

ISSN 0102-9568

# Bioikos

Volume 26 | Número 1  
Janeiro - Junho • 2012



## BIOIKOS

Revista semestral da Faculdade de Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Fundada em 1987, publica trabalhos científicos originais, artigos de revisão e comunicações científicas relacionados às diversas áreas da Biologia, em especial Ambiental e Educação, da comunidade nacional e internacional.

BIOIKOS is a biannual journal of the Biological Sciences School of the Life Sciences Center, Pontifícia Universidade Católica de Campinas. It was founded in 1987 and publishes from Brazil and around the world original scientific studies, review articles and scientific communications related to many areas of Biology, mainly Environmental and Education.

## COLABORAÇÕES / CONTRIBUTIONS

Os manuscritos (um original e três cópias) devem ser encaminhados ao Núcleo de Editoração SBI e seguir as "Instruções aos Autores", publicadas no final de cada fascículo.

All manuscripts (the original and three copies) should be sent to the Núcleo de Editoração SBI and should comply with the "Instructions for Authors", published at the end of each issue.

## ASSINATURAS / SUBSCRIPTIONS

Pedidos de assinatura ou permuta devem ser encaminhados ao Núcleo de Editoração SBI.

E-mail: sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br

Anual: Pessoas físicas: R\$40,00 Institucional: R\$120,00  
Aceita-se permuta

Subscription or exchange orders should be addressed to the Núcleo de Editoração SBI.

E-mail: sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br

Annual: Individual rate: R\$40,00 Institutional rate: R\$120,00  
Exchange is accepted

## CORRESPONDÊNCIA / CORRESPONDENCE

Toda a correspondência deve ser enviada à Bioikos no endereço abaixo:

All correspondence should be sent to Bioikos at the address below:

Núcleo de Editoração SBI

Av. John Boyd Dunlop, s/n., Prédio de Odontologia, Jd. Ipaussurama  
13060-904, Campinas, SP, Brasil.

Fone +55-19-3343-6876/6859 Fax +55-19-3343-6875

E-mail: sbi.ne\_biomed@puc-campinas.edu.br

Web: <http://www.puc-campinas.edu.br>

## INDEXAÇÃO / INDEXING

Aquatic Sciences & Fisheries Abstracts (ASFA), CAB Abstracts and Global Health, Periódica

## LISTA QUALIS

B-3

## Editora / Editor

Profa. Dra. Luciane Kern Junqueira (PUC-Campinas)

## Editores Associados / Associate Editors

### Botânica

Profa. Dra. Kayna Agostini (Unimep - Piracicaba)

### Ecologia e Meio Ambiente

Profa. Dra. Viviane Gianluppi Ferro (UFG - Goiânia)

### Zoologia

Prof. Dra. Cristina Sazima (Unicamp - Campinas)

### Oceanografia Biológica

Prof. Dr. Guilherme Nascimento Corte (Unicamp - Campinas)

## Editora Executiva / Executive Editor

Maria Cristina Matoso (SBI-PUC-Campinas)

## Conselho Editorial / Editorial Board

Prof. Dr. Adauto Ivo Milanez (Instituto de Botânica - São Paulo)

Profa. Dra. Ana Lúcia Vendel (UFPP - João Pessoa)

Profa. Dra. Carminda da Cruz-Landim (Unesp - Rio Claro)

Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna (Instituto de Botânica - São Paulo)

Prof. Dr. Edmundo Ferraz Nonato (USP - São Paulo)

Profa. Dra. Eunice da Costa Machado (UFPR - Pontal do Paraná)

Profa. Dra. Giovana Radomille Tofoli (Universidade São Francisco - Bragança Paulista)

Prof. Dr. José Roberto Miranda (Embrapa - Campinas)

Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura (PUC-Campinas)

Profa. Dra. Olga Yano (Instituto de Botânica - São Paulo)

Profa. Dra. Paula Maria Gênova de Castro (Instituto de Pesca - São Paulo)

Prof. Dr. Paulo de Tarso da Cunha Chaves (UFPR - Curitiba)

Prof. Dr. Vadim Viviani (UFSCar - Sorocaba)

Profa. Dra. Virginia Sanches Uieda (Unesp - Petrucatu)

Prof. Dr. Wesley Rodrigues Silva (Unicamp - Campinas)

## Normalização e Indexação / Standardization and Indexing

Maria Cristina Matoso

## Equipe Técnica

### Bibliotecária

Janete Gonçalves de Oliveira Gama

### Apoio Administrativo

Tatiane Aparecida da Silva

### Assistente de Editoração

Maria Angélica Miranda Bosso

O Conselho Editorial não se responsabiliza por conceitos emitidos em artigos assinados.

The Board of Editors does not assume responsibility for those opinions expressed in signed articles.

A eventual citação de produtos e marcas comerciais não expressa recomendação do seu uso pela Instituição.

The possible citation of products and brands does not express recommendation of the Institution for their use.

Copyright ©Bioikos

É permitida a reprodução parcial desde que citada a fonte. A reprodução total depende da autorização da Revista.

Partial reproduction is permitted if the source is cited. Total reproduction depends on the authorization of Bioikos.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas e Informação – SBI-PUC-Campinas

Bioikos. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências da Vida. Faculdade de Ciências Biológicas. – Campinas, SP, v.1 n.1 (jan./jun.1987-)

v.26 n.1 jan./jun. 2012

Semestral

Resumo em Português e Inglês

ISSN 0102-9568

1. Biologia – Periódicos. I. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências da Vida. Faculdade de Ciências Biológicas.

CDD 574



## Artigos | Articles

**Ambiental | Environmental**

- 3 *Water quality of urban streams, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, based on physical, chemical and biological analyses*  
Qualidade da água de arroios urbanos de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, com base em análises físicas, químicas e biológicas  
• Marília Schuch, Edson Fiedler de Abreu Júnior, Eduardo Lobo Alcayaga
- 13 *Validation of daily growth increments of statoliths of Brazilian squid Doryteuthis plei and D. sanpaulensis (Cephalopoda: Loliginidae)*  
Validação de incrementos de crescimento diário dos estatólitos das lulas brasileiras *Doryteuthis plei* e *D. sanpaulensis* (Cephalopoda: Loliginidae)  
• Daniela Cordella de Aguiar, Carmen Lucia Del Bianco Rossi-Wongtschowski, José Angel Alvarez Perez
- 23 *Biologia de Tetranychus mexicanus (McGregor) (Acari: Tetranychidae) em folhas de Pupunha (Bactris gasipaes Kunth)*  
*Life-history of the Tetranychus mexicanus (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on leaves of the Pupunha or Peach-palm (Bactris gasipaes Kunth)*  
• César Pagotto Stein, Núbia Daólio

**Recursos Pesqueiros | Fishing Resources**

- 29 *A pesca esportiva e o pesque-e-solte: pesquisas recentes e recomendações para estudos no Brasil*  
*Recreational fishing and catch-and-release: recent studies recommendations for studies carried out in Brazil*  
• Paulo de Tarso Chaves, Kátia Meirelles Felizola Freire
- 35 *Atividade alimentar do pacu Piaractus mesopotamicus Holmberg (1887) criados em tanques rede*  
*Feeding activity of the pacu Piaractus mesopotamicus Holmberg (1887) reared in fish cages*  
• Fabrício José Ferreira, Carlos Alberto da Silva

**Biologia Molecular | Molecular Biology**

- 43 *Deteção do polimorfismo gln604glu no Gene Abcg5 em um grupo de indivíduos de São Roque (São Paulo/Brasil) e correlação com parâmetros do perfil lipídico*  
*Detection of the gln604glu polymorphism in the gene Abcg5 in a group of individuals from the city of São Roque (São Paulo/Brazil) and the correlation with lipid profile parameters*  
• Diego Baratelli, Suely Capps Fernandes, Sidney Fernandes, Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos, Renata de Lima
- 51 *Instruções aos autores | Instructions for Authors*



ARTIGO | ARTICLE

## Water quality of urban streams, *Santa Cruz do Sul*, *Rio Grande do Sul*, Brazil, based on physical, chemical and biological analyses

*Qualidade da água de arroios urbanos de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil,  
com base em análises físicas, químicas e biológicas*

Marilia Schuch<sup>1</sup>

Edson Fiedler de Abreu Júnior<sup>1</sup>

Eduardo Lobo Alcayaga<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The purpose of the study was to evaluate the water quality of urban streams in *Santa Cruz do Sul*, in the Brazilian state of *Rio Grande do Sul*, using physical, chemical and microbiological parameters. Eight sampling sites were distributed over the upper and lower reaches of four streams. Four sampling campaigns were carried out, two in 2007 and two in 2008. The parameters analyzed were: temperature, pH, turbidity, dissolved oxygen, biochemical oxygen demand, nitrate, ammonia nitrogen, phosphate, total dissolved solids and thermotolerant coliforms. Simultaneously, epilithic diatom samples were collected, the species identified and the respective relative abundance determined. The assessment of water quality was performed applying resolution 357/2005 of the National Environment Council, and the Biological Water Quality Index. The results indicated that the streams are polluted by organic contamination and show advanced stages of eutrophication, mainly in the lower reaches, and are classified according to the National Environment Council resolution as "Class 4", corresponding to poor water quality. The results of the Biological Water Quality Index ranged from "strong" to "very strong" in most sampling sites, highlighting *Cyclotella meneghiniana*, *Fallacia monoculata*, *Nitzschia palea* and *Sellaphora pupula* as the species most tolerant to eutrophication. Two sampling groups were separated by using cluster analysis, one containing the points in the upper reaches and the other the points in the lower reaches, having 38% quantitative similarity in diatom community composition. This similarity can be explained by the fact that some of the abundant species

<sup>1</sup> Universidade de Santa Cruz do Sul, Laboratório de Limnologia. Av. Independência, 2293, Universitário, 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil. Correspondence to/Correspondência para: E.A. LOBO, E-mail: <lobo@unisc.br>.



tolerant to organic pollution and eutrophication, occurred in both the upper and lower reaches.

**Key words:** Urban streams. Epilithic diatoms. Organic pollution. Eutrophication.

## RESUMO

*Este estudo objetivou avaliar a qualidade da água de arroios urbanos, em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, utilizando parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Oito sítios de amostragem distribuíram-se nos trechos superiores e inferiores de quatro arroios. Duas amostragens foram realizadas em 2007 e duas em 2008. Foram analisados: temperatura, pH, turbidez, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, nitratos, nitrogênio amoniacal, fosfato, sólidos totais dissolvidos e coliformes termotolerantes. Simultaneamente, amostras de diatomáceas epilíticas foram coletadas, as espécies identificadas e as abundâncias relativas determinadas. Fez-se a avaliação da qualidade da água utilizando-se como parâmetro a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente e aplicando-se o índice biológico de qualidade da água. Os resultados indicaram que os arroios estão poluídos por contaminação orgânica apresentando avançados estágios de eutrofização, principalmente nos trechos inferiores, enquadrando-se na "Classe 4" de acordo com a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente, correspondendo a águas de má qualidade. Os resultados do índice biológico de qualidade da água variaram do nível "forte" a "muito forte" na maioria dos pontos de amostragem, destacando-se: *Cyclotella meneghiniana*, *Fallacia monoculata*, *Nitzschia palea* e *Sellaphora pupula* como as espécies mais tolerantes à eutrofização. Dois grupos de amostras foram separados através da análise de agrupamento, um contendo os pontos dos trechos superiores e o outro os pontos dos trechos inferiores, havendo 38% de similaridade quantitativa na composição da comunidade de diatomáceas. Tal similaridade pode ser explicada pelo fato de algumas das espécies abundantes e tolerantes à poluição orgânica e eutrofização ocorrerem tanto nos trechos superiores quanto inferiores.*

**Palavras-chave:** Arroios urbanos. Diatomáceas epilíticas. Poluição orgânica. Eutrofização.

## INTRODUCTION

Concerns about water are of particular interest, given its fundamental role in regulating biological processes and the health of human populations. Currently, however, the idea that water treatment can solve all problems has changed to a more efficient management of water sources, thus reducing the costs of treating and preserving the resources for the future. Within this framework, the monitoring of water quality is currently an important tool for environmental evaluation (Tundisi, 2000).

The assessment of water quality encompasses the physical, chemical and biological approaches (Lobo & Callegaro, 2000). Physical and chemical monitoring only permits snapshot measurements,

therefore restricting the knowledge of water conditions to the period when the measurements were taken. These limitations take on even more gravity when the object of the study is a lotic system where the current promotes the continuous renewal of water in each location. Biological monitoring provides a direct measure of ecological integrity by using the response of biota to environmental changes. This allows long-term environmental effects to be detected because of the capacity to reflect conditions that are not present at the time of sample and analysis. Moreover, studies of these communities provide a continuous record of the environmental quality, showing changes in the natural or anthropogenic processes (Gold et al., 2002). Physical and chemical methods are, however, complimentary to

biological methods, contributing to the correct assessment of the quality of running waters (Lobo *et al.*, 2004a).

Different taxonomic groups have been used in the assessment of water quality, especially the epilithic diatom community which is recognized as a potential indicator of contamination and has been recommended as particularly suitable in assessing water quality, due to the sensitivity of the species in relation to a variety of ecological conditions such as pH, salinity, organic matter and eutrophication (Round, 1991; Kelly & Whitton, 1995; Lobo *et al.*, 2002, 2004a; Ector & Rimet, 2005). In Brazil, however, only a few studies have been carried out using this group of algae as bioindicators, and mainly in the Southern region (Oliveira *et al.*, 2001; Lobo *et al.*, 2002; Lobo *et al.*, 2004a; Lobo *et al.*, 2004b; Lobo *et al.*, 2004c; Lobo *et al.*, 2010; Wetzel *et al.*, 2002; Hermany *et al.*, 2006; Salomoni *et al.*, 2006; Dupont *et al.*, 2007; Schneck *et al.*, 2007).

In this context, the main purpose of the present study was to evaluate the water quality of streams located in the urban area of *Santa Cruz do Sul*, in the Brazilian state of *Rio Grande do Sul*, using physical, chemical and biological methods.

## MATERIAL AND METHODS

### Study Area

The city of *Santa Cruz do Sul* is located in the *Pardinho* River Sub-basin, one of the main tributaries that make up the *Pardo* River Hydrographic Basin, in the state of *Rio Grande do Sul*. Inside the urban area, four main streams were selected and eight sampling sites were distributed along the streams; they were named *Lajeado* (S1 and S2), *Preto* (S3 and S4), *Pedras* (S5 and S6) and *Lewis-Pedroso* (S7 and S8), where S1, S3, S5 and S7 were located on the upper reaches and S2, S4, S6 and S8 in the lower reaches (Figure 1).

### Data collection

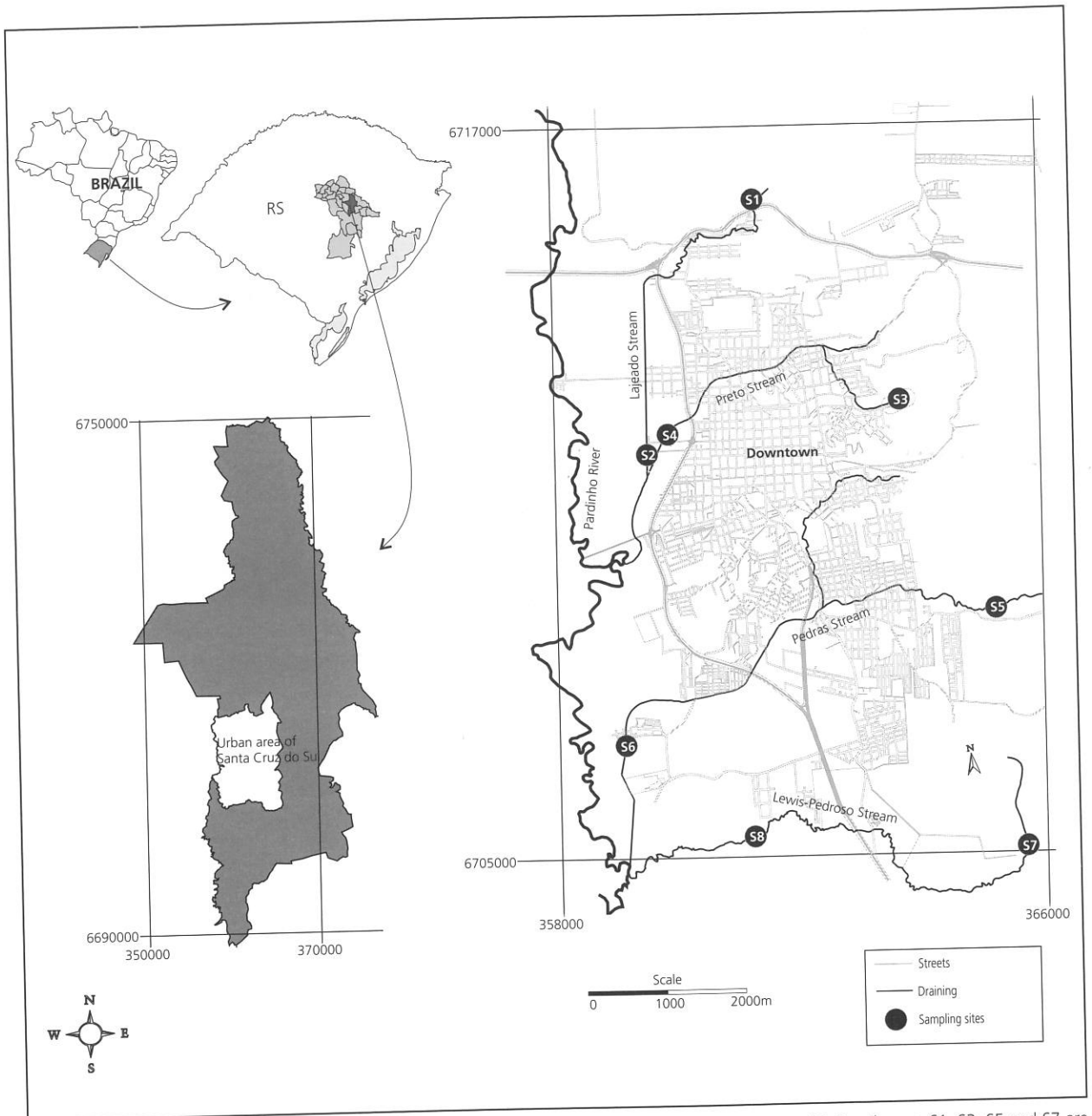
Four seasonal sampling campaigns were carried out in these streams, two in 2007 (August

and November) and two in 2008 (February and May). The physical, chemical and microbiological parameters analyzed were: water temperature, pH, turbidity, dissolved oxygen, biochemical oxygen demand after five days, nitrates, ammonia nitrogen, phosphate, total dissolved solids and thermotolerant coliforms. The water temperature was measured in the field using a mercury thermometer. For other parameters, samples were collected at the surface using glass bottles, with a capacity of between 300mL and 1000mL, and packed in coolers. The techniques used in the collection and sample analyses for physical, chemical and microbiological measurements are described in American Public Health Association (2005).

Simultaneously, epilithic diatoms were collected at the eight sampling sites. For qualitative and quantitative analysis, diatom samples were scrubbed off the upper surface of between three and five submerged stones, 10 to 20cm in diameter, using a toothbrush, and were fixed with formalin following the method employed by Kobayasi & Mayama (1982). Diatom samples were cleaned with sulfuric and hydrochloric acids and mounted on permanent slides with Naphrax. All specimens found in random transects under light microscopy through the prepared permanent slides were identified and counted up to a minimum of 600 valves using an Olympus BX-40 microscope. For the identification of species, the following taxonomic references were used: Metzeltin & Lange-Bertalot (1998, 2007), Rumrich *et al.* (2000), Metzeltin & García-Rodríguez (2003) and Metzeltin *et al.* (2005). To determine the abundant and dominant species, the Lobo & Leighton (1986) criterion was used. Voucher samples were stored in the DIAT-UNISC Herbarium at the *Universidade de Santa Cruz do Sul* (RS), Brazil.

### Data analysis

Based on the physical, chemical and microbiological data, the assessment of stream water quality was performed applying resolution 357 of the National Environment Council (Brazil, 2005). With



**Figure 1.** Location of the study area and the eight sampling sites (S1 - S8), in Santa Cruz do Sul county, RS, Brazil, were S1, S3, S5 and S7 are sampling stations of the upper reaches and S2, S4, S6 and S8 of the lower reaches.

regard to the biological analyses, the assessment of water quality was performed applying the Water Quality Biological Index (WQBI), based on the diatom classification for southern Brazilian rivers proposed by Lobo *et al.* (2004a). The environmental and biological data were standardized, utilizing the mathematical transformation  $(\ln + 1)$ , in order to

make a distinction between groups, based on the quantitative similarity of sampling sites in different sampling periods. The Bray-Curtis index was utilized as the distance coefficient for Cluster analysis, following Ludwig & Reynolds (1988). All the analyses were calculated using the Past software application, version 1.81 (Hammer *et al.*, 2008).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physical, chemical and microbiological variables

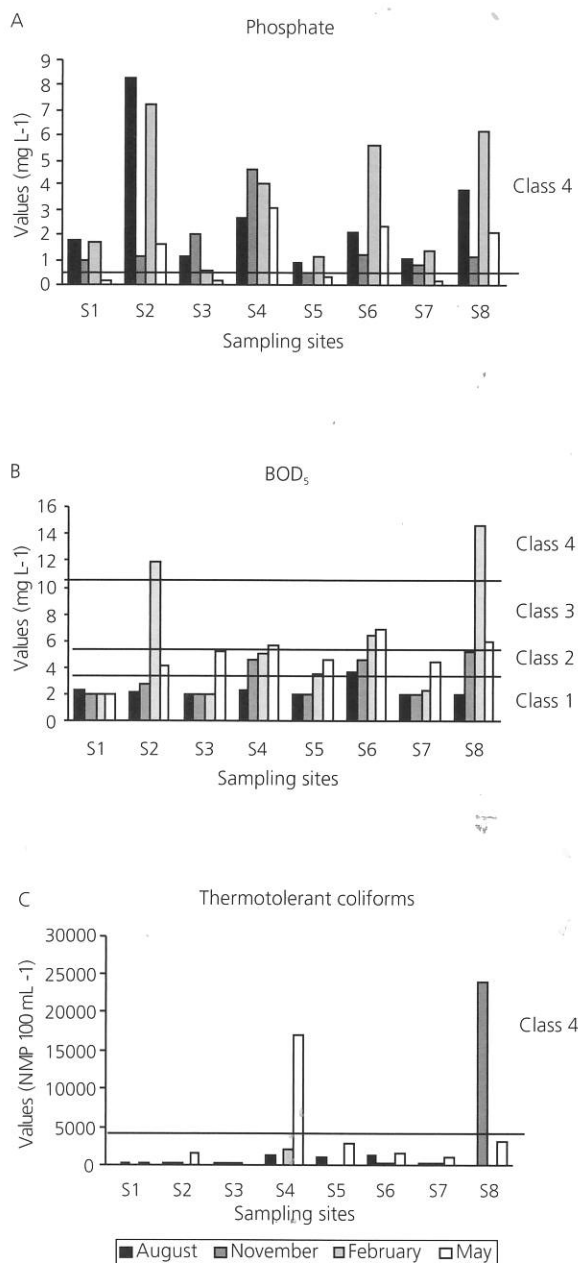
Overall, high values of phosphate, BOD<sub>5</sub> and thermotolerant coliforms were observed, these being the main parameters used to classify stream water quality. As can be seen in Figure 2(A), the results for phosphate concentration showed that almost all sampling sites were classified in "Class 4" (Brazil, 2005), corresponding to the poorest water quality level, used only for navigation and harmonizing landscapes, ranging between 0.28 and 8.31 mg L<sup>-1</sup>, except the points S1, S3 and S7, which were classified as "Class 3", in the May sampling (values ranged between 0.12 and 0.15 mg L<sup>-1</sup>). The high phosphate values were found at sampling stations in the lower reaches. Phosphorus is recognized as the main reason for eutrophication caused by diffuse or point sources that deteriorate the water quality, making it even unsuitable for human consumption (Tundisi & Tundisi, 2008). The high phosphate concentrations observed are probably related to the discharge of untreated domestic sewage and diffuse loads emanating from the rural and industrial areas of *Santa Cruz do Sul*.

The results for biochemical oxygen demand after 5 days (Figure 2B) indicated that S2 and S8 were classified in "Class 4", in the February sampling, as well as the points S2, S4 and S8, where the values obtained for dissolved oxygen ( $1.9 \pm 1.0$  mg L<sup>-1</sup>) corresponded to the same quality classification, indicating that these points contain high loads of organic pollution.

The results for thermotolerant coliforms (Figure 2C) indicated that points S8 in November and S4 in May, were also classified as "Class 4". The high values of thermotolerant coliforms indicate fecal contamination by domestic sewage and may also indicate the presence of pathogens that can affect the health of the population (Magalhães-Junior, 2007).

The results showed that the urban streams of the city of *Santa Cruz do Sul* are heavily polluted by organic contamination and show advanced stages of eutrophication, particularly the sampling sites S2,

S4 and S8, all of which are in the lower reaches, as indicated mainly by high values of phosphate, BOD<sub>5</sub> and thermotolerant coliforms.



**Figure 2.** Values for total phosphate (A), BOD<sub>5</sub> (B) and thermotolerant coliforms (C), in the eighth sampling sites (S1 - S8), in *Santa Cruz do Sul* county, RS, Brazil, at four seasons, two in 2007 (August and November) and two in 2008 (February and May), were S1, S3, S5 and S7 are sampling stations of the upper.

These results corroborate studies of environmental monitoring in regional water systems in the state of *Rio Grande do Sul*, Brazil, which have demonstrated that they already have very advanced states of eutrophication and organic pollution (Torgan et al., 1999; Rodrigues & Lobo, 2000; Oliveira et al., 2001; Lobo et al., 2002, Lobo et al., 2003; Lobo et al., 2004a; Lobo et al., 2004b; Lobo et al., 2004c; Lobo et al., 2004d; Lobo et al., 2010; Wetzels et al., 2002; Hermans et al., 2006; Salomoni et al., 2006; Dupont et al., 2007; Schneck et al. 2007).

### Biological composition

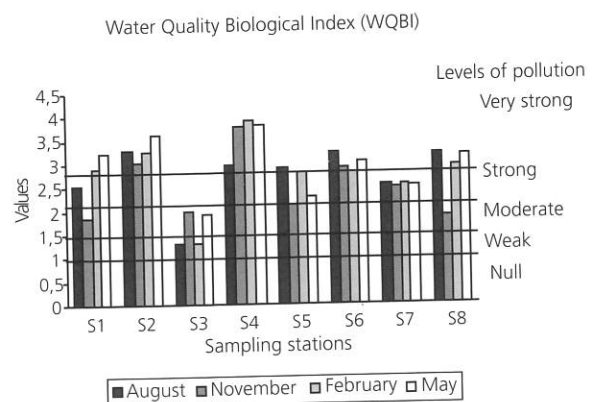
As for the composition of the epilithic diatom community, 203 species were identified to specific and infra-specific levels, distributed across 45 genera. A total of 53 taxa were considered to be abundant species (Lobo & Leighton, 1986). The BWQI results (Figure 3) indicated that the water quality levels range from "strong" (25.0%) to "very strong" (53.1%) in all sampling sites, except at the points S1, S3 and S8 where the pollution level was considered "moderate" (15.6%) in November and May. Point S3, in August and February, showed a pollution level considered "weak" (6.3%).

The highest pollution levels were found at the sampling sites S2, S4, S6 and S8, all of these located in the lower reaches, corroborating the results obtained through the physical, chemical and microbiological variables. These samples showed strongly to very strongly polluted waters. According to Lobo et al. (2004a), the high pollution levels determined using the BWQI are due to the occurrence of species tolerant to organic pollution and eutrophication, which showed high percentages of relative abundance such as *Achnanthes exiguum* var. *constrictum* (Grunow) Andresen, Stoermer and Kreis, *Adlafia drouetiana* (Patrick) Metzeltin and Lange-Bertalot, *Cyclotella meneghiniana* Kützing, *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot, *Fallacia monoculata* (Hustedt) Mann, *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing, *Luticola goeppertiana* (Bleisch) Mann, *Mayamaea atomus* (Kützing) Lange-Bertalot,

*Navicula cryptotenella* Lange-Bertalot, *N. symmetrica* Patrick, *Nitzschia palea* (Kützing) Smith, *Sellaphora pupula* (Kützing) Mereschkowsky in the strictest sense and *S. seminulum* (Grunow) Mann.

Among these taxa, *C. meneghiniana*, *F. monoculata*, *N. palea* and *S. pupula* were regarded as the species most tolerant to eutrophication according to Lobo et al. (2010), in a study carried out in the Pardo River Hydrographic Basin. *F. monoculata* was also considered by Souza & Senna (2009) as extremely tolerant to eutrophication and organic pollution.

According to Lobo et al. (2004a), *N. palea* is classified as one of the most tolerant species to organic pollution and eutrophication, indicative of polysaprobic conditions. This taxon has been recognized as a cosmopolitan species extremely tolerant to pollution (Watanabe et al., 1988; Kobayasi & Mayama, 1989; Round, 1991; Gomez, 1998). Moreover, van Dam et al. (1994) argue that *N. palea* corresponds to a polysaprobic species indicative of hypereutrophic conditions, and Bruno et al. (2003), working with planktonic diatom communities in the region of the *Quarto River, Argentina*, confirmed the validity of *N. palea* as an indicator of waters impacted by a high nutrient load.



**Figure 3.** Assessment of water quality using the Water Quality Biological Index (WQBI), with the respective levels of pollution, in the eighth sampling sites (S1 - S8), in *Santa Cruz do Sul* county, RS, Brazil, at four seasons, two in 2007 (August and November) and two in 2008 (February and May), where S1, S3, S5 and S7 are sampling stations of the upper reaches and S2, S4, S6 and S8 of the lower reaches.



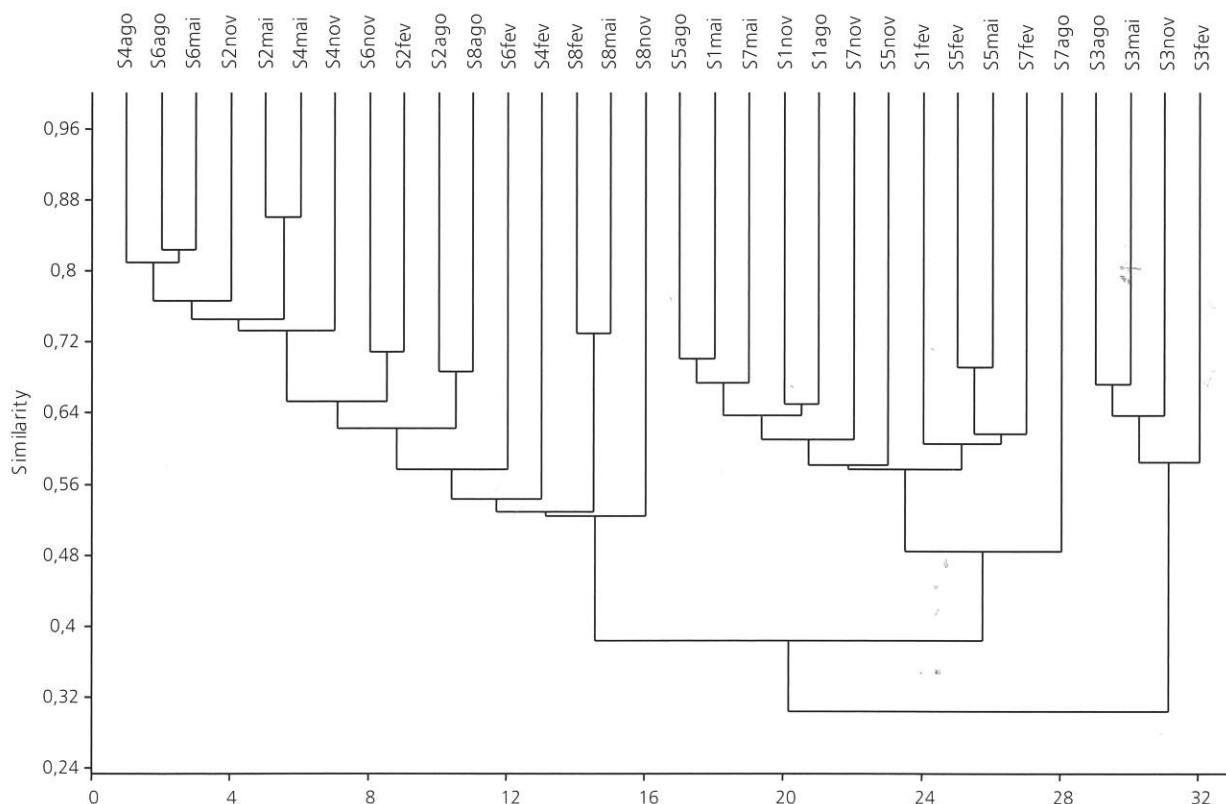
The sampling point S3 showed the lowest pollution level "Weak", although limited to August and February, and representing only 6.3% of the total pollution levels detected. In this case, most of the species that were considered abundant are sensitive to pollution (Lobo et al. 2004a), thus being responsible for the low BWQI values obtained. They are *Achnanthes rupestoides* Hohn, *Cocconeis placentula* var. *acuta* Meister, *Gomphonema pumilum* (Grunow) Reichardt and Lange-Bertalot, *Nupela lesothensis* (Schoeman) Lange-Bertalot, *N. praecipua* (Reichardt) Reichardt, *Planothidium biporumum* (Hohn & Hellerman) Lange-Bertalot and *Placoneis ovillus* Metzeltin, Lange-Bertalot and García-Rodríguez.

Some of these taxa have been classified as sensitive to organic pollution and/or eutrophication. According to van Dam et al. (1994), *A. rupestoides*

has a preference for oligotraphentic and oligosaprobic environments, as well as *P. biporumum* for oligotraphentic conditions. *C. placentula* var. *acuta* showed high relative abundance in oligotraphentic and mesotraphentic environments (Schneck et al., 2007).

The dendrogram in Figure 4 clearly shows this biological condition, separating by cluster analysis the sampling station S3, highlighting *A. rupestoides* as abundant taxa in all periods and *P. ovillus* as dominant in February, from other stations which were separated into two groups; the stations of the upper reaches (S1, S5, S7), and the stations of the lower reaches (S2, S4, S6, S8), in all sampling periods.

The environmental and biological data were analyzed together by Cluster analysis, as shown in the dendrogram in Figure 5. Again, two groups of sampling sites are separated, one containing the points



**Figure 4.** Cluster analysis based on biological data, in the eighth sampling sites (S1 - S8), in Santa Cruz do Sul county, RS, Brazil, at four seasons, two in 2007 (August and November) and two in 2008 (February and May), where S1, S3, S5 and S7 are sampling stations of the upper reaches and S2, S4, S6 and S8 of the lower reaches.

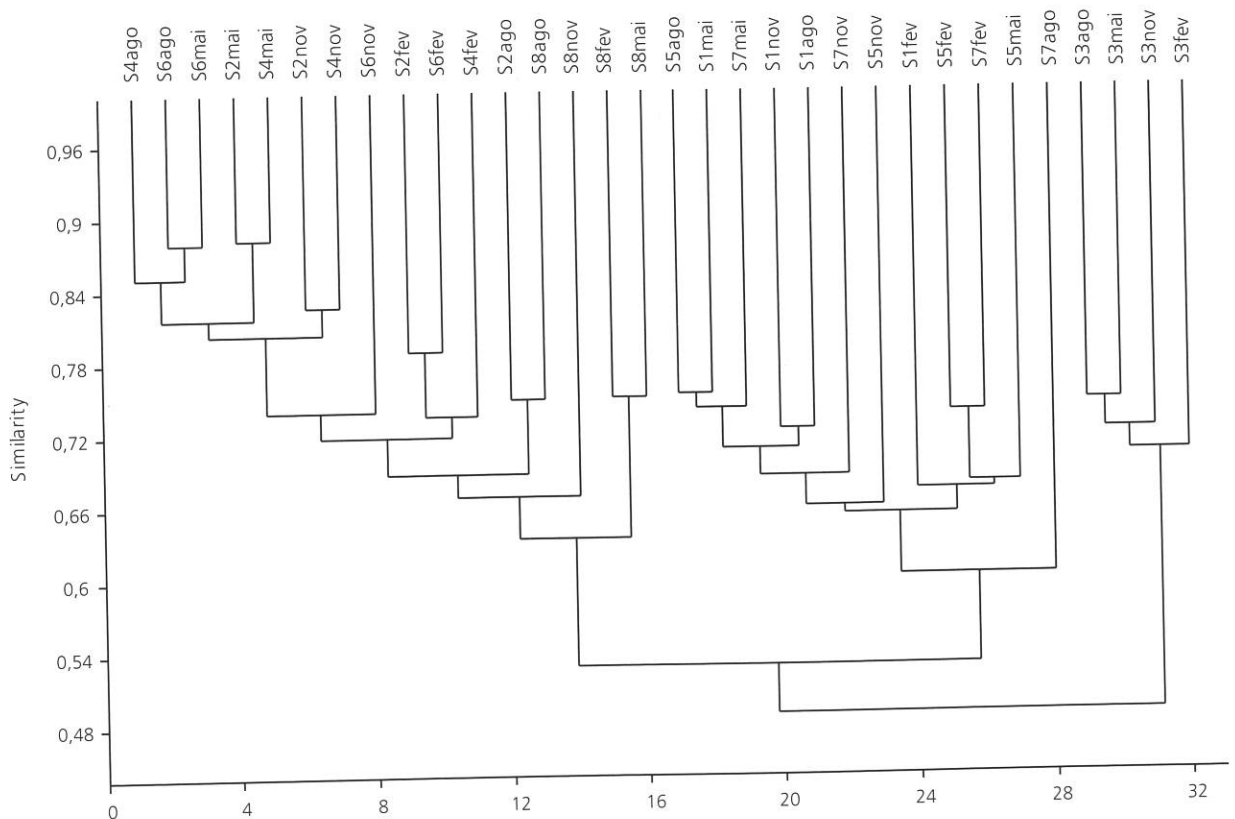
in the upper reaches in all sampling periods (S1, S5, S7), excepting S3, and the second containing the points in the lower reaches, in all periods (S2, S4, S6, S8). Similarly to the results shown in Figure 4 for biological data, the sampling site S3, in all sampling periods, was again separated, forming a single group, primarily because the diatom composition was different when compared to other sampling sites in relation to the pollution tolerance of species.

This clustering can be explained mainly by considering that the sampling sites in the lower reaches are characterized by the highest levels of pollution, as indicated by the environmental conditions, i.e. highest values of phosphate, BOD<sub>5</sub> and thermotolerant coliforms. The diatom composition corroborated this grouping; however, as shown in Figure 4, there is a 38% quantitative similarity between these two groups, as indicated by the Bray-Curtis index. This condition can be explained because

some of the abundant species that were tolerant to highly polluted environmental conditions occurred in both the upper and lower reaches. This was the case for *C. meneghiniana*, *E. minima*, *F. monoculata*, *G. parvulum*, *N. cryptotenella*, *N. palea*, *S. seminulum* and *S. pupula* (Krammer & Lange-Bertalot 1986; van Dam et al., 1994; Lobo et al., 2002, 2004a).

## CONCLUSION

These results highlight that, in spite of the higher pollution levels detected at the sampling sites in the lower reaches, those located in the upper reaches are also contaminated, suggesting that although the sites are located in the upper part of the streams, nowadays they are receiving a significant pollution load, probably originating from local domestic and agricultural activities. Thus, public



**Figure 5.** Cluster analysis based on the environmental and biological data, in the eighth sampling sites (S1 - S8), in Santa Cruz do Sul county, RS, Brazil, at four seasons, two in 2007 (August and November) and two in 2008 (February and May), were S1, S3, S5 and S7 are sampling stations of the upper reaches and S2, S4, S6 and S8.

policies must be implemented by local government to reduce the environmental impacts in the urban streams of *Santa Cruz do Sul*, since they are located in the *Pardinho* River Sub-basin, a source of water supply for this city and one of the main tributaries forming the *Pardo* River Hydrographic Basin.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their thanks to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazilian National Research Council - CNPq) for the scholarship granted to the first and second-named authors (PIBIC/CNPq) during their undergraduate studies.

## REFERENCES

- American Public Health Association. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21<sup>st</sup> ed. Washington: APHA.
- Bruno, E.; Martinez de Fabricius, A. & Luque, M.E. (2003). Fitoplankton en un tramo del Río Cuarto con influencia antrópica. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 38(1-2):1-13.
- Brasil. Conselho Nacional de Meio Ambiente. (2005). Resolução CONAMA nº 357 de 2005. *Diário Oficial da União*, 17 março 2005.
- Dupont, A.; Lobo, E.A.; Costa, A.B. & Schuch, M. (2007). Avaliação da Qualidade da Água do Arroio do Couto, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa Série Biologia*, 19(1):56-74.
- Ector, L. & Rimet, F. (2005). Using bioindicators to assess rivers in Europe: a overview. In: Lek, S.; Scard M.; Verdonchat, P.F.M; Descy, J.P. & Park, Y.S. (Ed.). *Modelling community structure in freshwater ecosystems*. Berlin: Heidelberg. p.7-19.
- Gold, C.; Feurtet-Mazel, A.; Coste, M. & Boudou, A. (2002). Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Research*, 36(14):3654-64.
- Gomez, N. (1998). Use of epilithic diatoms for evaluation of water quality in the Matanza-Riachuelo (Argentina), a Pampean plain river. *Water Research*, 32(7):2029-34.
- Hammer, O.; Harper, D.T. & Ryan, P.D. (2008). Past: paleontological statistics version 1.81. Norway: Paleontological Association. Available from: <<http://folk.uio.no/ohammer/past>>. (cited 10 Aug. 2008).
- Hermany, G.; Schwarzbald, A.; Lobo, E.A. & Oliveira, M.A. (2006). Ecology of the epilithic diatom community in a low-order stream system of the Guaíba hydrographical region: subsidies to the environmental monitoring of southern Brazilian aquatic systems. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18(1):25-40.
- Kelly, M.G. & Whitton, B.A. (1995). Comparative performance of benthic diatom indices used to assess river water quality. *Hydrobiology*, 302(3):79-188.
- Kobayasi, H. & Mayama, S. (1982). Most pollution tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo. *Japanese Journal of Phycology*, 30:188-96.
- Kobayasi, H. & Mayama, S. (1989). Evaluation of river water quality by diatoms. *The Korean Journal of Phycology*, 4(2):121-33.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1986). Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H. & Mollenhauer, D. (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 2/1*. New York: Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Lobo, E.A. & Leighton, G. (1986). Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de ríos y esteros de la Zona Central de Chile. *Revista Biología Marina*, 22(1):1-29.
- Lobo, E.A. & Callegaro, V.L. (2000). Avaliação da qualidade de águas doces continentais com base em algas diatomáceas epilíticas: enfoque metodológico. In: Tucci, C.E.M. & Marques, D.M. (Org.). *Avaliação e controle da drenagem urbana*. Porto Alegre: UFRGS. p.277-300.
- Lobo, E.A.; Callegaro, V.M. & Bender, E.P. (2002). *Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC.
- Lobo, E.A.; Wetzel, C.E. & Bes, D. (2003). Avaliação da qualidade da água dos arroios Sampaio, Bonito e Grande, Município de Mato Leitão, RS, Brasil. *Revista Tecno-Lógica*, 7(2):39-53.
- Lobo, E.A.; Callegaro, V.L.; Hermany, G.; Bes, D.; Wetzel, C.E. & Oliveira, M.A. (2004a). Use of epilithic diatoms as bioindicator from lotic systems in southern Brazil, with special emphasis on eutrophication. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 16(1):25-40.
- Lobo, E.A.; Callegaro, V.L.; Hermany, G.; Gomez, N. & Ector, L. (2004b). Review of the use of microalgae in South America for monitoring rivers, with special reference to diatoms. *Vie et Milieu*, 53(2/3):35-45.
- Lobo, E.A.; Bes, D.; Tudesque, E.L. & Ector, L. (2004c). Water quality assessment of the Pardinho River, RS, Brazil, using epilithic diatom assemblages and faecal coliforms as biological indicators. *Vie et Milieu*, 53(2/3):46-53.
- Lobo, E.A.; Callegaro, V.L.; Wetzel, C.E.; Hermany, G. & Bes, D. (2004d). Water quality study of Condor and Capivara streams, Porto Alegre municipal district, RS, Brazil, using epilithic diatoms biocenoses as bioindicatos. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 33(2):77-93.

- Lobo, E.A.; Wetzel, C.E.; Ector, L.; Katoh, K.; Blanco, S. & Mayama, S. (2010). Response of epilithic diatom community to environmental gradients in subtropical temperate Brazilian rivers. *Limnetica*, 29(2):323-40.
- Ludwig, J.A. & Reynolds, J.F. (1988). *Statistical ecology: a primer on methods and computing*. New York: John Wiley & Sons.
- Magalhães Júnior, A.P. (2007). *Indicadores ambientais e recursos hídricos*. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil.
- Metzeltin, D. & García-Rodríguez, F. (2003). *Las diatomeas uruguayas*. Montevideo: DIRAC.
- Metzeltin, D.; Lange-Bertalot, H. & García-Rodríguez, F. (2005). *Diatoms of Uruguay*. In: Lange-Bertalot, H. *Iconographia diatomologica*. Königstein: Koeltz Scientific Books. v.15.
- Metzeltin, D. & Lange-Bertalot, H. (2007). Tropical diatoms of South America II. In: Lange-Bertalot, H. (Ed.). *Iconographia diatomologica*. Königstein: Koeltz Scientific Books. v.18.
- Oliveira, M.A.; Torgan, L.C.; Lobo, E.A. & Schwarzbald, A. (2001). Association of periphytic diatom species of artificial substrate in lotic environments in the arroio Sampaio basin, RS, Brazil: relationships with abiotic variables. *Brazilian Journal of Biology*, 61(4):523-40.
- Rodrigues, L.M. & Lobo, E.A. (2000). Análise da estrutura de comunidades de diatomáceas epilíticas no Arroio Sampaio, Município de Mato Leitão, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa Série Botânica*, 12(2):5-27.
- Round, F.E. (1991). Diatoms in river water-monitoring studies. *Journal of Applied Phycology*, 3(2):129-45.
- Rumrich, U.; Lange-Bertalot, H. & Rumrich, M. (2000). Diatomeen der Anden. Von Venezuela bis Patagonien (Feurland). In: Lange-Bertalot, H. (Ed.). *Iconographia diatomologica*. Königstein: Koeltz Scientific Books. v.9.
- Salomoni, S.E.; Rocha, O.; Callegaro, V.L.M. & Lobo, E.A. (2006). Epilithic diatoms as indicators of water quality in the Gravataí river, Rio Grande do Sul, Brazil. *Hydro-biologia*, 559(1):233-46.
- Schneck, F.; Torgan, L. & Schwarzbald, A. (2007). Epilithic diatom community in a high altitude stream impacted by fish farming in southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 19(3):341-55.
- Souza, M.G. & Senna, P.A. (2009). Diatomáceas epilíticas da subordem Sellaphorineae do rio do Monjolinho, São Carlos, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasileira*, 23(3):618-29.
- Torgan, L.C.; Becker, V. & Prates, H.M. (1999). *Checklist das diatomáceas (Bacillariophyceae) de ambientes de águas continentais e costeiras do Estado do Rio Grande do Sul. Iheringia Série Botânica*, 52:89-144.
- Tundisi, J.G. (2000). Limnologia e gerenciamento de recursos hídricos: avanços conceituais e metodológicos. *Ciência e Ambiente*, 21:9-20.
- Tundisi, J.G. & Tundisi, T.M. (2008). *Limnologia*. São Paulo: Oficina de textos.
- Van Dam, H., Mertens, A. & Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Journal of Aquatic Ecology*, 28(1):117-33.
- Watanabe, T.; Asai, K. & Houki, A. (1988). *Numerical water quality monitoring of organic pollution using diatom assemblages*. Proceedings of the Ninth International Diatom Symposium. Koenigstein: Koeltz Scientific Books. p.123-41.
- Wetzel, C.E.; Lobo, E.A.; Oliveira, M.A.; Bes, D. & Hermany, G. (2002). Diatomáceas epilíticas relacionadas a fatores ambientais em diferentes trechos dos rios Pardo e Pardinho, Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil: Resultados preliminares. *Caderno de Pesquisa Série Biologia*, 14(2):17-38.

Received: 27/7/2011

Final version re-presented: 30/11/2011

Approved: 13/12/2011



ARTIGO | ARTICLE

## Validation of daily growth increments of statoliths of Brazilian squid *Doryteuthis plei* and *D. sanpaulensis* (Cephalopoda: Loliginidae)

*Validação de incrementos de crescimento diário dos estatólitos das lulas brasileiras  
Doryteuthis plei e D. sanpaulensis (Cephalopoda: Loliginidae)*

Daniela Cordella de Aguiar<sup>1</sup>

Carmen Lucia Del Bianco Rossi-Wongtschowski<sup>2</sup>

José Angel Alvarez Perez<sup>3</sup>

### ABSTRACT

This paper describes the first successful validation study of daily growth increments in the statoliths of the squids *Doryteuthis sanpaulensis* and *D. plei*, captured off the Southeastern coast of Brazil. Twenty-nine squid were kept in a laboratory and fed with fish injected with chlortetracycline. The chlortetracycline fluorescent markers were observed in polished statoliths previously exposed to UV light. The number of growth increments between the chlortetracycline marker and the edge of the statoliths corresponds to the number of days elapsed. The capture, transportation and laboratory procedures are described below.

**Key words:** Statoliths. Growth increment validation. *Doryteuthis sanpaulensis*. *Doryteuthis plei*.

### RESUMO

*Este artigo descreve o primeiro estudo bem sucedido sobre validação dos incrementos de crescimento dos estatólitos das lulas Doryteuthis plei e D. sanpaulensis, capturadas na costa sudeste brasileira. Vinte e nove lulas foram*

<sup>1</sup> Pé de Pato Pesquisas e Serviços Aquáticos. R. Japão, 391, 11330-210, São Vicente, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: D.C. AGUIAR. E-mail: <dacordella@gmail.com>.

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ensino Superior em Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Itajaí, SC, Brasil.



*mantidas em laboratório e alimentadas com peixes contendo clorotetraciclina. As marcas fluorescentes de clorotetraciclina foram observadas sob luz UV. Os incrementos entre a marca de clorotetraciclina e a borda do estatólito foram contados e corresponderam ao número de dias decorridos. A captura, o transporte e os procedimentos laboratoriais estão descritos.*

**Palavras-chave:** Estatólitos. Validação do incremento de crescimento. *Doryteuthis sanpaulensis*. *Doryteuthis plei*.

## INTRODUCTION

On the continental shelf of Southern Brazil, two loliginids, *Doryteuthis plei* and *D. sanpaulensis*, can be found in large concentrations (Martins & Perez, 2007; Haimovici et al., 2008).

*Doryteuthis plei* prefers warm coastal waters and is exploited seasonally on the continental shelf (22° - 28°S) by small scale, artisanal and industrial fleets (Perez et al., 2005). Shrimp trawlers capture *Doryteuthis sanpaulensis* as by-catch throughout the region between 22°S and 34°S (Gasalla et al., 2005). Both species exhibit large fluctuations in seasonal abundance, apparently influenced by local oceanographic events (Costa & Fernandes, 1993).

On cephalopods, hard structures such as statoliths, pens, beaks and crystalline lenses are efficient instruments for estimating age, due to the incremental growth deposits (Arkhipkin, 1991). Hence, interest has focused on statolith deposition marks, with validation as a critical pointer in determining age.

Statolith rings in squid were first mentioned by Clarke (1965) and it was subsequently mooted that they were deposited on a daily basis (Hurley et al., 1979; Lipinski et al., 1998), constituting a potential method to forecast ageing and its application to the assessment of squid stocks.

Laboratory rearing studies concerning the periodicity of these increments generally involve keeping the animals in the laboratory (Nakamura & Sakurai, 1991; Natsukari et al., 1991) fed on a diet containing tetracycline or strontium, substances that bind directly to the calcium present in skeletal structures (Campana, 2001). According to Moltschanivskyj (1994), due to the high metabolism of this

group, the diet is targeted directly at growth and thus the chemicals are quickly assimilated and registered as statolith increments, providing a signal (marker) on any given day (Jackson & Moltschanivskyj, 2001).

Chlortetracycline (CTC) and Oxytetracycline (OTC) are the most useful calcium-binding chemicals in these experiments (Lipinski, 1986; Lipinski et al., 1998) since they bind directly to aragonite crystals as well as to the protein matrix in the squid's statoliths during the deposition process, resulting in a fluorescent band, when viewed under ultraviolet light.

Several validation studies on statoliths of different species have sustained the hypothesis that the ring deposition takes place daily (Durholtz et al., 2002). Amongst these are *Todarodes pacificus* (Nakamura & Sakurai, 1991), *Alloteuthis stubtai* (Lipinski, 1986), *Idiosepius pygmaeus* (Jackson, 1989), *Doryteuthis plei* (Jackson & Forsythe, 2002), *Sepioteuthis lessoniana* (Jackson et al., 1993) and *Loligo vulgaris reynaudii* (Lipinski et al., 1998; Durholtz et al., 2002). The main problem concerning the validation of statolith increments is the low survival rate of animals in captivity, usually no longer than forty days (Lipinski, 1985). Keeping them in tanks, the handling of the food and restricted movement are all responsible for the high mortality rates (Hanlon et al., 1983; Vidal et al., 2002; Ikeda et al., 2004).

The importance of squid has been increasing in the fishing industry due to the depletion of more traditional fish stocks. Despite the importance to fisheries of *Doryteuthis plei* and *D. sanpaulensis* in Brazilian waters, little data about its growth parameters and aging are available, which is critical in understanding not only the fundamental biological

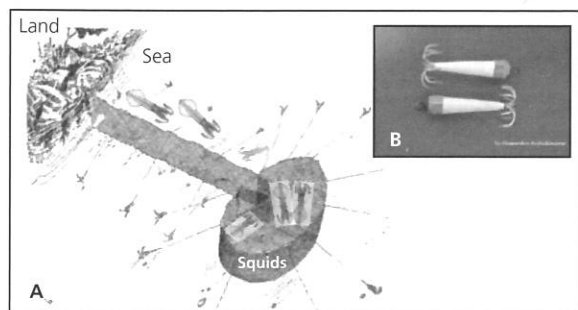
features, but also key elements of squid life-history, and for issues related to ecosystem modeling and management (Jackson, 2004). This paper is a contribution towards the validation of daily increments in the statoliths of these species.

## MATERIAL AND METHODS

The study was conducted between October 2004 and February 2005 in the city of Ubatuba (23° 26' 00"S; 45° 04' 00"W), in the Brazilian state of São Paulo.

In the first sampling, squid were captured at nighttime by means of *zangarilhos* (local variants of jigs with hand lines) (Masumoto, 2003) (Figure 1) near the Victoria islands (23°45' 00"S; 45° 01' 00"W), aboard the "*Véliger II*", a vessel belonging to the *Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo* (IOUSP). The squid were attracted to the surface by flashing fluorescent lights installed on the sides of the boat and the catch was placed in an open tank containing 200 liters of seawater under constant aeration. In order to reduce the metabolism and the activity of the squid, the temperature of the tank water was reduced by 2 - 3°C by adding bottles of ice, in accordance with Durholtz et al. (2002).

A second sampling took place in fishermen's trap nets (Figure 1) set up at Enseada beach, Cedar beach and Anchieta Island by means of hand lift-nets and small buckets. For these samplings, the Institute's small motorboat "*Nautilus*" was used,



**Figure 1.** A: Schematic drawing of a trap net modified from Vieira et al. (1945).

B: "*Zangarilho*" (hand jigs).

either at dawn or dusk. The same procedures described above were maintained on board for the handling and transportation of the samples to the laboratory.

The return to the laboratory occurred between 1 and 2 hours after each sampling, regardless of the number of animals collected, thereby avoiding injury or death.

In the laboratory, the animals were carefully separated into groups of five or fewer with the aid of small buckets and then distributed into 4 circular, black fiber tanks (1.4m high and 1.7m in diameter), filled with 2,500 liters of sea water. The seawater was collected on shore around 50m from the laboratory and filtered through a decantation system. The tanks were installed in an open tent exposed to natural light. The water aeration and circulation were constant and the water flux was approximately 30 liters/min<sup>-1</sup>. Water temperature and salinity were kept under natural conditions, the temperature ranging from 18.5°C to 26°C and salinity between 34 and 35.2 parts per thousand.

The squid remained for 24 hours without any interference, being fed *ad libitum* on small fish (50mm) collected with hand nets, the most common being *Trachinotus carolinus*, *Chloroscombrus chrysurus*, *Menticirrhus littoralis*, *Paralanchurus brasiliensis*, *Mugil sp.*, *Anchoa tricolor* and *Atherinella brasiliensis*. After a test using whole dead fish and fish pieces, we opted to use the former since the squid rejected pieces.

The squid were fed twice a day, in the morning and the afternoon, the fish being offered one by one, and the food supply was suspended when several items of prey were shunned, remaining in the bottom of the tank. Dregs and other residues were removed via manual siphoning twice a day and half of the tank's water volume was renewed every day. Dead squid were removed immediately. Such procedures ensured a clean environment and good water quality, avoiding the effects of excreta and the accumulation of debris.

After a period of adaptation to captivity and food intake in the tanks, the procedures for validating

statolith increments were followed using tetracycline hydrochloride CTC as a tracer. A solution of CTC 20g per liter of distilled water (Nakamura & Sakurai, 1991) was injected into the fish, and then a total of approximately 8 injected fish were offered to each squid. After marking, individuals would be observed for ten days. If they survived for this period of time, the process was repeated. After the death of marked animals, their Mantle Length (ML) and Total Weight (Wt) were recorded, according to the methodology described by Perez *et al.* (2002). Statoliths were prepared following the general methods reviewed by Perez *et al.* (2006), mounted on glass plates with transparent resin with the convex surface on the sagittal plane. Polishing was performed using 400 $\mu$ m, 9 $\mu$ m, 8 $\mu$ m and 6 $\mu$ m sandpaper, in decreasing order, until the focus and the edge of the dome were exposed. Both statoliths of each animal were prepared but only one was selected, randomly, for counting. These structures were examined under an ultraviolet light mercury microscope, 510nm, with 400x magnification, their images being captured and stored in an image analysis system.

Three blind counts were made independently by a single reader and their accuracy was tested using the following indices: Average Percentage Error (APE) (Beamish & Fournier, 1981) and the Coefficient of Variation (CV) (Chang, 1982). APE expressed the percentage deviation of each of the three counts from the mean count. CV expressed the standard deviation as a percentage of the mean count.

In order to check the periodicity of increment deposition, linear regressions were applied between the number of increments after the CTC marking (dependent variable) and days post-marking (independent variable). A *t*-test was applied to test the hypothesis that the regression slope was no different than 1 ( $H_0: b=1$ ), which would indicate that one increment was formed every day (95% significance level).

## RESULTS

The longest period of squid survival in captivity was 18 days and the shortest 2 days; 14 of them

survived more than 10 days, and the average survival was 4 days.

Most of the deaths occurring during the experiments were caused by injuries generated by collisions with the tank walls, sudden disturbances that triggered ink release, technical failures and pecking amongst the animals. After a week in captivity, the squid started to collide with the tank walls with damage appearing in the terminal portion of the fins. These lesions increased with time, in some cases with the loss of the whole fin. This behavior caused death for most of the animals (63.0%). Some squid became frightened in the presence of people or noise, ejecting ink, and dying a few hours later (between 2 and 5 hours). This was observed in immature specimens (71.0%) and before the first week of confinement was complete, being responsible for a mortality rate of 15.2%. Technical failures included animals getting caught in the circulation pumps, water level variation caused by changes in the water flow, power outages and mechanical pump failure, being responsible for 15.2% of mortality. Aggression between individuals, which increased gradually over the period of containment, generated injuries mainly to their fins, and corresponded to 6.5% of deaths.

Initially the live fish supplied stimulated the appetite of the squid, being devoured quickly. The ingestion of dead fish took longer and occurred only as a result of insistence; nevertheless, this procedure facilitated the maintenance of the squid in captivity.

The concentration of CTC injected into the squid food was sufficient to produce a mark in all statoliths as a fluorescent band around the perimeter. Table 1 shows 29 individuals marked (16 females between 45-150mm ML and 13 males between 54-194mm ML), 5 of them (numbers 41, 43, 44, 45 and 46) with a second band after an interval of 10 days. The average number of statolith increments of *Doryteuthis sanpaulensis* and *D. plei* were practically equal to the number of days post-marking.

The marks were evident under ultraviolet light. In a few cases the CTC band was not well defined

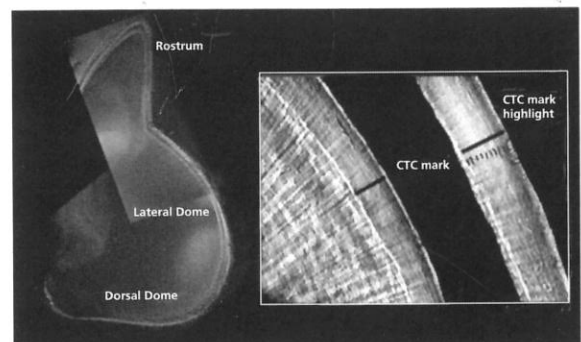
**Table 1.** Average number of increments (AIN) between the CTC mark and the statolith edge. Numbers 41, 43, 44, 45 and 46 show the AIN between two CTC marks and AIN between the CTC mark and the statolith edge, respectively. Experiments conducted with *Doryteuthis sanpaulensis* and *D. plei* on the Southeastern coast of Brazil between October 2004 and February 2005.

IN	Species	Gender	ML	DPM1	AIN	DPM2	AIN
13	<i>D. plei</i>	F	127	6	5.7		
16	<i>D. plei</i>	F	150	5	5.0		
20	<i>D. plei</i>	M	86	1	1.0		
21	<i>D. plei</i>	M	99	1	1.3		
22	<i>D. sanpaulensis</i>	F	81	2	1.7		
23	<i>D. sanpaulensis</i>	F	45	3	2.7		
24	<i>D. sanpaulensis</i>	F	50	4	3.3		
25	<i>D. plei</i>	M	89	4	3.7		
26	<i>D. plei</i>	F	58	7	6.0		
27	<i>D. sanpaulensis</i>	M	54	7	5.7		
28	<i>D. plei</i>	F	131	1	1.3		
29	<i>D. plei</i>	F	91	1	1.0		
30	<i>D. plei</i>	F	71	1	1.0		
31	<i>D. plei</i>	F	70	2	2.0		
32	<i>D. plei</i>	M	82	3	2.7		
33	<i>D. plei</i>	F	72	4	3.7		
34	<i>D. plei</i>	M	194	5	5.0		
35	<i>D. plei</i>	M	84	6	5.7		
36	<i>D. plei</i>	M	86	9	8.7		
37	<i>D. plei</i>	F	78	10	9.0		
38	<i>D. plei</i>	M	94	10	9.0		
30	<i>D. plei</i>	F	79	10	9.0		
40	<i>D. plei</i>	F	97	10	8.3		
41	<i>D. plei</i>	F	103	11	11.0	1	1.0
42	<i>D. plei</i>	M	171	13	13.0		
43	<i>D. plei</i>	F	80	13	12.3	2	2.0
44	<i>D. plei</i>	M	92	13	14.0	3	3.3
45	<i>D. plei</i>	M	89	14	14.7	4	4.0
46	<i>D. plei</i>	M	65	16	16.0	6	7.0

IN: Individual Number; DPM: Days Post-Marking; CTC: Chlortetracycline; ML: Mantle Length.

making it difficult to count the statolith increments. Figure 2 shows ten increments formed 10 days after the CTC intake. The width of the fluorescent band showed that the statolith regions grow independently: the top of the rostrum and the dorsal part of the dome exhibit faster growth, while the lateral dome grows more slowly (Figure 2).

For *D. plei*, the Average Percentage Error (APE) between the readings was 7.2%, and the Coefficient of Variability (CV) 9.6%, demonstrating an acceptable level of precision and consistency between the counts. For *D. sanpaulensis*, APE and CV were greater than 16.0% and 21.0%, respectively, probably due to the small number of animals analyzed (Table 2).



**Figure 2.** Two CTC fluorescent marks in the statolith of *Doryteuthis plei* (male; ML=65mm) exposed to UV light, at 100x magnification.

Note: The inset image shows in detail the CTC mark in the lateral dome exposed to normal transmitted and UV light, at 400x magnification. Its highlight shows growth increments between the CTC mark and the edge where dotted, at 500x magnification.

**Table 2.** Comparison between the three counts of increments deposited in staloliths of *Doryteuthis sanpaulensis* and *D. plei*, after marking with CTC. Experiments conducted on Southeastern coast of Brazil between October 2004 and February 2005.

IN	Species	Days	Counts			Mean	SD	APE	CV
			1	2	3				
13	<i>D. plei</i>	6	6	5	6	5.67	0.58	7.84	10.19
16	<i>D. plei</i>	5	5	5	5	5.00	0.00	0.00	0.00
20	<i>D. plei</i>	1	1	1	1	1.00	0.00	0.00	0.00
21	<i>D. plei</i>	1	1	1	2	1.33	0.58	33.33	43.30
25	<i>D. plei</i>	4	3	4	4	3.67	0.58	12.12	15.75
26	<i>D. plei</i>	7	5	6	7	6.00	1.00	11.11	16.67
28	<i>D. plei</i>	1	1	1	2	1.33	0.58	33.33	43.30
29	<i>D. plei</i>	1	1	1	1	1.00	0.00	0.00	0.00
30	<i>D. plei</i>	1	1	1	1	1.00	0.00	0.00	0.00
31	<i>D. plei</i>	2	2	2	2	2.00	0.00	0.00	0.00
32	<i>D. plei</i>	3	2	3	3	2.67	0.58	16.67	21.65
33	<i>D. plei</i>	4	4	4	3	3.67	0.58	12.12	15.75
34	<i>D. plei</i>	5	5	5	5	5.00	0.00	0.00	0.00
35	<i>D. plei</i>	6	6	5	6	5.67	0.58	7.84	10.19
36	<i>D. plei</i>	9	9	8	9	8.67	0.58	5.13	6.66
37	<i>D. plei</i>	10	9	9	9	9.00	0.00	0.00	0.00
38	<i>D. plei</i>	10	9	9	9	9.00	0.00	0.00	0.00
39	<i>D. plei</i>	10	10	8	9	9.00	1.00	7.41	11.11
40	<i>D. plei</i>	10	9	8	8	8.33	0.58	5.33	6.93
41	<i>D. plei</i>	11	11	12	10	11.00	1.00	6.06	9.09
42	<i>D. plei</i>	13	13	13	13	13.00	0.00	0.00	0.00
43	<i>D. plei</i>	13	13	11	13	12.33	1.15	7.21	9.36
44	<i>D. plei</i>	13	15	13	14	14.00	1.00	4.76	7.14
45	<i>D. plei</i>	14	16	14	14	14.67	1.15	6.06	7.87
46	<i>D. plei</i>	16	15	17	16	16.00	1.00	4.17	6.25
Mean								7.22	9.65
22	<i>D. sanpaulensis</i>	2	2	1	2	1.67	0.58	26.67	34.64
23	<i>D. sanpaulensis</i>	3	3	2	3	2.67	0.58	16.67	21.65
24	<i>D. sanpaulensis</i>	4	4	3	3	3.33	0.58	13.33	17.32
27	<i>D. sanpaulensis</i>	7	5	6	6	5.67	0.58	7.84	10.19
Mean								16.13	20.95

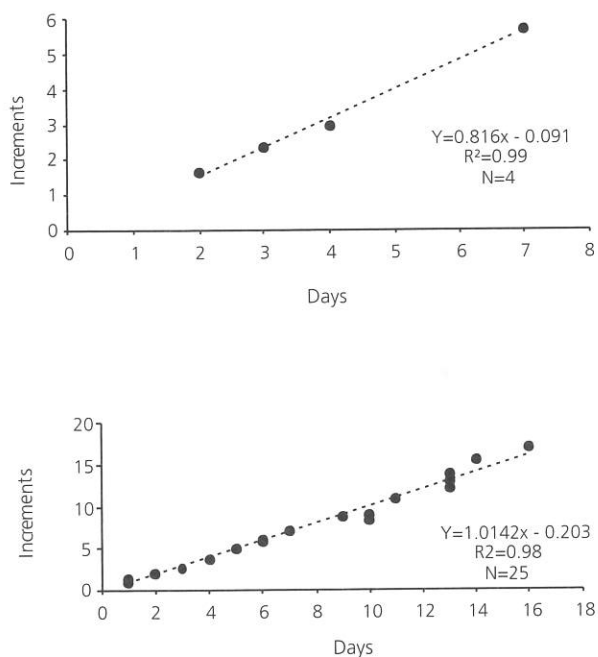
IN: Individual Number; SD: Standard Deviation; APE: Average Percentage Error; CV: Coefficient Of Variation.

The regression analysis between average increment numbers and days post-marking explained 99,0% of the variation obtained for *D. sanpaulensis* and 98,0% for *D. plei*. The slopes were 0.82 and 1.01, respectively. Figure 3 shows the relationship between the average increment number and days after marking. The t-test applied to the data showed that the number of rings is not statistically different from the number of days ( $p>0.05$ ), for both species.

## DISCUSSION

Trap nets worked better for sampling when compared to those where *zangarilhos* were used. The first caused considerably less stress and skin injuries to the animals. Moreover, since the trap nets are always located in areas sheltered from the open sea, the navigation conditions to and from these places are much calmer, making collection and transportation of animals less detrimental. The





**Figure 3.** Relationship between the average number of increments of *Doryteuthis sanpaulensis* (on top) and *D. plei* (at bottom) and the days elapsing after CTC marking. Experiments conducted on the Southeastern coast of Brazil between October 2004 and February 2005.

use of small 2-liter buckets also appeared to be better than hand lift-nets in pulling the animals out of the sea, as they caused less damage to the skin of the squid. In general, the transportation protocol employed, including a large water volume in the tank, with continuous oxygen supply and temperature decreased by 2-3°C, helped to keep the squid alive and in good condition until their arrival at the laboratory.

The experiments conducted to validate ring growth of *D. sanpaulensis* and *D. plei* support the hypothesis that 1 increment is equivalent to 1 day, corroborating the previous study by Jackson & Forsythe (2002), for *D. plei*. However, the small number of animals used in the experiments should be taken into consideration. According to Lipinski (1986), studies to validate squid rings generally involve a small number of animals and in all successful studies, fewer than 300 individuals were analyzed (Jackson, 2004).

The CV and APE indices show the precision of the results as regards the increment deposition after the CTC mark, as found for *D. plei*, by Jackson & Forsythe (2002).

The majority of deaths that took place during this study occurred due to injuries at the tip of the caudal fin produced by blows, similar to the findings of Nakamura & Sakurai (1991) and Lipinski (1985) who noted that some animals could resist such injuries for up to 3 weeks.

According to Jackson & Moltschaniwskyj (2001), the squid feeding rate did not influence the frequency of ring deposition in *S. lessoniana* but the ingestion of larger amounts of food cause wider ring deposition. Adult squid are voracious predators and their hunter instinct is stimulated by the movement and visibility of their prey (Büdelmann, 1996). For this reason, it is very difficult to feed these animals with dead fish. Lipinski (1985) was also unsuccessful in trying to feed *Alloteuthis subulata* with pieces of fish, the maintenance of this species depending on the constant supply of living prey. In the current experiment, *D. sanpaulensis* and *D. plei* adapted relatively well to a constant diet of dead fish, but we believe that the results would be better using live prey.

The CTC marks were particularly evident, showing that this substance was well incorporated into the statoliths, allowing us to analyze the deposited rings after its administration, as well as growth differences among parts of the structure; these differences were also observed by Lipinski (1986) and Nakamura & Sakurai (1991).

Although the behavior of the species was not the subject of this study, some relevant observations should be borne in mind when conducting future studies. It was observed that a large male and a mature female copulated (crown arms against crown arms), and four spawned balloon shaped capsules (two minors with 1.37cm and 1.67cm and two larger with 2.24cm and 2.65cm) were found in the bottom of the tank. Lipinski (1985) noted "buccal crown to buccal crown" copulation a few days before the appearance of encapsulated eggs in the substrate,

at 20-40mm. According to this author, although the deposition of eggs could be interpreted as stress due to unfavorable conditions, active feeding and mating suggest relatively good loliginid adaptation to aquaria.

## REFERENCES

- Arkhipkin, A.I. (1991). Methods for cephalopod age and growth studies with emphasis on statolith ageing techniques. In: Jereb, P.S.; Ragonese, R. & von Boletzky, S. (Ed.). Squid age determination using statoliths. *Proceedings of the International Workshop Held in the Istituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato*. Special publication. p.11-17.
- Beamish, R.J. & Fournier, D.A. (1981). Method for comparing the precision of a set of age determinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(8):982-3.
- Buldemann, B.U. (1996). Active marine predators: the sensory world of cephalopods. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 27(2-3):59-75.
- Campana, S.E. (2001). Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology*, 59:197-242.
- Chang, W.Y.B. (1982). A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 39(8):1208-10.
- Clarke, M.R. (1985). Growth rings in the beaks of the squid *Moroteuthis ingens* (Oegopsida, Onychoteuthidae). *Malacologia*, 3(2):297-307.
- Costa, P.A.S. & Fernandes, F.C. (1993). Seasonal and spatial changes of cephalopods caught in the Cabo Frio (Brazil) upwelling ecosystem. *Bulletin of Marine Science*, 52(2):751-9.
- Durholtz, M.D.; Lipinski, M.R. & Field, J.D. (2002). Laboratory validation of periodicity of incrementation in statoliths of the South African chokka squid *Loligo vulgaris reynaudii* (d'Orbigny, 1845): a reevaluation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1-2):41-59.
- Gasalla, M.A.; Perez, J.A.A.; Marques, C.A.; Tomas, A.R.G. & Oliveira, U.C. (2005). *Doryteuthis sanpaulensis*. In: Cergole, M.C.; Avila-da-Silva, A.O. & Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. (Ed.). *Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração*. São Paulo: Instituto Oceanográfico-USP. p.69-73. (Serie Documentos REVIZEE-Score Sul).
- Haimovici, M.; Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B.; Bernardes, R.A.; Fischer, L.G.; Vooren, C.M.; Santos, R.A. et al. (2008). *Prospecção pesqueira de espécies demersais com rede de arrasto-de-fundo na região Sudeste-Sul do Brasil*. São Paulo: Instituto Oceanográfico-USP. p.84-7 (Serie Documentos REVIZEE-Score Sul).
- Hanlon, R.T.; Hixon, R.F. & Hulet, W.H. (1983). Survival, growth and behavior of the loliginid squids *Loligo plei*, *Loligo pealei* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda) in closed sea water system. *Biology Bulletin*, 165(3):637-85.
- Hurley, G.V.; Beck, P.; Drew, J. & Radtke, R.L. (1979). A preliminary report on validating age readings from statoliths of the short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *International Commission for the Northwest Atlantic Fisheries, Research Document*, 79(26):1-6.
- Ikeda, Y.; Ueda, Y.; Sakurazawa, I. & Matsumoto, G. (2004). Transport of the oval squid *Sepioteuthis lessoniana* Férussac, 1831 in Lesson 1830-1831 (Cephalopoda: Loliginidae) for up to 24h and subsequent transfer to an aquarium. *Fisheries Science*, 70(1):21-7.
- Jackson, G.D. (1989). The use of statolith microstructures to analyze life history events in the small tropical cephalopod *Idiosepius pygmaeus*. *Fisheries Bulletin United States*, 87(2):265-72.
- Jackson, G.D. (2004). Advances in defining the life histories of myopsid squid. *Marine and Freshwater Research*, 55(4):357-65.
- Jackson, G.D.; Arkhipkin, A.I.; Bizikov, V.A. & Hanlon, R.T. (1993). Laboratory and field corroboration of age and growth from statoliths and gladii of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Mollusca: Cephalopoda). In: Okutani, T.; O'Dor, R.K. & Kubodera, T. (Ed.) *Recent advances in cephalopod fishery biology*. Tokyo: Tokay University Press. p.189-99.
- Jackson, G.D. & Forsythe, J.W. (2002). Statolith age validation and growth of *Loligo plei* (Cephalopoda: Loliginidae) in the north-west Gulf of Mexico during spring/summer. *Journal of Marine Biological Association of the UK*, 82(4):677-8.
- Jackson, G.D. & Moltschanivskyj, N.A. (2001). The influence of ration level on growth and statolith increment width of the tropical squid *Sepioteuthis lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae): an experimental approach. *Marine Biology*, 138(4):819-25.
- Lipinski, M.R. (1985). Laboratory survival of *Alloteuthis subulata* (Cephalopoda: Loliginidae) from the Plymouth area. *Journal of Marine Biological Association of the UK*, 65(4):845-55.
- Lipinski, M.R. (1986). Methods for the validation of squid age from statoliths. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(2):505-26.
- Lipinski, M.R.; Durholtz, M.D. & Underhill, L.G. (1998). Field validation of age readings from the statoliths of chokka squid (*Doryteuthis vulgaris reynaudii* d'Orbigny, 1845) and

an assessment of associated errors. *ICES Journal of Marine Sciences*, 55:240-57.

Martins, R.S. & Perez, J.A.A. (2007). The ecology of loliginid squid in shallow waters around Santa Catarina, southern Brazil. *Bulletin of Marine Science*, 80(1):125-46.

Masumoto, C. (2003). *As atividades pesqueiras da comunidade caçara de Pinguaba (Ubatuba, São Paulo)*. Masters dissertation, Departamento de Oceanografia, Universidade de São Paulo.

Moltschaniwskyj, N.A. (1994). Muscle tissue growth and muscle fibre dynamics in the tropical loliginid squid *Photodoryteuthis* sp. (Cephalopoda: Loliginidae). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 51(4): 830-5.

Nakamura, Y. & Sakurai, Y. (1991). Validation of Daily growth Increments in Statoliths of Japanese Common Squid *Todarodes pacificus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(11):2007-11.

Natsukari, Y.; Dawe, E. & Lipinski, M. (1991). Interpretation of data. In: Jereb, P.; Ragonese, S. & von Boletzky, S. (Ed.). Squid age determination using statoliths. *Proceedings of the International Workshop Held in the Instituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato*. Special publication. p.113-24.

Perez, J.A.A.; Aguiar, D.C. & Oliveira, U.C. (2002). Population biology of the long-finned squid *Loligo plei*

(Cephalopoda: Loliginidae) in Southern Brazilian Waters. *Fisheries Research*, 58(3):267-79.

Perez, J.A.A.; Aguiar, D.C. & Santos, J.A.T. (2006). Gladius and Statolith as Tools for Age and Growth Studies of the Squid *Loligo plei* (Teuthida: Loliginidae) off Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5):747-55.

Perez, J.A.A.; Gasalla, M.A.; Aguiar, D.C.; Oliveira, U.C.; Marques, C.A. & Tomas, A.R.G. (2005). *Loligo plei*. In: Cergole, M.C.; Avila-da-Silva, A.O. & Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. (Ed.). *Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração*. São Paulo Instituto Oceanográfico. p.62-8. (Série Documentos REVIZEE-Score Sul).

Vidal, E.A.G.; DiMarco, F.P.; Wormorth, J.H. & Lee, P.G. (2002). Optimizing rearing conditions of hatchling loliginid squid. *Marine Biology*, 140(1):117-27.

Vieira, B.B.; Carvalho, J.P.; Silva, A.G.D.A.; Braga, A.A.; Ramos, F.A.; Maia, M.M. et al. (1945). Anuário de pesca Marítima do Estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio. São Paulo: Departamento de Produção Animal.

Received: 20/10/2011

Final version re-presented: 22/11/2011

Approved: 13/12/2011



ARTIGO | ARTICLE

## Biologia de *Tetranychus mexicanus* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) em folhas de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)

*Life-history of the Tetranychus mexicanus (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on leaves of the Pupunha or Peach-palm (Bactris gasipaes Kunth)*

César Pagotto Stein<sup>1</sup>

Núbia Daólio<sup>1</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biologia do ácaro *Tetranychus mexicanus* (McGregor) criado em folíolos de *Bactris gasipaes* Kunth (pupunha). O ensaio foi conduzido em condições de laboratório com temperatura variando entre  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa entre  $60,0\% \pm 10,0\%$  e fotofase de 14h. O período decorrido de ovo a adulto foi de 13,0 dias para machos e de 13,6 dias para fêmeas, com sobrevivência de 59,3%. A proporção sexual foi de aproximadamente 4,7 fêmeas para cada macho. Depois de um período de pré-oviposição de 2,0 dias, as fêmeas passaram por um período médio de oviposição de 12,1 dias, com número médio de ovos por fêmea por dia de 0,82. A longevidade foi de 7,1 dias para machos e 16,7 dias para fêmeas. A razão intrínseca de aumento ( $r_m$ ) foi de 0,06, a razão finita de aumento ( $\lambda$ ) de 1,06 indivíduos por fêmea por dia, o tempo médio de uma geração (T) de 21,6 dias e a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) de 3,7.

**Palavras-chave:** Ácaro. Arecaceae. Tabela de vida de fertilidade. Tetraniquídeo.

### ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the biology of the mite called *Tetranychus mexicanus* (McGregor), reared on leaflets of *Bactris gasipaes* Kunth (peach-palm). The test was carried out under laboratory conditions at a

<sup>1</sup> Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Entomologia. Av. Barão de Itapura, 1481, Botafogo, 13012-970, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: C.P. STEIN. E-mail: <cesarstein@iac.sp.gov.br>.

temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , relative humidity of  $60,0\% \pm 10,0\%$  and photophase of 14 hours. The period of development from egg to adult was 13 days for males and 13.6 days for females, with a survival rate of 59.3%. The sex ratio was approx. 4.7 females per male. After a pre-oviposition period of 2 days, the females underwent a period of oviposition, on average, of 12.1 days, with 0.82 eggs per female per day. Longevity was 7.1 days for males and 16.7 days for females. The intrinsic rate of increase ( $r_m$ ) was 0.06, the finite rate of increase ( $\lambda$ ) 1.06 individuals per female per day, the mean generation time ( $T$ ) 21.6 days and net reproductive rate ( $R_0$ ) 3.7.

**Key words:** Mite. Arecaceae. Life-fertility table. Tetranychidae.

## INTRODUÇÃO

As pesquisas com a *Bactris gasipaes* Kunth, pupunha (Arecaceae), visando à produção de palmito, tiveram início na década de 1960 impulsionadas pela crescente necessidade de substituição à exploração comercial de palmitos das populações silvestres. No Brasil, os estudos se iniciaram na década de 1970 e cresceram rapidamente em decorrência da expansão dessa cultura pelo país (Clement & Bovi, 2000). Entre os problemas fitossanitários que podem ocorrer com essa cultura, está o ataque de ácaros fitófagos.

Os primeiros relatos de *Tetranychus mexicanus* (McGregor) ocorreram nos Estados Unidos da América (Texas), México e Argentina, tendo sempre as plantas cítricas como hospedeiras (Flechtmann & Baker, 1970). Presente em 13 países, todos do Continente Americano, e tendo como hospedeiras 90 espécies vegetais, esse ácaro foi observado apenas em *B. gasipaes* e *Cocos nucifera* L. (coqueiro) dentre as espécies que compõem a família Arecaceae (Bolland *et al.*, 1998).

Na Venezuela, é considerado, nos programas de manejo, como praga potencial de *Citrus latifolia* Tanaka (limão Tahiti) (Quiros-Gonzales, 2000) e, uma praga séria de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujazeiro) nos períodos de baixa precipitação pluvial (Dominguez-Gil & McPheron, 1992). No Brasil, além de causar prejuízos em maracujazeiros nos períodos de estiagem (Leite de Oliveira, 1987), esse ácaro também pode prejudicar plantios de

*Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em viveiros de mudas, casas-de-vegetação e cacauais adultos menos sombreados (Nakayama *et al.*, 1987). No Brasil, o *T. mexicanus* foi observado em inúmeros hospedeiros, notadamente nas frutíferas (Flechtmann, 1967; Paschoal, 1968b), porém somente no coqueiro entre as Arecáceas (Moraes & Flechtmann, 2008). Relatos de *T. mexicanus* em folhas de *B. gasipaes* no Brasil foram feitos por Stein & Daólio (2004) que coletaram esse ácaro em julho de 2003, no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo, Campinas, SP e por Vasconcelos & Silva (2011) na região de Manaus, AM.

Dados sobre a biologia de *T. mexicanus* são escassos. Paschoal (1968a) apresenta algumas observações sobre seu ciclo de desenvolvimento em laboratório, sobre folhas de *Citrus aurantifolia* (Christm.) (limão galego) e temperatura variando de 19 a 25°C. Recentemente, Sousa *et al.* (2010) desenvolveram trabalhos sobre a biologia desse ácaro, também em condições controladas, utilizando como hospedeiras três espécies de Annonaceae. O trabalho forneceu, além de informações sobre as diferentes fases do ciclo de vida do ácaro, alguns parâmetros para o seu desenvolvimento populacional através da tabela de vida de fertilidade.

Considerando a expansão da cultura de *B. gasipaes*, o potencial de danos de *T. mexicanus* sobre essa hospedeira (Couturier *et al.*, 1996; Vasconcelos & Silva, 2011) e a escassez de informações sobre sua biologia, propôs-se estudar a biologia desse ácaro e determinar os parâmetros de sua tabela de vida de fertilidade, tendo a pupunha como seu substrato alimentar.



## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do Instituto Agromônico, Campinas (SP), em sala climatizada, com temperatura variando de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $60\% \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas. Inicialmente, estabeleceu-se uma criação estoque de *T. mexicanus* em folhas de pupunha. Para isso, em placas de Petri (15,0cm de diâmetro) forradas com espuma sintética, foram acomodados três pedaços retangulares (10,0 x 2,0cm) de folíolos de pupunha com a face adaxial para baixo e os bordos recobertos de algodão hidrófilo. A espuma e o algodão foram conservados úmidos, pela adição de água destilada, para manter a turgescência do folíolo e evitar a fuga dos ácaros. As placas de Petri permaneceram abertas. Sobre cada pedaço de folíolo foram colocadas 15 fêmeas para postura e início de novas colônias, segundo método adaptado de Reis *et al.* (1997).

Para o estudo da biologia foram montadas quinze placas de Petri semelhantes às utilizadas na criação estoque. Entretanto, sobre os três pedaços de folíolos foram colocadas tiras estreitas de algodão umedecido, dispostas transversalmente ao limbo foliar, dividindo-os em 10 arenas de aproximadamente  $2,5\text{cm}^2$  por placa. Em cada arena, com auxílio de um microscópio estereoscópico e pincel com poucos pelos, uma única fêmea foi colocada para a obtenção de ovos. Após 24 horas, as fêmeas que realizaram postura foram retiradas, juntamente com os ovos excedentes, deixando-se apenas um por arena. A partir daí, foram realizadas duas observações diárias, às 7h e às 17h, para o acompanhamento dos diferentes períodos e viabilidades dos estágios imaturos. Após atingirem a fase adulta, os ácaros foram observados apenas uma vez ao dia, pela manhã, para a contagem e retirada dos ovos, até sua morte. Ácaros perdidos por acidente ou fuga, não tiveram os dados considerados para efeito de cálculos.

As variáveis observadas foram: período de incubação e viabilidade de ovos, duração e viabilidades dos diferentes estágios imaturos e do ciclo

de ovo a adulto, razão sexual, período de pré-oviposição e de oviposição, número médio de ovos por fêmea, média diária de ovos por fêmea e longevidade de machos e fêmeas.

Os parâmetros do ciclo de vida e razão sexual serviram como base para elaboração da tabela de vida de fertilidade segundo o proposto por Birch (1948). Foram calculados a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), razão intrínseca de crescimento ( $r_m$ ), tempo de desenvolvimento de uma geração (T) e taxa finita de crescimento ( $\lambda$ ). O tempo necessário para a obtenção de 50% de mortalidade da população (M 50%) foi obtido com o auxílio da tabela de vida e corresponde à idade em que a sobrevivência apresentou o valor mais próximo de 0,50 (Reis *et al.*, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ácaro *T. mexicanus*, criado em folhas de pupunha, apresenta variação na coloração quando comparado com ácaros criados em plantas cítricas, nos quais predominam as cores alaranjadas e avermelhadas (Paschoal 1968a). Em populações mantidas em pupunha os ovos são transparentes ao serem postos e vão se tornando amarelo-escuros ao se aproximarem da época da eclosão das larvas. Durante o período larval, o ácaro é amarelo-claro e vai adquirindo pontuações pretas na região do podossoma. Nos períodos de protoninfa até deutoninfa a coloração passa de verde-claro para verde-escuro, e surgem manchas marrons no podossoma que podem atingir o opistossoma. Os adultos são predominantemente esverdeados ao emergirem e vão se tornando pardacentos à medida que envelhecem. Nessa fase, as manchas são bem visíveis e atingem praticamente toda a região dorso-lateral do ácaro.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da viabilidade, a duração dos estágios de desenvolvimento para cada sexo e a duração dos diferentes períodos da fase adulta de *T. mexicanus* mantido em folhas de pupunha.

Os diferentes estágios da fase imatura do ácaro mexicano apresentaram viabilidades superiores a

85%, porém o acúmulo das mortalidades nesses diferentes estágios levou a uma redução de aproximadamente 40% de sua população antes de atingirem a fase adulta, de maneira semelhante aos resultados observados por Sousa *et al.* (2010) utilizando *Annona squamosa* L. como hospedeira do ácaro.

As durações dos distintos estágios imaturos e do período ovo-adulto mostraram-se semelhantes para ambos os sexos e com valores bem próximos dos encontrados por Sousa *et al.* (2010) para *A. squamosa*, *A. muricata* L. e *A. coriaceae* Mart., porém ligeiramente inferiores aos encontrados por Paschoal (1968a) em *C. aurantifolia* para as durações médias dos períodos de ovo (6,5 dias), larva (5,5 dias) e protoninfa (4,5 dias) que promoveram o alongamento do período de ovo-adulto de *T. mexicanus* nesse hospedeiro.

Evidentes diferenças nas longevidades entre os sexos foram observadas, sendo a das fêmeas 2,4 vezes superior a dos machos, semelhantemente ao relatado por Paschoal (1968a). No entanto, Sousa *et al.* (2010) observaram valores bem superiores, variando de 18,9 a 24,9 dias para machos e 29,5 a 47,0 dias para fêmeas, além de um período de sobrevivência dos machos bem superior ao das fêmeas quando criados sobre diferentes espécies de *Annona*.

Os valores observados para o período de pré-oviposição pelos autores acima mencionados e neste trabalho sugerem não haver interferência marcante dos hospedeiros neste parâmetro. Por outro lado, as anonas utilizadas por Sousa *et al.* (2010) favoreceram o alongamento do período de oviposição (16,9 a 22,7 dias) quando comparados com os obtidos com folhas de pupunha (12,1 dias).

A capacidade de postura de *T. mexicanus* em pupunha se mostrou baixa e semelhante àquela observada em limão galego por Paschoal (1968a) quando comparadas com as posturas obtidas em folhas de diferentes espécies de *Annona* (38,9 a 98,9 ovos por fêmea) por Sousa *et al.* (2010). A diferença na produção de ovos pode ser resultado do efeito da espécie hospedeira, uma vez que tal efeito também foi observado por van de Vrie *et al.* (1972), quando fêmeas de *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval), *Tetranychus kanzawai* Kishida e *Tetranychus urticae* produziram de 15 a 128 ovos por fêmea e atingiram um máximo de postura de 42 a 204 ovos por fêmea quando foram criadas em diferentes hospedeiros.

A espécie hospedeira parece não afetar a razão sexual, pois entre as espécies de *Annona* esse valor foi de 0,9 e em pupunha foi de 0,8.

As posturas iniciaram um dia após o surgimento do primeiro adulto (Figura 1) e atingiram seu

**Tabela 1.** Viabilidade (%) e duração (média  $\pm$  EP) dos estágios de desenvolvimento para cada sexo e duração dos diferentes períodos da fase adulta do ácaro, número total de ovos por fêmea, número médio de ovos por fêmea por dia e razão sexual de *Tetranychus mexicanus* criado em folhas de *Bactris gasipaes*. Temp.: 25°C $\pm$ 1°C; UR 60% $\pm$ 10% e fotofase: 14 horas.

Parâmetros	Viabilidade		Duração (dias)						
	n	%	Macho			Fêmeas			
			n	M	DP	n	M	DP	
Biológicos									
Ovo	135	91,8	14	5,1	0,13	66	5,2	0,04	
Larva	115	89,5	14	2,4	0,12	66	2,6	0,80	
Protoninfa	108	92,8	14	2,4	0,14	66	2,9	0,13	
Deutoninfa	94	85,1	13	3,2	0,70	66	3,0	0,09	
Ovo-adulto	80	59,2	13	13,0	0,25	66	13,6	0,15	
Longevidade	-	-	13	7,1	1,08	62	16,7	0,91	
Pré-oviposição	-	-	-	-	-	62	2,0	0,10	
Oviposição	-	-	-	-	-	62	12,1	0,93	
Número total de ovos/fêmea	n	M	DP						
	62	9,5	0,66	-	-	-	-	-	
Número médio de ovos/fêmea/dia	62	0,8	0,25	-	-	-	-	-	
Razão Sexual	135	0,8		-	-	-	-	-	

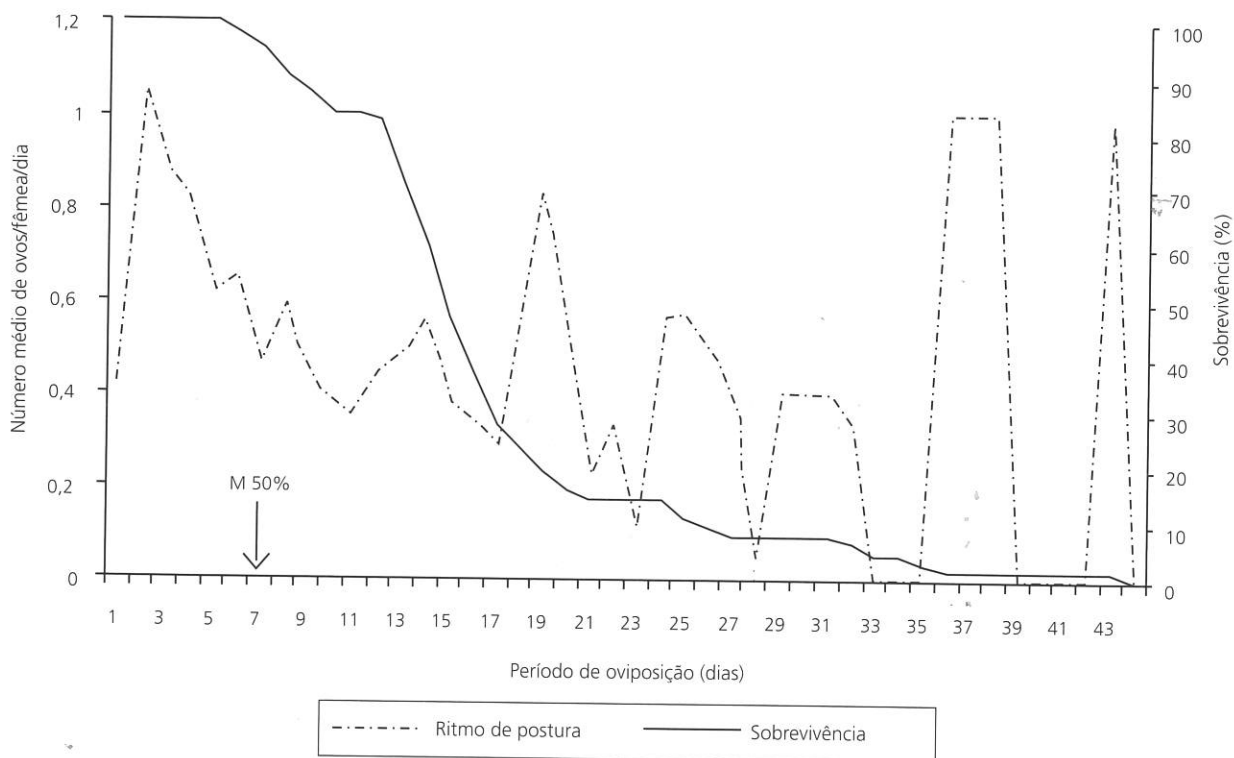
n: Número de indivíduos observados; M: Média; DP: Desvio-Padrão; UR: Umidade Relativa.

pico de 1,08 ovos/fêmea/dia no segundo dia do início da fase adulta do ácaro. Apesar do período de oviposição se estender por 43 dias, a partir do 32º dia uma única fêmea sobrevivente foi responsável pela postura de um único ovo nos 36º, 37º, 38º e 43º dias acarretando picos de 1,0 ovo/fêmea/dia. O crescimento da população depende da idade com que as fêmeas iniciam as posturas e da intensidade com que essas posturas acontecem. Nesse caso, com a pupunha, fêmeas de *T. mexicanus* iniciaram as posturas pouco tempo após a emergência dos adultos, porém o fizeram com pouca intensidade e com um número reduzido de fêmeas, pois somente metade da população se encontrava viva aos 20,5 dias do ciclo de vida dos ácaros (M 50%), correspondendo ao 7º dia após o início da fase adulta e apenas 1,6 dias antes do tempo médio para desenvolvimento de uma geração (T).

Os parâmetros biológicos da tabela de vida de fertilidade são apresentados na Tabela 2. Nela se observa que o tempo necessário para o desen-

volvimento de uma geração ( $T = 21,6$  dias) foi próximo dos observados por Souza *et al.* (2010) para a mesma espécie de ácaro em *A. muricata* e *A. squamosa* e pouco superior ao observado em *A. coriaceae*.

Os parâmetros relacionados ao aumento populacional  $R_0$  (3,7);  $r_m$  (0,06) e  $\lambda$  (1,06) observados em pupunha foram menores que aqueles encontrados por Sousa *et al.* (2010), para *T. mexicanus* em anonáceas. Esses mesmos autores consideraram suas observações semelhantes àquelas encontradas para outras espécies de ácaros pragas com elevados potenciais bióticos. A menor razão intrínseca de aumento observada em pupunha em relação às anonáceas pode estar relacionada ao efeito do hospedeiro, como sugeriu Teodoro & Reis (2006) para *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) criados em citros e cafeeiro. A baixa razão intrínseca de crescimento contribuiu para a ocorrência de uma taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) de apenas 3,7, valor que representa a taxa de crescimento da população



**Figura 1.** Ritmo de postura e sobrevivência de fêmeas de *Tetranychus mexicanus* em folhas de pupunha. M 50% - mortalidade de 50% da população correspondente ao 20,5 dia de desenvolvimento da população ou ao 7º dia após a primeira postura. Temperatura: 24º a 26ºC, 60 a 80% e Fotofase de 14 horas.

Nota: UR: Umidade Relativa.

**Tabela 2.** Parâmetros da tabela de vida de fertilidade de *Tetranychus mexicanus* criado em folhas de *Bactris gasipaes*. Temp.: 25°C±1°C; UR 60%±10% e fotofase: 14 horas.

Parâmetro	Valores
T	21,60
R <sub>0</sub>	3,70
r <sub>m</sub>	0,06
λ	1,06

Temp.: Temperatura; UR: Umidade Relativa.

a cada 21,6 dias. A razão finita de crescimento ( $\lambda$ ) de 1,06 indicou que a população cresceu a uma taxa diária de 6%, correspondendo a menos da metade da taxa crescimento observada nessa espécie em anonáceas (Sousa *et al.*, 2010).

Os resultados dos parâmetros de aumento populacional obtidos no presente estudo indicam que *T. mexicanus* não expressou alto potencial biótico quando criado sobre folhas de *B. gasipaes*, sugerindo que esse ácaro não pode causar dano econômico à pupunha, exceto em uma situação de desequilíbrio, com a eliminação de seus inimigos naturais, principalmente de seus predadores.

## REFERÊNCIAS

- Birch, L.C. (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, 17(1): 15-26.
- Bolland, H.R.; Gutierrez, J. & Flechtmann, C.H.W. (1998). World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Leiden: Brill.
- Clement, C.R. & Bovi, M.L.A. (2000). Padronização de medidas de crescimento e produção em experimentos com pupunhas para palmito. *Acta Amazônica*, 30(3):349-462.
- Couturier, G.; Tanchiva, E.; Inga, H.; Vásquez, J. & Riva R. (1996). Notas sobre los artrópodos que viven em el pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K.: Palmae) em La Amzonía peruana. *Revista Peruana de Entomología*, 39(1-3):135-42.
- Dominguez-Gil, O.E. & McPheron, B.A. (1992). Arthropods associated with passion fruit in western Venezuela. *Florida Entomologist*, 74(4):607-12.
- Flechtmann, C.H.W. (1967). Ácaros de plantas frutíferas. Piracicaba: USP. (Boletim Técnico Científico, 30).
- Flechtmann, C.H.W. & Baker, E.W. (1970). A preliminary report on the Tetranychidae (Acarina) of Brazil. *Annals of Entomological Society of America*, 63(1):156-63.
- Leite de Oliveira, C.A. (1987). Ácaros. In: Ruggiero, C. (Ed.). *Maracujá*. São Paulo: Legis Summa. p.104-10.
- Moraes, G.M. & Flechtmann, C.H.W. (2008). *Manual de acarologia*. Ribeirão Preto: Holos.
- Nakayama, K., Abreu, J.M. & Ferraz, E.C.A. (1987). Controle Químico do ácaro *Tetranychus mexicanus* (McGregor, 1950) em mudas de cacaueteiro. *Revista Theobroma*, 17(1):9-16.
- Paschoal, A.D. (1968a). Sobre a biologia do ácaro *Tetranychus mexicanus* (Acarina: Tetranychidae): notas prévias. *O Solo*, 60(1):67-70.
- Paschoal, A.D. (1968b). Um ácaro parasita de plantas frutíferas: *Tetranychus mexicanus* (Acarina: Tetranychidae). *O Solo*, 60(2):75-7.
- Quiros-Gonzales, M. (2000). Phytophagous mite populations on Tahiti lime, *Citrus latifolia*, under induced drought conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 24(12):897-904.
- Reis, P.R.; Alves, E.B. & Sousa, E.O. (1997). Biologia do ácaro-vermelho do cafeeiro *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917). *Ciência e Agrotecnologia*, 21(3):260-6.
- Reis, P.R.; Chiavegato, L.G. & Alves, E.B. (1998). Biologia de *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27(2):185-91.
- Sousa, J.M.; Gondim Jr., M.G.C. & Lofego, A.C. (2010). Biologia de *Tetranychus mexicanus* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) em três espécies de Annonaceae. *Neotropical Entomology*, 39(3):319-23.
- Stein, C.P. & Daólio, N. (2004). Biologia de *Tetranychus mexicanus* (McGregory) (Acari, Tetranychidae) em folhas de pupunha (*Bactris gasipaes*). *Anais do XX Congresso Brasileiro de Entomologia - XX CBE*. Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil. v.1, p.168.
- Teodoro, A.V. & Reis, P.R. (2006). Reproductive performance of the mite *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) on citrus and coffee, using life table parameters. *Brazilian Journal Biology*, 66(3):899-905.
- van de Vrie, M.; McMurtry, J.A. & Huffaker, C.B. (1972). Ecology of Tetranychid mites and their natural enemies: a review III - biology, ecology and pest Status and host-plant relation of Tetranychids. *Hilgardia*, 41:342-432.
- Vasconcelos, G.J.N. & Silva, N.M. (2011). Tetraniquídeos (Acari: Tetranychidae) em plantas cultivadas e daninhas na região de Manaus, Amazonas. *Anais do III Simpósio Brasileiro de Acarologia - III SIBAC*. Campinas: Instituto Biológico. Disponível em: <www.sibac.net.br/resumosarea.html>. (acesso: 16 ago. 2011).

Recebido em: 6/6/2011

Versão final reapresentada em: 11/11/2011

Aprovado em: 13/12/2011



ARTIGO | ARTICLE

## A pesca esportiva e o pesque-e-solte: pesquisas recentes e recomendações para estudos no Brasil

*Recreational fishing and catch-and-release: recent studies and recommendations for studies carried out in Brazil*

Paulo de Tarso Chaves<sup>1</sup>

Kátia Meirelles Felizola Freire<sup>2</sup>

### RESUMO

Este trabalho apresenta uma breve revisão a respeito do pesque-e-solte com o objetivo de informar sobre os principais problemas e soluções associados a essa atividade que vêm sendo discutidos nos últimos anos, colocando o Brasil dentro desse contexto. A liberação do peixe é considerada uma atitude nobre, de fundo conservacionista, levando muitos a proporem o fechamento de algumas áreas para a pesca comercial e manutenção apenas da pesca esportiva. Porém, há muito ainda que se conhecer com relação aos efeitos de tal prática, principalmente porque estudos sobre a sobrevivência pós-soltura são mais comuns em ambientes continentais do que em ambientes marinhos. As pesquisas atuais concentram-se na avaliação do bem-estar dos peixes liberados, na prevenção do seu estresse ou mortalidade e, mais recentemente, na discussão de aspectos éticos do pesque-e-solte. Algumas práticas bem estabelecidas têm sido mostradas ineficientes; outras devem sempre ser consideradas a depender do tipo de ambiente e da espécie. No Brasil, o conhecimento técnico-científico sobre o assunto ainda é incipiente e também concentrado em pesquisas realizadas no ambiente continental. A utilização do pesque-e-solte como medida de gestão não deve ser vista como uma panacea, aplicável a quaisquer condições. Recomenda-se uma análise de medidas precautórias para situações comuns em países em desenvolvimento ou economias em transição.

**Palavra-chave:** Ética na pesca. Injúrias em peixes. Pesca amadora.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia. Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: P.T. CHAVES. E-mail: <ptchaves@ufpr.br>.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Núcleo de Engenharia de Pesca. São Cristóvão, SE, Brasil.



## ABSTRACT

*This paper presents a brief review of catch-and-release. Its objective is to provide information about the main problems and solutions associated with this practice that have been discussed in recent years, and placing Brazil within this context. Releasing fish is considered to be a noble gesture, a conservationist approach. Based on this assumption, many have even proposed that some areas should be closed to commercial fishing and open exclusively to recreational fishers. However, many of the effects of this practice remain unknown, mainly if we consider that most studies on post-release mortality have been carried out in fresh water. Current research has focused on the assessment of the well-being of the released fish, the prevention of stress or mortality and, more recently, on the ethical aspects of catch-and-release. Some very well-established practices have been shown to be inefficient; others should be used according to habitat and species. In Brazil, technological and scientific knowledge on this subject is in its infancy and, moreover, it is focused on studies carried out in freshwater habitats. The use of catch-and-release as a management tool should not be seen as a panacea for all situations. We recommend an analysis of preventive measures applied to similar conditions observed in developing countries or economies in transition.*

**Key words:** Fishing ethics. Fish injuries. Recreational fishing.

## INTRODUÇÃO

A soltura de peixes imediatamente após a captura é usual na pesca esportiva ou amadora. Não se sabe ao certo quando a atividade teve início. Policansky (2008) considera que seja uma atividade tão antiga quanto a própria pesca. De acordo com Tufts *et al.* (2000), o pesque-e-solte já vinha sendo proposto desde 1870, mas sua efetiva utilização na América do Norte, como medida de conservação, somente começou a ser considerada a partir do final da década de 40 e início da década de 50. Barnhart (1989) cita que a primeira ocorrência data de 1954, no Great Smoky Mountains National Park, nos Estados Unidos da América. A partir daí, muitos países têm promovido tal prática. Ao longo desse período, diversas mudanças foram observadas no perfil dos pescadores esportivos e das artes de pesca por eles utilizadas (Radonski, 2002). As motivações podem ser o mero descarte de algo que não era o alvo; o cumprimento de normas legais sobre tamanho, espécie ou cota; o atendimento às regras de um torneio; ou a expectativa de, por tal ato, o pescador colaborar com a proteção à fauna e ao meio-ambiente. De fato, avalia-se a liberação do peixe como sendo uma atitude nobre, de fundo

conservacionista. Ela é ensinada para crianças (O'Bryant, 2011) e incentivada em programas de difusão leiga (Hogan, 2011).

No Brasil, a prática é comum entre pescadores de robalos (*Centropomus* spp.) e dourados (*Salminus* sp.), bem como entre os de beira de praia (exemplares pequenos, bagres, baiacus) e oceânicos (Istiophoridae). No país, a legislação já vinculou "Pesca Esportiva" à prática do pesque-e-solte (Portaria IBAMA nº 4, de 19 de março de 2009, Art. 2º). De fato, em questionários associados às licenças de pesca, cerca de 70% dos pescadores esportivos brasileiros declaram praticar o pesque-e-solte algumas vezes, e 20%, sempre (Freire *et al.*, 2011). Considerando-se que - na estimativa destes autores - o número de pescadores supera um milhão, tem-se vertiginosa incidência de peixes sendo sucessivamente capturados e soltos no mar e rios brasileiros.

Bartholomew & Bohnsack (2005) e O'Toole *et al.* (2010) oferecem duas boas compilações de estudos sobre o pesque-e-solte no mundo. A primeira ressalta as pesquisas a respeito da sobrevivência pós-soltura; a segunda registra que o maior conhecimento disponível é com relação ao ambiente



continental, não ao marinho. Em 2011 a *VI World Recreational Fishing Conference (WRFC)*, realizada em Berlim, Alemanha, trouxe a público os últimos resultados de pesquisas em países europeus, na América do Norte e na Austrália. Os trabalhos concentraram-se na avaliação do bem-estar dos peixes liberados, no estudo de procedimentos preventivos à sua mortalidade ou estresse, e na inovação quanto à discussão de aspectos éticos dessa pescaria.

No Brasil, o conhecimento técnico-científico sobre o assunto é incipiente. Há informação disponível sobre as taxas de mortalidade pós-soltura para a cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (70,0%), o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (46,0%), e o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (0,0%), referentes ao Pantanal - Mato Grosso do Sul (Capistrano-Santana *et al.*, 2007 - apenas reproduzidos aqui os resultados para  $n > 20$ ). Também em 2007, Gorgati apresentou um trabalho com crítica contundente à prática do pesque-e-solte. Recentemente, Carvalho *et al.* (2011) divulgaram resultados de resposta dos peixes a solturas havidas na pesca esportiva no Rio Negro, Amazonas e Lopes (2011) noticiou, após estudo com tucunarés, as seguintes taxas de mortalidade pós-soltura: *Cichla temensis* (7,1%), *C. monoculus* (2,4%) e *C. orinocensis* (0,0%).

O presente artigo constitui-se numa síntese comentada dos resultados apresentados na VI WRFC, objetivando motivar a elaboração de projetos para investigação técnico-científica em águas interiores e marinhas brasileiras. São pesquisas que, se realizadas, subsidiarão a legislação brasileira e ensejarão o delineamento de procedimentos responsáveis para a prática da pesca esportiva no País.

## A abordagem ictiológica

Muitos pescadores ignoram os impactos subletais do pesque-e-solte, avaliando que o dano ao peixe restringe-se ao tempo de manuseio fora d'água e que o único risco é o de morte por asfixia. Os resultados apresentados na VI WRFC expõem

algumas das outras variáveis, tanto biológicas como éticas, que devem ser consideradas.

1) *Barotrauma*: a captura de um peixe, seja com anzol, seja com rede ou armadilha, não passa inerte ao indivíduo. Hall *et al.* (2011) registraram no siluriforme dulceaquícola *Tandanus tandanus* uma reação tanto maior quanto maior for a profundidade de onde é retirado. Envolve exoftalmia, expulsão de ovócitos e danos à bexiga natatória.

2) *Tipo de isca*: alguns estudos têm indicado que o uso da isca viva aumenta a mortalidade dos peixes capturados após a soltura. Porém, de acordo com Pope *et al.* (2011), as consequências não são diretas, assim como não o é o efeito da temperatura. No entanto, a sugestão da utilização de iscas artificiais, com vistas a diminuir a mortalidade pós-soltura, parece ser um denominador comum entre os pesquisadores que tratam do pesque-e-solte (Cooke & Suski, 2005).

3) *Efeito do anzol*: tampouco a imediata soltura do animal neutraliza os danos. No estudo de Cline *et al.* (2011), nos casos em que o anzol permanecia no interior do indivíduo, os níveis de atresia ovocitária aumentavam. Em pesquisa experimental, McGrath (2011) testou o grau de oxidação sofrido por anzóis com diferentes proporções de níquel e aço, e com Raios-X acompanhou a trajetória dos mesmos no interior dos indivíduos. Anzóis com maior proporção de níquel alcançaram maior grau de ejeção, resultado alvissareiro, pois nenhum dos exemplares que ejetou o anzol morreu. Também o local de fixação do anzol no indivíduo é relevante: no estudo de Pope *et al.* (2011) essa variável faz a chance de sobrevivência variar de 44 a 98%. Na pesca recreativa na Suíça, anzóis com projeções laterais (barbelas ou farpas) são proibidos (Hertig, 2011).

4) *Condições da água na soltura*: muitos creem que o animal sob estresse requererá disponibilização adicional de oxigênio. Todavia, segundo experimento de Suski *et al.* (2011), a introdução suplementar de oxigênio na água é ineficaz, pois sob hiperóxia outros distúrbios são constatados. Com efeito, Danylchuk *et al.* (2011) observaram que

o tempo de manuseio pode não ter consequências tão negativas quanto o estresse térmico do retorno à água. Sob tais condições, no tubarão-limão, a alteração nos níveis de lactato e potássio no sangue foi significativa, pelo quê os autores recomendam que se evite capturar tubarões juvenis em épocas e locais com água quente. Saliente-se, ainda, que Wilde (2009) condena o processo de ventilação no momento da liberação do peixe, principalmente se proveniente de águas mais profundas.

5) *Protocolo de liberação do peixe*: pode-se questionar se é melhor retornar à água um peixe de cada vez, à medida que eles são pescados, ou vários exemplares simultaneamente. No predador *Esox lucius*, o procedimento de soltura foi testado por Stalhammar *et al.* (2011). A liberação de indivíduos isolados levava à apatia na busca por alimento, com consequente redução na ingestão. Inversamente, na soltura em grupo, a atividade alimentar aumentava, porém acrescida de comportamento agonístico dos indivíduos.

## A abordagem ética

Apesar dos impactos traumáticos e fisiológicos sobre o peixe, é esperado que ele sobreviva ao pesque-e-solte. Em estudo de longo prazo com *Micropterus salmoides* nos Estados Unidos, Cline *et al.* (2011) registraram recapturas de um mesmo indivíduo por até 12 vezes, com intervalos entre 1 e 98 dias após a captura imediatamente anterior. Mesmo assim, cabe refletir sobre a legalidade e a ética desta prática.

Provocar dor desnecessária em animais contraria a lei em muitos países, como na Alemanha, onde o "custo ético" é discutido por Olaussem (2011). No Brasil, a Lei 9.605 - Crimes ambientais, artigo 32, proíbe *praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres...* Paradoxalmente, a legislação também estimula o pesque-e-solte, como exemplificam (i) a Resolução 016/2009 da Secretaria do Meio-Ambiente do Estado do Paraná, Art. 1º: Proíbe a pesca nos meses de novembro e dezembro das espécies.... Parágrafo único - Permitir-se-á neste

período somente a prática da modalidade pesque-e-solte...; e (ii) a Instrução Normativa nº 49, de 27/10/05, do IBAMA, que nos rios de Mato Grosso que compõem a Bacia do Araguaia, de 1 a 28 de fevereiro, será permitida apenas a pesca amadora na modalidade pesque-e-solte. Arlinghaus *et al.* (2009) recomendam que se evite a utilização de abordagens centradas na dor, uma vez que não há consenso sobre o fato dos peixes sentirem dor ou não, e que se passe a considerar indicadores fisiológicos, comportamentais ou de condição física dos peixes capturados e liberados (considerados critérios mais objetivos).

Assim, orientação aos pescadores sobre práticas responsáveis para o pesque-e-solte é recomendada por Faria *et al.* (2011) e Hall *et al.* (2011). De fato, no momento em que a vida selvagem tem sido vista com crescente respeito e admiração, e sua função como alimento vem progressivamente sendo substituída pela de animais de companhia, Arlinghaus & Riepe (2011) receiam que a agressão causada pelo anzol desperte sentimentos antipesca- dores. Na Suíça, o pesque-e-solte intencional, ou seja, quando não associado a tamanho ou espécie de captura ilegal, é proibido (Hertig, 2011). Uma questão controversa, pois se é permitido matar o animal para comê-lo, por que se interditaria mantê-lo vivo?

## RECOMENDAÇÕES

No Brasil, a lacuna de estudos é evidente. Um guia para a prática do pesque-e-solte (Ceccarelli *et al.*, 2006), documento genérico e de aplicação possível a várias espécies, é uma importante referência local. Entretanto, falta o conhecimento de atributos quali-quantitativos, da reação das espécies nativas ao trauma experimentado, e do exato amparo legal para essa prática.

A utilização do pesque-e-solte como medida de gestão não deve ser vista como uma panacea, aplicável a quaisquer condições. Recomenda-se uma análise de medidas precautórias para situações

comuns em países em desenvolvimento ou economias em transição em que a ausência de informações detalhadas não permitam uma decisão direta. Cooke & Suski (2005) constituem uma boa referência para o tema.

Para a elaboração de um protocolo de boas práticas, que reduzam o impacto ambiental e elevem o substrato ético da pescaria no Brasil, recomendam-se pesquisas sobre:

*Quantificação dessa prática:* Vølstad *et al.* (2011) contabilizaram na Noruega 605 mapas de bordo a partir de 4000 barcos. Foram ignorados os pescadores desembarcados por, segundo os autores, envolver alto custo e representar relativamente pouco na captura. Não é a realidade brasileira, onde estudos com pesca recreativa não devem prescindir da consulta aos pescadores de beira de praia, provavelmente mais numerosos que os embarcados.

*Tipificação e atributos de anzóis e iscas:* assim procederam O'Toole *et al.* (2010) nas Bahamas, investigando tipos de isca e de anzol, local de fixação no peixe e o conseqüente tempo de manuseio.

*Avaliação dos efeitos letais e subletais:* até o momento, no Brasil, apenas os efeitos letais do pesque-e-solte têm sido considerados, não havendo nenhuma referência aos subletais. Particularmente, deve-se considerar o efeito da elevada temperatura da água sobre ambos, uma vez que a maior parte dos estudos desse tipo têm sido feitos para espécies de águas continentais de temperatura inferior àquela de região tropical.

## AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## REFERÊNCIAS

Arlinghaus, R. & Riepe, C. (2011). Do shifts in wildlife value orientations affect the moral acceptability of recreational fishing in post-industrialized societies? Book of Abstracts. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

Arlinghaus, R.; Schwab, A.; Cooke, S.J. & Cowx, I.G. (2009). Contrasting pragmatic and suffering-centred approaches to fish welfare in recreational angling. *Journal of Fish Biology*, 75:2448-63.

Barnhart, R.A. (1989). Symposium review: catch-and-release fishing, a decade of experience. *North American Journal of Fish Management*, 9(1):74-80.

Bartholomew, A. & Bohnsack, J.A. (2005). A review of catch-and-release angling mortality with implications for no-take reserves. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2):129-154. doi: 10.1007/s11160-005-2175-1.

Capistrano-Santana, A.; Catella, A.C.; Eaton, D. & Marques, D.K.S. (2007). Pesque-e-solte: sobrevivência inicial dos peixes devolvidos ao rio no Pantanal. *Anais do XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 2007, Itajaí.

Carvalho, Á.; Sardelli, C.H.; Souza, M.J. & Forsberg, B.H. (2011). Os ferimentos e o tempo de manuseio dos tucunarés (*Cichla* spp.) capturados na modalidade pesque e solte: um estudo de caso no médio rio Negro, Amazonas, Brasil. *Anais do XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 2011, Manaus.

Ceccarelli, P.S.; Cantelmo, O.A. & Melo, J.S.C. (2006). Sobrevivência de peixes capturados na modalidade pesque-e-solte em viveiros de pesca. *Boletim Técnico do CEPTA*, 18:19-28.

Cline, T.; Kitchell, J.; Weidel, B. & Hodgson, J. (2011). Growth response to catch-and-release angling in wild largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

Cooke, S.J. & Suski, C.D. (2005). Do we need species-specific guidelines for catch-and-release recreational angling to effectively conserve diverse fishery resources? *Biodiversity Conservation*, 14:1195-209.

Danylchuk, A.; Cooke, S.; Mandelman, J. & Suski, C. (2011). Effects of catch-and-release angling on the physiology and behaviour of juvenile lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in The Bahamas. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

Faria, F.; Sutton, S.; Simpfendorfer, C.; Tobin, R. & Awruch, C. (2011). Effects of recreational fishing on sharks in the Great Barrier Reef Marine Park. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

Freire, K.; Machado, M.L. & Crepaldi, D. (2011). Recreational fishery in Brazil. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

Gorgati, E.C.A.S. (2007). *Pesca esportiva: crueldade consentida e a glamourização do lazer na Terra da Gente*. Dissertação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Centro Universitário de Araraquara.

Hall, K.; Broadhurst, M.; Butcher, P. & Rowland, S. (2011). Sublethal effects of angling and release on two Australian native freshwater fish. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.

- Hertig, A. (2011). The struggle of Swiss anglers with the new animal protection law: a juristic overkill? *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Hogan, Z. (2011). The intersection of recreational fisheries and the world's freshwater megafish: coexistence, conservation or extinction? *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Lopes, K. (2011). Análise preliminar da taxa de mortalidade em tucunarés *Cichla* spp. (Teleostei: Cichlidae) submetidos ao sistema pesque-e-solte na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã (RDSA). *Anais do XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 2011, Manaus.
- McGrath, S. (2011). The fate of mullet (*Argyrosomus japonicus*) after ingesting conventional and modified stainless- and carbon-steel hooks. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- O'Bryant, R. (2011). Teach a child to fish. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- O'Toole, A.C.; Danylchuk, A.J.; Suski, C.D. & Cooke, S.J. (2010). Consequences of catch-and-release angling on the physiological status, injury, and immediate mortality of great barracuda (*Sphyrna barracuda*) in The Bahamas. *ICES Journal of Marine Science*, 67(8):1667-75. doi: 10.1093/icesjms/fsq090.
- Olaussem, J. O. (2011). Catch and release: Economics trumps biology trumps ethics? *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Policansky, D. (2008). Trends and developments in catch-and-release. In: Aas O. (Ed.). *Global challenges in recreational fisheries*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Pope, K.; Martin, D. & Wilde, G. (2011). Angler choice of terminal tackle and water depth. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Radonski, G.C. (2002). History and application of catch-and-release fishing: the good, the bad, and the ugly. In: Lucy, S.A. & Studholme, A.L. (Ed.). *Catch and release in marine recreational fisheries*. American Fisheries Society Symposium, 2002, Bethesda.
- Stalhammar, M.; Linderfalk, R.; Brönmark, C.; Arlinghaus, R. & Anderes-Nilsson, P. (2011). Short-term effects of catch-and-release angling on pike (*Esox lucius*) behaviour. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Suski, C.; Shultz, A.; Murchie, K.; Griffith, C.; Cooke, S.; Danylchuk, A. & Goldberg, T. (2011). Impacts of dissolve oxygen on the behaviour and physiology of bonefish: implications of live-release angling tournaments. *Proceedings of the VI World Recreational Fishing Congress*, 2011, Berlin.
- Tufts, B.L.; Davidson, K. & Bielak, A.T. (2000). Biological implications of "catch and release" angling of Atlantic Salmon. In: Whoriskey Jr., F.G. & Whelan, K.E. (Ed.). *Managing Wild Atlantic Salmon: new challenges - new techniques*. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Atlantic Salmon Symposium*, 1997, Ireland. p.195-227.
- Vølstad, J.H.; Korsbrekke, K.; Nedreaas, K.H.; Nilssen, M.; Nilsson, G.N.; Pennington, M. et al. (2011). Probability-based surveying using self-sampling to estimate catch and effort in Norway's coastal tourist fishery. *ICES Journal of Marine Science*, 68(8):1785-91.
- Wilde, G.R. (2009). Does venting promote survival of released fish? *Fisheries*, 34(1):20-28.

Recebido em: 7/10/2011

Versão final reapresentada em: 16/2/2012

Aprovado em: 28/3/2012



ARTIGO | ARTICLE

## Atividade alimentar do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887) criados em tanques rede

*Feeding activity of the pacu Piaractus mesopotamicus Holmberg (1887)  
reared in fish cages*

Fabrcio José Ferreira<sup>1</sup>  
Carlos Alberto da Silva<sup>2</sup>

### RESUMO

O pacu é um dos peixes brasileiros de maior importância comercial na pesca e na aquicultura, o interesse em conhecer o comportamento fisiológico dessa espécie fundamenta-se no contexto de que o pacu é uma espécie de clima tropical, que se alimenta preferencialmente de frutas, apresentando padrões nutricionais especeficos, além de uma grande capacidade para armazenar gordura. Foi estudado, dentro de um período de 24 horas, o comportamento alimentar do pacu criado em tanque rede. As coletas ocorreram a cada 4 horas, nesse período 6 peixes foram mortos e amostras de sangue foram coletadas para avaliaao do perfil lipídico e glicemico. A seguir, amostras do fígado e músculos foram coletadas e direcionadas para avaliaao das reservas glicogênicas, através de métodos de uso laboratorial. Para a análise estatística foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que as reservas glicogênicas hepáticas e musculares foram significativamente diferentes dentro do período de coleta apresentando maiores valores na transiao da manhã para a tarde e subsequente decaimento ao transcorrer da tarde para a noite. Com relaao a glicemia, foi observada elevaao na interface da tarde para a noite. De forma antagonica, o perfil lipídico mostrou dinâmica inversa, apresentando elevaao na transiao da tarde para a noite e reduao no período mautino. Os resultados mostram perfis diferenciados na mobilizaao das reservas energéticas variando de acordo com o período do dia/noite, e decorrendo das particularidades metabólicas do pacu na interaao com o meio ambiente e disponibilidade de alimento.

**Palavras-chave:** Metabolismo. Pacu. Piscicultura. Reserva de glicogênio.

<sup>1</sup> Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Ciências da Saúde. Rod. do Aucar, km 156, 13400-911, Piracicaba, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: F.J. FERREIRA. E-mail: <fajferre@unimep.br>.

<sup>2</sup> Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduaao em Fisioterapia. Piracicaba, SP, Brasil.



## ABSTRACT

The pacu is one of the most important Brazilian fish for commerce and aquaculture. Interest in the physiological behavior of this species is based on the context that the pacu is a tropical species, which has a preference for fruit and presents specific nutritional patterns as well as having a large capacity to store fat. Over a period of 24 hours, the feeding behavior was studied of pacu reared in fish cages. Catches were performed every 4 hours; 6 fish were sacrificed and blood samples were collected to determine the lipid and blood glucose plasma concentration. Then the liver and muscle samples were collected and used to evaluate the glycogen reserves, using laboratory methods. For the purposes of statistical analysis, the Shapiro-Wilk normality test was carried out, followed by the Tukey post-test ( $p < 0.05$ ). The results showed that the liver and muscle glycogen reserves were significantly different during the period of analysis, showing higher values in the transition from morning to afternoon and a subsequent decline from afternoon to nighttime. With regard to blood glucose, elevated levels were observed at the passage from afternoon to nighttime. On the other hand, the lipid profile showed inverse dynamics, presenting with an increase in the period of transition from afternoon to night and a decrease during the morning period. The results show different profiles in the mobilization of energy reserves, varying according to time of day/night, and resulting from the metabolic peculiarities of the pacu in its interaction with the environment and availability of food.

**Key words:** Metabolism. Pacu. Fish farming. Glycogen reserves.

## INTRODUÇÃO

Os peixes ocupam nichos ecológicos extremamente diversificados e possuem hábitos alimentares definitivamente diferenciados, tais como os peixes serrasalmíneos (pacu e tambaqui - frugívoros), os salmonídeos e os esturjões (carnívoros) que sofrem, igualmente, longos períodos de privação alimentar durante o seu ciclo de vida normal. A possibilidade de estudar tais extremos, ecológico e metabólico, é de longa data, conhecida como o fator responsável pela seleção dos peixes (Mommensen & Plisetskaya, 1991).

Na piscicultura a alimentação adequada do plantel proporciona o bom desenvolvimento das espécies, além de um expressivo ganho na produção, no entanto, existe um alto grau de desconhecimento das características ecofisiológicas de algumas espécies dificultando a exploração de resultados obtidos em ensaios experimentais. Esta dificuldade muitas vezes está baseada na própria condição geográfica ocupada pelos países tropicais, como o Brasil, devido

à grande diversidade de disponibilidade de alimentação (Souza *et al.*, 2003).

Para se ter êxito na produção de peixes, com bom desenvolvimento e rentabilidade no cultivo, é necessário um fornecimento adequado na quantidade e qualidade das dietas (Carneiro *et al.*, 1994).

O estado nutricional de um organismo está intimamente relacionados à taxa metabólica, condição que determina se o animal está em processo fisiológico de manutenção, catabolismo ou anabolismo (Souza, 1994). No que se refere as respostas metabólicas, desencadeadas por diferentes espécies de peixe, frente a flutuação na disponibilidade de alimentos, o padrão mostra-se extremamente variável, uma vez que, em situações de baixa disponibilidade são ativadas reações sequenciais promovendo a mobilização de suas reservas acumuladas. Por outro lado, quando eleva-se a disponibilidade de substratos metabolizáveis os sistemas formadores de reserva são ativados.

O pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 e o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier,



1818, peixes da sub-família Serrasalminae, estão entre os teleosteos mais difundidos na Piscicultura da América do Sul (Saint Paul, 1986; Cyrino *et al.*, 2004). Esses animais necessitam armazenar substratos energéticos para manutenção de grandes migrações, e têm despertado o interesse de cientistas dedicados aos estudos de estratégias metabólicas (Jomori *et al.*, 2005).

No ambiente natural, o ciclo de vida dos serrasalmíneos está estreitamente correlacionado com períodos de intensa ingestão de carboidratos. Durante a estação chuvosa eles permanecem nas zonas de inundação onde se alimentam intensivamente de frutas, sementes e castanhas e durante a estação seca, permanecem confinados no leito do rio, com reduzida disponibilidade alimentar. Por isso, o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, apresenta-se como um interessante modelo para o estudo da utilização de carboidrato na dieta e avaliação de seu metabolismo, considerando que a dieta natural da espécie inclui sementes e frutos, ricos neste nutriente (Menton, 1989).

A identificação dos sistemas reguladores do metabolismo, para espécies com grande habilidade para utilizar dietas ricas em carboidratos como fonte de energia e alta tolerância à glicose, são de grande importância para o conhecimento da atividade biológica (Figueiredo-Garutti *et al.*, 2002). O pacu é um dos representantes dos Ostariophysi que estão entre os peixes de maior valor comercial, na pesca e na piscicultura brasileira. Entretanto, muito pouco tem sido publicado a respeito das inter-relações fisiológicas entre a espécie e o meio ambiente. Assim, conhecer as variações circadianas no manuseio de substratos metabolizáveis se preenche de suma importância para a manutenção e estratégia de tratamento do plantel.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil da atividade alimentar num ciclo de 24 horas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criado em tanque rede, no intuito de contribuir para o conhecimento do comportamento da espécie e fornecer subsídios para uma futura geração de tecnologias relacionadas ao manejo em sistemas de piscicultura intensiva.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) coletados no centro de Piscicultura localizado no estado de São Paulo (latitude 23°52'46" Sul e longitude 44°26'33" Oeste). Foram realizadas coletas durante os meses de setembro, outubro e novembro de 2008. Os peixes foram mantidos em tanque rede com 8m<sup>3</sup> sendo este povoado com 50 animais submetidos a ciclo de alimentação com dieta contendo 35% de proteína bruta oferecida no período da manhã (7h). Em cada período foram coletados 6 peixes sequencialmente a cada 4 horas (8,12,16,20,24,4 horas). Para amostragem, os animais foram rapidamente retirados do tanque com auxílio de uma rede e colocados em um recipiente contendo eugenol (0,04ml/L de água) cuja indução da anestesia ocorre entre 1 a 5 minutos não sendo necessário o uso de luvas. Após parada de movimentação espontânea amostras de sangue coletadas da artéria caudal foram centrifugadas e o plasma isolado para avaliação da concentração plasmática de glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres, através de *kit* de aplicação laboratorial. Para eutanásia, utilizou-se dose elevada de anestésico. A seguir amostras do fígado e de músculos branco e vermelho (linha mediana dos animais) foram direcionados para avaliação do conteúdo de glicogênio através do método do fenol sulfúrico segundo Siu *et al.* (1970). Os valores estão expressos como médias e error padrão epm, n=24. Para a análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados conforme orientações de Ética na Experimentação Animal (Andersen *et al.*, 2004).

## RESULTADOS

Inicialmente foram avaliadas as alterações físico-químicas da água onde os animais estavam alocados tendo como eixo de análise a lâmina da água e a região mais profunda do tanque, onde foi verificada estabilidade nos parâmetros avaliados,

uma vez que, não foi observada diferença no pH, na temperatura e nem no teor de oxigênio dissolvido. Cabe ressaltar que o tanque rede atingia a profundidade de 8m, permitindo o livre fluxo de deslocamento dos animais. A seguir, passou-se a avaliar as condições meteorológicas no período das coletas sendo constatado um padrão de homogeneidade dos parâmetros, não apresentando valores estatisticamente diferentes como indicado na Tabela 1.

Dentro da proposta em tela, foi avaliada a partir do perfil de 24 horas, a dinâmica do peixe em armazenar glicogênio no tecido hepático. Assim, esta avaliação realizada no período matutino, as 8h, mostrou reservas 120,0% maiores se comparadas às observadas as 4 horas. No mesmo contexto, as amostras coletadas no período vespertino, as 12h, apresentaram-se 6,0% maiores do que a amostra anterior. Por outro lado, as amostras coletadas as 16h diferenciaram-se das avaliações anteriores, uma vez que, foi observada uma redução de 32,0% nas reservas. Este padrão de redução das reservas foi replicado na análise das amostras coletadas no período noturno, subsequentes as 20, 24 e 4h, nos quais as reservas apresentaram-se reduzidas em 28,0%, 8,0% e 7,5%, respectivamente (Figura 1).

Uma vez que, as características fisiológicas da espécie estão ligadas à movimentação contínua do animal no tanque em busca de alimento, a

avaliação das reservas glicogênicas musculares, se reveste de fundamental importância. Nesse contexto, foram avaliadas as reservas do músculo branco, o qual mostrou um comportamento de distribuição de forma homogênea, assim, esse músculo exibiu o seguinte perfil, a saber: entre as 4h e 8h as reservas foram elevadas em 60%; entre as 8h e 12h houve elevação de 25%, por sua vez, as amostras coletadas as 16h apresentaram redução de 10%; as 20h a redução atingiu 16%; as 24h a redução continuou a progredir chegando a 13% e por fim as 4h as reservas foram ainda mais reduzidas atingindo valores 30% menores (Figura 2).

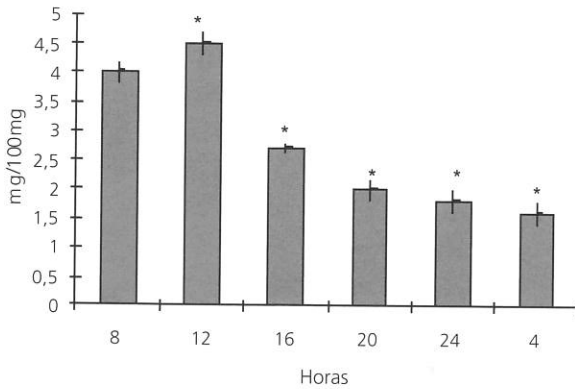
Uma característica peculiar dos peixes se refere à presença de músculo vermelho na linha lateral, fato sugestivo para a avaliação do comportamento das reservas glicogênicas nesta tipagem de fibra. Assim, ao avaliar o conteúdo de glicogênio, verificou-se que o músculo vermelho se comporta diferentemente do músculo branco, uma vez que, as 8h o nível de glicogênio apresentou-se elevado em 87,5% se comparado com o apresentado as 4h. No entanto, a partir daí, foi observada redução nas reservas atingindo 12,0%, 18,0%, 12,0%, 8,0% e 13,0%, respectivamente as 12h, 16h, 20h, 24h e 4h como pode ser observado na Figura 3.

Com relação à análise do perfil bioquímico iniciou-se pela avaliação da concentração

**Tabela 1.** Características ambientais no período da coleta. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. São Paulo (SP), 2007-2008.

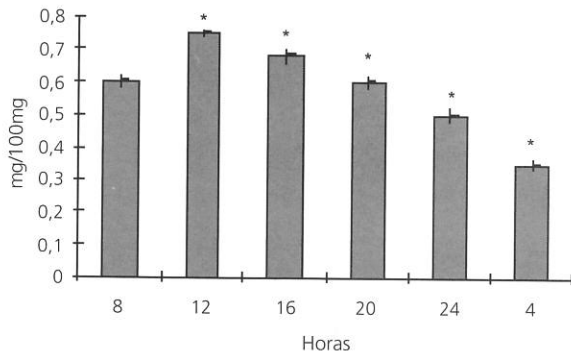
Período da coleta	Radiação Solar Global cal/cm.d	Insolação h/d	Precipitação mm	Temperatura		
				Máximo °C	Mínimo °C	Média °C
Setembro 2007	444	7,5	1,9	31,3	15,2	23,2
Outubro 2007	467	6,9	92,6	32,4	17,3	24,9
Novembro 2007	462	6,1	120,3	28,8	17,4	23,1
Total	M=457 EPM=6,9	M=6,8 EPM=0,4	M=71,6 EPM=35	M=23,8 EPM=8,2	M=16,6 EPM=0,7	M=23,7 EPM=0,5
Setembro 2007	456	7,6	46,1	27,1	13,3	20,2
Outubro 2008	445	5,9	108,7	29,5	17,6	23,5
Novembro 2008	522	7,4	24,3	30,1	17,6	23,9
Total	M=474 EPM=24	M=6,9 EPM=0,5	M=59,7 EPM=25	M=28,9 EPM=0,9	M=16,1 EPM=1,4	M=22,5 EPM=1,1

M: Média, EPM: Erro-Padrão da Média.



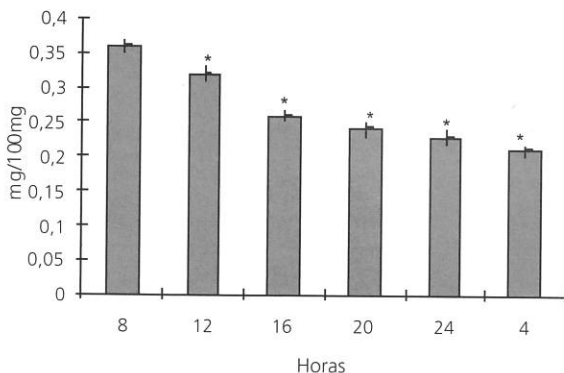
**Figura 1.** Conteúdo hepático de glicogênio (mg/100mg) do pacu (*Piaractus mesopotamucus* Holmberg, 1987).

Nota: Os valores correspondem à média erro-padrão, n=24. \* $p < 0,05$  comparado ao horário anterior.



**Figura 2.** Conteúdo de glicogênio do músculo branco (mg/100mg) do pacu (*Piaractus mesopotamucus* Holmberg, 1987).

Nota: Os valores correspondem à média erro-padrão, n=24. \* $p < 0,05$  comparado ao horário anterior.



**Figura 3.** Conteúdo de glicogênio do músculo vermelho (mg/100mg) do pacu (*Piaractus mesopotamucus* Holmberg, 1987).

Nota: Os valores correspondem à média erro-padrão, n=24. \* $p < 0,05$  comparado ao horário anterior.

plasmática de triacilglicerol sendo observada elevação de 16% e 30% na interface das 8-12h e das 12h-16h passando a manifestar redução de 5%, 12% e 10% nos horários das 20h, 24h e 4h, respectivamente. Avaliou-se também o perfil da concentração plasmática de ácidos graxos livres sendo observada elevação de 80% na interface das 8 às 12h, passando para valores 207% maiores entre 12h e 16 horas. Neste mesmo sentido foi observada redução de 80% entre 16h e 20h permanecendo neste perfil até às 24h quando a concentração começa a declinar atingindo valores similares durante as próximas 8h.

No que se refere ao perfil glicêmico observou-se elevação de 65% na interface das 8h às 12h passando por elevação adicional de 41% às 16h, quando o valor passa por redução de 35% e 28% na interface das 20h às 24h, após este horário os valores não mais diferiram (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

O pacu é um dos peixes brasileiros de importância comercial, na pesca e na aquicultura (Silva, 1985). O interesse em conhecer o comportamento fisiológico dessa espécie, fundamenta-se no contexto de que o pacu se alimenta preferencialmente de frutas e apresenta requisitos nutricionais ligados à utilização de elevadas quantidades de carboidrato além de exibir uma grande capacidade para armazenar gordura (Menton, 1989; Metón *et al.*, 2003).

A aquicultura é um campo das Ciências Biológicas que tem crescido expressivamente nos últimos anos e se destaca pela contribuição na produção de proteína de origem animal. Neste sentido, investigações de cunho científico realizadas na área de produção de peixes são indispensáveis para contribuir com o crescimento da atividade no país. Nas dinâmicas de tratamento do plantel de peixes tem sido amplamente utilizada a adição de carboidratos como suprimento de substratos meta-bolizáveis, assim, sua inclusão em concentrações adequadas pode assegurar uma

melhor eficiência na utilização de nutrientes durante o transcorrer do dia (Wilson, 1994).

A adoção de estratégias de alimentação com restrição alimentar e realimentação é uma forma de explorar a capacidade natural de recuperação metabólica e crescimento dos peixes que permite economia no fornecimento de ração (Souza *et al.*, 2003). Cuidados intensivos no desenvolvimento da piscicultura podem reduzir as taxas de catabolismo, além de melhorar a formação das reservas energéticas de glicose (Suarez & Mommsen, 1987). Um reflexo importante que pode ser constatado é o efeito poupador de proteína, uma vez que a glicose é um importante combustível metabólico para os tecidos suprindo funções metabólicas e indiretamente reduzindo a proteólise (Cowey *et al.*, 1977; Hilton *et al.*, 1987)

Foi observado que o comportamento metabólico do pacu apresenta ritmicidade durante 24h, prevalecendo a via metabólica que dá suporte a demanda em cada período, sendo utilizadas as reservas glicogênicas e concomitante a progressão do período de jejum observa-se mudança no perfil metabólico com domínio do padrão lipídico.

Tem sido descritas evidências indiretas sugerindo que a entrada de glicose nas células dos peixes é mediada por transportadores da família GLUT, de forma similar ao observado nos mamíferos. Em um estudo com tilápia, um peixe onívoro, anticorpos contra GLUT-1 de mamíferos reagiram com uma proteína presente no coração e cérebro dos peixes (Krasnov *et al.*, 1999).

Adicionalmente, Planas *et al.* (2000) identificaram, na truta, uma molécula de GLUT com alta homologia do GLUT-4 de mamíferos, que se expressou no músculo esquelético, rim e brânquias, tecidos com alta utilização de glicose. Nesse estudo identificou-se que as reservas glicogênicas modificam seu perfil de acordo com a periodicidade circadiana apresentando grandes reservas pela manhã e sequencial redução no transcorrer do dia até a noite, coincidindo com maiores índices de ingestão pela manhã e reduzido consumo na interface da tarde para a noite.

A importância da temperatura na regulação da ingestão alimentar e crescimento permanece pouco descrita para os peixes, mas sabe-se que a maioria destes animais se alimenta melhor quando as temperaturas estão altas permitindo que as taxas de crescimento tendam a ser mais altas na primavera e verão (Paul *et al.*, 1995). Essas observações tem relação direta com as condições ambientais apresentadas no presente estudo, uma vez que o período de análise apresentou temperaturas elevadas, de forma que, pode ter influenciado enquanto fator facilitador da ativação direta do eixo secretório insulínico e/ou na captação de diferentes substratos energéticos, facilitando tanto a geração de energia quanto a formação das reservas.

Outro fator, que é importante ressaltar se fundamenta no fato dos peixes onívoros serem capazes de utilizar níveis mais altos de carboidratos na dieta, devido a maior atividade da amilase no trato digestório (Hidalgo *et al.*, 1999).

**Tabela 2.** Concentração plasmática de Triacilglicerol (TG), Ácidos Graxos Livres (AGL) e glicose (mg/dL) coletados de acordo com a hora do dia ou noite do pacu (*Piaractus mesopotamucus* Holmberg, 1987).

Hora	TG (mg/dL)		AGL ( mmol/L )		Glicemia ( mg/dL)	
	M	EPM	M	EPM	M	EPM
8:00	303,52	8	0,30	0,05	58,0	5,0
12:00	352,55	7*	0,54	0,04*	96,0*	2,0*
16:00	457,43	6*	1,66	0,05*	135,4	10,0*
20:00	472,92	7*	0,33	0,02	100,0	4,0*
24:00	422,36	10*	0,35	0,01	72,0	10,0*
4:00	381,45	2*	0,36	0,03	67,0	5,2*

Os valores correspondem à Média (M) e Erro-Padrão da Média (EPM), n=24.

Sabe-se que os peixes alternam períodos de alimentação e jejum, em resposta a vários fatores, tais como a temperatura, reprodução, disponibilidade de alimento. Durante períodos de baixa disponibilidade de substratos metabolizáveis uma complexa rede de alterações são deflagradas para promover o ajuste biológico que se caracteriza pela mobilização de diferentes substâncias (Souza *et al.*, 2000).

A capacidade do peixe em mobilizar glicogênio hepático está diretamente relacionada à manutenção das concentrações glicêmicas durante período de restrição alimentar durante a fase inicial do jejum (Higuera & Cardenas, 1984). Em um estudo de Souza *et al.* (2000) com pacus jovens submetidos à restrição alimentar verificou-se redução da concentração de glicogênio hepático no início da restrição, sugerindo que o conteúdo glicogênico é uma reserva prontamente disponível e pronta a favorecer a homeostase glicêmica, sendo mantida ou restabelecida, posteriormente, pela mobilização de outras fontes de energia tais como os lipídios e as proteínas. Esses autores observaram, ainda, que, em períodos curtos de restrição alimentar, a concentração plasmática de ácidos graxos livres foi elevada no plasma, fato também observado no presente estudo e apresentado de forma pioneira enquanto mobilização com perfil circadiano.

O aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres pode inibir competitivamente a utilização da glicose pelos tecidos periféricos e a liberação de glicose pelo fígado, modulando a homeostase glicêmica e a gliconeogênese a partir de lipídios.

Tem sido demonstrado que a realimentação resulta na recuperação das concentrações normais de glicogênio tanto no fígado quanto no músculo, na manutenção de normoglicemia, aminoácidos plasmáticos, ácidos graxos livres plasmáticos, proteína total plasmática, como também da composição corporal (Hung *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2000). Assim, corroboramos com as observações indicando que após um período sem alimento, a exposição novamente a dieta, promove a recuperação dos principais reservatórios.

## CONCLUSÃO

O pacu apresenta um perfil alimentar caracterizado por uma significativa variação nas reservas energéticas durante 24 horas. Esta característica indica um metabolismo mais oxidativo sob normóxia, utilizando de uma estratégia bioquímica de armazenamento de glicogênio, para situações de hipóxia, em que passaria a um metabolismo mais anaeróbio.

## A G R A D E C I M E N T O

Ao professor doutor Antônio Ari Gonçalves (*in memoriam*) pelos ensinamentos, orientação e dedicação à formação de pesquisadores. Muito obrigado, ficando a honra de ter sido seu aluno.

## REFERÊNCIAS

- Andersen, M.L.; D' Almeida, V.; Ko, G.M.; Kawakami, R.; Martins, P.F.J.; Magalhães, L.E. *et al.* (2004). *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: Cromosite, 2004.
- Carneiro, D.J.; Fragnito, P.S. & Malheiros, E.B. (1994). Influence of carbohydrate and energy level on growth and body composition of tambacu, a hybrid of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 124(1-4):129-30.
- Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M. & Castagnolli, N. (2004). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.217-238.
- Cowey, C.; De La Higuera, M. & Adron, J.W. (1977). The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 38:385-95.
- Figueiredo-Garutti, M.L.; Navarro, I.; Capilla, E.; Souza, R.H.S.; Moraes, G.; Gutiérrez, J. *et al.* (2002). Metabolic changes in Brycon cephalus (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 132(2):467-76.
- Hidalgo, M.C.; Urea, E. & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170(3-4): 267-83.
- Higuera, M. & Cardenas, P. (1984). Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U- 14C)



- glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81(2):391-95.
- Hilton, J.W.; Plisetskaya, E.M. & Leatherland, J.F. (1987). Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 4(3):113-20.
- Hung, S.S.O.; Liu, W.; Li, H.; Storebakken, T. & Cui, Y. (1997). Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 151(1-4):357-63.
- Jomori, R.K.; Carneiro, D.J.; Nartins, M.I. & Portela, M.C. (2005). Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing system. *Aquaculture*, 243(1-4):175-83.
- Krasnov, A.; Pitkänen, T.I.; Reinisalo, M. & Mölsä, H. (1999). Expression of human glucose transporter type 1 and rat hexokinase type II complementary DNAs in rainbow trout embryos: effects on glucose metabolism. *Marine Biotechnology*, 1(1):25-32.
- Metón, I.; Fernàdez, F. & Baanante, I.V. (2003). Short-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 225(1-4):99-107.
- Menton, D.J. (1989). Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: Hernandez, R. (Ed.). *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Guadalupe. p.75-84.
- Mommsen, T.P. & Plisetskaya, E.M. (1991). Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4(2-3):225-59.
- Paul, A.J.; Paul, J.M. & Smith, R.L. (1995). Compensatory growth in Alaska yellowfin sole, *Pleuronectes asper*, following food deprivation. *Journal of Fish Biology*, 46(3):442-8.
- Planas, J.; Encarnacion, C. & Gutierrez, J. (2000). Molecular identification of a glucose transporter fish muscle. *FEBS Letters*, 481(3):266-70.
- Saint Paul, U. (1986). Potential for aquaculture of south America freshwater fishes: a review *Aquaculture*, 54(3):205-40.
- Silva, A.J. (1985). *Aspectos de alimentação do pacu adulto, Colossomamitrei (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no Pantanal de Mato Grosso*. Dissertação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Siu, L.O.; Russeau, J.C. & Taylor, A.W. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology*, 28(2):234-6.
- Souza, V.L. (1994). Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no metabolismo de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Souza, V.L.; Oliveira, E.G. & Urbinati, E.C. (2000). Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 15(4):371-9.
- Souza, V.L.; Urbinati, E.C.; Martins, M.I.E.G. & Silva, P.C. (2003). Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetidos a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(5):19-28.
- Suarez, R.K. & Mommsen, T.P. (1987). Gluconeogenesis in teleost fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 65(8):1869-82.
- Wilson, R.P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(1-4):67-80.

Recebido em: 21/10/2011

Versão final reapresentada em: 9/3/2012

Aprovado em: 28/3/2012





ARTIGO | ARTICLE

## Detecção do polimorfismo gln604glu no Gene Abcg5 em um grupo de indivíduos de São Roque (São Paulo/Brasil) e correlação com parâmetros do perfil lipídico

*Detection of the gln604glu polymorphism in the gene Abcg5 in a group of individuals from the city of São Roque (São Paulo/Brazil) and the correlation with lipid profile parameters*

Diego Baratelli<sup>1</sup>

Suely Capps Fernandes<sup>1</sup>

Sidney Fernandes<sup>2</sup>

Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos<sup>1</sup>

Renata de Lima<sup>1,3</sup>

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o polimorfismo Gln604Glu do gene ABCG5 e a sua correlação com os parâmetros lipídicos, em uma população de voluntários residentes na cidade de São Roque (SP), em 2009. Foram determinados os perfis lipídicos de 150 voluntários por meio de métodos enzimáticos colorimétricos (Advia-1650-Bayer) e em seguida a realização de análise do polimorfismo Gln604Glu do gene ABCG5 pela técnica de reação em cadeia da polimerase seguida de análise de enzima de restrição. Os resultados mostraram que 45% dos indivíduos apresentaram hipercolesterolemia, 31% exibiram hipertriacilglicerolemia e 11% hipoalfalipoproteinemia. A análise do polimorfismo Gln604Glu do gene ABCG5 demonstrou que 55% dos indivíduos eram heterozigotos, 37% homozigotos normais e 8% homozigotos mutantes. Não foi

<sup>1</sup> Universidade de Sorocaba, Curso de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia. Rod. Raposo Tavares km 92,5, 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: R. LIMA. E-mail: <renata.lima@prof.uniso.br>.

<sup>2</sup> Centro de Extensão Universitária, Curso de Medicina, Departamento de Cardiologia. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade de São Carlos, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Sorocaba, SP, Brasil.

observada diferença significativa entre os perfis lipídicos dos homocigotos selvagens, homocigotos mutantes e heterocigotos, não existindo correlação entre os perfis lipídicos e o polimorfismo. Os resultados sugerem que na população estudada, a presença do polimorfismo não pode ser considerada como um biomarcador para dislipidemia. Sendo necessários estudos mais amplos que avaliem a relação entre o perfil genético do indivíduo e a resposta ao tratamento preconizado.

**Palavras-chave:** ABCG5/G8. Dislipidemia. Farmacogenética. Hipercolesterolemia. Polimorfismo. Sitosterolemia.

## ABSTRACT

*The aim of the present work is to study the Gln604Glu polymorphism of the ABCG5 gene and its correlation with the lipid profile in a volunteer population resident in the city of São Roque in the state of São Paulo (2009). For the analysis of the lipid profile and the Gln604Glu polymorphism, we used the techniques of colorimetric analysis, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), respectively. The results showed that 45% of the individuals presented with hypercholesterolemia, 31% with hypertriacylglycerolemia and 11% with hypoalphalipoproteinemia. The analysis of the Gln604Glu polymorphism showed that 55% of the individuals were heterozygous, 37% normal heterozygous and 8% mutant heterozygous. No significant difference was observed between the lipid profiles of the wild homozygous, mutant homozygous and heterozygous, there being no correlation between the lipid profile and polymorphisms. The results suggest that the presence of polymorphism cannot be used as a dyslipidemia biomarker, in the studied population. Broader studies are required that can evaluate the relationship between the genetic profile of the individual and the response to the advocated treatment.*

**Key words:** ABCG5/G8. Dyslipidemia. Pharmacogenetics. Hypercholesterolemia. Polymorphism. Sitosterolemia.

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as desordens cardiovasculares são principal causa de mortalidade no mundo, responsáveis por um em cada três óbitos (World Health Organization, 2000; 2007).

As dislipidemias são um dos fatores de riscos mais importantes para o surgimento de eventos cardiovasculares. São modificações nas concentrações de lípidos e/ou lipoproteínas e/ou apoproteínas. Podem ser primárias quando apresentam causas genéticas, ou secundárias a várias doenças e ao uso de algumas drogas. Muitas vezes são mistas

(primárias e secundárias). Quando a causa não é identificada são denominadas de esporádicas ou poligênicas. As dislipidemias classificam-se em hipertriacilglicerolemias isoladas, hipercolesterolemias isoladas, hiperlipidemias mista e Lipoproteína de Alta Densidade-colesterol (HDL-c) baixo (De Faria & Castilho, 2006).

As estatinas são recomendadas para o controle da hipercolesterolemia isolada e podem ser administradas em associação à ezetimiba, colestiramina e eventualmente a fibratos ou ácido nicotínico. No tratamento da hipertrigliceridemia isolada são indicados, primeiramente, os fibratos e, em segundo lugar, o ácido nicotínico ou a associação de ambos. O ácido nicotínico e os fibratos são indicados para o

tratamento da hipoalfalipoproteinemia (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Em consequência da alta incidência dessas co-morbidades, existe a necessidade de desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Contudo, as respostas aos tratamentos hipolipemiantes exibem distinções interindividuais, sendo que, enquanto em alguns apresentam respostas efetivas, outros apresentam ausência de resposta ou mesmo toxicidade inesperada (Metzger et al., 2006). A busca de ferramentas terapêuticas mais eficazes e seguras, que possam prever quais pacientes responderão ou não a uma terapia é extremamente válida. Atualmente, aliada aos avanços da genética, biologia molecular e o sequenciamento do genoma humano, tem sido muito destacada a influência de variações genéticas nas respostas às drogas (Nebert, 1999; Sandrim et al., 2006).

Estes novos avanços deram início à farmacogenética, uma nova área que utiliza a genética para auxiliar na previsão da eficácia farmacológica da monoterapia ou da associação de um ou mais fármacos, podendo trazer vantagens ao tratamento das dislipidemias, devido a maior adesão do paciente ao tratamento em resposta a diminuição das reações adversas e maior eficácia do mesmo, o que leva a uma diminuição no tempo de tratamento e no número de internações, fator de importante impacto na saúde pública (Fiegenbaum & Hutz, 2006; Hirata et al., 2006; Metzger et al., 2006).

Recentemente, foi caracterizado um grupo de proteínas transmembranares conhecidas como cassete ATP-ligante (ABC), formadoras da família que medeia o transporte unidirecional, dependente de ATP, de uma gama seletiva de moléculas, como íons, açúcares, proteínas, compostos hidrofílicos, xenobióticos, esteróis e lipídios (Dean & Hamon, 2001; Vaisman et al., 2001). Pelo menos 5 sub-famílias dos transportadores ABC medeiam o efluxo de esteróis em mamíferos, são eles o ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5 e ABCG8. O ABCG5 e ABCG8 (*ATP-Binding Cassette, Subfamily G, Member 5 e 8*) são heterodímeros altamente expressos no fígado, intestino delgado, vesícula biliar e em menor quanti-

dade nos cólons intestinais (Graf et al., 2002). Essas proteínas desempenham papel crucial na homeostase do colesterol, pois produzem transportadores com uma grande especificidade para a eliminação dos esteróis de origem animal e vegetal e, em casos de mutações, há acúmulo de fitoesteróis na circulação sanguínea, fato conhecido como sitoesterolemia (Bhattacharyya & Connor, 1974).

A sitoesterolemia é uma doença de herança autossômica recessiva caracterizada pela hiperfitoesterolemia e hipercolesterolemia (Bhattacharyya & Connor, 1974; Hubáček et al., 2001; Lee et al., 2001; Heimerl et al., 2002).

Recentemente, o polimorfismo C1950G (Gln604→Glu) do gene ABCG5 foi caracterizado como causa de erros inatos de metabolismo que culminam em dislipidemias (Weggemans et al., 2002; Herron et al., 2006, Caamaño et al., 2008). O objetivo deste estudo foi determinar os perfis lipídicos e genéticos e verificar a existência de correlação entre o polimorfismo de uma única base (C1950G) do gene ABCG5 com as dislipidemias, em indivíduos da cidade de São Roque (SP).

## MATERIAL E METÓDOS

### Casuística

Este foi um estudo randomizado, realizado em 2009, com 150 indivíduos voluntários que residem na cidade de São Roque (SP). Como critérios de inclusão, foram considerados o não uso de medicamentos que pudessem vir a interferir no metabolismo lipídico ou de carboidratos e o não tratamento de doenças metabólicas. Os dados de cada um dos indivíduos como peso e altura foram medidos em momento anterior a coleta e o restantes dos dados pessoais foi obtidos através de questionário, os testes bioquímicos e genéticos foram realizados a partir de amostras biológicas sanguíneas. O questionário e a coleta foram realizados após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido. Este tipo de estudo é considerado de risco mínimo para os voluntários,

conforme definição da resolução 01/88 do Conselho Nacional de Saúde e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP - Universidade de Sorocaba (processo nº026/06).

### Determinação do perfil lipídico

A determinação das concentrações séricas do Colesterol Total (CT), HDL-c e Triacilglicerol (TG) foram realizados por métodos enzimáticos colorimétricos (*Sera Pak Plus*) em sistema de automação Advia-1650 (*Bayer*). As frações Lipoproteína de Baixa Densidade e Lipoproteína de Muito Baixa Densidade e do colesterol (LDL-c e VLDL-c) foram estimadas pela equação de Friedewald (Friedewald & Frederickson, 1972), para TG < 400mg/dL. O sangue foi coletado com o paciente respeitando jejum de 12 horas.

Para avaliação dos perfis lipídico e lipoprotéico foram utilizados os valores de referência baseados nas recomendações do *National Cholesterol Education Program* (NCEP, 1993) que considera hipercolesterolemia a elevação do LDL-c (e" 160mg/dL), hipertriacilglicerolemia a elevação do TG (e" 150mg/dL), hipoalfalipoproteinemia a redução do HDL-c (d" 40mg/dL) e hiperlipidemia mista valores aumentados de ambos, LDL-c (e" 160mg/dL) e TG (e" 150mg/dL). Nos casos em que os TG eram e" 400mg/dL, o cálculo do LDL-c pela fórmula de Friedewald era inadequado, sendo considerado a hiperlipidemia o colesterol e" 200mg/dL (*National Cholesterol Education Program*, 1993).

### Determinação do perfil genético

A extração do DNA genômico foi baseada em Sambrook et al. (1989). Os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram modificados a partir de Hubáček et al. (2004). Para realização da PCR as concentrações utilizadas foram aproximadamente 5ng de DNA genômico, 400nM de cada primer, 5x Tampão de reação, 2mM de MgCl<sub>2</sub>

0,2mM de deoxinucleotídeos (dNTP) e 2,5U de Taq DNA polimerase, sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos e 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos obtidos pela PCR foram de 117pb. Estes seguidamente foram expostos à restrição enzimática com a enzima *Xho-I* (Fermentas) por 16h a 37°C. Os alelos mutantes não possuem sitio de restrição da enzima, logo permaneceram inalterados, enquanto que os alelos normais foram divididos em 2 fragmentos (31pb + 86pb).

As bandas foram visualizadas em gel de agarose 1000 *Low melting* a 2 e 4%, utilizando-se *Blue Green Loading Dye I* (LCG) sobre luz UV, seguida de fotodocumentação.

Quanto a análise estatística, as características clínicas, bioquímicas e genéticas do grupo foram feitas através de análise descritiva. O teste de *t* Student foi utilizado para a comparação de dados como média e desvio padrão e o teste de Fischer na comparação de porcentagens, além de uma análise de variância com comparações múltiplas de uma via *One Away* Anova, sendo a significância estatística assumida para um  $p < 0,05$ . Para a análise dos dados foram utilizados os programas *GraphPadInStat* da *Graphpad Software Inc.*, San Diego, (CA) e *Minitab 14*.

## RESULTADOS

O grupo em estudo foi constituído de 150 indivíduos, sendo 87% brancos e 13% negros; 58% do sexo feminino e 42% do sexo masculino, com idade média de 38 anos e Índice de Massa Corporal (IMC) médio de 25,1kg/m<sup>2</sup>.

Em média, os voluntários eram normolipidêmicos (Tabela 1), entretanto, alterações importantes nas concentrações dos lípides plasmáticos foram observadas, como hipercolesterolemia (45%), hipertriacilglicerolemia (31%) e hipoalfalipoproteinemia (11%). Entre os hipoalfalipoproteinêmicos, 56,25% apresentaram também hipertriacilglicerolemia, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007).

A análise do perfil genético foi realizada em 147 indivíduos, sendo observado que 55% eram heterozigotos, 37% homozigotos normais e 8% de homozigotos mutantes (Figura 1).

Os indivíduos foram subdivididos em homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes, e as médias dos perfis lipídicos mostraram a não ocorrência de diferenças significativas entre os resultados (Tabela 2).

O estudo da correlação dos parâmetros das frações lipídicas e IMC com a mutação Gln604Glu não mostrou correlação estatisticamente significativa (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível observar que a maioria dos voluntários era portador de

**Tabela 1.** Caracterização do perfil lipídico e lipoproteico dos pacientes. São Roque (SP), 2009.

Perfil lipídico	Média	Desvio-Padrão
Colesterol Total (mg/dL)	198,44	40,81
VLDL-colesterol (mg/dL)	25,67	14,75
LDL-colesterol (mg/dL)	121,22	33,60
HDL-colesterol (mg/dL)	51,12	9,01
Triacilglicerol (mg/dL)	131,12	77,85

n:150; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade.

**Tabela 2.** Distribuição dos lípides de acordo com o perfil genético e comparação dos subgrupos. São Roque (SP), 2009.

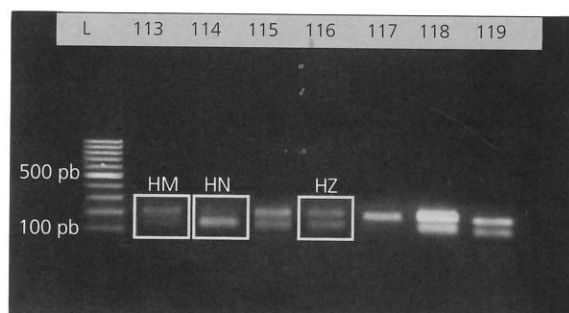
Variável	Homozigoto Mutante n=12 (8%)		Heterozigoto n=81 (55%)		Homozigoto Selvagem n=54 (37%)	
	M	DP	M	DP	M	DP
Perfil genético (%)						
Colesterol total (mg/dL)	183,2	36,2	196,7	43,4	206,8	35,8
VLDL-colesterol (mg/dL)	19,8	8,2	24,8	15,4	26,9	14,8
LDL-colesterol (mg/dL)	112,3	32,4	122,3	34,2	126,8	31,1
HDL-colesterol (mg/dL)	51,1	8,3	50,9	8,5	51,6	10,3
Triacilglicerol (mg/dL)	98,8	41,0	125,0	76,6	134,4	74,2

Análise estatística realizada por ANOVA "one way". \* $p > 0,05$ ; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; M: Média; DP: Desvio-Padrão.

**Tabela 3.** Perfil genético mutante em relação as frações lipídicas e ao IMC. São Roque (SP), 2009.

Perfil genético	$p$ (valor)
Colesterol Total vs Genótipo	0,317
Índice de massa corporal vs Genótipo	0,744
Triacilglicerol vs Genótipo	0,809
HDL-colesterol vs Genótipo	0,744
VLDL-colesterol vs Genótipo	0,373
LDL-colesterol vs Genótipo	0,744

\* $p > 0,05$ ; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; IMC: Índice de Massa Corporal.



**Figura 1.** Figura ilustrativa para identificação dos homozigotos mutantes (HM), heterozigotos (HZ) e homozigotos normais (HN).

hiperlipidemias (hipercolesterolemia ou hipertrigliceremia), além disso, mais da metade desses indivíduos apresentaram também dislipidemia mista (hipertriacilglicerolemia associada a hipoalfalipoproteinemia), corroborando com o que já está descrito na literatura a respeito de quão frequente é a associação entre esses diferentes tipos de dislipidemias (Law et al., 1994).

Recentemente foram realizados estudos, referente a genes importantes do metabolismo lipídico como os genes ABCG5/G8, buscando caracterizar e definir qual o seu verdadeiro papel molecular e fisiopatológico (Lida et al., 2002; Fitzgerald et al., 2010).

No presente estudo detectou-se que mais da metade dos voluntários eram portadores do polimorfismo (Gln604Glu) do gene ABCG5 (heterozigotos e homozigotos), havendo notoriamente um número maior de indivíduos heterozigotos (G/C). Dados referentes ao polimorfismo do gene ABCG5 na população brasileira são inexistentes. Embora existam estudos na população brasileira referente a outras mutações diretamente relacionadas com o metabolismo de lipoproteínas, entre elas estão mutações que interferem no Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR), Apo (AI-II), Apo (C-III), Apo (B), Apo E, receptores de LDL-c (LDLr), e casos de hipercolesterolemia familiar (Bydlowsky et al., 1996; Cavalli et al., 2000; Salazar et al., 2002; Santos & Zago, 2003; Fiegenbaum et al., 2007; Sabino et al., 2009).

Pesquisas que correlacionaram à dislipidemia e a mutação do gene ABCG5, apesar de terem algumas distinções de delineamento, são controversas em relação às mutações estarem ou não associadas às dislipidemias. No presente trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros do perfil lipídico e o polimorfismo Gln604Glu do gene ABCG5. Resultados semelhantes foram encontrados por Hubáček et al. (2004), ao estudarem 285 voluntários tchecos (70,0% homozigotos normais, 27,0% heterozigotos e 2,8% homozigotos mutantes) visto que não encontraram correlação ente o polimorfismo e a colesterolemia. Entretanto, Weggemans

et al. (2002) ao estudarem uma população holandesa identificaram uma relevante significância dos homozigotos mutantes do gene ABCG5 (Gln604Glu) com os níveis séricos dos lipídios. Estudo realizado na população chilena, Caamaño et al. (2008) constataram que dentre os 222 voluntários 118 eram hipercolesterêmicos, sendo aproximadamente 49 destes homozigotos mutantes (42,0%), sugerindo que a mutação no gene ABCG5 (Gln604Glu) estava altamente correlacionada com a hipercolesterolemia. Além disso, Acalovschi et al. (2006) constataram, em 68 indivíduos com cálculos renais, que a mesma mutação no ABCG5 estava associada a hipertriacilglicerolemia e que o polimorfismo pode contribuir com variações nos níveis dos lipídios plasmáticos e na saturação do colesterol biliar.

Segundo Weggemans et al. (2002), são necessários novos estudos epidemiológicos para verificar a real atuação do polimorfismo supra citado sobre as dislipidemias e as suas consequentes comorbidades e complicações, tais como as Doenças Arteriais Coronarianas (DAC).

É sabido que a prescrição dos hipolipemiantes se dá de modo empírico onde não é levada em conta a chamada "individualização bioquímica e terapêutica". A variabilidade de fármacos ilustra a heterogeneidade de resposta às drogas entre pacientes, e isso é parcialmente devido à composição genética única que cada indivíduo apresenta (Metzger et al., 2006).

É importante salientar que, apesar de não termos realizados testes que avaliassem o papel dos polimorfismos na eficácia do tratamento, a relevância do presente trabalho também reside no fato da identificação de mutações em genes específicos que podem ajudar numa predição farmacológica mais adequada visto que no presente trabalho foi detectada a presença de polimorfismo de uma única base (Gln604Glu) no gene ABCG5 com frequência genotípica de 63% de mutações. A terapia farmacológica comumente utilizada para o tratamento da hipercolesterolemia é, principalmente, a base de estatinas que atuam no metabolismo do colesterol,



enquanto que estudos demonstram que no caso de indivíduos com mutações no gene ABCG5 e ABCG8 a ezetimiba, que atua na absorção intestinal do colesterol, possui maior eficiência (Tunstall-Pedoe et al., 2000; Mansur et al., 2001; Graf et al., 2002; Freeman et al., 2004; Neal & Jones, 2006). Uma maior especificidade de repostas aos medicamentos trará melhoras à atenção médica e farmacêutica (Hirata et al., 2006; Metzger et al., 2006)

## CONCLUSÃO

A análise do perfil genético do grupo detectou na população a presença de polimorfismo Gln604Glu no gene ABCG5 com frequência genotípica de 63% de mutação (55% - heterozigotos e 8% - homozigotos mutantes). Não houve diferença significativa entre o perfil lipídico dos indivíduos homozigotos mutantes e heterozigotos quando comparados aos homozigotos selvagens, nem correlação significativa entre a presença do polimorfismo e as concentrações séricas dos lípidos. Desta forma, não é possível afirmar que a mutação a Gln604Glu do gene ABCG5 pode ser considerada como um biomarcador associado às dislipidemias. Os resultados sugerem que na população estudada, a presença do polimorfismo não pode ser usada como um biomarcador para dislipidemia. São necessários estudos mais amplos que avaliem a relação entre o perfil genético do indivíduo e a resposta ao tratamento preconizado.

## AGRADECIMENTOS

Em especial aos Professores Doutor Leonardo F. Fraceto, Luis Carlos de Almeida e Daniele Ribeiro Araujo pelos apontamentos, sugestões e críticas cujo, o apoio deles culminou nessa pesquisa de alta qualidade.

## REFERÊNCIAS

Acalovschi, M.; Ciocan, A.; Mostean, O.; Tirziu, S.; Chiorean, E.; Keppeler, H. et al. (2006). Are plasma lipid

levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms?: a preliminary study in siblings with gallstones. *European Journal of Internal Medicine*, 17(7):490-4.

Bhattacharyya, A.K. & Connor, W.E. (1974). Beta-sitosterolemia and xanthomatosis: a newly described lipid storage disease in two sisters. *Journal of Clinical Investigation*, 53(4):1033-3.

Bydlowsky, S.P.; Novak, E.M.; Issa, J.S.; Forti, N.; Giannini, S.D. & Diament, J. (1996). DNA polymorphisms of apolipoprotein B and A I - C III - A IV genes in a Brazilian population: a preliminary report. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(10):1269-74.

Caamaño, J.M.; Pacheco, A.; Lanás, F. & Salazar, L.A. (2008). Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 genes in Chilean subjects with polygenic hypercholesterolemia and controls. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(11):1581-5.

Cavalli, S.A.; Hirata, M.H.; Salazar, L.A.; Diament, J.; Forti, N.; Giannini, S.D. et al. (2000). Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. *Clinica Chimica Acta*, 302(1-2):189-203.

Dean, M.Y. & Hamon, G.C. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7):1007-7.

De Faria, E.C. & Castilho, L.N. (2006). Dislipidemias. In: Lopes, A.C.; Ward, L.S. & Guariento, M.E. *Medicina ambulatorial*. São Paulo: Atheneu.

Fiegenbaum, M. & Hutz, M.H. (2006). Farmacogenética de fármacos hipolipemiantes. *Medicina*, 39(4):543-3.

Fiegenbaum, M.; Andrade, F.M. & Hutz, M.H. (2007). Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: effect of gender, smoking and APOE genotypes. *Clinica Chimica Acta*, 380(1-2):175-81.

Fitzgerald, M.L.; Mujawar, Z. & Tamehiro, N. (2010). ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis*, 211(2):361-70.

Freeman, L.A.; Kennedy, A.; Wu, J.; Bark, S.; Remaley, A.T.; Santamarina-Fojo, S. et al. (2004). The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *Journal of Lipid Research*, 45(7):1197-6.

Friedewald, W.T., Levy, R.I. & Frederickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6):499-502.

Graf, G.A.; Li, W.P.; Gerard, R.D.; Gelissen, I.; White, A.; Cohen, J.C. et al. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *Journal of Clinical Investigation*, 110(5):659-9.

Heimerl, S.; Langmann, T.; Moehle, C.; Mauerer, R.; Dean, M.; Beil, F.U., et al. (2002). Mutations in the human ATP-

- binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia. *Human Mutation*, 20(2):151-5.
- Herron, K.L.; McGrane, M.M.; Waters, D.; Lofgren, I.E.; Clark, R.M.; Ordovas, J.M. et al. (2006). The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. *Journal of Nutrition*, 136(5):1161-5.
- Hirata, M.H.; Tavares, V. & Hirata, R.D.C. (2006). Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *Medicina*, 39(4):522-4.
- Hubáček, J.A.; Berge, K.E. & Cohen, H.H.H. (2001). Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Human Mutation*, 18(4):359-60.
- Hubáček, J.A.; Berge, K.E.; Stefková, J.; Pitha, J.; Skodová, Z.; Lánská, V. et al. (2004). Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiological Research*, 53(4):395-1.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. Departamento de Aterosclerose. (2007). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88 (Supl. 1). Disponível em: <[http://www.apah.org.br/imagens%5Cpdf\\_diretrizes%5Cdiretriz\\_de\\_aterosclerose.pdf](http://www.apah.org.br/imagens%5Cpdf_diretrizes%5Cdiretriz_de_aterosclerose.pdf)>. (acesso: 7 nov. 2009).
- Law, M.R.; Wald, N.J. & Thompson, S.G. (1998). Serum cholesterol reduction and health: by how much and how quickly is the risk of ischemic heart disease lowered? *British Medical Journal*, 308(6925):367-2.
- Lee, M.H.; Lu, K.; Hazard, S.; Yu, H.; Shulenin, S.; Hidaka, H. et al. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics*, 27(1):79-3.
- Lida, A.; Saito, S.; Sekine, A.; Mishima, C.; Kitamura, Y.; Kondo, K. et al. (2002). Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *Journal Human Genetic*, 47(6):285-310.
- Mansur, A.P.; Favarato, D.; Souza, M.F.; Avakian, S.D.; Aldrighi, J.M.; César, L.A. et al. (2001). Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 76(6):504-10.
- Metzger, I.F.; Costa, D.C.S. & Tanus-Santos, J.E. (2006). Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina*, 39(4):515-1.
- National Cholesterol Education Program. (1993). Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Journal of the American Medical Association*, 269(23):3015-23.
- Neal, R.C. & Jones, P.H. (2006). Complementary therapy to target LDL cholesterol: the role of the ezetimibe/simvastatin combination. *Vascular Health Risk Management*, 2(1):31-8.
- Nebert, D.W. (1999). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinical Genetics*, 56(4):247-8.
- Sabino, A.; Fernandes, A.P.; Lima, L.M.; Ribeiro, D.D.; Sousa, M.O.; Castro Santos, M.E. et al. (2009). Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) gene and homocysteine levels: a comparison in Brazilian patients with coronary arterial disease, ischemic stroke and peripheral arterial obstructive disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 27(1):82-7.
- Salazar, L.A.; Hirata, M.H.; Cavalli, S.A.; Nakandakare, E.R.; Forti, N.; Diament, J. et al. (2002). Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: identification of seven novel LDL-R gene mutations. *Human Mutation*, 19(4):462-3.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T.E. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Sandrim, V.C.; Rezende, V.B. & Tanus-Santos, J.E. (2006). Farmacogenética cardiovascular. *Medicina*, 39(4):535-2.
- Santos, J.E. & Zago, M.A. (2003). Familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis*, 4(3):1-2.
- Tunstall-Pedoe, H.; Vanuzzo, D.; Hobbs, M.; Mähönen, M.; Cepaitis, Z.; Kuulasmaa, K. et al. (2000). Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO, MONICA project populations. *Lancet*, 355(9205):688-700.
- Vaisman, B.L.; Lambert, G.; Amar, M.; Joyce, C.; Ito, T.; Shamburek, R.D., et al. (2001). ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *Journal Clinical Investigation*, 108(2):303-9.
- Weggemans, R.M.; Zock, P.L.; Tai, E.S.; Ordovas, J.M.; Molhuizen, H.O. & Katan, M.B. (2002). ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clinical Genetics*, 62(3):226-9.
- World Health Organization. (2007). Cardiovascular diseases. Available from: <[http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/)>. (cited: 22 Oct. 2007).
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Technical reports series: 894. Available from: <[http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS\\_894/en/index.html](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/index.html)>. (cited: 20 Feb. 2010).

Recebido em: 21/11/2011

Versão final reapresentada em: 16/2/2011

Aprovado: 9/3/2011

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista *Bioikos* publica trabalhos científicos originais, artigos de revisão e comunicações científicas relacionados às diversas áreas da Biologia. A partir de 2010, a *Bioikos* foi subdividida em grandes áreas temáticas para publicação, com Editores Associados específicos para cada área, que foram assim definidas:

■ **Ambiental**, que contempla:

- Botânica
- Ecologia
- Zoologia
- Recursos Pesqueiros

■ **Ensino**, que contempla:

- Educação, Sociedade e Ambiente
- Ensino de Ciências e Biologia

Portanto, é solicitado que os autores, ao encaminhar o manuscrito, definam a grande área temática e a subárea contemplada.

### PROCEDIMENTOS EDITORIAIS

#### 1. Avaliação de manuscritos

Os manuscritos submetidos à revista, que atenderem à política editorial e às instruções aos autores, são pré-selecionados pelos editores, que consideram o mérito científico da contribuição. Caso contrário, são devolvidos para adequação às normas, inclusão de carta ou de outros documentos eventualmente necessários.

Recomenda-se fortemente que o(s) autor(es) busque(m) assessoria linguística profissional (revisores e/ou tradutores certificados em língua portuguesa e inglesa) antes de submeter(em) originais que possam conter incorreções e/ou inadequações morfológicas, sintáticas, idiomáticas ou de estilo.

Originais identificados com incorreções e/ou inadequações morfológicas ou sintáticas são devolvidos antes mesmo de serem submetidos à avaliação quanto ao mérito do trabalho e à conveniência de sua publicação.

Aprovados nesta fase, os manuscritos são encaminhados aos revisores *ad hoc* selecionados pelos editores. Cada manuscrito é enviado para dois revisores de reconhecida competência na temática abordada. Em caso de desacordo, o original é enviado para uma terceira avaliação.

O processo de avaliação por pares é o sistema de *blind review*, em procedimento sigiloso quanto à identidade tanto dos autores

quanto dos revisores. Por isso, os autores devem empregar todos os meios possíveis para evitar a identificação de autoria do manuscrito.

No caso da identificação de conflito de interesse por parte dos revisores, o Comitê Editorial encaminha o manuscrito a outro revisor *ad hoc*.

Os pareceres dos consultores comportam três possibilidades: a) aceitação integral; b) aceitação com reformulações; c) recusa integral. Em qualquer desses casos, o autor é comunicado. A decisão final sobre a publicação ou não do manuscrito é sempre dos editores, aos quais é reservado o direito de efetuar os ajustes que julgarem necessários. Na detecção de problemas de redação, o manuscrito é devolvido aos autores para as alterações devidas; o trabalho reformulado deve retornar no prazo máximo determinado.

**Manuscritos aceitos:** manuscritos aceitos podem retornar aos autores para aprovação de eventuais alterações, no processo de editoração e normalização, de acordo com o estilo da revista.

**Provas:** são enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar ao Núcleo de Editoração na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não são aceitas nesta fase.

#### 2. Submissão de trabalhos

Os autores devem indicar, obrigatoriamente, no momento da submissão, o nome de três revisores com as respectivas informações profissionais e de contato.

São aceitos trabalhos acompanhados de carta assinada por todos os autores (assinaturas originais ou eletrônicas), com descrição do tipo de trabalho, declaração de que o trabalho está sendo submetido apenas à *Bioikos* e de concordância com a cessão de direitos autorais. A carta deve indicar nome, endereço, números de telefone e *e-mail* do autor para o qual a correspondência deve ser enviada.

Caso haja utilização de figuras ou tabelas publicadas em outras fontes, deve-se anexar documento que ateste a permissão para seu uso.

Enviar os manuscritos via e-mail <sbi\_ne\_biomed@puc-campinas.edu.br>, preparados em espaço entrelinhas 1,5, com fonte Arial 11. O arquivo deverá ser gravado em editor de texto similar ou superior à versão 97-2003 do *Word (Windows)*.

#### 3. Estrutura do artigo

A Revista *Bioikos* publica artigos nas categorias originais, de revisão e notas científicas. A publicação pode ser em português, espanhol ou inglês e o texto deve ter de 15 a 20 laudas. As folhas devem ter numeração personalizada desde a folha de rosto (que deve apresentar o número 1). O papel deve ser de tamanho A4, com formatação de margens superior e inferior (no mínimo 2,5cm), esquerda e direita (no mínimo 3,0cm).

Os artigos devem ter, aproximadamente, trinta referências, exceto no caso de artigos de revisão, que podem apresentar em torno de cinquenta.

Todas as páginas devem ser numeradas a partir da página de identificação. Para esclarecimentos de eventuais dúvidas quanto à forma, sugere-se consulta a este fascículo.

Versão reformulada: a versão reformulada deverá ser encaminhada via e-mail <sbi.ne\_biomed@puc-campinas.edu.br>. O(s) autor(es) deverá(ão) enviar apenas a última versão do trabalho.

O texto do artigo deve empregar fonte colorida (cor azul) para todas as alterações, juntamente com uma carta ao editor, reiterando o interesse em publicar nesta revista e informando quais alterações foram processadas no manuscrito. Se houver discordância quanto às recomendações dos revisores, o(s) autor(es) deve(m) apresentar argumentos que justifiquem sua posição. O título e o código do manuscrito devem ser especificados.

A página do título deve conter:

a. Título completo - deve ser conciso, evitando excesso de palavras, como "avaliação do...", "considerações acerca de...", "estudo exploratório...";

b. *Short title* com até quarenta caracteres (incluindo espaços), em português (ou espanhol, caso seja o idioma do artigo) e inglês;

c. Nomes de todos os autores por extenso, indicando a filiação institucional de cada um. Será aceita uma única titulação e filiação por autor. O(s) autor(es) deve(m), portanto, escolher entre suas titulações e filiações institucionais aquela que julgar(em) a mais importante;

d. Todos os dados da titulação e da filiação devem ser apresentados por extenso, sem siglas;

e. Indicação dos endereços completos de as universidades às quais estão vinculados os autores;

f. Indicação de endereço para correspondência com o autor para a tramitação do original, incluindo fax, telefone e endereço eletrônico.

**Observação:** esta deverá ser a única parte do texto com a identificação dos autores.

**Resumo:** todos os artigos submetidos em português ou espanhol devem ter resumo no idioma original e em inglês, com um mínimo de 150 palavras e máximo de 250 palavras. Os artigos submetidos em inglês devem vir acompanhados de resumo em português, além do *abstract* em inglês. Os resumos devem destacar os objetivos, a metodologia, informação sobre o local, população e amostragem da pesquisa, resultados e conclusões mais relevantes, considerando os objetivos do trabalho e indicando formas de continuidade do estudo. O resumo não deve conter citações, siglas e abreviaturas. Destacar no mínimo três e no máximo seis palavras-chave.

**Texto:** com exceção dos manuscritos apresentados como artigo de revisão e nota científica, os trabalhos devem seguir a estrutura formal para trabalhos científicos:

- **Introdução:** deve conter revisão da literatura atualizada e pertinente ao tema, adequada à apresentação do problema e que destaque sua relevância. Não deve ser extensa, a não ser em manuscritos submetidos como artigo de revisão.

- **Material e Métodos:** deve conter descrição clara e sucinta do método empregado, acompanhada da correspondente referência bibliográfica, incluindo procedimentos adotados, universo e amostra; instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação; tratamento estatístico. Em relação à análise estatística, os autores devem demonstrar que os procedimentos utilizados foram não somente apropriados para testar as hipóteses do estudo, mas também corretamente interpretados. Os níveis de significância estatística (ex.  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) devem ser mencionados. Ao relatar experimentos com animais, indicar se as diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais - ou se qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório - foram seguidas, e fornecer o número do processo.

- **Resultados:** sempre que possível, os resultados devem ser apresentados em tabelas ou figuras, elaboradas de forma que sejam autoexplicativas e com análise estatística. Deve-se evitar repetir dados no texto. Tabelas, quadros e figuras devem ser limitados a cinco no conjunto e numerados consecutiva e independentemente com algarismos arábicos, de acordo com a ordem de menção dos dados; devem vir em folhas individuais e separadas, com indicação de sua localização no texto. É imprescindível a informação do local e ano do estudo. A cada um deve-se atribuir um título breve. Os quadros e tabelas devem ter as bordas laterais abertas. O(s) autor(es) responsabiliza(m)-se pela qualidade das figuras (desenhos, ilustrações, tabelas, quadros e gráficos), que devem permitir redução sem perda de definição para os tamanhos de uma ou duas colunas (7,6 e 16,2cm, respectivamente). Não é permitido o formato paisagem. **Figuras digitalizadas** devem ter extensão JPEG e resolução mínima de 300 dpi. A publicação de **imagens coloridas**, após avaliação da viabilidade técnica de sua reprodução, é custeada pelo(s) autor(es). Em caso de manifestação de interesse por parte do(s) autor(es), a *Bioikos* providencia um orçamento dos custos envolvidos, que podem variar de acordo com o número de imagens, a distribuição em páginas diferentes e a publicação concomitante de material em cores por parte de outro(s) autor(es). As **figuras** deverão ser enviadas em impressão de alta qualidade, em preto-e-branco e/ou diferentes tons de cinza e/ou hachuras. É necessário o envio dos **gráficos**, separadamente, em arquivos no formato WMF (*Windows Metafile*) e no formato do programa em que foram gerados (SPSS, Excel), acompanhados de seus parâmetros quantitativos, em forma de tabela e com nome de todas as variáveis. As **imagens de satélite e fotografias** devem ser submetidas nos seguintes tipos de arquivo: TIFF (*Tagged Image File Format*) ou BMP (Bitmap). A resolução mínima deve ser de 300dpi (pontos por polegada), com tamanho mínimo de 16,2cm de largura. Uma vez apresentado ao(s) autor(es) o orçamento dos custos correspondentes ao material de seu interesse, este(s) deve(m) efetuar depósito bancário. As informações para o depósito são fornecidas oportunamente.

- **Discussão (este tópico pode ser apresentado com o tópico Resultados):** deve explorar adequada e objetivamente os resultados, discutidos à luz de outras observações já registradas na literatura.

- **Conclusão:** deve apresentar as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho, e indicar formas de continuidade do estudo. Não são aceitas citações bibliográficas nesta seção.

- **Agradecimentos:** pode existir uma seção de agradecimentos, em parágrafo não superior a três linhas, dirigidos a instituições ou indivíduos que tenham prestado efetiva colaboração para o trabalho.

- **Nome científico:** o nome científico completo de uma espécie deve ser mencionado nas legendas das ilustrações (figuras, tabelas e quadros), no *abstract*, resumo e introdução; posteriormente, o nome genérico deve ser abreviado.

- **Anexos:** devem ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do texto. Cabe aos editores julgar a necessidade de sua publicação.

- **Abreviaturas e siglas:** devem ser utilizadas de forma padronizada, restringindo-se apenas àquelas usadas convencionalmente ou sancionadas pelo uso, acompanhadas do significado, por extenso, na primeira citação no texto. Não devem ser usadas no título e no resumo.

- **Referências:** devem ser relacionadas alfabeticamente, no final do texto, pelos sobrenomes dos autores e cronologicamente por autor. No caso de publicações com dois autores, até o limite de seis, citam-se todos; acima de seis autores, citam-se os seis primeiros, seguido de *et al.* Os títulos dos periódicos devem ser referidos por extenso. Não são aceitas citações/referências de monografias de conclusão de curso de graduação, de resumos de trabalhos de congressos, simpósios, *workshops*, encontros, entre outros, bem como de textos não publicados (exemplos, aulas, entre outros). Citações de dissertações e teses devem ser evitadas ao máximo. Se um trabalho não publicado de autoria de um dos autores do manuscrito for citado (ou seja, um artigo *in press*), é necessário incluir a carta de aceitação da revista que publicará o referido artigo. Se dados não publicados obtidos por outros pesquisadores forem citados no manuscrito, é necessário incluir uma carta de autorização do uso dos mesmos por seus autores.

- **Citações no texto:** devem constar na lista de referências. Citar o sobrenome do autor, seguido do ano de publicação, como em Rocha (2008); se forem dois autores, o último sobrenome de ambos separados por &, como em Santos & Martins (2008); e se forem três ou mais autores, o sobrenome do primeiro autor seguido de *et al.* e do ano da publicação, como em Rafael *et al.* (2008). As citações devem ser separadas por ponto e vírgula e em ordem cronológica, como no exemplo: (Santos, 2003; Almeida *et al.*, 2004; Oliveira & Rocha, 2006). A exatidão e a adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são de responsabilidade do autor.

#### - Exemplos de referências

##### Periódico

##### Dois autores

Thatcher, V.E. & Brasil-Sato, M.C. (2008). *Ergasilussalmini* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of "dourado", *Salminus*

*franciscanus* from the upper São Francisco River, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3):555-7.

##### Mais de dois autores

Rafael, J.A.; Silva, N.M. & Dias, R.M.N.S. (2008). Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 38(1):173-8.

##### Livro

Ângelo, C. & Mayr, E. (2008). *Isto é biologia: a ciência do mundo vivo*. São Paulo: Companhia das Letras.

##### Mais de dois autores

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Johnson, A.; Raff, M.; Roberts, K. et al. (2007). *Fundamentos da biologia celular*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed.

##### Capítulo de Livro

Alterthum, F. (2005). Crescimento bacteriano. In: Trubulsi, L.R. & Alterthum, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu. Biblioteca Biomédica.

##### Dissertações e Teses

Silva, A.B. (2008). *Planejamento experimental e modelagem estatística do efeito do uso do lodo de esgoto em solos*. Dissertação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco.

##### Trabalhos apresentados em congressos e similares

Tubino, R.A.; Paes, E.T. & Monteiro-Neto, C. (2007). Determinação objetiva de guildas ecológicas de peixes da região costeira de Itaipu, Niterói-Rj, Brasil. *Anais do XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar - COLACMAR*, 2007, Florianópolis. v. 1.

**Material eletrônico** deverá informar: disponível em: <http://www...>. (acesso: 4 jun. 2008).

## LISTA DE CHECAGEM

- Declaração de responsabilidade e transferência de direitos autorais assinada por cada autor;
- Indicar a área e subárea da revista para a qual está submetendo o manuscrito;
- Enviar ao editor quatro vias do original (um original e três cópias) e um CD-ROM etiquetado com as seguintes informações: nome do(s) autor(es) e do arquivo. Na reapresentação, incluir o número do protocolo;
- Verificar se o texto, incluindo resumos, tabelas e referências, está reproduzido com letra arial, tamanho 11 e espaçamento entrelinhas 1,5, e com formatação de margens superior e inferior (no mínimo 2,5cm), esquerda e direita (no mínimo 3cm);
- Verificar se estão completas as informações de legendas das figuras e tabelas;
- Preparar página de rosto com as informações solicitadas;
- Incluir nomes de agências financiadoras e número do processo;
- Indicar se o artigo é baseado em tese/dissertação, colocando o título, o nome da instituição, o ano de defesa e o número de páginas;
- Incluir título do manuscrito, em português e inglês;



- Incluir título abreviado (*short title*) com quarenta caracteres, para fins de legenda em todas as páginas;

- Incluir resumos com no mínimo 150 e no máximo 250 palavras nos dois idiomas, português e inglês, ou em espanhol, nos casos em que se aplique, com palavras-chave;

- Verificar se as referências estão normalizadas segundo estilo adotado pela revista, ordenadas alfabeticamente, e se todas estão citadas no texto;

- Incluir permissão de editores para reprodução de figuras ou tabelas publicadas;

- Incluir parecer do Comitê de Ética da instituição.

## DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS

Cada autor deve ler e assinar os documentos Declaração de Responsabilidade (1) e Transferência de Direitos Autorais (2), nos quais devem constar:

- Título do manuscrito;

- Nome por extenso dos autores (na mesma ordem em que aparecem no manuscrito);

- Autor responsável pelas negociações.

**1. Declaração de responsabilidade:** todas as pessoas relacionadas como autoras devem assinar declarações de responsabilidade nos termos abaixo:

- “Certifico que participei da concepção do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo, que não omiti quaisquer ligações ou acordos de financiamento entre os autores e companhias que possam ter interesse na publicação deste artigo”;

- “Certifico que o manuscrito é original e que o trabalho, em parte ou na íntegra, ou qualquer outro trabalho com conteúdo substancialmente similar de minha autoria não foi enviado a outra revista e não o será enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela Bioikos, quer seja no formato impresso ou no eletrônico”.

### 2. Transferência de direitos autorais:

- “Declaro que, em caso de aceitação do artigo, a Bioikos passa a ter os direitos autorais a ele referentes, que se tornarão propriedade exclusiva da revista, e fica vedada qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação, impressa ou eletrônica, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e, se obtida, farei constar o competente agradecimento à revista”.

Assinatura do(s) autores(s) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Toda correspondência deve ser enviada à revista Bioikos no endereço abaixo:**

Núcleo de Editoração SBI - Campus II  
Av. John Boyd Dunlop, s/n., Prédio de Odontologia, Jd. Ipaussurama, 13060-904, Campinas, SP, Brasil.  
Fone/Fax: +55-19-3343-6875  
E-mail: sbi.ne\_biomed@puc-campinas.edu.br



## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The Journal *Bioikos* publishes original scientific studies, reviews and scientific communications of many biological areas. In 2010, *Bioikos* was divided into broad areas for publication, with specific associated editors for each area. The areas are the following:

- **Environmental**, covering:
  - Botany
  - Ecology
  - Zoology
  - Fishing Resources
  
- **Teaching**, covering:
  - Education, Society and Environment
  - Teaching of Sciences and Biology

We kindly ask the authors to indicate the area and subarea of the study according to the divisions above when submitting articles to the journal.

### EDITORIAL PROCEDURES

#### 1. Assessment of the manuscript

Manuscripts submitted to the journal in agreement with the editorial policy and instructions for authors are preselected by the editors according to the scientific merit of the contribution. If the article does not meet the requirements or standards of the journal, the authors will be asked to make the necessary changes and/or attach the missing documents, such as an introduction letter.

It is strongly recommended that the author(s) seek(s) professional linguists and/or translators certified in the Portuguese, English or Spanish languages before submitting articles with possible grammar, morphological, syntactic, idiomatic and/or stylistic errors.

Poorly written original articles containing mistakes and/or morphological or syntactic errors are returned to the authors before assessment of their merit or of publication convenience.

Articles approved in this phase are then sent to *ad hoc* referees selected by the editors. Each manuscript is sent to two referees of known competence in the field. If there is disagreement between the referees, the article is sent to a third referee for assessment.

The journal uses the blind review system, that is, both the referees and the authors remain anonymous to each other. Therefore, the authors are asked to avoid including information in the text that may uncover their identity.

If any of the referees report a conflict of interest, the editorial committee will send the article to another *ad hoc* referee.

The referees will either (a) accept the article in full; or (b) accept the article but request changes; or (c) refuse the article. The authors will always be notified of the outcome. However, the editors will make the final decision on whether to publish the article. They will also make adjustments if necessary. Texts with problems are returned to the authors for corrections. The authors are asked to return the article to the publishing department within the established deadline.

**Accepted manuscripts** may return to the authors for approval if changes are made during editing and formatting to meet the style of the journal.

**Hard proofs** are sent to the authors for correction of possible printing mistakes. Please return the hard proofs to the publishing department before the deadline. Other changes in the manuscript cannot be made during this phase.

#### 2. Submission of manuscripts

When submitting articles, the authors are asked to (a) indicate three referees and their respective professional and contact information.

Manuscripts need to be accompanied by a letter signed by all the authors describing the type of work and the thematic area, a declaration that the manuscript is being submitted only to the *Bioikos*, an agreement to transfer the copy rights and a letter stating the main contribution of the study to the area.

The manuscripts need to be sent to the Editorial Center of the Journal, by e-mail <sbi.ne\_biomed@puc-campinas.edu.br> with a line spacing of 1.5, font Arial 11. The file must be in Microsoft word (doc) format version 97-2003 or better.

#### 3. Structure of the manuscript

*Bioikos* Journal publishes original and review articles and scientific notes. Manuscripts may be in Portuguese, Spanish or English and be 15 to 20 pages long. Number all pages, starting at the title page, which should be page 1. Use A4 paper with upper and lower margins of at least 2.5cm and left and right margins of at least 3.0cm.

Reviewed version: send the copie of the reviewed version by e-mail <sbi.ne\_biomed@puc-campinas.edu.br>. The author(s) must send only the last version of the work.

Use blue font to make the requested changes to the text. Include a new letter addressed to the editor confirming your continued interest in publishing the manuscript and listing the changes. The letter should also contain the title and code of the manuscript and, in case of disagreement with the referees' recommendations, arguments that justify your position.

Include the following information in the title page:

- a. Complete title—should be concise and avoid excess words, such as “assessment of...”, “considerations about...”, “exploratory study...”;
- b. Short title with up to forty characters with spaces in English and Portuguese or Spanish;
- c. Full name of all authors indicating their institutional affiliations. Only one title and affiliation will be accepted per author. The author(s) are free to choose which title and affiliation they prefer. Do not abbreviate the titles or affiliations;
- d. Full address of the affiliated universities;
- e. The corresponding author’s full address, fax number, telephone number and e-mail.

**Observation:** Only the title page may contain information about the authors. All other pages cannot contain any information that identifies any of the authors.

**Abstract:** Articles submitted in Portuguese or Spanish must have an abstract in the respective language and one in English. The abstract should have at least 150 words and at most 250 words. Articles submitted in English should include an abstract in Portuguese in addition to the abstract in English. Include in the abstract the objective(s), method(s), information about location, population and sample of the study, and most important results and conclusions, considering the objectives of the study. Also make suggestions for future studies. Abstracts should not contain citations, acronyms or abbreviations. Abstracts may have from three to six keywords.

**Text:** original articles (but not reviews or scientific notes) should follow the formal structure of scientific papers:

- The **Introduction** should contain a current literature review, pertinent to the theme, appropriate to the presentation of the problem and emphasizing its importance. It should not be extensive, except in review articles.

- The **Material and Methods** should contain a clear and succinct description of the method(s) used followed by the corresponding literature references, including procedures, universe, sample, measurement instruments and, when applicable, validation method and statistical treatment. Demonstrate that the statistical procedures were not only appropriate for testing the hypotheses but were also correctly interpreted. Indicate the significance levels used (e.g.  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). If animals are used in the study, indicate if the guidelines of institutional or domestic research committees or domestic laws regarding the care and use of laboratory animals were followed. Also include the number of the approval process.

- The **Results** should be presented in self-explanatory tables or figures with statistical analyses whenever possible. The data in tables and figures should not be repeated in the text. Tables, charts and figures should be limited to five in all and numbered consecutively and independently with Arabic numerals, in concordance with the order in which they are mentioned in the text. Use one page for each item (table, figure, chart, etc.) and indicate their location in the text. Always include

the location and year of the study in their titles. Keep the titles short. Use open side borders for charts and tables. The author(s) are responsible for the quality of the figures (drawings, illustrations, tables, charts and graphs). It should be possible to resize them without loss of resolution (size of one or two columns, 7.6 and 16.2 cm respectively). Landscape format is not accepted. **Digital figures** should be in JPEG with a minimum resolution of 300 dpi. Printing of **color images**, if technically viable, is paid by the authors. If the authors are interested, *Bioikos* will provide a quote of the costs which will vary according to the number of images, number of pages the color images will occupy and whether other authors also requested printing of color images.

**Figures** should be sent in high quality print, in black and white and/or shades of gray and/or hatches. **Graphs** should be sent separately in WMF files (Windows metafile) and in the format of the program that generated them (SPSS, Excel) accompanied by their quantitative parameters in tables containing the names of all variables. **Satellite images** and **photographs** should be submitted in the following formats: TIFF (Tagged Image File Format) or BMP (Bitmap). Use a minimum resolution of 300dpi (dots per inch) and a minimum width of 16.2cm. Payment is due as soon as the quote is received, if agreed with. Authors are asked to pay by wire transfer or bank deposit. Account information will be duly provided.

The **Discussion (this section can be merged with Results)**: should discuss the results appropriately and objectively and compare them with other published results.

The **Conclusion** should contain pertinent conclusions, i.e., considering the objectives of the study, and make suggestions for future studies. Do not make citations here.

**Acknowledgments** are accepted in a separate paragraph and should contain no more than three lines naming the institutions or individuals who in fact collaborated with the study.

Include the **scientific names** of the studied species in the captions of the illustrations (figures, tables and charts), abstract, and introduction. Abbreviations are accepted elsewhere.

Only include **attachments** if they are essential for text comprehension. Their publication will be decided by the editors.

Use standard **abbreviations and acronyms** and only those used conventionally or sanctioned by use. The first time the term is mentioned in the text, it must be written in full accompanied by the abbreviation or acronym. Do not use abbreviations or acronyms in the title or abstract.

List **References** alphabetically at the end of the manuscript, according to the first author’s last name and chronologically by author. All authors should be cited in references with two to six authors; if more than six authors, only the first six should be cited followed by *et al.* Include the full name of the journals. Citations and/or references of undergraduate monographs, summaries of works presented in congresses, symposiums, workshops, meetings, among others, and unpublished articles (for example, classes, among others) will not be accepted. Citations of dissertations and theses should be avoided as much as possible. If an unpublished work, that is, an article in press, of one of the authors of the manuscript is cited, include the letter of acceptance of the journal that will publish the article. If unpublished data obtained by other researchers are cited in the manuscript, include a letter from the original authors authorizing their use.

All **citations in the text** must be listed in the references. When citing one author, cite the name of the author followed by the year of publication in parenthesis, for example, Rocha (2008); if there are two authors, cite both separated by an ampersand (&), for example, Santos & Martins (2008); if there are three or more authors, cite the last name of the first author followed by the expression *et al.*, for example, Rafael *et al.* (2008). Multiple citations should be separated by a semicolon and cited chronologically, for example, (Santos, 2003; Almeida *et al.*, 2004; Oliveira & Rocha, 2006). The author(s) are responsible for the accuracy and appropriateness of the references that have been consulted and mentioned.

### Examples of references

#### Journal

##### Two authors

Thatcher, V.E. & Brasil-Sato, M.C. (2008). *Ergasilussalmini* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of "dourado", *Salminus franciscanus* from the upper São Francisco River, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3):555-7.

##### More than two authors

Rafael, J.A.; Silva, N.M. & Dias, R.M.N.S. (2008). Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 38(1):173-8.

#### Book

Ângelo, C. & Mayr, E. (2008). *Isto é biologia: a ciência do mundo vivo*. São Paulo: Companhia das Letras.

##### More than two authors

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Johnson, A.; Raff, M.; Roberts, K. *et al.* (2007). *Fundamentos da biologia celular*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed.

#### Book chapter

Alterthum, F. (2005). Crescimento bacteriano. In: Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu. Biblioteca Biomédica.

#### Dissertations and theses

Silva, A.B. (2008). *Planejamento experimental e modelagem estatística do efeito do uso do lodo de esgoto em solos*. Dissertação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco.

#### Works presented in congresses and the like

Tubino, R.A.; Paes, E.T. & Monteiro-Neto, C. (2007). Determinação objetiva de guildas ecológicas de peixes da região costeira de Itaipua, Niterói-Rj, Brasil. *Anais do XII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar - COLACMAR*, 2007, Florianópolis. v.1.

**Web pages:** include the URL: <<http://www...>>. (accessed on June 4, 2008).

### CHECKLIST

- Declaration of responsibility and transfer of the copyrights signed by all authors.

- Indicate the area and subarea of the journal to which the manuscript is being submitted.

- Send four copies of the manuscript to the editor (one original and three copies) and a CD-ROM or DVD with the following information in the label: name of the author(s) and file name. If the article is being resubmitted after compliance with referees' suggestions, include the number of the protocol.

- The text, including the abstract, tables and references, should use font Arial 11 and line spacing of 1.5. The upper and lower margins should be of at least 2.5cm and the left and right margins should be of at least 3cm.

- Verify if the information in the captions of figures and tables is complete.

- Prepare a title page with the necessary information.

- Include the names of the sponsors and process numbers.

- Indicate if the article is based on a thesis/dissertation and include the title, name of institution, year of defense and number of pages.

- Include the title of the manuscript in English and Portuguese or Spanish.

- Include a short title with a maximum of 40 characters with spaces. This title will be the caption of all pages.

- Include abstracts with no less than 150 and no more than 250 words in English and Portuguese or Spanish, according to the language of the manuscript, and the respective keywords.

- Verify if the references are in agreement with the style of the journal and if all citations are included.

- Include the authorization of original editors to reproduce material published elsewhere.

- Include the approval of the Research Ethics Committee of the study institution.

### DECLARATION OF RESPONSIBILITY AND TRANSFER OF COPYRIGHT OWNERSHIP

Each author is asked to read and sign the documents "Declaration of Responsibility" (1) and "Transfer of Copyright Ownership" (2) which must include:

- the title of the manuscript;

- full name of the authors (in the same order that they appear in the manuscript);

- author responsible for the negotiations.

**1. Declaration of responsibility:** all authors are asked to sign the declarations of responsibility in the terms below:

- "I certify that I participated in the conception of the study and make public my responsibility for its content. I did not omit any connections or financial agreements with authors and companies that may have an interest in the publication of this manuscript".

- "I certify that the manuscript is original and that the work, in part or in full, or any other work with a substantially similar content of my authorship, has not been submitted to another journal in hard or electronic copy and will not be submitted to another journal in hard or electronic copy while its publication is being considered by the journal *Bioikos*".

## 2. Transfer of copyright ownership:

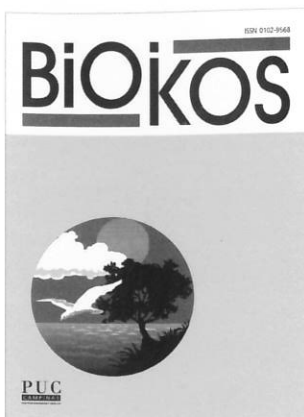
- "If *Bioikos* accepts to publish the manuscript, I declare that *Bioikos* becomes the exclusive owner of its copyrights. I am aware that

any reproduction elsewhere, in part or in full, in any media, printed or electronic, without the previous and necessary authorization by *Bioikos*, is strictly forbidden. If the authorization is granted, I shall include a note thanking *Bioikos*".

Signature of the author(s)      Date \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

***All correspondence should be sent to journal of Bioikos at the address below***

Núcleo de Editoração SBI - Campus II  
 Av. John Boyd Dunlop, s/n., Prédio de Odontologia, Jd. Ipaussurama, 13060-904, Campinas, SP, Brasil.  
 Fone/Fax:+55-19-3343-6875  
 E-mail: [sbi.ne\\_biomed@puc-campinas.edu.br](mailto:sbi.ne_biomed@puc-campinas.edu.br)



Prezado leitor,

É com satisfação que vimos convidá-lo **ASSINAR** ou **RENOVAR** a revista *BIOIKOS*, a melhor forma de ter contato com os trabalhos desenvolvidos por pesquisadores da área através de uma publicação nacional, indexada pela ASFA - Aquatic Sciences & Fisheries Abstracts, Base de Dados Periódica (Índice de Revistas Latinoamericano em Ciências), Lista Qualis: B-3.

Esperamos contar com sua presença entre nossos assinantes regulares.

Preencha o canhoto abaixo.

**ASSINATURA**       **RENOVAÇÃO**

<input type="checkbox"/> <b>Volume 22 (1 e 2) (2008)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pessoas Físicas</b>	R\$ 30,00	<input type="checkbox"/> <b>Institucional</b>	R\$ 50,00	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>Volume 23 (1 e 2) (2009)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pessoas Físicas</b>	R\$ 30,00	<input type="checkbox"/> <b>Institucional</b>	R\$ 50,00	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>Volume 24 (1 e 2) (2010)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pessoas Físicas</b>	R\$ 40,00	<input type="checkbox"/> <b>Institucional</b>	R\$100,00	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>Volume 25 (1 e 2) (2011)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pessoas Físicas</b>	R\$ 40,00	<input type="checkbox"/> <b>Institucional</b>	R\$120,00	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>Volume 26 (1 e 2) (2012)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pessoas Físicas</b>	R\$ 40,00	<input type="checkbox"/> <b>Institucional</b>	R\$120,00	<input type="checkbox"/>

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

CNPJ/CPE: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### FORMAS DE PAGAMENTO

##### Boleto Bancário

Solicitar via e-mail: [sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br](mailto:sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br)

**Obs. Favor indicar melhor data para o pagamento e em nome de quem o boleto deverá ser emitido.**

**Razão Social: Sociedade Campineira de Educação e Instrução. CNPJ: 46.020.301/0001-88**

**Revista Bioikos** - Núcleo de Editoração - Prédio de Odontologia - Campus II  
Av. John Boyd Dunlop, s/n. - J. Ipaussurama - 13060-904 - Campinas - SP. Fone/Fax: (19) 3343-6875  
E-mail: [sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br](mailto:sbi.assinaturane@puc-campinas.edu.br) - Home Page: [www.puc-campinas.edu.br](http://www.puc-campinas.edu.br)



**Pontifícia Universidade Católica de Campinas**  
(Sociedade Campineira de Educação e Instrução)

**Arcebispo:** Dom Airton José dos Santos

**Reitora:** Profa. Dra. Angela de Mendonça Engelbrecht

**Vice-Reitor:** Prof. Dr. Eduard Pranic

**Pró-Reitor de Graduação:** Prof. Dr. Germano Rigacci Júnior

**Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação:** Profa. Dra. Vera Engler Cury

**Pró-Reitora de Extensão e Assuntos Comunitários:** Profa. Dra. Vera Engler Cury

**Pró-Reitor de Administração:** Prof. Dr. Ricardo Pannain

**Diretora do Centro de Ciências da Vida:** Profa. Dra. Miralva Aparecida de Jesus Silva

**Diretor-Adjunto do Centro de Ciências da Vida:** Prof. Dr. José Gonzaga Teixeira de Camargo

**Diretor da Faculdade de Ciências Biológicas:** Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

#### **Bioikos**

Com capa impressa no papel supremo 250g/m<sup>2</sup> e miolo no papel couchê fosco 90g/m<sup>2</sup>

#### **Editoração eletrônica / DTP**

Toque Final

#### **Impressão / Printing**

Gráfica Editora Modelo Ltda.

#### **Tiragem / Edition**

800

#### **Distribuição / Distribution**

Sistema de Bibliotecas e Informação da PUC-Campinas - Serviço de Publicação, Divulgação e Intercâmbio



## Artigos | Articles

### Ambiental | Environmental

- 3 *Water quality of urban streams, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, based on physical, chemical and biological analyses*  
Qualidade da água de arroios urbanos de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, com base em análises físicas, químicas e biológicas
- Marília Schuch, Edson Fiedler de Abreu Júnior, Eduardo Lobo Alcayaga
- 13 *Validation of daily growth increments of statoliths of Brazilian squid Doryteuthis plei and D. sanpaulensis (Cephalopoda: Loliginidae)*  
Validação de incrementos de crescimento diário dos estatólitos das lulas brasileiras *Doryteuthis plei* e *D. sanpaulensis* (Cephalopoda: Loliginidae)
- Daniela Cordella de Aguiar, Carmen Lucia Del Bianco Rossi-Wongtschowski, José Angel Alvarez Perez
- 23 *Biologia de Tetranychus mexicanus (McGregor) (Acari: Tetranychidae) em folhas de Pupunha (Bactris gasipaes Kunth)*  
*Life-history of the Tetranychus mexicanus (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on leaves of the Pupunha or Peach-palm (Bactris gasipaes Kunth)*
- César Pagotto Stein, Núbia Daólio

### Recursos Pesqueiros | Fishing Resources

- 29 *A pesca esportiva e o pesque-e-solte: pesquisas recentes e recomendações para estudos no Brasil*  
*Recreational fishing and catch-and-release: recent studies recommendations for studies carried out in Brazil*
- Paulo de Tarso Chaves, Kátia Meirelles Felizola Freire
- 35 *Atividade alimentar do pacu Piaractus mesopotamicus Holmberg (1887) criados em tanques rede*  
*Feeding activity of the pacu Piaractus mesopotamicus Holmberg (1887) reared in fish cages*
- Fabrício José Ferreira, Carlos Alberto da Silva

### Biologia Molecular | Molecular Biology

- 43 *Detecção do polimorfismo gln604glu no Gene Abcg5 em um grupo de indivíduos de São Roque (São Paulo/Brasil) e correlação com parâmetros do perfil lipídico*  
*Detection of the gln604glu polymorphism in the gene Abcg5 in a group of individuals from the city of São Roque (São Paulo/Brazil) and the correlation with lipid profile parameters*
- Diego Baratelli, Suely Capps Fernandes, Sidney Fernandes, Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos, Renata de Lima