

Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâminas (*)

por

N. L. Cerqueira

(Laboratório do Serviço de Estudos e Pesquisas sôbre a Febre Amarela)

Vários meios e fixadores são empregados nas preparações microscópicas destinadas ao estudo dos mosquitos em suas diferentes partes ou fases de desenvolvimento, bem como de outros pequenos dípteros.

Dentre êles o Bálsamo do Canadá e o Líquido de Berlese são os de uso mais comum, embora apresentem alguns inconvenientes que as técnicas mais modernas ainda não conseguiram sanar.

Empenhados em remover tais empecilhos, sem esquecer a necessidade de preparações permanentes e, também, o tempo — fator imposto pela obrigatoriedade de exames imediatos — ensaiamos com várias resinas solúveis em álcool, até a obtenção de um preparado que tem como base colofônia ou breu e goma copal, dissolvidos em álcool com cânfora, eucaliptol e essência de terebintina. Êstes mesmos componentes usados para dissolver as resinas básicas, quando misturados em proporções adequadas, servem para constituir-se, à parte, o dissolvente e, ainda, se adicionado de ácido acético glacial, constitue um líquido de propriedades conservadoras e fixadoras no tratamento preliminar dos espécimes. Como se vê os ingredientes empregados no seu preparo são de facil obtenção e de custo relativamente baixo.

Para os três conjuntos acima enumerados, cujas fórmulas apresentamos adiantes, propomos respectivamente os nomes de ENECÊ, ESSENECÊ e ESSENECÊ-ACÉTICO.

F Ó R M U L A S

I. ENECÊ (Meio)

1. Colofônia branca, pura	22 g
2. Goma copal solúvel em álcool	12 g
3. Álcool absoluto	20 cc

(*) Os estudos e observações em que se baseia êste artigo foram realizados com o apôio e sob os auspícios do Serviço de Estudos e Pesquisas sôbre a Febre Amarela, do Governo do Brasil e da Divisão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller.

* Recebido para publicação a 6 de junho e dado à publicidade em agosto de 1943.

4. Cânfora.	10 g
5. Essência de terebintina	10 cc
6. Eucaliptol.	26 cc

II. ESSENECÊ (Dissolvente)

1. Álcool absoluto.	30 cc
2. Cânfora.	17 g
3. Essência de terebintina	15 cc
4. Eucaliptol.	38 cc

III. ESSENECÊ-ACÉTICO (Conservador e Fixador)

1. Essenecê	90 partes
2. Ácido acético glacial	10 partes

O Enecê é preparado como segue:

Num recipiente que deve ser de preferência um balão de Erlenmeyer, colocam-se o álcool absoluto e a cânfora. A seguir adicionam-se a colofônia e a goma copal (1) depois do que é o frasco arrolhado e agitado para só então ser levado a fogo brando em "banho-maria". Uma vez conseguida a completa liquefação do conteúdo, junta-se a essência de terebintina, filtra-se em seguida com a mistura ainda quente e, finalmente, ao filtrado adiciona-se o eucaliptol.

O Enecê é de reação ácida, tem um índice de refração de 1.467 a 26° C e não favorece o crescimento de cogumelos por não ser aquoso. É destinado a preparações permanentes, podendo ser dissolvido, quando muito espesso, com álcool absoluto, porém este recurso não deve antepor-se ao dissolvente propriamente dito.

A experiência mostrou que o emprêgo do Enecê para material corado pela Hematoxilina, Eosina, Fucsina e outros corantes de reação ácida, em nada prejudica a coloração, prestando-se êle, ainda, para dissecções sem os riscos de um rápido endurecimento. Embora formulado para fins entomológicos, revelou-se, posteriormente aproveitável em montagens histológicas.

As manipulações requeridas para seu emprêgo são singelas e rápidas: o meio na periferia da laminula (2) seca entre 24 a 48 horas, permitindo por esta fôrma o apôio daquela e sem que o meio se retraia. Durante esse tempo o

(1) Quando a goma copal é impura, pode-se purificá-la por meio de filtrações após dissolução no álcool. Para êste fim dissolve-se uma porção de goma em duas de álcool absoluto e depois de dissolvida é filtrada, distribuindo-se em placas de Petri ou vasos semelhantes. A seguir êstes recipientes são levados à estufa graduada entre 50° e 70° C para que se dê a evaporação do álcool. Depois de solidificada a goma é retirada dos vasos para pesagem. É recomendável manter os recipientes cobertos para evitar que a goma absorva água.

(2) Quando as peças montadas forem pequenas é conveniente conservar a lâmina em lugar plano e ventilado, para não correr-se o risco de ver alterada a disposição primitiva dada às mesmas.

material fica mais claro, porem exames satisfatórios podem ser feitos desde que esteja ultimada a montagem.

O desmonte de preparações feitas com o meio, dispensa aquecimento, bastando para tal emergí-los em Essencê ou em álcool absoluto.

Datando já de sete anos os resultados sempre satisfatórios obtidos pelos métodos de fixar e montar que aquí expomos, acreditamos ser suficiente o periodo experimental a que os submetemos, para recomedá-lo.

T É C N I C A

I. Para larvas de mosquitos

As larvas vivas devem ser mortas em Essencê-Acético para serem montadas depois de nele permanecerem por duas ou três horas. A conservação de tais larvas pode, se desejado, prolongar-se no referido líquido por tempo indeterminado.

As larvas conservadas em álcool devem apenas passar pelo álcool absoluto (15 minutos) para serem logo a seguir montadas, enquanto que as conservadas em solução de bórax-formol, ou solução de formalina glicerinada, deverão ser tratadas respectivamente por:

- a) Água destilada, preferivelmente quente (não fervente) 15 minutos;
- b) Álcool 90%, 15 minutos;
- c) Álcool absoluto, para completa desidratação, 15 a 20 minutos;
- d) Montagem.

Ao passar as larvas pelo álcool absoluto, convém fazer um corte com tesoura de ponta aguda entre o quinto e o sexto segmento do abdome para que por êle possa penetrar o líquido de montagem e facilitar o estudo dos últimos segmentos.

E' necessário em tôdas montagens colocar na lâmina, antes do material, uma gota de Enecê e, após êle, outra mais, para convenientemente situá-lo.

Provas comparativas feitas entre vários fixadores conhecidos e o Essencê-Acético, demonstraram que as larvas inteiras de mosquitos, tratadas pelo último, não se contraíam depois de nele montadas, enquanto que com os outros fixadores era necessário cortá-las após a imersão para evitar a contração. A-pesar-disto, devido ao sifão e a outros caracteres importantes situados nos segmentos terminais dos Culicineos, as larvas devem ser cortadas a-fim-de que se possam vê-los melhor. No caso de pequenas larvas vermiformes como por exemplo, as de Ceratopogonidas, é desnecessário usar tal expediente e até mesmo perfurá-las.

II. Para exúvias de larvas e pupas.

Na montagem de exúvias de larvas e pupas deve-se obedecer à seguinte série de manipulações:

- a) Álcool 90%, 10 minutos;
- b) Álcool absoluto, 10 minutos;
- c) Montagem.

III. Para adultos, inteiros ou em partes

1. Os espécimes vivos devem ser previamente mortos em clorofórmio, ou mesmo montados vivos imediatamente em Enecê.

2. Espécimes secos.

a) Os espécimes secos devem ser introduzidos em tubo de cultura, de preferência de 15 x 150 mm, que contenha 3 a 5 cc de solução de hidróxido de potassa a 10 % e postos a ferver em fogo brando entre um e três minutos, conforme a espessura do material. Ao começar a aquecer o tubo convem agitar a potassa para que esta ao ferver não atire fora o material.

b) Transferir com uma pipeta capilar de ponta longa, ou despejar a potassa num cristalizador, e retirar deste o material para outro cristalizador que contenha uma solução de álcool acético (80 cc de ácido acético glacial a 50% e 20 cc de álcool absoluto) ou então uma solução de ácido acético a 10% durante 10 minutos, tempo este que pode ser reduzido à metade se se tratar de genitália de mosquitos. (3)

Os mosquitos inteiros tratados pela potassa podem ser transferidos diretamente desta para Essencê-Acético e aí permanecer durante 30 a 40 minutos, em seguida montá-los em Enecê; ou então conservá-los no líquido por tempo ilimitado.

- c) Passar pelo álcool a 70%, 10 minutos;
- d) Corar em fucsina ácida (a 1% em álcool a 50%), 1 a 3 minutos;
- e) Diferenciar pelo álcool a 70% ou 90%;
- f) Passar pelo álcool absoluto, 10 a 15 minutos;
- g) Montagem.

A coloração com fucsina pode ser feita durante a permanência do material no álcool-acético, bastando para isso que se junte previamente algumas gotas do corante ao álcool-acético.

(3) Temos obtido ótimos resultados com o emprego de arruelas de cartolina de cor, de 12 ou 15 mm de diâmetro externo e cinco ou seis de diâmetro interno, nas montagens de genitálias inteiras de mosquitos. Estas arruelas, além de evitar a pressão exercida pela lamínula sobre a peça incluída, limitam o campo em que elas se encontram, facilitando deste modo a sua focalização.

RESUMO

Apresenta-se a fórmula de um novo meio para montagem de insetos em lâminas tendo como base colofônia e goma copal dissolvidas numa mistura de álcool, cânfora, essência de terebintina e eucaliptol. Descreve-se também a modificação desse dissolvente pela adição de ácido acético glacial para fixação preliminar.

O novo meio é destinado a preparações permanentes e o seu custo é relativamente baixo. As suas características e vantagens são as seguintes: Tem reação ácida. Não favorece o crescimento de cogumelos, por não ser aquoso. Seca lentamente permitindo que dissecções possam ser feitas. Clarifica espécimes não previamente tratados com potassa entre 24 a 48 horas possibilitando assim estudo neste período. Não retrai e seu índice de refração é 1.467 a 26° C. O material pode ser desmontado sem aquecimento. E finalmente não interfere com a coloração quando os corantes empregados são de reação ácida, e pode ser usada em preparações histológicas.

SUMMARY

The formula of a new medium for mounting insects on slides is presented, having as base colophonium and copal dissolved in a mixture of alcohol, camphor, essence of turpentine and eucalyptol. The modification of this solvent by the addition of glacial acetic acid for purposes of preliminary fixation is also described.

The new medium has the same permanence as those which it is designed to replace, and its cost is much less. Its characteristics and advantages follow. It gives an acid reaction. Being non-aqueous, it does not foster the growth of molds. It dries sufficiently slowly to permit dissections to be made. It clears specimens not previously treated with potassium hydroxide within 24 to 48 hours, thus making early study possible. The medium does not retract. Its refraction index at 26° C is 1.467. Mounted material can be dismounted without heating. And finally, it offers no interference to staining when the stain employed are of acid reaction, and can be used in histological preparations.