

Princípios básicos para testes de hipóteses com uso de experimentos manipulativos em ecologia: relato de um experimento de predador-presa

Basic principles for hypothesis testing with manipulative experiments in ecology: report of a predator-prey experiment

Rafaela Vendrametto Granzotti

Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá
rafaelagranzotti@gmail.com

Luiz Carlos Gomes

Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá e Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/UEM
lcgomes@nupelia.uem.br

Resumo

Experimentos manipulativos são formas de testar hipóteses em que se controla uma ou mais variáveis de interesse para obter-se uma resposta, determinando as relações de causa e efeito. Alguns pontos-chave dessa abordagem são: a similaridade das condições experimentais com as condições naturais dos organismos e o controle dessas variáveis nas unidades experimentais; a aclimação dos organismos utilizados; e a condução de um experimento piloto. O objetivo desse trabalho é relatar a metodologia de um experimento manipulativo sobre a influência da complexidade de habitat no sucesso de predação de um predador, com especial atenção à importância da aclimação adequada dos organismos utilizados no experimento e da condução de um experimento piloto para testar o delineamento experimental planejado. Após um experimento piloto, o predador e as presas foram aclimatados e colocados em aquários com diferentes densidades de macrófitas submersas, em três níveis com cinco réplicas cada. Após duas horas, as presas remanescentes nos aquários foram contadas. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por testes t de Student, mas não foram encontrados efeitos significativos da complexidade de habitat no consumo de presas pelo predador.

Palavras-chave

Piloto; aclimação; tratamento

Abstract

Manipulative experiments consist in the manipulation of one or more interest variables in order to test a hypothesis and determine causal relationships. A few key points of experiments are: maintaining the similarity of environmental variables between the experimental units and the natural environment and controlling these variables in the experimental units; the acclimation of organisms used in the experiment; and the conduction of a pilot experiment. The purpose of this paper is to describe the methodology of a manipulative experiment that tested the influence of habitat complexity on predation success of a predator, regarding specially the acclimation process and its adequate timing, and the conduction of a pilot trial to test the experimental design. After a pilot experiment, predator and prey were acclimated and placed in aquaria with different submerged macrophyte densities, in three levels with five replicates each. After two hours, prey that remained in the experimental units were counted. Differences between treatments were assessed with Student's t tests, however there were no significant effects of habitat complexity on prey consumption by the predator.

Key words

Pilot; acclimation; treatment

Introdução

“Fazer ciência” é um processo empírico, no qual todas as perguntas e hipóteses construídas devem ser testadas seguindo o método científico (UNDERWOOD, 1997; KREBS, 2001). Uma das metodologias usadas para isso são os experimentos manipulativos, em que as variáveis de interesse são controladas, permitindo determinar, mais facilmente, as relações de causa e efeito (PIANA et al., 2009; GOTELLI; ELLISON, 2011). O delineamento desses experimentos, que pode ser simples (unifatorial - um fator) ou complexo (multifatorial - dois ou mais fatores), é crucial, pois, com os dados obtidos, pode-se dar suporte (ou não) para a hipótese formulada (KREBS, 2001). Desta forma, trabalhos de experimentação requerem extensos e minuciosos planejamentos, desde a etapa de determinação da hipótese até o seu teste, através de manipulação das variáveis de interesse. Nesse planejamento, três pontos fundamentais são: o controle das variáveis que podem afetar a resposta, a aclimação dos organismos (especialmente em experimentos com animais), e a condução de um experimento piloto. Além disso, a curiosidade do pesquisador e sua capacidade de conectar a resposta obtida com o que acontece na natureza são requisitos fundamentais para produzir ciência com qualidade.

Assim, este trabalho traz o relato metodológico de um teste experimental, em aquários, envolvendo conceitos ecológicos de interação predador-presa e complexidade de habitat,

demonstrando a importância da condução de um experimento piloto e de um período adequado de aclimação dos organismos para o sucesso de um experimento.

Fundamentação teórica

Delineamento experimental

Um experimento manipulativo consiste em um evento controlado pelo observador (pesquisador) em que ele altera uma condição ou variável do ambiente (i.e., o fator de interesse) para então medir a mudança que essa alteração resultou em outras variáveis (i.e., a variável-resposta) e, assim, testar a hipótese proposta. O delineamento desses experimentos geralmente envolve tratamentos e o controle (GOTELLI; ELLISON, 2011). A Tabela I traz algumas definições de conceitos e termos importantes, envolvidos na condução de um experimento, que pode ser conduzido em condições laboratoriais ou em campo. Muitos experimentos testam o efeito de somente um fator na variável resposta (delineamentos simples - unifatorial), mas diversas vezes o pesquisador deseja saber o efeito de mais de um fator. Nesse caso, é vantajoso utilizar delineamentos multifatoriais, em que é testado tanto o efeito separado de cada fator como também o efeito combinado que os fatores têm na variável resposta (DOWDY et al., 2004; PIANA et al., 2009). Nesse tipo de delineamento, os níveis dos fatores são combinados para formar combinações de tratamentos (Tabela I). Por exemplo, um pesquisador deseja saber o efeito da presença de um predador piscívoro e da densidade de macrófitas aquáticas, no consumo de larvas de insetos por um peixe invertívoro, e está interessado no efeito combinado desses fatores. Para isso, ele pode delinear um experimento fatorial 2x2, em que o fator predação tem dois níveis (ausência e presença) e o fator densidade de macrófitas tem dois níveis (alta e baixa densidade), resultando em quatro combinações de tratamentos, que devem ser atribuídos aleatoriamente às unidades experimentais (DOWDY et al., 2004; PIANA et al., 2009; Tabela I).

Tabela I. Definições de alguns conceitos importantes relacionados à experimentação, segundo Gotelli; Ellison (2001) e Piana et al. (2009).

Conceito	Definição	Exemplo
Fator ou variável-preditora	Variável que é manipulada no experimento	- Complexidade de habitat - Predação

Tratamentos	Diferentes categorias do fator/ fatores utilizados, que serão comparadas	- Densidade de macrófitas - Presença do predador
Níveis do tratamento	Valores referentes ao fator, utilizados nos tratamentos	- 250g de macrófitas (alta) - 70g de macrófitas (baixa)
Réplicas	Múltiplas observações de um mesmo tratamento. Tem o objetivo de quantificar o erro experimental	10 aquários com alta densidade de macrófitas; cada aquário é uma réplica desse tratamento
Erro experimental	Variabilidade da variável-resposta resultante de fatores não controlados e variação ao acaso	Variabilidade entre unidades experimentais
Combinações de tratamentos	Combinações de todos os níveis do fator 1 com todos os níveis do fator 2, em delineamentos multifatoriais	- Alta densidade de macrófitas com predador - Alta densidade de macrófitas sem predador
Variável-resposta	Variável medida em resposta aos diferentes tratamentos	Número de peixes consumidos
Controle	Tratamento em que não há manipulação do fator, mas outras modificações inerentes aos demais tratamentos são realizadas	Presas e predadores interagem sem a adição de macrófitas
Unidades experimentais	Menor material experimental no qual os tratamentos serão estipulados ao acaso. Cada unidade receberá um tratamento ou combinação de tratamentos	Cada aquário utilizado no experimento

No caso de delineamentos multifatoriais, dois tipos de efeitos importantes são investigados: os efeitos principais e o efeito da interação (PIANA et al., 2009). Os efeitos principais são aqueles atribuídos aos fatores separadamente (Fig. 1A), enquanto o efeito da interação é um efeito adicional devido à combinação dos tratamentos, sendo mais conspícuo do que a soma dos efeitos principais envolvidos. Graficamente, quando se plota as médias da variável-resposta das diferentes combinações de tratamentos, a interação entre fatores aparece como desvios de paralelismo (Fig. 1B).

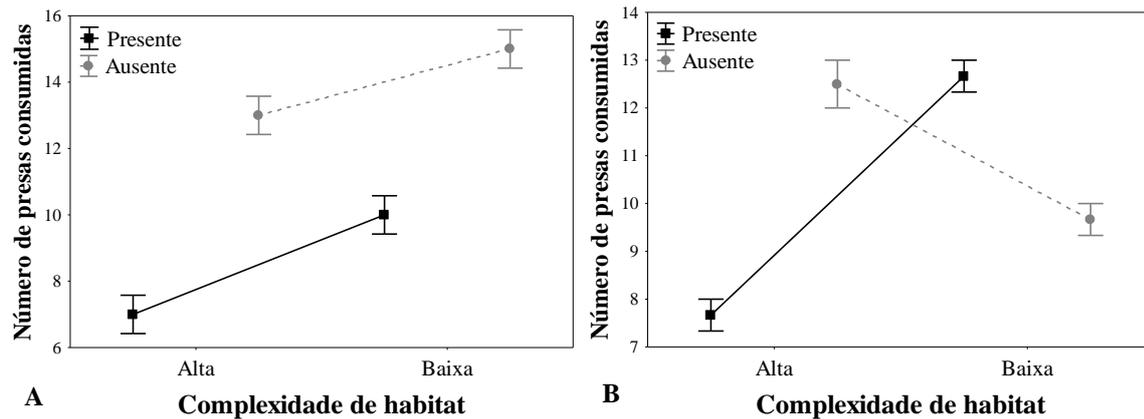


Figura 1. Representações gráficas dos efeitos de dois fatores (densidade de macrófitas e presença/ausência de predação) no número de presas consumidas, em um delineamento experimental multifatorial. A) Efeitos principais. B) Efeito da interação, em que há desvio do paralelismo. Dados são fictícios.

Alguns pontos essenciais de um experimento manipulativo

Um experimento manipulativo, delineado para testar uma hipótese, apresenta alguns pontos essenciais para ser conduzido (Fig. 2). Primeiramente, todas as condições ambientais que podem influenciar os resultados (como luz, temperatura, oxigênio, disponibilidade de alimento), fora o fator de interesse, devem ser controladas igualmente em todas as unidades experimentais, para garantia de que elas são realmente réplicas, o que permite o cálculo do erro experimental (PIANA et al., 2009). Essas variáveis também devem ser mantidas em valores mais próximos às condições encontradas no ambiente natural do organismo utilizado (GOTELLI; ELLISON, 2011).

Para o caso de experimentos que utilizem animais, outro ponto essencial é a aclimação dos indivíduos utilizados. Aclimação, nesse contexto, é o processo de ajustamento fisiológico do indivíduo às condições experimentais (GARLAND; ADOLPH, 1991), e é importante, principalmente, quando há translocação do organismo de seu ambiente natural ao ambiente de condições controladas, onde ocorrerá o experimento, mesmo se essas condições se aproximarem muito daquelas encontradas no ambiente natural. Assim, os indivíduos precisam se “acostumar” às novas condições a que estão expostos (como espaço, temperatura, luminosidade, presença de estruturas físicas no ambiente, entre outras) para que a resposta, ao fator de interesse do experimento, seja a mais próxima possível da resposta que teria em seu ambiente natural.

Além desses pontos, um procedimento que auxilia na determinação das condições experimentais ideais para a investigação da hipótese é o experimento piloto. O piloto consiste

em um experimento preliminar para testar o delineamento experimental planejado, utilizado para determinar o que pode ser mudado para melhorar o trabalho (possíveis falhas) e recolher informações que poderão ser utilizadas para planejar a próxima etapa do estudo (UNDERWOOD, 1997). O piloto também é importante para determinar o esforço (braçal, mental e de equipamentos) que o pesquisador irá precisar para fazer o experimento.

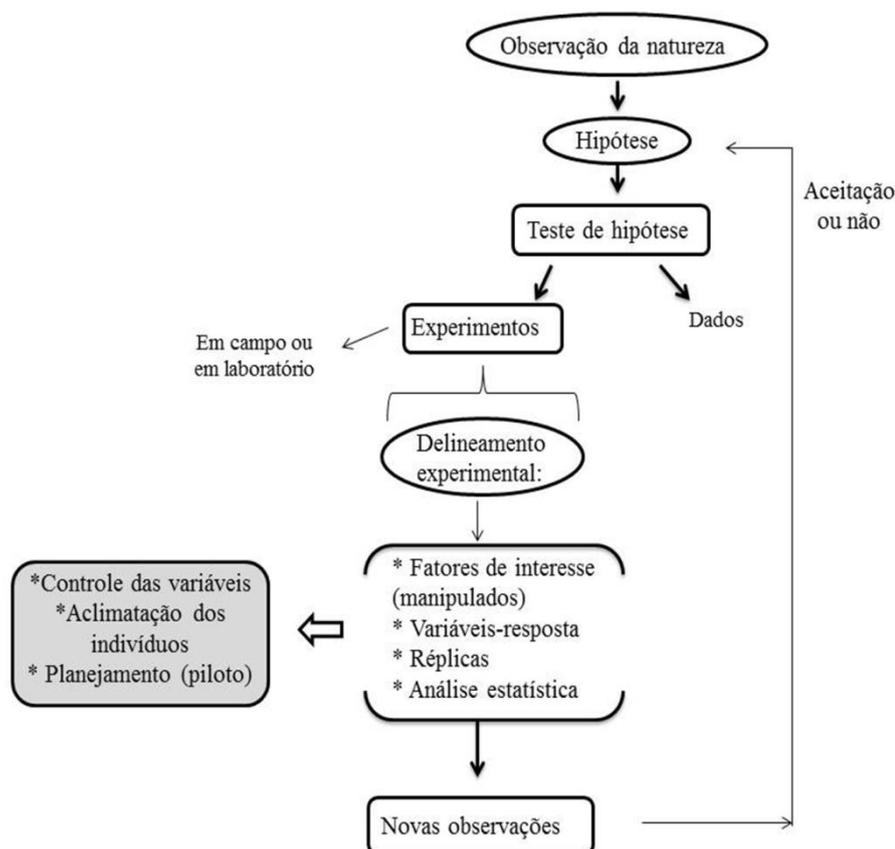


Figura 2. Esquema conceitual do método científico indutivo com foco em testes experimentais, incluindo pontos importantes no delineamento e condução dos experimentos.

É importante ressaltar que todos os experimentos envolvendo animais, antes de serem conduzidos, devem ser analisados e aprovados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), segundo a Lei no. 11.794 de 08/10/2008, através da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição onde a manipulação dos animais acontecerá.

Procedimentos

No experimento aqui relatado, a hipótese a ser testada era se a complexidade de habitat influencia o sucesso de forrageio de um predador. Para isso, baseado na literatura e observações em campo, foi planejado o delineamento experimental (procedimentos e variáveis-resposta) utilizando, como modelo, uma cadeia trófica composta por um peixe

predador piscívoro (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) e um peixe invertívoro (*Moenkhausia forestii*) de água doce. A complexidade de habitat foi reproduzida como a densidade de macrófitas aquáticas submersas, que oferecem refúgio para presas no ambiente natural (Fig. 3). Esse foi o fator de interesse do experimento em questão e, assim, foi manipulado nos diferentes tratamentos: níveis baixa, média e alta densidade de macrófitas (indexadora da complexidade). Outras variáveis que poderiam influenciar os resultados, como temperatura, luminosidade, oxigenação da água e alimentação prévia dos predadores foram controladas e mantidas em níveis similares em todos os tratamentos. Todas as condições ambientais se aproximaram daqueles valores encontrados no ambiente natural dos organismos que foram utilizados.

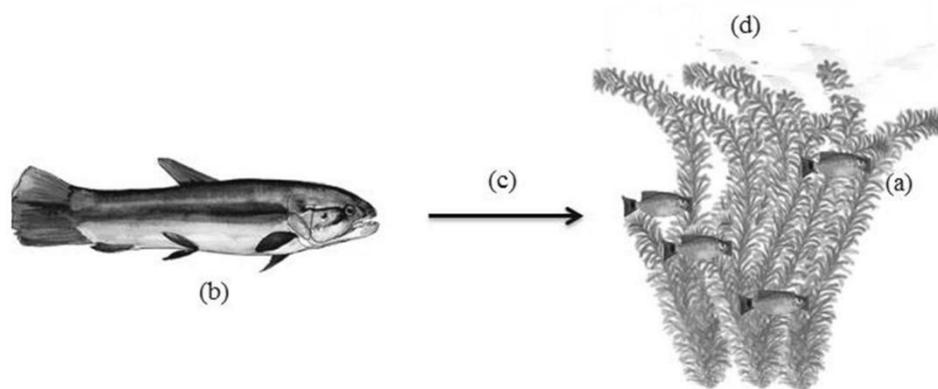


Figura 3. Interações entre os organismos utilizados e a complexidade de habitat. A presa *Moenkhausia forestii* (a) e o predador *Hoplerythrinus unitaeniatus* (b) fazem parte de uma interação de predação (c), possivelmente influenciada pela densidade de macrófitas submersas (d), que oferecem refúgio para as presas.

Os peixes usados como predador e presas foram coletados de seus ambientes naturais e mantidos no laboratório até a execução do experimento. É nesse período em que ocorre a aclimação dos indivíduos, que depende do tipo de organismo e de seu tamanho. O período de aclimação das presas e dos predadores foi diferente, devido a seu tamanho e comportamento distintos. Na literatura que reporta experimentos ecológicos, a espécie utilizada como presa geralmente é aclimatada nas condições experimentais por períodos que variam de 8 a 72 h (e.g., FIGUEIREDO et al., 2015), enquanto peixes predadores são aclimatados por pelo menos 14 dias (e.g. MURRAY et al., 2016).

Os indivíduos de *H. unitaeniatus* e *M. forestii*, utilizados no experimento, foram mantidos em caixas d'água com temperaturas controladas e alimentados por 15 dias. Essas caixas não representavam as unidades experimentais onde seria realizado o experimento, mas

sim uma primeira etapa de aclimação dos indivíduos fora de seu ambiente natural. Após esse período, os peixes foram transferidos para aquários de 40 L, nos quais o experimento seria executado, e mantidos neles por sete dias. Essa etapa representa a fase de aclimação real, em que os organismos se aclimatariam às condições experimentais finais. Nessas unidades experimentais, as condições de temperatura, oxigênio e luminosidade foram controladas. A alimentação dos indivíduos, nessa etapa, também foi cuidadosamente controlada, principalmente a dos predadores, que foram alimentados uniformemente e depois deixados em jejum por dois dias.

Nessa etapa foi necessário conduzir o experimento piloto, durante o qual foram determinados vários fatores importantes para a posterior execução do experimento completo: se o tempo de aclimação dos indivíduos estava adequado e se as demais condições experimentais, como a densidade de macrófitas, estavam adequadas para testar a hipótese proposta. Entretanto, durante o experimento piloto, foi observado que os peixes predadores não tentaram capturar as presas, mesmo com o período de jejum proposto (dois dias). Isso demonstrou que o comportamento dos predadores ainda não se assemelhava ao comportamento que teriam em seu ambiente natural, indicando que os indivíduos ainda não estavam aclimatados. Assim, o piloto indicou que o período de aclimação dos predadores tinha sido insuficiente até ali, sendo necessário replanejar o experimento, para que fosse alcançado maior sucesso no teste da hipótese proposta. Então, no experimento aqui relatado, o período de aclimação dos predadores foi de 21 dias nas condições experimentais finais, e o período de jejum final foi de sete dias.

Após a aclimação final dos predadores nas unidades experimentais, já com a presença de macrófitas aquáticas submersas em diferentes densidades, um vidro divisor foi colocado nos aquários para permitir a inserção das presas sem que elas tivessem contato direto com o predador. Assim, após 24 h de aclimação das presas, o vidro divisor foi retirado e o experimento teve início. Cada aquário continha um indivíduo predador e seis indivíduos presa. Predadores e presas ficaram em contato por duas horas; após esse período, foram retirados dos aquários e o número de presas remanescentes foi contado, permitindo determinar o consumo do predador nas diferentes densidades de macrófitas.

O próximo passo em um estudo experimental é avaliar estatisticamente a resposta obtida para aceitar ou rejeitar a hipótese testada (KREBS, 2001). Geralmente são utilizados os testes de hipóteses paramétricos, como os testes t de Student e as Análises de Variância (ANOVA). Para o experimento relatado, testamos as diferenças entre os tratamentos com

testes t de Student, mas não foi encontrado efeito significativo da complexidade de habitat no consumo de presas por *H. unitaeniatus*. Análises mais detalhadas demonstraram que modificações comportamentais, como mudanças na estratégia de forrageio do predador, resultaram em consumo de presas similares nas diferentes complexidades de habitat.

Considerações finais

Experimentos científicos requerem planejamento extensivo e dedicação por parte do pesquisador, mas quando bem conduzidos podem trazer respostas importantes sobre mecanismos ecológicos. Em relação ao experimento aqui relatado, a aclimatação adequada dos predadores se mostrou fundamental para o sucesso do delineamento experimental e, para determinar o tempo ideal de aclimatação, a condução de um experimento piloto foi de suma importância. O período de jejum dos predadores, nas condições experimentais finais, pode ter sido muito prolongado, influenciando os resultados e o comportamento de consumo dos piscívoros. Assim, sugere-se que, em experimentos envolvendo animais predadores, tanto o período ideal de aclimatação quanto o período de jejum sejam estudados com o experimento piloto, para que o comportamento dos mesmos se aproxime o máximo possível das condições naturais.

Os testes experimentais também podem, e devem fazer parte do ensino de Biologia e Ecologia nas escolas, sejam eles simplificados ou não. A experimentação pode instigar a curiosidade do aluno e exercitar sua capacidade de investigação, levando a uma construção significativa dos conhecimentos envolvidos (BINSFELD; AUTH, 2011; SILVA, 2014). Participar e, até mesmo, construir um experimento, permite ao aluno aplicar o método científico, exercitando a criação de hipóteses (mesmo que sejam simples), o planejamento do experimento e a busca de respostas que se apliquem à sua hipótese inicial. Os educadores, então, podem auxiliar no entendimento e interpretação dos resultados, relacionando os mesmos a observações feitas no ambiente natural e à ecologia dos organismos.

Referências

BINSFELD, S. C.; AUTH, M. A. A experimentação no ensino de ciências da educação básica: constatações e desafios. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 8, 2011, Campinas. Atas... Disponível em: <<http://www.nutes.ufrj.br/abrapec/viiienpec/resumos/R1382-1.pdf>>. Acesso em: 11.maio. 2016.

DOWDY, S.; WEARDEN, S.; CHILKO, D. Other Analysis of Variance designs. In: _____. Statistics for research. 3^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004, p. 341-408.

FIGUEIREDO, B. R. S.; MORMUL, R. P.; BENEDITO, E. Structural complexity and turbidity do not interact to influence predation rate and prey selectivity by a small visually feeding fish. *Marine and Freshwater Research*, v. 66, p. 170-176, 2015.

GARLAND, T. JR.; ADOLPH, S. C. Physiological differentiation of vertebrate populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* v. 22, p. 193-228, 1991.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. Princípios de estatística em ecologia. Porto Alegre: Artmed, 2011. 528p.

KREBS, C. Introduction to the science of ecology. In: _____. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. 5^a ed. California: Benjamin Cummings, 2001, p. 2-15.

MURRAY, G. P. D.; STILLMAN, R. A.; BRITTON, J. R. Habitat complexity and food item size modify the foraging behaviour of a freshwater fish. *Hydrobiologia*, n. 766, p. 321-332, 2016.

PIANA, P. A.; FERNANDES, R.; GOMES, L. C. Delineamento e análise de dados obtidos em experimentos com animais. In: LANSAC-TOHA, F. A.; BENEDITO, E.; OLIVEIRA, E. F. [Org]. Contribuições da história da ciência e das teorias ecológicas para a Limnologia. Maringá: EDUEM, 2009, p. 423-449.

SILVA, R. G. Aulas práticas: uma ferramenta didática no ensino de Biologia. *Arquivos do MUDI*, v. 18, n. 3, p. 29-38, 2014.

UNDERWOOD, A. J. Experiments in Ecology. Cambridge University Press, 1997. 504p.

Sugestões de leitura

PADIAL, A. A. Efeitos da heterogeneidade espacial sobre a predação e o uso de habitat de peixes invertívoros em micro-escala espacial. Anexo: Problemas na realização do experimento. 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) – Departamento de Biologia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

CONCEA. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasília, 07 de dezembro de 2015. Disponível em http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf.