontradas relações

significativas, provavelmente devido ao reduzido número de animais vocalizando durante o período estudado.

#### REFERÊNCIAS

- Colli, G. R., R. P. Bastos, & A. F. B. Araújo. 2002. The character and dynamics of the Cerrado herpetofauna, pp. 000-000. *In: The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna*. (P. S. Oliveira & R. J. Marquis, Eds.) Columbia University Press, New York, NY.
- Emlen, S. T., & L. W. Oring. 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. **Science** 197: 215-223.
- Gittins, S. P., A. G. Parker, & F. M. Slater. 1980. Population ecology characteristics of the common toad (*Bufo bufo*) visiting a breeding site in Mid-wales. **J. An. Ecol.** 49: 161-173.
- McVey, M. E., R. G. Zahary, D. Perry, & J. MacDougal. 1981. Territoriality and homing behavior in the poison dart frog (*Dendrobates pumilio*). **Copeia** 1981: 1-8.
- Perotti, M. G. 1994. *Bufo paracnemis* (Sapo Rococo, Kururu Guazu, Sapo Buey). Male behavior. **Herpetol. Rev.** 25: 62.
- Rintamäki, P. T., R. V. Alatalo, J. Höglund, & A. Lundberg. 1995. Male territoriality female choice on black grouse Leks. **Animal Behavior** 49: 759-767.
- Wells, K. D. 1977. The social behavior of anurans amphibians. **Animal Behavior** 25: 666-693.
- Woolbright, L. L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran amphibia. **Am. Nat.** 121: 110-119.

Aceito: 12.xii.2001



# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 25-32

26.iii.2003

ASPECTOS TAXONÔMICOS E ECOLÓGICOS DE *BOTHROPS MOOJENI* HOGE, 1966 (SERPENTES, CROTALINAE) DO TRIÂNGULO E ALTO PARANAÍBA, MINAS GERAIS, BRASIL

Renato Gomes Faria<sup>1</sup>  
Vera Lúcia de Campos Brites<sup>2</sup>

## RESUMO

Foram estudados aspectos da biometria, folidose e ecologia de *Bothrops moojeni*. Fêmeas têm maiores proporções cefálicas e corporais do que machos. Os indivíduos foram mais freqüentes nos períodos de dezembro-fevereiro (verão) e maio (outono); ocorrendo das 14:01 às 16:00 horas. O substrato utilizado mais freqüentemente foi as proximidades de córregos, rios e lagoas. Discute-se a variação observada relacionando-a a reprodução e hábitos alimentares.

**Palavras-chave:** *Bothrops moojeni*, taxonomia, ecologia.

## ABSTRACT

Aspects of biometry, pholidosis and ecology of *Bothrops moojeni* were studied. Females have bigger cephalic proportions than males. Individuals were more frequent in the period December-February (summer) and May (autumn), occurring from 14:01 to 16:00 hrs. The most frequently used substrate was in proximity to creeks, rivers and lakes. The observed variations are discussed in relation to reproduction and feeding habits.

**Key-words:** *Bothrops moojeni*, taxonomy, ecology.

## INTRODUÇÃO

*Bothrops moojeni* Hoge, 1966 foi descrito com base em uma fêmea coletada no Distrito Federal (Hoge, 1965). É uma espécie de ampla ocorrência, do Piauí ao nordeste do Paraguay, ocupando vários biomas (Campbell & Lamar, 1989; Belluomini & Autuori, 1982; Brites & Bauab, 1988; Wüster *et al.*, 1994).

O presente trabalho fornece informações sobre biometria e aspectos ecológicos (substratos utilizados, horários de coleta e distribuição de freqüência sazonal)

de *Bothrops moojeni* do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 espécimes (30 machos e 30 fêmeas) de *B. moojeni* provenientes do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, depositadas na coleção de herpetologia do Museu de Biodiversidade do Cerrado da Universidade Federal de Uberlândia. Para o estudo da ecologia foram utilizados dados

<sup>1</sup> Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Brasília. 70910-900.

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.



obtidos nas fichas de recebimento das serpentes doadas ao Setor de Manutenção de Répteis (Criadouro Conservacionista – Finalidade Científica), durante o período de 1986 a 1994, totalizando 159 espécimes.

Todas as variáveis morfométricas foram logaritmizadas. O tamanho do corpo foi definido como uma variável de tamanho (isométrica), seguindo os procedimentos descritos por Somers (1986). Primeiro, os escores de um autovetor de tamanho (isométrico) definido a priori como  $p^{-0.5}$ , foram obtidos pela multiplicação da matriz  $n$  versus  $p$  dos dados  $\log_{10}$ -transformados, onde  $n$  é o número de observações e  $p$  é o autovetor isométrico (Jolicoeur, 1963; Somers, 1986). Para remover o efeito do tamanho das variáveis morfométricas, foram obtidos os resíduos das regressões de cada variável pela variável tamanho (isométrico) do corpo. Realizou-se então uma análise de componentes principais (ACP) das variáveis morfológicas tamanho-ajustadas, para examinar diferenças morfológicas entre os sexos. Para verificar se as diferenças na forma de machos e fêmeas de *B. moojeni* são significativas, foi utilizado a análise multivariada de variância (MANOVA) com os três primeiros fatores.

As escamas dorsais foram contadas em três regiões: próximo da cabeça, meio do corpo e próximo da cloaca. As escamas ventrais foram contadas a partir da primeira escama mais larga que longa, até a anal. As subcaudais foram contadas do lado direito, a partir da anal até o final da cauda. Foram contadas as supra e infralabiais direitas e esquerdas. A anal e as subcaudais foram analisadas quanto à forma dupla ou simples. Os dados merísticos e morfométricos foram analisados por análise de variância multivariada (MANOVA) e análise discriminante, através do programa SYSTATFPU 5.2.1 para Windows. O nível de significância utilizado foi de 5%, os dados estão apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão.

A sexagem foi obtida por observação do hemipênis evertido ou por um pequeno corte longitudinal mediano a partir das primeiras subcaudais, permitindo a visualização da presença ou

não dos cordões que alojam o hemipênis introvertido.

Os parâmetros ecológicos analisados foram horários de coleta, sazonalidade e recursos utilizados (substrato).

## RESULTADOS

O tamanho do corpo varia entre os sexos (ANOVA,  $F_{1,58} = 6,37$ ;  $p=0,01$ ); a análise de componentes principais (ACP) dos dados morfológicos tamanho-ajustados mostrou diferenças morfológicas adicionais (Tabela 1 e 2). Os dois primeiros componentes principais acumularam 91,04% da variância explicada pelo conjunto dos componentes da ACP. A análise de variância multivariada aplicada aos três primeiros componentes principais mostrou diferença significativa na forma de cada sexo (MANOVA, Lambda, Wilks = 0,6067,  $p<0,00001$ ,  $N=60$ ). Valores positivos no primeiro componente principal estão relacionados com maior largura de cabeça e, inversamente, menores comprimentos de cauda e corpo. Valores positivos do segundo componente estão relacionados com maior comprimento de cauda e, inversamente menores comprimentos da cabeça e do corpo. O comprimento total (comprimento da cabeça + comprimento do corpo + comprimento da cauda), sem distinção de sexo, variou de 617mm a 1416mm.

As diferenças de foliose nos machos e fêmeas de *B. moojeni* foram significantivas (MANOVA, Lambda, Wilks=0,6519;  $p<0,00001$ ;  $N=60$ ). O número de subcaudais, dorsais - 2 (meio do corpo), ventrais e dorsais - 1 (próximo à cabeça), foram as que contribuíram para as diferenças encontradas. Os machos apresentaram subcaudais mais numerosas que as fêmeas; estas maior número de escamas dorsais-1 e ventrais que os machos (Tabela 3). A anal apresentou-se inteira em todos os espécimes analisados; as subcaudais divididas. O número de escamas supralabiais foi 7 em ambos os lados, exceção apenas de uma fêmea que apresentou 8 escamas do

Tabela 1. *Bothrops moojeni*, estatística da distribuição de frequência (C- comprimento, mm e L - largura, mm). Valores entre parêntes correspondem as variáveis morfológicas tamanho-ajustadas.

Medidas	Machos (N = 30)		Fêmeas (N = 30)	
	$\bar{x} \pm dp$	Min - Máx	$\bar{x} \pm dp$	Min - Máx
Tamanho do corpo	1,99±0,13	1,60 – 2,16	2,08±0,16	1,67 – 2,33
Cabeça - C	3,90±0,54 (-0,01±0,02)	2,70 – 4,80 (-0,08 – 0,05)	4,65±0,83 (0,01±0,03)	3,05 – 6,10 (-0,04 – 0,06)
Cabeça - L	2,34±0,37 (-0,01±0,04)	1,45 – 3,10 (-0,01±0,04)	2,79±0,63 (0,01±0,05)	1,30 – 3,90 (-0,12 – 0,11)
Corpo - C	80,80±12,99 (-0,001±0,02)	51,00 – 106,00 (-0,03 – 0,04)	91,20±15,60 (0,001±0,02)	50,00 – 119,00 (-0,04 – 0,07)
Cauda - C	13,52±2,22 (0,02±0,03)	8,00 – 17,50 (-0,03 – 0,08)	13,35±2,32 (-0,02±0,04)	7,50 – 17,00 (-0,12 – 0,07)

*dp* = desvio padrão da média

Tabela 2. *B. moojeni*, escores dos três primeiros componentes principais das variáveis morfológicas tamanho-ajustadas.

Variáveis	Componentes Principais		
	1	2	3
Comprimento da cabeça	0,21	-0,92	0,34
Largura da cabeça	0,94	0,26	-0,20
Comprimento do corpo	-0,69	-0,61	-0,40
Comprimento da Cauda	-0,75	0,63	0,36
Variância explicada pelos componentes	1,98	1,66	0,36
Porcentagem de variância explicada	49,42	41,62	8,96

Tabela 3. *B. moojeni*, estatística da distribuição de frequência dos caracteres merísticos (1 - próximo à cabeça, 2 - meio do corpo, 3 - próximo à cloaca, D - lado direito e E - lado esquerdo).

Escamas	Macho (N= 30)		Fêmeas (N=30)	
	$\bar{x} \pm dp$	Min - Max	$\bar{x} \pm dp$	Min - Max
Dorsais – 1	26,80±0,55	25-27	27,32±0,79	26-29
Dorsais – 2	25,56±0,81	24-27	26,55±1,28	25-29
Dorsais – 3	20,66±0,66	19-21	21,09±0,59	20-23
Ventrais	196,90±4,27	189-207	201,38±6,52	194-225
Subcaudais - D	65,06±3,91	56-73	58,67±5,50	40-70
Supralabiais - D	7±0	7	7,03±0,18	7-8
Supralabiais - E	7±0	7	7±0	7
Infralabiais - D	9,60±0,67	8-11	9,93±0,77	8-12
Infralabiais - E	9,70±0,70	8-11	9,80±0,75	8-11

*dp* = desvio padrão

lado direito.

Quanto à sazonalidade *Bothrops moojeni* ocorreu com maior frequência durante o verão e outono (Figura 1).

Com relação aos substratos utilizados, os indivíduos foram encontrados principalmente próximos à água (lagoas, córregos, rios e tanques de piscicultura), pastagens, próximos à sede de fazendas e culturas. Estas serpentes foram encontradas com menor frequência em ruas ou rodovias asfaltadas, interior de residências, montes de lenha, currais e estradas rurais (Figura 2).

Quanto à distribuição de horários, os indivíduos foram mais frequentes nos períodos das 14:01 às 16:00 h e das 08:01 às 10:00 h, não tendo sido encontrado nenhum espécime no intervalo das 04:01 às 06:00 h (Figura 3).

## DISCUSSÃO

A análise dos dados biométricos mostrou que as fêmeas de *B. moojeni* apresentam maiores proporções cefálicas, como observado para *B. alternatus* (Mesquita, 1997). O dimorfismo sexual para tamanho da cabeça pode estar relacionado aos hábitos alimentares; a variação sexual na forma da cabeça, seria primariamente devido a modificações de estruturas tróficas. O aumento da cabeça em um dos sexos serviria como estímulo visual, talvez em exibições intraespecíficas ou antipredatórias; este aumento refletiria em maiores órgãos sensoriais ou cérebro (Shine, 1989; Camilleri & Shine, 1990). Forsman (1992) estudando *Vipera berus* na Europa, propôs que indivíduos com diferentes tamanhos de cabeça mas igual tamanho corporal difeririam em suas taxas líquidas de ganho energético, isto é, teriam diferentes taxas de aquisição de energia, mas com igual custo de manutenção. Estas variações poderiam contribuir para diferenças individuais no sucesso de forrageamento, taxa de crescimento e sobrevivência, como verificado para os machos de *Vipera berus*

(Forsman, 1994). É possível que o dimorfismo sexual para tamanho da cabeça em algumas espécies, resulte também em diferenças de ganho energético em cada sexo. Entretanto, para *Bothrops moojeni* não existem, até o momento, dados na literatura que permitam discutir estas hipóteses. As maiores proporções cefálicas das fêmeas de *B. moojeni* provavelmente estejam relacionadas com o maior tamanho das glândulas de peçonha (Bauab *et al*, 1992)

O maior tamanho do corpo, bem como número mais elevado de escamas dorsais e ventrais encontradas nas fêmeas de *B. moojeni*, provavelmente, sejam decorrentes de fatores adaptativos ao período de gestação e à morfologia do sistema reprodutor da fêmea. Mais escamas dorsais permite nas espécies vivíparas maior distensão do corpo durante o período de desenvolvimento dos embriões como ocorre em *B. alternatus* e *Natrix natrix* (Mesquita, 1997; Thorpe, 1989). A região correspondente aos ovários contém maior número de ventrais quando comparados à região correspondente aos testículos (Gomes & Puerto, 1993). O aumento da cavidade abdominal das fêmeas levaria também a uma maior eficiência reprodutiva, já que as fêmeas maiores teriam condições de produzir ninhadas com maior número de indivíduos (Semlitsch & Gibbons, 1982) como verificado em *Simophis rhinostoma*, na qual o tamanho da ninhada está correlacionado com o número de folículos maduros e também com o tamanho corporal da fêmea (Semlitsch & Gibbons, 1982; Jordão & Bizerra, 1996). A evolução do tamanho nos animais se deve à competição por recursos entre os sexos ou simplesmente como consequência de diferenças sexuais na biologia reprodutiva (Shine, 1989).

Os machos de *B. moojeni* apresentaram a cauda ligeiramente maior do que as fêmeas, com o número de escamas subcaudais maior. O aumento da cauda dos machos provavelmente esteja relacionado a acomodação do hemipênis e do músculo retrator, tendo King (1989) mencionado que a extensão deste dimorfismo varia entre as espécies. O maior número de subcaudais das *B. moojeni* provavelmente favoreça

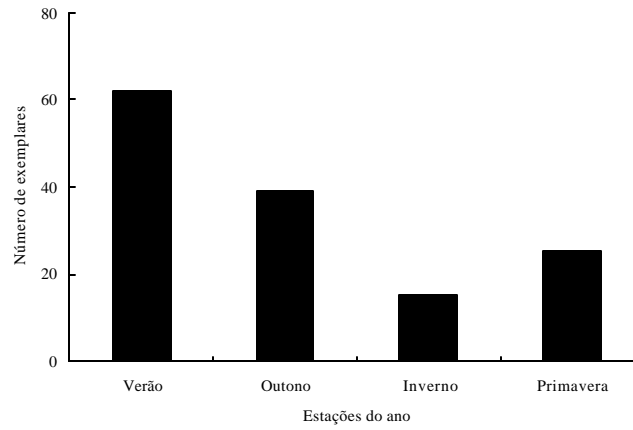


Figura 1. *B. moojeni*, sazonalidade, 1986-1994.

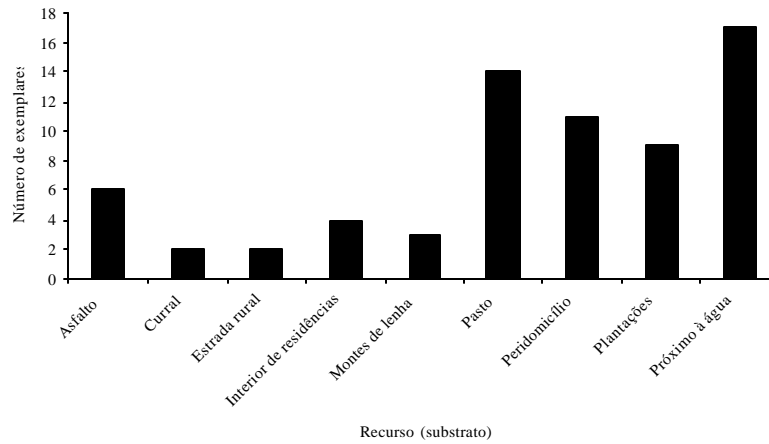


Figura 2. *B. moojeni*, distribuição de freqüência do substrato, 1986-1994.

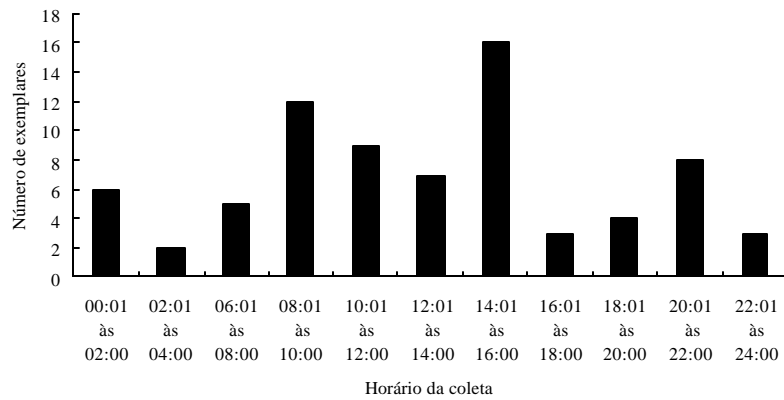


Figura 3. *B. moojeni*, distribuição de freqüência dos horários de coleta, 1986-1994.

o acasalamento aumentando o atrito, permitindo melhor fixação da cauda no momento da cópula.

A folidose de *B. moojeni* do cerrado corresponde a descrita por Campbell & Lamar (1989), exceção no número de ventrais que foi maior (189-225) do que o relatado (179-210). Para *B. moojeni*, não existem informações suficientes na literatura que permitam afirmar se o clima interfere na folidose, necessitando assim de investigações taxonômicas com espécimes de outras regiões.

Os indivíduos foram mais frequentes no verão e outono, período de reprodução; os filhotes de *B. moojeni* nascem no meio da estação chuvosa entre fins de dezembro e janeiro, podendo os nascimentos estenderem-se até março (Leloup, 1984; Freitas, 1999); em espécimes de cativeiro obtive-se resultados semelhantes, com o pico reprodutivo em janeiro (Méier & Sandoz-Ogata, 1996).

*B. moojeni* utiliza o substrato terrestre, ocorrendo com maior frequência próximo à água, provavelmente em decorrência do possível uso de presas aquáticas ou semi-aquáticas em sua dieta. *B. moojeni*, utiliza principalmente áreas de mata e de ecótono entre mata e o cerrado, sugerindo que a escolha de habitat por estes animais pode estar relacionado ao habitat de suas presas (Borges & Araújo, 1998).

Encontramos na literatura vários relatos de ofiofagia como *B. moojeni* x *Erythrolamprus aesculapii*, *B. atrox* x *Leptodeira annulata* e *B. jararacussu*, alimentando-se de anuros e lagartos, respectivamente (Brites, 1987; Puerto & Cordeiro, 1987; Marques, 1998). *B. jararaca* e *B. jararacussu* ocorrem em locais próximos à água incluindo anfíbios em sua alimentação (Lema *et al.*, 1983). *B. moojeni* em cativeiro aceitam girinos de *Rana catesbeiana* e neonato de *Mus musculus* (Brites, 1987; Faria, 1998). Na natureza *B. moojeni* alimenta-se de rãs, lagartos e pequenos roedores (Freitas, 1999).

Os filhotes de várias espécies de *Bothrops* nascem com a extremidade da cauda branca inclusive *B. moojeni*, o que favorece a prática "luring caudal"

mencionada por Sazima (1991) para *B. jararaca* e *B. jararacussu*. A utilização desta tática de caça também foi observada para juvenis de *Tropidodryas striaticeps* (Sazima, 1993). Várias espécies de serpentes utilizam a tática de forrageamento de "senta-e-espera" (Mattison, 1995), estas serpentes têm normalmente colorações crípticas no corpo e na cabeça com a extremidade da cauda mais clara, o que permite atraírem suas presas movimentando-a. Esta tática é comum em juvenis que se alimentam de lagartos e anfíbios; com a maturidade perdem estas características, devido a mudança na dieta, ou em consequência da inabilidade de grandes serpentes para a tática de caça.

Leloup (1984) propôs que a água atuaria como reguladora da temperatura em *Bothrops moojeni*. É provável que a preferência desta espécie pela proximidade da água esteja associada às duas hipóteses, tanto na captura de presas aquáticas ou semiaquáticas, quanto no auxílio da termorregulação.

O segundo substrato mais utilizado por *B. moojeni* foram as pastagens, como descrito também para *B. alternatus* (Mesquita, 1997). Embora *B. moojeni* tenha sido encontrada em diversas culturas, no Triângulo e Alto Paranaíba predominam as pastagens, o que justifica a maior ocorrência destes animais neste substrato.

A proximidade de *Bothrops moojeni* à sede de sítios e fazendas possivelmente se deva à presença de roedores em locais de armazenamento de grãos, ou mesmo a presença de restos de alimentos próximos às residências que favorecem a presença de roedores, que acabam atraindo as serpentes. A ocorrência das serpentes em estradas asfaltadas coincidem com a coleta noturna executada pela equipe de segurança da Usina Hidrelétrica de Emborcação – CEMIG, Araguari.

Embora *Bothrops moojeni* tenha hábitos noturnos (Leloup, 1984), esta espécie foi coletada em praticamente todos os períodos da manhã até a noite conforme também notado por Puerto (1992). O maior número de espécimes foram coletados durante o dia,

coincidindo com as jornadas de trabalho dos trabalhadores rurais. *B. moojeni* não foi encontrada entre 04:01 h e 06:00 h, provavelmente devido ao fato destas serpentes se recolherem às tocas para fugir do frio intenso da madrugada (por volta das 04:00 h) como relatado por Leloup (1984).

**Agradecimento:** Os autores agradecem aos professores Dr<sup>a</sup> Cecília Lomônaco de Paula da Universidade Federal de Uberlândia e Dr. Fernando Antônio Bauab da Faculdade de Medicina de Catanduva e aos biólogos Ms. Daniel Oliveira Mesquita, Ms. Fabiana de Gois Aquino, Ms. Dárius Tubelis e Alison Gainsbury pelas críticas e sugestões.

#### REFERÊNCIAS

- Bauab, F. A., Y. Iwashima, V. L. C. Brites, J. C. Cury & W. T. Victorino. 1992. Estudo comparativo da produção máxima de peçonha e inquérito bacteriológico bucal em serpentes Viperidae, pp.110. **Anais do Congresso Científico da UFU**, Uberlândia.
- Belluomini, H. E. & M. P. Autuori. 1982. Methodology applied in the elaboration of faunal salvage in the region of "Água Vermelha" hydroelectric power plant. Centrais Energéticas de São Paulo-CESP. **Mem. Inst. Butantan** 46: 119-138.
- Borges, R. & A. Araujo. 1998. Seleção de hábitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). **Rev. Bras. Biol.** 58: 591-601.
- Brites, V. 1987. Ofiofagia de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Ophidia, Viperidae) na natureza. Juiz de Fora. XIV **Congresso Brasileiro de Zoologia**, Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Brites, V. & F. Bauab. 1988. Fauna ofidiana do município de Uberlândia - Minas Gerais - Brasil. I - Ocorrência na área urbana. **Rev. Cie. Cien. Biom. Uni. Fed. Uberlândia**. 3: 3-8.
- Camilleri, C. & R. Shine. 1990. Sexual Dimorphism and Dietary Divergence: Differences in Trophic Morphology between Male and Female Snakes. **Copeia** 1990: 649-658.
- Campbell, J. & W. Lamar. 1989. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Comstock. Cornell University Press., Ithaca, New York.
- Faria, R. 1998. Caracterização taxonômica e ecológica de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais - Brasil. **Não publicado. Monografia de Bacharelado**. Universidade Federal de Uberlândia.
- Forsman, A. 1992. **Adaptive body and head size variation in populations of the adder *Vipera berus***. Acta Univ. Ups. Summ. Upps. Diss. Fac. Sci., Compreh.
- Forsman, A. 1994. Growth Rate Survival in Relation to Relative Head Size in *Vipera berus*. **J. Herpetol.** 28: 231-238.
- Freitas, M. A. 1999. **Serpentes da Bahia e do Brasil . Suas características e hábitos**. Editora Dall, Feira de Santana.
- Gomes, N. & G. Puerto. 1993. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan** 55: 69-100.
- Hoge, A. 1965. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes, Viperidae). **Mem. Inst. Butantan** 32: 109-184.
- Jolicoeur, P. 1963. The multivariate generalization of the allometry equation. **Biometrics** 19: 497-499.
- Jordão, R. & A. Bizerra. 1996. Reprodução, dimorfismo sexual e atividade de *Simophis rhinostoma* (Serpentes, Colubridae). **Rev. Bras. Biol.** 56: 507-512.
- King, R. 1989. Sexual dimorphism in snake tail length: sexual selection, natural selection, or morphological constraint? **Biol. J. Linn. Soc.** 38: 133-154.
- Leloup, P. 1984. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. **Acta Zoo. Pathol. Antver.** 78: 177-198.
- Lema, T., M. Araujo & A. Azevedo. 1983. Contribuição para o conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comun. Mus. Ci. PUC**, Porto Alegre 26: 41-121.
- Marques, O. 1998. Reprodução e hábitos alimentares de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae), na estação ecológica Juréia-Itatins, litoral sul de São Paulo, pp.386. **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Mattison, C. 1995. **The encyclopedia of Snake**. Facts on File, New York.
- Meier, J. & A. Sandoz-Ogata. 1996. Experiences with a large-scale breeding center for snake venom production. **D. Zool. Garten N. F.** 66: 77-92.

- Mesquita, D. 1997. Biometria, folidose e ecologia da população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (Serpentes-Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba-MG. **Não publicado. Monografia de Bacharelado.** Universidade Federal de Uberlândia.
- Puerto, G. 1992. Serpentes brasileiras de importância médica, pp. 143-149. In: **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**, (S. Schvartsman, Ed.). Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo.
- Puerto, G. & C. Cordeiro. 1987. *Leptodeira annulata* (Linnaeus, 1958) (Serpentes), pp. 281. **XIV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Juiz de Fora
- Sazima, I. 1991. Caudal luring in two neotropical pitvipers, *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu*. **Copeia** 1991: 245-248.
- Sazima, I. 1993. Feeding technique of juvenile *Tropidodryas striaticeps*: probable caudal luring in a colubrid snake. **Copeia** 1993: 222-226.
- Semlitsch, R. & J. Gibbons. 1982. Body size dimorphism and sexual selection in two species of water snakes. **Copeia** 1982: 974-976.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **Quart. Rev. Biol.** 64: 419-461.
- Somers, K. M. 1986. Multivariate allometry and removal of size with principal components analysis. **Syst. Zool.** 35: 359-368.
- Thorpe, R. 1989. Geographic variation: multivariate analysis of six character systems in snakes in relation to character number. **Copeia** 1989: 63-70.
- Wüster, W., S. Pierini & G. Puerto. 1994. *Bothrops moojeni* (Brazilian Lancehead). Brazil: Mato Grosso. **Herpetol. Rev.** 25: 166.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 33-38

26.iii.2003

ASPECTOS TAXONÔMICOS E ECOLÓGICOS DE UMA POPULAÇÃO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854 (SERPENTES, VIPERIDAE) DAS REGIÕES DO TRIÂNGULO E ALTO PARANAÍBA, MINAS GERAIS

Daniel Oliveira Mesquita <sup>1</sup>  
Vera Lúcia de Campos Brites <sup>2</sup>

## RESUMO

Foram analisados aspectos morfológicos e ecológicos de uma população de *Bothrops alternatus* (caracteres merísticos e morfométricos; sazonalidade, atividade diária e substrato) das regiões de cerrado do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. Machos e fêmeas diferem significativamente com relação ao número de escamas dorsais, ventrais e sub-caudais. A cabeça e o comprimento do corpo (rostro-anal) das fêmeas são maiores, provavelmente uma adaptação relacionada à reprodução. Os indivíduos foram mais freqüentes no outono e inverno e próximos à água, áreas de pastagens e agrícolas. O pico de atividades diária foi entre 07:00-09:00 horas.

**Palavras-chave:** *Bothrops alternatus*, ecologia, taxonomia.

## ABSTRACT

The morphological and ecological aspects of populations of *Bothrops alternatus* (meristic and morphometry; seasonality, daily activities and substrate) were analyzed in individuals collected in two cerrado regions, the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, Minas Gerais. The differences between males and females were significant in relation to the number of dorsal, ventral and subcaudal scales. The head and body (snout-vent) of females are larger than in males, probably an adaptation related to reproduction. The individuals were frequent in the autumn and winter and near water, grazing and agricultural areas. The peak of daily activity was between 07:00-09:00 hours.

**Key-words:** *Bothrops alternatus*, ecology, taxonomy.

## INTRODUÇÃO

*Bothrops alternatus* Duméril, conhecida popularmente no Brasil como urutu, cruzeiro, urutu cruzeiro, ocorre ao sul de Goiás até o Paraguai, podendo ser encontrada em locais úmidos e secos (Campbell & Lamar, 1989; Lema, 1987). A espécie foi redescrita por Amaral (1933/34) utilizando exemplares procedentes de várias regiões do Brasil e Uruguai. Vanzolini & Brandão (1944-45) citam que

esta espécie apresenta forte dimorfismo sexual na folidose. Entretanto, nestes trabalhos não foram analisados espécimes provenientes do cerrado.

O objetivo deste trabalho é caracterizar a população de *Bothrops alternatus* do cerrado do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, quanto a folidose e morfometria e apresentar um sumário ecológico sobre a sazonalidade, padrões de uso de recursos (substrato) e horário de captura dos espécimes.

<sup>1</sup> Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Brasília. 70910-900.

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.



## MATERIAL E MÉTODOS

Para os estudos de folidose e morfometria foram analisados 39 exemplares (14 machos e 25 fêmeas) de *Bothrops alternatus* provenientes do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. Os exemplares estão depositados no Museu da Biodiversidade do Cerrado da Universidade Federal de Uberlândia.

Os caracteres merísticos utilizados foram número de escamas dorsais, contadas próximo à cabeça, no meio do corpo e próximo à escama anal; ventrais, a partir da primeira escama mais larga que longa, após as escamas geneais até a anal; subcaudais, da anal até a extremidade posterior da cauda; supra e infralabiais, contadas do lado esquerdo e direito da cabeça; condição da anal quanto à forma - dupla ou simples.

As medidas corporais utilizadas foram o comprimento e largura da cabeça, largura interocular, comprimento rostro-anal e comprimento da cauda.

A sexagem foi obtida pela observação do hemipênis evertido ou através de um pequeno corte longitudinal mediano à partir das primeiras subcaudais. Os dados morfométricos foram obtidos com auxílio de um paquímetro para comprimento da cabeça (CCA), largura da cabeça (LCA) e largura interocular (LIO), as demais medidas - comprimento rostro-anal (CRA) e caudal (CCAU), foram feitas com fita métrica decimal.

Os dados morfométricos foram logaritimizados. O comprimento rostro-anal foi considerado como o tamanho do corpo das serpentes. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar se existe diferença no tamanho do corpo entre os sexos. Foi também utilizada uma análise de covariância multivariada (MANCOVA), para verificar diferenças significativas entre os sexos, com o comprimento rostro-anal como covariável, e uma análise discriminante. Os dados merísticos foram analisados por uma MANOVA e análise discriminante. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o SYSTATFPU 5.2.1 para Macintosh.

Os dados ecológicos utilizados foram obtidos durante o recebimento dos animais doados pela comunidade ao Setor de Répteis-Criadouro Conservacionista da Universidade Federal de Uberlândia, no período de 1986 a 1994.

## RESULTADOS

As diferenças na folidose dos machos e fêmeas de *B. alternatus* foram significativas (Lambda, Wilks = 0,281;  $p < 0,001$ ); as escamas subcaudais, dorsais-1 (próximas a cabeça) e ventrais foram as principais responsáveis pela diferença. Os machos apresentaram mais escamas subcaudais que as fêmeas e estas apresentaram mais escamas dorsais-1 e ventrais que os machos (Tabela 1).

Os indivíduos apresentaram dimorfismo sexual de tamanho (ANOVA,  $p = 0,04$ ) e o comprimento da cabeça (CCA) e largura da cabeça (LCA) foram os principais responsáveis pela diferença (Wilks' Lambda = 0,589;  $p = 0,001$ ). As fêmeas apresentaram maior CCA e LCA que os machos (Tabela 2).

Os indivíduos ocorreram com maior frequência nos meses de junho, outubro e setembro, e durante o outono e inverno (Figura 1).

Quanto ao horário de captura, as serpentes foram mais frequentes no início da manhã, entre 7:00 e 9:00 horas (Figura 2).

Com relação aos padrões do uso de recursos, as serpentes ocorreram principalmente em locais úmidos, próximos a rios e córregos. Ocorreram também em áreas de pastagens, seguido por áreas de culturas de cana, milho e hortaliças e nas proximidades das sedes de sítios e fazendas, sendo pouco encontradas nas estradas rurais (Figura 3).

## DISCUSSÃO

As fêmeas de *Bothrops alternatus* do Triângulo e Alto Paranaíba apresentaram maior número de

escamas ventrais que os machos, relacionado com a morfologia do sistema reprodutor que apresenta ovários e ovidutos longos. Esta relação foi descrita também em *Boa constrictor* e *B. jararaca* (Gomes *et al.*, 1989; Gomes & Puerto, 1993). O maior número de escamas dorsais nas fêmeas, provavelmente se deve a uma adaptação ao período de gestação, quando ocorre aumento do volume dos ovidutos para acomodação dos embriões em desenvolvimento com conseqüente distensão da pele. Esta espécie apresenta marcado dimorfismo sexual na folidose; as fêmeas têm maior número de escamas dorsais e ventrais, e os machos têm maior número de subcaudais (Vanzolini & Brandão, 1944-45). Fêmeas de *B. alternatus* com corpo maior e escamas ventrais mais numerosas corroboram com a presença de maior número de marcas naturais dorsais nas fêmeas (Mesquita, 1997).

O maior tamanho da cabeça das fêmeas está relacionado com o tamanho do corpo e com a maior produção de veneno, como também foi descrito para *B. alternatus*, *B. pradoi* e *B. atrox* (Bauab *et al.*, 1992; Biasi *et al.*, 1976/77; Beluomini *et al.*, 1991). Provavelmente, o maior tamanho do corpo das fêmeas deva-se a viviparidade nestas serpentes.

Dimorfismos sexuais para medidas da cabeça e corpo são frequentemente encontrados em serpentes; sendo que estas diferenças provavelmente não estão relacionadas com seleção sexual (Camilleri & Shine, 1990), e sim devido a diferenças de hábitos alimentares entre os sexos (Shine, 1989).

Com relação à sazonalidade, as serpentes foram mais freqüentes no outono e inverno, tendo sido encontradas nas mesmas proporções em ambas as estações. A ocorrência no outono provavelmente se relacione com o período de recrutamento destes animais (Achaval & Olmos, 1997). No inverno o metabolismo pode diminuir, o que limitaria seus deslocamentos. Porém, nas áreas estudadas, é nessa época que ocorre o preparo do solo para a agricultura, o que poderia favorecer o encontro das serpentes.

Com relação à atividade diária, o horário de

Tabela 1. *Bothrops alternatus*; média, desvio padrão e amplitude, folidose, machos e fêmeas.

ESCAMAS	MACHOS (n=14)	FÊMEAS (n=25)
Dorsais - 1	28,29 ± 1,49 (26-31)	30,40 ± 1,85 (26-33)
Dorsais - 2	29,50 ± 1,65 (27-33)	30,08 ± 2,86 (28-35)
Dorsais - 3	22,50 ± 1,34 (20-25)	23,76 ± 1,48 (21-27)
Ventrais	171,57 ± 6,16 (155-179)	176,52 ± 5,06 (165-186)
Subcaudais	45,64 ± 2,31 (39-52)	38,28 ± 2,70 (35-48)
Supralabiais - D	9,21 ± 0,80 (8-10)	9,44 ± 1,08 (8-13)
Supralabiais - E	9,00 ± 0,55 (8-10)	9,32 ± 0,85 (8-12)
Infralabiais - D	13,29 ± 1,20 (11-15)	13,40 ± 1,08 (12-15)
Infralabiais - E	12,92 ± 1,86 (12-16)	13,32 ± 1,14 (12-15)

(1- próximo a cabeça, 2- meio do corpo, 3- próximo a cloaca, D- lado direito, E- lado esquerdo).

Tabela 2. *Bothrops alternatus*; morfometria de machos e fêmeas.

MEDIDAS	MACHOS (n=14)	FÊMEAS (n=25)
CCA	32,82 ± 8,76 (23,30 - 59,7)	44,84 ± 14,02 (21,00 - 64,30)
LCA	20,41 ± 9,05 (10,90 - 46,00)	28,29 ± 10,44 (11,80 - 46,10)
LIO	12,47 ± 3,75 (7,00 - 22,70)	15,42 ± 5,22 (8,20 - 29,00)
CCO	531,21 ± 170,165 (287 - 960,00)	701,80 ± 242,00 (275,00 - 1095,00)
CCAU	88,00 ± 19,51 (42,00 - 120,00)	86,84 ± 26,33 (35,00 - 130,00)

(CCA – comprimento da cabeça, LCA – largura da cabeça, LIO – largura interocular, CRA – comprimento rostro-anal e CCAU – comprimento da cauda).

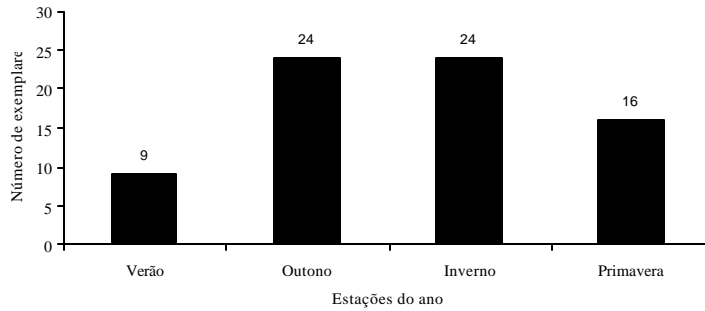


Figura 1. *Bothrops alternatus*: distribuição de freqüência sazonal, Setor de Répteis-UFU.

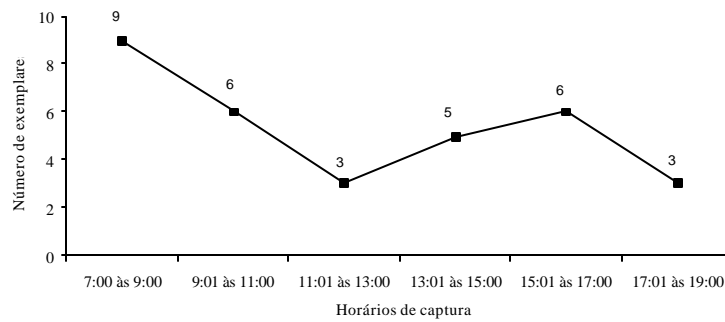


Figura 2. *Bothrops alternatus*: distribuição de freqüência dos horários de captura, Setor de Répteis-UFU.

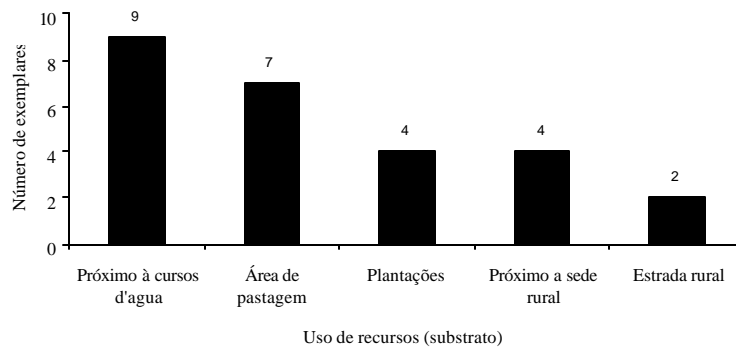


Figura 3. *Bothrops alternatus*: distribuição de freqüência do uso de recursos (substrato), Setor de Répteis-UFU.

pico de *B. alternatus* foi das 7:00 às 9:00hs, podendo estar relacionado com a temperatura mais baixa, o que induziria os indivíduos a procurarem locais mais ensolarados para se aquecerem (Homano-Hoge, 1996). A baixa ocorrência das *B. alternatus* no período das 11:01 às 13:00 horas pode estar relacionado com a insolação, obrigando as serpentes a se esconderem.

Quanto ao substrato, *B. alternatus* ocorreu com maior frequência em locais próximos a córregos e rios, como constatado também para *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Lema *et al.*, 1983; Faria, 1998). Há duas hipóteses para explicar a preferência de algumas espécies de Crotalinae nas proximidades da água: i) alimentação, pois estas serpentes incluiriam presas aquáticas e/ou semi-aquáticas nas suas dietas, como observado em *B. jararaca* e *B. jararacussu*, que incluem anfíbios na sua alimentação (Lema *et al.*, 1983) e ii) a água poderia atuar na regulação da temperatura das serpentes, como descrito para *B. moojeni*, podendo ambas hipóteses estarem associadas.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem ao PHD Guarino Rinaldi Colli, aos Biólogos Renato Gomes Faria e Ayrton Klier Péres Jr. da Universidade de Brasília, Dr. Fernando Antônio Bauab da Faculdade de Medicina de Catanduva e ao Dr. José Fernando Pinese da Universidade Federal de Uberlândia pelas críticas e sugestões.

## REFERÊNCIAS

- Achaval, F., & A. Olmos. 1997. **Anfibios y Reptiles del Uruguay** (1ª ed.). Barreiro y Ramos S. A., Montevideo, Uruguay.
- Amaral, A. 1933/34. Sobre a espécie *Bothrops alternata* D. & B., 1854 (Crotalidae). Variações. Redescrição. **Mem. Inst. Butantan** 8: 7-31.
- Bauab, F. A., Y. Iwashima, V. L. C. Brites, J. C. Cury, & W. C. Victorino. 1992. Estudo comparativo da produção máxima de peçonha e inquérito bacteriológico bucal em serpentes Viperidae, pp.110. **Anais do Congresso Científico da UFU**, Uberlândia..
- Beluomini, H. E., P. Biasi, G. Puerto, W. Fernandes, & A. L. Domingues. 1991. Amostras da população de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) apreciadas nas quantidades de veneno obtidas e dados ecológicos. Belém, **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, nova série, Zoologia** 7: 53-69.
- Biasi, P., H. E. Beluomini, & W. Fernandes. 1976/77. Quantidade de veneno obtidas na extração de serpentes *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948) (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan** 40/41: 155-166.
- Camilleri, C., & R. Shine. 1990. Sexual dimorphism and dietary divergence: differences in trophic morphology between male and female snakes. **Copeia** 1990: 649-658.
- Campbell, J. A., & W. W. Lamar. 1989. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Cornell University Press, Ithaca.
- Cardoso, R. P., Jr., L. A. B. M. Lula, M. Iwasaki, & S. M. Oliveira. 1990. Análise radiológica na ofiofagia de filhote serpente *Bothrops alternatus* (Viperidae-Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan** 52: 63-68.
- Faria, R. G. 1998. Caracterização taxonômica e ecológica de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais-Brasil. **Não publicado. Monografia**, Universidade Federal de Uberlândia.
- Gomes, N., & G. Puerto. 1993. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan** 55: 69-100.
- Gomes, N., G. Puerto, M. A. Buonato, & M. F. M. Ribeiro. 1989. Atlas anatômico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (Serpentes; Boidae). **Mem. Inst. Butantan** 2: 1-59.
- Leloup, P. 1984. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. **Acta Zoo. Pathol. Antver.** 62: 173-201.
- Lema, T. 1987. Lista preliminar das serpentes registradas para o Estado do Rio Grande do Sul (Brasil Meridional) (Reptilia, Lepidosauria, Squamata). **Acta Biol. Leopold.** 9: 225-240.
- Lema, T., M. L. Araújo, & A. C. P. Azevedo. 1983. Contribuição para o conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comun. Mus. Ci.**, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre 26: 41-121.
- Mattison, C. 1995. **The encyclopedia of snakes**. New York.
- Mesquita, D. O. 1997. Biometria, foliose e ecologia da

- população de *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Serpentes- Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba-MG. **Não Publicado. Monografia de Bacharelado**, Universidade Federal de Uberlândia.
- Puerto, G. 1992. Serpentes brasileiras de importância médica. *In* S. E. d. L. M. Ltda (ed.), Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos, pp. 288p. São Paulo.
- Romano-Hoge, S. A. R. W. L. 1996. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano, pp. 131 *In: Acidentes Por Animais Peçonhentos: Reconhecimento, Clínica e Tratamento*. Ed. Atheneu, São Paulo.
- Sazima, I. 1991. Caudal luring in two neotropical pitvipers, *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu*. **Copeia** 1991: 245-248.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **Quart. Rev. Biol.** 64: 419-462.
- Vanzolini, P. E., & J. H. F. Brandão. 1944-45. Notas sobre algumas diferenças sexuais na folidose de *Bothrops alternata* D. & B., 1854, e sua variação geográfica. **Mem. Inst. Butantan.** 18: 251-258.

Aceito: 12.xii.2001

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

---

São Cristóvão, SE 3 (2): 39-40

26.iii.2003

---

## INCUBATION PERIOD AND HATCHING OF THE SPIX'S WHIPTAIL LIZARD (*CNEMIDOPHORUS OCELLIFER*) IN CAPTIVITY

*Ivan França e Souza*<sup>1</sup>  
*Rafael Silveira Ribeiro*<sup>2</sup>  
*Nelson Jorge da Silva Júnior*<sup>3</sup>

### ABSTRACT

In this paper we report favorable conditions to hatch eggs of *Cnemidophorus ocellifer*.

**Key-words:** Incubation period, *Cnemidophorus ocellifer*.

### RESUMO

Neste artigo descrevemos as condições favoráveis para eclosão dos ovos de *Cnemidophorus ocellifer*.

**Palavras-chave:** Período de incubação, *Cnemidophorus ocellifer*

### INTRODUCTION

The source of the increasing variety of animals for the pet trade as well as for research, and the frequent identification of problems that must be solved in order to breed and rise new taxa, was mentioned by Chiszar (1996) as the two important ways of the fertile crescent of the herpetoculture. A number of discoveries that emerged directly or indirectly from herpetoculture, produced major effects within the scientific community (e. g., recognition of the profound effects of small variations in temperature, and recognition of the importance of hibernation in bringing about the

reproductive condition in temperature species and of rainfall cycles in bringing about reproduction in some tropical species). In addition, when the herpetoculturists succeed in reproducing new, sometimes rare, taxa, researchers invariably find features to interest to study in animals not previously available (Chiszar, 1996).

The objective of this paper is report the best conditions for the development of *C. ocellifer* eggs as we do not have reports of hatching of this species in captivity, and this might be a good contribution for future studies on the ontogeny of lizards, where we will create conditions to hatch eggs in captivity.

---

<sup>1</sup> Laboratório de Herpetologia, Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas, Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária, 1440, Setor Universitário, 74.210-010, Goiânia, Goiás, e-mail: souzai@terra.com.br

## MATERIALS AND METHODS

On 23 March 2001, a female *Cnemidophorus ocellifer* was captured using a pit fall trap, near Piranhas River, Municipality of Piranhas in the State of Goiás, Brazil (16°35'16"S, 51°47'50"W). The collecting site is within a dense Cerrado vegetational formation. The specimen laid two eggs on 24 March 2001. One egg was lost during the trip from Piranhas to Goiânia. The other (16.64 x 8.62mm) was kept at the Laboratory of Herpetology of the Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB), in a small thermic box with humid vermiculite at 24.5 °C ( $\pm$  1.0 °C).

## RESULTS AND DISCUSSION

A young specimen hatched on 21 May 2001, with SVL: 59.24mm, tail: 40.12mm (red) and body weight 0.142g (CEPB 1241).

The reproductive cycle of *C. ocellifer* was mentioned by authors in the last years (Vitt, 1983; Vitt and Breitenbach, 1993; Mesquita, 2001). However, the authors did not mention the incubation period for the eggs, although we know that natural conditions for the eggs' development are very different from the ones in a laboratory.

Our observations indicate the incubation period in laboratory of this species in 58 days, in the same conditions.

Acknowledgments: We are indebted to the staff of NATURAE - Projetos e Consultoria Ambiental Ltda for their help during field work. We thank to L. L. Carneiro for his efforts in taking care of the eggs at the Laboratory of Herpetology of the Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas. Grants for the authors were provided by the Vice reitoria de Pós Graduação e Pesquisa of the Universidade Católica de Goiás.

## REFERENCES

- Chiszar, D. 1996. Foreward, p. vii-x. *In: Advances in herpetoculture*. (Peter D. Stimpfle, Ed.). Special Publications of the International Herpetological Symposium, Inc., Des Moines, Iowa, USA 167 p.
- Mesquita, D. O. 2001. Ecologia de *Cnemidophorus ocellifer* (Squamata: Teiidae) no Cerrado brasileiro, p. 1-39. *In: Uma análise comparativa da ecologia de populações de Cnemidophorus (Sauria: Teiidae) do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF, Brasil 83 p.
- Vitt, L. J. 1983. Reproduction and sexual dimorphism in the tropical teiid lizard *Cnemidophorus ocellifer*. *Copeia* 1983:359-366.
- Vitt, L. J. and G. L. Breitenbach . 1993. Life histories and reproductive tactics among lizards in the genus *Cnemidophorus* (Sauria: Teiidae), pp. 211-244. *In: Biology of Whiptail Lizards (Genus Cnemidophorus)*. (J.W. Wright and L. J. Vitt, Eds.). University of Oklahoma, Norman, USA 417 p.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 3 (2): 41- 46

26.iii.2003

## EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *COCOS NUCIFERA* L. (ARECACEAE)

Marlucia Cruz de Santana<sup>1</sup>

Silvio Lopes Teixeira<sup>2</sup>

José Everaldo Gomes<sup>3</sup>

### RESUMO

Temperatura afeta a germinação *in vitro* de embriões zigóticos do coqueiro *Cocos nucifera*. A temperatura de 39°C inibiu a germinação. Nos tratamentos submetidos às temperaturas de 24°C, 29°C e 34°C as diferenças não foram significativas.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, temperatura, embriões zigóticos, germinação *in vitro*.

### ABSTRACT

Temperature affects *in vitro* germination of zygotic embryos of the palm *Cocos nucifera*. The temperature of 39°C inhibited germination. In treatments under temperatures of 24°C, 29°C and 34°C the differences were not significant.

**Key-words:** *Cocos nucifera*, temperature, zygotic embryos, *in vitro* germination.

### INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), com mais de 11 milhões de hectares plantados em 86 países, é a mais importante palmeira cultivada nos trópicos, envolvendo cerca de 10 milhões de pequenos proprietários e famílias de meeiros. Mais de 80 milhões de pessoas dependem diretamente do coqueiro e dos subprodutos para o seu sustento (Frison et al., 2000).

Na indústria o coqueiro desempenha importante papel econômico como alimento e como matéria prima na fabricação de cosméticos, remédios,

plásticos, álcool e óleos, entre outros produtos; na economia rural ele garante a sobrevivência do agricultor (Ménon e Pandallai, 1958; Ohler, 1984). No Brasil, a cultura do coqueiro ocupa principalmente terras arenosas situadas ao longo da faixa litorânea que se estende do Pará ao Rio de Janeiro (Ferreira et al., 1998).

A produção de coco está diminuindo no mundo todo. O declínio na produtividade das culturas é causado pelo envelhecimento das palmeiras, calamidades naturais, erosão genética e carência de variedades que associem adaptação com alta produtividade (Hocher et al., 1999; Magat, 1996;

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

<sup>2</sup> Laboratório de Fitotecnia, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

<sup>3</sup> Secretaria de Estado da Educação do Desporto e Lazer de Segipe.



Sáenz et al., 1999).

A estabilidade temporal da produção do coqueiro depende da disponibilidade e acesso à diversidade genética pelos melhoristas e produtores, para superar alguns dos principais problemas. O desenvolvimento sustentável de *C. nucifera* está sendo promovido através de várias atividades; dentre estas é relevante a coleta e conservação de germoplasma em várias partes do mundo. Entretanto, fatores como o grande volume da semente do coco e o alto custo do seu transporte dificultam esse trabalho. A cultura *in vitro* de embriões zigóticos representa uma solução rápida e econômica desses problemas pois além de permitir o transporte barato de embriões, que são pouco volumosos, podem originar mudas para transplante no campo (Cogent Newsletter, 2000). Nos casos em que o intercâmbio de germoplasma é necessário para incrementar programas de melhoramento, a cultura de embriões adquire especial importância. Ainda não existe um protocolo de alta eficiência para a cultura de embriões de coco, porque é necessário superar algumas dificuldades, como a baixa taxa de germinação dos embriões (Batugal & Engelmann, 1997).

Com o objetivo de colaborar para a resolução destes problemas sobre germinação, este trabalho verifica a influência da temperatura sobre a germinação *in vitro* dos embriões de *C. nucifera*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram conduzidos no Setor de Cultura de Tecidos do Laboratório de Fitotecnia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Sementes maduras (*Cocos nucifera*) com cerca de 11 meses de idade, foram obtidas na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO) em Campos, RJ.

**Extração e Desinfestação dos Embriões:** Após

descascados e acondicionados em caixas de colheita, as sementes foram quebradas na região mediana e retirados cilindros de endosperma com embriões, utilizando-se um vazador com cerca de 1,5 cm de diâmetro. Os endospermas foram embalados em sacos plásticos.

No laboratório os cilindros foram lavados com água autoclavada e detergente neutro, enxaguados e imersos em álcool (95%) por um minuto. A desinfestação foi feita utilizando-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 30 minutos, após os quais foram enxaguados cinco vezes com água autoclavada. Os embriões foram extraídos dos cilindros em câmara de fluxo laminar, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (0,1% de cloro ativo) e enxaguados abundantemente com água.

**Meio de Cultura:** O meio básico utilizado para germinação dos embriões foi o Y3 de Eeuwens (1976), com vitaminas de Morel e Wetmore (1951), caseína hidrolisada (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (6%), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1 mg L<sup>-1</sup>) e ágar (0,6%); o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os embriões excisados foram cultivados em tubos de ensaio (15 cm x 2,50 cm) contendo 20 ml de meio de cultura.

Neste experimento foi avaliado o efeito da temperatura sobre a germinação dos embriões com os tratamentos: T1: 24±1°C; T2: 29 ±1°C; T3:34±1°C e T4:39±1°C, em câmaras climatizadas FANEN, modelo 347.

Inicialmente a incubação foi realizada no escuro. Trinta dias após a inoculação as plântulas foram transferidas para um fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>., fornecida por lâmpadas Gro-Lux. Sessenta dias após a inoculação, foram avaliadas as percentagens de embriões: germinados (presença de plúmula e radícula); com plúmula; com radícula; não germinados, e deformados. Noventa dias após a inoculação foram avaliados os comprimentos da

folha, da raiz primária e da plântula.

Foram utilizados delineamentos estatísticos inteiramente casualizados, com 4 tratamentos e 5 repetições; a unidade experimental foi composta por 10 tubos de ensaio com um embrião/tubo. A significância das Anovas foram verificadas pelo teste de Tukey. Os níveis de significância foram 1% e 5%.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância foi significativa para as variáveis germinação do embrião, emissão de plúmula, número médio de embriões não germinados, embriões deformados e emissão de radícula (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais de germinação (emissão de plúmula + radícula) nos tratamentos com temperaturas de 24°C, 29°C e 34°C. O efeito foi inibidor sob temperatura de 39°C e após 30 dias de cultivo nesse tratamento, a inibição da germinação foi praticamente total (Tabela 2). O maior dano da alta temperatura foi na região radicular; as diferenças entre o percentual de emissão da radícula entre os demais tratamentos neste período não foram significativas.

A irregularidade na emissão da radícula é observada com frequência na cultura *in vitro* de embriões de coqueiro. Em algumas plântulas a emissão da radícula é o primeiro sinal da germinação, neste caso a raiz tem maior desenvolvimento do que as partes aéreas ou as raízes primárias crescem em extensão sem ramificar, o que também não é funcional porque a área de absorção fica reduzida.

A qualidade das partes aéreas determina o sucesso do enraizamento (Gratapaglia & Machado, 1998). O pouco desenvolvimento da parte aérea é acompanhado por crescimento lento das raízes, assim é necessário que as plantas passem por uma fase de alongamento. As partes aéreas com rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina e outros fatores de enraizamento, os quais são translocados para a base, estimulando a rizogênese. Em plântulas de coqueiro cultivadas *in vitro* nem sempre isto ocorre, ocorrendo com frequência um desequilíbrio observado entre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

Durante a germinação da semente do coco em natureza a plúmula rompe o exocarpo em cerca de dois meses. Essa estrutura protege as primeiras folhas do contato direto com o sol, da baixa umidade e das temperaturas altas. No presente estudo as diferenças entre os percentuais de emissão de plúmula nas temperaturas de 24°C e 39°C não foram

Tabela 1. ANOVA: Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* 30 dias após a inoculação no meio de cultura.

#### Quadrados médios

FV	GL	Emissão da plúmula e radícula (%)	Emissão da plúmula (%)	Emissão da radícula (%)	Embriões não germinados (%)	Embriões deformados (%)
Tratamento	3	34,13**	13,52**	4,10*	35,10**	10,16**
Erro	16	1,17	1,61	1,22	1,36	1,78
Média		5,30	3,56	1,71	5,62	3,00
CV(%)		20,32	35,64	64,71	20,74	44,30

FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação, + = dados transformados  $\sqrt{x+1}$ .

\*\*significante ao nível de 1%, \*significante ao nível de 5%

Tabela 2. Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, 30 dias após a inoculação no meio de cultura.

Temperatura (°C)	Emissão da plúmula e radícula+	Emissão da plúmula +	Emissão da radícula +	Embriões não germinados +	Embriões deformados+
24	6,05a*	2,64b	2,89a	3,61b	3,56a
29	7,00a	4,02ab	1,00a	4,69b	3,15ab
34	6,81a	5,65a	1,00a	4,67b	1,00b
39	1,46b	1,92b	1,93a	9,53a	4,33a
DMS	1,96	2,29	1,99	2,11	2,41

Tukey, médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.

+, dados transformados  $\sqrt{x+1}$

DMS, diferença mínima significativa

significantes. O maior percentual de embriões deformados (4,33%), foi encontrado na temperatura de 39°C, entretanto não foi estatisticamente diferente da temperatura de 24°C (3,56%). No cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro é comum a ocorrência de embriões deformados. Estes embriões apresentam um crescimento exagerado do cotilédone, sem que haja emissão da plúmula e da radícula. O fenômeno foi relacionado com a temperatura e observamos que houve maior incidência nas temperaturas de 24°C e 39 ° C, seguidos pela temperatura de 29°C . Na temperatura de 34°C o número de embriões deformados foi o menor, o que pode indicar um ótimo de temperatura para a maturação de alguns embriões que possivelmente ainda estavam imaturos na época da colheita. Os resultados encontrados também apontam para os limites de temperatura adequados para germinação *in vitro*.

A análise de variância, foi significativa para as variáveis comprimento médio da parte aérea, comprimento médio da raiz e da planta e número médio de embriões não germinados (Tabela 3).

Sessenta dias após a inoculação, os valores médios encontrados para as variáveis comprimento da plântula e da parte aérea, tiveram resultados semelhantes em relação aos tratamentos (Tabela 4); as maiores médias foram encontradas nos Tratamentos 2 (29°C) e 3 (34°C), seguidos dos Tratamentos 1 (24°C) e 4 (39°C). No Tratamento 1 o percentual de germinação não diferiu entre os

Tratamentos 2 e 3, mas houve pouco crescimento da parte aérea, em relação aos outros dois tratamentos, mostrando que a temperatura de 24°C não é recomendável para o crescimento. O comprimento médio da raiz (0,05 cm) foi menor sob temperatura de 39°C, enquanto que na temperatura de 29°C foram obtidos maior valor médio (1,32cm). Durante a germinação em natureza a raiz primária atravessa o mesocarpo, rompe o exocarpo e alcança o solo, encontrando aí temperaturas mais amenas do que as suportadas pela plúmula. Provavelmente a radícula não tenha suportado a temperatura de 39°C, evidenciado por manchas escuras nestas regiões e nos embriões cultivados.

A temperatura recomendada para o cultivo de embriões de coco *in vitro* é de 27°C embora sejam citados na literatura que o crescimento ocorre na faixa de 27°C a 31°C (Verdeil *et al.* 1997; Batugal e Engelmann, 1997). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a germinação dos embriões de coco ocorre no intervalo de 24°C a 34°C. O baixo número de embriões deformados e o maior percentual de germinação, sugerem que sob a temperatura de 34°C o embrião completa o seu amadurecimento.

Não houve diferença do número médio de embriões germinados às temperaturas de 24°C, 29°C e 34°C. O mesmo não ocorreu na fase de crescimento, durante o qual os maiores valores para comprimento médio das plântulas foram obtidos para aquelas cultivadas sob temperatura de 29°C e 34°C.

Tabela 3. ANOVA: Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera*, 60 dias após a inoculação no meio de cultura.

FV	GL	Quadrados médios				Embriões não germinados <sup>+</sup> (%)
		Parte Aérea	Raiz	Planta		
Tratamento	3	23,65**	1,53**	36,59**		27,96**
Erro	16	0,51	0,15	0,93		1,43
Média		2,52	0,85	3,39		6,64
CV(%)		28,47	45,42	28,40		18,01

FV = fonte de variação, GL = graus de liberdade, + = dados transformados em  $\sqrt{x+1}$   
 \*\*significante ao nível de 1%

Tabela 4. Influência da temperatura na germinação *in vitro* de embriões zigóticos *Cocos nucifera*, 60 dias após inoculação no meio de cultura.

Temperatura (°C)	Comprimento médio (cm)			Embriões não germinados (%)
	Parte Aérea	Raiz	Planta	
24	1,40b	0,95a	2,35b	7,44ab
29	4,66a	1,32a	6,07a	4,07c
34	3,99a	1,07a	5,05a	5,53bc
39	0,03c	0,05b	0,08c	9,53a
DMS	1,29	0,69	1,74	2,17

Tukey, médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.  
 +, dados transformados  $\sqrt{x+1}$   
 DMS, diferença mínima significativa

Agradecimentos: A Capes e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) financiaram a pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- Batugal, P.A., F. Engelmann. 1997. **Coconut embryo *in vitro* culture. Proceedings of the first workshop on embryo culture.** Banao, Guinobatan, Albay, Philippines, IPGRI. 164p.
- Cogent Newsletter. 2000 **Improved *in vitro* techniques benefit other R&D activities on coconut.** IPGRI, 4:18.
- Eeuwens, C.J. 1976. Mineral requirement for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum.** 36:23-28.
- Ferreira, J.M.S., D.R.N. Warwick, L.A. Siqueira. 1998. **Cultura do coqueiro no Brasil.** 2. ed. Aracaju, EMBRAPA-SPI. 292 p.
- Frison, E. A., H.Omont, F.Rognon, P. Batugal. 2000 **Prococos: a global programme for coconut research.** 37<sup>th</sup> COCOTECH/International Coconut Conference of APCC. Chennai 24 à 28 July .
- Grattapaglia, D., M.A. Machado. 1998. Micropropagação, pp. 183-260. *In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* ( A. C.Torres, L.S.Caldas & J.A.Busos, Eds.) Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB.
- Hoher, V., J.L.Verdeil, A.Rival, S.Hamon. 1999. Application of *in vitro* techniques to the conservation and propagation of coconut palms, pp.267-278. *In: Current advances in coconut biotechnology. Current plant science and biotechnology in agriculture.* (C.J. Oropeza, L.Verdeil, G.R.Ashburner, R.Cardena & J.M.Santamaría, Eds). Dordrecht, Kluwer

Academic Publishers.

- Magat, S.S. 1996. Search for a better understanding of the mineral nutrition and fertilizer needs of coconuts in the Philippines towards a reliable nutrition management and fertilizer recommendation: from 1964 to 1996 and beyond. **Coconut R & D Symposium, 30 years founding anniversary of the PCA-Davao Research Center, Bago-Oshiro, Davao City**, 6<sup>h</sup> February, 38p.
- Ménon, K.P.V., K.M. Pandalai. 1958. **The coconut palm: a monograph**. Indian Central Coconut Committee, Ernakulan, Índia, 383p.
- Morel, G.M., R.H. Wetmore. 1951. Fern callus tissue culture. **Am. J. Botany**, 38:141-143.
- Ohler, J.G. 1984. **Coconut, tree of life**. FAO, Rome, Italy. 437p.

- Sáenz, L., J.L.Chan, R.Souza, R.Hornung, E.Rillo, J.L.Verdeil, C. Oropeza. 1999. Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants pp 309–320. *In: **Current advances in coconut biotechnology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture***.(C. Oropeza, J.L.Verdeil, G.R.Ashburner, R.Cardena & J.M Santamaría, Eds).Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Verdeil, J.L., J.L.Hocher, A.Rival, S.Hamon. 1997. Improving the efficiency on coconut zygotic embryo culture: a physiological and biochemical approach, pp112-117.*In: **Coconut embryo in vitro culture*** (P.A. Batugal & F. Engelmann. Eds). Proceedings of the first workshop on embryo culture, Banao, Philippines, IPGRI.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

---

São Cristóvão, SE 3 (2): 47-53

26.iii.2003

---

## CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS QUANTITATIVOS NA PESQUISA BIOLÓGICA

*Jeane Carvalho Vilar<sup>1</sup>*  
*Celso Morato de Carvalho<sup>1</sup>*

### RESUMO

Discute-se brevemente alguns aspectos sobre métodos quantitativos na pesquisa biológica.

**Palavras-chave:** métodos quantitativos, pesquisa biológica.

### ABSTRACT

Theoretical aspects of the quantitative methods in the biological research are briefly discussed.

**Key words:** quantitative methods, biological research.

### INTRODUÇÃO

Estas notas são dirigidas aos estudantes de graduação da área biológica que freqüentam o nosso curso optativo sobre métodos quantitativos na pesquisa biológica, oferecido semestralmente no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. Nosso objetivo neste exercício é tentar, resumidamente, discutir a importância de alguns procedimentos essenciais na elaboração de uma pesquisa biológica.

A prática da observação e a execução de pesquisas biológicas exigem o conhecimento de algumas regras básicas sobre a área temática de estudo e sobre métodos de análise. A elaboração de questões e o que observar dependem muito mais de leitura crítica, busca incessante de informações e vivência

científica do que qualquer outro fator.

Quando se deseja relacionar um problema biológico específico aos métodos de análise, necessariamente se interpõe entre estes dois fatores a coleta de dados, que pode ser feita de duas maneiras, dependendo da questão: i) *mensurativa*, onde os dados são coletados em natureza, sem a manipulação nos tratamentos, como em muitos estudos ecológicos, botânicos e zoológicos, ou ii) *manipulativa*, na qual diferentes unidades experimentais recebem tratamentos diferenciados induzidos, como ocorre na farmacologia, na fisiologia ou na biofísica (Hurlbert, 1984).

A coleta de dados, essência da observação e da verificação de hipóteses, apresenta algumas fases importantes, até a análise final e a interpretação biológica das variações. Estas fases são (Fearnside,

---

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n; Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. 49100-000.

1986; Hayek, 1994): i) identificação do problema biológico; ii) formulação das questões, elaboradas sem ambigüidades; iii) elaboração de um sistema de proposições entre variáveis, as quais consistem das hipóteses de estudo (hipóteses nula e alternativa): num sistema de proposições falso/verdadeiro, a hipótese nula ( $H_0$ ) é aquela a ser testada, a hipótese alternativa ( $H_1$ ) é “aceita” quando a nula for rejeitada; iv) planejamento experimental; v) obtenção de dados e verificação da hipótese - análise das variações dos dados obtidos e vi) interpretação dos resultados.

### Questões

É impossível executar uma pesquisa ou avaliar a literatura científica sem um conhecimento básico probabilístico e estatístico sobre as inter-relações entre os parâmetros biológicos da área de interesse e as variações dos fenômenos observados. Essencial para esta compreensão é a elaboração de questões claras, as quais fazem indagações sobre as relações entre duas ou mais variáveis. As questões devem ser precisas, de modo a permitir a elaboração de hipóteses verificáveis. Questões generalistas ou metafísicas devem ser evitadas. Por exemplo “será que a qualidade dos fatores climáticos interferem na reprodução das serpentes?” não fornece elementos para verificações. Uma pergunta mais apropriada para verificação poderia ser “o potencial reprodutivo de uma população de *Leptodeira annulata* (Serpentes) da região da caatinga do oeste de Sergipe aumenta com o aumento das chuvas?”.

Neste contexto, é importante a definição das variáveis utilizadas, para delimitar a natureza destas e dos procedimentos. Imprecisões nas definições levam a ambigüidades e impossibilidade de verificações, como aquelas nas quais “cabem tudo”, como um leito de Procusto e com base apenas nas representações sociais. Por exemplo, a afirmação “a diversidade de serpentes da região de Sergipe parece ser relativamente boa e as espécies tendem a ter razoável número de indivíduos” não diz nada. Afirmações deste tipo não definem quantitativamente as variáveis, trazem

informações imprecisas e nenhuma verificação pode ser feita. Para uma discussão mais abrangente sobre as definições operacionais e definição das variáveis sugerimos o trabalho de Hayek (1994).

### Variáveis

Qualquer atributo ou estado biológico que possa diferir entre os elementos de uma população pode ser chamado de *variável* (Zar, 1994; Vanzolini, 1993). Quatro tipos de variáveis biológicas podem ser reconhecidas (Stevens, 1946):

- i) Variáveis de escala geométrica: variáveis quantitativas com ponto zero verdadeiro e que admitem todas as operações aritméticas. Podem ser *discretas*, com valores positivos inteiros, como o número de escamas ventrais de serpentes, ou *contínuas*, as quais podem tomar quaisquer valores positivos.
- ii) Variáveis de escala intervalar: variáveis contínuas com ponto zero e unidades arbitrárias, por exemplo as diversas escalas de temperatura.
- iii) Variáveis de escala ordinal: estas variáveis podem ser arranjadas por postos, numa ordenação crescente ou decrescente, como as variações de cores e formas.
- iv) variáveis de escala categórica (ou nominais): permitem a classificação sem ambigüidade e em classes mutuamente exclusivas, como o sexo.

### Populações e Amostras

O objetivo da análise quantitativa na pesquisa biológica é fazer inferências de atributos presentes em um grande grupo, através da análise destas características em um pequeno grupo de dados retiradas ao acaso do grupo maior. Estas inferências são expressas em probabilidades.

O total de medidas sobre as quais se quer tirar conclusões é a população ou universo. Por exemplo, podemos estar interessados em tirar conclusões sobre o comprimento do corpo de lagartos na idade da primeira reprodução, em uma determinada espécie que ocorre na Serra de Itabaiana, Sergipe. Todos os

comprimentos de corpo destes lagartos, com as mesmas características reprodutivas, formam a população em questão.

Populações podem ser muito grandes, como o exemplo dos lagartos, mas às vezes podem ser pequenas, como a população constituída por todos os mocós (*Kerodon rupestris*) fêmeas com mais de cinco anos de idade, da região de Canindé do São Francisco. Se a população a ser estudada for pequena, praticamente todas as medidas do conjunto poderão ser obtidas. Na realidade, isso é difícil de ocorrer, devido a vários fatores limitantes, como tempo e dinheiro, mas podemos obter as medidas de parte da população, como um subconjunto. Este subconjunto constitui a amostra. Através das características da amostra podemos obter as características da população de onde esta amostra foi retirada (Zar, 1996).

Os modos de obtermos amostras biológicas podem variar, dependendo do tipo de questão e da área temática da pesquisa. Independente destes fatores, é essencial a aleatoriedade com que as amostras são obtidas. Isto requer que todos os elementos da população tenham a mesma chance de serem selecionados na amostra, i.e., a seleção de um elemento na amostra não deve influenciar a chance de outro ser selecionado (amostras independentes).

Duas perguntas freqüentes que nos fazem são relacionadas ao tamanho da amostra e se um aumento no tamanho destas leva a melhores resultados. Muitos fatores interferem na obtenção de amostras, cuja essência é determinar o tamanho mínimo necessário para as verificações estatísticas. Isso vai depender diretamente da questão biológica formulada e do tipo de teste a ser utilizado, planejado antes da pesquisa ser realizada. Por exemplo, um teste muito utilizado na pesquisa biológica é o teste de t (Student). A distribuição de t é caracterizada pelo quociente da diferença entre a média amostral e a média da população (verdadeira) pelo desvio padrão da média amostral. Se aumentarmos os graus de liberdade a distribuição converge para uma normal, com N infinito, cujo valor é  $t = 1,96$ . Acima de 15 graus de

liberdade e um nível de significância de 5%, podemos aumentar o quanto quisermos o tamanho da amostra que não aumentará o poder do teste em discriminar possíveis diferenças (ver Vanzolini, 1993).

### Distribuição normal

A distribuição normal é uma curva em forma de sino (curva de Gauss), caracterizada por ter valores preponderantes em torno da média, os quais vão decrescendo para os extremos da curva (Figura 1). É a distribuição mais importante, porque é a base dos testes de hipóteses pré-estabelecidos.

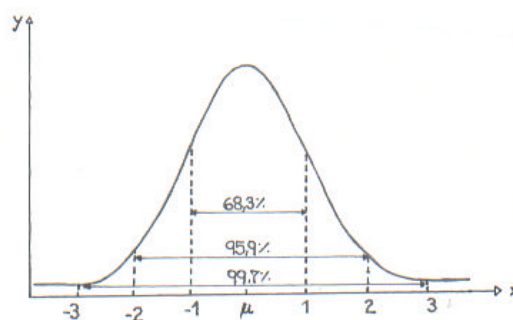


Figura 1. Distribuição normal.

68,3% das observações estão contidas entre a média  $\pm 1$  desvio padrão,  
95,9% das observações estão contidas entre a média  $\pm 2$  desvios padrão,  
99,7% das observações estão contidas entre a média  $\pm 3$  desvios padrão.

Na distribuição normal, para cada valor de  $x$  corresponde um valor de  $y$ , expresso pela função:

$$y = \frac{1}{\delta \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\delta^2}}$$

Os parâmetros desta equação são o desvio padrão ( $\delta$ ) e a média ( $\mu$ ), de modo que para um determinado desvio padrão e médias diferentes, poderão existir infinitas curvas – neste caso a média determina a distribuição, quanto maior, mais afastada de  $y$ . Para uma determinada média e desvios padrões diferentes poderão também existir infinitas curvas – neste caso o desvio padrão determina a distribuição, quanto maior o desvio, mais dispersos serão os pontos ao redor da média.

Cada amostra retirada de uma população



normalmente distribuída terá uma média. Se retirarmos várias amostras aleatórias desta população, iremos obter várias médias, as quais terão uma distribuição normal, cuja variância irá diminuir à medida que o número de amostras aumentar. O desvio padrão de uma distribuição amostral chama-se *erro padrão*, depende da variância e dos graus de liberdade e tem muita importância nos testes de hipóteses.

### Formulação de Hipóteses

Como trabalhamos com amostras na pesquisa biológica, a partir destas fazemos inferências sobre a média da população e as comparamos entre populações. Desse modo podemos verificar se as médias das amostras entre populações são significativamente diferentes entre si, se os dados (repetições) de vários procedimentos experimentais diferem entre si, dentro e entre amostras, ou se a média de uma amostra está contida no intervalo de confiança da média de uma população conhecida.

Fazemos estas inferências *antes* da coleta de dados, porque fazê-las depois dos dados coletados pode invalidar a pesquisa. Elaborada a questão e definida suas variáveis, formulamos duas hipóteses. A primeira, que vai “orientar” a pesquisa, chamamos de *hipótese nula (Ho)*, na qual estabelecemos que as variáveis não têm efeito, que as amostras são provenientes da mesma população, com médias contidas no intervalo de confiança de 95% ou que as relações biológicas investigadas não estão associadas ou são homogêneas. Se concluirmos que a hipótese nula deva ser rejeitada, a *alternativa (H1)* é então considerada verdadeira.

### Erros

Para rejeitarmos ou não a hipótese nula precisamos de um critério objetivo, que determine a probabilidade de rejeição (*valor do p*). Por convenção adotamos a probabilidade de 5% (0,05) ou menos como *critério* para rejeitarmos  $H_0$ . Esta probabilidade é chamada de *nível de significância*, representada pela letra grega  $\alpha$  (alfa). Isto quer dizer que uma observação tem 95% de chance de estar nas áreas sob a curva normal compreendidas entre os parâmetros que estabelecemos na hipótese nula (ver Figura 1). Existe uma chance de 5% dos valores excederem aqueles especificados na  $H_0$ , correspondentes aos extremos do nível de significância; na curva normal são conhecidas como *regiões de rejeição*, que podem estar situadas entre os menores (esquerda) ou maiores valores (direita), dependendo da questão estabelecida na hipótese nula (Figura 2).

Um teste estatístico tem um valor que corresponde ao critério (nível de significância) para rejeitarmos a hipótese nula. Este valor é chamado de *valor crítico*, que vai indicar as áreas de rejeição da hipótese nula.

Uma pergunta freqüente que também nos fazemos é sobre a probabilidade de rejeitarmos erroneamente a hipótese nula. Esta probabilidade é dada pelo nível de significância ( $\alpha = 0,05$  ou menos). Isto significa que há uma probabilidade de 5% em rejeitarmos a hipótese nula e ela ser verdadeira. As tábuas estatísticas dão estas probabilidades associadas ao valor encontrado nos testes de verificação de hipóteses. Rejeitar erroneamente a hipótese nula é

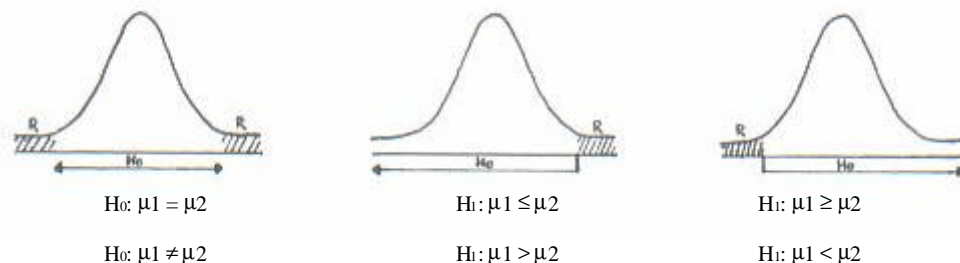


Figura 2. Região de rejeição (R).

conhecido como erro tipo I ou erro alfa. Existe associado outro tipo de erro em estatística, conhecido como erro tipo II ou erro  $\beta$  (letra grega beta), que consiste em não rejeitar a hipótese nula ( $H_0$  não é “aceita”) e ela ser falsa. Este tipo de erro não podemos estabelecer, como fazemos com o nível de significância (erro alfa). Qual tipo de erro é mais grave irá depender do tipo de pesquisa. Se a pesquisa estabelecer que cometer um erro tipo I for mais grave do que cometer o erro tipo II, podemos então determinar o nível de significância em 1% ( $\alpha = 0,01$ ). Como dissemos, estes erros têm de ser estabelecidos antes de ser executada a pesquisa, quando ainda estiver na fase de planejamento.

Associado ao erro de não rejeitarmos a hipótese nula e ela ser verdadeira, temos o poder do teste estatístico, determinado pela relação  $1 - \text{erro } \beta$ . Poder do teste é aquele que apresenta alta probabilidade de que a hipótese nula seja rejeitada quando esta é de fato falsa.

### Testes Estatísticos

A escolha do teste a ser utilizado para verificação da hipótese nula (rejeição ou não) deve ser determinada *antes* da pesquisa ser executada. Existem vários programas de computador que facilitam os cálculos, muitas vezes enfadonhos de serem feitos a mão. Entretanto, nós sugerimos sempre aos alunos que não utilizem os programas antes de saberem alguns passos intermediários, forçosamente feitos “no braço”, para que o comportamento dos dados e a conclusão do teste possam ser corretamente interpretados.

Quem vai determinar o tipo de teste é a variável, amarrada à questão. Nos testes univariados, com variáveis de escala geométrica, podem ser aplicados testes paramétricos, com uma amostra, comparando a média amostral com a média de uma população conhecida, com áreas de rejeição situadas em ambas as caudas ou somente em uma, à esquerda ou à direita da curva normal, dependendo da questão formulada. Um teste paramétrico pode estimar os

parâmetros da população e condiciona que a distribuição seja normal, comparando médias ou variâncias. No caso de duas amostras, pareadas ou não, comparam-se as médias; se ambas não forem significativamente diferentes, não se rejeita a hipótese nula e optamos por considerá-las como tendo sido retiradas da mesma população. Em ambos os casos, uma e duas amostras, utilizamos a distribuição de t (Student) para verificar a significância das diferenças entre as médias ( $t = \text{diferença pelo seu desvio padrão}$ ). Os análogos não paramétricos, cujas variáveis são do tipo ordinal e os dados ordenados por postos (ranks), permitem as mesmas conclusões; neste caso não são comparadas médias e não fazemos inferências dos parâmetros da população. Os testes não paramétricos têm maior probabilidade de cometermos erro tipo II.

Para análises com mais de duas amostras, é inválido fazer comparações duas a duas, porque a chance de cometermos um erro tipo I é muito grande, devido ao nível de significância ficar maior do que 5% (Zar, 1996). Nestes casos, utilizamos análises de variâncias (Anova), que podem ser executadas por blocos, com um, dois ou três fatores e com repetições ou sem repetições, sempre dependendo do tipo de questão. A essência da análise de variância, respeitadas as condições de variâncias iguais (homocedasticidade) e aleatoriedade das amostras, é comparar a variação dentro e entre as amostras, se a segunda for considerada significativamente maior do que a primeira, a hipótese nula será rejeitada. É um dos testes mais executados na pesquisa biológica; na forma paramétrica quando as variáveis são de escala geométrica, na forma não-paramétrica se as variáveis forem de escala ordinal. A complementação da Anova, quando significativa, é feita através de comparações múltiplas das médias (paramétricos) ou através de comparações múltiplas dos postos (não-paramétricos). Na forma paramétrica os testes de comparações múltiplas seguem a “linha” dos testes de Tukey-Duncan-Kramer ( $H_0$ : as médias são iguais); na forma não-paramétrica há os análogos, tipo Nemenyi, Dunn e Newman-Keuls, que comparam postos ou diferenças

entre múltiplas medianas (Zar, 1996; Vanzolini, 1993; Siegel, 1977).

Muitas vezes é importante verificar na pesquisa se duas ou mais variáveis geométricas estão relacionadas entre si, situação na qual uma das variáveis é dependente da outra, não implicando em relações de causa e efeito. Colocadas em gráfico, a variável dependente é o eixo do y; a independente é o eixo do x, dizemos então regressão de y sobre x, sempre a variável dependente sobre a independente. Na sua forma simples, a regressão linear tem a relação funcional  $y_i = a + bx$ ; a = constante da regressão, b = coeficiente da regressão (inclinação da reta). Análises de regressão, com uma ou mais retas, são extremamente úteis na pesquisa biológica, para verificar relações entre caracteres morfológicos (proporções corporais ou estruturas de plantas), várias relações entre parâmetros fisiológicos e ambientais, efeito de drogas, modelos dose-dependente e probit (DL50), permitindo predizer valores de y dentro da amplitude dos dados (Vanzolini, 1993; Fisher, 1946). A significância da regressão é verificada através de uma análise de variância; na forma simples nos dá a variação total, variação devida à regressão, com 1 grau de liberdade e a variação sobre a regressão (erro) com n-2 graus de liberdade. Se a regressão for significativa, a variância devida à regressão será significativamente maior do que a variância sobre a regressão; o quociente entre estas é um teste de F. Podemos verificar também, qual porcentagem da variação total é explicada pela regressão, através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), uma medida de quanto uma variável participa na variância da outra. No caso de várias retas, verificamos também as diferenças entre duas retas e a homogeneidade entre mais de duas retas. Nos casos em que a regressão não conforma uma linha reta, podemos usar de anamorfoses para “ajustes”, utilizando transformações logarítmicas do tipo  $\log x - \text{arit } y$ ,  $\text{arit } x - \log y$  e  $\log x - \log y$ .

Questões envolvendo correlação entre duas variáveis geométricas (paramétrico) ou duas ordinais ou uma ordinal e outra geométrica (não-paramétrico)

são comuns na pesquisa biológica, embora não permitam conclusões sobre causa e efeito. O coeficiente de correlação é a raiz quadrada do coeficiente de determinação da regressão linear, a covariação entre duas variáveis. Dois ou mais coeficientes de correlação podem ser comparados; testes semelhantes ao de Tukey para comparações múltiplas podem ser utilizados para comparar pares de coeficientes entre si.

No caso de termos duas ou mais variáveis categóricas (nominais), utilizamos as tabelas de dupla entrada formando células que contêm as freqüências esperadas e observadas, com o objetivo de verificar associações e homogeneidades entre as categorias (por exemplo, numa tabela 2 x2 teremos 4 categorias). Estas verificações são extremamente úteis na pesquisa biológica, o critério é a distribuição qui-quadrado, introduzida por Karl Pearson e expandida por ele e R.A.Fisher (Zar, 1996). Os testes medem o ajustamento (ou distância) entre as freqüências esperadas e observada. O teste G (Wilks), para várias linhas e colunas, o teste exato de Fisher, para expectativas pequenas ( $< 5$ ) e o teste de Kolmogorov-Smirnov são dos mais utilizados.

Outras distribuições, importantes em estudos ecológicos, são (Zar, 1996): a distribuição binomial, que considera proporção de indivíduos em duas categorias, p e q, de modo que  $q = 1 - p$ ; a distribuição de Poisson, para verificar a distribuição espacial de indivíduos na população, caracterizada pela hipótese nula média igual à variância - distribuição ao acaso (Vilar *et.al*, 2000); a distribuição circular, importante nos estudos sobre orientação em aves. Para todos estes paramétricos há os análogos não paramétricos. Existem bons textos sobre estatística para estudos ecológicos, nós sugerimos Abuara & Petrere (1997), Brower & Zar (1997) e Hairston (1994).

## REFERÊNCIAS

Abuara, M.A.P. & M. Petrere, Jr. 1997. **Estimativas da**

- abundância de populações animais. Introdução às técnicas de captura e recaptura.** Editora da Universidade Estadual de Maringá/Nupelia, Maringá, Pr. 161 p.
- Brower, J.E., J.H.Zar & C.N.Ende, 1997. **Field and laboratory methods for general ecology.** 4th. ed. WCB/McGraw-Hill 273 p.
- Fearnside, P.M. 1986. **Human carrying capacity of the Brazilian rainforest.** Columbia Univ. Press, New York 293 p.
- Fisher, R.A. 1946. **Statistical methods for research workers.** Oliver and Boyd, Edinburgh, London 354p.
- Hurlbert, S.H. 1984. **Pseudoreplication and the design of ecological field experiments.** Ecological Monographs 54 (2): 187-211.
- Hairston, N.G.1994. **Ecological Experiments. Purpose, design and execution.** Cambridge Univ. Press 370 p.
- Hayek, L.C.1994. Research design for quantitative amphibian studies, pp. 21 – 39. *In: Measuring and monitoring biological diversity. Standards methods for amphibians.* (W.R.Heyer, M.A.Donnely, R.W.McDiarmid, L.A. & M.S.Foster, Eds.). Smithsonian Inst. Press 364 p.
- Siegel, S. 1977. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento.** McGraw-Hill do Brasil, São Paulo 350p.
- Stevens, S.S. 1946. On the theory of scales measurement. **Science** 103:677-680.
- Zar, J.H. 1996. **Biostatistical analysis.** 3rd.ed. Prentice Hall, New Jersey 662p + Tabs.
- Vanzolini, P.E. 1993. **Métodos estatísticos elementares em sistemática zoológica.** Hucitec, São Paulo 130p.
- Vilar, J.C., N.A.C.Ziengier & C.M.Carvalho, 2000. Distribuição espacial de *Vellozia dasypus* Semberg (Velloziaceae) e *Melocactus zehntneri* (Britt et Rose) Lützelb (Cactaceae) na Serra de Itabaiana, Sergipe. **Biol. Geral Exper.** 1(1): 5 – 15.

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES:** *Biologia Geral e Experimental* é uma publicação semestral da Universidade Federal de Sergipe, publica manuscritos originais de todas as áreas da biologia geral e experimental. Os manuscritos devem ser enviados em **três vias** datilografadas em espaço duplo. A **primeira página** deve conter o título, nome(s) do(s) autor(es), instituição, número de figuras e tabelas, palavras-chave (até 5), título abreviado para cabeça de páginas, nome e endereço do autor para correspondência. A **segunda página** deve conter Resumo e Abstract. As **páginas seguintes** devem conter os itens Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Agradecimentos nesta ordenação quando possível. Notas de rodapé deverão ser evitadas. Nas **citações** devem ser utilizadas letras minúsculas sem destaque. As **referências** deverão conter sobrenome e iniciais dos autores citados, ano, título, nome da revista abreviado e em destaque, volume, número, primeira e última páginas. *Exemplo:* Fisher, R.A. & B.Balmukand, 1928. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. **J. Genet.** 20:79-92. Citações de artigos de livros deverão ser mais completas. *Exemplo:* Elliot, W.B. 1978. Chemistry and immunology of reptilian venoms, p. 163-436. *In:* **Biology of the Reptilia** (C.Gans & K.A.Gans, Eds.). Academic Press, London and New York 782 p. **Tabelas, gráficos e figuras** devem ser apresentadas separadamente, com indicações no texto onde deverão ser inseridos. A Redação da revista se encarregará da primeira revisão das provas, a revisão final será responsabilidade dos autores.

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS:** *Biologia Geral e Experimental* is a bi-annual publication of the Universidade Federal de Sergipe, meant to publish original manuscripts in all areas of the experimental and general biology. Manuscripts should be sent in three typewritten double spaced copies. The **first page** should contain the title, name(s) of the author(s), number of figures and tables, key words (up to 5), abbreviated title for running heads, name and address of the author for correspondence. The **second page** should contain the abstract. The **following pages** should contain the items Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Acknowledgements in that order when possible. Footnotes should be avoided. **Citations** should be in low case. **References** should first contain the last name followed by the initials of the authors, title, abbreviated name of the journal, volume, number, first and last pages. *Example:* Fisher, R.A. & B.Balmukand, 1928. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. **J. Genet.** 20:79-92. Citations of articles in books should be complete. *Example:* Elliot, W.B. 1978. Chemistry and immunology of reptilian venoms, p. 163-436. *In:* **Biology of the Reptilia** (C.Gans & K.A.Gans, Eds.). Academic Press, London and New York 782 p. **Tables, graphs and figures** should be presented separately, with indications in the text for inclusion. The staff of the journal (Redação) will make the first revision of the drafts; the final revision will be the authors' responsibility.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
AV. MARECHAL RONDON S/N - JARDIM ROSA ELZE  
SÃO CRISTÓVÃO - SE. 49100-000