

VOLUME 5, NÚMERO 1, OUTUBRO 2004

ISSN 1519-1982

# ***BIOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL***



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

SÃO CRISTÓVÃO

**BIOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

**REITOR:** Josué Modesto dos Passos Subrinho

**VICE-REITOR:** Angelo Roberto Antonioli

**COMISSÃO EDITORIAL (UFS)**

Celso Morato de Carvalho  
(Editor)

Jeane Carvalho Vilar  
(Co-editor)

Carlos Dias da Silva Júnior

Clóvis Roberto Pereira Franco

Adauto de Souza Ribeiro

Angelo Roberto Antonioli

**COMISSÃO EDITORIAL ASSOCIADA**

Adriano Vicente – Universidade Federal  
de Pernambuco, UFPE

Edson Fontes de Oliveira – Universidade  
Estadual de Maringá/Nupelia

Everton Amancio – Conselho Nacional  
de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico, CNPq

Francisco Filho de Oliveira –  
Universidade Federal da Paraíba,  
UFPB

**COMISSÃO DE REDAÇÃO**

Celso Morato de Carvalho

Jeane Carvalho Vilar

Everton Amâncio

*Biologia Geral e Experimental* é indexada nas Bases de Dados: Latindex, Biosis Previews, Biological Abstracts e Zoological Record.

ENDEREÇO/ADDRESS: *Biologia Geral e Experimental*, Departamento de Biologia – Universidade Federal de Sergipe.  
Av. Mal. Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, Se; CEP 49100-000; e-mail: jcvilar@bol.com.br ou  
cmorato@bol.com.br.

Aceita-se permuta/Exchange is accepted.

## SUMÁRIO

---

Biol. Geral Exper., São Cristóvão-SE, vol. 5, num. 1

---

30.x.2004

- Morphological variation of *Montastrea cavernosa* and *Siderastrea stellata* (Cnidaria: Scleractinia) from the states of Maranhão, Paraíba and Pernambuco, Brasil. 5 – 11  
*Michelle Gomes Santos, Fernanda Maria Duarte do Amaral, Fabrício Bezerra de Sá & Maria da Glória Abage de Lima*
- Cardiovascular effect induced by the essential oil of *Ocotea duckei* vattimo in rats. 12 – 18  
*Renildo Moura da Cunha, Silvia Renata Queiroz de Farias, José Crispim Duarte, Márcio Roberto Viana dos Santos, Êurica Adélia Nogueira Ribeiro & Isac Almeida de Medeiros*
- Echinodermata da Bacia de Camamu, Bahia, Brasil. 19 – 25  
*Cynthia Lara de Castro Manso*
- Emprego de *Poecilia vivipara* e *Artemia salina* para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. 26 – 29  
*Edison Barbieri*
- Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). 30 – 33  
*Marlucia Cruz de Santana & Silvio Lopes Teixeira*

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 5 (1): 5-11

30.x.2004

MORPHOLOGICAL VARIATION OF *MONTASTREA CAVERNOSA* AND *SIDERASTREA STELLATA* (CNIDARIA: SCLERACTINIA) FROM THE STATES OF MARANHÃO, PARAÍBA AND PERNAMBUCO, BRASIL

Michelle Gomes Santos<sup>1</sup>

Fernanda Maria Duarte do Amaral<sup>2</sup>

Fabrcio Bezerra de Sá<sup>3</sup>

Maria da Glória Abage de Lima<sup>4</sup>

## ABSTRACT

In this study we examined the skeletal morphometry of five populations of the corals *Montastrea cavernosa* and *Siderastrea stellata* from the northeastern coast of Brasil. The colony shape of *S. stellata* from the state of Maranhão is predominantly flattened and the corallite diameter and columellar distance varied significantly among the populations of both species. The number of septa varied significantly in *S. stellata*. This variations may reflect the colonies' adaptations to different levels of sedimentation and different light conditions, as well as the intrinsic genetic variability of scleractinian corals.

**Keywords:** morphological variation, *Montastrea cavernosa*, *Siderastrea stellata*, Brasil.

## RESUMO

Examinamos a morfologia esquelética em cinco populações dos corais *Montastrea cavernosa* e *Siderastrea stellata*, do litoral do nordeste do Brasil. A forma das colônias de *S. stellata* do Maranhão é predominantemente achatada, o diâmetro do coralito e a distância columelar variaram significativamente entre as populações das duas espécies. O número de septos variou significativamente para *S. stellata*. Possivelmente estas variações refletem adaptações das colônias a diferentes condições de sedimentação e luminosidade, além da variabilidade genética intrínseca às espécies de corais escleractínios.

**Palavras-chave:** variação morfológica, *Montastrea cavernosa*, *Siderastrea stellata*, Brasil.

## INTRODUCTION

Morphological variation is an interesting property of several sessile organisms (Bradshaw, 1965; Boardman *et al.*, 1969; West *et al.*, 1993), including corals (Wijsman-Best, 1974; Foster, 1977; Veron, 1981; Willis, 1985; Veron, 1995; Veron & Stafford-Smith, 2000). Coral species are identified by morphological characters of their calcareous skeleton, such as: corallite size; the number, arrangement, and structural details of the septa; colony habit (free or adhered to the substrate); coral form; and different

aspects of the coenosteum (region between corallites). Together, these characters form the basis for the taxonomy of the order Scleractinia (Vaughan & Wells, 1943; Wells, 1956; Cairns, 1978, 1982; Zlatarski & Estalella, 1982; Zlatarski, 1990; Amaral, 1991).

At it provokes misinterpretations in studies with large temporal and spatial scales, this morphological variation is the main problem in scleractinian systematics (Wijsman-Best, 1974; Best *et al.*, 1983; Miller, 1994; Veron, 1995). The description of patterns of variation in morphological characters is necessary for the elaboration of a stable classification system

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, s/n. João Pessoa, PB. 58.059-900, siderastrea@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife, PE, 52.171-900.

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

<sup>4</sup> Departamento de Física e Matemática, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

that permits increased accuracy and greater advances in ecological and evolutionary research (Knowlton *et al.*, 1992; Amaral, 1994; Palumbi, 1994).

The cause of this variability has not yet been determined. It may be due to environmental factors (Foster 1977, 1978, 1980, 1983), genetic differentiation (Brakel, 1977; Carlon & Budd, 2002; Maté, 2003), or even to a combination of both (Futuyma, 1992; Knowlton *et al.*, 1992). The principal environmental factors known to influence variation in zooxanthellate corals are the quantity of light (Barnes, 1973; Fricke & Schuhmacher, 1983; Willis, 1985; Amaral, 1991; Beltrán-Torres & Carricart-Ganivet, 1993; Amaral, 1994; Antônio-de-Souza & Amaral, 2001), hydrodynamics (Foster, 1980), and sedimentation levels (Barnes & Lough, 1999; Todd *et al.*, 2001). Environmental effects have been investigated in studies involving the translocation of colonies, although the heterogeneity of reef environments may conceal the relative importance of each physical variable (Gattuso, 1985; Miller, 1994; Bruno & Edmunds, 1997).

Whereas differences in qualitative characters have been described (Laborel, 1970; Mayal & Amaral, 1990), quantitative approaches are necessary to identify the more variable characters (Foster, 1980; Amaral, 1994). The aim of the present study was to describe, both qualitatively and quantitatively, the variation in morphological characters of the skeletons of different populations of *Montastrea cavernosa* (Linnaeus, 1767) and *Siderastrea stellata* Verrill, 1868 from northeastern Brasil.

## MATERIAL AND METHODS

### Localities

Samples were collected in three northeastern Brazilian localities: Manuel Luiz Coral Banks and Picãozinho, Paraíba; Tamandaré, Pernambuco. The Manuel Luiz Coral Banks are part of a State Marine Park (Parque Estadual Marinho do Parcel do Manuel Luiz) located on the continental shelf, at 00° 50'S and

44° 15'W, 86 km from the coast of the Brazilian state of Maranhão and 180 km from the city of São Luís. The reefs are pinnacle shaped, covering an area of 69 km<sup>2</sup>. The temperature is approximately 28°C (Rocha, 1999), and the cnidarian fauna is composed of twelve species of corals and four species of calcified hydroids, as well as some species of gorgonians (Amaral *et al.*, 2000; Castro & Pires, 2001).

The reefs of Picãozinho (between 06°42'05"/07°07'30"S and 34°48'37"/34°50'00"W), are located at the city of João Pessoa, in the Brazilian state of Paraíba. They are composed of small rectangular platforms of no more than 300 m in extension, aligned parallel to the coast at a distance of 700 to 1,600 m from the beach. The annual temperature of this locality varies from 24° to 27°C. The cnidarian fauna is composed of six species of corals, as well as some species of calcified hydroids and zoanthids (Young, 1984; Vuelta, 2000).

The region of Tamandaré (08°47'02"S and 35°06'45"W) is located approximately 110 km south of the city of Recife, in the Brazilian state of Pernambuco. A considerable coral fauna grows on beachrocks parallel to the coast. The temperature is approximately 24°C in the rainy season ("winter") and 35°C in the dry season ("summer"), and visibility varies from 1 to 20 m according to the season, precipitation, winds, and currents (Maida & Ferreira, 1997; Amaral, 1998; Castro & Pires, 2001).

### Field studies

The field studies took place between June 1999 and July 2000. Five colonies of *Montastrea cavernosa* (Figure 1) were collected from Picãozinho and Tamandaré, and five colonies of *Siderastrea stellata* were collected in each of the three localities (Figure 2). The specimens were collected at a depths of 25m in Maranhão and up to 5m in Paraíba and Pernambuco. The colonies were removed with the aid of a hammer and chisel, at locations at least 2m apart, in order to avoid collecting clones (Foster, 1980).

The specimens were deposited in the Cnidaria

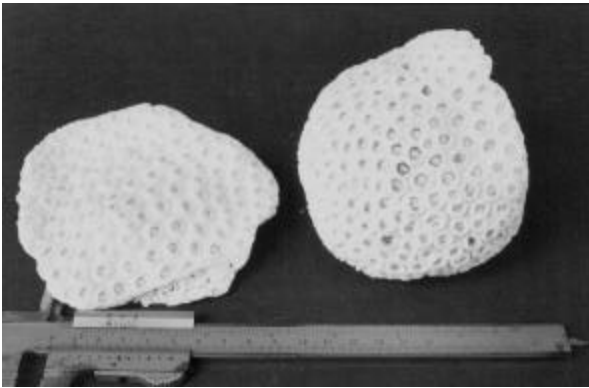


Figure 1. *Montastrea cavernosa*: Skeleton from Tamandaré.

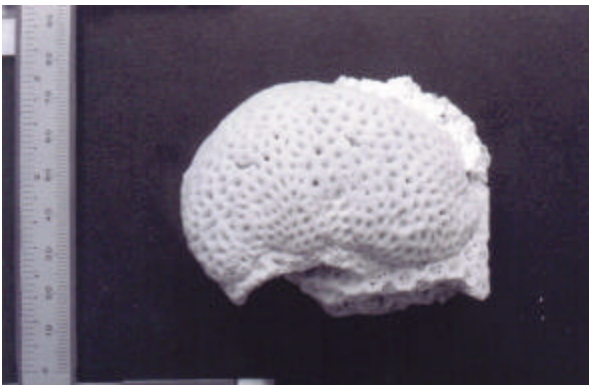


Figure 2. *Siderastrea stellata*: Skeleton from Manuel Luiz Coral Banks.

collection of the Reef Environment Laboratory of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (LAR/UFRPE) with the following numbers: *M. cavernosa* – LAR/UFRPE 029; 109; 185; 161; 173; 448; 449; 450; 451; 452 and *S. stellata* – LAR/UFRPE 012a; 012b; 012c; 012d; 012e; 020; 022; 063; 175; 160; 453; 454; 455; 456; 457.

### Laboratory study

The sample's soft parts were removed with a 30% solution of sodium hypochlorite, and then washed in distilled water and allowed to dry naturally. Skeleton characters were measured with a caliper (0.05 mm) and a stereoscopic microscope. The following qualitative and quantitative characters were recorded: colony shape, corallite shape, corallite diameter, columellar distance, and number of septa per corallite.

Ten corallites per colony, chosen randomly, were measured and had their septa counted (Amaral, 1994).

### Statistical analysis

In this study, the term population refers to all the colonies collected at same locality (Foster, 1980). The significance of the variations between populations of *M. cavernosa* was tested using the Student's *t* test for independent samples, and ANOVA among populations of *S. stellata*. Before applying ANOVA, variance homogeneity was ascertained using Levene's test, and posterior analyses were undertaken using Tukey's test (Zar, 1999). A  $p=0,05$  significance level was used, and all tests were run on Statistica, version 4.0.

## RESULTS

### *Montastrea cavernosa*

The colonies of *M. cavernosa* were hemispheric and flattened in shape in Picãozinho and Tamandaré. Corallites were predominantly rounded. Corallite diameters of *M. cavernosa* from Tamandaré (Table 1) were significantly larger than those of Picãozinho ( $t=6.69$ ;  $t_{0.05(2)98}=1.98$ ;  $p<0.05$ ), and columellar distances were significantly smaller ( $t=-3.58$ ;  $t_{0.05(2)98}=1.98$ ;  $p<0.05$ ). The number of septa did not vary significantly between the two populations ( $t=-0.86$ ;  $t_{0.05(2)98}=1.98$ ;  $p>0.05$ ).

### *Siderastrea stellata*

Most of the *S. stellata* colonies collected from the Manuel Luiz Coral Banks were flattened in shape, whereas those from Picãozinho and Tamandaré were mostly hemispheric. Corallites were predominantly rounded. Corallite diameter varied significantly among populations ( $F=21.05$ ;  $F_{0.05(2)147}=3.78$ ;  $p<0.05$ ), with the colonies from the Manuel Luiz Coral Banks and Picãozinho differing significantly from those of Tamandaré (Tables 2 and 3).

The columellar distance, which refers to the

Table 1. *Montastrea cavernosa*: Descriptive statistics of the skeletal characteriss at Picãozinho and Tamandaré.

Locality	N	Character	A	x	s	V	I(x)
Picãozinho	50	a *	4.60 – 6.90	5.62±0.07	0.52	0.27	5.47 – 5.77
		b *	6.50 – 9.70	7.90±0.12	0.84	0.71	7.67 – 8.14
		c	32 – 51	41.82±0.67	4.78	22.84	40.46 – 43.18
Tamandaré	50	a *	5.10 – 8.30	6.46±0.10	0.72	0.51	6.25 – 6.66
		b *	5.90 – 9.10	7.31±0.12	0.83	0.69	7.07 – 7.54
		c	31 – 49	41.02±0.64	4.51	20.39	39.74 – 42.30

a = corallite diameter; b = columellar distance; c = number of septa; (\*) = measurements in millimeters; N = number of corallites; A = amplitude; x = mean ± standard error; s = standard deviation; V = variance; I(x) = confidence limits of mean (95%).

Table 2. *Siderastrea stellata*: Descriptive statistics of the skeletal characters at Manuel Luiz Coral Banks, Picãozinho and Tamandaré.

Locality	N	Character	A	x	s	V	I(x)
Manuel Luiz Coral Banks	50	a *	2.40 – 4.70	3.50±0.06	0.46	0.21	3.36 – 3.63
		b *	2.60 – 4.50	3.51±0.07	0.47	0.22	3.37 – 3.64
		c	30 – 55	43.04±0.68	4.79	22.98	41.68 – 44.40
Picãozinho	50	a *	2.40 – 4.70	3.56±0.06	0.45	0.20	3.43 – 3.69
		b *	2.60 – 4.50	3.07±0.06	0.43	0.19	2.94 – 3.19
		c	30 – 55	43.18±0.97	6.86	47.01	41.18 – 45.13
Tamandaré	50	a *	1.90 – 3.80	3.01±0.07	0.47	0.22	2.88 – 3.15
		b *	1.60 – 3.90	2.60±0.07	0.48	0.23	4.46 – 2.73
		c	29 – 50	38.80±0.89	6.33	40.08	37.00 – 40.60

a = corallite diameter; b = columellar distance; c = number of septa; (\*) = measurements in millimeters; N = number of corallites; A = amplitude; x = mean ± standard error; s = standard deviation; V = variance; I(x) = confidence limits of mean (95%).

space between the colony’s corallites, differed significantly among the populations of *S. stellata* (F=48.83;  $F_{0.05(2)147} = 3.78$ ; p<0.05). The columellas of the specimens from Maranhão were significantly more widely spaced in comparison with the other populations (Tables 2 and 4). The total number of septa also varied significantly (F=8.44;  $F_{0.05(2)147} = 3.78$ ; p<0.05), with the Manuel Luiz Coral Banks and Picãozinho having a similar number, significantly larger than that recorded at Tamandaré (Tables 2 and 5).

DISCUSSION

Colonies of *Montastrea cavernosa* were both hemispheric and flattened in Pernambuco and Paraíba, suggesting shape heterogeneity in shallow environments. Several studies link the flattened form to deep environments (Laborel, 1970; Barnes, 1973;

Table 3. *Siderastrea stellata*: Tukey’s test for corallite diameter.

Locality	m	N
Manuel Luiz Coral Banks	3.50	50
Picãozinho	3.56	50
Tamandaré	3.01	50

m = mean; N = number of corallites.

Table 4. *Siderastrea stellata*: Tukey’s teste for the columellar distance.

Locality	m	N
Manuel Luiz Coral Banks	3.51	50
Picãozinho	3.07	50
Tamandaré	2.60	50

Table 5. *Siderastrea stellata*: Tukey’s test for the number of septa per corallite.

Locality	m	N
Manuel Luiz Coral Banks	43.04	50
Picãozinho	43.18	50
Tamandaré	38.80	50

Fricke & Schuhmacher, 1983; Amaral, 1994; Bruno & Edmunds, 1997), although a species can exhibit several patterns within a single type of environment (Brakel, 1977; Maýal & Amaral, 1990; Veron, 1995; Carlon & Budd, 2002). There are no records of *M. cavernosa* corallite shape in Brasil (Laborel, 1970; Amaral, 1991, 1994) and in this study we observed predominantly rounded corallites.

The significant differences between-localities in corallite diameter and columellar distance indicate the plasticity of these characters in *M. cavernosa*. However, the absence of variation in the number of septa per corallite suggests stability in this character. It might also indicate similarity in the deposition of calcium in the two populations given that, according to Beltrán-Torres & Carricart-Ganivet (1993), this last character directly reflects calcification effort.

Considering the geographic proximity and physical similarity of the reef environments of Picãozinho and Tamandaré, this explanation for the similarity in the number of septa is plausible despite other factors that influence calcium deposition. Nevertheless, the marked variability in *M. cavernosa* corallite diameter corroborates the observations of Amaral (1991, 1994) at both intra and interpopulational levels. This author indicated that this character, along with septa thickness, exhibits relatively high plasticity.

*Siderastrea stellata* appears to adopt the general colony form described by Barnes (1973) and Fricke & Schuhmacher (1983), with predominantly hemispheric colonies in shallow waters, and more flattened colonies at greater depths. As for *M. cavernosa* the corallite was invariably rounded.

The significant variation in corallite diameter, columellar distance, and number of septa indicates that the skeletal morphometry of *S. stellata* can vary considerably at the interpopulational level. Todd *et al.* (2001) noted that large polyps are characters of *Favia speciosa* (Dana, 1846) colonies from shallow environments near the coast, where the levels of water turbidity is often high. However, *S. stellata* was

characterized by significantly smaller corallites at Tamandaré in comparison with Manuel Luiz, located in deep water far from the coast. Despite the lack of quantitative data for the studied areas' environmental variables, the results of this study suggest that *S. stellata* may not follow the morphological pattern of *F. speciosa*.

The columellar distance differed significantly among all populations of *Montastrea cavernosa* and *Siderastrea stellata*. The differences in the distance between columellas occur due to the colony's adaptations to light intensity (Barnes, 1973; Foster, 1980; Amaral, 1994). We observed a tendency for increasing mean columellar distance in a south-north direction in both species. In *S. stellata*, the largest mean distance was recorded in Maranhão. In deep areas, the need to improve the exposure of tissue (and, consequently, of zooxanthellae), is translated into flattened colonies with distant columellar centers, which generates a larger coenosteum.

Foster (1977, 1980) relates variations in *Montastrea annularis* to factors such as light and nutrient availability, and Lasker (1979, 1981) points to behavioral differences that influence morphology in *M. cavernosa*. Sunlight may be equally abundant at the two *M. cavernosa* study localities, and thus may not influence the variation in columellar distance, although no data are available on the quantity of sediment particles in the water.

We consider that the considerable variability in the morphological characters of *M. cavernosa* and *S. stellata* may reflect the combined action of environmental stimuli and the genetic potential of these species. The unique characteristics of Brazilian reef environments and the endemic condition of *S. stellata* indicate a need for more detailed studies, with a view to creating a profile of variation in this species.

**Acknowledgements:** We thank Dr. Nancy Knowlton for revising the manuscript; Andrea Q. Steiner, Eduardo Esteves, and Cristiane F. Costa for their suggestions; and PIBIC/CNPq for granting a fellowship to the first author.



## REFERENCES

- Amaral, F. D. 1991. **Varição morfológica dos esqueletos de *Montastrea cavernosa* (Linnaeus, 1767) e *Favia gravida* (Verrill, 1868) (Cnidaria: Scleractinia)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Museu Nacional do Rio de Janeiro, UFRJ 120 p.
- Amaral, F.D. 1994. Morphological variation in the reef coral *Montastrea cavernosa* in Brazil. **Coral Reefs** 13: 113-117.
- Amaral, F.D. 1998. Recifes de corais e de arenitos do Brasil. **Res. XIII Simpósio de Biologia Marinha, USP – CEBIMar** p. 5.
- Amaral, F.D., M.M. Hudson & M.C. Coura, 2000. New findings on coral and hydrocorals from the Marine Park of Manuel Luiz Parcel (Maranhão State). **Proc. 9<sup>th</sup> International Coral Reef Symposium** 115(3):294.
- Antônio-de-Souza, C. & F.D. Amaral, 2001. Variação morfológica de algumas espécies de corais Mussidae (Cnidaria: Anthozoa) do Brasil. **Tropical Oceanography** 29(2):81-95.
- Barnes, D.J. 1973. Growth in colonial scleractinians. **Bulletin of Marine Science** 23 (2):280-298.
- Barnes, D.J. & J.M. Lough, 1999. *Porites* growth characteristics in a changed environment: Misima Island, Papua New Guinea. **Coral Reefs** 18:213-218.
- Beltrán-Torres, A.U. & J.P. Carricart-Ganivet, 1993. Skeletal morphologic variation in *Montastrea cavernosa* (Cnidaria: Scleractinia) at Isla Verde Coral Reef, Veracruz, Mexico. **Revista de Biología Tropical** 41 (3):559-562.
- Best, M.B., G.J. Boekschoten & A. Oosterbaan, 1983. Species concept and ecomorph variation. **Paleontographica Americana** 54:70-79.
- Boardman, R.S., A.H. Cheetham & P.L. Cook, 1969. Intracolony variation and the genus concept in Bryozoa. **Proc. North American Paleontological Convention** 294-320.
- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics** 13:115-155.
- Brakel, W.H. 1977. Corallite variation in *Porites* and the species problem in corals. **Proc. 3<sup>rd</sup> International Coral Reef Symposium** 3:393-398.
- Bruno, J.F. & P.J. Edmunds, 1997. Clonal variation for phenotypic plasticity in the coral *Madracis mirabilis*. **Ecology** 78(7):2177-2190.
- Cairns, S.D. 1978. New genus and species of ahermatypic coral (Anthozoa: Scleractinia) from the Western Atlantic. **Proc. Biological Society of Washington** 91(1):216-221.
- Cairns, S.D. 1982. Stony corals (Cnidaria: Hydrozoa: Scleractinia) of Carrie Bow Cay, Belize. **Smithsonian Contributions to the Marine Sciences** 12: 271-301.
- Carlson, D.B. & A.F. Budd, 2002. Incipient speciation across a depth gradient in a scleractinian coral? **Evolution** 56 (11):2227-2242.
- Castro, C & D.O. Pires, 2001. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. **Bulletin of Marine Science** 69(2):357-371.
- Foster, A.B. 1977. Patterns of small-scale variation of skeletal morphology within the Scleractinian corals, *Montastrea annularis* and *Siderastrea siderea*. **Proc. 3<sup>rd</sup> International Coral Reef Symposium** 2: 409-415.
- Foster, A.B. 1978. **Morphologic variation within three species of reef corals (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia)**. PhD Thesis. Johns Hopkins University 278 p.
- Foster, A.B. 1980. Environmental variation in skeletal morphology within the Caribbean reef corals *Montastrea annularis* and *Siderastrea siderea*. **Bulletin of Marine Science** 30 (3):678-709.
- Foster, A.B. 1983. The relationship between corallite morphology and colony shape in some massive reef-corals. **Coral Reefs** 2:19-25.
- Fricke, H.W. & H. Schuhmacher, 1983. The depth limits of Red Sea stony corals: an ecophysiological problem (a deep diving survey by submersible). **Marine Ecology** 4 (2):163-194.
- Futuyma, D.J. 1992. **Biologia evolutiva**. Sociedade Brasileira de Genética & CNPq, 2<sup>a</sup> ed., São Paulo, 646 p.
- Gattuso, J.P. 1985. Features of depth effects on *Stylophora pistillata*, an hermatypic coral in the Gulf of Aqaba (Jordan, Red Sea). **Proc. 5<sup>th</sup> International Coral Reef Congress** 6:95-100.
- Knowlton, N., E. Weil, L.A. Weigt & H.M. Guzmán, 1992. Sibling species in *Montastrea annularis*, coral bleaching and coral climate record. **Science** 255:330-333.
- Laborel, J. 1970. Madreporaires et hydrocoralliaries récifaux des cotes brésiliennes. Systematique, écologie, répartition géographique. **Résultats Scientifiques des Campagnes de la "Calypso"** 9(5):171-229.
- Lasker, H.R. 1979. Light dependent activity patterns among reef corals: *Montastrea cavernosa*. **Biological Bulletin** 156:196-211.
- Lasker, H.R. 1981. Phenotypic variation in the coral *Montastrea cavernosa* and its effects on colony energetics. **Biological Bulletin** 160:292-302.
- Maida, M. & B.P. Ferreira, 1997. Coral Reefs of Brazil: an overview. **Proc. 8<sup>th</sup> International Coral Reef Symposium** 1:263-274.
- Maté, J.L. 2003. Ecological, genetic, and morphological differences among three *Pavona* (Cnidaria: Anthozoa) species from the Pacific coast of Panama. **Marine Biology** 142:427-440.
- Maýal, E. & F. Amaral, 1990. Ecomorfose em alguns escleractínios da costa pernambucana. Universidade Federal de Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos** 21:239-251.
- Miller, J.K. 1994. Morphological variation in the coral genus *Platygyra*: environmental influence and taxonomic implications. **Marine Ecology Progress Series** 110:19-28.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive

- isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics** 25:547-572.
- Rocha, L.A. 1999. **Composição e estrutura da comunidade de peixes do parque estadual marinho do Parcel do Manuel Luiz – Maranhão, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal da Paraíba 147 p.
- Todd, P.A., P.G. Sanderroo & L.M. Chou, 2001. Morphological variation in the polyps of the scleractinian coral *Favia speciosa* (Dana) around Singapore. **Hydrobiologia** 444:227-233.
- Vaughan, T.W. & J.W. Wells, 1943. Revision of the suborders, families, and genera of the Scleractinia. Geological Society of America. **Special Papers of Washington Museum** 44:1-363.
- Veron, J.E.N. 1981. The species concept in Scleractinia of Eastern Australia. **Proc. 4<sup>th</sup> International Coral Reef Symposium** 2:183–186.
- Veron, J.E.N. 1995. **Corals in space and time**. Comstock/Cornell – Ithaca. New York 321 p.
- Veron, J.E.N. & M. Stafford-Smith, 2000. **Corals of the world**. Australian Institute of Marine Science (AIMS), Townsville MC, Queensland, Australia 3 vol.
- Vuelta, C.B. 2000. **Influência do turismo sobre a ictiofauna do Recife do Picãozinho, Paraíba, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal da Paraíba 102 p.
- Wells, J.W. 1956. Scleractinia, pp. 328-344. *In*: **Treatise on Invertebrate Paleontology** (Moore, R.C. Ed.). Geological Society of America, New York.
- West, J.M., C.C. Harvell & A.M. Walls, 1993. Morphological plasticity in a gorgonian coral (*Briareum asbestinum*) over a depth cline. **Marine Ecology Progress Series** 94(1):61-69.
- Wijsman-Best, M. 1974. Habitat-induced modification of reef corals (Faviidae) and its consequences for taxonomy. **Proc. 2<sup>nd</sup> International Coral Reef Symposium** 2:217-228.
- Willis, B.L. 1985. Phenotypic plasticity stability in the reef corals *Turbinaria mesenterina* and *Pavona cactus*. **Proc. 5<sup>th</sup> International Coral Reef Congress** 4:107-112.
- Young, P.S. 1984. **Análise qualitativa e quantitativa da fauna associada aos corais hermatípicos *Mussismilia harttii*, *M. hispida* e *Siderastrea stellata* (Coelenterata: Scleractinia) nos recifes de João Pessoa, PB**. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal da Paraíba 180 p.
- Zar, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. 4<sup>th</sup> edition. Prentice Hall.
- Zlatarski, V.N. 1990. *Porites colonensis*, new species of stony coral (Anthozoa: Scleractinia) of the Caribbean coast of Panama. **Proc. Biological Society of Washington** 103(2):257–264.
- Zlatarski, V.N. & N.M. Estalella, 1982. **Les Scléactiniaires de Cuba**. Éditions de l'Académie Bulgare des Sciences, Sofia 471 p.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 5 (1): 12-18

30.x.2004

## CARDIOVASCULAR EFFECTS INDUCED IN RATS BY THE ESSENTIAL OIL OF *OCOTEA DUCKEI* VATTIMO (LAURACEAE)

Renildo Moura da Cunha<sup>1</sup>  
Silvia Renata Queiroz de Farias<sup>1</sup>  
José Crispim Duarte<sup>1</sup>  
Márcio Roberto Viana dos Santos<sup>1</sup>  
Éurica Adélia Nogueira Ribeiro<sup>1</sup>  
Isac Almeida de Medeiros<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The cardiovascular effects induced in rats by the essential oil of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (ODEO) were evaluated in this study. ODEO induced hypotension, apparently due to a decrease of the peripheral vascular resistance, and bradycardia, likely due to indirect activation of the cardiac muscarinic receptors via vagal stimulation. Furthermore, ODEO induced negative chronotropic and inotropic effects on rat atria, probably due to inhibition of calcium influx, which may also contribute to the ODEO-induced bradycardia.

**Key words:** *Ocotea duckei*, essential oil, hypotension, bradycardia, isolated rat atria.

### RESUMO

Os efeitos cardiovasculares induzidos pelo óleo essencial das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo (OEOD) em ratos foram avaliados. OEOD induziu hipotensão, devido à diminuição da resistência periférica vascular, e bradicardia, devido à ativação indireta dos receptores muscarínicos cardíacos via estimulação vagal. OEOD também induziu efeitos cronotrópico e inotrópico negativos em átrio de rato, devido à inibição do influxo de cálcio, a qual parece contribuir também para a bradicardia induzida pelo OEOD.

**Palavras-chave:** *Ocotea duckei*, óleo essencial, hipertensão, bradicardia, átrio isolado de rato.

### INTRODUCTION

The use of medicinal plants for the treatment of human diseases has increased considerably worldwide. Evaluation of the effects of these plants on organs and systems contribute to the development of the scientific basis for their therapeutic application, and also enrich considerably the therapeutic arsenal for the treatment of a number of diseases (Elizabetzky, 1986).

*Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) is a

medicinal plant known popularly in Brasil as “louro-de-cheiro”, “louro-pimenta” or “louro-canela”. Several species of the *Ocotea* genus are used in the folk-medicine of northern and northeastern Brasil for the treatment of disorders such as neuralgia, dyspepsia, anorexia and pain.

A preliminary phytochemical screening of the species revealed the presence of benzyloquinoline alkaloids and furofuranic lignanes. This plant's essential oil (ODEO) presents 28 components, among them  $\alpha$ -pinene, which has smooth muscle relaxant

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, caixa postal 5009, João Pessoa, PB, 58.051-970, isacmed@uol.com.br

activity (El Tantawy *et al.*, 1999) and trans-caryophyllene – the major compound – which presents calcium channel blocker activity in isolated cardiac ventricular cells (Sensch *et al.*, 1993). Considering that no pharmacological studies of the activity of this essential oil on the cardiovascular system are available, this study aimed to evaluate the cardiovascular effects induced by ODEO in rats.

## MATERIAL AND METHODS

### **Preparation of the essential oil from the leaves of**

***O. duckei***: The leaves were collected in January 2000, near the town of Santa Rita, in the Brazilian State of Paraíba. The voucher specimen is deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier under identification code Agra 4309. Essential oil was obtained from fresh leaves by steam distillation in a clevenger apparatus for 3 h (Matos *et al.*, 1999) and stored at 4°C. When required, the oil was dissolved in a saline/cremophor (0.2% v/v) solution and diluted in saline to the desired concentrations.

**Animals**: Male Wistar rats (250-350 g) were used for all experiments. The animals were housed under conditions of controlled temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and lighting (lights on: 06:00-18:00 h), with free access to food (Purina-Brasil) and tap water.

**Drugs**: The drugs used were: heparin sodium salt (Roche), sodium thiopental (Cristália) and atropine sulfate, N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and sodium nitroprusside (all from Sigma). All drugs were dissolved freely in distilled water.

**Direct blood pressure measurements in non-anaesthetized rats**: Under sodium thiopental anaesthesia (45 mg/kg, i.v.), the lower abdominal aorta and inferior vena cava were cannulated via the left femoral artery and vein using polyethylene catheters. The catheters were then filled with heparinized saline

solution and led under the skin to emerge between the scapulae. Arterial pressure was measured after 24 h by connecting the arterial catheter to a pre-calibrated pressure transducer (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, USA) coupled to an amplifier-recorder (Model TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, USA.) and connected to a computer equipped with an analog-digital converter board (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, USA) and CVMS software (WPI, Sarasota, FL, USA). The data were sampled at a frequency of 500 Hz. For each cardiac cycle, the computer calculated mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) (pulse interval). The venous catheter was inserted for drug administration. Sodium nitroprusside (10 µg/kg) was injected to check the efficacy of venous catheter insertion.

After cardiovascular parameters had stabilized, MAP and HR were recorded before (baseline values) and after i.v. administration of randomized doses of ODEO (1, 5, 10 and 15 mg/kg). Dose-response curves were then obtained. Successive injections were separated by a time interval sufficient to allow full recovery of cardiovascular parameters. Similar records were obtained after separate acute administration of atropine (2 mg/kg; i.v.; 15 min.), a non-selective antagonist of muscarinic receptors (Mitchelson, 1984) or L-NAME (20 mg/kg, i.v. 30 min.), a competitive inhibitor of NO-synthase (Moncada & Higgs, 1993).

### **Direct blood pressure measurements in anaesthetized and vagotomized rats**

The animals were cannulated as described above, maintained under anaesthesia with sodium thiopental (45 mg/g; i.v.) and controlled body temperature using an electric blanket ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ). An intra-tracheal probe coupled to an artificial ventilator (Rodent Ventilator, Ugo Basile) was inserted in these animals, which were separated into two groups. The first group was sham-operated (SHAM), while a cervical bilateral vagotomy was performed on the members of the second group.

Once cardiovascular parameters had stabilized following the surgical procedure, MAP and HR were

recorded before (baseline values) and after administration of randomized doses of ODEO (1, 5, 10 and 15 mg/kg). Dose-response curves were constructed as described above.

**Rat atrium preparation:** The animals were killed by stunning and bled. The left and right atria were cut perpendicular to the axis of the heart and suspended by cotton threads in organ baths containing 10 ml of Krebs's bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 10.0, MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2 and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 8.5; pH 7.4) maintained at 37°C and gassed with a carbogenic mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Next, each atrium was stabilized under a resting tension of 0.5 g for at least 1 h. The left atrium was driven electrically by two parallel platinum electrodes with rectangular pulses at a frequency of 3 Hz, duration of 3 ms and voltage of 1.5 times the excitation threshold for each atrium. Isometric tension was recorded using a force transducer (Ugo basile, Comerio, VA, Italy) coupled to a physiograph (Gemini 2, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy). After stabilization, ODEO (0.1, 1, 10, 30, 100, 300 and 500 µg/mL) was administered cumulatively in the bath to obtain a concentration-response curve before (control) and after 1 µM of atropine. Concentration-response curves were also obtained for CaCl<sub>2</sub> (0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 9.6 and 12.8 mM) before (control) and after incubation of the preparations with individual concentrations of ODEO (1, 10, 30 and 100 µg/mL).

**Statistical analysis:** Values are expressed as means ± SEM. When appropriate, Student's t tests and two-way analyses of variance (ANOVA) were conducted in order to evaluate the significance of the differences between means. All statistical analyses were done using GraphPad Prism™ 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA.

## RESULTS

Table 1 shows baseline values of MAP and HR in normotensive non-anaesthetized rats before (control) and after acute administration of atropine (2 mg/kg; i.v.) or L-NAME (20 mg/kg; i.v.). The acute administration of atropine significantly increased the HR, while acute administration of L-NAME increased the MAP but reduces HR.

Table 1. Baseline values of Mean Arterial Pressure (MAP) and Heart Rate (HR) in non-anaesthetized rats before (control) and after acute administration of atropine or L-NAME.

	Control	After atropine	After L-NAME
MAP (mmHg)	117 ± 1	121 ± 4	142 ± 1 *
HR (bpm)	354 ± 4	422 ± 10 *	305 ± 7 *

Values are mean ± SEM of 6 experiments.

\* p<0.05 vs control.

ODEO (1, 5, 10 and 15 mg/kg i.v randomly) induced hypotension (7±1, 15±2, 21±1 and 37±3%, n=6, respectively) and bradycardia (2±0.3, 9±1, 18±4 and 53±4%, n=6, respectively) in a dose-dependent manner (Figure 1). The hypotensive response was not affected after atropine (2 mg/kg, i.v.) or L-NAME (20 mg/kg, i.v.) whereas the bradycardic response was eliminated after atropine, but was not affected after L-NAME (Figure 1).

Table 2 shows baseline values of MAP and HR in control normotensive anaesthetized (SHAM) and vagotomized rats. In these animals, only the HR value increased significantly after vagotomy. Furthermore, anaesthesia with sodium thiopental did not affect significantly the ODEO-induced hypotension and bradycardia when compared with that induced in non-anaesthetized rats (10±1, 29±4, 31±5, 50±8% and 2±0.3, 16±4, 20±3, 43±6%, respectively, n=6).

Bilateral cervical vagotomy did not affect the

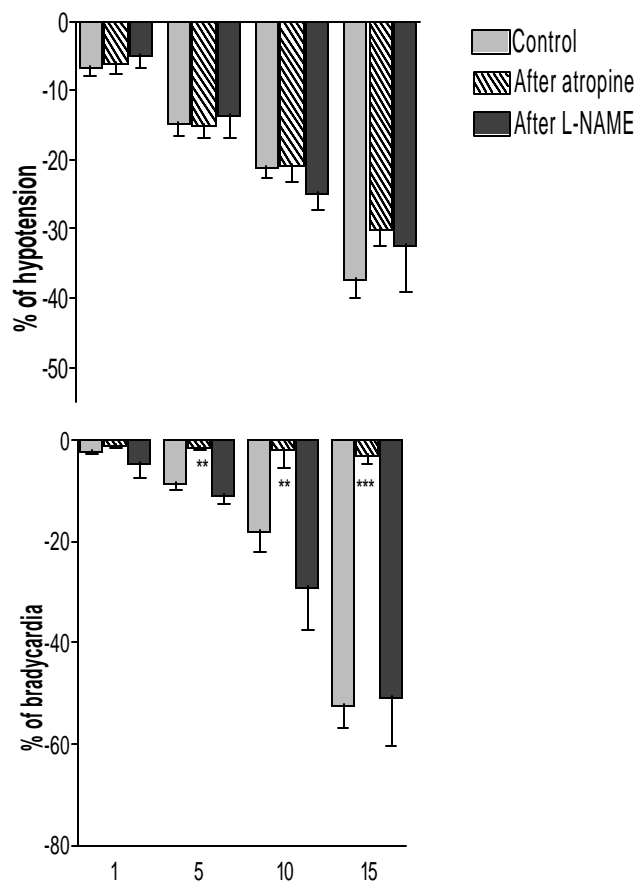


Figure 1. Hypotensive and bradycardic response induced by OEOD in non-anaesthetized rats before (control) and after acute administration of atropine (2 mg/Kg, i.v.) or L-NAME (20 mg/Kg, i.v). Values are mean  $\pm$  SEM of six experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs control.

Table 2. Baseline values of Mean Arterial Pressure (MAP) and Heart Rate (HR) in anaesthetized rats before (SHAM) and after bilateral cervical vagotomy (vagotomized).

	SHAM	Vagotomized
MAP (mmHg)	121 $\pm$ 3	122 $\pm$ 5
HR (bpm)	403 $\pm$ 10	472 $\pm$ 12 *

Values are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments.  
\*  $p < 0.05$  vs SHAM.

hypotensive response (11 $\pm$ 2, 34 $\pm$ 2, 46 $\pm$ 5 and 51 $\pm$ 0.7 %, respectively, n=6), whereas the bradycardic response was strongly reduced (1 $\pm$ 0.2, 4 $\pm$ 2, 6 $\pm$ 1 and 10 $\pm$ 2 %, respectively, n=6; Figure 2).

In rat atria, OEOD (0.1, 1, 10, 30, 100, 300 and 500 mg/mL) induced negative chronotropic and inotropic effects that were not affected after 1 mM atropine (figure 3). In addition, CaCl<sub>2</sub> induced positive chronotropic and inotropic effects that were attenuated after pre-incubation with OEOD (1, 10, 30 or 100 mg/mL; Figure 4a, b).

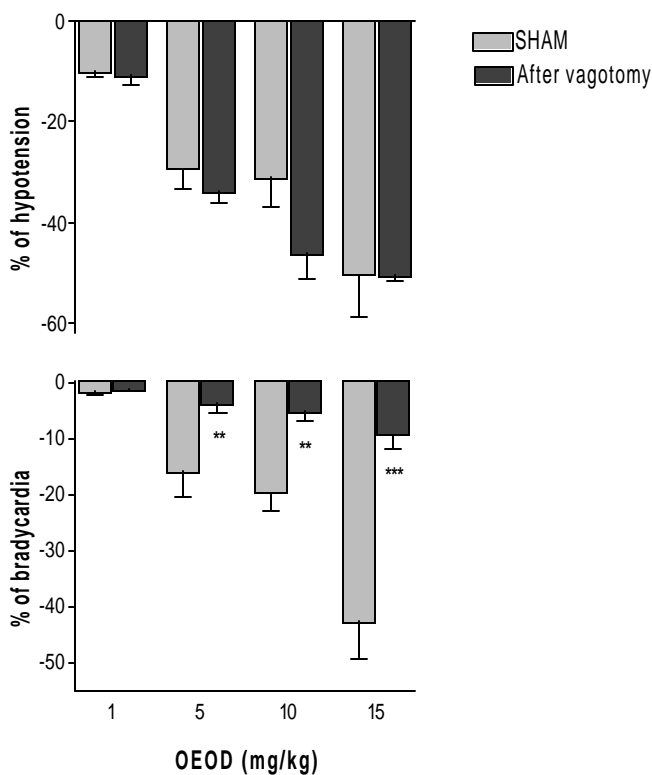


Figure 2. Hypotensive and bradycardic response induced by OEOD in anesthetized rats before (SHAM) and after bilateral cervical vagotomy. Values are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs SHAM.

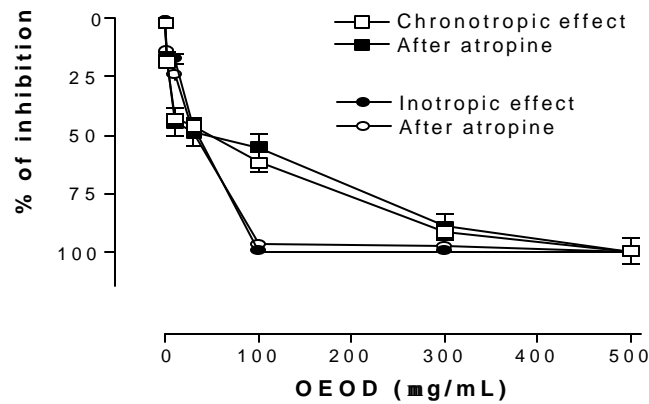


Figure 3. Chronotropic and inotropic negative effects induced by OEOD (1, 10, 30, 100, 300 and 500  $\mu\text{g/mL}$ ) in isolated rat atria before and after atropine. Values are mean  $\pm$  SEM of six experiments.

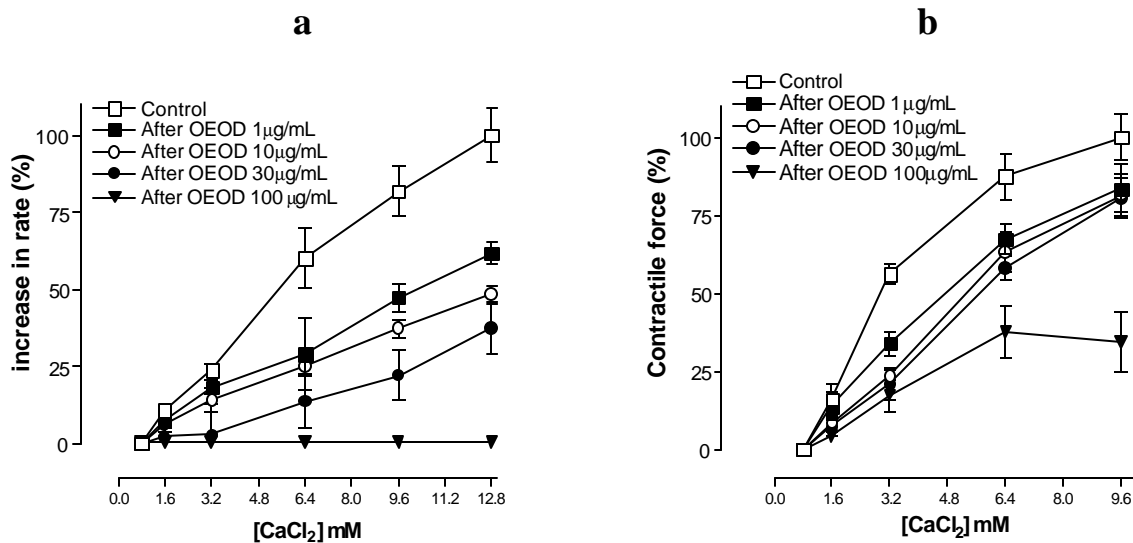


Figure 4. Effect of the incubation with OEOD (1, 10, 30 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) on chronotropic (a) and inotropic (b) positive effects induced by  $\text{CaCl}_2$  (0.8, 1.6, 3.2, 6.4 and 9.6 mM) in isolated rat atria. Values are mean  $\pm$  SEM of six experiments.

DISCUSSION

The major finding of the present study is that ODEO induced hypotension and bradycardia in normotensive rats, apparently due to a decrease in peripheral vascular resistance and indirect activation of cardiac muscarinic receptors, respectively. We decided to evaluate the ODEO effects first on cardiovascular parameters in non-anaesthetized rats in order to avoid the influence of anaesthesia and stress

(Smith & Hutchins, 1980; Fluckiger *et al.*, 1985). In these animals, ODEO induced hypotension associated with intense bradycardia.

It is well established that the primary autonomic regulation of sinoatrial node function is by vagal action via stimulation of cardiac muscarinic receptors (Peterson *et al.*, 1984). Stimulation of these receptors induces intense bradycardia followed by hypotension due to a decrease in cardiac output. These receptors are predominantly of the  $M_2$  subtype (Caulfield, 1993;

Brodde & Michel, 1999), as confirmed by the localization of  $M_2$  mRNA in the rat heart by *in situ* hybridization (Hoover *et al.*, 1994). Although the expression of  $M_1$ ,  $M_3$  and  $M_4$  subtype muscarinic receptor genes in the mammalian heart has been reported, they have not yet been associated with any functional response in rat atria (Stengel *et al.*, 2000).

In order to evaluate the role of these receptors in ODEO-induced responses, we performed experiments in the presence of atropine, a non-selective antagonist of muscarinic receptors (Mitchelson, 1984). Under these conditions, only the bradycardic response was eliminated. We may thus conclude that ODEO could induce bradycardia via two pathways: either directly in these receptors or indirectly via vagal activation and release of acetylcholine in the sinoatrial node. This was investigated by using anaesthetized cervical bilateral vagotomized rats. In these animals, the bradycardic response to ODEO was strongly attenuated, suggesting that the bradycardic response is due to an indirect than direct activation of cardiac muscarinic receptors. These results also suggest that hypotension do not appear to be due to a decrease of cardiac output as a function of the intense bradycardia, but is probably due to a decrease in peripheral vascular resistance.

It is well established that NO is a major endothelium-derived relaxing factor, both *in vivo* and *in vitro* (Moncada *et al.*, 1991), and that the release of NO from endothelial cells leads to relaxation of vascular smooth muscle cells and plays a critical role in the maintenance of vascular tone (Moncada *et al.*, 1991; Moncada & Higgs, 1993). It is thus reasonable to assume that the decrease in blood pressure is due to NO release from the vascular endothelium and the subsequent reduction of peripheral vascular resistance.

In order to investigate the possible involvement of NO in the ODEO-induced hypotensive response, we performed experiments in non-anaesthetized rats pre-treated with L-NAME, an inhibitor of NO-synthase (Moncada & Higgs, 1993). In this condition, the effects of ODEO were not altered, suggesting that

NO do not appear to be involved in the ODEO-induced hypotensive response.

To rule out the hypothesis that ODEO is acting directly on cardiac muscarinic receptors to produce the bradycardic response, we used isolated rat atria. In these preparations, ODEO-induced negative chronotropic and inotropic effects that were not affected by atropine, confirming that bradycardia ODEO do not really appear to be due to direct cardiac muscarinic receptors activation. Furthermore, these effects do not appear to be essential to the expression of the bradycardic response induced by ODEO in non-anaesthetized rats, but can contribute to the bradycardia.

The  $Ca^{2+}$  channels in many different cell types are activated upon membrane depolarization and mediate  $Ca^{2+}$  influx in response to action potentials. The  $Ca^{2+}$  entering cells through voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels serves as the second messenger of electrical signaling, initiating intracellular events, such as contraction. Multiple types of  $Ca^{2+}$  channels have been identified by their physiological and pharmacological properties (Catterall, 2000). In cardiac muscle, the major expressed  $Ca^{2+}$  channels have been designated as L-type (Larsen *et al.*, 2002). Their functional activity is decreased by  $Ca^{2+}$  channel antagonists (McDonald *et al.*, 1994).

As trans-caryophyllene, the major compound found in ODEO could be due to a  $Ca^{2+}$  channel blocker properties in isolated cardiac ventricular cells (Sensh *et al.*, 1993), it is possible to hypothesize that the negative chronotropic and inotropic effects induced by ODEO could be due to a  $Ca^{2+}$  channel blockade. To evaluate this possibility, we recorded concentrations-response curves to  $CaCl_2$  in the presence of the oil. Thus,  $CaCl_2$  produced positive chronotropic and inotropic effects that were significantly attenuated or eliminated by ODEO, suggesting that ODEO acts via inhibition of the  $Ca^{2+}$  influx in isolated rat atria.

In conclusion, the results demonstrate that ODEO induces hypotension, apparently due to a



reduction in peripheral vascular resistance, and bradycardia, related to indirect activation of the cardiac muscarinic receptors via vagal stimulation. ODEO-induced negative chronotropic and inotropic effects in rat atrium, probably due to inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which also appears to contribute to the ODEO-induced bradycardia.

**Acknowledgements:** This research was supported by CAPES and PRONEX/CNPq, Brasil.

#### REFERENCES

- Brodde, O.E. & M.C. Michel, 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol. Rev** 51:651-690.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 16:521-555.
- Caulfield, M.P. 1993. Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. **Pharmacol. Ther.** 58:323-331.
- El Tantawy, M.E., F.S. El Sakhawy, M.A. El Solí & S.A. Ross, 1999. Chemical composition and biological activity of the essential oil of the fruit of *Taxodium distichum* (L.) rich growing in Egypt. **J. Essent. Oil Res.** 11(3):386-392.
- Elizabetsky, E. 1986. New directions in ethnopharmacology. **J. Etnobiol.** 6:121.
- Fluckiger, J.P., M. Sonnay, N. Boillat & J. Atkinson, 1985. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **Eur. J. Pharmacol.** 109:105-109.
- Hoover, D.B., R.H. Baisden & S.X. Xy-Moy, 1994. Localization of muscarinic receptor mRNAs in rat heart and intrinsic cardiac ganglia by in situ hybridization. **Circ. Res.** 75:813-820.
- Larsen, J.K., J.W. Mitchell & P.M. Best, 2002. Quantitative analysis of the expression and distribution of calcium channel subunit mRNA in the atria and ventricles of the rat heart. **J. Molec. Cell. Cardiol.** 34:519-532.
- Matos, F.J.A., M.I.L. Machado, A.A. Craveiro, J.M. Barbosa-Filho, E.V.L. Cunha & C.A. Hiruma, 1999. Essential oil of *Mentha x villosa* from Northeastern Brazil. **J. Essent. Oil Res.** 11:41-44.
- McDonald, T.F., S. Pelzer, W. Trautwein & D. Pelzer, 1994. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells. **Physiol. Rev.** 74(2):365-507.
- Mitchelson, F. 1984. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacol. Sci. (suppl.)** 5:12-16.
- Moncada, S. & E.A. Higgs, 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine** 29:2002-2012.
- Moncada, S., R.M.J. Palmer & E.A. Higgs, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43:109-142.
- Peterson, G.L., G.S. Herron, M. Yamaki, D.S. Fullerton & M.I. Schimerlik, 1984. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:4993-4997.
- Sensch, O., W. Vierling, W. Brandt & M.Reiter, 1993. Calcium-channel blocking effect of constituents of clove oil. **Planta Med. Suppl.** 59(7):A687-A691.
- Smith, T.L. & P.M. Hutchins, 1980. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Am. J. Physiol.** 238:H539-H544.
- Stengel, W.P., J. Gomeza, J. Wess & L.M. Cohen, 2000.  $M_2$  and  $M_4$  receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. **J. Pharmacol. Exper. Ther.** 292(3):877-885.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 5 (1): 19-25

30.x.2004

## ECHINODERMATA DA BACIA DE CAMAMU, BAHIA, BRASIL

Cynthia Lara de Castro Manso<sup>1</sup>

### RESUMO

Apresenta-se uma lista dos Echinodermata da bacia de Camamu, Bahia. Dentre os equinóides, são registrados pela primeira vez *Paraster floridiensis* (Kier & Grant, 1965) no Brasil e no nordeste *Agassizia excentrica* Agassiz, 1879. Descreve-se uma espécie nova de ofiuróide do gênero *Amphioplus* e apresenta-se uma chave para as espécies brasileiras.

**Palavras-chave:** Bacia de Camamu, Echinodermata.

### ABSTRACT

A list of the Echinodermata from the Camamu Basin in the Brazilian state of Bahia, is presented. Of the echinoids, *Paraster floridiensis* (Kier & Grant, 1965) was recorded for the first time in Brasil, and *Agassizia excentrica* Agassiz, 1879 for the first time in the Brazilian Northeast. A new species of ophiuroid of the genus *Amphioplus* is described and a key for Brazilian species is presented.

**Keywords:** Camamu Basin, Echinodermata

### INTRODUÇÃO

Durante projeto de monitoramento sobre a influência da perfuração de poços de petróleo na macrofauna bentônica do bloco BM-CAL-4, realizado pela ENSR International Brasil Ltda, várias espécies de equinodermos foram coletadas, dentre estas uma nova espécie de ofiuróide do gênero *Amphioplus*. Neste trabalho é apresentada uma lista das espécies com comentários sobre *Paraster floridiensis*, *Agassizia excentrica* (Echinoidea) e *Ophiophragmus cubanus* (Ophiuroidea). As coletas foram realizadas com um busca fundo van Veen, pelo biólogo Mário Sérgio Ximenez, durante dezembro de 2002 a abril de 2003, entre as latitudes 13°35' e 14°00'S. O material coletado está depositado no Laboratório de Fauna

Psâmica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### LISTA DAS ESPÉCIES

Classe Asteroidea

Ordem Paxilosida Perrier, 1884

Família Astropectinidae Gray, 1840

*Astropecten armatus brasiliensis* (Muller & Troschel, 1842)

Classe Ophiuroidea

Ordem Ophiurida Muller & Troschel, 1840

Família Ophionereididae Ljungman, 1867

*Ophionereis squamulosa* Koehler, 1914

Família Ophiodermatidae Ljungman, 1867

<sup>1</sup> Fundação Paleontológica Phoenix, Rua Geraldo Menezes de Carvalho, 218, Suissa, Aracaju, Se, 49050-750, cynthia@phoenix.org.br

*Ophioderma brevispinum* (Say, 1825)  
 Família Amphiuridae Ljungman, 1867  
*Amphiodia atra* (Stimpson, 1852)  
*Amphiodia pulchella* (Lyman, 1869)  
*Amphiolus brasiliensis* Tommasi, 1970  
*Amphioplus camamuensis* sp n.  
*Amphiura* sp.  
*Ophiophragmus cubanus* (A. H. Clark, 1917)  
*Ophiophragmus brachyatis* H. L. Clark, 1915  
 Família Ophiothrichidae Ljungman, 1867  
*Ophiothrix angulata* (Say, 1825)

Classe Echinoidea  
 Ordem Spatangoida Claus, 1876  
 Família Schizasteridae Lambert, 1905  
*Paraster floridiensis* (Kier & Grant, 1965)  
*Agassizia excentrica* Agassiz, 1879  
 Classe Holothuroidea  
 Ordem Apodida Brandt, 1835  
 Família Synaptidae Burmeister, 1837  
*Leptosynapta* sp.

*Paraster floridiensis* (Kier & Grant, 1965)

**Material examinado:** um exemplar, com parte dos espinhos ainda conectados à carapaça, coletado em 22/01/2003 na estação GD9 (519686N/ 8494061E) a 45m de profundidade.

**Diagnose:** Carapaça globular com o sistema apical central; ambulacro III estreito com as pétalas anteriores levemente flexionadas (Figura 1).

**Descrição:** Carapaça subglobular quase tão larga quanto longa com 12,0 mm de comprimento, 11,0 mm de largura e 9,5 mm de altura, recoberta por espinhos finos e hialinos; muitos destes espinhos levemente curvados e com as pontas ligeiramente espatuladas. Os espinhos que cobrem as placas do

plastrão diferem daqueles do restante da carapaça. Estes são longos, finos e com as pontas alargadas e arredondadas assemelhando-se a uma colher. As placas próximas aos filódios não possuem espinhos; estes também são escassos nas placas ambulacrais seguintes às pétalas. O sistema apical é etmolítico com quatro poros genitais. O ambulacro III possui um sulco profundo estendendo-se em direção ao peristoma. Os poros, de onde partem pódios de tonalidade alaranjada a avermelhada, são arranjados em séries simples próximos às paredes do sulco ambulacral. Pétalas pares anteriores levemente curvadas na porção distal, com 15 pares de poros iguais em forma de fenda curta. Pétalas pares posteriores com oito pares de poros semelhantes nas duas séries; os pódios mais finos é de cor alaranjada, com tonalidade mais clara do que aquela do ambulacro III. O peristoma é aproximadamente três vezes mais largo que longo, estreito e localizado próximo à margem anterior. O periprocto está localizado em posição vertical na margem superior da região posterior. Fascíolos peripetálico e látero-anal presentes (Figura 1); fascíolo peripetálico próximo às extremidades das pétalas, exceto no interambulacro 5, mais largo nas extremidades dos pares de pétalas anteriores (II e IV); fascíolo lateral inicia-se na região próxima às pétalas pares anteriores e segue em direção ao periprocto, passando abaixo deste. As placas do plastrão formam um triângulo estreito e convexo. Não foi possível observar pedicelários, entretanto Kier & Grant (1965) visualizaram apenas alguns pedicelários globíferos.

**Comparações:** *P. floridiensis* difere de *P. doederleini* (Chesher, 1972) pelo formato mais arredondado da carapaça, pétalas mais flexionadas e no formato dos espinhos da carapaça. Difere de *P. rotundatus* Doderlein por apresentar o sistema apical mais anterior, as pétalas posteriores situadas longe da borda da carapaça, e pelo formato divergente e flexionado do par anterior. *P. floridiensis* difere ainda de *P. compactus* Köehler da Baía de Bengala, por possuir os poros do ambulacro anterior oblíquos, a carapaça

mais larga e mais alta, pétalas posteriores mais largas e mais curtas e as pétalas anteriores mais divergentes (Kier & Grant, 1965).

**Distribuição:** Dos Estados Unidos (Flórida) à Bahia.

**Comentários:** Os registros da distribuição de *P. floridiensis* limitavam-se à Flórida e Caribe. Esta espécie era ainda conhecida de profundidades mais rasas, entre 2 a 25 metros (Hendler *et al.*, 1995); neste trabalho foi encontrada a 45 metros de profundidade.

**Biologia:** Os indivíduos desta espécie vivem no interior de sedimentos lamosos ou arenosos, enterrando-se até 250 mm de profundidade (Chesher, 1966). Também são encontrados entre os grãos de sedimentos em associação com *Paraster doederleini* (Chesher, 1972) e outros equinóides espatangóides (Hendler *et al.*, 1995). Na baía de Camamu *P. floridiensis* estava associado ao ofiuróide *Amphioplus camamuensis* sp. n.

*Agassizia excentrica* Agassiz, 1879

**Material examinado:** Cinco exemplares coletados em janeiro e abril de 2003 nas estações GD2 (519693N/8499938E), GD10 (521811N/8494926E), GD11 (521793N/8499082) e GD14 (521055N/8492039E), entre 44 e 51 metros de profundidade.

**Diagnose:** Equinóides pequenos de formato oval. Sistema apical fora do centro e mais próximo da região posterior.

**Descrição:** Carapaças pequenas de formato oval medindo entre 5,0 e 18,0 mm de comprimento (Figuras 2 A, F). Carapaças cobertas por espinhos pequenos, afilados e vítreos; sobre as placas do plastrão estes espinhos são espatulados e pouco maiores que os demais (3mm) (Figura 2B); espinhos ao redor do periprocto muito pequenos. Os tubérculos

da região anterior que margeiam o ambulacro III são um pouco maiores que os demais. O sistema apical é pouco afastado do centro em direção à região posterior. Quatro poros genitais. A madreporita estende-se entre os poros genitais posteriores (Figura 2 C), o número de poros da madreporita tende a diminuir com o aumento da carapaça. Ambulacro III muito raso próximo ao sistema apical e quase que apenas marcado na região distal; os poros deste ambulacro são pequenos e difíceis de serem distinguidos. Pétalas pares anteriores mais longas que as posteriores, com os poros da série anterior diminutos, os demais semelhantes aos da série posterior. Periprocto situado verticalmente na margem superior da região lateral posterior; as placas do periprocto são um pouco maiores próximos às bordas e diminuem próximo ao centro (Figura 2E). Peristoma localizado na região ventral anterior com formato semilunar (Figura 2D), coberto por cerca de sete placas grandes. Esterno longo e triangular, recoberto por espinhos espatulados. Não foi possível observar nenhum pedicelário.

**Distribuição:** Do Caribe ao Brasil.

**Comentários:** É a primeira vez que a espécie é assinalada para a costa nordeste do Brasil.

**Biologia:** *A. excentrica* foi obtida no interior de sedimentos finos, junto aos ofiuróides *Amphiodia atra*, *Amphioplus camamuensis* sp. n. e *Amphiodia pulchella*.

*Ophiophragmus cubanus* (Clark, 1917)

**Material examinado:** Um exemplar da estação GD1 (517586N/ 8499079E) coletado em janeiro de 2003 a 36 metros de profundidade.

**Diagnose:** Papilas semelhantes a espinhos na margem do disco, espalhadas nas regiões dorsal e ventral.

Várias placas dorsais braquiais fendidas. Três espinhos braquiais pontiagudos e levemente comprimidos.

**Descrição:** Disco 9,5mm de diâmetro; acentuadas reentrâncias interradaiais, coberto por escamas pequenas e imbricadas. Braços muito longos, cerca de 150 mm de comprimento. Escudos radiais aproximadamente duas vezes mais longos do que largos, unidos principalmente na região distal e separados na porção proximal por até quatro escamas. Pequenas papilas espiniformes verticais na margem distal do disco, com falhas; numerosas papilas nas reentrâncias interradaiais do disco e próximo às extremidades distais dos escudos radiais, pouco presentes entre os escudos radiais e umas poucas espalhadas aleatoriamente entre as escamas da superfície dorsal do disco (Figura 4A). Região ventral recoberta por escamas semelhantes às da região dorsal. Papilas pequenas e espiniformes semelhantes àquelas observadas na região dorsal, em maior quantidade na porção mediana da região ventral interradaial. Fendas bursais longas com os bordos delineados por escamas um pouco maiores do que as da região ventral. Escudos orais losangulares com a extremidade proximal mais alongada. Escudos adorais subtriangulares contíguos e afilados na região proximal. Mandíbulas largas, côncavas e curtas com duas papilas orais de cada lado. Papila distal com formato triangular, maior que a proximal e posicionada próximo ao escudo adoral. Par de papilas infradentais em posição vertical no ápice da mandíbula; abaixo destas, uma fileira de dentes quadrangulares (Figura 4B). Placas ventrais dos braços de formato subpentagonal com pequenas reentrâncias laterais. Placas laterais proeminentes com três espinhos semelhantes; estes alargados na região proximal, afilados na extremidade distal e levemente comprimidos. Duas escamas tentaculares; a externa, subtriangular, posicionada na placa lateral. Placas braquiais dorsais mais largas do que longas com as bordas arredondadas, muitas fragmentadas na linha

média da região dorsal.

**Distribuição:** Ilhas Dry Tortugas, Cuba, Ilhas Virgens, Belize e Brasil.

**Biologia:** A espécie é encontrada em áreas de mangue, onde vive enterrada no sedimento lamoso, movendo lentamente as pontas de seus braços em direção à superfície do sedimento a fim de coletar alimentos entre os detritos. Muitas vezes é encontrada junto ao poliqueta comensal *Malmgreniella puntotorensis* (Hendler *et al.*, 1995). Na baía de Camamu foi coletada junto ao ofiuróide *Ophioderma brevispinum* (Say, 1825).

*Amphiplus camamuensis* sp. n.

**Holótipo:** um exemplar coletado na estação GD14 da Empresa Bioconsult Ambiental Ltda, Bacia de Camamu, Bahia.

**Parátipos:** 1 exemplar completo; 35 exemplares sem a parte superior do disco e duas partes superiores do disco isoladas obtidas no período de janeiro-junho de 2003 nas estações: GD1 (517586N/8499079E); GD2 (519693N/8499938E); GD9 (519686N/8494061E); GD10 (521811N/8494926E); GD11 (521793N/8499082E); GD13 (518948N/8491171E); GD14 (521055N/8492039E); GD15; GD16; GD18 (Sem coordenadas).

**Diagnose:** Pequeno ofiuróide de aparência delicada; escudos radiais estreitos e separados. Região dorsal e ventral do disco coberta por escamas pequenas e imbricadas; uma pequena escama tentacular; três espinhos braquiais.

**Descrição:** Discos 4,00 a 5,00 mm de diâmetro de contorno semipentagonal e com leves reentrâncias interradaiais. Escamas da região dorsal pequenas e

imbricadas. Escamas centro-dorsal e primárias muito pouco aparentes. Escudos radiais aproximadamente quatro a cinco vezes mais longos do que largos unidos apenas na extremidade distal e separados por cinco a seis escamas estreitas (Figura 3A). Região ventral do disco totalmente recoberta por escamas pequenas e imbricadas e pouco menores do que aquelas que cobrem a região dorsal. Fendas bursais longas margeadas por escamas estreitas. Escudos orais com a região distal arredondada e a proximal afilada. Escudos adorais triangulares afilados anteriormente e alargados na região distal, com uma leve depressão na margem distal. Um par de papilas infradentais no ápice das mandíbulas. Quatro papilas orais, a proximal pequena, e pouco afilada; a segunda e a terceira, maiores e com os bordos arredondados, esta última encostada no escudo adoral; a quarta, arredondada e menor que as demais, seria a escama do poro tentacular oral (Figura 3B). Braços longos, com as placas dorsais medianamente convexas e quase tão largas quanto longas. Placas braquiais ventrais subpentagonais com uma acentuada reentrância na margem distal. Uma pequena escama tentacular ao longo de todo o braço. Placas braquiais laterais tocam-se na região mediana ventral, com três espinhos levemente comprimidos e afilados.

**Etimologia:** Da localidade tipo, Bacia de Camamu, Bahia.

**Distribuição:** conhecida somente da localidade tipo.

**Comparações:** A nova espécie de equinodermo difere das demais espécies de *Amphioplus* assinaladas para o Brasil e regiões vizinhas principalmente no número de escamas tentaculares, duas em *Amphioplus lucyae* Tommasi, 1971, *A. albidus* (Ljungman, 1967), *A. brasiliensis* Tommasi, 1970 e *A. mathildae* Tommasi & Abreu, 1974. Difere de *A. corniortodes* H. L. Clark, 1918, pela ausência de escamas na região ventral e de 2 escamas tentaculares. *A. sepultus* Hendler, 1973 tem duas escamas tentaculares, *A. trombodes* H. L.

Clark, 1918 tem formato papilar das escamas da região dorsal do disco, *A. (Unioplus) daleus* (Lyman, 1879) tem escudos radiais mais largos, papila oral distal maior e espinho braquial médio maior.

**Biologia:** O novo *Amphioplus* foi coletado juntamente com os ofiuróides *Amphiodia pulchella*, *Amphiodia atra* e os equinóides *Agassizia excentrica* e *Paraster floridiensis*, a 36 - 51 metros de profundidade. Devido às suas características morfológicas, esta espécie é referida para fundos formados em sua maior parte por elementos finos.

Chave para as espécies do gênero  
*Amphioplus* Verril, 1899 da costa brasileira.

1 Uma escama tentacular Duas	<i>A. camamuensis</i> 2
2 Espinhos braquiais com dentículos Sem	3 4
3 Quatro a três espinhos braquiais largos e rombudos	<i>A. mathildae</i>
Três espinhos braquiais afilados	<i>A. brasiliensis</i>
4 Escamas centro-dorsal e primárias aparentes	<i>A. lucyae</i>
Não	<i>A. albidus</i>

*Comentários*

A maior ocorrência dos Ophiuroidea na bacia de Camamu parece estar de acordo com o esperado nas regiões tropicais (Manso & Absalão, 1988).

Com relação à dominância de espécies, *Amphiodia atra* foi a dominante, provavelmente devido ao hábito gregário e pouca mobilidade no sedimento, formando os chamados “bancos de ofiuróides” nos ambientes estuarinos e lagunais (Hendler, *et al.*, 1995, Hendler, 1996). Esta espécie pode viver associada ao ofiuróide *Hemipholis elongata*, em águas com salinidade e temperatura médias de 28‰ e 26,1°C (Tommasi, 1970; Nunes,

1975). *A. atra* pode ainda ser encontrada associada a *Ophiostigma isocanthum*, *Hemipholis elongata*, *Amphiopholis subtilis*, *Amphiodia riisei*, *A. pulchella* e *Ophiophragmus luetkeni* (Manso & Alves, 1999; Manso & Absalão, 1988).

**Agradecimentos:** Ao biólogo Mário Sérgio Ximenez, responsável direto pela coleta e envio do material à autora para ser identificado. À empresa de consultoria ambiental ENSR International Brasil Ltda, financiada pela EL Paso Óleo e Gás do Brasil Ltda., por permitir a publicação do trabalho. Aos biólogos Décio Maia e Patrícia Caussin pela coordenação de trabalho de monitoramento ambiental que resultou nas coletas dos espécimes estudados. À Dra. Ana Maria Gouveia pela correção do texto e valiosas sugestões.

#### REFERÊNCIAS

Chesher, R.H. 1966. Redescription of the echinoid species *Paraster floridiensis* (Spatangoida: Schizasteridae). **Bull. Mar. Sci.** 16:1-19.  
Hendler, G., J.E. Miller, D.L. Pawson & P.M. Kier, 1995.

**Sea stars, sea urchins and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean.** Smithsonian Institution Press, Washington 390p.  
Hendler, G. 1996. Taxonomic Atlas of the benthic fauna of the Santa Maria basin and western Santa Barbara Channel. Class Ophiuroidea. **Misc. Taxa** 14:113-179.  
Kier, P.M. & R.E. Grant, 1965. Echinoids distribution and habits, Key Largo Coral Reef Preserve, Florida. **Smithsonian Misc. Coll.** 149(6):1-68.  
Manso, C.L.C. & R.S. Absalão, 1988. Ophiuroidea: Situação pré-operacional nos Sacos de Piraquara, região sob influência da descarga da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto (CNAAA). **Rev. Brasil. Biol.** 48(1):75-82.  
Manso, C.L.C. & O.F.S. Alves, 1999. Equinodermos do infralitoral da Baía de Todos os Santos (BTS-BA). Resultados preliminares. **XII Encontro de Zoologia do Nordeste**, Resumos, Feira de Santana, Bahia p.353.  
Nunes, T.B. 1975. Echinodermata da baía de Aratu (Bahia: Brasil). **II Simpósio sobre Oceanografia Biológica**, UDO, Venezuela 179-189.  
Tommasi, L.R. 1970. Os Ofiuróides recentes do Brasil e de regiões vizinhas. **Contr. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paulo, ser. Ocean. Biol.** 20:1-146.

Aceito: 30.vii.2004

#### FIGURAS

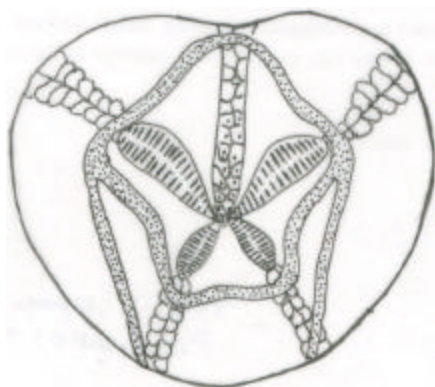


Figura 1. *Paraster floridiensis*: região aboral.

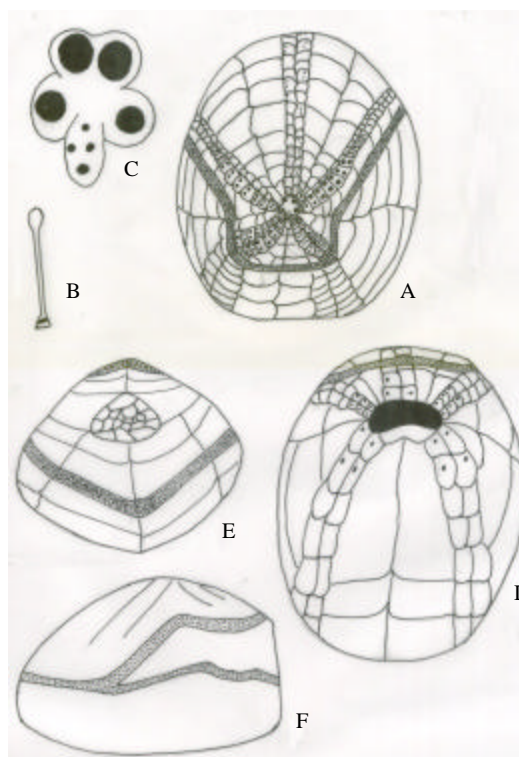


Figura 2. *Agassizia excentrica*. A: carapaça e ambulacros, B: espinho do plastrão, C: disco apical, D: região oral e peristoma, E: região posterior da carapaça e periprocto, F: região lateral da carapaça.

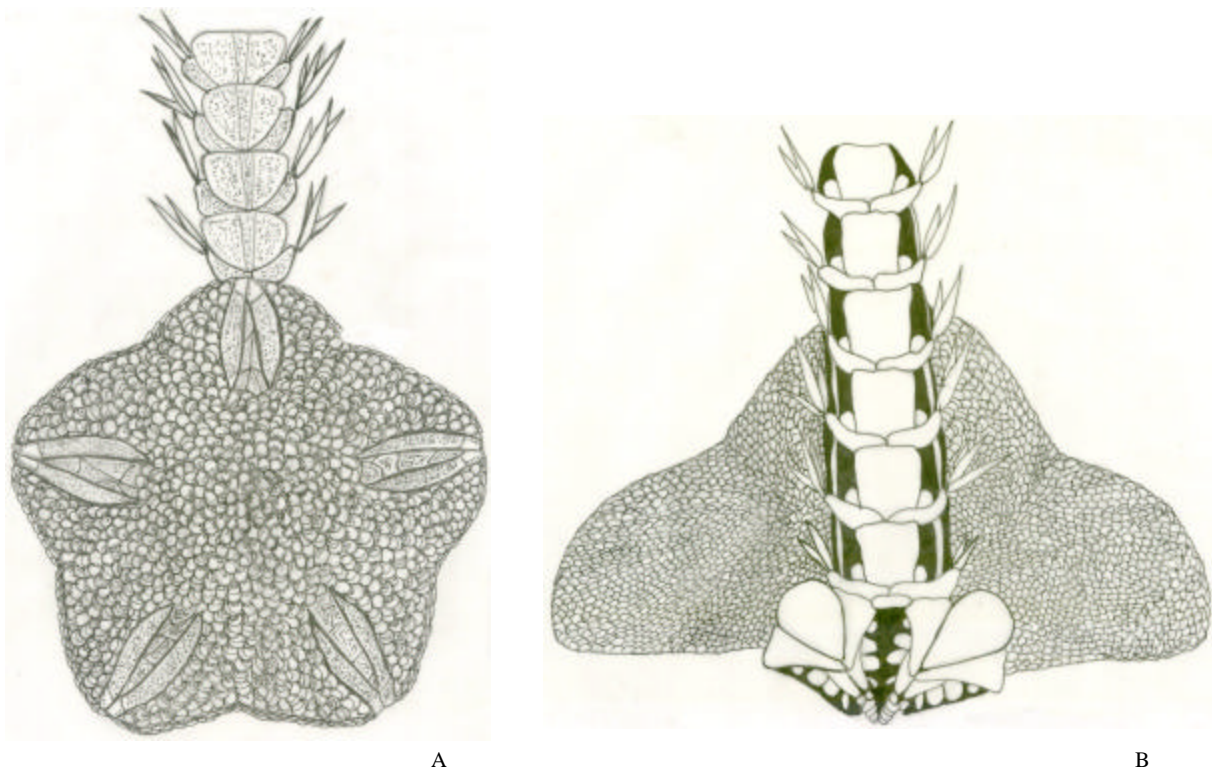


Figura 3. *Amphiplus camamuensis* sp. n.: A - região dorsal do disco, B - região ventral do disco.

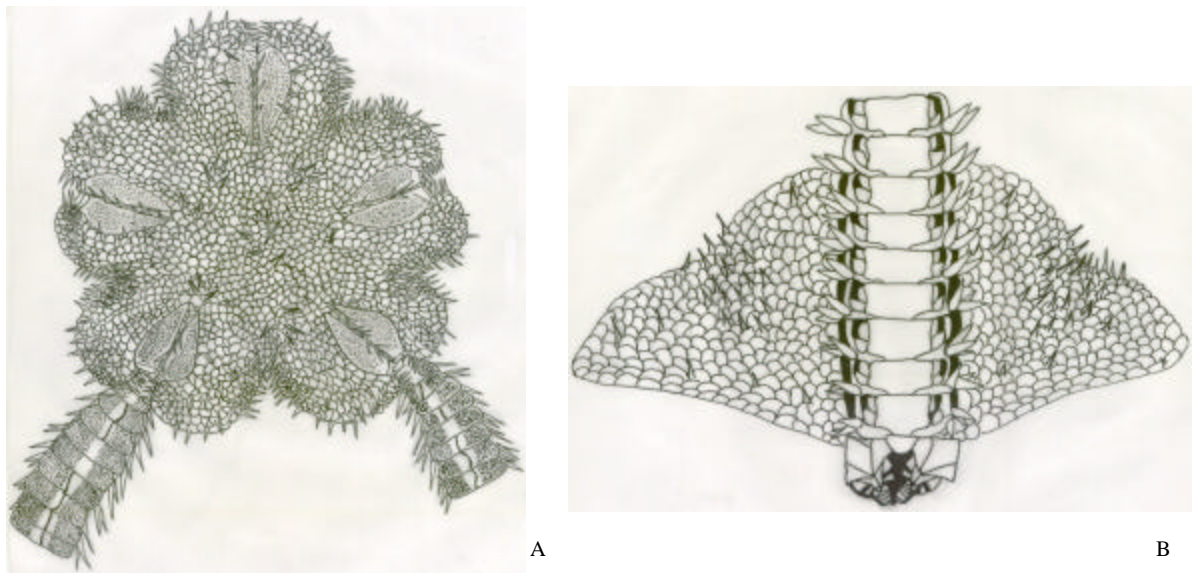


Figura 4. *Ophiophragmus cubanus*: A - região dorsal do disco, B - região ventral do disco.



# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 5 (1): 26-29

30.x.2004

## EMPREGO DE *POECILIA VIVIPARA* (CYPRINODONTIFORMES) E *ARTEMIA SALINA* (CRUSTACEA) PARA DETERMINAR A TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO EM SERGIPE, BRASIL

Edison Barbieri<sup>1</sup>

### RESUMO

A toxicidade aguda da água de produção de petróleo no Estado de Sergipe (Brasil) foi avaliada em *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea). Os animais foram expostos a diferentes diluições do efluente por 96 horas. Cinco réplicas com 10 indivíduos de *P. vivipara* foram submetidos às diluições de 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, e 50% de água de produção. O grupo controle não recebeu água de produção. Os indivíduos mortos foram contados após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição a água de produção. As CL50 foram 32.11%, após exposição de 24 horas, 24.57% em 48 horas, 22.77% em 72 horas e 19.98% em 96 horas. O intervalo da CL(I) para *A. salina* foi 28.24% e 29.12% durante 24 horas de exposição.

**Palavras-chave:** *Poecilia vivipara*, *Artemia salina*, toxicidade, água de produção, Brasil.

### ABSTRACT

The acute toxicity of effluent water from the production of petroleum in the Brazilian State of Sergipe was evaluated in *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) and *Artemia salina* (Crustacea). The animals were exposed to different concentrations of the effluent for a period of up to 96 hours. Five replicates of ten individuals of *P. vivipara* were exposed to 1%, 5%, 10%, 20%, 30% and 50% dilutions of effluent water. The control group did not receive effluent water. Dead individuals were counted after 24, 48, 72 and 96 hours of exposure. The LC50s were 32.11% after 24 hours of exposure, 24.57% in 48 hours, 22.77% in 72 hours and 19.98% in 96 hours. The LC50 interval for *A. salina* was 28.24% to 29.12% during 24 hours of exposure.

**Key words:** *Poecilia vivipara*, *Artemia salina*, toxicity, effluent water, Brasil.

### INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade são necessários para avaliar a poluição aquática, uma vez que os testes físico-químicos são ineficazes em detectar efeitos deletérios causados à biota, bem como não detectam várias classes de compostos químicos poluentes (Tarzwell, 1971; Pantini *et al.*, 1995; Barbieri, Phan & Gomes, 2000). Para estimar os efeitos deletérios de materiais tóxicos sobre o ambiente, frequentemente são

necessárias respostas rápidas e os testes de toxicidade aguda são ferramentas confiáveis para estimar as concentrações nas quais produtos tóxicos podem provocar efeitos deletérios sobre os organismos.

Os peixes e invertebrados aquáticos são sensíveis às variações de parâmetros ambientais e por isso são utilizados como modelos para testes de poluentes (Barbieri, Phan & Gomes, 1998; Barbieri, Oliveira & Serralheiro, 2002). Entretanto, são poucas as espécies aquáticas tropicais que têm sua

<sup>1</sup>Instituto de Pesca-SAASP, caixa postal 61, CEP 11990-000, Cananéia (SP), edisonbarbieri@yahoo.com.br

sensibilidade determinada, o que leva à utilização de informações da literatura sobre a toxicidade de efluentes avaliados em outros países, em condições ambientais diferentes das encontradas no Brasil, como no caso da toxicidade da água produzida derivada da extração de petróleo e gás. Pesquisas sobre toxicidade em ambientes brasileiros são de grande interesse, não só para os programas de agentes tóxicos, como também na avaliação de possíveis impactos ambientais de substâncias tóxicas sobre a biota aquática e suas possíveis implicações na preservação ambiental, pois durante a produção de petróleo e gás há a liberação para o ambiente de um grande volume de água produzida (Henderson *et al.*, 1999). A água produzida é a maior fonte de poluição relacionada às atividades petrolíferas, pois ela contém muitos contaminantes, incluindo hidrocarbonetos, metais pesados e aditivos químicos (Higashi *et al.* 1992; Stephenson, 1992). O objetivo do presente trabalho foi determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de toxicidade seguiram as recomendações da 17ª e 18ª edições do “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 1989, 1992). Os animais utilizados nos testes foram o peixe ciprinodontiforme *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 e embriões do crustáceo *Artemia salina* (L., 1758), mantidos em aquários de vidro.

Para a obtenção de náuplios de *A. salina* utilizou-se um lote de cistos procedentes das salinas da região de Macau (RN). Foram utilizados náuplios de 6 a 8 horas de idade, obtidos 24 horas após o preparo dos cistos para a eclosão, com a finalidade de utilizar nos testes náuplios no estágio II de desenvolvimento (Veiga, 1989).

Os testes com *Poecilia vivipara* foram realizados em sistema semi-estático com a renovação

da solução-teste a cada 24 horas, utilizando-se água desionizada. Para a análise da toxicidade aguda da água de produção, foram empregadas as diluições 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, e 50%. O grupo controle não recebeu água de produção. Como a salinidade da água de produção de petróleo foi 48, foram utilizados controles com salinidade diferentes: um com salinidade 0 e outro 25, pois na diluição de 50% a salinidade foi 25. Os parâmetros da água dos aquários foram monitorados nos instantes 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas: temperatura (20.0-25.0°C), oxigênio dissolvido (7.5-7.8mgO<sub>2</sub>/l), pH (6.54-7.53), amônia (0.076-3400mg/l) e condutividade (220-31000mS/cm).

Foram utilizados dez peixes para cada concentração com cinco réplicas. Para mortalidade foram determinadas as concentrações letais (CL) do agente tóxico que causa mortalidade de 50% dos organismos em 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando-se a terminologia CL(I), proposta por Lloyd & Tobby (1979). Foram considerados somente os testes em que a mortalidade no controle não foi superior a 10% dos organismos testados.

#### RESULTADOS

Nos ensaios de *Poecilia vivipara* com água de produção de petróleo constatou-se aparente similaridade entre as cinco réplicas. Os valores das CL(I) obtidos para as diluições de água produzida situaram-se entre 29.42% e 33.98%, durante o período de exposição de 24 horas, 24.18% e 26.15% em 48 horas, 22.35% e 24.18% em 72 horas, 17.94% e 22.35% em 96 horas (Tabelas 1 e 2).

Os valores das CL(I) obtidos para as diluições de água produzida durante o período de exposição de 24 horas, utilizando *Artemia salina* como indicador, situaram-se entre 28.24% e 29.12%. Estes resultados foram aparentemente similares entre as réplicas (Tabela 2).

O aumento da concentração e do tempo de

Tabela 1. Toxicidade aguda da água de produção de petróleo em diferentes períodos de exposição para *Poecilia vivipara*.

	CL(D)50	Intervalo de Confiança	
	% de diluição	Limite Inferior	Limite Superior
<i>Réplica 1</i>			
24h	33,98	29,06	39,73
48h	26,15	23,17	29,52
72h	24,18	20,01	29,21
96h	22,35	17,88	27,95
<i>Réplica 2</i>			
24h	31,83	26,81	37,78
48h	24,18	20,01	29,21
72h	22,35	17,88	27,95
96h	18,72	13,85	25,29
<i>Réplica 3</i>			
24h	31,80	26,81	37,78
48h	24,18	20,01	29,21
72h	22,35	17,88	27,95
96h	20,67	16,28	26,23
<i>Réplica 4</i>			
24h	29,42	23,50	36,84
48h	24,18	20,01	29,21
72h	22,65	19,58	26,19
96h	17,94	14,36	22,26
<i>Réplica 5</i>			
24h	33,54	27,76	40,42
48h	24,18	20,01	29,21
72h	22,35	17,88	27,95
96h	20,25	15,17	27,03

Tabela 2. Toxicidade aguda da água de produção de petróleo durante 24 horas de exposição para *Artemia salina*.

Réplicas	Valores de CL(D)50	Intervalo de confiança	
	em 24 horas	Limite inferior	Limite superior
1	28,24	26,49	30,11
2	28,44	26,43	30,61
3	26,95	24,23	28,82
4	27,82	25,32	29,12
5	29,12	28,34	31,42

exposição à água de produção causaram maior mortalidade. Nas concentrações iguais ou menores do que 5% de água produzida não houve mortalidade. Em todos os tempos de exposição testados a mortalidade atingiu níveis próximos a 54% após 24 horas e de 100% após 48 horas de exposição a 40% de água de produção. Após 24 horas de exposição com 50% de água de produção a mortalidade de *Poecilia vivipara* atingiu 100%. Nas concentrações onde a quantidade foi inferior a 5% de água produzida não ocorreram mortes nos tempos de exposições testados (24, 48, 72 e 96 horas).

## DISCUSSÃO

O efeito de poluentes nos organismos é complexo, resultante das interferências físico-químicas do meio externo e das funções vitais. Para monitorar a qualidade ambiental é necessário que sejam avaliados rapidamente estes efeitos. Testes de CL50, que quantificam alterações nas taxas de mortalidade sob influências deletérias, são amplamente empregados para esse fim (Barbieri, Oliveira & Serralheiro, 2002).

A comparação das concentrações letais (CL50 e CL100) mostra que na mesma espécie os indivíduos não reagem com a mesma intensidade à mesma concentração de uma substância. Por isso, ao serem avaliadas a toxicidade de um produto químico sobre o ambiente não deve ser considerado apenas o efeito médio sobre um grupo de indivíduos, mas também deve ser considerada a sensibilidade individual, que pode variar em relação aos diferentes tóxicos do ambiente (van Egmond, Hambling & Marshall, 1999; Barbieri, Serralheiro & Rocha, 2001).

A sensibilidade individual é determinada por fatores hereditários e influenciada pela idade dos indivíduos, devido às modificações na atividade de diversas enzimas. Por isso, peixes juvenis são geralmente mais sensíveis a certas toxinas. Nos primeiros estágios de desenvolvimento os organismos

apresentam maior sensibilidade, provavelmente devido à maior atividade mitótica durante estas fases (Swedmark *et al.*, 1971). A capacidade de absorção reduzida do estômago e do intestino pode também diminuir a sensibilidade de algumas substâncias tóxicas (Barbieri, Oliveira & Serralheiro, 2002). É mais comum, contudo, verificar que peixes com mais idade se mostrem mais sensíveis a poluentes químicos do ambiente, pois a metabolização e excreção dos contaminantes se processa de modo mais lento.

Neste estudo, a CL(I)50 de *Poecilia vivipara* exposta à água produzida apresentou sobreposição nos intervalos de confiança entre os tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas), sugerindo que os resultados podem ser reprodutíveis. Brendehaug *et al.* (1992) estudaram a toxicidade de água produzida em *Skeletonema costatum* (microalga), *Artemia salina* (crustáceo) e *Photobacterium phosphoreum* (bactéria). Eles constataram que a letalidade em *A. salina* situou-se abaixo de 20% de água produzida e que a toxicidade foi mais alta em *P. phosphoreum*. Os valores obtidos por Henderson *et al.* (1999) para a toxicidade de água produzida utilizando a bactéria *P. phosphoreum*, variaram entre 5% e 12%, enquanto os valores médios de EC(50) para *Skeletonema costatum* foi 28% de água produzida. Neste estudo, a toxicidade para *Artemia salina* situou-se abaixo de 29% de água produzida, semelhante ao encontrado por Brendehaug *et al.* (1992).

#### BIBLIOGRAFIA

- APHA, 1989. **Standard methods for examination of water and wastewater**. American Public Health Association. 17 ed. Washington.
- APHA, 1992. **Standard methods for examination of water and wastewater**. American Public Health Association. 18 ed. Washington.
- Barbieri, E., V. N. Phan & V. Gomes, 1998. Efeito do DSS, Dodecil Sulfato de Sódio, no metabolismo e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. **Rev. bras. Biol.** 58(2):263-271.
- Barbieri, E., V.N. Phan & V. Gomes, 2000. Linear alky ibenzene aulphonate, on metabolic rate and swimming capacity of *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology and Environmental Restoration** 3(2):69-75.
- Barbieri, E., P.A.C. Serralheiro & I.O. Rocha, 2001. Alteration of *Centropomus paralelus* exposed to LAS-C12 (Dodezil benzene sodium sulfonate). **Cadernos** 7(2):56-66.
- Barbieri, E., I.R. Oliveira & P.A.C. Serralheiro, 2002. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* according to the temperature and salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 277:109-127.
- Brendehaug, J., S. Johnsen, K.H. Bryme, A.L. Gjose, T.H. Eide & E. Aamot, 1992. Toxicity testing and chemical characterization of produced water - a preliminary study pp. 248-256. *In: Produced Water. Technological Environmental Issues and Solutions* (Ray, J.P. & F.R. Engelhardt Eds.) New York.
- Henderson, S.B., S.J.W. Grison, P. Johnson & B.D. Roddie, 1999. Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. **Marine Pollution** 38(12):1141-1151.
- Higashi, R.M., G.N. Cherr, C.A. Bergens & T. W. M. Fan, 1992. An approach to toxicant isolation from a produced water source in the Santa Barbara Channel, pp.223-233. *In: Produced Water: Technological/ Environmental Issues and Solutions* (Ray, J.P. & F.R. Engelhardt, Eds.). Plenum Press, New York.
- Lloyd, R. & T.E. Tooby, 1979. New terminolgy required for short-term static fish bioassay LC(I)50. **Bull Environm. Contam. Toxicol.** 22(1):3.
- Pantini, C., N. Spret, M.C. Maggitti & R. Germani. 1995. Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod *Echinogammarus tibaldii*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 55:179-186.
- Stephenson, M.T., 1992. A survey of produced water studies, pp. 1-11. *In: Produced Water: Technological/ Environmental Issues and Solutions*. (Ray, J.P. & F.R. Engelhardt Eds.), Plenum Press, New York.
- Swedmark, M., B. Braaten, E. Emanuelsson & A. Granmo. 1971. Biological effects of surface active agents on marine animals. **Mar. Biol.** 9:183-201.
- Tarzwel, C.M. 1971. Bioassays to determine allowable waste concentrations in the aquatic environment. I-Measurement of pollution effects on living organisms. **Proc. Royal Soc. London** B177:279-298.
- Van Egmond, R., S. Hambling & S. Marshall. 1999. Bioconcentration, biotransformation, and chronic toxicity of sodium laurate to zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry** 18(3):466-473.
- Veiga L.F. 1989. Avaliação da faixa de sensibilidade de *Artemia salina* ao lauril sulfonato de sódio. Rio de Janeiro. Petrobras/Cempes/Supes/Diter 64p.

# Biologia Geral e Experimental

Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão, SE 5 (1): 30-33

30.x.2004

## INFLUÊNCIA DO ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO NO CRESCIMENTO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

Marlucia Cruz de Santana<sup>1</sup>  
Silvio Lopes Teixeira<sup>2</sup>

### RESUMO

Neste estudo foi adicionado ANA (ácido naftalenoacético 5, 10 e 15mgL<sup>-1</sup>) ao meio de cultura em três grupos de plântulas de coqueiro para verificar *in vitro* a influência do ácido na eficiência do enraizamento e no crescimento da parte aérea das plântulas. O grupo controle não recebeu ANA. Após 60 dias de cultivo, as diferenças entre as variáveis comprimento da parte aérea e número de raízes foram significativamente diferentes do controle e mais eficientes nas concentrações 5mgL<sup>-1</sup> (parte aérea) e 15mgL<sup>-1</sup> (número de raízes) de ANA. Após 90 dias de cultivo as diferenças entre as variáveis tamanho das plântulas e número de raízes foram significativamente diferentes do controle e mais eficientes nas concentrações 15mgL<sup>-1</sup> (plântulas) e 10mgL<sup>-1</sup> (raízes) de ANA.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*, embrião zigótico, ANA, crescimento, enraizamento.

### ABSTRACT

In this study, NAA (naphthalenoacetic acid) was added to three groups (5, 10 and 15mgL<sup>-1</sup>) of coconut palm plantule cultures in order to evaluate the *in vitro* influence of the acid on plantule rooting and the efficiency of the growth of aerial parts. The control group did not receive NAA. After 60 days of culture, the variables aerial part length and number of roots were significantly different from the control and more efficient at 5mgL<sup>-1</sup> (aerial part) and 15mgL<sup>-1</sup> (number of roots) of NAA. After 90 days of culture, the variables size of plantule and number of roots were significantly different from the control and more efficient at 15mgL<sup>-1</sup> (plantules) and 10mgL<sup>-1</sup> (roots) of NAA.

**Keywords:** *Cocos nucifera*, zygotic embryo, NAA, growth, rooting.

### INTRODUÇÃO

A produtividade das culturas de coco (*Cocos nucifera* L.) está diminuindo em todas as regiões do mundo. Dentre os fatores responsáveis por este declínio situam-se a carência de variedades com mais produtividade e a erosão genética. A sustentabilidade das culturas do coco depende da disponibilidade e acesso à diversidade genética pelos melhoristas e produtores (Batugal & Engelman, 1997). Uma das

soluções para testar metodologias com a finalidade de aumentar a eficiência das culturas de coco é incrementar pesquisas com embriões zigóticos *in vitro* para otimizar o crescimento e o enraizamento das plântulas, objetivo deste estudo.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados embriões de coco com cerca de 11 meses de idade, provenientes da Estação

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, SE, CEP 49100-00, mar@ufs.br

<sup>2</sup> Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, teixeira@uenf.br

Experimental da PESAGRO, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

O meio de cultura utilizado foi o Y3 de Eeuwens (1976), com vitaminas de Morel e Wetmore (1951), caseína hidrolisada (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (6%), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1 mg L<sup>-1</sup>) e ágar (0,6%). O pH da cultura foi ajustado em 5.8 antes da autoclavagem.

Sessenta dias após a inoculação (DAI) em meio básico, as plântulas foram transferidas para meio de cultura com ácido naftalenoacético (ANA), constituindo três grupos experimentais com 5mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> e 15 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Cada grupo foi composto por três repetições constituídas por embriões provetas, um embrião por proveta. O grupo controle recebeu apenas meio de cultura sem ANA. A duração dos tratamentos foi de 90 dias. A cada 30 dias as plântulas foram transferidas para novo meio de cultura, com as mesmas composições e concentrações de ANA.

Os embriões foram incubados em câmara de crescimento no escuro. Na fase de germinação a temperatura foi mantida a 29 °C; após 60 dias as plântulas foram cultivadas a 34 °C. Trinta dias após a inoculação as plântulas foram expostas a fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas Gro-Lux.

As variáveis utilizadas foram os comprimentos da folha, da raiz primária e da plântula e o número de folhas e raízes por plântula. A estatística utilizada foi análise de variância seguida por teste de Tukey, o nível de significância foi de 5% (Zar, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 60 dias de cultivo dos embriões em meio de cultura com ANA, as diferenças entre as variáveis tamanhos das plântulas, das raízes primárias e do número de folhas não foram significativamente diferentes do controle ( $F_{0.05(1)3,8} = 3.04$ ,  $p > 0.05$ ;  $F_{0.05(1)3,8} = 3.17$ ,  $p > 0.05$  e  $F_{0.05(1)3,8} = 2.89$ ,  $p > 0.05$ ,

respectivamente; Tabela 1), mas as diferenças entre os tamanhos das partes aéreas e o número de raízes foram significantes ( $F_{0.05(1)3,8} = 4.92$ ,  $p < 0.05$  e  $F_{0.05(1)3,8} = 6.37$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente; Tabela 1). Contribuiu para a significância da variável comprimento da parte aérea a concentração 5mgL<sup>-1</sup> de ANA; para a significância da variável número de raízes contribuiu a concentração 15 mgL<sup>-1</sup> de ANA (Tabela 2).

Quando as plântulas estavam com 90 dias de cultivo as variáveis comprimento da parte aérea, raízes e número de folhas não foram significativamente diferentes do controle ( $F_{0.05(1)3,8} = 2.26$ ,  $p > 0.05$ ;  $F_{0.05(1)3,8} = 3.54$ ,  $p > 0.05$  e  $F_{0.05(1)3,8} = 3.25$ ,  $p > 0.05$ , respectivamente; Tabela 3), mas as variáveis comprimento da plântula e o número das raízes foram significantes quando comparadas com o controle ( $F_{0.05(1)3,8} = 6.12$ ,  $p < 0.05$  e  $F_{0.05(1)3,8} = 8.10$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente; Tabela 3). Contribuiu para a significância da variável comprimento da plântula a concentração de 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA; para a variável número de raízes a maior contribuição foi na concentração 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA (Tabela 4).

A dificuldade de enraizamento das plântulas de coqueiro cultivadas *in vitro* tem sido relatada na literatura desde os experimentos pioneiros de cultivo de embriões de coco realizados por De Guzman e Del Rosario (1964). Esta dificuldade é um sério problema que compromete a cultura do embrião zigótico do coco e a sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização, porque as plântulas podem desenvolver um deficiente sistema radicular ou mesmo nenhuma raiz (Verdeil *et al.*, 1997). A utilização de 20 mgL<sup>-1</sup> de ANA, associado à utilização de carvão ativado no meio de cultura, aumenta a eficiência na formação de sistema radicular nos embriões de coqueiro *in vitro*, mas Assy-Bah (1986) relata que tal procedimento tem efeitos negativos sobre o crescimento das plântulas na fase *ex vitro*.

Nos experimentos deste estudo, houve crescimento no comprimento das raízes em resposta à concentração de ANA, porém sem atingir um pico,

Tabela 1. Anova: crescimento e enraizamento de plântulas de *C. nucifera* em meio de cultura com ANA, após 60 dias de cultivo.

Origem	g.l.	Comprimento da Parte Aérea (cm)	Comprimento da Raiz Primária (cm)	Tamanho da Plântula (cm)	Número de Folhas	Número de Raízes
Entre	3	29.85	2.7	33.58	0.26	31.43
Erro	8	6.06	0.85	11.04	0.09	4.93

g.l., graus de liberdade

Tabela 2. Teste de Tukey: análise da significância das diferenças entre os grupos parte aérea e raízes de plântulas de *C.nucifera* em meio de cultura com ANA, após 60 dias de cultivo.

Concentração de ANA (mgL <sup>-1</sup> )	Comprimento da Parte Aérea (cm)	Número de Raízes
Controle	18.67 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>b</sup>
5	23.30 <sup>a</sup>	5.93 <sup>b</sup>
10	16.77 <sup>b</sup>	5.67 <sup>b</sup>
15	16.47 <sup>b</sup>	12.33 <sup>a</sup>

Médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.

Tabela 3. Anova: Crescimento e enraizamento de plântulas de *C. nucifera* em meio de cultura com ANA, após 90 dias de cultivo.

Origem	g.l.	Comprimento da Parte Aérea (cm)	Comprimento da Raiz (cm)	Comprimento da Plântula (cm)	Número de Folhas	Número de Raízes
Entre	3	5.84	10.53	29.45	0.13	29.49
Erro	8	2.58	2.97	4.81	0.04	364

g.l., graus de liberdade

Tabela 4. Teste de Tukey: análise da significância das diferenças entre os grupos plântulas e raízes de plântulas de *C.nucifera* em meio de cultura com ANA, após 90 dias de cultivo.

Concentração de ANA (mgL <sup>-1</sup> )	Comprimento da Plântula (cm)	Número de Raízes
Controle	28.65 <sup>b</sup>	4.07 <sup>b</sup>
5	33.02 <sup>ab</sup>	7.53 <sup>ab</sup>
10	36.27 <sup>a</sup>	11.33 <sup>a</sup>
15	33.17 <sup>ab</sup>	9.67 <sup>a</sup>

Médias iguais nas colunas são representadas pelas mesmas letras.

mesmo na maior concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>. Ziv (1995) considera que o sistema radicular deficiente é uma das principais causas da morte de plântulas na fase *ex vitro*. Dificuldades no enraizamento das plântulas de coqueiro foram observadas desde o início do desenvolvimento da técnica (Reynolds, 1982). Em experimento *in vitro* conduzido com embrião de *Zizania aquatica* L., também foi observado que o crescimento em cultura foi caracterizado pelo desenvolvimento precoce da parte aérea e crescimento mínimo da raiz primária (Crocker & Barton, 1957).

A necessidade de uma fase de enraizamento com ANA para plântulas de coqueiro cultivados *in vitro* foi confirmada neste estudo, o que concorda com os dados de Melo (2000) para plântulas da guarirrobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.), as quais plântulas não formaram raiz fasciculada na ausência de reguladores de crescimento. A utilização de ANA na concentração de 1.0 mgL<sup>-1</sup> no meio de cultura foi necessária para promover o enraizamento adequado dessa palmeira, uma concentração bem inferior à necessária para enraizamento de plântulas de coqueiro.

#### REFERÊNCIAS

- Assy Bah, B. 1986. Culture in vitro d'embryons zygotiques de cocotiers. **Oléagineux** 41(7):321-328.
- Batugal, P.A. & F. Engelmann., 1997. **Coconut embryo in vitro culture**. Proceedings of the first workshop on embryo culture. Banao, Guinobatan, Albay, Philippines, IPGRI 64p.
- Crocker, W. & L.V. Barton, 1957. **Physiology of seeds: an introduction to the experimental study of seed and germination problems**. Waltham, Massachusetts, Chronica Botanica Company 267p.
- De Guzman, E.V. & D.A. Del Rosario, 1964. The growth and development of *Cocos nucifera* L. 'Macapuno' embryos in vitro. **The Philippine Agriculturist** 48:82-94.
- Eeuwens, C.J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum** 36:23-28.
- Melo, B. de 2000. **Cultivo de embrião in vitro da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras 117p.
- Morel, G.M. & R.H. Wetmore., 1951 Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany** 38:141-143.
- Reynolds, J.F. 1982. Vegetative propagation of palm trees pp.183-207. *In: Tissue culture in forestry* (Bonga, J.M. & D.J. Durzan, Eds.). The Hague, Martinus Nijhoff Publishers.
- Verdeil, J.L., J.L. Hoche, A. Rival & S. Hamon, 1997. Improving the efficiency on coconut zygotic embryo culture: a physiological and biochemical approach pp.112-117. *In: Coconut embryo in vitro culture: Proceedings of the first workshop on embryo culture* (Batugal P. A., & F. Engelmann, Eds). Banao, Philippines, IPGRI.
- Zar, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**. 3rd ed. Prentice-Hall, New Jersey. 662p.+Tabs.
- Ziv, M. 1995. *In vitro* acclimatization pp. 493-538. *In: Automation and environmental control in plant tissue culture* (Aitken-Christie, J., T. Kozai & M.A.L. Smith, Eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.



**INSTRUÇÕES AOS AUTORES:** *Biologia Geral e Experimental* é uma publicação semestral da Universidade Federal de Sergipe, publica manuscritos originais de todas as áreas da biologia geral e experimental. Os manuscritos devem ser enviados em **três vias** datilografadas em espaço duplo. A **primeira página** deve conter o título, nome(s) do(s) autor(es), instituição, número de figuras e tabelas, palavras-chave (até 5), título abreviado para cabeça de páginas, nome e endereço do autor para correspondência. A **segunda página** deve conter Resumo e Abstract. As **páginas seguintes** devem conter os itens Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Agradecimentos nesta ordenação quando possível. Notas de rodapé deverão ser evitadas. Nas **citações** devem ser utilizadas letras minúsculas sem destaque. As **referências** deverão conter sobrenome e iniciais dos autores citados, ano, título, nome da revista abreviado e em destaque, volume, número, primeira e última páginas. *Exemplo:* Fisher, R.A. & B.Balmukand, 1928. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. **J. Genet.** 20:79-92. Citações de artigos de livros deverão ser mais completas. *Exemplo:* Elliot, W.B. 1978. Chemistry and immunology of reptilian venoms, p. 163-436. *In:* **Biology of the Reptilia** (C.Gans & K.A.Gans, Eds.). Academic Press, London and New York 782 p. **Tabelas, gráficos e figuras** devem ser apresentadas separadamente, com indicações no texto onde deverão ser inseridos. A Redação da revista se encarregará da primeira revisão das provas, a revisão final será responsabilidade dos autores.

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS:** *Biologia Geral e Experimental* is a bi-annual publication of the Universidade Federal de Sergipe, meant to publish original manuscripts in all areas of the experimental and general biology. Manuscripts should be sent in three typewritten double spaced copies. The **first page** should contain the title, name(s) of the author(s), number of figures and tables, key words (up to 5), abbreviated title for running heads, name and address of the author for correspondence. The **second page** should contain the abstract. The **following pages** should contain the items Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Acknowledgements in that order when possible. Footnotes should be avoided. **Citations** should be in low case. **References** should first contain the last name followed by the initials of the authors, title, abbreviated name of the journal, volume, number, first and last pages. *Example:* Fisher, R.A. & B.Balmukand, 1928. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. **J. Genet.** 20:79-92. Citations of articles in books should be complete. *Example:* Elliot, W.B. 1978. Chemistry and immunology of reptilian venoms, p. 163-436. *In:* **Biology of the Reptilia** (C.Gans & K.A.Gans, Eds.). Academic Press, London and New York 782 p. **Tables, graphs and figures** should be presented separately, with indications in the text for inclusion. The staff of the journal (Redação) will make the first revision of the drafts; the final revision will be the authors' responsibility.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
AV. MARECHAL RONDON S/N - JARDIM ROSA ELZE  
SÃO CRISTÓVÃO - SE. 49100-000