

Técnicas de preparação microscópica de Artrópodes

por J. MONTEIRO GUIMARÃES

É situação corrente para o técnico de fitossanidade ter de recorrer a preparações microscópicas de material infestante a fim de chegar ao conhecimento do agente causal.

Se é certo que para o fitiatra bastará em muitos casos o estudo da sintomatologia e o exame macroscópico do agente, também é verdade que em muitos outros casos a determinação segura da espécie atacante só com o auxílio do microscópio composto será possível.

Referindo-nos por agora apenas aos Artrópodes, nomeadamente insectos e ácaros, podemos dizer que nem sempre é indispensável a execução de preparações microscópicas. De facto, o reconhecimento específico de numerosos insectos é possível mediante a observação directa dos exemplares com o auxílio do microscópio estereoscópico, vulgarmente conhecido por «lupa», não necessitando recorrer às referidas preparações. Contudo, para facilitar o exame, proceder-se-á a uma montagem do tipo macroscópico. São exemplos disto as montagens em alfinete, quer directamente quer por colagem numa ponta de cartolina.

Desde que se tenha de empregar uma ampliação superior a 50 ou 100 vezes, passa-se ao domínio do microscópio propriamente dito e, assim, à obrigação de preparar o material entre lâmina e lamela.

IMPRENSA PORTUGUESA — Porto

Isto não acontece somente com os espécimes mais pequenos, inferiores a 3 mm de comprimento, mas também com outros maiores quando se pretende examinar uma peça ou uma parte destacada, como por exemplo uma peça bucal, o aparelho reprodutor, uma escama, ou um articulo numa pata. Em tudo o que se segue referimo-nos exclusivamente à microscopia óptica.

Tipos de preparação e sua escolha

Mesmo dentro de um grupo restrito, como o dos Artrópodes, podem considerar-se diversos tipos de preparação e são numerosas as técnicas possíveis. Além de necessidade de preparar material somente para identificação, há também a de constituir com ele colecções de referência que, por esse facto, deverão ser de longa duração. Temos assim preparações temporárias e preparações permanentes que diferem essencialmente no meio de montagem. Evidentemente que há também a considerar inúmeros casos relacionados com estudos especiais, e nestes podem estar incluídas preparações em esfregaço (por ex.: hemolinfa de insectos), e toda uma série de técnicas

• prepara a col.
hemolinfa
• prepara a col.
hemolinfa

histológicas (cortes finos de tecidos ou órgãos).

Perante uma vastíssima lista de métodos utilizáveis em micrografia, a dificuldade não reside tanto na execução perfeita de uma determinada técnica como numa escolha acertada. O que é realmente necessário é definir claramente o que se pretende observar em face do material dado e das disponibilidades de meios e de tempo.

Dum modo geral pode dizer-se que não existem técnicas perfeitas ou ideais para todos os casos. E é também bom lembrar que quanto maior for o número de manipulações maior é o risco de deterioração do material. Por outro lado, pode acontecer não ser possível obter tudo o que se pretende com uma só técnica e assim tornar-se necessário dividir o material disponível em duas ou mais partes que serão dirigidas para outras tantas técnicas.

É muito fácil a ocorrência de insucessos a pessoas pouco experientes. A estas recomenda-se um exame de pormenor, fase por fase, ao material em tratamento pois é certo que o mais leve descuido pode levar à sua inutilização completa. Contudo, em muitos casos é impossível evitar certas alterações, sobretudo na pigmentação e na proporção das dimensões. O técnico deverá estar ciente dessa possibilidade e saber interpretar correctamente a preparação.

Referimo-nos atrás a alguns tipos de preparação e à existência de numerosos métodos ou técnicas. Na verdade existem tantos métodos quantos queira a nossa imaginação.

O essencial é sabermos o que podemos esperar das propriedades de um número relativamente pequeno de reagentes apropriados aos trabalhos com Artrópodes. Se assim for, poderemos com êxito ajustar um dado método conhecido, modificando-o de acordo com o estado particular em que o nosso material se encontra.

Técnicas gerais usadas na montagem de Artrópodes

Dum modo geral podemos indicar as seguintes fases na preparação do material do tipo aqui considerado:

Anestesia e morte — Fixação — Dissecção (quando necessária) — Despigmentação ou Diafanização — Coloração (quando necessária) — Preparação para a montagem — Montagem — Acabamento.



Este esquema pode, no entanto, ficar reduzido a uma única operação, a da *montagem*. É, por exemplo, o caso de certos ácaros e insectos de pequenas dimensões e pouco pigmentados, montados num meio do tipo «Berlese». De facto, este meio é constituído de tal modo que ao mesmo tempo assegura a morte de pequenos animais, fixa-os e diafaniza-os sem requerer qualquer tratamento prévio, garantindo ainda uma presa suficiente da lamela ao fim de alguns dias.

1. Apreciando fase por fase, não nos determos na anestesia e morte, apenas aqui referindo que em certos casos é importante conseguir que os animais fiquem em extensão perfeita, o que pode requerer procedimento adequado, como por exemplo a adição de algumas gotas de acetato de etilo ao líquido de colheita ou emprego deste último previamente aquecido.

2. A fixação, que é uma etapa indispensável e crítica nas técnicas citológicas e histológicas, é aqui facilmente conseguida com o emprego dos líquidos normais de conservação: álcool, formol, ácido acético, etc.

3. Quando necessária a dissecção, se não for adequadamente realizada por o material se encontrar endurecido pelo conservante, requer um tratamento prévio de amolecimento que pode conseguir-se através de um líquido fenólico ou de um álcali. Mas neste caso estamos realizando já a fase da despigmentação ou

4.

diafanização. Um dos diafanizadores mais conhecidos é o cloralfenol (e também o lactofenol). É um dos reagentes mais úteis em microscopia pois, além de conceder transparência ao material sem alterar as suas estruturas, actua como desidratante. O uso de álcalis, como a potassa ou soda cáustica, envolve sempre o risco de destruição de estruturas delicadas. Actuam por dissolução dos tecidos, sendo os tecidos moles, internos, os primeiros a serem atacados. Na entanto, para estruturas fortemente esclerosadas é forçosa a sua utilização. Há aqui, portanto, dois tipos de acções distintos. Num a diafanização é de natureza óptica, através de uma homogenização dos índices de refração dos diferentes tecidos do espécime. No outro, é de natureza química, pois é a dissolução das partes internas e dos pigmentos que confere a transparência ao objecto.

A coloração, para os fins que nos interessam, vai perdendo interesse porquanto é mais uma complicação do processo, não só em si própria mas por exigir a ausência, durante as fases subsequentes, de reagentes que a prejudiquem ou destruam, como acontece com os líquidos fenólicos. Além disso, os modernos equipamentos de microscopia, como o contraste de fase e o contraste por interferência, substituem-na em muitos casos com vantagem. Sendo necessária, as estruturas quitinosas podem ser coradas por diversos corantes, entre os quais a *fucsina*, a *safranina* e o *ácido pirogálico*.

No que respeita à preparação para a montagem, ela depende do montante a usar. Aqui, deparam-se-nos duas hipóteses: ou o montante é do tipo aquoso ou do tipo resinoso.

Na primeira hipótese, caso do fluido de Berlese por exemplo, não é necessária qualquer preparação ou, no caso de tratamento pela potassa cáustica, apenas uma lavagem com água acidulada.

Se o meio de montagem for uma resina, como acontece com o Bálamo do Canadá, então torna-se indispensável atender a duas exigências. A primeira é

a desidratação perfeita do material, que se pode conseguir com o cloralfenol ou com álcoois de força crescente até ao álcool absoluto e a segunda é o tratamento por um reagente que permita a passagem à resina, e que, portanto, seja um solvente tanto do álcool como desta última. É, por exemplo, o caso do Xilol ou do Eugenol.

O uso de um ou de outro tipo de montante presta-se a longa discussão acerca das respectivas vantagens e inconvenientes. Para já, diremos, que os ácaros e certos insectos muito delicados não suportam o processo do tipo resinoso. Para os outros casos, temos a considerar a grande vantagem deste último quanto à duração ilimitada da preparação e também à melhor conservação da cor e das proporções. A montagem em meio aquoso é muito mais rápida e pode aplicar-se a qualquer objecto. Todavia, a duração está longe de ser ilimitada, a cor vai-se desvanecendo e as proporções alteram-se, nalguns casos consideravelmente, devido à evaporação da água contida que faz com que a lamela exerça uma pressão crescente sobre o objecto.

Sobre a montagem propriamente dita pouco há a dizer. Colocado o objecto na lâmina com o montante, há que orientá-lo convenientemente e proceder, por meio de agulhas, à extensão dos apêndices. Resta colocar a lamela de modo a não deslocar o objecto nem a aprisionar bolhas de ar.

Sob o termo acabamento queremos incluir as operações de etiquetagem e de protecção com luto ou verniz.

Alguns métodos mais usados

A) Montagens em Hoyer (uma das fórmulas do tipo «Berlese»):

- 1 — Como foi dito, o material é colocado directamente no montante se é pouco pigmentado e de cutícula delicada. Deposta a lamela, passa-se a prepara-

ção algumas vezes pela chama duma lamparina para acelerar a clarificação.

2 — Para material um tanto esclerosado ou espesso é conveniente tratá-lo primeiro pelo cloralfenol num pequeno tubo de ensaio que se mantém aquecido por alguns minutos; passa-se depois para o montante e fecha-se a preparação. Em vez de cloralfenol pode empregar-se lactofenol ou simplesmente ácido láctico.

2 — Caso contrário há que desidratá-lo previamente, podendo utilizar-se material proveniente directamente do álcool de conservação ou da potassa cáustica para despigmentação e amolecimento. Não é conveniente a sequência cloralfenol — bálsamo, embora seja possível visto que aquele líquido fenólico é solúvel no bálsamo. Se usarmos o cloralfenol para desidratar devemos passar depois a um líquido intermédio, o eugenol por exemplo. Segue-se a montagem.

No caso de se empregarem álcoois na desidratação, esta deve ser progressiva, usando-se consecutivamente 3 ou 4 álcoois de forças diferentes (30, 50, 70 e 100° por ex.) principalmente em espécimes delicados para não provocar distorções. Os tempos de cada tratamento variam entre meia e uma hora, em regra. Após a desidratação procede-se como no caso anterior.

Deve ter-se sempre presente a necessidade absoluta duma perfeita desidratação; de contrário aparecerão manchas de aspecto leitoso na preparação final.

Deve dizer-se, contudo, que há resinas que não exigem uma desidratação tão elevada. Citei o caso do Euparal, que também pode ser empregado com grande vantagem.

A secagem das preparações em bálsamo, quando realizada à temperatura ambiente, pode requerer cerca de seis meses. Em estufa seca a 40° poderá reduzir-se a algumas semanas.

Estes métodos são de emprego quase universal, mas por muito eficazes que sejam não devem dispensar que se anote,

3 — Se os animais ou parte deles são fortemente esclerosados ou pigmentados, recorre-se normalmente ao emprego da potassa cáustica. Usa-se em regra este álcali dissolvido em água a 5 ou 10%.

O material é colocado num pequeno tubo de ensaio contendo aquele reagente e aquecido em banho-maria durante o tempo necessário para a dissolução dos tecidos moles, o que depende principalmente do tamanho do espécime. Pode ir de alguns poucos minutos até meia hora ou mais.

Procede-se depois à lavagem com água acidulada por ácido acético e à eliminação, sob a lupa, de restos de tecidos ainda aderentes. Segue-se a montagem.

B) Montagem em Bálsamo do Canadá

1 — Se o material se encontra naturalmente no estado seco, por exemplo, escamas de lepidópteros, asas de dípteros, exuviae de larvas ou pupas, então a montagem pode ser directa.

lactofenol < prep. extemporaneeas.
Ardo laticos -
muito pouco
pique a esta base e
prep. extemporaneeas.
Lactofenol colhe na
de pl. Afelictos
e laticos.
Em esta preparação
coloca-se 2 espécimes,
podendo ser numerosos
fina mais do que
preparação, 4 a 5 minutos
de secagem. A colheita contém
tubo de laço no Cloralfenol
O cloralfenol tem
tempo de secagem de
de tal modo qd
muito tempo se
colocado dentro/
na resina.

Desidrata-se
de álcool - 70-80°
b
até 100°
líquido intermédio
b
b
b

admissa fazer a preparação nos espaços no caso do bálsamo.
para usar a resina sempre quente para do a resina em que se
o líquido de secagem tem que ser quente. Utiliza o
bandeja de cartolina e vidro humectado com
esta resina de secagem de resina de secagem / resina

antes de se iniciarem as manipulações, a coloração geral do corpo e das suas partes quando diversamente pigmentadas.

Métodos especiais

Há determinados insectos e ácaros cuja preparação se recomenda fazer-se dentro de determinados métodos apropriados, por diversas razões. Uma destas é a existência frequente, em certos grupos, de massas internas de produto ceroso, muito pigmentado e opaco, que não cede à acção dos diafanizadores vulgares.

- 1 — Há insectos que sendo pequenos e delicados ou têm uma cutícula extraordinariamente opaca (caso de alguns tisanópteros) ou contêm no seu interior massas compactas difíceis de dissolver, caso de certos afídeos e cochonilhas. Para estes últimos, não querendo uma acção prolongada da potassa, por vezes arriscada, pode combinar-se uma acção curta desta (cerca de 5 minutos) e dum tratamento subsequente de lactofenol. Se este for moderadamente aquecido, em poucos minutos obtém-se uma boa clarificação.

A montagem far-se-á, de preferência, em Hoyer. Deve dizer-se que a perfuração num ou em dois pontos da articulação do abdómen, ao iniciar o tratamento do material, facilita consideravelmente a penetração dos reagentes e a expulsão dos corpos indesejáveis.

- 2 — Para Afídeos é particularmente útil a acção da potassa seguida de uma passagem por detergente líquido, servindo para este fim os de uso doméstico.

- 3 — Quando se pretende uma intensa despigmentação duma cutícula muito esclerotizada, mas evitando danificar órgãos ou processos muito frágeis, caso frequente nos Tisanópteros, pode recorrer-se ao tratamento pela mistura:

Água oxigenada (a 30 vols.) ...	80 ml
«Triton X-100 (5 % em álcool)	2 ml
Álcool octílico (2 % em dioxano)	8 ml
Amónia (25 %)	10 ml

O último reagente só se junta no momento de emprego.

Basta um aquecimento muito ligeiro para que esta solução actue em poucos minutos. Submetendo o material, em seguida, a uma passagem rápida por cloralfenol quente consegue-se uma clarificação rápida dos órgãos internos. Pode montar-se imediatamente em Hoyer.

- 4 — Um dos maiores problemas nas montagens em Bálamo é a distorção e a contracção que certos apêndices ou órgãos delicados costumam sofrer quando contactam com o líquido de passagem ao bálamo ou a quando da imersão neste. Entre os insectos difíceis de montar neste meio contam-se os Tisanópteros. Para estes foi concebido um método eficaz que também tem provado noutros grupos:

- Depois da cutícula ser perfurada num ou dois pontos com uma agulha fina, faz-se actuar uma solução a 12 % de OHK em amónia, a frio. São necessárias, em regra, mais de 3 horas.
- Tratamento em lactofenol aquecido cerca de $\frac{1}{4}$ de hora.
- Desidratação em cloralfenol aquecido durante meia a uma hora.
- Passagem por uma mistura de uma parte de xilol, uma de

terpineol e duas de salicilato de metilo, durante cerca de uma hora.

— Montagem em bálsamo.

- 5 — As larvas de insectos de cutícula clara necessitam muitas vezes de coloração. Nestes casos segue-se, dum modo geral, o esquema clássico do emprego da potassa cáustica, lavagem, coloração, desidratação pelos álcoois, xilol e montagem em bálsamo. No entanto é útil atender-se a dois pontos. Antes do tratamento pela potassa far-se-á um corte longitudinal da cabeça ao ânus pela face ventral, com uma lâmina fina, o que permite após a dissolução do conteúdo interno a planificação completa da cutícula. Quanto ao segundo ponto refere-se ao emprego de um corante ácido, por exemplo a fucsina ácida, descorado pela adição de algumas gotas de potassa ou soda cáustica. Deste modo é mais fácil manipular-se o material no corante, dentro do qual ele permanece sempre bem visível. Bastará passá-lo para o meio neutro ou ligeiramente ácido do líquido de lavagem (água ou água acidulada) para aparecer a coloração esperada.

- 6 — Um outro caso a considerar é o da remoção do revestimento de escamas das asas de borboleta. Talvez um dos mais aconselháveis seja o que consiste na imersão da asa num detergente doméstico ligeiramente diluído (Sonasol, por ex.) e com a ajuda de 2 pincéis remover a maior parte das escamas em ambas as faces da asa. A operação terminar-se-á com a passagem por lixívia mais ou menos diluída, conforme os casos, mas exigindo

sempre o cuidado duma vigilância atenta, pois uma acção demasiado prolongada pode levar à destruição da membrana alar. Segundo a nossa experiência, não vemos necessidade de corar as nervuras, operação que nem sempre é completa, levando por isso a erros de interpretação. Parece preferível examinar a asa em transparência, usando iluminação oblíqua no microscópio (lupa).

Muitos outros métodos ficam por referir mas, na impossibilidade de efectuar uma revisão mais completa, preferimos apontar aqueles que, em nossa opinião, poderão adaptar-se a maior número de casos que o técnico normalmente enfrenta, sendo ao mesmo tempo de emprego mais acessível.

Fórmulas de alguns reagentes mais úteis

Fluido de Hoyer

Misturar à temperatura ambiente na sequência indicada:

Água destilada	50 g
Goma arábica (cristais claros)	30 g
Hidrato de cloral crist.	200 g
Glicerina	20 g

Cloralfenol

Fundir em calor moderado:

Hidrato de cloral crist.	80 g
Fenol crist. (puríssimo)	40 g

Lactofenol

Misturar à temperatura ambiente:

Fenol crist. (puríssimo)	80 g
Ácido láctico	40 g