

COMUNICADO  
TÉCNICO

416

Colombo, PR  
Outubro, 2018



# Montagem de lâminas permanentes de Sciaridae da coleção Embrapa Florestas

Pedro Cazetta da Cruz  
Guilherme Schnell e Schuhli  
Dalva Luiz de Queiroz

# Montagem de lâminas permanentes de Sciaridae da coleção Embrapa Florestas

**Pedro Cazetta da Cruz**, graduando, Curitiba, PR; **Guilherme Schnell e Schuhli**, Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Dalva Luiz de Queiroz**, Engenheira Florestal, doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

Lâminas de microscopia são usadas para diversos propósitos na entomologia, entre os mais importantes estão a identificação e preservação de material. Para a montagem de lâminas permanentes é necessário dispor o material biológico, posicionando-o sobre uma lâmina e cobrindo-o com resina e lamínula (Kraus; Arduin, 1997). Este processo de montagem é importante para que seja feita a conservação de materiais biológicos, possibilitando que sejam mantidos permanentemente em um acervo, como em coleções de identificação, tornando-os uma referência material. Por exemplo, as coleções de identificação têm, como finalidade, o fornecimento de referências para a identificação e descrição de material biológico. Somente o acervo de Diptera da Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure da UFPR conta com mais de 110 mil espécimes, dos quais 40% encontram-se identificados (Taxonline, 2013). Isto sugere a importância dos acervos dessas coleções,

principalmente em instituições ligadas à agricultura como a Embrapa Florestas. Estas coleções também fundamentam a descrição de novas espécies, conservando tipos de descrições (holótipos, lectótipos e neótipos). Sciarídeos são insetos que, em média, medem de 1 mm a 6 mm, raramente excedendo 10 mm (Mohrig; Menzel, 2010), pertencentes à ordem Diptera. Como são insetos de diminutas proporções, a montagem de lâminas é importante para a análise de sua morfologia e exame de estruturas, como artículos das antenas, venação das asas e genitálias, padrões de cerdas e estruturas das pernas (Belkin, 1962).

É comum que os materiais tipos de espécies de Sciaridae sejam depositados e preservados em lâminas permanentes (Papavero, 1994). Tendo em vista a importância da montagem de lâminas permanentes de Sciaridae, apresenta-se aqui um guia para a montagem destes espécimes conforme protocolo utilizado para a coleção da Embrapa Florestas.

A Embrapa Florestas mantém projetos ligados à prática de controle de Sciaridae, desde 2013, com produções que incluem o controle, o monitoramento e mesmo a descrição de novas espécies deste grupo (Schühli, 2013, 2014; Schühli et al., 2013, 2014, 2017; Amorim; Schühli, 2017; Queiroz et al., 2017b). Por este envolvimento, o Laboratório de Entomologia Florestal mantém vouchers em uma coleção de referência mantida em lâminas permanentes de microscopia. Para esta coleção houve a necessidade de se adaptar protocolos para a montagem e preservação dos espécimes. Este documento permitirá que o processo seja divulgado para outros laboratórios e também servirá como um instrumento de treinamento interno para pesquisadores e estudantes envolvidos com o tema.

São diversos os protocolos disponíveis para a montagem de lâminas de insetos. De forma geral, a montagem do inseto passa por seis fases. Na primeira fase o inseto é clarificado por ação de ataque químico (ácido ou básico). Na segunda fase interrompe-se o ataque químico. Na terceira o inseto é submetido a uma bateria alcoólica de desidratação. Na quarta fase é imerso em um solvente que o prepara para a resina em que será preservado. Na sexta e última ele é fixado em resina entre lâmina e lamínula. Estes procedimentos gerais de montagem são comuns, por exemplo, aos trabalhos de Hardwick (1950), Wirth e Marston (1968), Steffan (1983), Cumming (1992), Paiva et al. (2006) e Queiroz et al. (2017a).

Neste documento são apresentadas variações baseadas na modificação dos agentes clarificadores, comentando também a adequação de outras possibilidades durante o processo e pormenores de ajustes com base em experiência própria e em referências técnicas (Steffan, 1983; Cumming, 1992; Queiroz et al., 2017a).

Quanto aos agentes clarificadores, são apresentadas três variações baseadas em diferentes compostos: o hidróxido de sódio (NaOH), o hidróxido de potássio (KOH) e o ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ). Os hidróxidos possuem as mesmas propriedades para a clarificação, porém o NaOH é menos cáustico aos tecidos (Gurney et al., 1964). Esses compostos agem dissolvendo as partes moles do animal, permitindo a passagem de luz por sua cutícula. Geralmente a ação cáustica destas sodas (NaOH e KOH), a frio, por períodos mais longos, oferece um resultado de clarificação mais uniforme do que a imersão por curto período em soda aquecida (Hardwick, 1950). Para estes meios de clarificação é importante que o processo seja interrompido com um banho rápido (1 minuto) em ácido acético (Cumming, 1992), geralmente a 10%.

O ácido láctico é considerado um ácido fraco, que manterá as propriedades de clarificação, mas sem danificar estruturas membranosas, permitindo, por exemplo, que as asas sejam mantidas na montagem. Este ácido age primariamente como um agente macerador, removendo tecidos moles sem danificar estruturas esclerotinizadas de interesse ao estudo (Cumming, 1992).

No processo de montagem das lâminas podem ser utilizadas diferentes resinas, como as mais tradicionais, Entellan, Euparal, Permount, Bálsamo do Canadá ou até algumas propostas de adaptação usando resinas não desenvolvidas para este propósito, como a Resina acrílex ou Verniz vitral 500 (Paiva, 2006). Estes meios têm como função preencher o espaço entre a lâmina e a lamínula, impregnando o inseto e finalizando a sua fixação. Estas resinas apresentam baixo índice de refração, permitindo a visualização clara da morfologia do inseto em seus detalhes. Cada uma das resinas adéqua-se a solventes específicos como, por exemplo, o xileno ou o clorofórmio. Opção foi feita aqui pelo uso da resina comercial Entellan, utilizando Limoneno (um monoterpene) como solvente em substituição ao xilol, conforme sugerido em metodologia descrita por Queiroz et al. (2017a).

O espécime é colocado na lâmina, com sua vista lateral em evidência, com uma gota de solvente. Para os machos, a terminália é neste momento removida com auxílio de estiletes, para que possa ser apresentada em vista dorsal posicionada ao lado do corpo do inseto. A resina é depois adicionada e a lamínula é posicionada mantendo estas disposições. Após a montagem com as resinas, é recomendado a utilização de uma estufa a 38 °C, para acelerar a polimerização (Queiroz et al., 2017a), mas esse procedimento é opcional para a aceleração do processo.

Para facilitar os procedimentos prévios para a montagem, os reagentes

necessários e suas respectivas concentrações foram organizados e dispostos na Figura 1. Além destes reagentes são necessários os instrumentos costumeiros de manipulação de insetos como micro estiletes, ganchos e pinças finas. Vasilhames como cadinhos, placas de toque, placas ELISA e Embryo-Dish também são necessários para conter o inseto imerso nas soluções. No caso dessa prática, manteve-se este conjunto especialmente dedicado para a montagem de lâminas, evitando sujeira na montagem ou danos a peças e equipamentos.

O protocolo foi desenvolvido para insetos capturados diretamente em etanol 70%. Insetos secos devem passar por processo de hidratação para posterior digestão. A organização de bancada pode ser vista na Figura 1 onde se pode observar, ao fundo, da esquerda para a direita, as alíquotas dos reagentes em garrafas de pequeno volume, as resinas, lâminas e lamínulas e à frente, em mesmo sentido, uma placa de toque de seis poços, microestiletes, pipeta plástica descartável e microtubo plástico.

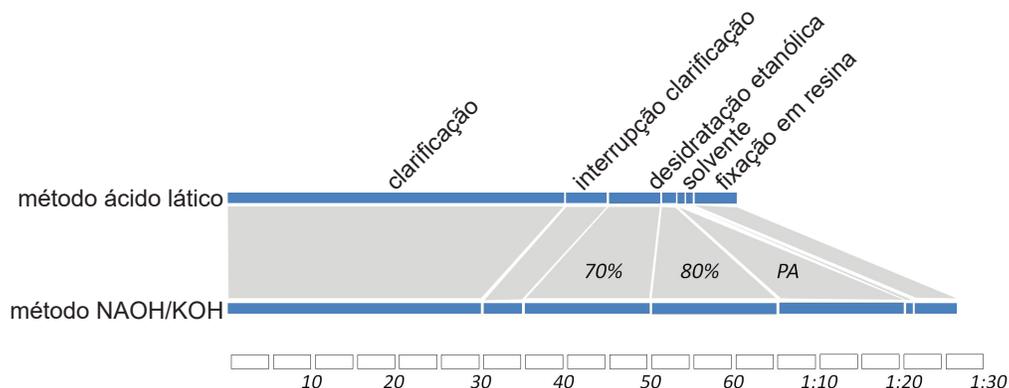
A Figura 2 apresenta um comparativo entre os métodos cáustico e ácido, em relação ao tempo de duração de cada procedimento.

Um espécime montado foi registrado com o auxílio de um microscópio Olympus, na objetiva de 10x de aumento, com câmera digital reflex Canon EOS 1100D acoplada diretamente na posição de uma ocular do microscópio (Figura 3). A imagem foi processada em empilhamento de fotos com diferentes níveis



Foto: Pedro Cazetta da Cruz

**Figura 1.** Materiais para montagem. Ao fundo da esquerda para a direita: Etanol 70%, 80% e P.A.; NaOH 10%; ácido láctico 80%; Limoneno; Resina; caixa de lâminas; caixa de lamínulas. À frente e no mesmo sentido: placa de toque de seis poços; microestiletas; pipeta; microtubo.



**Figura 2.** Comparação do tempo de execução dos processos de método cáustico (NAOH/KOH) com o método ácido (ácido láctico). A escala inferior representa o tempo em minutos.



Foto: Guilherme Schnell e Schuhli

**Figura 3.** Espécime do gênero *Bradysia*, macho coletado em área de infestação e criado artificialmente em laboratório. O espécime encontra-se fixado em lâmina permanente da coleção de Sciaridae da Embrapa Florestas, pelo método do ácido láctico.

de focalização para permitir visualização de todas as estruturas, utilizando o software Combine ZP (Hadley, 2010), com as opções de alinhamento e balanço de imagem (“Align and Balance Image Frames”), seguido de empilhamento leve (“soft stack”). Os níveis de cor foram ajustados de forma automática, no software GNU Image Manipulation

Program - GIMP (the GIMP Project) (GIMP..., 2018).

Importante frisar a necessidade de equipamentos de segurança e proteção individual, como o uso de capela com exaustão, ao se trabalhar com voláteis como o xileno e com as resinas, bem como o uso do guarda-pó, luvas e óculos de proteção.

### Protocolo baseado em clarificação com ácido láctico

Procedimento	Tempo
1 Se desejar remover as asas: retire as asas com microestiletas e deposite-as em limoneno. Transfira as asas para a lâmina ainda embebidas. Disponha as asas exibindo uma em face ventral e a outra dorsal.	
2 Acrescente uma gota de Entellan na lâmina sobre as asas. Se houver formação de bolhas, remova-as com o microestilete. Se necessário corrija a disposição e aguarde leve polimerização para que a montagem não se desloque com a lamínula. ....	5 minutos
3 Cobrir a montagem das asas com lamínula (sugestão de 22 mm x 22 mm).	
4 Submeter o restante do inseto à clarificação acrescentando ácido láctico a frio. ....	40-45 minutos
5 Remover <sup>1</sup> o clarificador e acrescentar 2 mL água destilada. ....	5 minutos
6 Remover a água e acrescentar etanol 70%. ....	6 minutos
7 Remover o etanol 70% e acrescentar etanol 80%. ....	2 minutos
8 Remover o etanol 80% e acrescentar etanol PA. ....	1 minuto
9 Remover etanol PA e acrescentar limoneno. ....	1 minuto
10 Acrescentar à lâmina uma gota de Entellan e aguardar ligeira polimerização. ....	5 minutos

<sup>1</sup> As remoções podem ser feitas com pipeta ou transferindo o inseto de poço ou vasilhame. Optou-se aqui por usar uma pipeta tipo Pasteur para remover o reagente do poço, sem ter de mover o espécime.

Procedimento	Tempo
11 Posicionar o espécime na lâmina sobre a gota de Entellan já depositada e acrescentar mais uma gota de Entellan. Cobrir com lamínula (sugestão de 22 mm x 22 mm) e aguardar polimerização completa em superfície plana <sup>2</sup> . .....	12 horas

### Protocolo baseado em clarificação cáustica

Procedimento	Tempo
1 Remova as asas com microestiletas e deposite-as em limoneno. Transfira as asas para a lâmina ainda embebidas. Disponha as asas exibindo uma em face ventral e a outra dorsal.	
2 Acrescente uma gota de Entellan na lâmina sobre as asas. Se houver formação de bolhas remova-as com o microestilete. Se necessário corrija a disposição e aguarde leve polimerização, para que a montagem não se desloque com a lamínula. ....	5 minutos
3 Cobrir a montagem das asas com lamínula (sugestão de 22 mm x 22 mm).	
4 Submeter o restante do inseto à clarificação. NaOH/KOH a frio <sup>3</sup> . ....	30 minutos
5 Remover clarificador e acrescentar 2 mL de água destilada. ....	5 minutos
6 Remover água e acrescentar etanol 70%. ....	15 minutos
7 Remover etanol 70% e acrescentar etanol 80%. ....	15 minutos
8 Remover etanol 80% e acrescentar etanol PA. ....	15 minutos
9 Remover etanol PA e acrescentar limoneno. ....	1 minuto
10 Acrescentar à lâmina uma gota de Entellan e aguardar ligeira polimerização. ....	5 minutos
11 Posicionar espécime em lâmina sobre a gota de Entellan já depositada e acrescentar mais uma gota de Entellan. Cobrir com lamínula (sugestão de 22 mm x 22 mm) e aguardar polimerização completa em superfície plana <sup>2</sup> . ....	12 horas

<sup>2</sup> Eventuais bolhas de ar devem ser removidas e espaços não cobertos pelo Entellan devem ser preenchidos por capilaridade, acrescentando gotas no limite da lamínula.

<sup>3</sup> As clarificações cáusticas requerem que o processo seja interrompido com um banho rápido (1 minuto) em ácido acético 10%.

Tanto pelo processo cáustico quanto pelo ácido obtido é possível obter boas montagens de lâminas permanentes. A lâmina pronta, devidamente etiquetada, pode ser vista na Figura 4. O resultado final também pode ser verificado na Figura 4, em um exemplar macho de *Bradysia* sp., montado a partir do método ácido e fotografado em câmera digital.

A clarificação cáustica pode ser difícil de ser interrompida. Neste caso o resultado final pode ser comprometido, porque a clarificação pode se estender mesmo depois da montagem da lâmina, chegando a danificar estruturas importantes do espécime. Também por este

Foto: Pedro Cazetta da Cruz



**Figura 4.** Montagem final do espécime na lâmina com etiquetas de procedência e identificação.

método, a cutícula do inseto torna-se mais gelatinosa, sendo mais frequentes acidentes na montagem (como a desarticulação de peças ou rompimento de cutícula). Justamente por danificarem estruturas membranosas, os clarificadores cáusticos danificam a asa e, portanto, demandam a remoção destas estruturas e montagem em separado (Wirth; Marston, 1968), tarefa trabalhosa e que muitas vezes danifica o espécime.

O emprego da clarificação baseado em NaOH ou KOH é mais comum entre os dipterologistas, sendo o ácido láctico menos utilizado (Cumming, 1992).

Uma observação a se fazer quanto à clarificação, seja ela cáustica ou ácida, é a possibilidade de uso de calor como catalisador da reação. Entretanto, o controle do ponto de clarificação com o calor, por ser muito rápido, é mais difícil. O contraponto do aquecimento é que, para o ácido láctico, as estruturas membranosas irão expandir. Em alguns momentos isto pode ser positivo para everter terminálias ou expandir abdômes e peças bucais. Por outro lado, pode também vir a romper estas estruturas. Já os hidróxidos, se aquecidos, deixam a cutícula mole e pegajosa, dificultando sua manipulação e fazendo os espécimes mais frágeis e suscetíveis a quebras.

Uma fase crítica é a de desidratação etanólica. Por serem insetos muito pequenos, variações no tamanho do inseto, idade e respectiva composição de cutícula podem exigir tempos diferentes dos sugeridos. Se expostos demais ao etanol mais concentrado os espécimes

são osmoticamente drenados, ficando com aspecto enrugado e impossibilitando a visualização de estruturas importantes. Por outro lado, se a desidratação for breve e não remover a água presente, o inseto tenderá a sofrer decomposição durante o tempo de preservação em lâmina. É bom acompanhar visualmente a fase de desidratação para prevenir que o espécime se deforme, ajustando os tempos às condições da amostra.

O limoneno é um monoterpeneo presente nas cascas de cítricos. Como terpeno, solubiliza muito bem a maioria das resinas usadas em microscopia. O limoneno foi testado para substituir o xileno, evitando os fortes cheiros e optando por um produto de menor toxicidade, conforme mencionado por Queiroz et al. (2017a). Este solvente mostrou-se muito mais seguro e muito efetivo para diversos tipos de resinas de microscopia.

São novos atributos desta proposta para o estudo da família Sciaridae tanto o uso do ácido láctico, quanto do limoneno como solvente. Vantagens importantes são: a qualidade final da lâmina, o tempo total do procedimento de montagem e o controle da clarificação e da integridade do espécime. Muito importante é o fato de poder manter as asas no inseto, prevenindo perdas e trocas de material, agilizando o processo e resultando em uma montagem mais limpa. Portanto, recomenda-se para coleções, a montagem com a clarificação baseada em ácido láctico, sem o aquecimento do espécime, e com o uso do solvente limoneno.

## Referências

- AMORIM, D. de S.; SCHUHLI, G. S. e. A new species of *Euricrium* Enderlein from southern Brazil, new records for *E. varians* (Lane), a new combination, and a key for the Neotropical species of the genus. **Zootaxa**, v. 4231, n. 3, p. 327-340, 2017. DOI: 10.11646/zootaxa.4231.3.2.
- BELKIN, J. N. **Mosquitoes of the South Pacific**. Berkeley: University of California Press, 1962. v. 2. p. 74-75.
- CUMMING, J. Lactic acid as an agent for macerating Diptera specimens. **Fly Times**, v. 8, p. 7, 1992.
- GIMP Image Editor. Disponível em: <<http://www.gimp.org>>. Acesso em: 14 maio 2018.
- GURNEY, A. B.; KRAMER, J. P.; STEYSKAL, G. C. Some techniques for the preparation, study, and storage in microvials of insect genitalia. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 57, n. 2, p. 240-242, 1964.
- HADLEY A. **Combine ZP software, new version**. 2010 URL: Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20090123110407/http://hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/CZP/News.htm>> Acesso em: 14 maio 2018.
- HARDWICK, D. F. Preparation of slide mounts of Lepidopterous Genitalia. **The Canadian Entomologist**, v. 82, n. 11, p. 231-235, 1950.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Ed. da UFRJ, 1997. 1997. v. 1. 198 p.
- MOHRIG, W.; MENZEL, F. Sciarid (Black fungus gnats). In: BROWN, B. V.; BORKENT, A.; CUMMING, J. M.; WOOD, D. M.; WOODLEY, N. E.; ZUMBADO, M. (Ed.). **Manual of Central American Diptera**. Ottawa: NRC Research Press, 2010. p. 279-292.
- PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta**

**Botânica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.  
DOI: 10.1590/S0102-33062006000200002.

PAPAVERO, N. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica**. 2. ed. São Paulo: Ed. da UNESP, 1994. 1994. p. 26-27.

QUEIROZ, D. L.; BURKHARDT, D.; GARRASTAZU, M. C. **Protocolo de coleta e montagem de psilídeos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2017a. 11 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 393).

QUEIROZ, D. L.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. I.; ZANUNCIO, J. C.; BARBOSA, L. R.; SCHÜHLI, G. S.; BURCKHARDT, D. Pragas em viveiro de eucalipto. In: WENDLING, I.; DUTRA, L. F. (Ed.). **Produção de mudas de eucalipto**. 2. ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2017b. p. 125-172.

SCHÜHLI, G. S. **Contagem automática de insetos em armadilhas adesivas**: uma sugestão baseada no monitoramento de Sciaridae. Colombo: Embrapa Florestas, 2013. 7 p. (Comunicado técnico. Embrapa Florestas, 330).

SCHUHLLI, G. S. **Os mosquitos sciarídeos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. 26 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 272).

SCHUHLLI, G. S.; PENTEADO, S. R. C.; REIS FILHO, W.; NICKELE, M. A. **Medidas contingenciais para o controle de sciarídeos (moscas-dos-cogumelos) em pátios de toras de pinus**. Colombo: Embrapa Florestas, 2013. 5 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 315).

SCHUHLLI, G. S.; PENTEADO, S. R. C.; REIS, W.; AMORIM, D. S. Sciarid fungus-gnats as nuisance factor in Pinus timber yards. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, p. 454-456, 2014. DOI: 10.4336/2014.pfb.34.80.732.

STEFFAN, W. A. Preparation of slide mounts of Sciaridae (Diptera). **International Journal of Entomology**, v. 25, p. 231-232, 1983.

TAXONLINE. **Coleções zoológicas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná [2013]. Disponível em: <<http://taxonline.bio.br/colecoes/?id=3-cole%C3%A7%C3%B5es-zool%C3%B3gicas>>. Acesso em: 14 maio 2018.

WIRTH, W. W.; MARSTON, N. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 61, n. 3, p. 783-784, 1968.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Florestas**

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,  
Caixa Postal 319  
83411-000, Colombo, PR, Brasil  
Fone: (41) 3675-5600  
[www.embrapa.br/florestas](http://www.embrapa.br/florestas)  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição  
Versão digital (2018)



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Florestas

Presidente

*Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-Presidente

*José Eliidney Pinto Júnior*

Secretária-Executiva

*Neide Makiko Furukawa*

Membros

*Álvaro Figueredo dos Santos, Gizelda Maia*

*Rego, Guilherme Schnell e Schühli, Ivar*

*Wendling, Luis Cláudio Maranhão Froufe,*

*Maria Izabel Radomski, Marilice Cordeiro*

*Garrastazu, Valderês Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

*José Eliidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica

*Francisca Rasche*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Neide Makiko Furukawa*

Foto capa

*Guilherme Schnell e Schuhli*

CGPE 14779