



MANUAL DE TÉCNICAS
PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

9. NEMERTINEA (RHYNCHOCOELA)

DIVA DINIZ CORRÊA

Campinas, SP
1987

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

Campinas, SP

1987

9. NEMERTINEA (RHYNCHOCOELA)

DIVA DINIZ CORRÊA

A referência mais antiga a um nemertino é a breve citação de um "Sea Long-Worm" feita por William Borlase em 1758. O filo conta atualmente com cerca de 900 espécies (Gibson, 1982a), das quais apenas 15 (7 gêneros) são terrestres e 12 (6 gêneros) de água doce. A vasta maioria das espécies ocorre no mar.

Até 1948, quando teve início um estudo regular dos nemertinos brasileiros (Corrêa, 1948, 1949, 1950, 1951, 1953, 1954, 1957, 1958, 1966; Gibson, 1973; Rosas dos Santos, 1974) eram conhecidas do Brasil apenas 3 espécies de nemertinos, 1 espécie marinha, *Carcinonemertes carcinophila* var. *imminuta* Humes, 1942, do Rio de Janeiro (Humes, 1942) e 2 espécies de água doce, *Prostoma eilhardi* (Montgomery, 1894), do Paraná, São Paulo e Pará (Marcus, 1942, 1943; Corrêa, 1951) e *Siolineus turbidus* du Bois-Reymond Marcus, 1948, do Pará (Marcus, E. du B.R., 1948). Atualmente conhecem-se 42 espécies de nemertinos do Brasil, das quais 40 marinhas, de diferentes substratos; a maioria vive sobre ou entre algas, embaixo de pedras soltas, em areia grossa ou no lodo. Quase todas as espécies descritas são provenientes do litoral do Estado de São Paulo (32), principalmente do litoral norte (região de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha de São Sebastião). Pouco (9) se conhece do litoral central (Baía de Santos e arredores) e do sul (5) e praticamente nada dos outros Estados brasileiros (Bahia, 1; Rio de Janeiro, 2; Paraná, 1). Com uma extensão de cerca de 7.000 km, estendendo-se do Cabo Orange, Amapá, ao Arroio do Chuí, Rio Grande do Sul (5°N a 35°S), pode-se afirmar que a nemertofauna brasileira continua desconhecida. Este fato não é apenas local, brasileiro, mas bastante generalizado. Certas regiões que contaram no passado com especialistas interessados já são melhor conhecidas, como a costa da Califórnia, o golfo de Nápoles e outras.

Esse pequeno conhecimento do grupo talvez seja explicável pelas dificuldades envolvidas no seu estudo, principalmente considerando-se que uma identificação completa não pode prescindir do conhecimento da anatomia interna, o que depende de procedimentos técnicos trabalhosos e demorados. Um outro problema é representado pela natureza frágil do corpo dos nemertinos, que leva muitas vezes à coleta apenas de espécimens fragmentados ou incompletos (especialmente os dragados), assim que partes taxonomica-

mente importantes (região anterior, probóscida) foram perdidas. Com essas dificuldades a enfrentar, não é surpreendente que a maioria dos zoólogos prefira ignorá-los inteiramente ou apenas identificá-los como membros desse filo.

CARACTERES GERAIS EXTERNOS E INTERNOS (Gibson, 1972, 1982b)

Os nemertinos são animais vermiformes, não segmentados, medindo cerca de alguns milímetros até 30 metros de comprimento, mas a maioria mede de 20 a 30 cm. Seu corpo mole é muito elástico, dotado de grande capacidade de contração e distensão e assim o comprimento, a largura e a forma do corpo, muito variáveis, dependem dessa característica. Muitas espécies bentônicas medem menos de 1 mm de largura, sendo elípticas ou circulares em corte transversal. As espécies com corpo achatado dorsoventralmente podem medir de 6 a 8 mm de largura na região intestinal chegando, em exemplares grandes de certas espécies, a atingir até 25 mm.

A extremidade anterior do corpo é geralmente pontiaguda ou truncada, não havendo uma cabeça definida. Em alguns gêneros há um lobo cefálico, com forma variável, mas não representa uma cabeça, pois normalmente não contém o cérebro. A região anterior de muitas espécies possui sulcos cefálicos, como fendas longitudinais em ambos os lados do corpo ou como fendas transversais, em número de 1 ou 2, circundando o corpo total ou incompletamente. A região anterior também contém olhos, mas muitas espécies, principalmente nos adultos, são desprovidas de olhos. O número de olhos varia muito, tanto inter - como intraespecificamente, sendo dispostos mais ou menos bilateralmente. Nas espécies com 2 a 6 olhos o número é geralmente constante; nas outras, o número de olhos aumenta comumente com a idade e o tamanho. Muitas vezes os olhos são parcial ou totalmente invisíveis devido à pigmentação cefálica. Os olhos são geralmente pré-cerebrais, mas certos gêneros possuem também olhos pós-cerebrais.

A cor pode ser mais ou menos uniformemente branca ou creme ou em tons de vermelho, pardo, laranja, verde, amarelo, rosa ou cinza. Nas formas com cores pálidas, ou com corpo transparente, os órgãos internos (probóscida, intestino, cérebro, gônadas, órgãos cerebrais) podem ser vistos através da face dorsal, em animais ligeiramente comprimidos entre lâmina e lamínula. As mudanças de cor, surgidas durante o período reprodutivo, podem ser atribuídas aos pigmentos contidos nas gônadas maduras e diferenças entre os sexos podem levar a um dimorfismo de cores. Variações de cor na região intestinal, muito comuns, podem ser devidas ao conteúdo intestinal. Há muitos nemertinos que possuem padrões definidos de cores nas formas de faixas, listras, manchas, anéis, efeitos marmóreos, cores contrastantes, dispostos em formas geométricas, comumente mais marcados na face dorsal ou confinados à região cefálica.

A extremidade posterior do corpo geralmente estreita-se gradualmente, terminando ou não em ponta fina, às vezes provida de um cirro caudal. O ânus abre-se na extremidade posterior, terminal ou dorsal, ou na base do cirro quando este está presente.

Externamente também podem ser observadas partes de órgãos sensoriais situados internamente, como a abertura dos canais dos órgãos cerebrais, o órgão frontal e os órgãos laterais, assim como a boca, em posição ventral variável.

Entre os caracteres internos alientam-se, por sua importância taxonômica, a probóscida, o sistema vascular sanguíneo e o intestino pérvio, provido de boca e ânus separados, cujo con-

junto define um nemertino, separando-o de qualquer outro animal.

A probóscida, característica fundamental dos nemertinos e única no seu tipo no reino animal, é um tubo muscular alongado, eversível, de comprimento variável, situado dorsalmente ao intestino, dentro de uma câmara tubular com parede própria e cheia de líquido, o rincocelo. A parede da probóscida contém um número variável de camadas musculares e dois epitélios, um voltado para a luz da própria probóscida e o outro para a luz do rincocelo. A extremidade posterior da probóscida é cega e presa à parede do rincocelo por um músculo retrator e a extremidade anterior comunica-se com a extremidade interna de outro tubo, o rincodeo. Este abre-se na parte anterior do corpo por um poro, o poro do rincodeo. Em certos nemertinos a boca é interna, situada na parede do rincodeo. Em outros, a boca e o poro do rincodeo são externos e separados. A probóscida pode ser armada ou não. A probóscida armada é dividida em três regiões: a câmara anterior, a câmara armada e a câmara posterior. A câmara armada contém o estilete principal, um espinho reto ou curvo, de tamanho variável, liso ou com marcas, montado sobre uma base, com forma e dimensões variáveis. Em ambos os lados do estilete principal há duas ou mais bolsas que contêm um número variável de estiletos acessórios. Certos nemertinos possuem numerosos estiletos principais, colocados sobre uma base de forma variável e numerosas bolsas com estiletos acessórios. A probóscida não armada não é dividida anatomicamente em regiões.

COLETA

"One usually does not set out to collect nemerteans, but, rather, picks up occasional specimens as they are found. When the worm is located, grasp it to prevent its escape but do not pull it" (Knudsen, 1966).

Naturalmente o especialista interessado "does set out" para coletar nemertinos, independentemente das muitas dificuldades envolvidas.

Os nemertinos vivem principalmente no mar, em todos os mares, do Ártico ao Antártico e nos mais variados ambientes marinhos. A maioria das espécies é bentônica, ocorrendo nas zonas entre-marés ou sub-litorais, mas há um grupo de nemertinos batipelágicos, oceânicos, das grandes massas de água. São porém pouco comuns; ainda não foram encontrados em água mais rasa e também não em águas brasileiras. Outros tipos incomuns de nemertinos podem ser mencionados. As espécies do gênero *Carcinonemertes*, já conhecido do Brasil, vivem principalmente no interior de massas de ovos de braquiuros (várias espécies de caranguejos e siris), parecendo ser um parasito verdadeiro, pois se alimenta de ovos e embriões de seus hospedeiros. As espécies do gênero *Malacobdella* vivem numa relação ectocomensal na cavidade do manto de moluscos bivalvos mas, apesar de intensas buscas, ainda não foram encontradas no Brasil; possuem forma de sanguessuga e são os únicos nemertinos com ventosa ventral posterior; a sua procura pode ser feita em moluscos vivos, tarefa difícil, devido à necessidade de abrir as valvas, ou em moluscos fixados, com valvas já abertas, mas então os nemertinos já estarão também fixados. Os nemertinos terrestres, gêneros *Geonemertes* e outros, também bastante procurados mas ainda não encontrados no Brasil, vivem em lugares úmidos, com alta umidade do ar e fraca luminosidade, entre restos de folhas mortas, embaixo de troncos de árvores caídas e em decomposição. Eles ocorrem desde o nível de maré baixa até 1.200 m de altitude. Algumas espécies de nemertinos vivem em água doce de

rios, lagos e tanques.

As técnicas de coleta que serão descritas, abrangendo todo o processo, desde o achado dos vermes até a sua conservação, constituem principalmente resultado da experiência da autora, a qual coincide, em termos gerais, com a experiência de outros autores que se referem ao assunto em seus trabalhos de pesquisa ou em trabalhos especiais sobre coleta (Knudsen, 1966; Kirsteuer, 1967; Lincoln & Sheals, 1979; Gibson, 1982b). São todas técnicas muito simples, que exigem equipamento modesto e de baixo custo e que foram usadas na coleta das espécies brasileiras já descritas. Também foram incluídas formas de trabalho com os vermes vivos coletados, como anestesia, fixação e conservação apropriadas, a fim de que venham a constituir bom material para estudos de valor. Incluí também orientação sobre o registro dos caracteres dos animais vivos, como confecção de desenhos, acompanhados de descrições simples desses caracteres. A coleta de nemertinos requer muito cuidado e paciência se quisermos obter espécimes completos, com a probóscida invertida; em geral, não compensa manter material danificado.

A Coleta de nemertinos que vivem em algas

A coleta de nemertinos que vivem em algas, animais geralmente pequenos, faz-se coletando primeiro as algas. Esta coleta pode ser feita com maré alta mas é preferível fazê-la com maré baixa, o que facilita o trabalho pela ausência de ondas no local. O primeiro passo é localizar as algas e escolher o seu tipo. Elas devem ter ramificações densas ou crescimento em forma de crostas espessas e não fortemente aderentes ao substrato. Estes tipos de algas oferecem abrigo seguro contra o contínuo deslocamento dos animais pelas ondas e nelas vivem geralmente outros animais que servem de alimento para os nemertinos. Escolher muito bem os tufo ou crostas, coletá-los cuidadosamente e nunca em excesso, o que pode ser um desperdício inútil e ainda complicar o longo e trabalhoso processo que se segue quando o número de animais encontrados é grande. É sempre preferível um pequeno número de animais bem coletados e bem preparados a muitos animais coletados apressadamente e muitas vezes imprestáveis para as finalidades propostas. Com as próprias mãos, deslocam-se os tufo ou crostas de algas, postos em baldes pequenos de plástico (2 litros), que são então fechados. Se as algas estiverem submersas, esta operação deve ser feita rapidamente para impedir que os animais possivelmente existentes sejam levados pela água do mar. Os baldes contendo as algas, mas apenas com a água que escorreu naturalmente das algas, são agora transportados para o laboratório ou outro local onde possa ser montada a segunda parte da coleta. Toma-se uma bacia ou cuba de plástico e nela coloca-se água do mar quase até a borda. Em seguida desfazem-se os tufo ou crostas de algas diretamente sobre a água, onde são colocados os fragmentos e nunca em excesso. Isto feito, cobre-se a cuba totalmente com um pano preto grosso para impedir que a luz penetre. A cuba deve ser descoberta a primeira vez cerca de uma hora após a sua montagem. Enquanto se espera examina-se a água que escorreu das algas dentro dos baldes de transporte para verificar se há aí algum nemertino. Ao descobrirmos a cuba, veremos que na superfície da água ou na sua borda há geralmente um grande número de pequenos animais (poliquetos, crustáceos, moluscos, policládidos, opistobrânquios, pantópodos) e também possivelmente nemertinos. Esses animais foram obrigados a deixar os seus esconderijos entre as algas pelas mudanças das condições ambientais, migrando para a superfície. Deve-se então iniciar a retirada dos nemertinos e o procedimento dependerá do seu tamanho. Os pequenos são aspirados com

um conta-gotas de abertura larga e os grandes são colhidos com um pincel. São então colocados, se possível individualmente, em vidros de relógio contendo água do mar. Se houver muitos animais montam-se pequenos aquários provisórios em placas de vidro, com água do mar e alguns fragmentos de algas que servirão de substrato para os animais. Estes, mantidos muito tempo sem abrigo, locomovem-se continuamente, "cansam-se" e secretam quantidades excessivas de muco, principalmente em altas temperaturas e podem se tornar imprestáveis. Após a retirada dos animais, a cuba deve ser novamente coberta e esperada mais uma hora para novo descobrimento e assim sucessivamente, até que se esgote a fauna de nemertinos nessa "armadilha fisiológica". Sempre que possível, o conteúdo do restante da cuba deve ser devolvido ao mar. Muitos animais que não interessavam no momento permanecem vivos e podem ser recuperados no seu habitat natural. A técnica descrita pode ser aplicada a qualquer substrato que possa conter nemertinos, como outras plantas marinhas, mexilhões, ostras, blocos mortos de corais, crostas de animais sedentários e mesmo pequenas pedras contendo crescimentos variados, devendo-se reduzir todos a pequenas porções para facilitar a saída dos vermes. Todos os tipos de substratos podem ser coletados diretamente ou, havendo condições (conhecimento e equipamento apropriado), por mergulho, com a vantagem de conseguir amostras mais profundas. Estas devem ser colocadas, ainda debaixo da água, rapidamente, em sacos plásticos, impedindo que a água carregue os nemertinos porventura existentes. Um arranjo diferente é descrito por Kirsteuer (1967). Um recipiente retangular de vidro, com 30 litros de capacidade, mais alto que largo, é preenchido até cerca de 2/3 com algas e água é acrescentada até atingir 5 cm acima do nível superior das algas, que devem ser mantidas submersas com auxílio de varetas de madeira. O recipiente, que não precisa ser arejado, é mantido em um lugar fracamente iluminado ou no escuro, mas um canto dele deve ser mantido exposto à luz natural ou artificial. A atividade respiratória de todos os animais presentes continua e é mesmo intensificada pelo aumento da temperatura da água, o que gradualmente reduz o nível do oxigênio dissolvido na água e a fraca iluminação impede que isto seja restaurado através da fotossíntese das algas. Ao mesmo tempo a concentração de dióxido de carbono na água aumenta. O comportamento dos nemertinos é afetado pelas condições crescentemente adversas da água. Em condições normais as respostas são em geral positivamente geotáticas e negativamente fototáticas, mas aqui são invertidas e em resultado eles saem das algas, dirigem-se para cima e reúnem-se na superfície da água, no canto iluminado do recipiente. A montagem deve ser controlada regularmente cada 15 a 30 minutos e qualquer nemertino presente deve ser retirado. A amostra está geralmente esgotada depois de 1 a 4 dias. Cuidado deve ser tomado para que a temperatura da água não suba muito rapidamente. Quando isto acontece, o ritmo de diminuição do oxigênio pode ser tão rápido que os animais são asfixiados antes que possam atingir a superfície da água. O método da diminuição do oxigênio dessa montagem também pode ser aplicado a outros tipos de substratos que possam abrigar nemertinos. A superfície desses substratos deve ser examinada para procura de eventuais espécimens grandes e fragmentos com mais de 10 cm de diâmetro devem ser reduzidos antes de colocá-los na água do recipiente.

Coleta de nemertinos que vivem embaixo de pedras soltas

Os nemertinos que vivem embaixo de pedras soltas podem ser animais relativamente grandes, facilmente localizados. Tendo-se encontrado um bom número de pedras soltas, na faixa entre-

-marés ou abaixo, inicia-se a procura dos animais. Isto também é facilitado com a maré baixa, que descobre locais menos acessíveis com maré alta. As pedras são levantadas e examinada a sua face inferior. Se for constatada a presença de nemertinos, eles devem ser cuidadosamente removidos com um pincel pequeno e colocados em pequenos frascos de plástico, sem água, mas com tufo de algas, que então são fechados e colocados em um balde de plástico ou sacola própria para transporte. Nunca colocar no mesmo frasco um número muito grande de animais se possível, colocá-los individualmente. A pedra deve ser recolocada na posição exata em que estava, para que não se perturbem e não se destruam outros animais nela existentes. Pedras abandonadas, com a face inferior para cima, geralmente perdem toda a sua fauna por dessecação, durante as horas de maré baixa e o repovoamento da face oposta pode levar meses a anos. No momento em que se levantam as pedras, verifica-se o comportamento fototático negativo dos nemertinos, que deslizam rapidamente para a outra face à procura de sombra. Chegando-se ao laboratório colocam-se os animais em vidros de relógio ou placas de vidro, com água do mar e tufo de algas. Naturalmente podem ser procurados nemertinos em outros tipos de substratos soltos, como blocos de corais mortos ou mesmo objetos não naturais lançados ao mar, como pedaços de tijolos, telhas, garrafas ou latas de cerveja.

Coleta de nemertinos que vivem em areia grossa

A coleta de nemertinos que vivem em areia grossa da região entre-marés, principalmente as espécies do gênero *Ototyphlonemertes*, cegas mas providas de estatocistos, bastante pequenas (1-10 mm) e delicadas, é feita da seguinte maneira. Encontrando-se uma praia com areia grossa passa-se à procura dos animais. Como eles vivem nas microcavernas entre os grãos de areia, estes devem ter um certo diâmetro (2-5 mm), abaixo do qual os espaços entre eles são pequenos demais para conter os animais. Recolhe-se uma porção da areia molhada (200-300 cc), a profundidades de 5-20 cm, colocando-a em uma bacia ou cuba de plástico, com pouca água do mar. Se o recipiente for transparente, é recomendável pintá-lo de preto, pois os vermes, sendo claros, são mais facilmente vistos contra um fundo escuro. Ao trabalhar no mar nunca use recipientes de vidro e também não objetos cortantes e pontiagudos como facas, facões, canivetes, etc. A seguir, inclina-se o recipiente de modo a acumular toda a areia em um só ponto, próximo à borda. Volta-se então o recipiente à posição horizontal, que é então inclinado na direção oposta à ocupada pela areia, que deve ser mantida no seu lugar. Acrescenta-se água até atingir a borda da areia, mas sem ultrapassá-la. Após um curto tempo, podemos ver surgindo da areia pequenos animais filiformes, geralmente turbelários e nemertinos, que se dirigem para a água. Com alguma experiência, os nemertinos são facilmente reconhecíveis e podem ser retirados com um conta-gotas e colocados em pequenos frascos com água para o transporte. Esta técnica pode ser aplicada na própria praia ou várias amostras de areia podem ser levadas em frascos ou sacos plásticos para o laboratório e aí mais comodamente montados vários recipientes inclinados, apoiados em um suporte adequado. Uma técnica auxiliar de coleta de nemertinos de areia e a de isca gem. Colocam-se alguns peixes mortos sobre a areia molhada, em vários pontos da linha de descida da água, na maré vasante e sobre eles uma pedra para mantê-los em seus lugares. Após cerca de 1 hora, sempre antes que a maré suba, afasta-se o peixe e recolhe-se a areia que estava embaixo dele. Passa-se então à técnica do recipiente inclinado. Os nemertinos de areia grossa são mais resistentes que os de algas, tendo sido mantidos dentro da areia, no

laboratório, sem arejamento e sem alimentação, além daquela eventualmente aí existente, durante cerca de 6 meses.

Kirsteuer (1967) sugere três métodos para obtenção de nemertinos de areia: 1) a amostra de areia é colocada em um recipiente alto, cilíndrico, com água cerca de 3 vezes o volume da areia que é então fortemente agitada. Quando a areia estiver quase sedimentada despeja-se a água, com os animais em suspensão, em uma rede de plâncton e então transferem-se os animais para placas de vidro. Repete-se a operação de 4 a 5 vezes para cada amostra. 2) A amostra é tratada como acima, substituindo-se a água do mar por uma solução de cloreto de magnésio em água de torneira. 3) Colocar a areia em cilindros de vidro de 2 a 3 litros de capacidade e água do mar até um nível de 1 cm acima da superfície da areia. Deixar em repouso durante 3 a 5 dias e, se houver animais, eles surgirão na camada superficial de 1 cm de areia de onde são retiradas pequenas amostras e então examinadas na lupa binocular.

Coleta de nemertinos que vivem no lodo

Os nemertinos que vivem no lodo podem ser colhidos pela técnica de peneiramento. Amostras de lodo, recolhidas diretamente com uma caneca, ou dragadas em regiões mais profundas, são postas em pequena quantidade sobre uma peneira com malhas suficientemente largas para facilitar a sua saída na lavagem com água do mar, mas não permitindo a saída dos animais. Pode-se também usar um conjunto de peneiras superpostas com malhas de tamanho diferente, mais isto complica o processo e não tem sido útil para a coleta de nemertinos. Os animais são retirados com um pincel e colocados em frascos sem água, mas com alguns fragmentos de algas. Este processo de peneiramento, antigo e ainda muito usado para coleta de vários tipos de animais, tem o inconveniente de danificar os nemertinos e ocasionar facilmente a sua perda. Um método mais aconselhável, principalmente para pequenos nemertinos, é o da sedimentação do lodo. Este é colocado, imediatamente após a tomada de amostras, em cubas rasas, em forma de bandejas, sendo então lavado delicadamente com água do mar para desfazer possíveis blocos de lodo, deixando-o bem homogêneo. É então deixado em repouso para sedimentar em uma camada que não deve ultrapassar 15 cm de espessura e coberta com apenas cerca de 2 cm de água. Todos os possíveis objetos grandes, como pedras, artefatos humanos, invertebrados grandes, devem ser retirados. Quando a água estiver clara, procuram-se os nemertinos, que geralmente aparecem após 24 horas na superfície do lodo, principalmente na borda da bandeja. Se surgirem outros animais (poliquetos, crustáceos, moluscos) eles devem também ser removidos para não perturbarem a camada superficial de lodo. Quando encontrados, os nemertinos são apanhados com um conta-gotas ou pincel, dependendo do seu tamanho. O exame da amostra deve ser repetido após 24-36 horas, mas geralmente após 2 dias não são encontrados mais nemertinos. Tomam-se então pequenas amostras da camada de 3-10 cm do lodo superficial, que são colocadas em placas de vidro e examinadas na lupa binocular. A amostra principal provavelmente está esgotada se não aparecerem mais nemertinos nas amostras pequenas. Se houver espécimes, então a amostra total pode ser novamente agitada, deixada repousar e examinada após 24 horas. Um segundo tratamento da amostra só é recomendável se não houver indicações de decomposição orgânica. Esta técnica também pode ser aplicada à areia ou à areia lodosa.

Coleta de nemertinos de água doce

Os nemertinos de água doce (gênero *Prostoma*) devem ser procurados principalmente em plantas aquáticas (*Salvinia*, aguapé

e muitas outras), embaixo de pedras soltas ou outros objetos que possam ser levantados, e também no lodo, em tanques, lagos, rios ou qualquer outro tipo de local com água doce e plantas aquáticas. São animais pequenos, que exigem muita atenção para a sua localização. Muitas vezes são encontrados em recipientes de laboratório, onde foram postas as plantas aquáticas, com lodo e água do mesmo local. O primeiro achado brasileiro foi em amostras de lodo (Marcus, 1942). Os dois seguintes (Marcus, 1943) foram em amostras de lodo e plantas aquáticas (raízes de aguapé), de um córrego de fundo lodoso e água turva e de lodo com plantas aquáticas de um córrego pedregoso e limpo. Têm aparecido regularmente em tanques com plantas aquáticas e lodo existentes ao redor dos prédios do Instituto de Biociências (USP), na Cidade Universitária, São Paulo.

Naturalmente, há técnicas de coleta mais aperfeiçoadas, adotadas quando se pretende obter dados quantitativos de populações de determinada espécie para observações ecológicas ou ciclos reprodutivos (Young & Gibson, 1975; Gibson & Young, 1976).

ANESTESIA E FIXAÇÃO

Para a obtenção de animais bem distendidos, não fragmentados, com a probóscida retraída no corpo, sem rupturas da parede do corpo, não devemos nunca subestimar a necessidade de anestesia antes da fixação. Ela é sempre necessária, não apenas para animais grandes, então indispensável, mas também para animais medindo menos de 4 a 5 cm de comprimento, pois muitas espécies comportam-se mal durante a fixação sem prévia anestesia. Os anestésicos em geral têm o inconveniente de lesar parcial ou totalmente a delicada epiderme destes animais; mas, sendo cuidadosamente aplicada, isto pode ser contornado e, em qualquer caso, ainda é preferível em relação às outras desvantagens.

Os métodos mais comumente usados são os seguintes: por imersão do verme em solução anestésica, relativamente inócua e de resultados bastante satisfatórios, cuja fórmula, de fácil preparação, é composta de 25 g de cloreto de magnésio dissolvidos em 250 cc de água do mar + 250 cc de água doce de torneira. O animal deve ser completamente coberto com a solução e a cuba deve ser mais longa que o animal, pois este distende-se durante a anestesia. O tempo é variável, mas geralmente vai de 10 minutos a 2 horas. Animais que não reagem mais ao toque com um pincel estão anestesiados. Outro processo é o da adição à água do mar, onde se encontra o verme, de cristais de uretana, hidrato de cloral ou mentol, todos muito satisfatórios. O verme é colocado em uma placa de vidro grande, para conter suficiente água do mar (para um verme com 5 cm de comprimento são necessários 300 cc de água do mar), sendo então acrescentados alguns cristais de um dos anestésicos mencionados, gradualmente, sobre a água, a cada 10 minutos aproximadamente. O tempo necessário também é variável, mas geralmente após 30 minutos a 2 horas o animal estará relaxado. Se surgir algum problema, como contração do corpo, enrolamento ou eversão parcial da probóscida, devolve-se o animal para a água do mar, para recuperação e então repete-se a anestesia, usando menos anestésico. Moretto (1966) aconselha, para se obter um relaxamento rápido dos nemertinos, o uso de sulfato de manganês monohidratado, em solução em água do mar do local, filtrada em papel de filtro, com a concentração de 2%. Colocar os animais individualmente em placas de Petri com 50 ml da solução e a anestesia processa-se após 20 a 30 minutos.

Um fixador simples, de fácil preparação e que dá bons

resultados, é o formol de 5 a 10%. Para a fixação, se o animal for grande, despeja-se todo o anestésico, distende-se bem o animal e acrescenta-se o fixador a frio, até cobrir o verme por completo. Se os animais forem pequenos pode-se transferi-los diretamente com um conta-gotas para o fixador. Eventualmente pode-se tentar a fixação de pequenos nemertinos, até 2 a 3 cm de comprimento, sem anestesia, mas com formol aquecido a cerca de 60°C. Colocam-se os animais em um vidro de relógio com água do mar e pacientemente esperamos os animais deslisarem até atingirem seu comprimento máximo. Isto torna-se mais fácil se for feito individualmente, mas é uma tarefa trabalhosa e demorada. Enquanto isso, coloca-se o formol em um tubo de ensaio e inicia-se o seu aquecimento, podendo-se usar uma lâmpada a álcool ou mesmo uma vela de cera. Quando o formol começar a fazer ruído de fervura próxima e se o animal estiver bem distendido, retira-se cuidadosamente a água do mar com um conta-gotas, deixando apenas o suficiente para que o animal continue a deslizar. Despeja-se então o formol aquecido sobre o animal, surpreendendo-o na sua totalidade, motivo pelo qual é desaconselhável para nemertinos grandes não anestesiados. A frio ou a quente, deve-se fixar simultaneamente o menor número possível de animais e, preferivelmente, principalmente se forem grandes, um de cada vez. Os animais devem permanecer no fixador de 3 a 5 horas e depois podem ser transferidos para o álcool 70%, que é o líquido conservador usual. O formol não deve ser usado para nemertinos que possuem estiletos e do qual não foi feito um desenho prévio do animal vivo, pois ele tem o inconveniente de dissolver os estiletos.

Um dos melhores fixadores para nemertinos é o líquido de Bouin (75 partes de ácido pícrico em solução saturada, 25 partes de formol, 5 partes de ácido acético glacial), que mata o animal e fixa as estruturas dos tecidos em condições muito boas para futuros estudos histológicos. Animais pequenos, até 10 mm, devem ficar no fixador de 3 a 5 horas; os maiores, de 12 a 24 horas. Os espécimes são conservados em álcool 70%, o qual deve ser renovado periodicamente, enquanto ficar amarelo, devido ao ácido pícrico. O líquido de Bouin também não é apropriado para nemertinos com estiletos.

Outro fixador excelente é o líquido Susa, mas a sua preparação e os procedimentos que se seguem à fixação são mais complicados que os anteriores. A sua composição é: 45 g de cloreto de mercúrio, 5 g de cloreto de sódio, 800 ml de água destilada, 20 ml de ácido tricloroacético, 40 ml de ácido acético glacial e 200 ml de formol comercial. O cloreto de mercúrio (sublimado corrosivo) é extremamente venenoso e sua solução saturada assemelha-se à água, é inodora e não deve ser aspirada ou entrar em contato com a pele ou com instrumentos de aço, pois tem ação corrosiva. A fixação pode ser feita a frio ou a quente, deixando os animais no fixador durante 3 a 24 horas e, a fim de remover precipitados de mercúrio dos tecidos, deve-se transferir o animal para o álcool 70% e pingar algumas gotas de lugol (3 g de solução de iodo + 6 g de iodeto de potássio + 300 ml de álcool 70%), várias vezes e então conservar o animal em álcool 70%.

ASPECTOS GERAIS DO ESTUDO DOS ANIMAIS

Embora muitas espécies de nemertinos possam ser identificadas com segurança na base dos seus caracteres externos, isto só é possível se os animais foram vistos em vida. Frequentemente os espécimes, como os obtidos de amostras dragadas, já estão fixados e nesses casos estudos histológicos são essenciais. De fa

to, esse procedimento é aconselhável sempre se o pesquisador tiver o tempo necessário, entusiasmo e instalações, seja começando com espécimes vivos ou com fixados.

Para finalidades de pesquisa, principalmente de sistemática, é importante o registro completo dos caracteres em vida e, em formas pequenas e transparentes, também os internos. Este é um processo trabalhoso e raramente conseguido por pessoas não especialistas do grupo que, algumas vezes bem intencionadas, colocam o animal vivo diretamente no álcool, com resultados sempre desastrosos. Além da autonomia e eversão da probóscida, as cores e desenhos perdem-se rapidamente e faltam várias informações sobre os aspectos externos e internos. O conhecimento dos caracteres externos registrados em vida é de grande valor quando se realizam estudos ecológicos no mar, pois possibilita uma rápida identificação, o que é impossível quando apenas os caracteres internos são conhecidos. O ideal é combinar o estudo dos dois aspectos, o externo e o interno.

O registro dos caracteres externos, assim como detalhes importantes das estruturas internas, devem ser feitos através de um desenho, com todas as anotações possíveis e de um caderno de registros, onde é mencionado tudo o que não comportava no desenho. Para fazer um desenho de um nemertino não são necessários grandes dotes artísticos ou muito tempo. Faz-se um esboço do contorno do animal, já anestesiado, a lápis, com as proporções comprimento-largura exatas, em uma folha de papel branco e acrescentam-se todos os caracteres reconhecíveis, como número e disposição dos olhos, sulcos cefálicos, listras, anéis ou outros desenhos. As cores devem ser mencionadas ao lado do desenho ou, se houver tempo, seria interessante pintá-las com lápis em cores. As dimensões também devem ser anotadas, como comprimento em fase distendida e largura máxima, assim como qualquer comportamento que o animal apresentar, como forma de locomoção, enrolamento, sensibilidade ao toque e outros. Cada desenho recebe um número, naturalmente o mesmo que acompanhará o espécime ou espécimes conservados e o registro dos caracteres no caderno de registros.

Para o estudo dos caracteres internos, que podem ser acrescentados no desenho, como probóscida, rincocelo, cérebro, órgãos cerebrais, gônadas, intestino, visíveis através da face dorsal do corpo, devemos fazer uma lâmina com o verme vivo. Coloca-se o animal entre lâmina e lamínula, com bastante água do mar e cuidadosamente comprime-se a lamínula até obter um achatamento satisfatório, com aumento da transparência, mas sem romper o espécime. Animais anestesiados são mais próprios para este exame. Isto pode ser aperfeiçoado, suportando-se a lamínula com pequenos pedaços de cera de abelha, nos 4 cantos, recomendável sempre que o número de espécimes for pequeno. Muitas vezes este procedimento é impossível, devido ao tamanho dos vermes ou cores muito escuras, mas o conhecimento dos caracteres do estilete é indispensável. Provoca-se, nesse caso, com algumas gotas de álcool, a eversão da probóscida, que é sempre transparente e pode ser facilmente comprimida entre lâmina e lamínula.

Muitos caracteres internos importantes podem também ser reconhecidos em preparações de vermes totais, o que só é possível em animais pequenos. Coram-se os vermes hidratados com paracarmim, durante 5 a 10 minutos. Lava-se a peça várias vezes em álcool 50% e então passa-se a diferenciá-la com álcool clorídrico. Quando o animal estiver rosa claro, é novamente lavado; a seguir, é desidratado nos álcoois 70, 80, 96 e absoluto. Coloca-se em óleo de cravo ou creosoto para torná-lo transparente e monta-se a lâmina total em bálsamo do Canadá ou se inclui o espécime para confecção de cortes.

A morfologia interna é estudada e entedida a partir de

cortes transversais seriados. Espécimes pequenos (10 mm ou menos de comprimento) podem ser cortados totalmente (recomenda-se cera de parafina com ponto de fusão a 56°C), mas com animais maiores o comprimento torna impraticável cortá-los na totalidade. Nestes casos, toda a extremidade anterior do corpo (até o fim do intestino anterior) deve ser cortada, juntamente com alguns setores representativos do restante do corpo, tomados em intervalos regulares (a cada 5 cm se for um animal com 30 a 40 cm de comprimento). Os cortes devem ter espessura de cerca de 10 micrômetros.

O corante tricrômico de Mallory, embora de aplicação difícil, tem sido usado com bom resultado para distinguir os vários tecidos do corpo. Outros métodos como o Azan ou o Masson fornecem resultados comparáveis, mas tomam mais tempo. É comumente interessante corar alguns cortes com azul Alcian 1%, contraindicados com eosina ou fucsina ácida, pois salientam muito bem as glândulas secretoras de muco da epiderme, derme, região cefálica e intestino.

O método clássico, mais simples, da hematoxilina-eosina, dá resultados muito bons para estudos topográficos dos órgãos e também histológicos, se não houver necessidade de grande refinamento.

REFERÊNCIAS

- Corrêa, D. D. 1948. *Ototyphlonemertes* from the Brazilian Coast. *Comm. zool. Mus. Hist. nat. Montev.* **49** (2): 1-12.
- Corrêa, D. D. 1949. Ecological study of Brazilian *Ototyphlonemertes*. *Comm. zool. Mus. Hist. nat. Montev.* **55** (3): 1-7.
- Corrêa, D. D. 1950. Sobre *Ototyphlonemertes* do Brasil. *Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo (zool.)* **15**: 203-234.
- Corrêa, D. D. 1951. Freshwater Nemertines from the Amazon Region and from South Africa. *Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo (zool.)* **16**: 257-270.
- Corrêa, D. D. 1953. Sobre a neurofisiologia locomotora de hoplonemertinos e a taxonomia de *Ototyphlonemertes*. *Anais Acad. bras. Ciênc.* **25** (4): 545-555.
- Corrêa, D. D. 1954. Nemertinos do Litoral Brasileiro. *Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo (zool.)* **19**: 1-110.
- Corrêa, D. D. 1957. Nemertinos do Litoral Brasileiro VI. *Anais Acad. bras. Ciênc.* **29** (2): 251-271.
- Corrêa, D. D. 1958. Nemertinos do Litoral Brasileiro VII. *Anais Acad. bras. Ciênc.* **29** (3): 441-455.
- Corrêa, D. D. 1966. A New Hermaphroditic Nemertean. *Anais Acad. bras. Ciênc.* **38** (2): 365-369.
- Corrêa, D. D. (pronto para o prelo). *9 Nemertini*. Manual de Identificação de Invertebrados Límnicos do Brasil. Publicação do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Gibson, R. 1972. *Nemerteans*. Hutchinson, London.
- Gibson, R. 1973. A new littoral hoplonemertean (*Divanella evelinae* gen. et sp. nov.) from the coast of Brazil. *Bull. Mar. Sci.* **23**: 793-810.
- Gibson, R. 1982a. Nemertea. In *Synopsis and Classification of Living Organisms*, vol. 1 ed. S.P. Parker, pp. 823-824. McGraw-Hill, New York.
- Gibson, R. 1982b. *British Nemerteans*, Cambridge University Press.
- Gibson, R. & Young, J. O. 1976. Ecological observations on a population of the freshwater hoplonemertean *Prostoma jenningsi* Gibson & Young, 1971. *Arch. Hydrobiol.* **78**: 42-50.
- Humes, A. G. 1942. The morphology, taxonomy, and bionomics of the nemertean genus *Carcinonemertes*. *Ill. biol. Monogr.* **18**: 1-105.

- Kirsteuer, E. 1967. Marine, benthonic nemerteans: how to collect and preserve them. *Am. Mus. Novit.* 2290: 1-10.
- Knudsen, J. W. 1966. Biological Techniques. Collecting, Preserving, and Illustrating Plants and Animals. A Harper International Ed.
- Lincoln, R. J. & Sheals, J. G. 1979. Invertebrate Animals. Collection and Preservation. British Museum (Natural History). Cambridge University Press.
- Marcus, E. 1942. Sobre um nemertino d'água doce do Brasil. *Anais Acad. bras. Ciênc.* 14: 371-383.
- Marcus, E. 1943. Novos achados de nemertinos límnicos. *Anais Acad. bras. Ciênc.* 15: 11-17.
- Marcus, E. du B. R. 1948. An Amazonian heteronemertine. *Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo* 13: 93-109.
- Moretto, H. 1966. Una substancia relajante para el phylum Nemetes. *Physis* 26 (71): 224.
- Rosa dos Santos, E. 1974. Nemertinos (Heteronemertini e Hoplonemertini) do Brasil (Estado de São Paulo). Dissert. Mestr. Zool. Univ. S. Paulo, 1-61.
- Young, J. O. & Gibson, R. 1975. Some ecological studies on two populations of the freshwater hoplonemertean *Prostoma eilhardi* (Montgomery, 1894) from Kenya. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 2803-2810.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

LISTA DE FASCÍCULOS

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

* Já publicados.