



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM
EM CIÊNCIAS DA TERRA E DO AMBIENTE - PPGM**



JOSEANE BRANDÃO PIRES SOARES

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE
*LEMNA AEQUINOCTIALIS WELW. (LEMNOIDEAE - ARACEAE)***

**FEIRA DE SANTANA - BA
2013**

JOSEANE BRANDÃO PIRES SOARES

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE
*LEMNA AEQUINOCTIALIS WELW. (LEMNOIDEAE - ARACEAE)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Modelagem em Ciências da Terra e do Ambiente, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Flávio França

**FEIRA DE SANTANA - BA
2013**

Folha de aprovação...

Os desenvolvimentos disciplinares das ciências não só trouxeram as vantagens da divisão do trabalho, mas também os inconvenientes da super-especialização, do confinamento e do despedaçamento do saber. Não só produziram o conhecimento e a elucidação, mas também a ignorância e a cegueira.”

*Edgar Morin (2006).
A cabeça bem feita*

Dedico esta conquista aos meus irmãos, Moisés e Mateus, pois sabem o que passei para chegar aqui e tomam isto como exemplo para suas vidas!

AGRADECIMENTOS

A Deus: toda honra, toda glória e todo o meu louvor!

A FAPESB pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Modelagem em Ciências da Terra e do Ambiente na pessoa dos coordenadores, pela oportunidade de ingresso em um novo patamar acadêmico.

Aos meus pais pelo “alicerce” que me deram e em especial à minha mãe (*in memoriam*), que não ficou aqui para vivenciar comigo tanta coisa que sonhamos juntas, mas me deixou um legado eterno.

Ao meu esposo pelo seu companheirismo.

Aos meus dois irmãos simplesmente por existirem, e a todos os meus familiares pelo carinho. Estes laços podem não acrescentar “nada” na pesquisa, mas acrescenta “tudo” no pesquisador!

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio França, por ter “abraçado esta ideia” fazendo-se participante desta pesquisa e não apenas expectador. A você Prof. Flávio, meu carinho e respeito!

A Prof. Ms. Eliane Leite (“*amiga mais chegada que uma irmã*”) pelo incentivo em toda minha caminhada acadêmica, e aos meus amigos que com suas histórias enriquecem meu cotidiano.

Aos meus colegas da turma, e aos do TAXON.

A todos os professores do PPGM, em especial a Prof. Dra. Taíse Bonfim e o Prof. Dr. Garcia Vivas pelas orientações “*diante do desconhecido*”.

A Prof. Dra. Efigênia, e ao Prof. Ms. Vitor Rios (UFBA) pela sua contribuição nos passos iniciais desta pesquisa.

Ao apoio técnico de Adriano (Labotec),
Elmário (Lab. Didático) e Leila (PPGM),

a todos (as) vocês os meus reais agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1 – Cultivo ex situ de <i>Lemna aequinoctialis</i> Welw.	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.4 CONCLUSÕES.....	44
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 2 – Modelo computacional do crescimento de <i>Lemna aequinoctialis</i> Welw.	51
2.1 INTRODUÇÃO.....	52
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.4 CONCLUSÕES.....	72
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICE I	78
APÊNDICE II	79
APÊNDICE III	80
APÊNDICE IV	81
APÊNDICE V	82
APÊNDICE VI.....	83
APÊNDICE VII.....	84

LISTA DE FIGURAS

1. Fluxograma da pesquisa.....	14
2. Forma de vida das macrófitas aquáticas.....	17
3. Desenho da <i>Lemna aequinoctialis</i> Welw.....	21
4. Classificação Taxonômica	22
5. Mapa da região onde foram realizadas as coletas	24
6. Açude 5 (lagoa das coletas).....	25
7. Cultivo de clones	27
8. Dois frondes de <i>Lemna aequinoctialis</i>	27
9. Experimentos organizados na bancada do TAXON	27
10. Brotamento de uma fronde a partir de outra.....	28
11. Inóculo de Lemnas marcadas com caneta preta a prova d'água.....	29
12. Distribuição do último experimento	29
13. Estufa utilizada para os experimentos.....	30
14. Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento I com solução P&S)	32
15. Curva de crescimento em solução P&S (experimento I).	32
16. Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento I com água da lagoa). .	34
17. Curva de crescimento em água da lagoa (experimento I)	34
18. Comparação dos resultados do primeiro experimento	35
19. Algas na raiz da <i>L. aequinoctialis</i>	36
20. Experimento antes, durante e depois da contaminação	37
21. Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento II)	38
22. Curva de crescimento em solução P&S (experimento II).	39
23. Crescimento de Lemna a partir de diferentes inóculos (em água da lagoa)	40
24. Crescimento de Lemna a partir de diferentes inóculos (experimento III com solução P&S)	42
25. Experimentos com microorganismos visíveis a olho nú (iniciaram com 1 Lemna).....	43
26. Recipiente 26 e recipiente 56.....	44
27. Interfaces de 4 modelos em NetLogo da biblioteca do programa.....	53
28. Protocolo ODD (Grimm <i>et al.</i> , 2006).....	55
29. Roteiro do agente Lemna.....	58
30. Roteiro do agente contaminante.....	59

31. Gráfico com intervalo de confiança do crescimento em NetLogo.....	67
32. Comparação entre as curvas de crescimento do modelo com os resultados em NetLogo.....	68
33. Interface do modelo de crescimento de <i>Lemna aequinoctialis</i>	69
34. Crescimento a partir de 4 indivíduos.....	70
35. Crescimento a partir de 8 indivíduos.....	70
36. Comparação entre as curvas de Comparação dos resultados da simulação em NetLogo.....	71
37. Comparação dos resultados da simulação em NetLogo.....	72

LISTA DE TABELAS

1.	Média semanal do experimento I (com solução P&S).....	31
2.	Média semanal do experimento I (com água da lagoa).....	33
3.	Média semanal do experimento II (com solução P&S).....	36
4.	Média semanal do experimento III (com água da lagoa).....	40
5.	Média semanal do experimento III (com solução P&S).....	41
6.	Média semanal do experimento III com 8 indivíduos inoculados em quatro meios de cultura.....	43
7.	Crescimento médio em NetLogo.....	67

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o fenômeno da facilitação no estabelecimento e desenvolvimento de populações de *Lemna aequinoctialis* Welw. através do modelo computacional em NetLogo. Para tanto foram realizados cultivos *ex situ* para estabelecer parâmetros e variáveis para serem utilizados na elaboração do modelo, e estudar o fenômeno da facilitação entre os indivíduos. Com o modelo computacional, buscou-se testar o inóculo ideal para esta facilitação em ambientes não-axênicos. Os experimentos foram realizados em água da lagoa autoclavada e sem autoclavar, em solução de Pirson & Siedel, e em várias concentrações de Citrato de Chumbo. Em cada semana foi contado o número de indivíduos brotados. Os resultados foram organizados em planilha eletrônica e foram produzidas curvas ajustadas segundo modelo de regressão. A comparação entre os resultados foi avaliada a partir do teste t com nível de confiança de 5%. Os resultados do cultivo mostraram que o chumbo favorece o aumento da taxa de crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw., que um indivíduo pode permanecer vivo até 70 dias num meio sem a reposição, e que existe facilitação entre os indivíduos da mesma espécie para o seu desenvolvimento em ambientes contaminados, existindo assim um valor mínimo pelo qual as colônias se estabelecem. O modelo computacional descreve o comportamento da *Lemna aequinoctialis* Welw. num ambiente simulado com e sem a contaminação por microorganismo. A hipótese de facilitação foi estudada e mostrou que um único indivíduo em ambiente não-axênico não se desenvolve, dois indivíduos podem se desenvolver, e o valor mínimo para se garantir o estabelecimento e crescimento é quatro indivíduos.

PALAVRA-CHAVE:

Cultivo, curvas de crescimento, macrófitas, modelo computacional, facilitação

ABSTRACT

The aim of this work was to study the phenomenon of facilitation in the establishment and development of populations of *Lemna aequinoctialis* Welw .. through the computer model in NetLogo. For both crops were carried out ex situ to establish parameters and variables to be used in developing the model, and study the phenomenon of facilitation between individuals. With the computational model, we sought to test the ideal inoculum for this facilitation in non-axenic. The experiments were performed in pond water and autoclaved without autoclaving in solution Pirson & Siedel, and various concentrations of citrate Lead. Each week to count the number of individuals sprouted. The results were organized in spreadsheet and produced curves were adjusted in the regression model. A comparison of the results was evaluated from the t test with a confidence level of 5%. The results showed that the cultivation lead promotes increased growth rate of *Lemna aequinoctialis* Welw. That an individual can stay alive up to 70 days in medium without resetting, and that there is facilitation between individuals of the same species for their development in contaminated environments, so there is a minimum amount by which the colonies are established. The computational model describes the behavior of *Lemna aequinoctialis* Welw. a simulated environment with and without contamination by microorganisms. The hypothesis of facilitation was studied and showed that a single frond of *Lemna* in non-axenic not developed, two individuals can develop, and the minimum to ensure the establishment and growth is four individuals.

KEYWORD:

Cultivation, growth curves, macrophytes, computational model, facilitation

INTRODUÇÃO GERAL

Os modelos são ferramentas valiosas para pesquisas, porque além de auxiliarem na compreensão de fenômenos, permitem ao homem fazer inferências e simulações para determinados resultados. Segundo Biembengut (1999) criar modelos para interpretar fenômenos naturais e sociais é inerente ao ser humano, ele também afirma que a noção de modelo está presente nas diversas áreas do conhecimento como: Arte, Moda, Arquitetura, História, Economia, Literatura e Matemática.

As simulações através do computador podem colocar em ação as mais variadas hipóteses sobre a realidade, e auxiliam na análise de dados coletados para responder aos problemas em questão. A interdisciplinaridade discutida e almejada nos ambientes de educação e pesquisa é uma característica presente nestes programas. No NetLogo por exemplo, é possível criar formas geométricas e animações na tela do computador, que podem ser usadas para representar muitos objetos do mundo (uma formiga, uma molécula, um carro, dentre outros). Ele permite explorar e modelar comportamento de sistemas descentralizados e sistemas complexos, seus comandos são muito próximos da linguagem natural e apresentam uma interface gráfica com botões de controle, sistema de gráficos, exportação e importação de modelos, entre outros (AZEVEDO *et al*, 2005).

Conhecidas como “duckweeds”, “lentilhas d’água” ou somente “Lemnas”, as *Lemnoideae* formam um grupo monofilético em *Araceae*, ocupam grandes áreas nas lagoas do Semi-árido e são consideradas as menores plantas vasculares do mundo (POTT, 1993). As espécies desta subfamília são bioindicadoras ambientais, estocam nutrientes, são utilizadas na produção de papel e de biogás, são estudadas como alternativa para redução de custos e aumento de produção, além de fornecerem habitat e fonte de alimento para outros organismos (TARDIVO *et al.*, 2007; POTT & POTT, 2002; LANDOLT, 1986; HENRY-SILVA & CAMARGO, 2002).

Fragoso *et al.* (2009) destaca o caráter multidisciplinar de um ecossistema aquático e afirma que existem muitos fatores e processos físicos, químicos e biológicos que dificultam análises quantitativas deste ecossistema, ressaltando a importância dos modelos neste estudo. Modelar o crescimento da *Lemna aequinoctialis* Welw. pode ser uma alternativa para realização de simulações utilizando apenas programas computacionais, uma vez que os bioensaios têm sido grandes aliados dos pesquisadores que buscam prever os efeitos de substâncias nocivas ao meio ambiente.

Na tentativa do cultivo de clones de *Lemna aequinoctialis* Welw. em laboratório (utilizando água da mesma lagoa onde foram coletados os espécimes) observou-se que um único indivíduo por recipiente não desenvolveu, morrendo após algumas semanas. Com a

mesma água da lagoa, foram inoculadas quantidades maiores (aleatórias) de indivíduos e houve crescimento do número de indivíduos. O cultivo de clone foi então proposto utilizando solução de Pirson & Siedel (LANDOLT, 1986) e houve desenvolvimento e formação de colônias de *Lemna*. A partir desta observação, levantou-se a hipótese de que existiu algum componente na água da lagoa que inibiu o crescimento do vegetal, sendo então necessário um valor mínimo de indivíduos no meio, para o estabelecimento e desenvolvimento da espécie.

Relações ecológicas entre os seres vivos são muito estudadas no âmbito das pesquisas, entre elas há a relação de facilitação entre espécies. Este fenômeno já foi estudado por pesquisadores (Bieber & Scultori, 2007) que o definem como a capacidade de alguns organismos de reverterem um ambiente com características abióticas severas, para se estabelecerem nestes locais.

Neste trabalho pretende-se estudar o fenômeno de facilitação entre indivíduos de *Lemna aequinoctialis* Welw. através de um modelo computacional construído e comparado com dados experimentais conforme fluxograma metodológico na figura 1. No primeiro capítulo apresenta-se o cultivo *ex situ* de *Lemna aequinoctialis* Welw. em diferentes meios de cultura, e no segundo capítulo a construção do modelo computacional de crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw. com o fenômeno da facilitação, que é confrontado com os resultados obtidos nos experimentos.

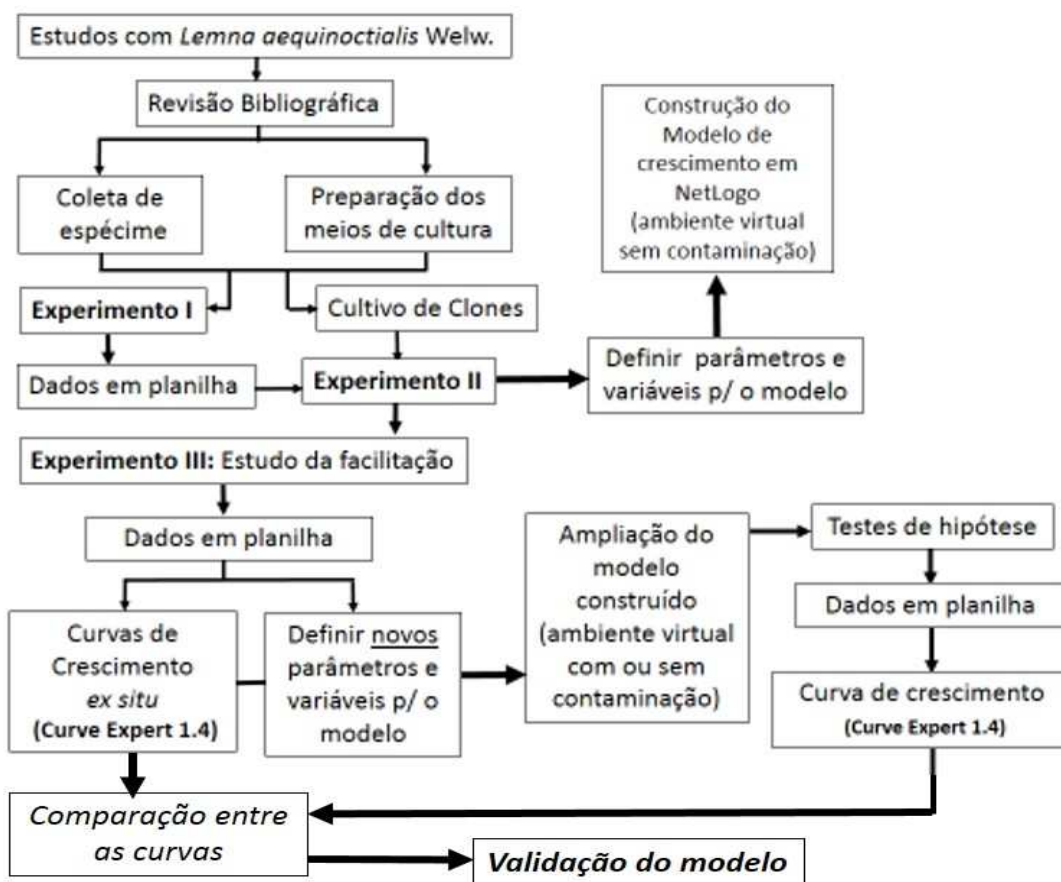


Figura 1 – Fluxograma da pesquisa

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, L. L., MENEZES, C. S., MAGDALENA, B. C., PONTAROLO, E. Ambientes Computacionais Orientados a Agentes para apoio à Aprendizagem Baseada em Simulação. In: **Anais do XVI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE INFORMÁTICA NA EDUCAÇÃO – SBIE-UFJF**, Juiz de Fora – MG. 2005 Disponível em < <http://www.br-ie.org/pub/index.php/sbie/article/view/392> >. Acesso em set. 2010.

BIEBER, A. G.; SCULTORI, C. Facilitação ao Estabelecimento de Plântulas em manchas de vegetação nas Dunas da Ilha do Cardoso, Cananéia. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, setembro, 2007. Caxambu, Mg.

BIEMBENGUT, M. S., **Modelagem Matemática & Implicações no Ensino-Aprendizagem de Matemática**. Blumenau: Editora FURB, 1999.

FRAGOSO JÚNIOR, C. R.; FERREIRA, T. F.; MARQUES, D. M. **Modelagem ecológica em ecossistemas aquáticos**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. In: **Acta Sci**, v. 24, p. 36-48, 2002. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/2353/2297>>

LANDOLT E. The family *Lemnaceae*- a monographic study. Vol. 1: Morphology; karyology; ecology; geographic distribution; systematic position; nomenclature; descriptions. In: LANDOLT, E. (ed.) **Biosystematic Investigations in the family of Duckweeds (*Lemnaceae*)**. Stiftung Rübél, Zürich, 1986.

POTT, V. J. ; POTT, A. Potencial de uso de plantas aquáticas na despoluição da água. In: **Documentos 133**. Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747, dez. 2002.

POTT, V.J. A família Lemnaceae S. F. Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. Dissertação de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 200 p., 1993.

TARDIVO, R. C., BACH, A., MORO, R. S. Macrófitas aquáticas da represa de Alagados. In: **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**. Editado por Mário Sérgio de Melo; Rosemeri Segecin Moro; Gilson Burigo Guimarães. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2007.

CAPÍTULO 1

Cultivo *ex situ* de *Lemna aequinoctialis* Welw.

1.1 INTRODUÇÃO

Os termos “hidrófitas”, “helófitas”, “euhidrófitas”, “limnófitos”, “plantas aquáticas”, “macrofitas”, referem-se ao conjunto de vegetais do ambiente aquático, sendo “macrofitas aquáticas” o termo de uso mais corrente (Pompêo, 2001). Segundo Thomaz & Bini (2003) a partir da década de 1980 surgiram pesquisas com macrofitas aquáticas de aspecto ecológico, pois até então só existiam poucas publicações de abordagem taxonômica. Os autores levantam aspectos que acreditam ter influenciado no aumento destas publicações, tais como a consolidação dos cursos de pós-graduação em ecologia no Brasil, o reconhecimento das importantes funções ecológicas desempenhadas pelas macrofitas aquáticas e as interferências indesejadas, decorrentes do crescimento excessivo desses vegetais. No grupo das macrofitas ainda é insipiente a quantidade de pesquisas realizadas com as espécies do gênero *Lemna*.

As macrofitas aquáticas são classificadas de acordo com a forma de vida (Figura 2): Submersas fixas, Submersas livres, Flutuantes fixas, Flutuantes livres, Emergentes, Anfíbias e Epífitas (IRGANG *et al*, 1984; PEDRALLI, 1990). Segundo pesquisadores como Thomaz & Bini (2003), a temperatura, a luminosidade, a disponibilidade de nutrientes, o carbono e o oxigênio dissolvido influenciam diretamente na produtividade primária destas plantas.

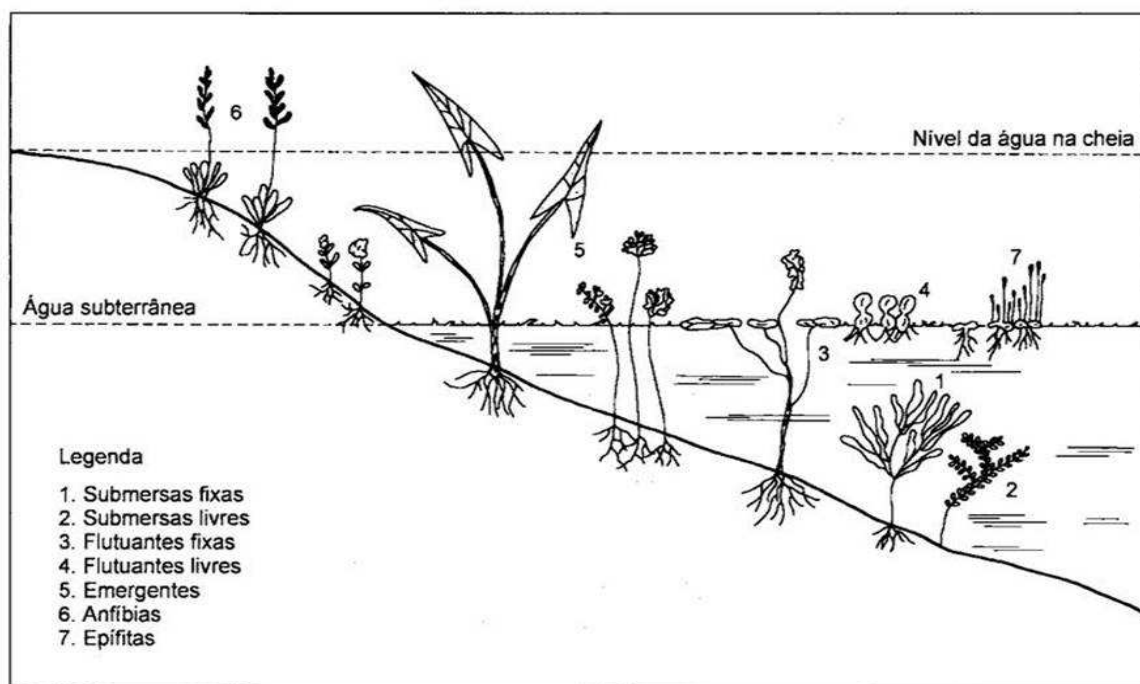


Figura 2 – Forma de vida das Macrofitas Aquáticas (PEDRALLI, 1990)

A importância destes vegetais é múltipla, por exemplo: fornecem habitat e refúgio para alevinos, algas e bactérias fixadoras de nitrogênio; são bioindicadoras ambientais; estocam nutrientes (pois são fonte de alimento para muitos tipos de peixes e algumas espécies de aves e mamíferos aquáticos); liberam nutrientes (absorvendo os nutrientes do sedimento por suas raízes e liberando-os na água, através da excreção ou durante sua decomposição); proporcionam sombreamento (muitas formas de vida são sensíveis às altas intensidades de radiação solar); fornecem materiais de importância econômica para a sociedade (como fertilizante de solo, fertilizante de tanques de piscicultura, matéria prima para a fabricação de remédios, artesanato, etc) (TARDIVO *et al.*, 2007). Segundo o autor essas plantas também podem ocasionar problemas, pois com condições ótimas de crescimento as espécies se propagam causando: a diminuição da disponibilidade de oxigênio solúvel na água; eutrofização do ambiente aquático; proliferação de organismos de importância sanitária; prejuízos ao bom funcionamento dos equipamentos do sistema de geração de energia hidrelétrica e abastecimento de água.

As *Lemnoideae* são macrófitas flutuantes livres, elas são também conhecidas como duckweeds, lentilhas d'água ou Lemnas e integram um grupo monofilético¹ dentro de Araceae² (ROTHWELL *et al.*, 2004). A principal característica das *Lemnoideae* está na sua redução morfológica, estando o corpo vegetal resumido a um fronde fotossintetizante, sendo que raízes podem estar presentes ou não (LANDOLT, 1986). Este grupo de plantas é registrado nos principais estudos realizados nos mais importantes ambientes aquáticos do Brasil, como para o Pantanal Matogrossense (POTT, 1993).

Pott (1993) em seu trabalho no Pantanal encontrou oito espécies das 34 até então reconhecidas, que compunham as *Lemnoideae*, são elas, *Spirodela intermedia* W. Koch, *Lemna aequinoctialis* Welw., *L. valdiviana* Phil, *Wolffiella welwitschii* (Hegelm.) Monod, *W. lingulata* (Hegelm.) Hegelm., *W. oblonga* (Phil.) Hegelm., *Wolffia brasiliensis* Wedd. e *W. columbiana* Karsten, essas espécies foram distribuídas em quatro gêneros. Já no trabalho de F. França *et al.* (2003), realizado em seis açudes do semi-árido da Bahia, foram encontradas quatro espécies, *Lemna aequinoctialis* Welw., *L. valdiviana* Phil, *Wolffia brasiliensis* Wedd. e *Wolffiella welwitschii* (Hegelm.) Monod.

¹ Diz-se do grupo de organismos que compartilham ancestral comum.

² Pesquisadores discutiram as relações filogenéticas de *Lemnaceae* e *Araceae*, concluindo que as *Lemnaceae* deveriam ser incluídas, como uma subfamília, na família *Araceae* (Mayo *et al.*, 1995)

Diversos autores (Henry-Silva & Camargo (2002), Graeff *et al.* (2007), Landolt & Kandeler (1987), França (2008)) outros, discutem a importância ecológica dos representantes desta subfamília, e destacam sua utilização como complemento alimentar para mamíferos, aves, répteis, peixes, gastrópodos e artrópodos. Foram registradas também, relações mutualísticas, relações comensalistas, como o epifitismo de diversas espécies de algas em representantes de *Lemna* ou *Wolffiella* e relações amensalistas como o efeito inibidor de crescimento de larvas de insetos (LANDOLT, 1986).

Segundo Landolt & Kandeler (1987), as *Lemnoideae* podem ser utilizadas para bioensaios fitofisiológicos, para detecção de substâncias tóxicas, para remover substâncias (inclusive metais pesados) da água, produção de energia e de substâncias químicas, além de regular ecossistemas aquáticos. Henry-Silva & Camargo (2002) ainda citam outras utilidades desta subfamília, como o aproveitamento na produção de papel, produção de biogás e na fertilização de solos. Em seu estudo sobre o uso de plantas aquáticas para despoluição da água, Pott & Pott (2002) apontam a necessidade de pesquisas de tratamento e de preservação dos nascentes e cursos d'água, e destacam a importância das *Lemnoideae* no tratamento de água.

França (2008) estudou a qualidade nutricional da *Lemna valdiviana* Phil e mostrou que na produção de ração para o peixes pode-se utilizar é ideal a utilização da espécie, pois além de contribuir para a redução da pesca (para este fim), é uma produção de baixo custo. Essas e outras características ora citadas, realçam o valor econômico desta subfamília. Graeff *et al.* (2007) destacam:

*No contexto mundial, a pesca e a aquicultura estão sendo consideradas atividades estratégicas para a segurança alimentar do planeta. O mercado internacional de peixes é exigente, no que diz respeito ao tamanho e qualidade, tanto para espécies frescas como congeladas inteiras ou filés congelados. Para que o Brasil entre nesse mercado, liderado por países asiáticos e outros países latino-americanos é necessário ter preço e qualidade competitivos. No entanto, o maior empecilho à expansão do cultivo e à aquicultura geral é o custo da produção, em especial da ração (KUBITZA, 2000, apud GRAEFF *et al.*, p.3, 2007).*

As *Lemnoideae* têm um alto índice de reprodução e se espalham por praticamente todo o planeta, com exceção das regiões desérticas e polares propiciando material suficiente para longas pesquisas (LANDOLT, 1986). Segundo Santos *et al.* (2001) o crescimento de espécies aquáticas da subfamília *Lemnoideae* será aproximadamente

exponencial sempre que o fornecimento de nutrientes e CO₂ for suficiente e equilibrado. Culley & Myers (1980) afirmam que a reprodução das *Lemnoideae* é basicamente vegetativa, onde um fronde dá origem à outra em um curto período de dias o que resulta num crescimento exponencial. França (2008) verificou que, a taxa de consumo de nutrientes é diretamente proporcional à taxa de crescimento, e que a concentração de fósforo e nitrogênio influencia diretamente no crescimento dos indivíduos. A autora ainda afirma que elas podem duplicar sua biomassa em dois a três dias a depender da concentração de nutrientes na água onde se desenvolvem.

O cultivo de *Lemnoideae* já foi realizado por muitos pesquisadores como França (2008), Santos *et al.* (2001), Landolt & Kandeler (1987), dentre outros, que oferecem suporte para esta pesquisa. Segundo esses autores existem condições ideais para o crescimento das *Lemnoideae* dentre elas destacam-se o controle de temperatura, cargas de nutrientes e o pH. Landolt & Kandeler (1987) afirmam que existem espécies desta subfamília que a partir de um fronde produzem acima de 20 novos frondes por brotamento antes de se separarem em colônias menores. França (2008) realizou o cultivo de *Lemna valdiviana* Phil. a fim de observar os efeitos de doses de excremento de aves na produção e qualidade nutricional desta espécie, e concluiu que existe uma relação direta entre a dose de excremento de aves e o aumento na produção da biomassa de *Lemna valdiviana* Phil.

Essas plantas se reproduzem a temperaturas que variam de 6 a 33°C e pH de 5,0 a 9,0, mas para uma maior produtividade os valores ideais são de 27°C de temperatura e pH entre 6,5 a 7,5 (Journey *et al.*,1993; Gomez, 2000). Landolt & Kandeler (1987) destacam que o pH ideal para o crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw. está entre 4,8 e 7. Para realização do cultivo é necessário observar o que influencia a reprodução levando em consideração os fatores que reduzem a taxa de crescimento das espécies, tais como, escassez ou desequilíbrio de nutrientes, toxinas, extremos valores de pH e temperatura, super crescimento de colônia, aglomerado e competição com outras plantas por luz e nutrientes (FRANÇA, 2008).

Ao estudar a variação do número de indivíduos em populações de *Lemnoideae* num açude que margeia a Estrada do Feijão³ (Rodovia BA 052 – Angüera - Ba, Brasil), Pires *et al.* (2009) quantificaram as coletas realizadas em dois períodos diferentes do ano, verificando uma densidade média de 719,4x10⁵ indivíduos/m² (primeira coleta) e de 178,6x10⁵ indivíduos/m² (segunda coleta). Foram identificadas também, quantidades significativas de *Lemna aequinoctialis* Welw. (98,06% na primeira coleta e 99,94% na segunda coleta) confirmando os estudos de Pott (1993) que afirma que a *L. aequinoctialis*

³ Região onde foram coletados os materiais deste trabalho (cf. descrição da área de estudo na metodologia).

Welw. ocorre principalmente em áreas com influência antrópica, em lagoas rasas, próximo à sede de fazendas, e que dificilmente é encontrada com *L. valdiviana* Phill.. Assim como no Pantanal (POTT, 1993), a *Wolffiella welwitchii* (Hegelm.) Monod. foi uma espécie não frequente neste açude.

A *Lemna aequinoctialis* Welw. (Figura 3) possui de 2,0 a 3,9 mm de comprimento por 1,4 a 2,4 de largura, 2 papilas no lado dorsal, 1 na base e outra maior, e 3 nervuras. Esta espécie apresenta 1 raiz por fronde de até 36 mm de comprimento (POTT, 1993).

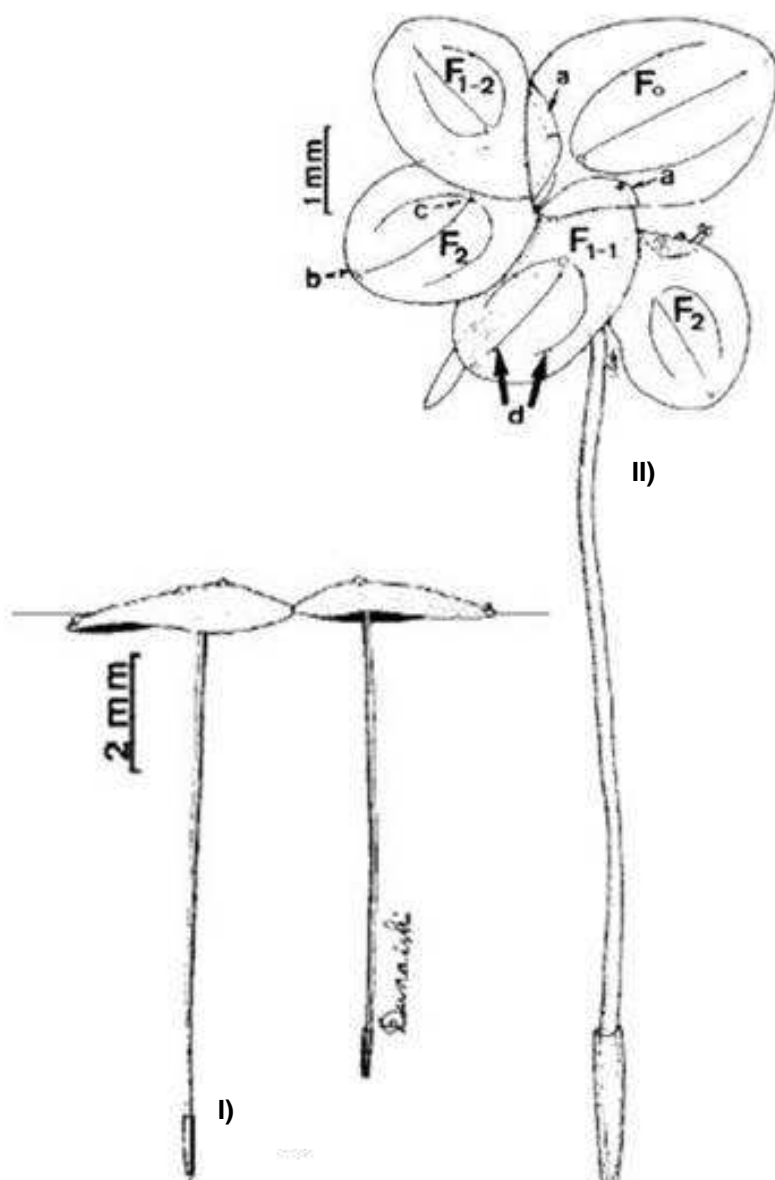


Figura 3 Desenho da *Lema aequinoctialis* Welw.

- I) - Hábito em relação à superfície da água (POTT, 1993)
- II) - Colônia de frondes - vista superior (POTT, 1993).
 (a) cavidade vegetativa, (b) papila apical, (c) papila basal, (d) nervuras

A figura 4 mostra a classificação taxonômica da *Lemna aequinoctialis* Welw.

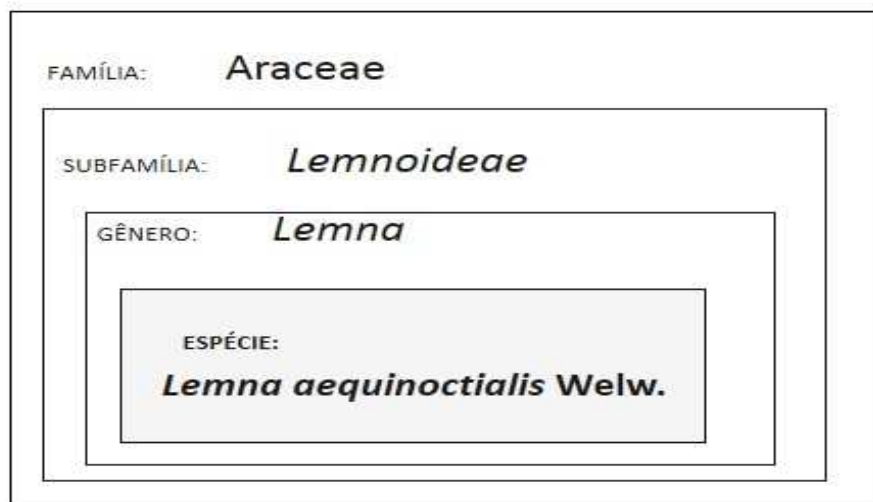


Figura 3 Classificação taxonômica

A *Lemna aequinoctialis* Welw. tem a capacidade de se reproduzirem de maneira assexuada, produzindo clones genéticos (LANDOLT, 1986) o que possibilita a formulação de programas de intervenção que possam organizar, mudar ou prever o comportamento desta espécie, uma vez que uma população formada por indivíduos geneticamente idênticos facilita a realização de bioensaios, pois elimina a variabilidade genética como um componente capaz de gerar distorções em respostas a estímulos ambientais.

O objetivo geral deste capítulo é estudar o fenômeno da facilitação entre indivíduos de *Lemna aequinoctialis* Welw. e padronizar curvas de crescimento em diferentes meios de cultura a partir de experimentos *ex situ*. A necessidade de estudar este fenômeno entre indivíduos de *Lemna aequinoctialis* Welw., surgiu a partir de observações em laboratório, onde um indivíduo não brotava em água da lagoa e morria após algumas semanas, mas um número maior de indivíduos se desenvolvia neste mesmo meio. O estudo da facilitação foi então proposto e é o que permeia esta pesquisa.

O fenômeno da facilitação é definido como a capacidade de alguns organismos de reverterem um ambiente com características abióticas severas, para se estabelecerem nestes locais, este fenômeno é necessário para o bom funcionamento do ecossistema (BIEBER & SCULTORI, 2007; JONSSON, 2011). Castanho (2012) aponta as restingas como um tipo de ambiente favorável para o predomínio de facilitação por oferecer condições ambientais limitantes para o desenvolvimento das plantas. Lortie (2010) argumenta que a facilitação é um termo estritamente voltado para descrever positivas interações entre plantas, representando o oposto do que vem a ser a relação de competição. O autor ainda destaca que esta relação pode ser chamada de interação positiva de plantas. Moutinho

(2011) afirma que a relação de facilitação se estabelece em consequência do processo de sucessão ecológica, e que os efeitos desta relação tornam-se mais importante em ambientes severos, onde espécies podem minimizar os fatores estressantes para outras espécies que apresentam uma limitação maior ao estresse.

Em geral o termo crescimento é um termo quantitativo. Nas ciências biológicas, ele pode estar associado à mudança de tamanho, mudança de peso ou número de células, e pode ser estudado para diversos objetivos. Em plantas, por exemplo, o crescimento pode ser acompanhado para conhecer melhor um vegetal, para fazer previsão de produções, ou estudar diferenças funcionais e estruturais entre cultivares de uma mesma espécie, e isto pode ser quantificado a partir da medida da altura, do diâmetro, da área de alguma parte da planta, ou a partir da pesagem da matéria. Nesta pesquisa o crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw. é avaliado a partir do número de frondes, portanto cada brotamento (fronde-filha) é quantificado como um indivíduo, desconsiderando-se tamanho ou peso.

Os objetivos específicos deste capítulo são: estudar o comportamento dos organismos em diferentes meios de cultura a partir do experimento *ex situ*; estudar o comportamento dos organismos expostos a diferentes concentrações de Citrato de Chumbo; estabelecer parâmetros e variáveis para a construção de um modelo computacional.

Segundo Lima-Brito *et al* (2011) a cultura *in vitro* é uma estratégia de conservação *ex situ* que garante a manutenção da integridade genética e biológica de uma espécie. Neste trabalho utiliza-se o termo “*ex situ*”, pois os organismos estão fora de seu meio natural, mas não estão sozinhos num meio esterilizado.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

a) Caracterização da área de coleta

As coletas foram realizadas numa lagoa que margeia a Estrada do Feijão no município de Angüera Km-16 da Rodovia BA-052 (Figura 5), cuja região já foi estudada por F. FRANÇA *et al.* (2003) que selecionaram seis açudes com alta cobertura de macrófitas para estudar a flora de plantas vasculares.

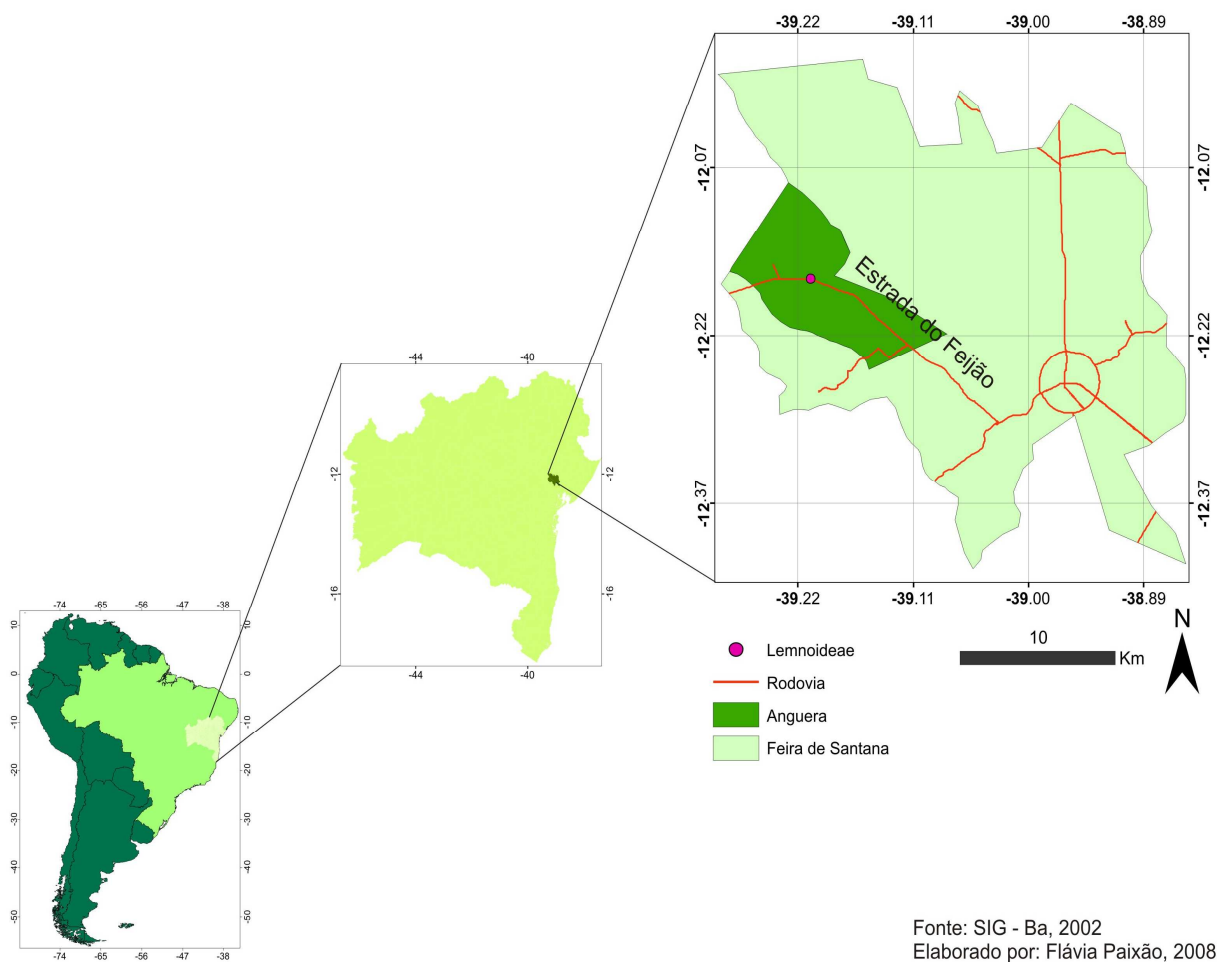


Figura 5 - Mapa da região onde foram realizadas as coletas

Esta lagoa (Figura 6) encontra-se nas coordenadas 12°11'38"S e 39°09'07"W, 200m s.n.m. de altitude, com ca. 5.860 m², e foi classificada pelos autores como açude 5 no qual existe o maior número de espécies de plantas aquáticas dentre os açudes da região.



Figura 6 – Açude 5 (local das coletas)

b) Coleta de espécimes

As plantas foram coletadas (período da manhã) com uma peneira (malha: 0,1 x 0,1 cm), transferidas para um recipiente de vidro contendo água da própria lagoa, e levadas para o Laboratório de Taxonomia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde foram selecionadas as *Lemna aequinoctialis* Welw., segundo classificação de Pott (1993).

c) Análise da água

Foram selecionados dois pontos da lagoa para realizar a coleta e tomar as medidas de parâmetros físico-químicos da água. O ponto 1 foi uma região mais afastada da margem e o ponto 2 foi próximo da margem (onde havia *Lemnoideae*). Alguns parâmetros foram medidos no local (pH, condutividade, oxigênio dissolvido e turbidez), e outras análises (bacteriológica, metais) foram feitas no Laboratório de Saneamento (UEFS).

d) Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados nesta pesquisa foram:

- 1º experimento: água da lagoa autoclavada; solução de Pirson & Siedel (ou solução P&S) (LANDOLT, 1986).
- 2º experimento: apenas solução P&S.
- 3º experimento: solução P&S; solução P&S com diferentes concentrações de citrato de chumbo (17; 51; 85mg/l); água da lagoa (sem autoclavar).

A água da lagoa foi coletada com um recipiente de 10 litros (no mesmo dia e local da coleta das Lemnas - pela manhã), e levada para o laboratório para ser filtrada através de um papel filtro comum. No primeiro experimento esta água foi esterilizada em autoclave a fim de reduzir o número de organismos consumindo nutrientes.

A solução P&S foi composta no laboratório didático da UEFS com: 400 mg/l de nitrato de potássio, 200 mg/l fosfato de potássio di-hidrogenado, 1200 mg/l Cloreto de cálcio hexaidratado, 300 mg/l sulfato de magnésio heptaidratado, 5 mg/l sulfato ferroso heptaidratado, 0.3 mg/l cloreto de manganês tetraidratado, 0.5 mg/l ácido bórico.

O meio de cultura contendo citrato de chumbo também foi composto no laboratório didático da UEFS a partir da solução P&S, onde foram feitas três concentrações: 17 mg/l, 51 mg/l, 85 mg/l.

e) Cultivo de Clones

10 recipientes de vidro (8 cm de diâmetro e capacidade de 300ml) foram separados, cada um contendo 100ml de solução e 2 indivíduos mãe e filha), e colocadas numa bancada dentro do laboratório, próximo de uma janela de vidro sob temperatura ambiente de 25°C. Durante um mês observou-se o desenvolvimento dos clones, e assim foi escolhido o cultivo com maior número de indivíduos e melhor aspecto (Figura 7) para realizar os experimentos seguintes.

f) Cultivo de *Lemna aequinoctialis* Welw.

Os recipientes de vidro utilizados no cultivo possuem 8 cm de diâmetro e capacidade de 300ml. Todos foram devidamente identificados, e forrados para impedir o recebimento de luz nas laterais. Segue a descrição dos três cultivos realizados em diferentes períodos:



Figura 7 – Cultivo de clones
(Foto de cima)

1º CULTIVO: de 16/11/11 a 11/01/12

Foram separados 20 recipientes de vidro contendo 170ml do meio líquido (10 recipientes com água da lagoa filtrada-autoclavada e 10 com solução P&S), e em cada um foram inoculadas 10 frondes de *Lemna* (Figura 8). Todos os recipientes foram tampados com placas de Petri e colocados numa bancada com temperatura média local de 24,5° C, umidade 44,7%, luz fluorescente (fotoperíodo de 12 horas) além da luz natural que incide pela janela (Figura 9).

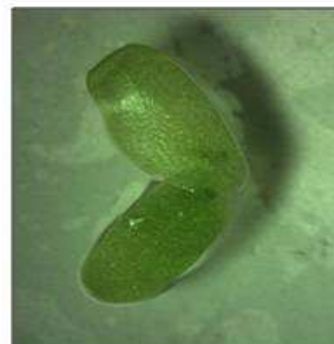


Figura 8 – Dois frondes de
Lema aequinoctialis



Figura 9 - Experimentos organizados na bancada do TAXON

O desenvolvimento dos organismos foi acompanhado por oito semanas. A cada sete dias foi feita a medição do pH, o registro fotográfico e a contagem do número de indivíduos vivos. A contagem foi feita a partir dos brotamentos onde cada nova fronde é um indivíduo (figura 10). O indivíduos vivos apresentam coloração verde e os que chegam no estado morto assumem coloração branca.



Figura 10 – Brotamento de uma fronde a partir de outra

Antes de cada medição o pHmetro portátil (PHTEK) foi calibrado (com solução tampão pH 4.0 e pH 7.0). Ao estabilizar o valor do pH, o aparelho era retirado, lavado com água destilada e inserido no próximo recipiente.

O número de frondes obtido semanalmente em cada recipiente foi organizado em planilha Excel versão 2007 para os cálculos de média aritmética, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), produção de gráficos e curvas de crescimento.

2º CULTIVO: de 02/05/12 a 18/07/12

O segundo cultivo foi realizado utilizando apenas a solução de P&S. Os procedimentos para o inóculo, a contagem e a medição do pH seguiram os mesmos métodos do primeiro cultivo. Houve apenas algumas alterações:

- o aumento do número de recipientes (de 10 para 13) pois caso houvesse necessidade de descartar alguma amostra, ainda assim ficaria um número considerável de amostras;
- a inserção do controle (um recipiente com meio de cultura e sem frondes), para observar se a alteração no valor do pH ocorre devido a presença de *Lemna*;
- mudança de localização dos frascos na bancada, a fim de garantir que todos recebessem as mesmas condições de luminosidade;
- cultivo a partir de clones (pois no anterior foi feito a partir de indivíduos escolhidos aleatoriamente);
- aumento no período do experimento (de 8 para 12 semanas), a fim de observar o período de resistência das espécies sem a reposição de nutrientes;
- marcação das Lemnas inoculadas com tinta a prova d'água (Figura 11), a fim de observar o tempo de vida da espécie;

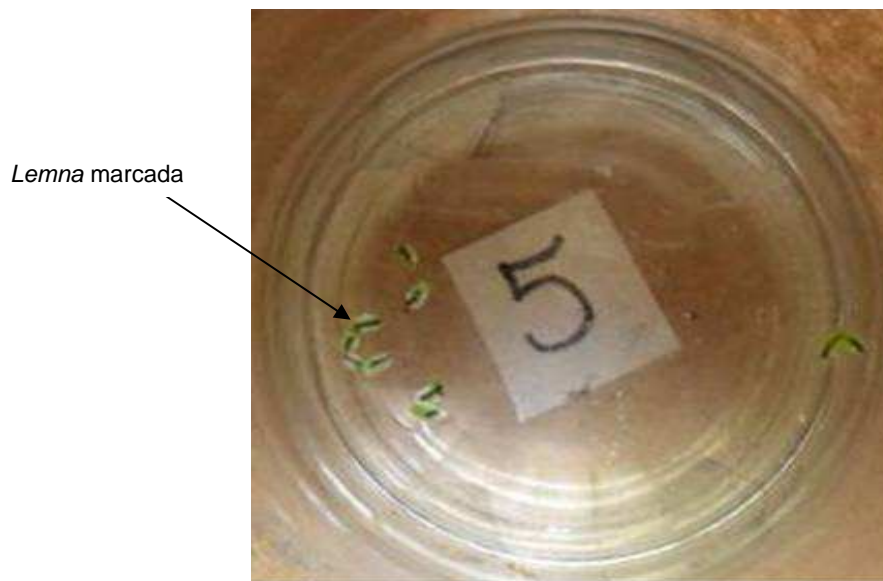
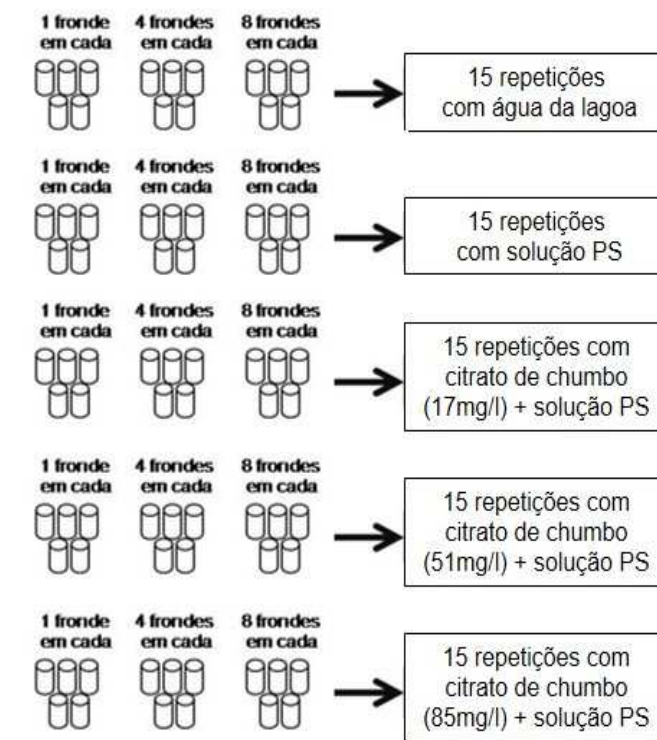


Figura 11- Inóculo de Lemnas marcadas com caneta preta a prova d'água.

3º CULTIVO: de 26/11/2012 a 28/01/2013

Neste cultivo os procedimentos para o inóculo e a contagem seguiram os mesmos métodos do cultivo anterior, sendo que não foi medido pH em razão da utilização de contaminante químico. A quantidade de recipientes aumentou, pois utilizou-se cinco meios de cultura totalizando 75 parcelas experimentais (Figura 12).



Total = 75 parcelas experimentais

Figura 12- Distribuição do último experimento

Todos os recipientes foram tampados com placas de Petri e colocados numa estufa com fotoperíodo (12h) e termoperíodo (Figura 13) programada para dois períodos: dia com temperatura constante de 25°C, e noite com 19°C que foi a temperatura média observada nos experimentos anteriores realizados fora de uma estufa, na bancada do laboratório. A posição dos recipientes foi alternada a cada três dias para garantir recebimento uniforme de luz.

O desenvolvimento dos organismos foi acompanhado por oito semanas. A cada sete dias foi feito o registro fotográfico e a contagem do número de frondes. Esses dados foram organizados em planilha Excel versão 2007.



Figura 13- Estufa utilizada para os experimentos

g) Cálculo da taxa de crescimento:

A taxa de crescimento foi calculada mediante a fórmula (1) proposta por Landolt (1986), expressa como a diferença entre os logaritmos do número de frondes final (F_d) e o número inicial (F_o), dividido pelo número de dias (d) de crescimento e multiplicado por 1000.

$$(1) \quad k = [(\log_{10}(f_d) - \log_{10}(f_o)) / d] * 1000$$

h) Análise estatística

A partir da contagem semanal calculou-se a média aritmética, o desvio padrão e o intervalo de confiança dos dados. Para comparação entre os resultados foi realizado o teste “t student” com nível de significância de 5%.

i) Produção das curvas

A média semanal do número de indivíduos nos três experimentos foi utilizada para gerar as curvas de crescimento através do software “Curve Expert 1.4”. O programa oferece uma variada gama de modelos de regressão não-lineares. Para a construção das curvas nesta pesquisa utilizou-se no grupo das curvas “sigmoidais” o modelo logístico que gera curvas crescimento ajustadas segundo regressão através do modelo logístico (2):

$$(2) \quad y = a / (1 + \exp(b - cx))$$

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1º CULTIVO (1º experimento):

Os resultados deste primeiro cultivo apresentaram comportamento diferenciado para cada meio de cultura. Na solução de P&S observou-se que após a primeira semana o valor inicial (10 frondes) já havia duplicado, e na quarta semana registrou-se 516 indivíduos distribuídos entre os recipientes. Para o cálculo da média e a produção das curvas foi necessário desconsiderar os recipientes que se diferenciaram muito do conjunto, como por exemplo E-1, E-2 e E-3 (Tabela 1), que devido a posição dos recipientes (pouca luminosidade) os indivíduos acabaram tendo morte precoce. Este cultivo durou oito semanas, até a quarta semana 70% dos experimentos continuaram crescendo, mas a partir da quinta semana a variação entre os resultados foi alta, pois os indivíduos começaram a morrer de forma atípica e isto comprometeu 50% das repetições (Tabela completa - apêndice I).

Resultado do 1º Cultivo com solução de Pirson & Siedel					
Experimentos/ Recipientes	Início	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
E - 1	10	21	24	2	1
E - 2	10	21	24	2	0
E - 3	10	23	32	32	1
E - 4	10	24	30	74	123
E - 5	10	24	47	84	108
E - 6	10	27	37	67	86
E - 7	10	22	30	38	75
E - 8	10	20	32	59	103
E - 9	10	20	31	31	70
E - 10	10	28	45	66	72

Tabela 1- Média semanal do experimento I (com solução P&S)

A taxa de crescimento até a quarta semana foi de 34%, mas decresceu bruscamente a partir da quinta semana. A disponibilidade de luz não uniforme, foi o que mais comprometeu o experimento, e contribuiu para as altas variações, como mostra no gráfico da figura 14, onde os intervalos se sobrepõem (nível de confiança (IC) de 95%).

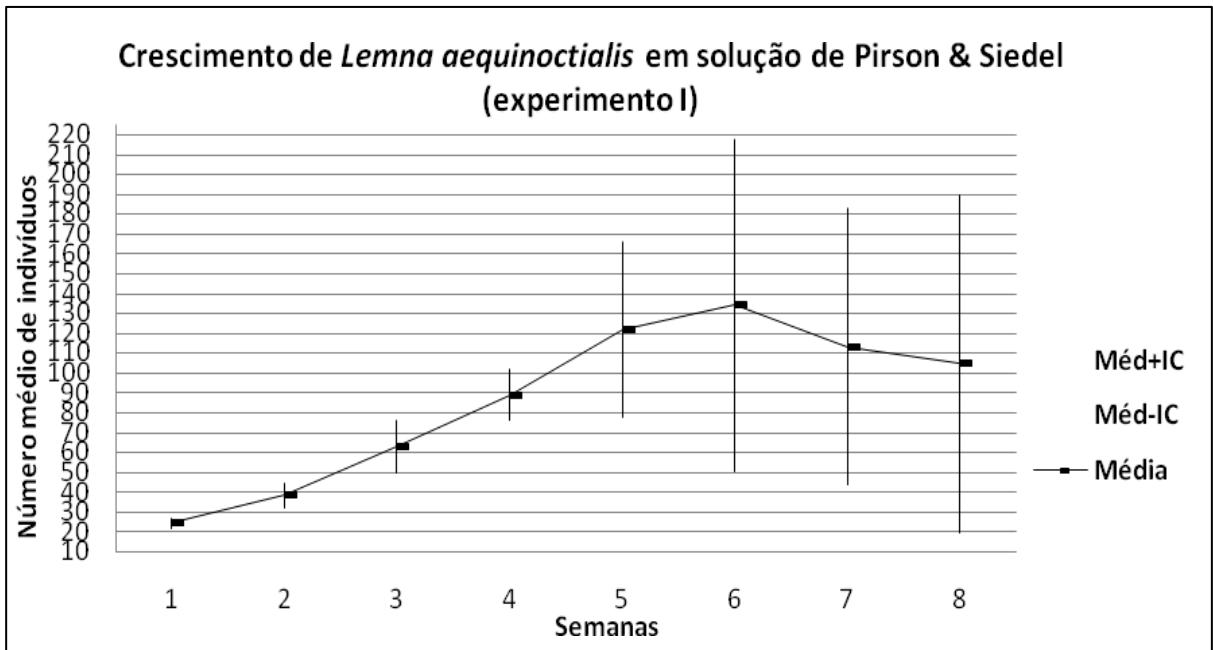


Figura 14- Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento I solução P&S)

No gráfico abaixo (Figura 15), os pontos indicam os valores médios obtidos em cada semana e a linha contínua descreve a curva de crescimento ajustada a partir do conjunto de dados. Observa-se que a maioria dos pontos estão fora da curva o que reflete a alta variação entre os resultados deste primeiro experimento. Os parâmetros para a equação foram: $a=1.2$, $b=1.6$ e $c=1.0$ (valores aproximados para uma casa decimal) com coeficiente de correlação igual a 0.97.

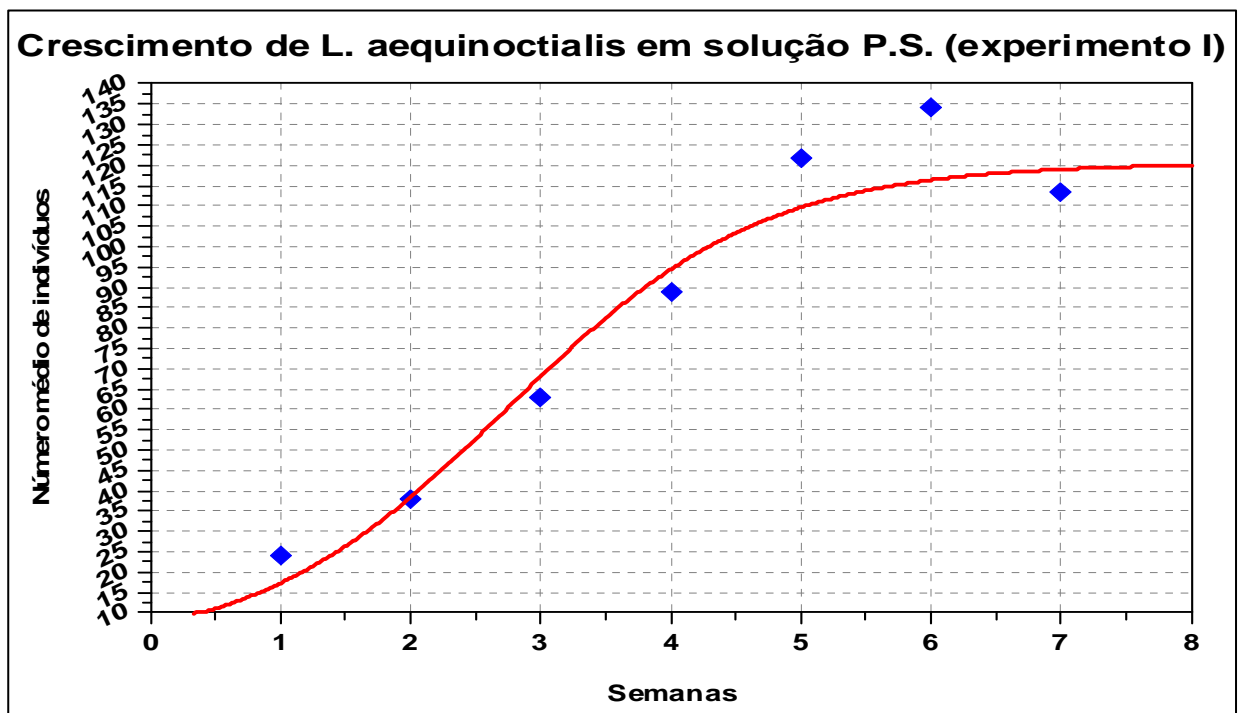


Figura 15 – Curva de crescimento em solução P&S (experimento I)

O valor inicial do pH neste meio de cultura foi 4.9 e decorrida a primeira semana já havia alterado nos 10 recipientes variando entre 6.0 a 6.2. Com este resultado levantou-se a hipótese de que as Lemas alteravam o valor do pH no meio, e isto só pôde ser analisado no segundo experimento (*vide* p.34).

No cultivo em água da lagoa filtrada e autoclavada observou-se que, decorrida a primeira semana poucos indivíduos duplicaram (Tabela 2). Na quarta semana registrou-se um total de 226 indivíduos, nas semanas seguintes não houve alterações significativas no número de brotamentos (Tabela completa - apêndice II). Segundo pesquisadores como Culley & Myers (1980) e Graça França (2008) as espécies desta família duplicam sua biomassa em dois a três dias em condições ótimas de crescimento, isto indica que esta lagoa apesar de conter *Lemna aequinoctialis* Welw. durante todo ano, não oferece condições para um crescimento exponencial, possivelmente pela presença de algum componente na água.

Comparando os resultados deste experimento com o primeiro, observou-se que o autoclave da água da lagoa, não alterou a taxa de crescimento da espécie que permaneceu baixa por razões não estudadas nesta pesquisa. Além disto, em nenhum dos dois casos houve o desenvolvimento de microorganismos (visíveis a olho nu) como foi visto em todos os experimentos realizados com outros meios de cultura.

Resultado do 1º Cultivo com água da lagoa filtrada e autoclavada

Experimento	Início	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
E – 1	10	17	18	19	22
E – 2	10	19	21	23	25
E – 3	10	21	21	24	27
E – 4	10	17	20	20	22
E – 5	10	19	19	22	23
E – 6	10	20	22	25	28
E – 7	10	18	19	22	21
E – 8	10	21	22	20	17
E – 9	10	18	19	23	24
E – 10	10	13	15	15	17

Tabela 2 Média semanal do experimento I (com água da lagoa)

A taxa de crescimento até a quarta semana foi de 14%, o pH registrado inicialmente foi de 7.0 e após a primeira semana este valor alterou para 7.4. A figura 16 mostra que a média semanal não se diferenciou significativamente.

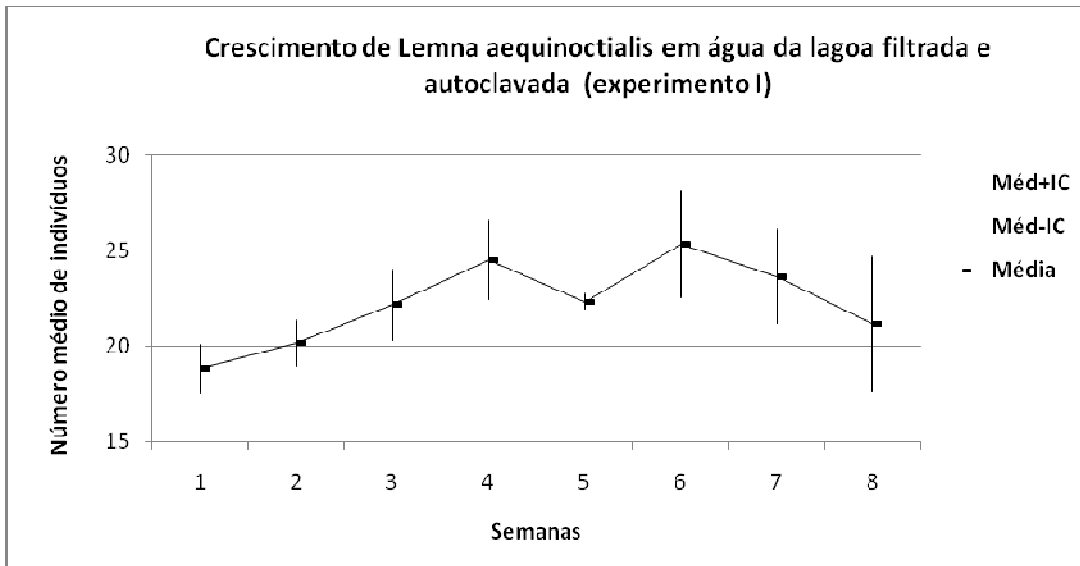


Figura 16 – Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento I com água da lagoa)

Na figura 17 os pontos estão todos fora da curva ajustada mostrando que além da variação dos dados, o crescimento não apresentou etapas bem definidas. Comparando este resultado com a curva de crescimento em solução P&S observa-se que a fase estacionária se iniciou muito cedo, reforçando a existência de elementos neste meio que inibem o desenvolvimento da espécie. Os parâmetros para a equação do modelo acima foram: $a=2.3$, $b=1.2$ e $c=1.4$ (valores aproximados para uma casa decimal) com coeficiente de correlação igual a 0.95

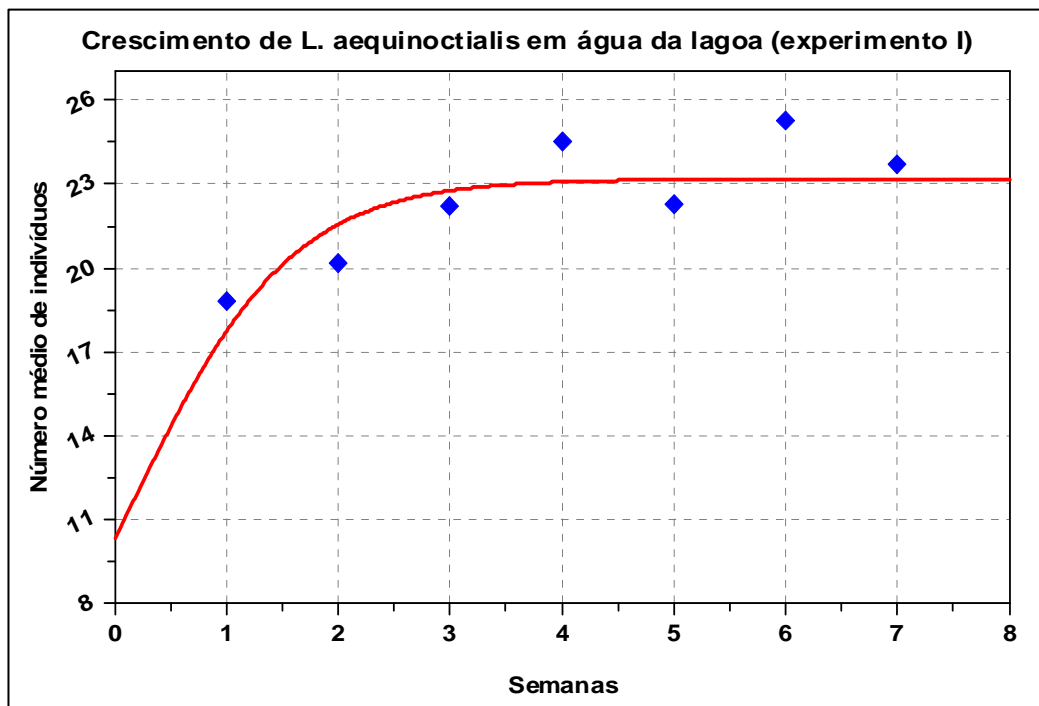


Figura 17 – Curva de crescimento em água da lagoa (experimento I)

A figura 18 mostra a comparação entre o desenvolvimento da Lemna ao longo das oito semanas na água da lagoa autoclavada e na solução P&S.

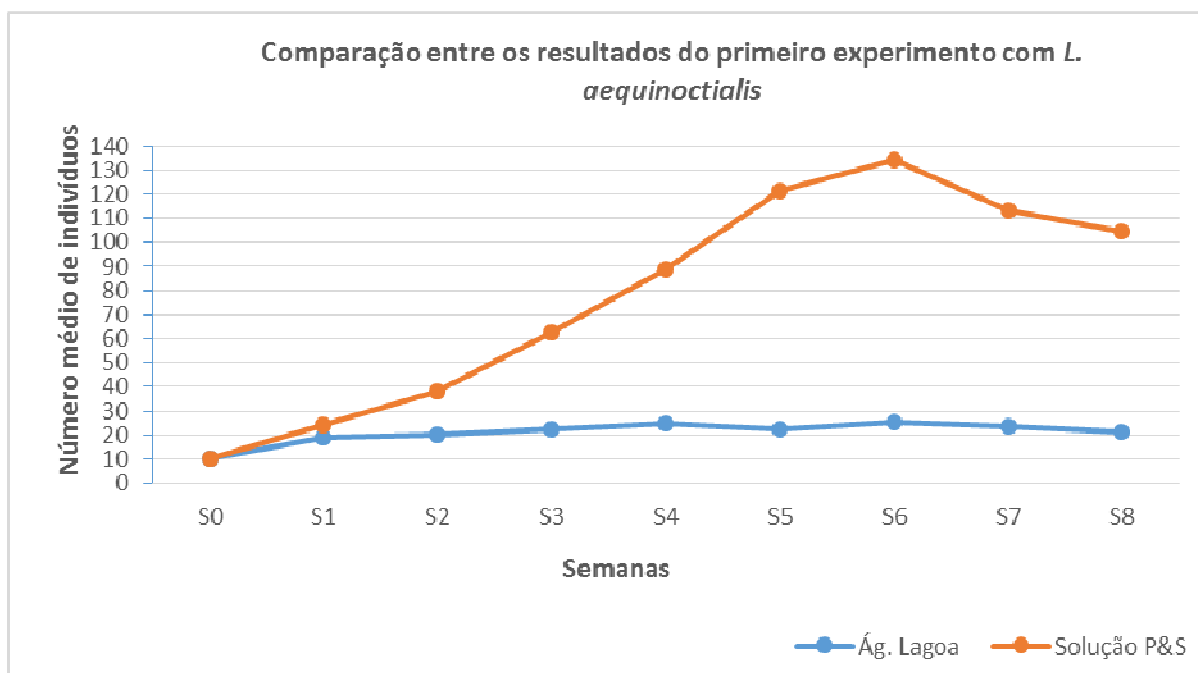


Figura 18 – Comparação dos resultados do primeiro experimento

A partir destes resultados surgiram questões a serem trabalhadas no segundo cultivo, como a necessidade de: realizar experimentos a partir de clones, identificar as espécies inoculadas para obter informações importantes sobre o tempo de desenvolvimento da *Lemna aequinoctialis* Welw. nessas condições de cultivo, rever as condições de luminosidade nos recipientes, e realizar análise da água da lagoa para conhecer alguns parâmetros físico-químicos do meio.

2º CULTIVO (2º experimento):

O experimento iniciou com um total de 130 clones (Tabela 3), foram 12 semanas de observação sem reposição de nutrientes. As Lemnas tiveram melhor desempenho do que no cultivo anterior (realizado com o mesmo meio de cultura) pois na décima segunda semana o número de indivíduos ainda aumentava (tabela completa – apêndice III), enquanto no primeiro cultivo este número decresceu a partir da sétima semana. Isto indica a influência da luz para o crescimento da espécie, pois no primeiro houve a falta de disponibilidade uniforme de luz.

Resultado do 2º Cultivo

Experimentos / Recipiente	Início	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	5ª Semana
E – 1	10	15	19	30	47	80
E – 2	10	16	21	35	50	101
E – 3	10	19	27	38	56	88
E – 4	10	15	31	42	78	106
E – 5	10	13	24	43	65	116
E – 6	10	15	32	52	101	113
E – 7	10	10	20	29	39	64
E – 8	10	17	25	40	76	92
E – 9	10	19	32	51	61	96
E – 10	10	13	32	72	172	195
E – 11	10	17	25	44	72	97
E – 12	10	18	38	66	83	177
E – 13	10	18	35	51	78	127
Total indiv.	130	205	361	593	978	1452

Tabela 3 – Média semanal do experimento II (com solução P&S)

A taxa de crescimento até a quarta semana foi de 29%, e não decresceu bruscamente. Os clones marcados começaram a morrer a partir da sexta semana (42 dias), na nona semana ainda existiam alguns deles vivos e a partir deste período todos os clones inoculados estavam mortos, o que sugere uma variação de idade para as Lemnas de 40 a 70 dias num meio de cultura sem a reposição de nutrientes. O valor inicial do pH do meio de cultura foi 5.8, após a primeira semana foi 6.3, permanecendo este valor até o final do experimento. Isto aconteceu também no controle (sem Lemna), o que isenta as espécies de causarem a alteração do pH no meio. Esta variação pode ter sido causada pela variação de temperatura que o meio de cultura sofreu, pois segundo Cunha *et al* (2010), a variação na temperatura altera o valor do pH no meio.

Neste experimento houve o desenvolvimento de algas na raiz de muitos frondes (Figura 19), mas apesar de consumirem os nutrientes disponíveis, não inibiram o crescimento da *Lemna*.

Identificou-se também o surgimento de microorganismos em alguns recipientes na segunda semana, mas as espécies continuaram se desenvolvendo, como mostra a figura 20.



Figura 19-Algas na raiz da *Lemna*

Nas imagens I e II a coloração do meio foi alterada pelo surgimento de fungos, mas na imagem III o meio líquido voltou ao seu aspecto inicial e os indivíduos continuaram se desenvolvendo como mostra a imagem IV. Este fenômeno foi estudado no experimento seguinte (último experimento).

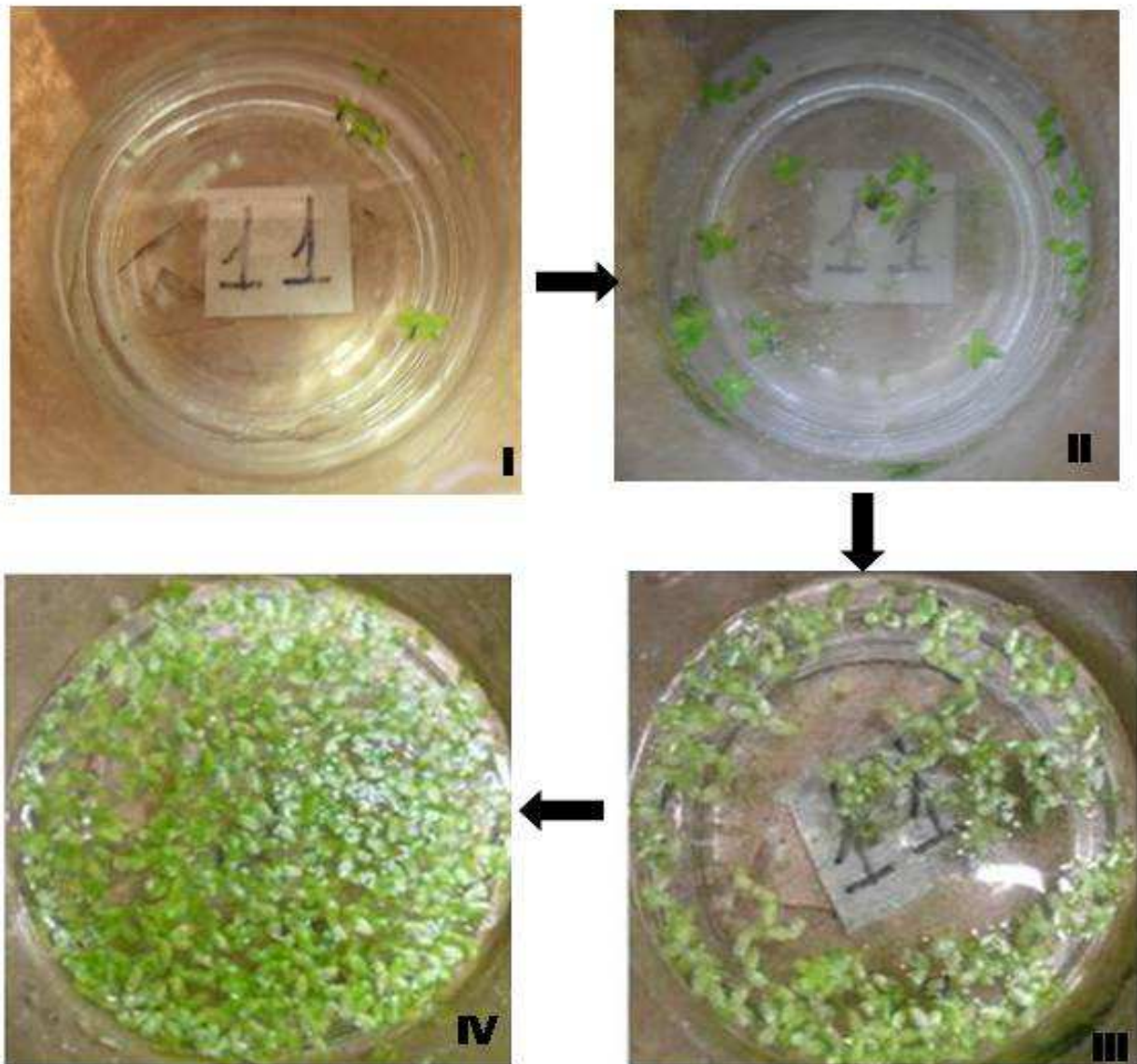


Figura 20- Experimento antes, durante e depois da contaminação

O gráfico abaixo (Figura 21) mostra a média semanal (com 95% de confiança - IC) do número de indivíduos nascidos, onde é possível ver que até a oitava semana, as médias são significativas.

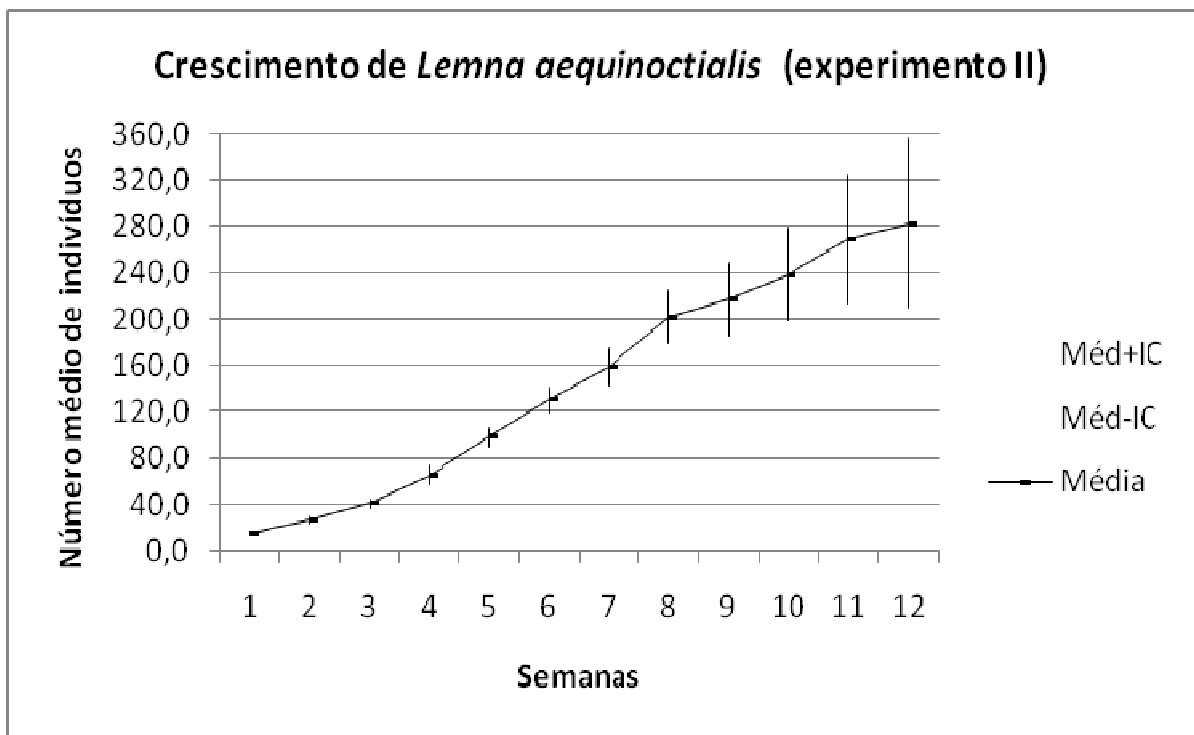


Figura 21 - Relação entre a média e o intervalo de confiança (experimento II)

A curva de crescimento (Figura 22) mostra um comportamento típico de organismo em condições controladas, onde até a 12ª semana o crescimento esteve na fase log. O coeficiente de correlação da curva de crescimento foi 0,99 e poucos pontos estiveram fora da curva o que indica que os dados obtidos e aqueles da curva ajustada são considerados correspondentes. Os parâmetros para a equação foram: $a=2.9$, $b=2.3$ e $c=4.7$ (valores aproximados para uma casa decimal).

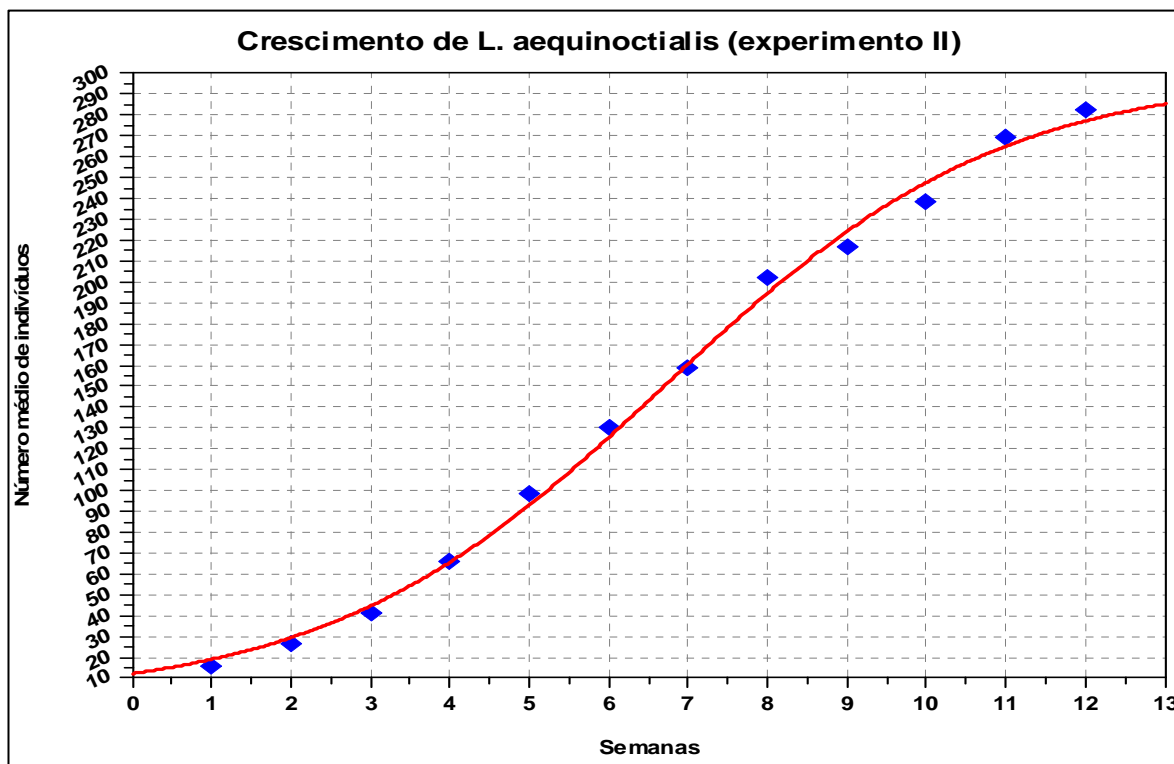


Figura 22 – Curva de crescimento em solução P&S (experimento II)

A partir dos resultados dos dois primeiros experimentos, estabeleceram-se o meio ideal para o cultivo, parâmetros para a construção do modelo computacional (*vide* capítulo II), e a curva de crescimento da espécie a partir de 10 indivíduos inoculados.

3º CULTIVO:

No terceiro cultivo onde foram realizados os testes de facilitação. Os microorganismos foram identificados (vistos a olho nu) na primeira semana (4 a 5 dias depois do inóculo) onde o número de Lemnas ainda não havia duplicado, e a hipótese de facilitação logo pôde ser estudada.

O experimento com água da lagoa apresentou o mesmo comportamento do primeiro cultivo realizado com este meio de cultura (porém autoclavado). Observou-se que tanto para 1, 4 e 8 indivíduos inoculados, a taxa de crescimento foi muito baixa em razões proporcionais a essas quantidades iniciais, como mostram a tabela 4 e a figura 23.

Experimento III com água da lagoa
(média semanal do nº de frondes)

Semanas	Teste com 1 indivíduo	Teste com 4 indivíduos	Teste com 8 indivíduos
S0	1	4	8
S1	1	5	8
S2	2	5	10
S3	2	6	11
S4	2	6	11
S5	2	6	11
S6	2	7	11
S7	2	7	11
S8	1	7	11

Tabela 4- Média semanal do experimento III (com água da lagoa)

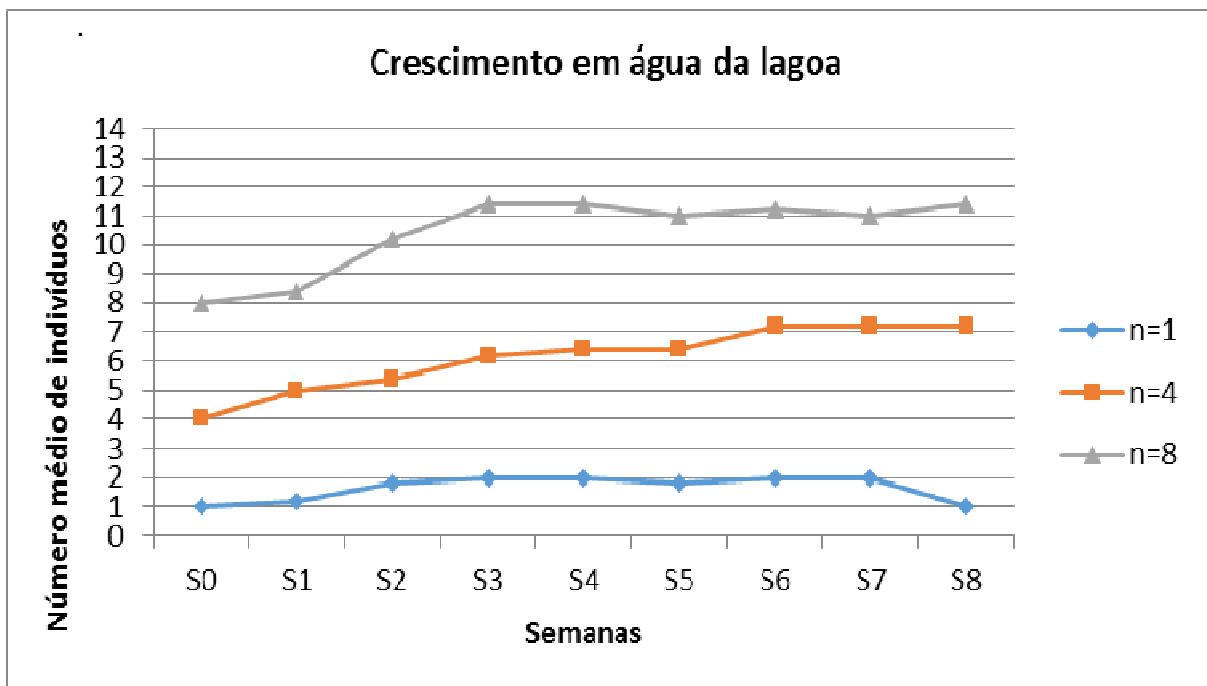


Figura 23 – Crescimento de Lemna a partir de diferentes inóculos (experimento III com água da lagoa)

As análises feitas neste meio (água da lagoa coletada) (apêndice VI) revelaram a presença de Zinco, Chumbo, Cobre e Manganês, sendo que este último apresentou uma concentração tão elevada que foram necessárias várias diluições antes da análise. Lizieri *et al* (2011) realizaram estudos com macrófitas aquáticas flutuantes (*Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Spirodela polyrhiza*) e observaram que as três espécies acumulam

manganês em seus tecidos e como consequência houve redução do conteúdo de clorofila total nas três espécies, mas em relação a taxa de crescimento apenas em *Spirodela polyrhiza* houve redução. Outros pesquisadores destacam como a presença de herbicidas nos ambientes aquáticos influenciam na taxa de crescimento de algumas macrófitas. Portanto a baixa taxa de crescimento observada nos experimentos com este meio, possivelmente pode ter sido resultado da presença de um desses componentes.

O cultivo II realizado anteriormente apenas com a solução de P&S, apresentou um bom desenvolvimento da espécie. Neste terceiro cultivo, a infestação⁴ ocorreu logo na primeira semana e como o número de *Lemnas* ainda não havia duplicado (resultados na tabela 5), a maior taxa registrada entre as três observações foi de 12%. A relação de facilitação entre os indivíduos foi estudada.

**Experimento III com Solução P&S
(média semanal do nº de frondes)**

Semanas	Teste com 1 indivíduo	Teste com 4 indivíduos	Teste com 8 indivíduos
S0	1	4	8
S1	1	6	12
S2	1	7	13
S3	2	8	17
S4	2	8	17

Tabela 5- Média semanal do experimento III (com solução P&S)

Os resultados mostraram que quando 1 indivíduo é inoculado no meio e o mesmo for infestado, não há desenvolvimento de colônias de *Lemnas*. Nos recipientes alguns chegaram a produzir mais 1 brotamento, vindo a morrer a partir da quinta semana. Em outros recipientes não houve duplicação do número inicial e os indivíduos permaneceram vivos até a quarta semana, morrendo sem brotar, o que não é comum nas *Lemnas*. O meio de cultura que a princípio era incolor ficou completamente esbranquiçado nestes experimentos, por causa da infestação.

Nos inóculos feitos com quatro indivíduos, houve infestação em sua maioria e os indivíduos se desenvolveram com uma baixa taxa de crescimento. A coloração do meio não ficou comprometida como no resultado anterior, e na sexta semana as espécies ainda estavam vivas. Com 8 indivíduos inoculados também houve crescimento e a taxa de

⁴ Surgimento de microorganismos visíveis a olho nú, no meio de cultura.

crescimento permaneceu baixa até a sétima semana quando o número de brotamentos começou a aumentar significativamente.

A figura 24 mostra o desenvolvimento dos indivíduos ao longo das oito semanas para as três quantidades de inóculos realizadas, onde se observa que com um indivíduo não houve estabelecimento de colônia de frondes no meio contaminado. É importante salientar que este meio de cultura foi utilizado anteriormente para o cultivo de clones (ou seja 1 fronde apenas no meio), e em todos os recipientes que não desenvolveram microorganismos a espécie se estabeleceu e desenvolveu com taxa crescente.

Os nutrientes disponíveis foram os mesmos dos experimentos anteriores, indicando que a inibição do crescimento ocorreu devido a presença dos microorganismos.

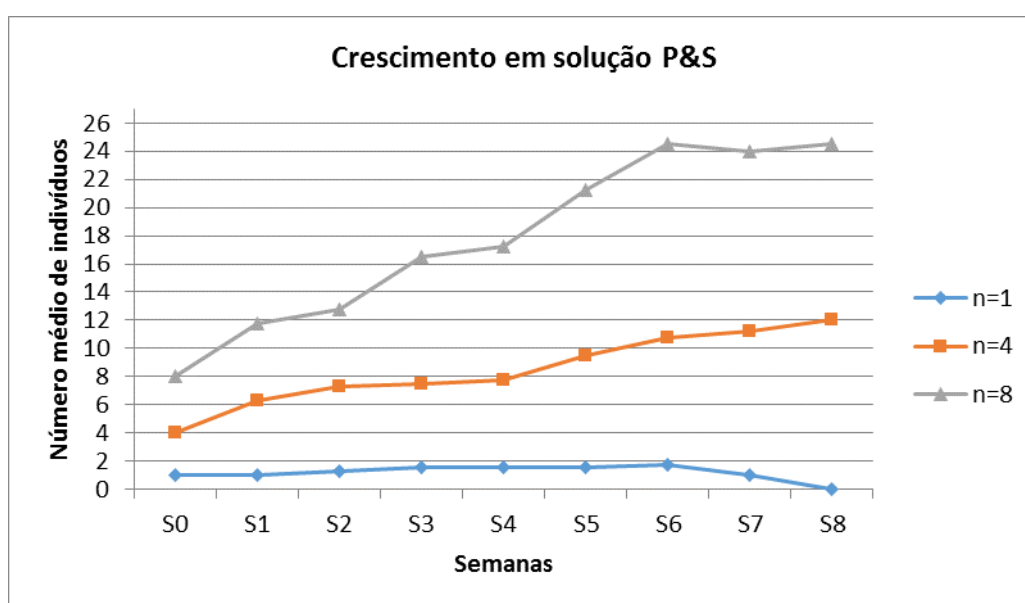


Figura 24 – Crescimento de Lemna a partir de diferentes inóculos (experimento III com solução P&S)

Nos experimentos realizados com as diferentes concentrações de citrato de chumbo (tabela completa apêndice V), a resposta para o desenvolvimento de 1 indivíduo sozinho na presença de microorganismos foi a mesma apresentada nos experimentos feitos sem este elemento químico. Já nos experimentos feitos a partir de 4 e 8 indivíduos, contribuiu para um aumento da taxa de crescimento das Lemnas, como mostra a tabela 6 comparando o resultado do número de indivíduos a cada semana na solução P&S com e sem citrato de chumbo no meio. Estes dados mostram que as espécies não morrem na presença deste metal pesado e possivelmente esta seja uma das razões das macrófitas serem estudadas por diversos pesquisadores (VALITTUTO, 2004; LAYBAUER & SCHILD, 1999) que as caracterizam como bioindicadoras ambientais. Segundo estes autores elas absorvem o elemento do meio.

Comparação: 8 indivíduos inoculados (média semanal)				
Semanas	Solução P&S sem chumbo (Pb)	Solução P&S + 17mg/l de Pb	Solução P&S + 51mg/l de Pb	Solução P&S + 85mg/l de Pb
S0	8	8	8	8
S1	12	11	12	12
S2	13	13	14	16
S3	17	21	17	19
S4	17	21	24	24
S5	21	24	32	28
S6	25	29	41	40
S7	24	31	45	43
S8	25	38	50	53

Tabela 6- Média semanal do experimento III com 8 indivíduos inoculados em quatro meios de cultura

Nos recipientes onde foram inoculados apenas 1 indivíduo e houve infestação, o metal pesado não alterou a condição de existência do indivíduo como mostra a figura 25, em que tanto no recipiente-18 (sem chumbo) e como no recipiente-33 (com chumbo), os indivíduos não se desenvolveram e morreram após algumas semanas. Se não houvesse contaminação⁵ no meio ou o número de indivíduos inoculados fosse maior, nos recipientes destacados abaixo a superfície do meio estaria coberta por frondes de Lemnas.

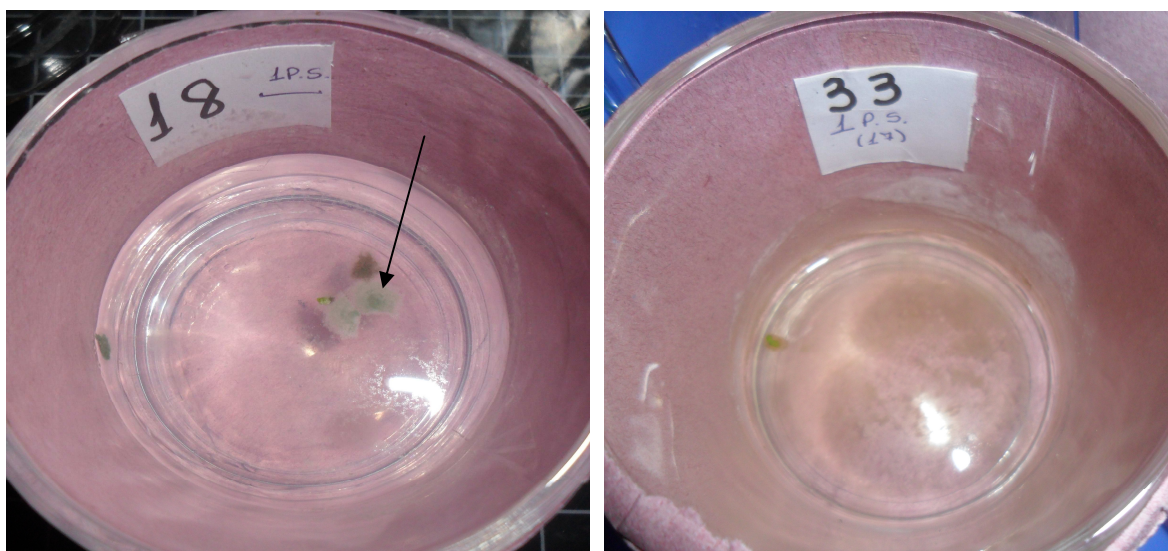


Figura 25 - Experimentos com microorganismo visíveis a olho nu (iniciaram com 1 Lemna)

⁵ A membrana formada em torno do fronde no recipiente-18 foi considerada como contaminação. Uma vez que todos os indivíduos envolvidos pela mesma morriam. No recipiente-33 mostra um estágio onde a membrana formada se desfez deixando o meio inicialmente transparente, com a cor totalmente amarelada e o indivíduo morto.

Nos recipientes com 4 e 8 frondes inoculados houve infestação inicialmente, mas os indivíduos se estabeleceram no meio. A figura mostra as espécies vivas, e o meio de cultura (que era totalmente transparente) com pequenas membranas pois é exatamente a contaminação inicial que vai se desfazendo e ficam os resquícios visíveis na superfície do meio (Figura 26). Observando a figura 25 (anterior) e a figura 26, pode-se observar que a quantidade de indivíduos inoculados influencia no estabelecimento da *Lemna aequinoctialis* Welw. em ambientes contaminados por microorganismos.

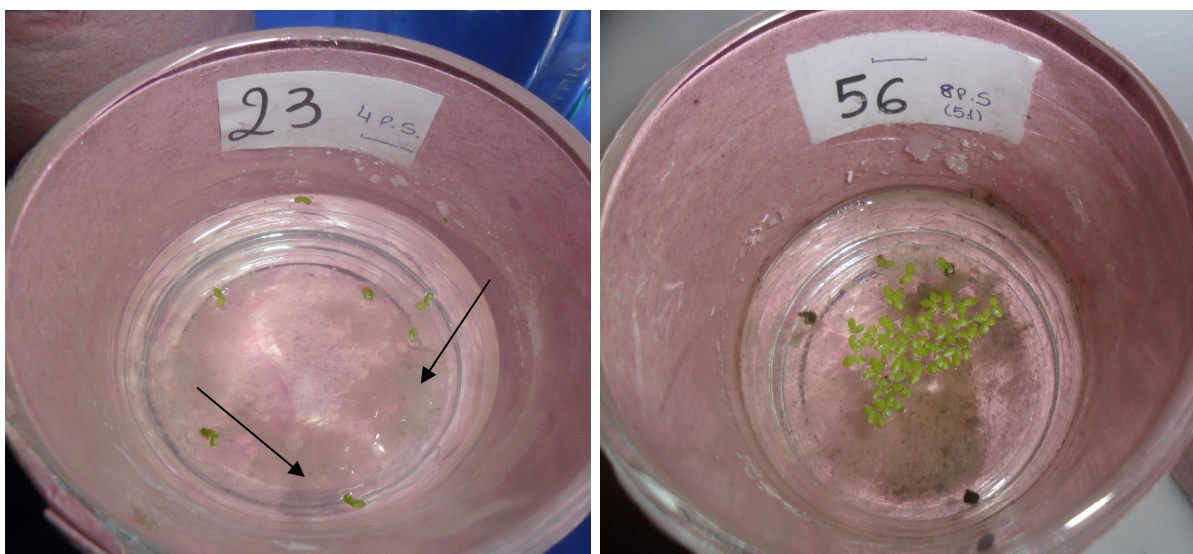


Figura 26 – Recipiente-23 iniciou com 4 indivíduos (com solução P&S)
Recipiente-56 iniciou com 8 indivíduos (com solução P&S e chumbo (51mg/l))

1.4 CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos mostraram o comportamento da *Lemna aequinoctialis* Welw. sob diferentes condições de cultivo. No primeiro experimento a variação dos dados foi alta a partir da quarta semana (em solução P&S), mostrando que a luminosidade (fator identificado) é imprescindível para se obter resultados significantes do crescimento da espécie.

Nos experimentos realizados com água da lagoa, a taxa de crescimento foi baixa, e isto também foi identificado na lagoa, pois nesta área de estudo as Lemnas não foram encontradas em grandes quantidades formando um cobertura sobre a superfície como é o comum desta espécie. Suspeita-se que esta baixa taxa de crescimento pode ser o resultado da alta concentração de Manganês (identificado na análise da água) ou a presença de

herbicidas no meio (hipótese levantada uma vez que a lagoa fica numa fazenda, onde possivelmente utilizam estes componentes).

O segundo experimento realizado com a solução de Pirson & Siedel, foi o que apresentou a maior taxa de crescimento da *Lemna aequinoctialis* Welw. em laboratório, fornecendo assim parâmetros para a construção de um modelo computacional. A ausência de um crescimento exponencial especula-se que tenha sido motivado pelo cultivo não-axênico. Com isso é necessário destacar que, para pesquisas onde se busque avaliar comportamentos particulares de um indivíduo é necessário cultivo axênico, sendo que não basta ter meio de cultura e materiais estéreis, os espécimes também precisam estar esterilizados. Neste cultivo observou-se que um indivíduo de *Lemna aequinoctialis* Welw permanece vivo entre 40 e 70 dias, num meio sem reposição de nutrientes a mais de 80 dias.

A presença de microorganismos no meio, foi importante no estudo da facilitação das espécies, onde nas análises feitas com “um, quatro e oito” indivíduos inoculados (3º experimento) bem como com “dez” indivíduos (2º experimento), observou-se que um único fronde só se estabelece e produz outros frondes, em ambientes não infestados por microorganismos. A partir disto concluiu-se que quanto maior o número de indivíduos, menor a ação dos microorganismos de inibir o desenvolvimento da espécie, confirmando a relação de facilitação levantada nesta pesquisa, e levantando a seguinte questão: “qual a quantidade inicial (a mínima e a ideal) de frondes, para que em ambientes infestados a espécie se estabeleça e se desenvolva”.

Os experimentos com citrato de chumbo mostraram que este elemento favorece o aumento da taxa de crescimento da espécie, que se desenvolveu melhor na maior concentração trabalhada, e por isso neste trabalho o que se considerou como contaminantes para a *Lemna aequinoctialis* Welw. foram microorganismos (fungos e bactérias) e não o elemento químico.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIEBER, A. G.; SCULTORI, C. Facilitação ao Estabelecimento de Plântulas em manchas de vegetação nas Dunas da Ilha do Cardoso, Cananéia. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, setembro, 2007. Caxambu, Mg.

CASTANHO, C. T. Facilitação entre plantas e suas implicações para a dinâmica e restauração de restingas. Tese (doutorado em ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 2012. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41134/tde-24082012-151906/>. Acesso em jan/2013.

CULLEY, D. D.; MYERS, R. W. Effect of harvest rate on duckweeds yield and nutrient extraction dairy waste lagoon. In: CULLEY, D. D. ; FRYE, J. B. (eds.) U. S. Department of Energy Final Report. School of Forestry and Wildlife Management, Louisiana State University, Baton Rouge, 1980. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-7345.1981.tb00273.x/abstract>> . Acesso em out. 2010.

CUNHA, J.P.A.R.; ALVES, G.S.; REIS, E.F. Efeito da temperatura nas características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. In: **Planta daninha**. vol.28, no.3 Viçosa, 2010.

FRANÇA, G. M. O. Efeito de doses de excremento de aves na produção e qualidade nutricional de *Lemna valdiviana Phil* (Araceae) para piscicultura. Cruz das Almas – Bahia. 2008. 69f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

FRANÇA, F., MELO, E., GÓES NETO, A., ARAÚJO, D., BEZERRA, M. G., RAMOS, H. M., CASTRO, I., GOMES, D. Flora Vascular de Açudes de uma região do semi-árido da Bahia, Brasil. In: Acta bot. bras. 17(4):549-559. 2003

GOMEZ, K. L. G. Potencial de la Planta Aquática Lemna sp gibba en La alimentacion de cerdos. Dissertação (Mestrado): Universidade de Colima, Tecoman, Colima, 2000, 70p.

GRAEFF,G., VIANNA,A. G., TONETTA,D., PRUNER, E. N. Avaliação do potencial nutritivo da Macrófita aquática Lemna minor, por meio da análise da composição química e por sua utilização em ração para carpa comum (Cyprinus carpio L.) na fase de recia. In: Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 37-50, jan./jun. 2007 <<http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/viewFile/458/206>> acesso em mai/2011.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (Eichhornia crassipes, Pistia stratiotes e Salvinia molesta) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. In: Acta Sci, v. 24, p. 36-48, 2002. <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBioIsci/article/view/2353/2297>.

IRGANG BE.; PEDRALLI G; WAECHTER JL. Macrófitos aquáticos da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. Rossleria 6: 395-404, 1984.

JONSSON, M. Perda de Biodiversidade e Funcionamento dos Ecossistemas. In: ECOLOGIA.INFO 30, 2011. Disponível em <http://www.ecologia.info/biodiversidade.htm>. Acesso em: janeiro de 2012.

JOURNEY, W; SKILLICORN; P., SPIRA, W. Duckweed aquaculture: A new aquatic farming system for developing countries. In: World Banck Publication. Washington, D. C., 1993, 67p. Disponível em: <http://www.wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/1993/03/01/000009265_3970128103342/Rendered/PDF/multi_page.pdf>. Acesso em 25/04/2010.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. 1. ed. Jundiaí, 2000. 285 p.

LANDOLT E. The family Lemnaceae- a monographic study. Vol. 1: Morphology; karyology; ecology; geographic distribution; systematic position; nomenclature; descriptions. In: LANDOLT, E. (ed.) Biosystematic Investigations in the family of Duckweeds (Lemnaceae), Vol. 2. Veröffentlichungen des geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rübél, Zürich, 1986.

LANDOLT E.; R. KANDELER. The family Lemnaceae- a monographic study. Vol. 2: phytochemistry, physiology; application; bibliography. In LANDOLT, E. (ed.) Biosystematic Investigations in the family of Duckweeds (Lemnaceae), Vol. 4. Veröffentlichungen des geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rübél, Zürich, 1987.

LAYBAUER, L. and SCHILD, O.L., Heavy metals absorption by *Eichhornia azurea* in the Minas do Camaqua, Southern Brazil, *Iheringia-Serie-Botanica*, 52: 35-53, 1999.

LIMA- BRITO, A; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIMII, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Cienc. Rural* [online]. 2011, vol.41, n.8, pp. 1354-1361. ISSN 0103-8478. LIZIERI, C.; AGUIAR, R.; KUKI, K. N. Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrhiza* In: *Rodriguesia* 62(4): 909-917, 2011. Disponível em: <<http://rodriguesia-seer.ibrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/335/136>>. Acesso em: jan/2013.

LORTIE, C. J. Facilitation and the Organization of Communities. In: Oxford bibliographies, 2010. Disponível em <http://www.oxfordbibliographies.com/browse?jumpTo=facilit&letter=f&module_0=obo-9780199830060&page=2&pageSize=20&sort=title>. Acesso em: jan/2013.

MAYO, S., BOGNER, J. & BOYCE, P. The Arales. In: *Monocotyledons - Systematics and Evolution* (P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler & C.J. Humphries, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. p.277-286, 1995.

MOUTINHO, M. F. Facilitação ou competição? Relação interespecífica entre duas espécies de plantas de dunas. In: *Ecologias da Mata Atlântica*. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/curso/2011/pdf/mariana_moutinho.pdf> Acesso em dezembro de 2012.

PAIXÃO, F. Mapa da localização da área de estudos em Anguera, Bahia. Feira de Santana: SIG-Ba, 2002.

PEDRALLI, G. Macrófitas aquáticas: técnicas e métodos de estudos. Estudos de Biologia, 26: 5-24, 1990.

PIRES, J. B., FRANÇA, F., CONCEIÇÃO NETO, A. O. Avaliação da Homogeneidade em Populações de Lemnoideae (Araceae). In: Sitientibus. Série Ciências Biológicas. , v.9, p.24 - 29, 2009.

POMPÊO, M. L. M. As macrófitas aquáticas: aspectos ecológicos e metodológicos. São Paulo: Portal de Ecologia Aquática. 2001. USP, IB, Departamento de Ecologia, Disponível em <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=30&Itemid=386>. Acesso em jan/2012.

POTT, V.J. A família Lemnaceae S. F. Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. Dissertação de Mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 200 p., 1993.

POTT, V. J. ; POTT, A. Potencial de uso de plantas aquáticas na despoluição da água. In: Documentos 133. Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747, dez. 2002.

ROTHWELL, G. W., VAN ALTA, M. R., BALLARD, H. E., STOCKEY, R. A. Molecular phylogenetic relationships among Lemnoideae and Araceae, using trnL – trnF intergenic spacer, 2004. In: Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 378-385.

SANTOS, D. M. M, BANZATTO; D. A. Influência de herbicidas em macrófitas aquáticas. In: Pesq. Agropec. Bras., v.33, n.6, p.823-830, jun. 1998. Brasília.

SANTOS, D. M. M., PITELLI, R. A. & BANZATTO, D. A. Efeito de Herbicidas em *Spirodela Punctata* (g.f.w.meyer) Thompson (*Lemnaceae*) cultivada em diferentes soluções nutritivas. In: **Rev. Ecosistema** Vol. 26, n. 1 jan. – jul. 2001. Disponível em <<http://189.20.243.4/ojs/ecossistema/include/getdoc.php?id=49&article=14>> Acesso em nov.2010.

TARDIVO, R. C., BACH, A., MORO, R. S. Macrófitas aquáticas da represa de Alagados. In: Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná. Editado por Mário Sérgio de Melo; Rosemeri Segecin Moro; Gilson Burigo Guimarães. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2007.

THOMAZ, S.M.; BINI, L. M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Maringá: EDUEM, 2003.

VALITUTTO; R. S. Acumulação de poluentes inorgânicos por macrófitas aquáticas nos reservatórios de Santana e Vigário, Barra do Piraí-RJ. Dissertação de mestrado. Niterói –RJ, 2004 Universidade Federal Fluminense.

CAPÍTULO 2

Modelo Computacional do crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw.

2.1 INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia possibilitou ao homem a realização de muitas atividades através do computador. As grandes descobertas da humanidade são resultado da necessidade de se resolver situações problema do seu cotidiano, um exemplo disto são os modelos computacionais baseados em agentes que auxiliam na compreensão de fenômenos e permite ao homem fazer inferências e simulações para atingir determinados resultados.

Muitas áreas do conhecimento lidam com modelos em suas pesquisas, e isto contribui para a diversidade de definições para este termo. Christofolletti (1999) e Moreira (2001) definem os modelos como uma representação simplificada da realidade, Sampaio (1998) considera um modelo como um novo mundo construído para representar fatos/eventos/objetos/processos que acontecem no mundo real ou imaginário, e Ford (1999) o trata como um substituto de um sistema real. Fragoso *et al* (2009) conceituam um modelo como a representação de algum objeto ou sistema em uma linguagem de fácil acesso e uso, destacando que quanto mais complexos os sistemas mais necessários são os modelos. Apesar dos variados conceitos, os autores são comuns em afirmar a importância e funcionalidade desta ferramenta para pesquisas científicas e também como ferramenta pedagógica.

Segundo Azevedo *et al.* (2005), um importante tipo de simulação é a modelagem baseada em agentes, onde é possível observar como os agentes individuais interagem entre si e com seu ambiente possibilitando o entendimento dentro de um processo dinâmico. Os autores afirmam que uma simulação pode possibilitar algumas explorações que são difíceis de realizar através de modelos analíticos, tais como a interdependência entre populações diferentes, habitantes de um mesmo ecossistema, e a sua variabilidade em função de agentes, internos ou externos ao sistema.

Lima *et al.* (2009) ao estudarem a modelagem de sistemas baseada em agentes ressaltaram que este tipo de modelagem é uma das metodologias (ou técnicas) disponíveis para construção de modelos e sua utilização está se expandindo rapidamente em diversos campos da ciência, tais como ciências sociais e ambientais. Existem vários ambientes de programação especificamente projetados para modelagem baseada em agentes como NetLogo, Swarm, Repast, AnyLogic, Mason e Ascape, StarLogo e Microworlds (SAMUELSON & MACAL, 2006), nesta pesquisa optou-se pelo programa NetLogo devido: aos resultados satisfatórios e condizentes com a realidade (GRIMM & THIELE, 2010) que o modelo produz (além de uma interface com riqueza visual e informativa (Figura 27)), e pela

intencionalidade de produzir um modelo que seja utilizado e/ou expandido por pesquisadores que não lidam com a área de exatas.

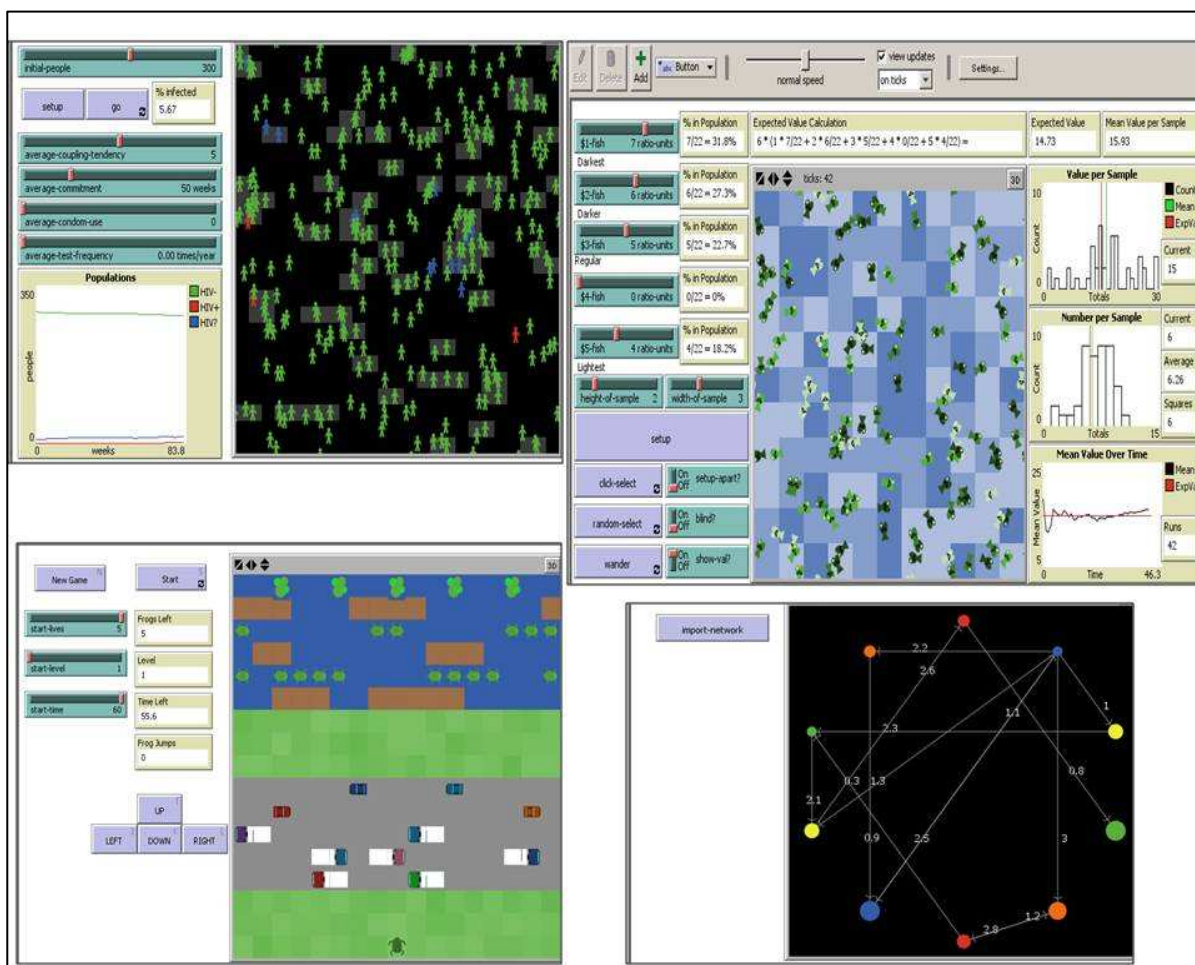


Figura 27 – Interfaces de 4 modelos em NetLogo da biblioteca do programa

O NetLogo tem uma linguagem de modelagem própria, derivada da linguagem de programação Logo, é uma ferramenta de acesso e uso gratuito⁶, com comandos próximos da linguagem natural, o que a torna uma linguagem de alto nível e de fácil aprendizado (Miller, 2010). É um programa que apresenta uma grande biblioteca de modelos de amostras que abrangem vários domínios sociais e naturais. Nele existe o “observador” (observer) que especifica e controla as condições de funcionamento, agentes (turtles) e o ambiente (patches). Esses agentes têm sido muito utilizados para visualizações e abstrações matemáticas, desenhos artísticos, jogos, ecossistemas, dentre outros, isto porque é possível realizar análises e conjecturas sobre as variações de parâmetros

⁶ Disponível em: <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/> .

ocorridas nas interações entre os agentes individuais (pessoas, bactérias, insetos, nações, ou organizações) e seu ambiente (AZEVEDO *et al.*, 2005).

Alguns autores (SPEELMAN & GARCIA-BARRIOS, 2010; JACOBSON, 2008; MILLER, 2010) destacam o estudo de simulações através do NetLogo, como uma ferramenta importante no processo de ensino-aprendizagem, pois auxilia na compreensão de fenômenos diversos. Speelman & Garcia-Barrios (2010) afirmam que ao propor uma atividade de simulação com o programa NetLogo a uma turma de mestrado, houve aumento na qualidade das respostas dos estudantes sobre o tema “Agrodiversidade”, com um nível de entendimento de 86% em detrimento de 29% durante o ensino passivo/conceitual. Segundo os autores, os estudantes declararam ter aprendido 55% do seu conhecimento atual através da oficina dos quais 76% foi aprendido usando a simulação.

Grimm & Thiele (2010) destacam o NetLogo como uma plataforma muito utilizada para a modelagem ecológica e ambiental, ressaltando que uma vez que o modelo é considerado bom o suficiente para ser analisado mais profundamente, podem ser executados experimentos de simulação e para serem analisados através de outras ferramentas como o “R”⁷. Jacobson (2008) discute a importância dos modelos computacionais como ferramentas de apoio para a aprendizagem baseada em problemas. Ele cita como exemplo a possibilidade da realização de experimentos computacionais com organismos unicelulares proposta por um modelo em NetLogo. Bishai (2010) trabalhou com simulações computacionais através do NetLogo no estudo de infecção da tuberculose.

Autores que discutem bioensaios (SIQUEIRA *et al.*, 2011; SANTOS & BANZATTO, 1998; COSTA *et al.*, 2008) destacam que estes experimentos científicos são grandes aliados dos pesquisadores que buscam prever os efeitos de substâncias nocivas ao meio ambiente, Santos *et al.* (2001) por exemplo, realizaram bioensaios (*ex situ*) com macrófitas aquáticas para detectar poluentes na água. Um modelo computacional pode tornar mais objetivo às decisões para a realização destes experimentos científicos.

Parunak *et al.* (1998) destacam a capacidade dos modelos baseados em agentes, de capturar detalhes de fenômenos reais, bem como características qualitativas e particulares dos organismos dentro de um sistema. Além destes aspectos existe a simulação de fenômenos e predições, que faz destes modelos ferramentas tão utilizadas no âmbito das pesquisas. A fim de padronizar a descrição da modelagem baseada em agentes para que os modelos se tornem completos, compreensíveis e reproduzíveis, foi que Grimm *et al.* (2006) propuseram o protocolo padrão ODD⁸, sendo revisado anos depois onde os autores

⁷ O “R” é uma linguagem e ambiente de computação estatística e construção de gráficos.

⁸ Overview, Design concepts and Details (Visão geral, conceitos de projeto e detalhes).

acrescentam outros conceitos (Grimm *et al.*, 2010) a fim de deixar ainda mais detalhada a descrição dos modelos (Figura 28).

Visão geral	Propósito
	Variáveis de estado e escala
	Visão de processo e escalonamento
Conceitos de projeto	Conceitos de projeto
Detalhes	Inicialização
	Entrada
	Sub-modelos

Figura 28 – Protocolo ODD (GRIMM *et al.*, 2006)

O bloco “visão geral” envolve os três primeiros elementos do protocolo: (I) Propósito (esclarecer o propósito do modelo, para que o leitor entenda o porquê de determinados aspectos foram considerados e outros não), (II) Variáveis de estado e escala (determinar o estado em que os elementos se encontram e a escala de representação espaço-temporal. Daí surge aspectos a serem respondidos, tais como: Quem são os agentes e quais as suas características? Como é o ambiente de interação? Como ocorre a relação agente e ambiente?), (III) Visão de processo e escalonamento (onde se deve detalhar o suficiente para permitir que o modelo seja implementado por pesquisadores interessados. Nele é necessário descrever a ordem em que ocorre os fatos, ou seja, como o modelo vem programado) (GRIMM *et al.*, 2010).

No segundo bloco está o quarto elemento “conceitos de projeto” (IV), onde os autores apresentam uma lista de pontos que podem ser abordados (princípios básicos, fenômenos emergentes, adaptação, objetivos, predição, interação, estocasticidade, coletividade, observação) e no último bloco “detalhes”, que contém os três últimos elementos do protocolo: inicialização (V) (informar quais os valores iniciais dos parâmetros e variáveis; quais as características iniciais dos indivíduos e do ambiente; a inicialização varia a cada simulação ou é sempre a mesma?), entradas (VI) (descrever se o modelo utiliza dados externos; se existe alguma condição ambiental que muda com o passar do tempo), e sub-modelos (VII) (detalhar todos os sub-modelos que foram incluídos no elemento III) (GRIMM *et al.*, 2010).

O objetivo geral deste capítulo foi construir um modelo computacional de crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw. para estudar o fenômeno da facilitação no estabelecimento e desenvolvimento dos indivíduos em ambientes contaminados, identificando qual o valor crítico e o ideal para que as espécies sobrevivam. Os objetivos específicos foram: elaborar um modelo preliminar do crescimento de Lemna para produzir curvas de crescimento, validar este modelo a partir da comparação com curvas de crescimento do referido organismo em meios de cultura, e inserir novos parâmetros ao modelo para estudar a hipótese de facilitação. A hipótese é de que: “abaixo de um valor crítico as Lemnas não se desenvolvem, ou seja, não reproduzem e morrem precocemente”.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

a) Programa utilizado

Para a construção do modelo utilizou-se o NetLogo 4.1 (Wilensky, 2009). No modelo os agentes são as Lemnas e o Contaminante (convencionou-se microorganismos como contaminante), e o ambiente é o meio de cultura.

Os parâmetros e variáveis do modelo foram obtidos a partir dos experimentos realizados nesta pesquisa conforme está descrito no primeiro capítulo. Existem alguns parâmetros e equações (serão identificados no momento da descrição de cada um) que foram resultados de ajustes feitos no código a partir de diferentes simulações buscando tornar o modelo condizente com os dados do experimento. Esses valores foram testados em diferentes simulações e validados após a comparação com os resultados dos experimentos, para que pudessem então compor o código deste modelo.

b) Descrição do modelo segundo protocolo ODD

I- Propósito

As Lemnoideae têm grande importância para o ambiente (cf. capítulo 1), no entanto ainda é pequeno o número de ações que viabilizem o uso das espécies desta subfamília para contribuir na minimização de impactos causados no ambiente. Diante disto foi proposto um modelo computacional de crescimento de *Lemna aequinoctialis* Welw. como pioneiro para estudar o comportamento da espécie em diferentes condições, de forma que pesquisadores se apropriem desta ferramenta para desenvolver e ampliar outros estudos de

simulação, conhecendo assim quais as condições favoráveis para acelerar ou retardar o crescimento das mesmas em aplicações reais no ambiente.

A cada simulação o modelo gera dados que são utilizados para produção de curvas de crescimento. Nele cada fronde é um indivíduo que se propaga por brotamento. O nutriente está difundido no próprio meio em forma de energia que vai sendo absorvida e diminuindo a medida que cresce o número de indivíduos consumidores, não havendo reposição. Existe dois ambientes para simulação que pode ser escolhido para estudar o comportamento da espécie: um ambiente com e outro sem contaminação.

II-Variáveis de estado e escala

O modelo é composto por: *Lemna aequinoctialis* Welw., contaminante, meio de cultura.

- *Lemna aequinoctialis* Welw.: iniciam num ambiente contendo nutrientes onde absorvem nutrientes de forma homogênea (quantidade calculada diariamente pela fórmula descrita nas páginas seguintes), se reproduzem por brotamento e podem ou não ser contaminadas. Se deslocam quando nascem há alguns passos da mãe, e depois podem ou não dar um ínfimo passo a sua frente (caso atenda o comando). Seu desenvolvimento é alterado quando o ambiente tem infestação, e podem alcançar três estados: viva, morta (quando as condições levam a morte) e doente (quando é contaminada). Cada uma tem a sua idade e intervalo de reprodução atualizado a cada rodada⁹. Elas percebem a quantidade de indivíduos a sua volta, a quantidade de nutrientes disponíveis e a presença de contaminante, e podem estar em uma das quatro fases estabelecidas pelo modelo:

Fase jovem: o indivíduo não brota (reproduz) até que chegue à fase estabelecida (fase de brotamento).

Fase adulta: o indivíduo pode brotar quando atinge a fase de brotamento.

Fase pós-brotamento: após cada brotamento o indivíduo tem um intervalo para produzir novas frondes.

- Contaminante: é representado por apenas um agente que possui energia, que pode aumentar ou diminuir. Seu deslocamento é apenas um mínimo passo para um lado, caso a condição exija. Não possui idade, mas existe um controlador de tempo que determina suas ações. Em contato com as Lemnas vivas, ele altera o estado delas de viva para doente. Exerce alteração no meio reduzindo em pequenas quantidades a disponibilidade de nutriente.

⁹ Ou seja, a cada dia (cada "tick" foi convencionado neste modelo como 1 dia).

- Ambiente: o ambiente tem uma quantidade inicial de nutriente que vai decrescendo ao longo do tempo pelo consumo das Lemnas e do contaminante, isto é calculado diariamente de acordo com a quantidade de indivíduos consumidores (fórmula descrita em “inicialização” p.57). O ambiente de simulação deste modelo é um mundo plano (limites de contorno laterais) tamanho 51x51.
- O tempo: é contado a cada rodada através de uma unidade de tempo artificial adotada pelo NetLogo (ticks), neste modelo convencionou-se que um cada “tick” é um dia. A simulação é programada para oito semanas, no entanto o modelo pode funcionar para mais ou menos dias. A cada rodada o modelo simula 10 recipientes com Lemnas em crescimento (experimentos) produzindo a média aritmética e o desvio padrão do número de indivíduos a cada sete dias.

III- Visão de projeto e escalonamento:

As Lemnas vivas executam o processo descrito na figura 29:

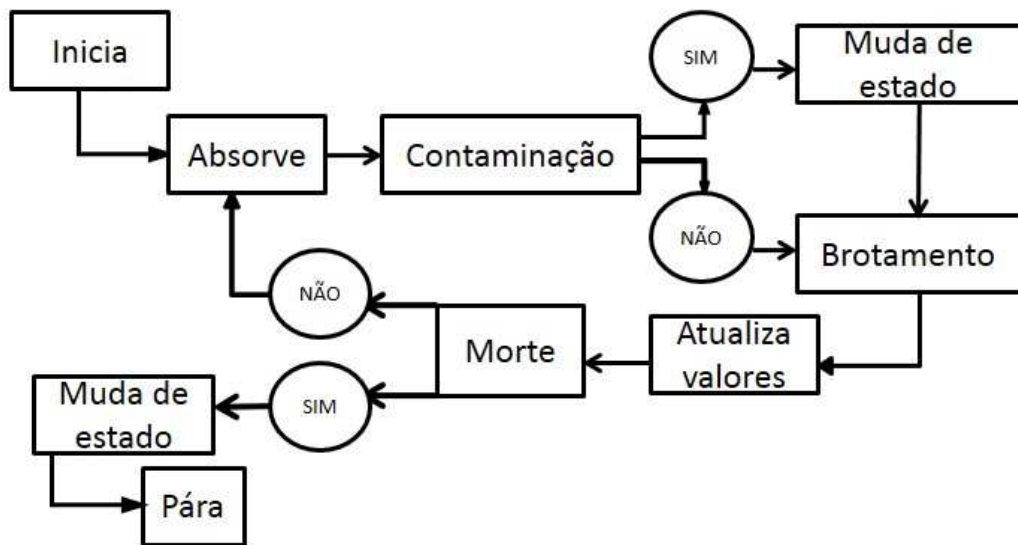


Figura 29 – Roteiro do agente Lemna

O contaminante executa o processo descrito na figura 30:

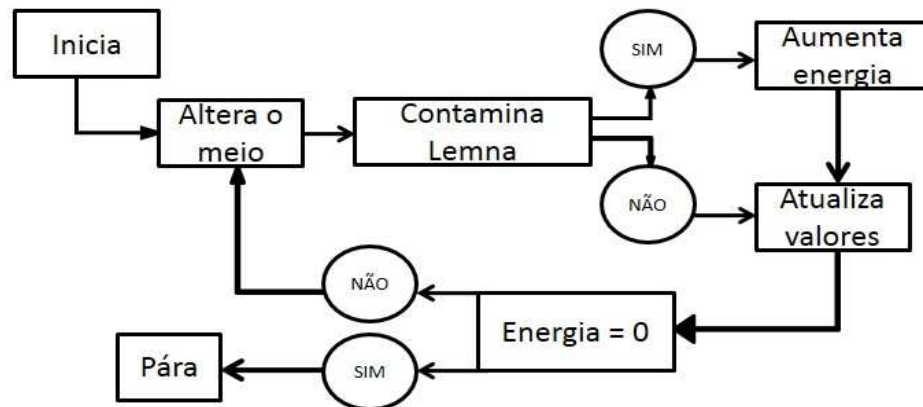


Figura 30 – Roteiro do agente Contaminante

IV- Conceitos do projeto

Nesta simulação só se considera como contaminante os microorganismos (fungos e bactérias). O modelo gera dados que são utilizados para produção de curvas de crescimento da espécie em diferentes condições ambientais.

A Lemna (corpo vegetativo do tipo fronde) se reproduz por brotamento. Em condições ótimas de crescimento, o indivíduo cresce conforme descrição de autores como Landolt (1986), Pott & Pott (2002), onde a quantidade de brotamento aumenta para 20 por indivíduo (o total de reprodução de um indivíduo) e a espécie têm crescimento exponencial.

O pergunta para a modelagem foi: “Qual a quantidade inicial (a mínima e a ideal) de frondes, para que em ambientes infestados a espécie se estabeleça e se desenvolva?”.

V- Inicialização / VI- Entradas:

Os parâmetros globais do modelo foram baseados nos dados dos experimentos *ex situ* realizados nesta pesquisa com a solução P&S (capítulo I), de forma que pudesse ser validado pela comparação das curvas e taxas de crescimento. Os parâmetros globais e seus respectivos valores foram:

- Quantidade de nutrientes do ambiente:

A quantidade inicial adotado foi 5 mg e vai decrescendo à medida que os indivíduos consomem.

- Volume:

Foi estabelecido que a quantidade de meio líquido do ambiente, deveria simular o volume dos cultivos *ex situ* e por isso adotou-se $V=200$ ml.

- Quantidade de nutrientes absorvido diariamente: o quanto as Lemnas absorvem cada dia é dado por:

$$Q = \text{quantidade de nutrientes do ambiente} / (\text{volume} - \text{número de Lemnas vivas})$$

- Tempo de reprodução:

É o tempo que a Lemna leva entre um brotamento e outro (um tempo de pausa). Este tempo é de 10 dias. Quando o ambiente está contaminado este valor aumenta para 15 dias. Cada Lemna inicia com um contador que estabelece aleatoriamente um *intervalo de reprodução* inicial para cada uma. Este intervalo vai atualizando a cada dia e só permite que a Lemna reproduza caso seja maior que o “*tempo de reprodução*”.

- Fase de brotamento:

Existe um período pelo qual a Lemna começa a brotar (no código é chamado de maioria), e este período é influenciado pelas condições do meio. Portanto após o nascimento ela precisa de 15 dias para então começar a reproduzir. Em ambiente contaminado este valor aumenta para 20 dias.

- Tempo corrido: existe um contador de tempo para controlar a contaminação no ambiente. Uma vez que o meio foi contaminado este tempo funciona da seguinte forma:

— Quando o tempo corrido > 2 (dias) a contaminação surge.

— Quando tempo corrido = 2 (dias) uma Lemna é contaminada.

— Quando o tempo corrido > 3 (dias) se existir algum indivíduo muito próximo (num raio 4 unidades do NetLogo) da contaminação (que fica localizada, em alguma parte da superfície) então de este é contaminado.

Estes valores convencionados foram baseados nas observações experimentais.

- Tempo de vida: as Lemnas sobrevivem até um tempo estabelecido, que varia de 40 a 70 dias.
- Média aritmética: o programa calcula a média aritmética (com dez repetições) do número de indivíduos a cada sete dias, durante dois meses. O modelo permite aumentar este período de observação.
- Desvio padrão: o programa calcula o desvio padrão do número de indivíduos a cada sete dias, durante dois meses.

CARACTERÍSTICAS PRÓPRIAS DOS AGENTES (turtles-own):

Lemnas:

- Estado de Vida: no modelo todas as Lemnas iniciam vivas. Existem três estados de vida que elas podem assumir: o estado vivo, morte ou doença.

Morte – por idade, por sobreposição no espaço, ou por falta de nutrientes. No modelo elas assumem a coloração branca e depois de um tempo (90 dias) já não são vistas na interface (ficam da cor do meio), simulando o momento em que alguns indivíduos mortos ficam abaixo da superfície.

Doente - por contaminação. Neste estado a Lemna não se desenvolve, e depois de um período (cerca de 40 dias) morrem.

- Idade: cada Lemna inicia com uma idade aleatória, entre 10 e 25 dias, e a mesma vai atualizando a cada dia (tick). Quando chega na “fase de brotamento” reproduz e quando atinge o tempo de vida (global) morre.
- Intervalo de reprodução: existe o controle de um intervalo de tempo entre um brotamento e outro. O modelo inicia com Lemnas que possuem intervalos de reprodução aleatórios entre 0 e 30 dias, e as Lemnas que nascem durante a simulação iniciam com um intervalo de reprodução igual a zero, e depois este valor vai aumentando com o tempo.

Quando o intervalo de reprodução é maior que o “tempo de reprodução” (global), então o indivíduo pode verificar as outras condições para reprodução, e estará ou não pronto para brotar.

- Quantidade de nutriente absorvido: aqui guarda a quantidade de nutriente que a Lemna absorve diariamente (é atualizada a cada dia).
- Quantidade de nutriente absorvido no tempo: armazena a “quantidade de nutriente absorvido” para que na hora do brotamento as Lemnas-filhas herdem 10% do seu nutriente.

Contaminante: as equações e os valores descritos abaixo foram resultados de ajustes feitos no código, e validados após a comparação com os resultados dos experimentos.

- Energia: o contaminante é um agente que possui energia, que pode aumentar ou diminuir ao longo do tempo. Ele inicia com energia igual a três unidades (valor que mais se adéqua ao estudos). Assim, a cada Lemna nascida ele perde 0.1 de energia e diminui em 0.01 no tamanho¹⁰, e a cada Lemna infectada ele ganha 0.2 de energia e aumenta em 0.02 no tamanho. Se a energia for igual a zero o contaminante perde seu poder de infestação no meio.

- Alteração do meio: o contaminante influencia na qualidade do meio líquido para as Lemnas. Assim adotou-se que, quando ele surge, começa a diminuir em pequenas quantidades a disponibilidade de nutriente no ambiente. E isto é feito através da seguinte relação:

$$\text{Alteração do meio} = [\text{quantidade de nutriente do ambiente} * 100 / (\text{volume} - \text{quantidade de Lemnas vivas})]$$

$$\text{Quantidade de nutriente do ambiente} = [\text{quantidade de nutriente do ambiente} - \text{alteração do meio}]$$

- Alteração total do meio: armazena tudo que o contaminante vai tirando do meio ao longo do tempo, ele é atualizado a cada dia através do acréscimo do quanto foi alterado no dia (“alteração do meio” descrito anteriormente).

¹⁰ O tamanho do contaminante é considerado no modelo pois em características reais, a disposição do contaminante no espaço determina o desenvolvimento das Lemnas, ou seja quanto maior é a cobertura do contaminante na superfície mais Lemnas são afetadas.

DADOS DE ENTRADA:

Ao iniciar o ambiente (mundo no modelo de Lemna) os seguintes parâmetros são definidos segundo a ordem abaixo (valores ajustados a partir do resultado dos experimentos):

— Quantidade de nutrientes do ambiente = 5 mg

— Volume = 200ml

— Tempo corrido = 0

— Cria Lemnas, podendo variar de 1 a 30 indivíduos pois existe uma variável na interface onde o observador escolhe qual o “n” inicial. As características dadas a este agente são: cor, forma, tamanho, direção, estado de vida (viva), idade (entre 10 e 25 dias ou “ticks”), intervalo de reprodução (0 a 30 dias), tempo de vida ou limite de vida (de 50 a 70 dias).

— Pergunta: “existe contaminação?”. Esta pergunta é decidida na interface (pelo pesquisador) onde tem um botão (switch) para se escolher se a simulação será no ambiente com ou sem contaminação.

Se existir contaminação então:

 Será criado um agente contaminador (determina-se cor, forma, tamanho, energia (= 5) e direção aleatória) e serão estabelecidos os valores das globais “Fase de brotamento = 20” e “tempo de reprodução=15”

Se não existir contaminação:

 As variáveis globais são estabelecidas (Fase de brotamento = 15” e “tempo de reprodução=10”) e segue-se para a próxima fase.

FUNCIONAMENTO DO MODELO:

Definidas as variáveis globais, a criação do ambiente e dos agentes com suas características, então o modelo roda a partir de um comando que inicialmente cria um vetor para armazenar o numero de indivíduos em 10 repetições (ou seja 10 simulações) e calcular a média aritmética e o desvio padrão a cada sete dias.

Em cada repetição são executados os seguintes comandos (nesta ordem):

- ✓ Atualização do dia (tempo corrido + 1)
- ✓ Consumo de nutriente
- ✓ Ação do contaminante (sim ou não)
- ✓ Reprodução (sim ou não)
- ✓ Atualização de gráficos
- ✓ Atualização de idade e intervalo de reprodução das Lemnas
- ✓ Contagem de dias
- ✓ Condições de morte

Abaixo será descrito cada comando listado acima:

- Atualização do dia:

O tempo corrido começa em zero e precisa ser atualizado assim que começa o dia, pois ele é necessário para determinar as ações do contaminante.

- Consumo de nutriente:

As Lemnas absorvem e o meio vai reduzindo a quantidade de nutrientes diariamente:

— Quantidade de nutriente absorvido no dia = [quantidade de nutriente do ambiente / (volume – total de Lemnas vivas)]

— Quantidade de nutriente do ambiente = quantidade de nutriente do ambiente - quantidade de nutriente absorvido no dia

— Quantidade de nutriente absorvido = quantidade de nutriente absorvido + Quantidade de nutriente absorvido no dia

- Ação do contaminante (caso a simulação seja feita em ambiente contaminado):

Trata-se de um bloco de comandos que funciona a partir do valor do tempo corrido:

- Se o tempo corrido = 2 então uma Lemna é contaminada.
- Se o tempo corrido > 3 então o contaminador verifica se existe alguma Lemna viva num raio de visão = 4 unidades do NetLogo. Se existir, então aleatoriamente uma Lemna é escolhida e contaminada. Com isso a sua energia aumenta em 0.2 e o seu tamanho aumenta em 0.02. Quando a sua energia chegar a zero ele perde o poder de infestação nas Lemnas.

- Reprodução:

Se existem nutrientes no meio, e as Lemnas atendem às condições:

- I. Lemnas com idade > Fase de brotamento
- II. Intervalo de reprodução > tempo de reprodução
- III. Estado de vida = 1

Então haverá brotamento (reprodução), e os seguintes comandos são executados:

- A quantidade de nutriente absorvido no tempo = quantidade de nutriente absorvido
- Brota 1 indivíduo, com:
 - Idade= 0
 - Intervalo de reprodução = 0
 - Quantidade nutriente absorvido = 10% * quantidade de nutriente da Lemna-mãe absorvido no tempo
- A Lemna-filha se afasta 5 unidades da Lemna-mãe
- O contaminador perde energia: $E_{\text{atual}} = E_{\text{total adquirida}} - 0.1$ (ao perder energia diminui o tamanho em 0.01)
- Zera o intervalo de reprodução da Lemna-mãe

- Atualização de gráficos

Comando para exibir os gráficos do crescimento das Lemnas nos diferentes estados de vida e da quantidade de nutriente do meio.

- Atualização de idade e intervalo de reprodução das Lemnas:

As Lemnas aumentam a idade e o intervalo de reprodução a cada dia (rodada).

- Contador de dias

Armazena os número de dias (ou rodadas). Este dado é importante pois é verificado: nas condições de morte, contaminação, intervalo de reprodução.

- Condições de morte

As condições que fazem a Lemna morrerem são:

- estado de vida = 1 e idade maior que o tempo de vida, ou
- quantidade de nutriente absorvido = 0, ou
- sobreposição de indivíduos (podem estar numa região com muitos onde: se num raio=3 (unidades do NetLogo) a quantidade de indivíduos for maior que 10, então uma das Lemnas neste raio morre).

Para melhorar a visualização na interface, as Lemnas mortas e doentes quando chegam a 70 dias ficam da cor do meio. Isto não as exclui do ambiente, pois o monitor continua revelando o total de mortos e doentes, mas simula um ambiente real (em laboratório), onde as Lemnas mortas, após um período começam a ficar abaixo da superfície. O contaminante desaparece do mundo quando a energia for igual a zero.

A partir do modelo descrito, pôde-se fazer simulações e assim testar a facilitação entre os indivíduos verificando assim qual o valor crítico para o desenvolvimento da espécie em ambiente contaminado.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No NetLogo, os resultados da simulação (tabela 7) feita em um ambiente sem infestação, registrou taxa de crescimento da *Lemna aequinoctialis* Welw. até a quinta semana, de taxa de 31%, e nas semanas seguintes foi decrescendo gradualmente. Desenvolvimento semelhante a este, foi observado no segundo cultivo *ex situ* (cf. capítulo 1).

Semanas	Número médio de indivíduos
Início	10
1S	18
2S	25
3S	36
4S	54
5S	74
6S	101
7S	136
8S	201
9S	267
10S	343
11S	419
12S	458

Tabela 7- Crescimento médio em NetLogo

O crescimento ao longo das doze semanas pode ser observado no gráfico construído a partir dos intervalos de confiança (IC) (figura 31), que mostra como as médias (oito simulações) representam significativamente (nível de confiança de 95%) o desenvolvimento ao longo do tempo. Foi analisado até a 12ª semana para observar o comportamento da curva quando comparado com o resultado do cultivo II feito no mesmo período.

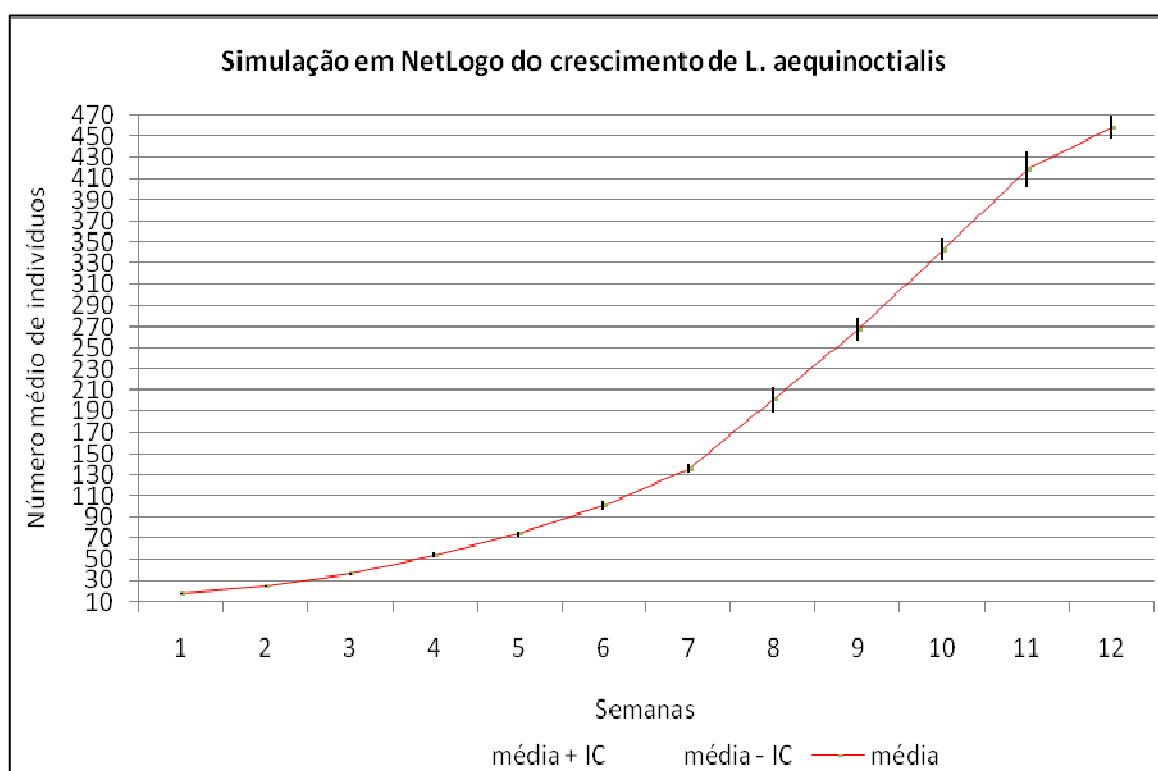


Figura 31- Gráfico com intervalo de confiança do crescimento em NetLogo

O teste t realizado para comparar os dados do modelo com os do segundo cultivo, revelou que os resultados são correspondentes a um nível de significância de 5% com sensibilidade de teste de 0,082 indicando que o modelo descreve o comportamento de *Lemna aequinoctialis* Welw. cultivada em laboratório.

A curva de crescimento desta simulação mostrou que os dados estão correlacionados à curva ajustada, com coeficiente de correlação de 0,99 e desvio padrão de 7.2. Este comportamento também foi observado na curva do cultivo *ex situ* feito em onze semanas (cultivo II) conforme mostra o gráfico comparativo na (figura 32).

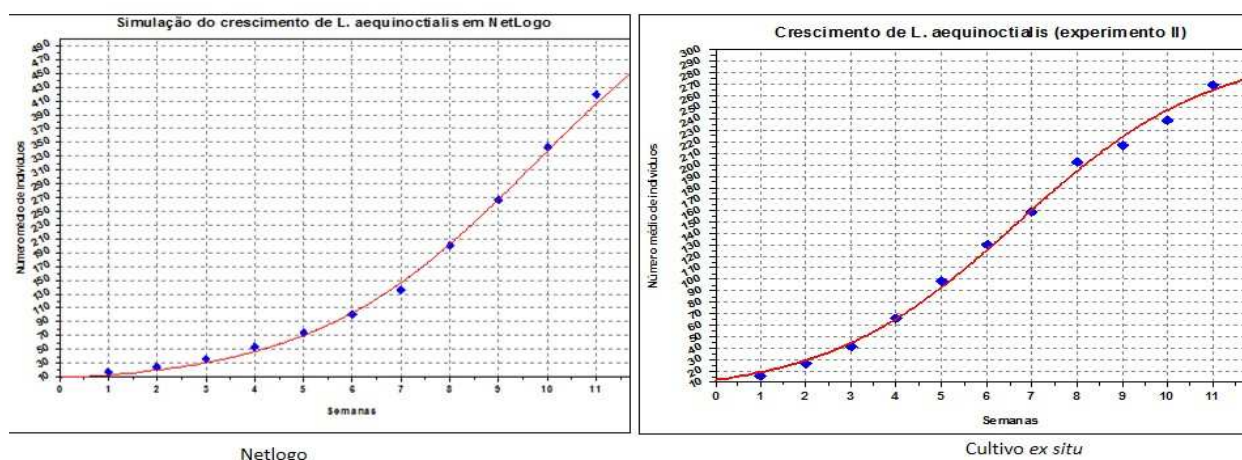


Figura 32- Comparação entre as curvas de crescimento do modelo com os resultados em NetLogo

Durante a realização dos experimentos *ex situ* observou-se que organismos isolados tinham dificuldade de se manter frente a contaminação de microorganismos (cf. capítulo 1). Este fenômeno pode ser descrito como facilitação (BIEBER & SCULTORI, 2007; JONSSON, 2011; CASTANHO, 2012) onde a presença de uma população favorece o estabelecimento da espécie, pois os indivíduos ajudam-se mutuamente e termina por vencer a competição pelos nutrientes com outros organismos, o que não acontece com indivíduos isolados. O modelo então passa a simular um ambiente contaminado, permitindo observar o comportamento dos indivíduos a partir de diferentes números iniciais de indivíduos.

A interface do modelo construído contém um botão para que o observador escolha a simulação com ou sem contaminação, tem a opção (botão: “roda”) onde pode acompanhar o desenvolvimento dos indivíduos ao longo das semanas ou a opção de estudar o modelo tomando as médias semanais (botão: “testedehipótese”) (figura 33).

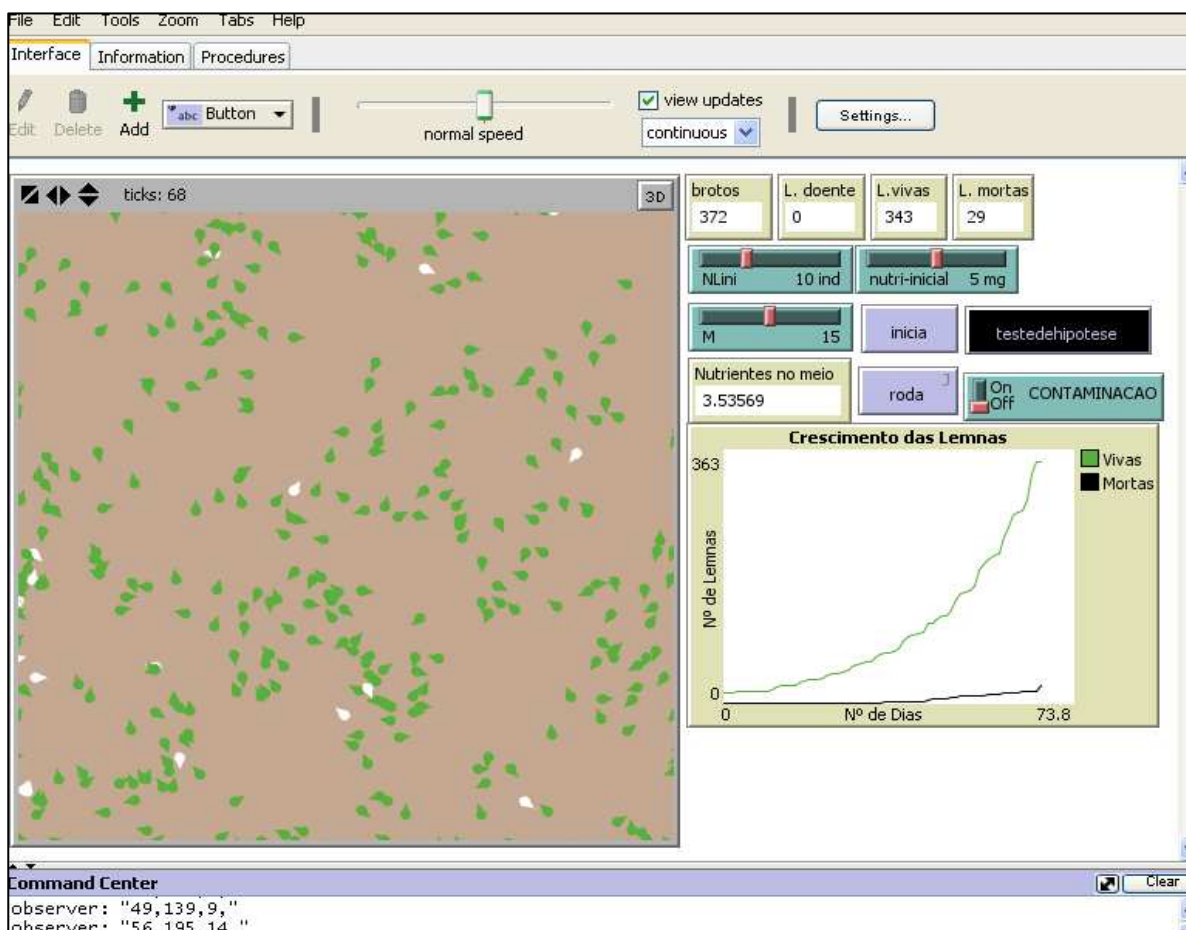


Fig. 33 – Interface do modelo de crescimento de *Lemna aequinoctialis*

Para a simulação iniciada com 4 indivíduos, a taxa de crescimento registrada foi de 9%, e esta mesma taxa foi encontrada no experimento *ex situ* com 4 Lemnas inoculadas. O gráfico da figura 34 mostra a relação entre o crescimento nestes dois estudos citados. (cf. capítulo I) onde de acordo com o teste t, os dados do modelo e os do cultivo (para 4 indivíduos iniciais) são correspondentes a um nível de significância de 5% com sensibilidade de teste de 0,029 indicando que o modelo descreve o comportamento da espécie de *Lemna aequinoctialis* Welw. quando ocorre infestação no ambiente.

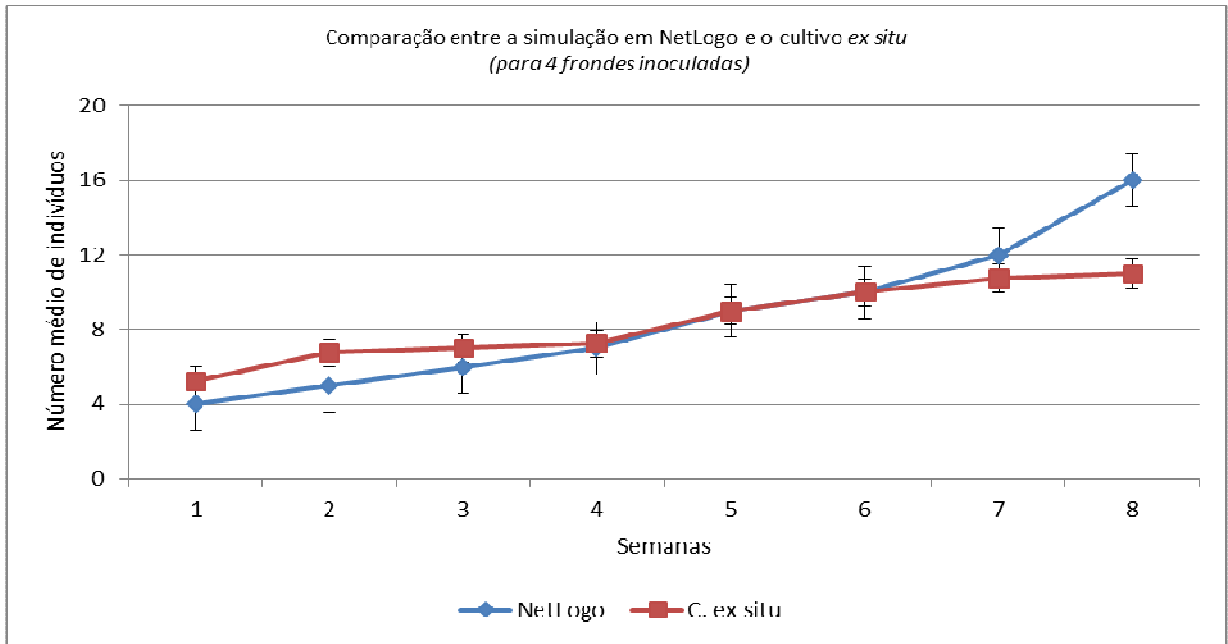


Figura 34 – Crescimento a partir de 4 indivíduos

A simulação que iniciou com 8 indivíduos registrou uma taxa de 10%, e no experimento *ex situ* com esta mesma quantidade de indivíduos, foi 12%. O gráfico da figura 35 mostra a comparação entre os resultados do cultivo e os do modelo, onde de acordo com o teste t estes resultados não se diferenciam significativamente.

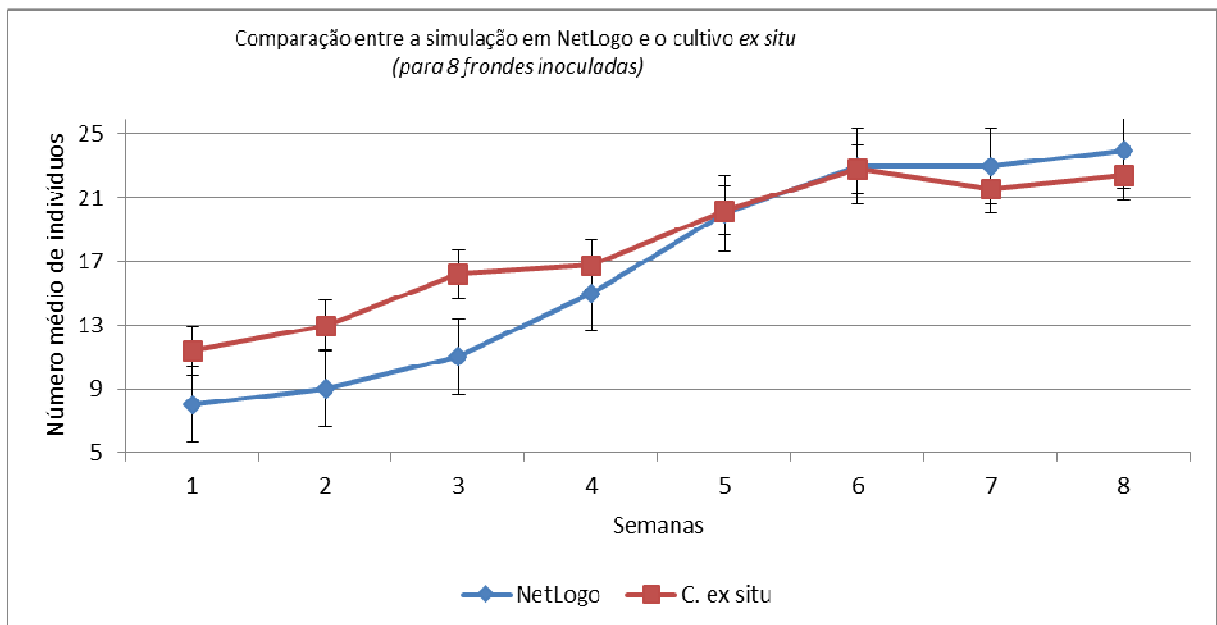


Figura 35 – Crescimento a partir de 8 indivíduos

As curvas de crescimento (figura 36) com coeficiente de correlação variando entre 0,99 e 0,98 mostram o desenvolvimento da espécie no modelo em NetLogo e nos experimentos *ex situ* para $n=4$ e $n=8$.

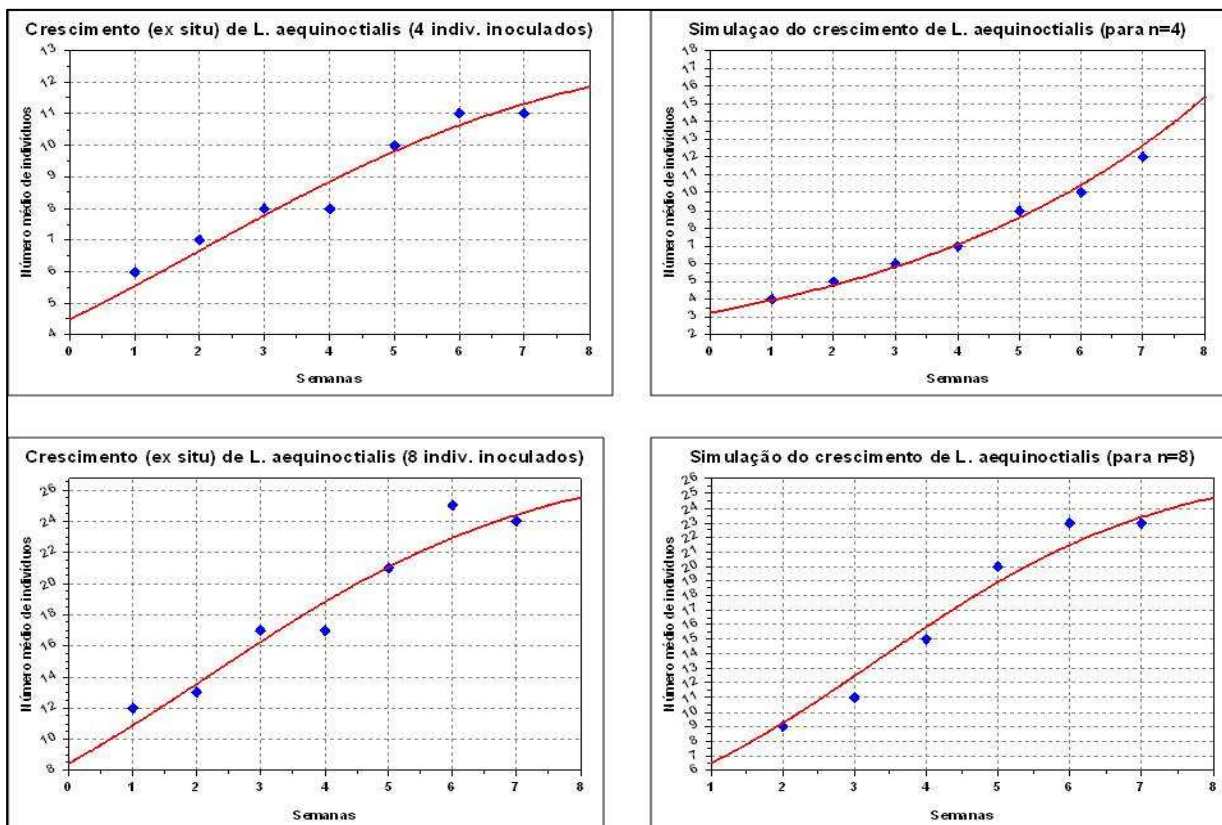


Figura 36 – Comparação entre as curvas de crescimento *ex situ* com as produzidas pelo modelo

Os resultados e as variações observadas no modelo em NetLogo, foram identificados também nos experimentos, e apesar das taxas terem apresentado pequenas variações, o modelo descreveu o comportamento dos indivíduos mostrando a importância do número inicial de indivíduos para o desenvolvimento da espécie. O gráfico da figura 37 mostra a média semanal com o erro padrão (intervalos) dos resultados das simulações em NetLogo a partir de diferentes quantidades de indivíduos. Nele pode-se perceber que a partir de quatro indivíduos as Lemnas em ambientes contaminados podem se desenvolver sendo que a maior taxa de crescimento registrada foi a partir de 15 indivíduos.

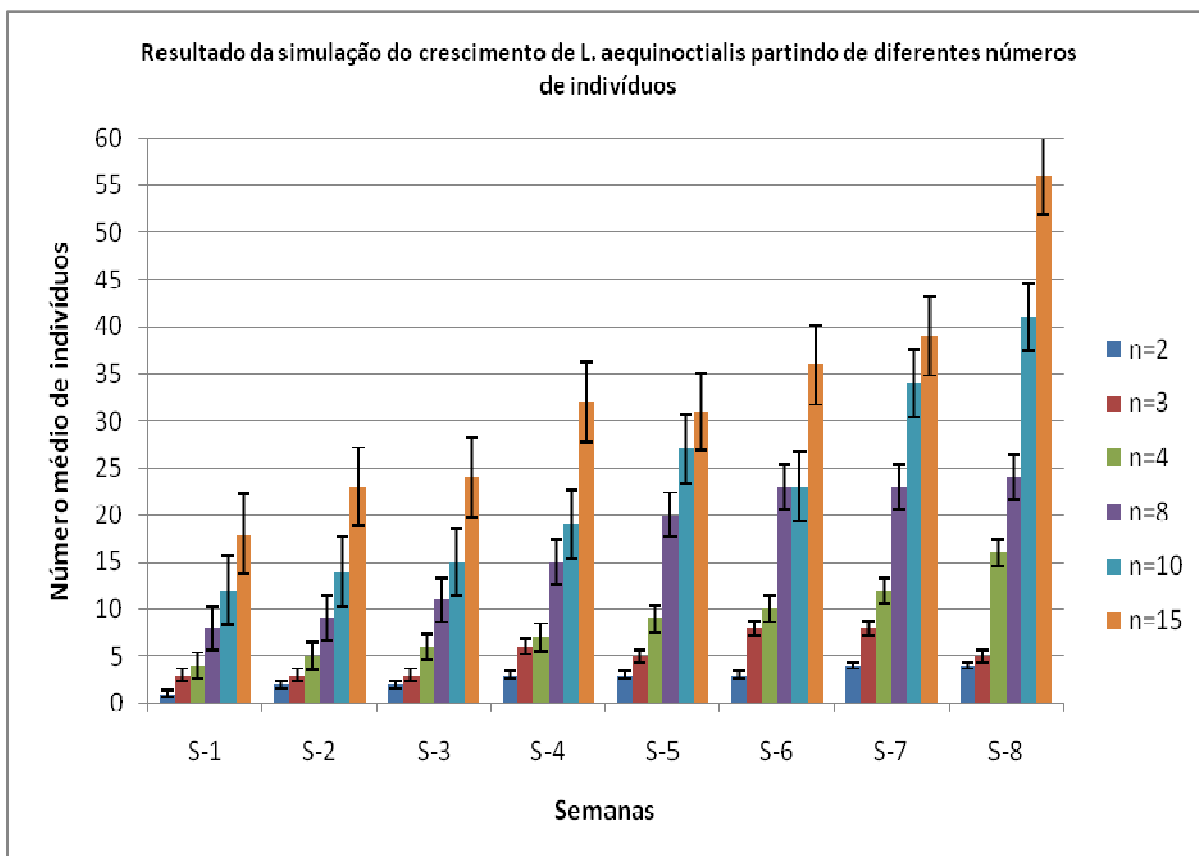


Figura 37 – Comparação dos resultados da simulação em NetLogo

2.4 CONCLUSÕES

O modelo de crescimento em NetLogo, descreveu o comportamento da *Lemna aequinoctialis* Welw. num ambiente simulado sem contaminação por microorganismo, apresentando taxa de crescimento compatível com os resultados do segundo cultivo realizado com solução P&S. Na simulação em ambiente contaminado, a hipótese de facilitação foi estudada e conforme os resultados do terceiro cultivo *ex situ*, existe facilitação entre indivíduos de *Lemna aequinoctialis* Welw.

A partir das simulações realizadas, verificou-se que é necessário uma quantidade mínima de frondes (indivíduos) de *Lemna*, para que em ambientes contaminados a espécie se estabeleça e se desenvolva. Os resultados das simulações mostraram que, um único fronde em ambiente contaminado não se desenvolve, dois e três frondes podem se

desenvolver (ou não), mas o valor mínimo para se garantir o estabelecimento de colônias de frondes é quatro indivíduos.

Estudando o modelo para valores maiores que quatro, os resultados mostraram que se $4 \leq n^{\circ}$ de indivíduos iniciais ≤ 8 então a espécie se estabelece nestes ambientes, e crescem inicialmente com baixa taxa de crescimento. As maiores taxas de crescimento registradas foram para simulações a partir de 10 indivíduos iniciais.

Com o acima exposto, pode-se concluir que o modelo construído representa de forma realista o desenvolvimento de frondes de *Lemna aequinoctialis* Welw. em ambientes com ou sem contaminação por microorganismos. Para estudar o comportamento de outras espécies do gênero *Lemna* a partir deste modelo, pode ser necessário modificar alguns parâmetros e/ou variáveis isto porque, nesta pesquisa não houve experimentos em laboratórios com outras espécies para comparação dos resultados.

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, L. L., MENEZES, C. S., MAGDALENA, B. C., PONTAROLO, E. Ambientes Computacionais Orientados a Agentes para apoio à Aprendizagem Baseada em Simulação. In: Anais do XVI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE INFORMÁTICA NA EDUCAÇÃO – SBIE-UFJF, Juiz de Fora – MG. 2005 Disponível em < <http://www.br-ie.org/pub/index.php/sbie/article/view/392> >. Acesso em set. 2010.

BIEBER, A. G.; SCULTORI, C. Facilitação ao Estabelecimento de Plântulas em manchas de vegetação nas Dunas da Ilha do Cardoso, Cananéia. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, setembro, 2007. Caxambu, Mg.

BIEMBENGUT, M. S., Modelagem Matemática & Implicações no Ensino-Aprendizagem de Matemática. Blumenau: Editora FURB, 1999.

BISHAI, J. D., BISHAI, W. R., BISHAI, D. M. Heightened Vulnerability to MDR-TB Epidemics after Controlling Drug-Susceptible TB. In: PLoS ONE. Setembro/2010, vol. 5, issue 9. Disponível em: <<http://www.plosone.org>>. Acesso em jan. 2012.

CASTANHO, C. T. Facilitação entre plantas e suas implicações para a dinâmica e restauração de restingas. Tese (doutorado em ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 2012. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/411134/tde-24082012-151906/>. Acesso em jan/2013.

CHRISTOFOLETTI, A. Modelagem de sistemas ambientais. São Paulo: Edgard Blucher, 1999, 1ª edição.

Costa, C. G. V., VIEIRA, D. R., BALDASSO, L. F., SPARAGNA, P. M., KUWANA, R., OLIVEIRA, R. T. Bioensaio: Limitação Nutricional - *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta - Prasinophyceae). São Paulo: Instituto de Oceanografia, 2008. Disponível em: <<http://www.danilorvieira.com/disciplinas/iob127/relatorio2.pdf>>. Acesso em nov. 2010.

FORD, A. (1999) Modeling the Environment: an Introduction to System Dynamics Models of Environmental Systems Covelo, CA: Island Press.

FRAGOSO JÚNIOR, C. R.; FERREIRA, T. F.; MARQUES, D. M. Modelagem ecológica em ecossistemas aquáticos. São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske, J., Goss-Custard, J., Grand, T., Heinz, S., Huse, G., Huth, A., Jepsen, J. U., Jørgensen, C., Mooij, W. M., Müller, B., Pe'er, G., Piou, C., Railsback, S. F., Robbins, A. M., Robbins, M. M., Rossmanith, E., Rüger, N., Strand, E., Souissi, S., Stillman, R. A., Vabø, R., Visser, U., DeAngelis, D. L., 2006. A standard protocol for describing individual-based and agent-based models. In: **Ecological Modelling**, v. 198, n. 1-2, p. 115–126, 2006. ISSN 0304-3800.

GRIMM, V., THIELE, J. C. NetLogo meets R: Linking agent-based models with a toolbox for their analysis. In: *Environmental Modelling & Software* 25 (2010) 972e974. Disponível em: www.elsevier.com/locate/envsoft. Acesso em jul. 2012.

GRIMM, V.; BERGER, U.; DeANGELIS, D.L.; POLHILL, J.G.; GISKE, J.; RAILSBACK, S.F.; The ODD protocol: a review and first update. In: Ecological Modelling, Elsevier, v. 221 (2010), p. 2760-2768. Disponível em: www.elsevier.com. Acesso em ago. 2012.

JACOBSON, M. J. A design framework for educational hypermedia systems: theory, research, and learning emerging scientific conceptual perspectives. In: Education Tech Research Dev (2008) 56:5–28. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/4807325022730610/>>. Acesso em jun. 2011.

JONSSON, M. Perda de Biodiversidade e Funcionamento dos Ecossistemas. In: ECOLOGIA.INFO 30, 2011. Disponível em <http://www.ecologia.info/biodiversidade.htm>. Acesso em: janeiro de 2012.

LANDOLT E. The family Lemnaceae- a monographic study. Vol. 1: Morphology; karyology; ecology; geographic distribution; systematic position; nomenclature; descriptions. In: LANDOLT, E. (ed.) Biosystematic Investigations in the family of Duckweeds (Lemnaceae), Vol. 2. Veröffentlichungen des geobotanischen Intitutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich, 1986.

LAYBAUER, L. and SCHILD, O.L., Heavy metals absorption by Eichhornia azurea in the Minas do Camaqua, Southern Brazil, Iheringia-Serie-Botanica, 52: 35-53,1999.

LIMA, T. F. M., FARIA, S. D., SOARES F., B. S., CARNEIRO, T. G. S. Modelagem de sistemas baseada em agentes: alguns conceitos e ferramentas. In: Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Natal - Brasil, abr. 2009, INPE, p. 5279-5286. Disponível em: <<http://marte.dpi.inpe.br/col/dpi.inpe.br/.../5279-5286.pdf>>. Acesso em out. 2010

MOREIRA, G. S. (2001). A Utilização de um Ambiente de Modelagem Computacional no Ensino/Aprendizagem de Economia. Dissertação de Mestrado. IM-NCE: Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/DCC/IM/NCE.

MILLER, B. W., BRECKHEIMER, I., MCCLEARY, A. L., GUZMÁN-RAMIREZ, L., CAPLOW, S. C., JONES-SMITH, J. C., WALSH, S. J. Using stylized agent-based models for population–environment research: a case study from the Galápagos Islands. In: *Popul Environ*, 2010, 31:401–426.

PARUNAK, H. V. D.; SAVIT, R.; RIOLO, R. L. Agent-based modeling vs. equation-based modeling: A case study and users' guide. In Sichman, C. and Gilbert, editors, *Multi-agent systems and Agent-based simulation (MABS'98)*, volume 1534 of LNAI series. Springer-Verlag.

POTT, V. J. ; POTT, A. Potencial de uso de plantas aquáticas na despoluição da água. In: *Documentos 133*. Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747, dez. 2002.

SAMPAIO, F. F. (1998). Modelagem Dinâmica Computacional e o Processo de Ensino-Aprendizagem: Algumas Questões para Reflexão. Em: Universidad de Chile (Org.), *Anais, Conferência Internacional de Informática e Educação do Chile – TISE'98*. Santiago: Universidade de Chile.

SAMUELSON, D.A.; MACAL, C.M. Agent-Based Simulation Comes of Age: Software opens up many new areas of application. In: *OR/MS Today*. Vol 33. n. 4. 2006. Disponível em: <<http://www.lionhrtpub.com/orms/orms-8-06/agent.html>>. Acesso em set. 2010.

SANTOS, D. M. M, BANZATTO, D. A. Influência de herbicidas em macrófitas aquáticas. In: *Pesq. Agropec. Bras.*, v.33, n.6, p.823-830, jun. 1998. Brasília.

SANTOS, D. M. M., PITELLI, R. A. & BANZATTO, D. A. Efeito de Herbicidas em *Spirodela Punctata* (g.f.w.meyer) Thompson (*Lemnaceae*) cultivada em diferentes soluções nutritivas. In: **Rev. Ecosistema** Vol. 26, n. 1 jan. – jul. 2001. Disponível em <<http://189.20.243.4/ojs/ecossistema/include/getdoc.php?id=49&article=14>> Acesso em nov.2010.

SIQUEIRA, L. F. S., ROJAS, M. O. A., COSTA NETO, J. J. G., BARBIERI, R. Bioensaio e estudo da decomposição de ruppia marítima I. da Laguna da Jansen, São Luís – Ma (Brasil). In: Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica - ISSN 1982-422X , Vol. 6, número 1, jan-jun. 2011.

SPEELMAN, E. N., GARCIA-BARRIOS, L. E. Agrodiversity v.2: An educational simulation tool to address some challenges for sustaining functional agrodiversity in agro-ecosystems. In: Ecological Modelling 221 (2010) 911–918. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/ecolmodel>>. Acesso em abril 2012

WILENSKY, U. NetLogo. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL, 2009. Disponível em <<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>> Acesso em nov. 2010.

APÊNDICE I

Resultados do 1º experimento com solução de Pirson & Siedel (tabela completa)

NÚMERO DE INDIVÍDUOS A CADA SEMANA (*SOLUÇÃO P&S*)

RECIPIENTE	0	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
	semana								semana
R1	10	21	24	2	1	0	0	0	0
R2	10	21	24	2	0	0	0	0	0
R3	10	23	32	32	1	0	0	0	0
R4	10	24	30	74	123	300	508	742	960
R5	10	24	47	84	108	125	114	106	120
R6	10	27	37	67	86	62	26	0	0
R7	10	22	30	38	75	115	156	167	250
R8	10	20	32	59	103	210	300	224	152
R9	10	20	31	31	70	0	0	0	0
R10	10	28	45	66	72	96	74	69	0

APÊNDICE II

Resultados do 1º experimento com solução água da lagoa filtrada e autoclavada (tabela completa)

NÚMERO DE INDIVÍDUOS A CADA SEMANA

Recipiente	0	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
		semana							semana
R1	10	17	18	19	22	22	26	22	24
R2	10	19	21	23	25	22	31	29	22
R3	10	21	21	24	27	22	23	24	16
R4	10	17	20	20	22	23	24	21	16
R5	10	19	19	22	23	23	21	21	22
R6	10	20	22	25	28	22	27	25	27
R7	10	18	19	22	21	19	20	21	21
R8	10	21	22	20	17	20	21	21	22
R9	10	18	19	23	24	24	21	20	20
R10	10	13	15	15	17	17	11	11	10

APÊNDICE III

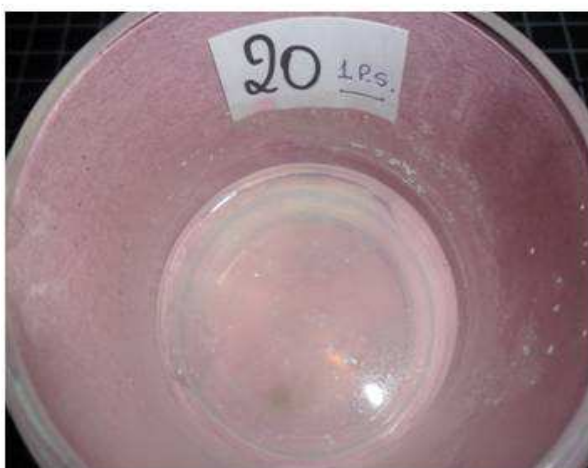
Resultados do 2º experimento com solução de Pirson & Siedel (tabela completa)

Número de indivíduos a cada semana

	1ª Semana	2ª Semana	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª Semana	12ª Semana
E1	15	19	30	47	80	100	137	179	217	226	260	280
E2	16	21	35	50	101	120	148	201	216	271	380	405
E3	19	27	38	56	88	116	126	175	197	219	190	150
E4	15	31	42	78	106	132	151	175	128	119	130	95
E5	13	24	43	65	116	156	185	234	240	253	260	270
E6	15	32	52	101	113	164	206	265	287	317	327	340
E7	10	20	29	39	64	107	101	118	95	110	130	133
E8	17	25	40	76	92	116	140	148	158	143	130	90
E9	19	32	51	61	96	115	157	248	260	288	428	485
E10	13	32	72	172	195	260	292	360	445	420	507	525
E11	17	25	44	72	97	140	205	256	350	415	448	555
E12	18	38	66	83	177	192	273	326	345	370	536	590
E13	18	35	51	78	127	168	191	223	240	261	280	303
média	15,8	27,8	45,6	75,2	111,7	145,1	177,8	223,7	244,5	262,5	308,2	324,7

APÊNDICE IV

Inóculos realizados em solução de Pirson & Siedel e em Água da lagoa. Os experimentos com água da lagoa não sofreram alterações visíveis (pela presença de outros organismos) como nos realizados com solução, tanto para 1 indivíduo como para 8 inoculados.



1 indivíduo em Solução P&S



8 indivíduos em solução P&S + 51mg/l Pb



1 indivíduo em água da lagoa



8 indivíduos em água da lagoa

APÊNDICE V

Resultados do experimento realizado com diferentes concentrações de citrato de chumbo, para diferentes quantidades de Lemnas inoculadas.

Experimento com 17mg/l de Pb diluído em solução P&S (média semanal do nº de frondes)			
Semanas	1 indivíduo	4 indivíduos	8 indivíduos
S0	1	4	8
S1	1	7	11
S2	2	8	13
S3	2	12	21
S4	2	12	21
S5	2	12	24
S6	2	12	29
S7	1	22	31
S8	1	26	38

Experimento com 51mg/l de Pb diluído em solução P&S (média semanal do nº de frondes)			
Semanas	1 indivíduo	4 indivíduos	8 indivíduos
S0	1	4	8
S1	1	7	12
S2	2	8	14
S3	2	9	17
S4	2	10	24
S5	3	11	32
S6	3	13	41
S7	3	14	45
S8	3	16	50

Experimento com 85mg/l de Pb diluído em solução P&S (média semanal do nº de frondes)			
Semanas	1 indivíduo	4 indivíduos	8 indivíduos
S0	1	4	8
S1	2	7	12
S2	2	8	16
S3	2	9	19
S4	2	10	24
S5	2	11	28
S6	3	11	40
S7	3	13	43
S8	3	18	53

APÊNDICE VI

Resultados da análise de metais pesados na água da lagoa

	CHUMBO	COBRE	ZINCO	MANGANÊS*
P1 A	0,13	0,06	0,44	0,84
P1 B	0,13	0,05	0,52	0,91
P1 C	0,17	0,06	0,45	0,98
**média	0,14	0,06	0,47	0,91
P2 A	0,21	0,09	0,44	0,32
P2 B	0,26	0,12	0,50	0,39
P2 C	0,26	0,12	0,49	0,39
média	0,24	0,11	0,48	0,37
SED A	0,60	0,23	0,58	0,59
SED B	0,52	0,19	0,62	0,54
***média	0,56	0,21	0,60	0,56

*A amostra precisou ser diluída
 ** Em cada ponto da lagoa (P1 e P2) foram feitas 3 sub-amostras que foram analisadas e depois calculou-se a média
 ***Média das duas 2 sub-amostras de sedimento (SED A, SED B)

Resultados da análise bacteriológica e dos parâmetros físico-químico da água da lagoa

	PONTO 1	PONTO 2
pH	6.9	7.0
Condutividade	756	707
Oxigênio	1.65	2.0
Turbidez	309	263
Sólidos Totais	1234 mg/l	1362mg/l
Coliforme total	$\geq 1,6 \times 10^4$ NMP/100ml	$\geq 1,6 \times 10^4$ NMP/100ml
Coliforme fecal	$1,7 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$

APENDICE VII

Código do modelo de *Lemna aequinoctialis* Welw.

```
breed [lemnas lemna]
breed [maus mau]
globals
[
  tempoReproducao
  quantnutriAbsorvidoDia
  volume
  quantnutriAmbiente
  medialemna
  desviolemna
  maioridade
  tempo-passou
]
lemnas-own
[
  estadoVida
  idade
  intervaloReproducao
  quantnutriAbsorvido
  quantnutriAbsorvidoTemp
  idade-morte
]
maus-own
[
  energia
  alteracao
  alteracaototal
]

to inicia
  reset-ticks
  ca
  set quantnutriAmbiente nutri-inicial
  set volume 20000
  set tempo-passou 0

  ask patches [set pcolor 37]

  create-lemnas NLini
  [
    set shape "default"
    set size 4
    setxy random-xcor random-ycor
    set color green
    set estadoVida 1

    set idade random 15 + 10
    set intervaloReproducao random 30
    set idade-morte random 20 + 50
    fd random-float NLini / 2
  ]
  ifelse CONTAMINACAO
  [ CONTAMINAR ]
  [
    set tempoReproducao 10
    set maioridade 15
  ]
End to roda
  set tempo-passou tempo-passou + 1
  absorve
  if tempo-passou >= 2 [mau-agindo]
  gera
  atualizaGrafico
  ask lemnas
  [set idade idade + 1 set
  intervaloReproducao intervaloReproducao +
  1]
  tick
  morre
end

to testedehipotese
  foreach [7 14 21 28 35 42 49 56] ;; 63 70 77]
  [
    let zlemnas []
    repeat 10
    [
      inicia
      repeat ?
      [roda]
      let qtdlemnas count lemnas with
      [estadoVida = 1]
      set zlemnas lput qtdlemnas zlemnas
    ]
    set medialemna int mean zlemnas
    set desviolemna int standard-deviation
  zlemnas
  show (word ? "," medialemna ","
  desviolemna ",")
  ]
end
```

```

to absorb
  ask lemnas with [estadoVida = 1]
  [
    set quantnutriAbsorvidoDia
    quantnutriAmbiente / (volume - (count
    lemnas with [estadoVida = 1]))
    set quantnutriAmbiente
    (quantnutriAmbiente -
    quantnutriAbsorvidoDia)
    set quantnutriAbsorvido
    (quantnutriAbsorvido +
    quantnutriAbsorvidoDia)
  ]
end
to gera
ifelse quantnutriAmbiente > 0
[
  ask lemnas with [(idade > maioridade)
  and (intervaloReproducao >
  tempoReproducao) and (estadoVida =
  1)]

  [ifelse any? maus in-radius 15
  [ fd random 2]
  [
    set quantnutriAbsorvidoTemp
    quantnutriAbsorvido
    set quantnutriAbsorvido
    quantnutriAbsorvido * 0.9
  ]
  hatch 1
  [
    set idade 0
    set intervaloReproducao 0
    set quantnutriAbsorvido
    quantnutriAbsorvidoTemp * 0.1
    right random 360
    ask lemnas in-radius 4
    [face myself rt 180 fd 5 ]
    ask maus
    [
      set size size - 0.01
      set energia energia - 0.1
    ]
  ]
  set intervaloReproducao 0
  ]
  ]
  [stop]
end

```

```

to CONTAMINAR
  set tempoReproducao 15
  set maioridade 20
  create-maus 1
  [
    set shape "cloud"
    set size 3
    set color red
    set energia 3
    random-seed 20
    fd random-float NIni
  ]
End
to mau-agindo

ask maus
[
  set alteracao quantnutriAmbiente /
  (volume - (count lemnas with
  [estadoVida = 1]))
  set quantnutriAmbiente
  quantnutriAmbiente - alteracao
  set alteracaototal alteracaototal +
  alteracao

  if tempo-passou = 2
  [
    ask one-of lemnas with [estadoVida =
    1]
    [
      set estadoVida 2
      set color red fd 1]
    ]

  if tempo-passou > 3
  [
    ask maus
    [
      if any? lemnas with [estadoVida = 1] in-
      radius 4
      [
        ask one-of lemnas with [estadoVida =
        1]
        [
          set estadoVida 2
          set color red
          fd 1
        ]
      ]
    ]
  ]
]

```

```

ask maus
  [
    set size size + 0.02
    set energia energia + 0.2
    fd 0.1
  ]
]
]
]
]
end
to morre

  ask lemnas with [ (estadoVida = 1)
and (idade >= idade-morte) or
(quantnutriAbsorvido <= 0)]
  [
    set color white
    set estadoVida 0
  ]

  ask lemnas with [estadoVida = 1]
  [
    let nlenm count lemnas in-radius 3
with [estadoVida =1]

```

```

if nlenm > 10
  [
    ask one-of lemnas in-radius 3 with
[estadoVida = 1]
    [
      set estadoVida 0
      set color white
    ]
  ]
]

ask maus
  [if energia = 0 [die]]

ask lemnas with
[estadoVida = 0 or estadoVida = 2 and
idade > 70]
  [set color 37]
end
to atualizaGrafico
  set-current-plot "Crescimento das
Lemnas"
  set-current-plot-pen "Vivas"
  plot count lemnas with [estadoVida = 1]
  set-current-plot-pen "Mortas"
  plot count lemnas with [estadoVida = 0]
end

```