



MANUAL DE TÉCNICAS
PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

34. ECHINODERMATA

A.S.F. DITADI

Campinas, SP
1987

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOLÓGICAS

Campinas, SP

1987

34. ECHINODERMATA

A. S. F. DITADI

INTRODUÇÃO

As diferentes classes de equinodermas podem ser encontradas todas em uma mesma área; o interessado nestes animais tem, freqüentemente, a possibilidade de coletar uma grande variedade de representantes do filo num restrito espaço do domínio marinho. Não obstante, tenha sempre em mente a seguinte série de considerações, para o melhor aproveitamento futuro do material a ser coletado (museu, taxonomia, histologia, trabalhos práticos, etc.):

(1) Tendo em vista a existência de um endoesqueleto de carbonato de cálcio, os equinodermas não deve ser mantidos em fixadores ácidos. (2) Muitos equinodermas podem ser guardados a seco, ao invés de em líquidos, porém alguns deles, especialmente as estrelas-do-mar, são identificados também com base em estruturas moles, para o que a preservação a seco é insatisfatória. (3) Muitos equinodermas têm a tendência de quebrar os braços quando mergulhados diretamente em fixadores, ao passo que (4) outros, em primeira linha as holotúrias, são muito contráteis e freqüentemente evisceram caso não forem previamente anestesiados. (5) Tenha a certeza de que dispõe de um recipiente de tamanho adequado para anestésiar, fixar e conservar os espécimens.

Na seguinte seqüência de informações, muitas vezes serão propostos vários anestésicos: entenda-se que eles estão mencionados em ordem decrescente, com referência aos melhores resultados obtidos na maioria dos casos: o mesmo é válido para fixadores e líquidos de conservação. Para alguns grupos a informação aqui fornecida provém exclusivamente da bibliografia.

Qualquer que seja o procedimento geral escolhido, é importante anestésiar, fixar e conservar os espécimens separadamente. Em muitos casos consegue-se um resultado muito bom quando se emprega o líquido fixador aquecido (50-60°C).

COLETA

Os equinodermas ocupam habitats que vão desde a zona

Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências & Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo.

entremarés até profundidades de mais de 10.000 metros. São encontrados tanto em fundos arenosos e lodosos quanto em fundos rochosos.

Para águas profundas (aquelas não alcançadas por mergulho autônomo) é indispensável o uso de dragas e pegadores de fundo. Para se trabalhar com este equipamento deve-se utilizar também embarcações apropriadas. Tudo isso encarece consideravelmente esse tipo de coleta, portanto deixaremos de lado estas informações visto que escapam do objetivo do presente manual.

A coleta durante períodos de maré baixa ou por mergulho (com ou sem tubos de oxigênio) é mais do que satisfatória, pois os equinodermas são abundantes em todos os mares, inclusive na zona de estirâncio. Em praias arenosas, estrelas e ouriços-do-mar podem ficar expostos durante a maré baixa: as holotúrias de grande tamanho são muito comuns sob ou entre fendas rochosas submersas: os crinóides já ocorrem a pouca profundidade abaixo da marca inferior da maré, fixados a substratos duros e os ofiuros são coletados sob qualquer pedra, entre algas e/ou esponjas.

Ao coletar os diferentes tipos de equinodermas, coloque-os em baldes com algas (do tipo "sargaço"): se a coleta for feita em meses quentes e o coletor permanecer durante muito tempo na praia, periodicamente encha o balde com água do mar drenando a seguir.

Não coloque muitos animais em um mesmo balde: essa observação é especialmente importante em se tratando de holotúrias, pois o confinamento de muitos animais induz à evisceração: a consequência é a morte dos exemplares restantes.

Não há valor algum em coletar espécimens extremamente grandes se o coletor não possuir um recipiente para acomodá-lo durante a coleta depois dela. Se bem que o tamanho seja um fator secundário no caso de espécimens preservados a seco, deve ser considerado no momento da coleta e da fixação a fim de evitar o sacrifício inútil de animais.

OBSERVAÇÃO: Quando estiver coletando animais que vivem sob pedras, tenha o cuidado de fazê-lo com o auxílio de uma pinça ou então com luvas grossas. Nesse ambiente é comum a existência de anelídeos poliquetos da família Amphinomidae, cujas cerdas finas se quebram em contato com a pele do coletor, sendo a remoção difícil e dolorosa.

ESTRELAS-DO-MAR E OFIUIROS

A. Anestesia, fixação e preservação em líquidos

Tanto os sais de Epsom (= sulfato de magnésio, grau comercial) quanto o cloreto de magnésio ou mesmo a água doce podem ser usados para anestésiar e matar estes animais.

Coloque os animais em recipientes de fundo chato, contendo água do mar suficiente apenas para cobri-los: Adicione pequenas quantidades do sal escolhido, de hora em hora e durante todo o dia. Deixe os animais neste meio durante algumas horas ou mesmo a noite inteira. O tempo vai depender, entre outras variáveis, do próprio anestésico, da espécie animal, do tamanho do exemplar, do seu estado fisiológico, da temperatura, etc. Depois disto, teste os animais com estímulos mecânicos (estilete) ou químicos (gotas de álcool ou formol). Quando anestesiados, transfira-os para uma outra cuba, agora com água doce, e arrume os braços (= raios) de forma a ocuparem o menor espaço possível. O braço mais longo (Figura 1) deve ficar perfeitamente em linha reta para que se possa medir e contar as placas (= ossículos do endo-

esqueleto), essenciais para a taxonomia.

Depois, adicione formol (de preferência neutralizado), até atingir uma concentração de 5-10%. Deixe os exemplares aí por 24-48 horas. Uma injeção de formol puro na cavidade do corpo dos animais abrevia esta etapa.

Agora os espécimens podem ser guardados em álcool. Primeiramente lave o material em água doce, depois deixe-os em álcool 50% durante 6 horas, passando então para o álcool 70% onde serão guardados.

Com a água doce, o procedimento é semelhante. Adicione água doce pouco a pouco ao recipiente que contém o animal. Nesse caso a narcose é conseguida muito mais rapidamente do que com o emprego de sais de magnésio.

Embora tratados em conjunto, quanto ao emprego de anestésicos e fixadores, os tempos de anestesia para os ofiuros são muito mais curtos do que para as estrelas-do-mar.

B. Preservação a seco

A preservação a seco é uma alternativa para o caso de não se dispor de vidraria adequada para guardar os animais.

Proceda como o indicado no item precedente apenas até a fixação em formol, deixando os animais no fixador durante vários dias. Após a fixação leve os animais para secar à sombra e em local muito arejado. Jatos de ar quente, como os das saídas de condicionadores de ar, são preferíveis à exposição direta ao sol ou estufas fechadas. Arrume os exemplares sobre uma tela a fim de que a ventilação seja efetiva nas duas superfícies. O tempo de secagem completa varia de 1-3 semanas. Depois da primeira semana o processo pode ser acelerado colocando os espécimens em estufa onde haja circulação de ar.

C. Preparação dos pés tubulares (= "podia")

Para o estudo dos "podia" é necessário que estejam bem distendidos; portanto, anestésie o espécimen como recomendado no item a, tomando os seguintes cuidados.

Depois de um certo tempo no anestésico, coloque o animal com os "podia" para cima (= face oral voltada para cima), de modo a permitir uma boa expansão destas estruturas.

Método alternativo (demorado, porém efetivo). Adicione álcool 96% pouco a pouco à cuba que contém o animal: este processo de gotejamento deve, obrigatoriamente, ser demorado. A concentração final de álcool, na cuba, deverá ser da ordem de 20%. Mantenha o animal nesta solução alcoólica até a completa narcose. Fixar em álcool 70%. Quando os "podia" não estiverem bem distendidos, mesmo após demorada anestesia, faça um orifício no madreporito e injete, com o auxílio de uma seringa e de uma agulha hipodérmica de tamanho adequado, grandes quantidades de álcool 96%. Pode-se também injetar o álcool (no caso de estrelas-do-mar) através da extremidade de um raio, via canal radial.

D. Preparação de pedicelárias

Disseque pedaços da carapaça que contenham pedicelárias. Separe as diferentes pedicelárias e escolha qualquer um dos anestésicos relacionados no final deste artigo. Cada tipo de pedicelária de um mesmo indivíduo pode responder diferentemente a um mesmo anestésico. Além disto, as respostas de um mesmo tipo de pedicelária podem também ser diferentes em diferentes espécies.

Fixe-as em formol neutro ou alcalino 5%.

As pedicelárias podem ser preservadas neste mesmo líquido, porém o melhor é guardá-las em álcool 70%.

Se houver intenção de montar as peças em lâminas permanentes, proceda a coloração com Paracarmin de Meyer (opcional). A seguir, passe as pedicelárias através da série crescente de álcoois, clareamento em óleo de cravo e montagem em bálsamo do Canadá ou outro meio equivalente.

E. Preparação do esqueleto

Use, de preferência, animais de pequeno porte com um disco de aproximadamente 10 centímetros de diâmetro. Coloque os animais em uma solução aquosa 10% de NaOH (ou KOH). Remova os espécimens de tempo em tempo, lave-os e escove fortemente com uma escova de dentes ou similar, a fim de verificar se os tecidos já estão no ponto de serem removidos. Não deixe a maceração ir longe demais, pois os ossículos podem desagregar-se. Quando as partes moles estiverem se soltando, remova a membrana peristomial e as partes internas dos espécimens. Lave em água corrente por uma hora, depois em álcool ácido 30%, novamente uma rápida lavagem em água corrente e seque em estufa.

F. Preparação de larvas

As larvas devem ser bem anestesiadas para evitar contração e/ou distorção. Anestesiá-las com cloretana ou hidrato de cloral durante 15 minutos a várias horas (vai depender da larva). Teste as reações das larvas com um estilete, antes de fixá-las. Fixar em formol 5% e desidratar em álcoois 35, 50, 75 e 95%. Deixar neste último por 24 horas e depois voltar ao álcool 70% onde as larvas serão guardadas.

Método alternativo: fixar em sublimado corrosivo por alguns instantes (1-2 minutos). Colorir em Bórax-carmin e seguir a série ascendente de álcoois, xilol I e II e montar em bálsamo do Canadá ou outro meio equivalente.

OURIÇOS-DO-MAR E BOLACHAS-DA-PRAIA

A. Fixação e preservação em líquidos

Sacrificar os animais em formol 5-10% ou álcool 80% (24 horas). Lavar em água corrente para retirar a areia, algas ou pedaços de conchas aderidos e preservar em álcool 80% alcalino. Depois de 24 horas trocar o álcool. Os espécimens destinados à dissecação devem ser injetados (via peristômio) com formol concentrado. Não há necessidade de prévia anestesia.

B. Preservação a seco

Coloque o ouriço num recipiente com água do mar suficiente para cobri-lo. Deixe-o apresentar todos os espinhos eretos. Então, rapidamente, derrame areia fina até cobri-lo totalmente. Pressione a areia com uma espátula, ou mesmo com as mãos (cuidado). Remova o excesso de água, substituindo por formol a 10%. Depois de 24 horas, lave o animal em água corrente e seque-o da mesma maneira como se faz com estrelas-do-mar e ofiuros. A secagem pode ser feita inclusive com a areia (dispensando a lavagem), pois à medida que vai secando a areia vai caindo.

Este método permite manter os espinhos do ouriço-do-mar praticamente como o animal os mantém em vida. Pode-se dissecar o peristômio e remover a lanterna de Aristóteles bem como ou-

tros órgãos internos.

Uma outra alternativa é injetar formol concentrado na cavidade do corpo do animal e secar o espécimen sem a remoção das partes moles.

Um outro método de preservação a seco e que se aplica tanto a ouriços regulares quanto a irregulares (tendo em vista apenas a preservação da carapaça), consiste em:

Sacrificar o animal em água doce por imersão de 30-45 minutos. Depois, imergi-lo em uma solução saturada de bicloreto de mercúrio durante 12 horas. A seguir secar e "escovar" fora os espinhos. A remoção do peristômio e órgãos internos é opcional.

CRINÓIDES OU LÍRIOS-DO-MAR

A. Anestesia, fixação e preservação em líquidos

Anestesiar os animais em água doce ou sob a ação de sais de magnésio (cloreto ou sulfato). A anestesia no escuro melhora os resultados. O tempo de narcose para crinóides é muito pequeno quando comparado ao das estrelas-do-mar.

Mesmo depois de bem anestesiados, os crinóides tendem a "enrolar" os braços quando depositados no fixador. Para evitar este efeito, segure, tanto quanto possível, os braços dos crinóides em posição distendida ao imergi-los no fixador. Use luvas de borracha para esta finalidade.

Dependendo da finalidade, a preservação de crinóides em líquidos pode dispersar a fase de anestesia, bastando lançar os animais diretamente no álcool 80%.

B. Preservação a seco

Coloque os crinóides já fixados, como se recomendou no item anterior, em uma mistura de glicerina e álcool 50% na proporção de 2:3, durante 24 horas. Remova-os e deixe secar.

HOLOTÚRIAS OU PEPINOS-DO-MAR

A. Anestesia, fixação e preservação em líquidos

Deixe o animal relaxar completamente (em ambiente escuro ou bem sombreado) e só depois comece a adicionar quantidades crescentes de sais de magnésio (cloreto ou sulfato) a cada meia hora e durante várias horas. Os sais podem ser adicionados diretamente ao recipiente que contém o animal ou sob a forma de uma solução aquosa concentrada. O animal deve permanecer nesse meio durante várias horas. Quando estiver trabalhando com animais de grande porte, inicie o processo no fim da tarde a fim de continuar na manhã seguinte. Depois disso, teste os tentáculos expandidos com um estilete ou gotas de formol. Se o animal não reagir, fixe-o em formol 10% durante 24 horas. Lave-o e transfira-o para álcool 80%, onde será preservado.

A fixação pode ser feita diretamente em álcool 80% (recomendável para espécimens pequenos), trocado duas vezes antes de ir para a preservação definitiva.

Um outro método que também dá bons resultados é o uso de mentol. Da mesma forma como acima, deixe a holotúria relaxar (no escuro) e só então adicione o mentol. O tempo de anestesia, nos dois procedimentos, oscila entre 12 e 30 horas para animais

de grande porte. Para animais pequenos (5 centímetros ou menos de comprimento) o tempo de anestesia é bem menor.

A combinação dos dois métodos (sais de magnésio e mentol) não abrevia consideravelmente o tempo de anestesia, se bem que induz os animais a um relaxamento muito maior.

No momento da fixação, injete fixador na cavidade do corpo do animal. Troque o álcool após 24 horas.

Não conserve os holoturóides em formol, porque a longo prazo ele corrói os ossículos dérmicos, muito importantes para a taxonomia do grupo.

B. Montagem de pequenas espécies em lâminas

Procure pequenos holoturóides entre as ramificações de algas do tipo "sargaço", que cobrem grandes áreas de certos costões rochosos. Selecione animais com menos de 10 mm de comprimento. Trata-se, em geral, de alguma espécie do gênero *Synaptula*.

Mantenha os animais num recipiente com água do mar filtrada, no escuro, durante cerca de 24 horas. Este procedimento de limpeza do tubo digestivo dos animais pode sofrer algumas interrupções para a troca de água do recipiente.

Anestésie os espécimens com mentol e fixe-os em álcool 70% durante 24-48 horas.

Coloração opcional em Paracarmin de Meyer, seguida de desidratação segundo a série crescente de álcoois, xilol I e II e montagem em bálsamo do Canadá ou outro meio equivalente.

C. Preparação de ossículos dérmicos

Corte um pedaço de parede do corpo de um holoturóide e coloque-o dentro de um tubo de ensaio contendo uma solução aquosa a 10% de NaOH (ou de KOH). Leve o tubo para aquecer em chama fraca no bico de Bunsen. Utilize uma pinça de madeira para segurar o tubo durante o processo de aquecimento. Aqueça o tubo por breves momentos, retirando-o imediatamente da ação direta da chama (tenha o cuidado de jamais direcionar a abertura do tubo de ensaio para o lado de seu rosto). Este procedimento geral afrouxa e "digere" o tecido dérmico, liberando os ossículos na solução. Lave-os demoradamente em água doce. Observe ao microscópio entre lâmina e lamínula.

Os ossículos podem ser montados em lâminas permanentes, segundo o método descrito para as pedicelárias.

ANESTÉSICOS PARA EQUINODERMAS

- Água doce ou destilada. Adicione pouco a pouco, ao recipiente que contém os animais, quantidades crescentes de água doce até diluir a água do mar em cerca de 50%. Processo rápido.

- Água do local de coleta. Ferver a água do local de coleta a fim de exauri-la de oxigênio. Deixar voltar à temperatura ambiente. Depositar nela os animais para anestésiar. Processo lento.

- Água putrefada. Adicionar, pouco a pouco, à cuba onde se encontram os animais, água do mar que continha animais mortos. Uma alternativa é lançar pequenos pedaços de vísceras de holotúria ao recipiente de anestesia. Processo lento para ser usado na falta total de outro recurso. Como o método anterior o resultado nem sempre é dos melhores.

- Álcool etílico. gotejar álcool etílico 96% na água onde se encontram os animais. O gotejamento deve ser feito com

grandes intervalos de tempo e durante várias horas, até se obter uma solução alcoólica final ao redor de 10-20%. Esperar até o organismo tornar-se não reativo. Processo lento.

- Cloretana. Adicionar os sais diretamente ao recipiente onde estão os animais. Pode-se usar também uma solução aquosa concentrada. Processo rápido para larvas.

- Hidrato de cloral. Como o anterior. Processo rápido.

- Mentol. Como o anterior. Os cristais de mentol sobrenadam na água. Processo rápido para espécimens pequenos.

- Sais de Epson (sulfato de magnésio bruto). Adicionar os sais, sob a forma de uma solução concentrada, ao recipiente que contém os animais. Esta adição deve processar-se pouco a pouco e a intervalos longos. Processo lento.

- Sulfato de magnésio (sal amargo). Como o anterior ou fazer uma solução aquosa 20% e misturar com água do mar na proporção de 1:1 e submergir o animal. Processo lento.

LÍQUIDOS PARA A FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE EQUINODERMAS

- Álcool alcalino. Álcool etílico na concentração desejada, mais algumas gotas de uma solução aquosa 1% de bicarbonato de sódio. Testar o pH com papel de tornassol ou processo equivalente.

- Bouin marinho (para fins histológicos).

Solução estoque:

Solução saturada de ácido pícrico em água

do mar filtrada 75 partes

Formol (comercial) 25 partes

Na hora de usar, adicionar 5% de ácido acético gla-

cial.

- Formol neutro. Soluções de formol na concentração desejada, em água doce ou do mar. Adicionar bórax, pedaços de giz ou de coral para neutralizar ou mesmo levemente alcalinizar a solução.

- Sublimado corrosivo. Solução saturada de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), equivalente a 5 g deste sal em 100 ml de água doce. Filtrar. Cuidado, muito venenoso!

CONSTRUÇÃO DE "ARMÁRIO AQUECIDO" PARA GUARDAR EQUINODERMAS

Um dos problemas mais sérios para a estocagem a seco de equinodermas (carapaças) é o ataque pela umidade, acompanhado pela proliferação de fungos. Este problema é especialmente grave em regiões onde a umidade relativa do ar é alta, como por exemplo nas cidades litorâneas.

A proposta de se construir ou mesmo de apenas adaptar um simples armário com um sistema de aquecimento, afasta quase que por completo estes fatores de deterioração de material biológico.

As indicações transcritas a seguir sugerem o uso de um armário de madeira, constituído de até 7 andares, com prateleiras dispostas a cerca de 15 centímetros de altura uma da outra. A altura total do armário será de pouco mais de um metro.

As prateleiras seriam corrediças e constituídas de esquadrias de madeira com "tela de galinheiro" (malha bem fina).

Na base do armário fixar um soquete de porcelana para receber uma lâmpada de 60 ou 100 W. A fonte produtora de calor poderia ser, também, uma resistência ou placa metálica ligada à

rede elétrica e que fornecesse calor semelhante àquela desprendida pela lâmpada de 60-100 W. Este dispositivo eliminaria as frequentes reposições de lâmpadas queimadas.

Na parte mais alta das costas do armário, bem como nas portas, deve-se abrir quatro orifícios com cerca de 4 centímetros de diâmetro cada. Isto permitirá a circulação do ar aquecido e eliminação da umidade. Estes orifícios receberão uma cobertura de tela plástica de malha adequada para impedir a entrada e proliferação de baratas.

O "armário aquecido" pode ser utilizado também para a secagem de equinodermas, depois da etapa de fixação. Em se tratando de usar o armário para esta finalidade, substitua a lâmpada de 100 por 200 W ou resistência que produza aquecimento equivalente. A potência da lâmpada ou da resistência requerida para a secagem vai depender também da cubagem do armário.

A Figura 2 sugere o aspecto que deve ter um "armário de secagem" para guardar equinodermas.

REFERÊNCIAS

- Bullough, W. S. 1968. *Practical Invertebrate Anatomy*. Mac Millan & Co. Ltd. Londres.
- Cox, F. E. G., Dales, R. P., Gree, J., Norton, J. E., Nichols, O. & Wakelin, D. 1969. *Practical Invertebrate Zoology*. Sidgwick & Jackson, Londres.
- Knudsen, J. W. 1966. *Biological Techniques*. Harper & Row Publ. Nova Iorque.
- Mahoney, R. 1973. *Laboratory Techniques in Zoology*. Butter worth & Co. Publ. Ltd. Londres.
- Pantin, C. F. A. 1964. *Notes on Microscopical Techniques for Zoologists*. Cambridge Univ. Press. Londres.

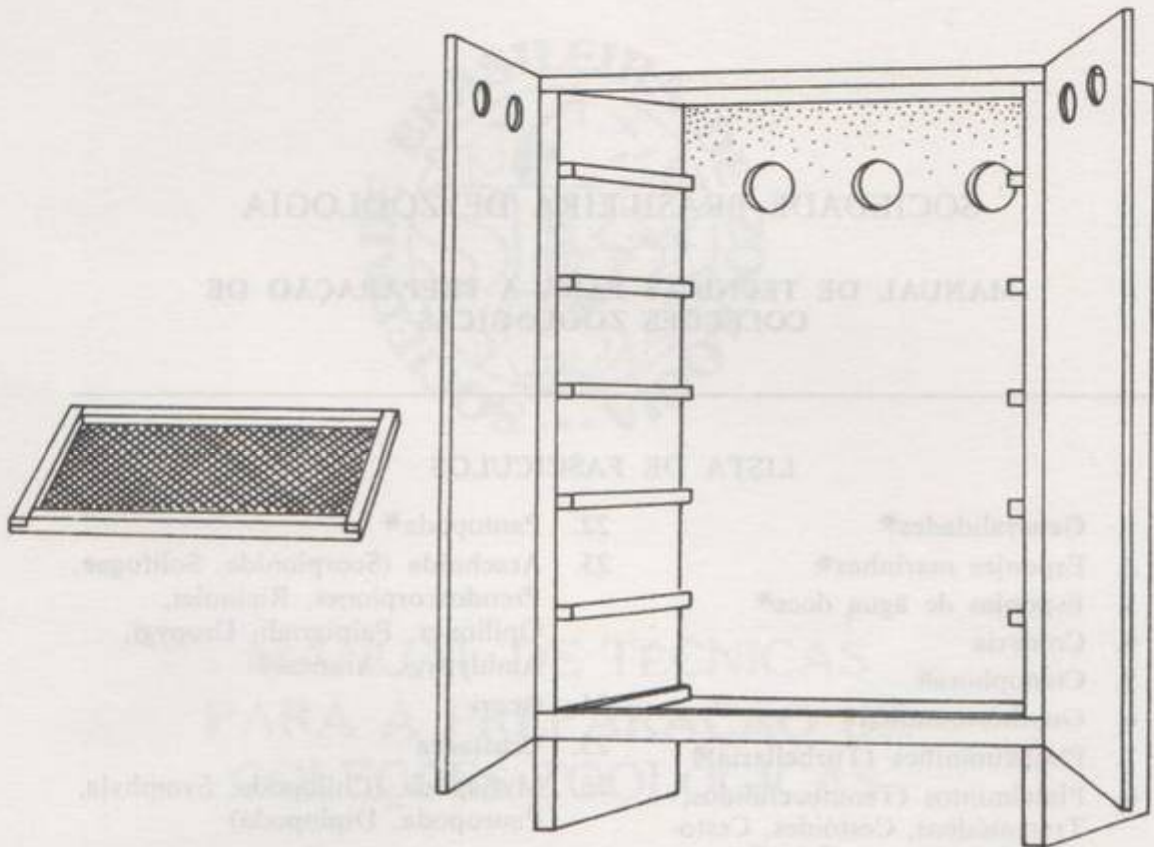


Figura 1

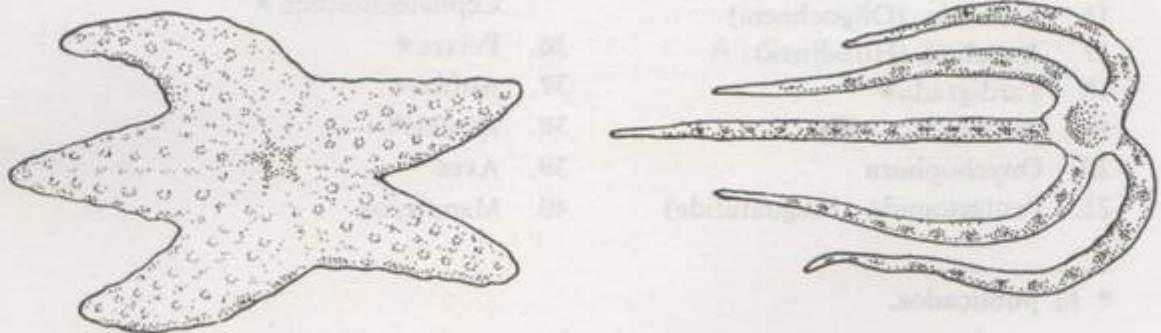


Figura 2

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA
MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

LISTA DE FASCÍCULOS

1. Generalidades*
2. Esponjas marinhas*
3. Esponjas de água doce*
4. Cnidaria
5. Ctenophora*
6. Gnathostomulida*
7. Plathelminthes (Turbellaria)*
8. Platelminthos (Temnocefálidos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários) e Acantocéfalos*
9. Nemertinea (Rhynchocoela)*
10. Rotifera*
11. Gastrotricha*
12. Cephalorhyncha (Priapulida, Nematomorpha e Kinorhyncha)
13. Nematoda
14. Entoprocta e Ectoprocta (Bryozoa)
15. Annelida (Polychaeta)*
16. Annelida (Oligochaeta)
17. Annelida (Hirudinea)
18. Tardigrada*
19. Echiura *
20. Onychophora
21. Pentastomida (Linguatulida)
22. Pantopoda*
23. Arachnida (Scorpionida, Solifugae, Pseudoscorpiones, Ricinulei, Opiliones, Palpigradi, Uropygi, Amblypygi, Araneae)
24. Acari
25. Crustacea
26. Myriapoda (Chilopoda, Symphyla, Pauropoda, Diplopoda)
27. Insetos imaturos*
28. Insetos
29. Mollusca
30. Sipuncula*
31. Phoronida*
32. Brachiopoda
33. Chaetognatha
34. Echinodermata*
35. Hemichordata, Urochordata e Cephalochordata *
36. Peixes *
37. Anfíbios
38. Répteis*
39. Aves
40. Mamíferos

* Já publicados.