

91

Circular
TécnicaCorumbá, MS
Dezembro, 2010

Autores

Fábio GalvaniQuímico, Dr.,
Embrapa Pantanal
CP 109, Corumbá, MS
CEP 79320-900
fgalvani@cpap.embrapa.br**João Batista Garcia**Matemático, Analista,
Embrapa Pantanal
CP 109, Corumbá, MS
CEP 79320-900
jgarcia@cpap.embrapa.br**Sandra Aparecida Santos**Zootecnista, Dra.,
Embrapa Pantanal
CP 109, Corumbá, MS
CEP 79320-900
sasantos@cpap.embrapa.br

Adequação de metodologia – preparação de lâminas microhistológicas de referência de tecidos vegetais e fezes

Introdução

Lâminas “permanentes” são indispensáveis para a ilustração de cursos básicos e avançados de botânica (REID, 1999) e também são utilizadas nas pesquisas de cunho eminentemente anatômico, nas pesquisas de anatomia aplicada à taxonomia-cladística, de farmacognosia ou de fisiologia vegetal, e nas aulas de biologia das escolas brasileiras de ensino médio. Nos estudos anatômicos, uma lâmina bem preparada é primordial para a análise e, conseqüentemente, para a interpretação e discussão dos resultados (PAIVA et al, 2006).

A montagem de lâminas histológicas consiste em depositar o material biológico numa lâmina de vidro e cobrir com lamínula. É necessário colocar um meio junto com o material, que o preservará por algum tempo e garantirá a união da lamínula com a lâmina (KRAUS; ARDUIN, 1997).

A escolha do meio de montagem depende do uso que se fará dos espécimes montados, do tipo de microscopia empregada e do tempo necessário de preservação (REID, 1999).

Na Embrapa Pantanal, a confecção de lâminas microhistológicas é utilizada como ferramenta em estudos para a avaliação da composição botânica da dieta de herbívoros (SANTOS et al., 2002; DESBIEZ et al., 2010). Esta técnica baseia-se na análise de fragmentos da epiderme de plantas que são preservados no trato digestivo, comparados com material de referência das plantas encontradas na região de interesse. Deste modo, uma lâmina bem preparada é primordial para a análise e, conseqüentemente, para a discussão dos resultados de pesquisa (RENTFLEISH; HANSEN, 2010). Para o preparo das lâminas microhistológicas, o método foi desenvolvido por Sparks e Malecheck (1968) e modificado por Scott e Dahl (1980). No entanto, esses métodos vem sendo adaptados conforme as especificidades locais.

A montagem de lâminas microhistológicas utilizando como meio a solução de Hoyer, é o método tradicionalmente utilizado no Laboratório de Dieta Animal da Embrapa Pantanal, devido às suas características de secagem e transparência, bem como pela capacidade de preservação do material em boas condições de visualização por longos períodos. Entretanto, desde que se iniciou a confecção das lâminas microhistológicas no Laboratório de Dieta Animal, alguns problemas na metodologia foram verificados, especialmente relacionado com o tempo de secagem. Após as montagens das lâminas o tempo de secagem das mesmas tem sido demasiadamente longo, sendo que algumas passavam por esse processo por cerca de seis meses para a completa secagem. Além disso, também tem sido verificado que muitas lâminas microhistológicas preparadas com a solução de Hoyer apresentaram-se deterioradas logo após o preparo, ou seja, a solução de montagem original não permanecia fixa ao longo da extensão laminar, formando vários espaços vazios como se a solução de montagem tivesse evaporado, o que impossibilitava a leitura completa (todos os campos) da lâmina em microscópio. Além disso, observou-se durante os anos de trabalho no laboratório que a maioria das lâminas confeccionadas com a solução de montagem original deterioravam em aproximadamente cinco anos.

Neste sentido, este trabalho propõe uma adaptação na preparação da solução de Hoyer, pela modificação da quantidade de goma arábica utilizada na solução com o objetivo de aumentar a durabilidade das lâminas microhistológicas em amostras de tecido vegetal e fezes para leitura da dieta de herbívoros.

Preparação de lâminas microhistológicas

O primeiro passo antes da confecção das lâminas de plantas e fezes é o preparo das soluções de limpeza e de montagem.

Solução de limpeza ou de Hertwig

Materiais para a preparação da solução integral:

240 g de hidrato de cloral

19 mL de ácido clorídrico 1 N

60 mL de glicerina

Preparo da solução: colocar a glicerina e o ácido clorídrico em Becker sob agitação e brando aquecimento até homogeneizar a solução e em seguida adicionar o hidrato de cloral e homogeneizar a solução. Para o preparo de meia solução deve-se diminuir pela metade a quantidade dos reagentes utilizados na preparação da solução integral.

Solução de montagem ou de Hoyer

Materiais para a preparação da solução integral:

200 g de hidrato de cloral

50 mL de água destilada

20 mL de glicerina

60 g de goma arábica

Preparo da solução: adicionar a glicerina e a água destilada e homogeneizar sob agitação e aquecimento moderado. Adicionar hidrato cloral até completa dissolução. Posteriormente, adicionar a goma arábica também sob agitação até dissolução. Filtrar a solução caso alguns grânulos não forem dissolvidos.

No Laboratório de Dieta Animal da Embrapa Pantanal, para a confecção de lâminas de referências costumeiramente se prepara meia solução de Hoyer, utilizando a metade das quantidades de reagentes utilizados na preparação da solução integral.

Preparo das lâminas de referência com amostras de plantas

Coleta e identificação das amostras

A coleta de plantas de referência deve abranger toda a área de estudo e espera-se que esta contemple o maior número possível de espécies. Para cada amostra, são feitas coletas de exsicatas para identificação do material. Desta maneira, evita-se que um determinado componente apareça nas fezes e não seja identificado no material de referência existente. Na amostragem coleta-se em torno de 0,5

kg de amostra que pode ou não ser separada em caules, folhas, e frutos, para confecção de lâminas.

A identificação taxonômica das plantas é feita inicialmente no herbário da Embrapa Pantanal. Quando não possível, as exsicatas são enviadas para especialistas para a identificação taxonômica da planta.

Confecção das lâminas

Para o preparo das lâminas são necessários os seguintes materiais: lamparinas, álcool comum, pinça de madeira, pinça pontiaguda fina, fósforo ou isqueiro, peneiras, lâminas, lamínulas, esmalte incolor e liquidificador. Os componentes vegetais são lavados em água natural ou a quente e misturados em liquidificador por 1 ou 2 minutos (velocidade média para máxima), dependendo do material. As gramíneas geralmente demoram mais para serem trituradas (3 a 4 minutos).

Após a mistura, o material é coado em peneiras de ABNT 80, abertura de malha de 0,77 mm e Tyler 80 e novamente lavado em água corrente. Em seguida, coloca-se uma pequena alíquota deste material no centro da lâmina e adiciona-se a solução de limpeza. Aquece-se a lâmina em chama. Após o aquecimento da lâmina, adicionam-se lentamente algumas gotas de solução de montagem e por último a lamínula. Depois de montada, a lâmina é levada para secar em estufa a 25°C durante 15 dias ou pode-se deixar secar em temperatura ambiente por cerca de 20 dias.

Normas de segurança

Quando for aquecer o material é necessário que o laboratório seja equipado com exaustor ou uma capela, a fim de impedir que a fumaça produzida pelo aquecimento se espalhe pelo laboratório. Além disso, é imprescindível o uso de Equipamento de Proteção Individual como, por exemplo, o uso de máscara, avental e luvas.

Preparo das lâminas de referência com amostras de fezes

Coleta das amostras

O material fecal a ser coletado deve ser, preferencialmente, fresco. O seu armazenamento é feito em pequenos vidros com tampa de rosca contendo álcool 70%. O número de amostras colhido depende do delineamento experimental. Por exemplo, para avaliar a dieta da população de bovinos de uma pastagem cuja distribuição de fezes no campo se concentra nos ditos “malhadores”, coleta-se no mínimo cinco amostras em cada malhador e, o número de malhadores amostrados fica a critério do pesquisador. Com relação aos animais silvestres, as amostras devem ser colhidas sempre que avistadas

(anotando-se a coordenada geográfica) em diferentes épocas do ano, definindo previamente um número mínimo de colheita por época. Deve-se ter cuidado de não coletar fezes existentes na água, pois nesse caso não se consegue distinguir se são recentes ou não.

Confecção das lâminas

As amostras de fezes que se encontram acondicionadas em vidro com álcool 70% são misturadas em liquidificador na velocidade média ou máxima, durante 30 segundos. Não é necessário retirar o álcool nesse processo. Em seguida, o material é lavado com água natural ou morna e coado em peneira tipo ABNT 140, abertura de malha de 1,105 mm e Tyler 150 para retirar o álcool. O material resultante é colocado em pequeníssimas porções no centro da lâmina e a seguir realiza-se o mesmo procedimento descrito para lâminas de referência com as amostras de plantas. Após o preparo das lâminas, estas estão prontas para a leitura e análise em microscópio. A quantidade de amostra assim como as soluções de limpeza e de montagem são ajustadas conforme a necessidade.

Testes e adaptações realizadas no processo

Todos os ensaios foram feitos utilizando como solução de montagem a meia solução de Hoyer que apresenta a seguinte composição:

- 100 g de hidrato de cloral
- 25 mL de água destilada
- 10 mL de glicerina
- 30 g de goma arábica

Num primeiro momento procurou-se avaliar a secagem das lâminas microhistológicas submetidas a diferentes temperaturas e expostas a secagem por um período superior ao método tradicional (15 dias). Assim sendo, foram confeccionadas 42 lâminas microhistológicas para cada ensaio descrito abaixo:

Teste 1: as lâminas confeccionadas com a solução de montagem foram colocadas em estufa a 25°C durante 30 dias.

Teste 2: as lâminas confeccionadas com a solução de montagem original foram refrigeradas à 10°C durante 30 dias.

Para as lâminas que foram submetidas ao Teste 1 foi observado que 10% das lâminas não solidificavam, ou seja, a solução não permanecia fixa dentro da extensão laminar tornado-as inutilizadas para a leitura microscópica. Para todas lâminas confeccionadas e submetidas ao Teste 2 foi verificado que a solução de montagem não solidificava durante todo o período de permanência na temperatura de 10°C.

Durante a confecção das lâminas, observou-se que ao adicionar a goma arábica, a solução de montagem tornava-se mais espessa. Com base nessas observações, decidiu-se realizar novos testes variando a quantidade de goma arábica (4 níveis) na preparação da solução de Hoyer e tomando as lâminas confeccionadas no Teste 1 como referência, pois 90% das lâminas estavam em condições perfeitas de uso. Deste modo foram confeccionadas 42 lâminas de cada amostra conforme descrito na Tabela 1. Após o preparo das lâminas foi observado o tempo de secagem do material a temperatura de 25°C em estufa com circulação de ar, bem como as condições de uso das lâminas e o período que permaneceram sem se haver deterioração e perda de material.

Tabela 1. Condições de ensaio para averiguação da secagem das lâminas.

Amostra	Quantidade de goma arábica adicionada na solução de montagem (g)
1	30
2	40
3	50
4	60

Resultados e considerações

A Figura 1 apresenta os resultados e observações das modificações realizadas na confecção de 42 lâminas de cada amostra. Pode-se verificar que a adição de goma arábica na meia solução de Hoyer contribuiu para diminuir a perda e deterioração das lâminas. Além disso, a adição de goma arábica também proporcionou a aceleração da secagem das lâminas. Com relação ao tempo de secagem na estufa, observou-se uma redução significativa. Ou seja, lâminas microhistológicas preparadas com 60 g de goma arábica ficaram prontas para leitura ou armazenamento após 10 dias de preparo. As perdas por deterioração em função do tempo também foram reduzidas com a adição de goma arábica nas amostras. Até o momento (33 meses após o preparo), as lâminas microhistológicas preparadas com 60 g de goma arábica permanecem intactas e com boas condições de uso para a leitura microscópica.

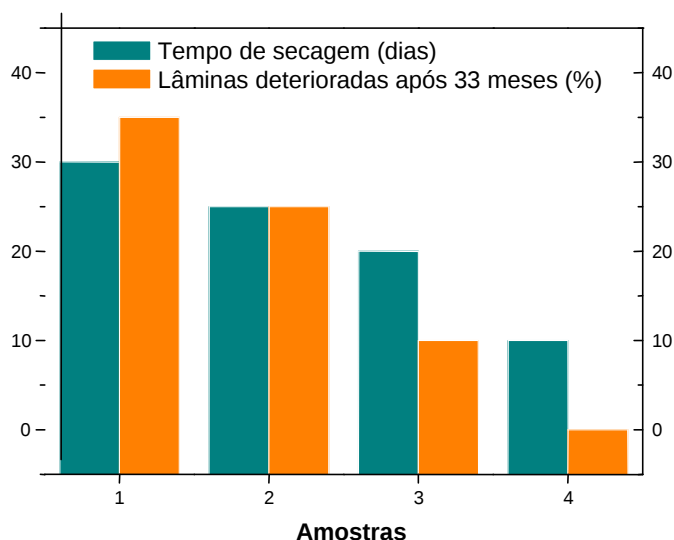


Figura 1. Período de secagem e estimativa da deterioração de laminais microhistológicas preparadas com diferentes quantidades de goma arábica: Amostra 1 (30g); Amostra 2 (40 g); Amostra 3 (50 g); Amostra 4 (60 g).

Na Figura 2 são apresentadas algumas lâminas de plantas que foram confeccionadas no dia 12/03/2008 com as diferentes quantidades de goma arábica e como elas se encontram após 33 meses. Pode-se verificar que a amostra 4 preparada com 60 g de goma arábica encontra-se em perfeitas condições de leitura, enquanto que as demais já se encontram deterioradas.

Na Figura 3 são mostradas lâminas de fezes de ovinos confeccionadas em julho de 2008 com 60 g de goma arábica em perfeitas condições de leitura.



Figura 3. Lâminas microhistológicas de fezes de ovinos confeccionadas em julho/2008 com 60 g de goma arábica.

Conclusões

Concluiu-se que com o aumento de concentração da goma arábica de 30 g para 60 g na solução de montagem, as lâminas ficaram prontas em menor período de tempo, viabilizando o período de confecção para leitura, melhorando também a qualidade das mesmas. As lâminas confeccionadas com estas adaptações encontram-se em perfeitas condições para leitura e não demonstram quaisquer tipos de deteriorização após 33 meses.

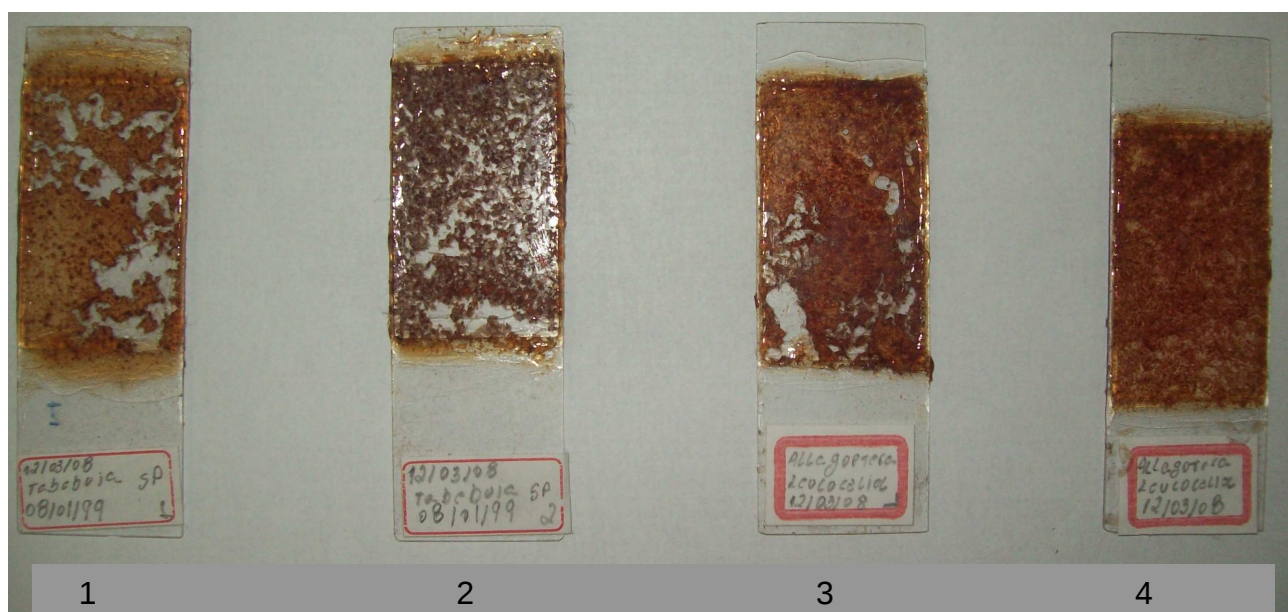


Figura 2. Lâminas de plantas preparadas em 12/03/2008 com diferentes quantidades de goma arábica: Amostra 1 (30 g); amostra 2 (40 g); amostra 3 (50 g); amostra 4 (60 g).

Referências

DESBIEZ, A. L. J.; SANTOS, S. A.; TOMAS, W.M.; ALVAREZ, J. M. Use and partitioning of forage resources amongst two wild herbivores and domestic cattle in a seasonal Neotropical wetland. **Journal of Mammalogy**. [2010?]. No prelo.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.25p.

REID, J. W. Técnicas taxonômicas para copépodes. **Limnotemas**, n.1, p 1-25. fev. 1999. Disponível em: <<http://www.sblimno.org.br/limnotemas/Limnotemasv1.pdf>>. Acesso em 20 out. 2010.

RENTFLEISH, J.; HANSEN, H. H. **Microhistology in the Enreca Project**. Disponível em: <<http://www.husdyr.kvl.dk/htm/hhh/MICROW.htm>>. Acesso em 03 out. 2010.

PAIVA, J. G. A.; FRANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-REIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500â: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n.2, p. 257-264. 2006.

SANTOS, S.; COSTA, C.; SOUZA, G. S.; POTT, A.; ALVAREZ, M.; MACHADO, S. R. Composição botânica da dieta de bovinos em pastagem nativa na sub-região da Nhecolândia, Pantanal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v..31, n.4, p.1648-1662 2002.

SCOTT, G., DAHL, B. E. **Key to selected plant species of Texas using plant fragments**. Lubbock: Texas Tech. Press, 1980. 9p.

SPARKS, D. R., MALECHEK, J. C. Estimating percentage dry weight in diets using a microscope technique. **Journal of Range Management**, v.21, n.4, p.264-265, 1968.

COMO CITAR ESTE DOCUMENTO

GALVANI, F.; GARCIA, J. B.; SANTOS, S. A. **Adequação de metodologia**: preparação de lâminas microhistológicas de referência de tecidos vegetais e fezes. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2010. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 91). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT91>. Acesso em: 31 dez. 2010.

Circular Técnica, 91

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-3234-5800
Fax: 67-3234-5815
Email: sac@cpap.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2010): formato digital

Comitê de Publicações

Presidente: Aiesca Oliveira Pellegrin
Secretária-Executiva: Suzana Maria Salis
Membros: Debora Fernandes Calheiros
Marcel Henrique Amici Jorge
José Aníbal Comastri Filho
Secretária: Regina Célia Rachel

Expediente

Supervisor editorial: Suzana Maria Salis
Normalização bibliográfica: Viviane de Oliveira Solano
Editoração eletrônica: Suzana Maria Salis
Disponibilização na home page: Luiz E. Macena de Britto