

Metodos usados em microanatomia e histologia entomológica. (*)

Rudolf Barth

Indice:

I. Introdução

II. Preparações totais

- a) Montagem de esqueletos de insetos inteiros
- b) Montagem de insetos sem pigmentação
- c) Montagem de insetos pigmentados
- d) Preparo do soluto aquoso de dióxido de cloro
- e) Montagem de insetos com coloração
- f) Montagem de asas
- g) Montagem de asas com coloração dos núcleos

III. Fixação

- a) Formol
- b) Sublimado
- c) Ácido ósmico
- d) Branqueamento
- e) Fixadores para orientação geral
- f) Fixação de musculatura estriada
- g) Fixação do protoplasma
- h) Fixação de material para estudos de espermiogênese
- i) Tampão para ácido ósmico
- k) Fixação de derivados do protoplasma
- l) Fixação de folículos, tubos e canais

IV. Desidratação

- a) Desidratação de objetos maiores e partes com cutícula
- b) Desidratação de objetos menores sem cutícula
- c) Desidratação de cortes

* Trabalho realizado sob os auspícios do Conselho Nacional de Pesquisas. Recebido para publicação em 23-7-1958.

V. Inclusão em parafina

- a) Parafina
- b) Parafina com latex
- c) Inclusão de pequenos objetos

VI. Cortagem

- a) Descarregar o micrótomo
- b) Tipos de micrótomos

VII. Coloração

- a) Idratação e desidratação de cortes sobre lâminas
- b) Adesivo de albumina-glicerina
- c) Conservação de corantes sensíveis
- d) Exame de corantes
- e) Coloração para orientação geral I.
- f) Coloração para orientação geral II.
- g) Coloração para orientação geral III.
- h) Coloração das estruturas celulares
- i) Coloração dos gânglios
- k) Coloração dos limites celulares

VIII. Outras técnicas

- a) Solutos isotônicos para insetos
- b) Injeção nas traquéias
- c) Expulsão das secreções
- d) Determinação da relação entre o peso do animal vivo e o da massa cuticular
- e) Demonstração dos órgãos de fagocitose
- f) Preparação de pequenos objetos

I. INTRODUÇÃO.

Examinando a bibliografia entomológica, constatamos que os trabalhos referentes a sistemática ocupam o primeiro lugar, enquanto que o número dos estudos morfológicos, *sensu latiori*, e histológicos é consideravelmente pequeno. Este fato explica-se pela necessidade, de antes de analisar a composição e o funcionamento do corpo, descrever, classificar e registrar a imensa quantidade de insetos no mundo inteiro. Com isso, logicamente, os métodos usados em sistemática são bem conhecidos e uniformizados. O aspecto é bem diferente na parte de micronatomia e histologia; pois, nestas matérias, os resultados dependem, em grande escala, da perfeição das técnicas e da aplicação exata das prescrições de trabalho. Os métodos e indicações, encontrados em numerosos trabalhos, publicados na Europa, América do Norte, e outras regiões de clima moderado, podemos empregar somente com bastante restrições e modificações; por exemplo os de desidratação e de infiltração com parafina, pois as especiais condições climáticas, como umidade relativa e absoluta, temperatura e eletricidade estática do ar e dos aparelhos, exigem precauções diferentes e alterações das indicações encontradas nos manuais sobre técnicas de laboratório.

No início dos meus estudos micronatômicos e histológicos no Brasil, surgiu logo a necessidade de analisar todos os métodos, que usei na Europa e sempre me deram bons resultados, afim de localizar as dificuldades e de encontrar as razões

e fatores, que me impossibilitam o emprêgo das fórmulas clássicas, em nosso laboratório. Por exemplo, não conseguimos cortar séries ininterruptas de cortes com menos de 7 μ , até descobrir que em certos dias, sob condições climáticas especiais (depois da passagem de frentes de ar frio, mesmo de frentes ocultas) a eletricidade estática do ar aumenta tanto, que os cortes de parafina se colam ou enrolam na navalha ou no bloco. Ligando o micrótomo a terra (tubulação de água ou gas), consegui descarregar o metal para evitar êste fator.

Em virtude da falta de descrições de métodos em microanatomia e histologia usados na entomologia e descritos na língua portuguesa, o prof. OLÍMPIO DA FONSECA, então diretor do Instituto Oswaldo Cruz, sugeriu-me compôr, em forma de guia, os métodos mais conhecidos e usados. Assim de forma provisória, saiu a comunicação "Métodos de trabalho na anatomia e histologia entomológica", publicada nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (1953, Vol. 51: 95-186). Durante os seguintes anos modifiquei e aperfeiçonei vários métodos. Estas modificações técnicas foram publicadas, parcialmente, em numerosas comunicações apresentadas em várias revista (Mem. Inst. Oswaldo Cruz; Zool. Jahrb. (Anat.); Rev. Brasil. Biol.; Rev. Ent.; An. Acad. Brasil. Ciênc.). Diversos colegas e interessados propuseram-me desde há alguns anos, uma nova publicação sôbre os métodos que usamos atualmente, de preferência os aplicados na histologia entomológica. Verifiquei, realmente, que sôbre esta parte da microtécnica, no momento não existe nenhuma apresentação especializada, e que os manuais de microscopia se referem, em geral e com poucas excessões, ao material de vertebrados e de alguns invertebrados com excessão dos insetos. Resolvi, então, tentar resumir as novas experiências e indicar as modificações de técnicas, que estamos usando atualmente, sabendo, aliás, que também esta comunicação será incompleta pois, correspondendo às necessidades, oriundo dos problemas em questão, sempre estamos sujeitos de alterar as prescrições. Nêste sentido, esta publicação não representa uma simples coleção de métodos já conhecidos, mas sim um resumo das experiências dos últimos anos de trabalho no laboratório que tem como finalidade ajudar colegas e principiantes, que queiram dedicar-se à matéria em apreço.

Somos de opinião, que cada cientista, que tenha em vista o progresso da ciência, deve comunicar, de vez em quando, os aperfeiçoamentos das suas técnicas e os resultados das experiências obtidas com aparelhos, assim como novos métodos aplicados sob as nossas condições meteorológicas e climatológicas. Estas publicações contribuem, em grande escala, para a formação de novos cientistas.

II. PREPARAÇÕES TOTAIS.

- a) **MONTAGEM DE ESQUELETOS DE INSETOS INTEIROS OU DE PARTES DO CORPO.** Em vez do conhecido método para montagem das partes cuticulares, segundo a descrição de COSTA LIMA (veja: Insetos do Brasil, Vol. 3, págs. 200-201), usamos em geral, uma técnica mais suave na destruição dos pigmentos e tecidos, e na clarificação e desidratação, a fim de manter em posição natural os órgãos internos, facilitando, assim, a análise da anatomia interna:
- b) **MONTAGEM DE INSETOS OU PARTES DO CORPO SEM PIGMENTAÇÃO,** considerando-se êste método como técnica padrão:
 - 1: Fixação por álcool, formol e outro fixador convencional, evitando, aliás, misturas que contêm cloreto ou bicloreto de mercúrio. Aconselha-se fixadores com ácido pícrico que, por sua vez, tingem ligeiramente os órgãos internos.
 - 2: Lavagem e desidratação através da série crescente de álcoois até o de 96%.
 - 3: Enxugar ligeiramente com papel de filtro e colocar em terpinol puro.

- 4: Deixar em terpinol até que o objeto esteja suficientemente diafanizado (até alguns dias, conforme o tamanho do inseto e a grossura da sua cutícula).
- 5: Terpinol puro (alguns minutos).
- 6: Montar em balsamo de Canadá.

O terpinol oferece duas vantagens em comparação com benzol (benzene), xilol, creosoto, óleo de cedro e outros óleos vegetais: Este é capaz de armazenar relativa quantidade de água e álcool, sem turvação, e de não endurecer as articulações do objeto, como é o caso de alguns outros intermediários, facilitando, assim, a montagem final na lâmina.

c) MONTAGEM DE OBJETOS PIGMENTADOS.

- 1: Fixação como em II b).
- 1: Transpor em álcool a 60%.
- 3: Colocar em diafanol (e manter no escuro) até a destruição completa dos pigmentos; o processo prossegue, lentamente, e pode demorar por vários dias. Caso que o líquido descorre, deve ser substituído por nova quantidade.
- 4: Lavagem em álcool a 60%.
- 5: Desidratar até álcool a 90%.
- 6: Terpinol (2 vezes) até diafanizar o objeto.
- 7: Montar em bálsamo de Canadá.

Diafanol é uma mistura de 10 partes de um soluto aquoso de dióxido de cloro e de 1 parte de ácido nítrico oficial (25%; peso específico: 1.145-1.148). O dióxido de cloro (é preciso ter cuidado — pois o gás é venenoso) deve ser guardado no escuro sendo melhor ainda na geladeira a fim de evitar que o gás saia da água.

d) PREPARO DE SOLUTO AQUOSO DE DIÓXIDO DE CLORO (SEGUNDO MOLLER):

- 1: Em um dessecador de 1 000 cm³ de conteúdo, com tampa esmerilhada, deposita-se 220 cm³ de água destilada.
- 2: Em um vidro aberto (tipo Becker), de 100 cm³ de conteúdo, joga-se 12 cm³ de água destilada juntando-se, devagar e sempre mexendo, 44 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, e, depois de esfriar, coloca-se este vidro no dessecador.
- 3: Juntam-se ao ácido diluído 12 g de clorato de potássio (KC10₃) (cuidado explosível).
- 4: Fecha-se o dessecador (evite inspirar o gás do dióxido de cloro) deixando tudo 24 horas no escuro. O gás citado dissolve-se na água do dessecador; o soluto, depois da saturação, tem uma cor fortemente amarelada.
- 5: Este líquido pode ser conservado, por muito tempo, na geladeira.

e) MONTAGEM DE INSETOS COM COLORAÇÃO:

- 1: Fixação como em II b).
- 2: Transpor em álcool a 60%.
- 3: Colocar em diafanol (mantendo no escuro) como em II c).
- 4: Lavagem em álcool a 60%.

- 5: Neutralizar em uma mistura de parte iguais de tiosulfato de sódio (2,5%, aquoso) e nitrato de sódio (5%, aquoso), substituindo este líquido por outra quantidade até ficar sem turvação, mínimo 6 horas.
- 6: Água corrente, 30 minutos.
- 7: Corar os núcleos em galocianina ou azul de galamina, algumas horas até 2 dias conforme o tamanho do objeto. Não há perigo de supercoloração.
- 8: Água destilada.
- 9: Desidratar pela série de álcoois até 96%.
- 10: Coloração contraste em vermelho congo — orange. Duração: na estufa de 60° 2 a 4 horas; na temperatura do ambiente 1 até 2 dias.
- 11: Lavar em álcool 96%.
- 12: Terpinol (duas vezes) até diafanizar.
- 13: Montar em bálsamo de Canadá.

Resultado: Núcleos azuis; protoplasma ligeiramente azulado, músculos amarelos; cutícula (inclusive tendões) vermelho. Em pequenos insetos este método permite analisar toda a anatomia interna, enquanto que em insetos maiores a cutícula grossa dificulta as observações da estrutura dos órgãos internos.

Solutos: a) Galocianina: ferver (3') 0,15 g de galocianina em 100 cm³ de um soluto a 5% de alumem de crômio; deixar esfriar; filtrar e completar o filtrado com água destilada até 100 cm³.

b) Azul de galamina: ferver 0,1g do corante em 100 cm³ de um soluto a 5% de alúme de sódio ou potássio; deixar esfriar; filtrar e completar até 100 cm³ com água destilada.

c) Vermelho congo-orange; mistura-se partes iguais de soluto saturados de vermelho congo e orange "GG" em álcool a 96%.

f) MONTAGEM DE ASAS:

- 1: Colocar a asa no diafanol. A asa irá flutuar sobre o líquido; para aumentar a velocidade de difusão do diafanol, a asa deverá ser molhada por uma gota de éter. Duração: até a asa ficar amarelo claro.
- 2: Colocar em álcool a 96%. No caso de ficarem bolhas de ar nas nervuras, aquece-se o recipiente com o objeto no banho maria, até as bolhas saírem.
- 3: Transpor para vermelho congo. Duração: na estufa a 60° até 30'; na temperatura ambiente 2 horas ou mais.
- 4: Lavar em álcool a 96%, 2'.
- 5: Colocar em terpinol. Controlar até que a asa fique bem transparente.
- 6: Pegar a asa, entrando com o porta-objetos no próprio líquido, e montar em bálsamo de Canadá.

Soluto de vermelho congo: dissolve-se 1 g do corante em 100 cm³ de álcool a 96%, agitando repetidamente. Filtrar depois de 24 horas. O soluto é estável e pode ser usado por muito tempo.

g) MONTAGEM DE ASAS COM COLORAÇÃO DOS NÚCLEOS

Afim de localizar glândulas, sensilas, nervos e hemácias no interior da asa, precisa-se de uma coloração dos núcleos. O seguinte método pode ser aplicado somente em material fresco.

- 1: Fixação em líquido de Carnoy (6 partes de álcool absoluto, 3 partes de clorofórmio e 1 parte de ácido acético glacial) (10').
- 2: Álcool a 96%, 10'.
- 3: Álcool a 60%, 10'.
- 4: Diafanol (até a destruição dos pigmentos).
- 5: Álcool a 60%, 5'.
- 6: Álcool a 40%, 5'.
- 7: Neutralizar (veja sob item II e -5).
- 8: Água destilada.
- 9: Coloração por galocianina (veja sob item II e), algumas horas. Para acelerar a coloração pode-se aquecer, mas não ferver.
- 10: Água destilada, 1'.
- 11: Álcool a 70%, 5'.
- 12: Vermelho congo (veja sob item II f).
- 13: Álcool a 96%, 5'.
- 14: Terpinol e montagem em bálsamo de Canadá conforme o item II f -5 e -6.

III. FIXAÇÃO.

- a) **FORMOL.** Sempre contém certa quantidade de ácido fórmico, por isto deve ser conservado em vidro escuro, pois a formação do citado ácido se efetua sob a ação da luz. A fim de neutralizar o formol concentrado (aproximadamente 40% do gas de formaldehido em água) basta colocar no fundo do vidro uma camada (1 ou 2 cm de grossura) de carbonato de cálcio pulverizado, agitando de vez em quando; o P_{H} corresponde aproximadamente a 6,5.

Como meio de diluição do formol usa-se água corrente, pois a alcalinidade desta neutraliza uma grande quantidade do ácido fórmico.

Nas colorações com corantes sensíveis aos ácidos (hematoxilinas) elimina-se os depósitos ácidos depois de uma fixação em formol, mergulhando a lâmina com os cortes, várias vezes em amoníaco a 2,5% (NH_4OH); esta manipulação, de outro lado, aumenta a afinidade de certas estruturas aos corantes.

- b) **SUBLIMADO (BIOCLORETO DE MERCÚRIO):** Depois de fixação com líquidos, que contém sublimado, deixamos o emprêgo de iodo pois este diminui a afinidade do citoplasma e várias estruturas (fibrilas em células glandulares, fusos e cromatina). A fim de eliminar os depósitos de sublimado deixamos os cortes 24 horas em álcool a 40% na estufa a 60° C. Em vez de sublimado experimentamos o cloreto de mercúrio (calomel) que deu resultados melhores pois o protoplasma coagula em granulações muito mais finas.
- c) **ÁCIDO ÓSMICO (TETRÓXIDO DE ÓSMIO):** Para diminuir o perigo, o tetróxido de ósmio de se reduzir sob a influência da luz ou das impurezas, mantemo-o na geladeira, tanto o ácido tamponado como o soluto em ácido crômico.
- d) **BRANQUEAMENTO DEPOIS FIXAÇÃO COM ÁCIDO ÓSMICO:** A forte coloração escura de certas partes depois de fixadas pelo ácido ósmico (gorduras, óleos, mitocôndrios etc.) pode ser eliminada pelos seguintes métodos:

A. Método com permanganato de potássio.

- 1: Colocar as lâminas com os cortes em xilol até extração total da parafina.
- 2: Álcool a 100%.
- 3: Álcool a 96%.

- 4: Álcool a 70%.
- 5: Álcool a 40%.
- 6: Água destilada.
- 7: Mergulhar as lâminas em um soluto de permanganato de potássio a 0,3%, juntando a mesma quantidade de ácido sulfúrico concentrado.
- 8: Água corrente. mínimo 1 hora.
- 9: Neutralizar em carbonato de lítio (ou bicarbonato de sódio) a 5%.
- 10: Água destilada (duas vezes), 10'.
 - depois coloração com hematoxilina férrica (veja o item VII h).

B. Método com dióxido de cloro.

- 1: Colocar as lâminas com os cortes em xilol até a extração total da parafina.
- 2: Álcool a 100%.
- 3: Álcool a 96%.
- 4: Álcool a 70%.
- 5: Colocar as lâminas num vidro em cujo fundo se colocou antes 10 a 15 gotas de soluto de dióxido de cloro em água (conforme o item II d) até o branqueamento desejado, efetuado pelo gas do dióxido.
- 6: Água destilada, 1'.
- 7: Neutralizar em uma mistura de partes iguais de soluto aquoso de tiosulfato de sódio (2,5%) e nitrato de sódio (5%), renovando o líquido várias vezes até ficar sem turvação (aproximadamente 2 horas).
- 8: Água destilada.
 - depois coloração com hematoxilina férrica (veja o item VII h).

e) **FIXADORES PARA ORIENTAÇÃO GERAL:**

Num corte de insetos encontramos vários tecidos diferentes, que para exame histológico, podemos fixar e corar somente com métodos especiais conforme a finalidade do estudo. Para orientação geral usamos os seguintes métodos de fixação, que conservam todos os tecidos em estado suficiente para uma coloração que permite analisar os componentes que compõem o corte.

A. **Fixação com o líquido segundo Buoin-Dubosq-Brasil (modificado):**

Composição: Soluto-mãe: Soluto saturado de ácido pícrico em álcool a 80%.

Antes do uso mistura-se: 7,5 partes do soluto-mãe, 7,5 partes de álcool a 80%, 6 partes de formol neutro e 1 parte de ácido acético glacial.

Emprêgo: Depois da fixação (2 até 12 horas conforme o tamanho do objeto) colocar o material em álcool a 70%, renovar este algumas vezes até o álcool ficar claro; depois desidratar os objetos pelo método convencional (veja sob item IV a).

B. **Fixação com líquido de Carnoy com sublimado (mod. seg. Weber):**

Composição: 60 partes de álcool absoluto, 30 partes de clorofórmio, 10 partes de ácido acético e 0,6 g de sublimado. Em vez de sublimado pode-se usar cloreto de mercúrio (calomel), juntando este ao álcool da mistura até a saturação

Emprêgo: Dedois da fixação (1 até 3 horas conforme o tamanho do objeto) lavar em álcool a 96% e, depois, desidratar pelo método do item IV a).

f) **FIXAÇÃO DA MUSCULATURA ESTRIADA:**

Fixador de Helly.

Composição: Dissolve-se em 100 cm³ água destilada 2,5 g bicromato de potássio, 1 g sulfato de sódio e 5 g de sublimado. Antes do uso, junta-se 5 cm³ de formol.

Emprêgo: Duração 12 a 24 horas; após a fixação impregnar com bicromato de potássio, 3% em água destilada, durante 5 a 7 dias. Depois lavar em água corrente, 24 horas, e desidratar segundo o item IV a).

Coloração dos cortes com hematoxilina férrica.

Além dos elementos fibrilares dos músculos, consegue-se demonstrar os mitocôndrios intersticiais e o retículo interfibrilar que se tingem em cor cinzento-amarelada.

g) **FIXAÇÃO DO PROTOPLASMA**, especialmente em células glandulares, células do intestino, tecido adiposo e tubo de Malpighi:

A. Fixador de Heidenhain (chamado "Susa"):

Composição: 80 cm³ água destilada, 0,5 g cloreto de sódio, 2 g ácido tricloracético, 4,5 g sublimado, 4 cm³ ácido acético glacial e 20 cm³ formol.

Emprêgo: Depois da fixação (2 à 24 horas conforme o tamanho do objeto) lavar em álcool a 96% (renovar algumas vezes) e desidratar conforme o método comum (veja o item IV a).

B. Fixador de Gilson:

Composição: 880 cm³ água destilada; 20 g sublimado; 90 cm³ álcool a 70%; 15 cm³ ácido nítrico e 4 cm³ ácido acético glacial.

Emprêgo: Duração de 1 à 6 horas. Lavar em álcool a 70% e desidratar pelo método comum (veja o item IV a).

Este último método é aconselhável caso que o material possui partes cuticulares cujas incrustações são parcialmente extraídas.

h) **FIXAÇÃO DE MATERIAL PARA ESTUDOS DE ESPERMIOGÊNESE:**

Para evitar modificações postmortais, empregamos a seguinte técnica de preparação e fixação;

- 1: Decapitar o inseto e abrir dorsalmente o corpo.
- 2: Jogar, com uma pipeta, o fixador na cavidade aberta, a fim de fixar, superficialmente, os testículos evitando, assim, modificações postmortais pela preparação.
- 3: Renovar o fixador algumas vezes durante 10'.
- 4: Isolar os testículos e colocá-los num vidro com o fixador (trabalhar com instrumentos não metálicos).
Como fixador usamos, exclusivamente, ácido ósmico, puro, a 1% (conservar na geladeira).

Para obter os melhores resultados, especialmente, para demonstração de mitocôndrios e do aparelho de Golgi, recomendamos o emprêgo de tetróxido de ósmio tamponado de seguinte maneira:

i) TAMPÃO PARA O_2O_4 (SEGUNDO STERN):

Soluto mãe: Dissolve-se 9,714 g de acetato de sódio ($3 H_2O$) e 14,714 g de "veronal sódico" em água bidestilada (livre de CO_2) ad 500 cm^3 . Mistura-se 5 partes do soluto mãe com 2 partes de um soluto de cloreto de sódio a 8,5% em água bidestilada; é este líquido que chamamos "soluto base". Para obter um certo P_H adiciona-se a 7 cm^3 de soluto base: a cm^3 n/10 HCl e (18-a) cm^3 H_2O bidestilada, conforme a seguinte tabela:

"a"	P_H	"a"	P_H
0,00	9,64	6,50	6,75
0,25	9,16	7,00	6,12
0,50	8,90	8,00	5,32
0,75	8,68	9,00	4,93
1,00	8,55	10,00	4,66
2,00	8,18	11,00	4,33
3,00	7,90	12,00	4,13
4,00	7,66	13,00	3,88
5,00	7,42	14,00	3,62
5,50	7,25	15,00	3,20
6,00	6,99	16,00	2,62

Valores intermediários pode-se calcular por meio de interpolação linear. Para a fixação usamos um P_H de 7,25.

Em cada caso evitamos o emprêgo de ácido acético pois verificamos o mesmo fato, já descrito por vários autores, que este ácido dissolve certas estruturas celulares e provoca uma forte embibição de cromosomas, mitocôndrios, aparelho de Golgi (parcialmente dissolvido) e fibrilas, falsificando, assim, o aspecto microscópico.

Duração da fixação com ácido ósmico tamponado:

- partes com o menor diâmetro até 1 mm -: 1 hora;
- partes com o menor diâmetro até 1,5 mm: 2 horas;
- partes com o menor diâmetro até 3 mm -: 6 horas.

Depois de ter lavado o material em água corrente (24 horas), passa-se pela série de álcoois, terpinol e parafina.

k) FIXAÇÃO DE DERIVADOS DO CITOPLASMA:

Para fixação dos fios do fuso, centríolos, mitocôndrios, aparelho de Golgi, limites celulares e tonofibrilas preferimos ácido ósmico e sublimado. Por este método o citoplasma (*sensu strictiori*) apresenta apenas uma precipitação parcial, dando um aspecto esponjoso, de maneira que, as citadas estruturas ressaltam mais do citoplasma não modificado do que depois de fixação com ácido ósmico tamponado. Usamos a seguinte composição:

- 4 partes de ácido ósmico a 1% dissolvido em ácido crômico a 1% e
- 2 partes de um soluto aquoso de cloreto de mercúrio (sublimado), saturado).

O modo da fixação é o mesmo como o com ácido ósmico puro.

l) FIXAÇÃO DE FOLÍCULOS, TUBOS, CANAIS ETC.:

Afim de fixar objetos em forma de tubos bem esticados, usamos folhas de celofane:

- 1: Prepare uma fôlha de celofane, jogando algumas gotas de um soluto (aproximadamente semisaturado) de celofane em acetona, sobre vidro limpo. Depois de ter evaporado o líquido solvente, corte pedaços do filme em tamanho de uma lâmina.

- 2: Prepare o material em soluto isotônico (veja o item VIII a), fixe uma extremidade do tubo por um fio de “nylon” e coloque o mesmo sobre a folha de celofane que, por sua vez, é colocada sobre uma lâmina de vidro por meio de adesivo de albumina (veja o item VII b).
- 3: Fixação em gás de ácido ósmico:
Deposite algumas gotas do ácido (1% ou 2% em água) no fundo do tubo de coloração e coloque a folha de celofane com o material em posição vertical, no mesmo recipiente, fechando-o depois. O gás de ácido ósmico, acumulado no tubo, dissolve-se no líquido do material fixando o tecido depois de 20 a 30 minutos. A folha de celofane torna-se-á preta como o objeto.
- 4: Trata-se o material agora como depois de fixação comum com ácido ósmico, subindo a série de álcoois até 96%, passando-se depois para álcool-benzol (partes iguais de álcool a 96% e benzol puro). A folha de celofane dissolver-se-á e o material, bem esticado, está pendurado no fio de “nylon”. Depois de tratar o objeto 2 horas com terpinol puro, coloca-se o material, sempre em posição vertical, em parafina líquida, para ser depois de 2 ou 3 horas emblocado em parafina.

IV. Desidratação:

a) DESIDRATAÇÃO DE OBJETOS MAIORES E PARTES COM CUTÍCULA:

A umidade relativa e absoluta do ar muito elevada, especialmente no Rio de Janeiro, dificultam o emprêgo de álcool “absoluto”, pois um álcool, altamente sêco, quando em contacto com o ar, logo reabsorve tanta água que a sua concentração cai até 98% ou menos. Depois de ter experimentado e comparado numerosos métodos, escolhemos como melhor processo de desidratação (especialmente de partes que contêm estruturas cuticulares) uma série de misturas entre álcool a 96% e benzol (benzene) puro, método êste já aplicado por KISSER em material de vegetais. Apresentamos, em seguida, como exemplo, a desidratação de um abdômem de um Lepidóptero com o comprimento de 13 mm e de um diâmetro de 6 mm:

- 1: Fixação segundo Bouin-Duboscq-Brasil —: 6 horas ou mais (Nêste líquido os objetos podem ser conservados durante algumas semanas. Para estudos histológicos, aliás, o material não deve ficar mais do que 12 horas.)
- 2: Lavar várias vêzes em álcool a 70% para eliminar o excesso de ácido pícrico e ácido acético. Duração total: 6 horas.
- 3: Álcool a 96%, 6 horas.
- 4: Álcool a 96% e benzol na proporção 3: 1, 6 horas.
- 5: Álcool a 96% e benzol na proporção 1:1, 6 horas.
- 6: Álcool a 96% e benzol na proporção 1:3, 6 horas.
- 7: Álcool a 96% e benzol na proporção 7:100, 6 horas.
- 8: Benzol puro (duas vêzes), cada vez 6 horas.
- 9: Parafina.

B) DESIDRATAÇÃO DE OBJETOS MENORES SEM CUTÍCULA:

Partes do corpo, menores do que 5 mm de diâmetro e sem cutícula, não precisam deste tratamento demorado. Examinamos vários líquidos intermediários, que podem ser intercalados entre álcool “absoluto” e benzol (ou xilol) afim de eliminar do objeto os restos de água e álcool, que mesmo sendo vestígios, não

saem mais do tecido quando o material está no líquido final. Os melhores resultados que obtivemos foram sempre com terpinol (puro, para análise), que pode ser substituído por eucaliptol que, embora endureça mais o tecido, não possui a grande capacidade de reter água e álcool como observamos com terpinol. A desidratação de um tecido, por exemplo, testículo de um heteróptero, com o diâmetro menor de 2 mm, faz-se conforme os seguintes itens:

- 1: Fixação com ácido ósmico tamponado, 3 a 4 horas.
- 2: Lavar em água corrente, 12 a 24 horas.
- 3: Álcool a 40%, 2 horas.
- 4: Álcool a 70%, 2 horas.
- 5: Álcool a 96%, 6 horas.
- 6: Terpinol e álcool a 96% na proporção 1:1, 3 a 6 horas.
- 7: Terpinol, 6 horas (o material, no início, flutua sobre o terpinol, depois da infiltração afunda e torna-se mais ou menos transparente).
- 8: Terpinol, 2 horas.
- 9: Benzol, 3 a 6 horas.
- 10: Parafina.

Caso que a desidratação é perfeita, não se precisa passar o material pelo soluto saturado de parafina em benzol.

C) DESIDRATAÇÃO DE CORTES:

Depois de algumas passagens de lâminas contendo cortes corados, pela série de álcoois e xilol. este último líquido possui tanto álcool e restos de água, que não desidrata o suficiente, para poder montar o material em bálsamo de Canadá. Para evitar o perigo de turvação do xilol ou bálsamo, incluímos entre o álcool absoluto e xilol uma mistura de:

- benzol — 2 partes.
- toluol — 1 parte.
- xilol — 1 parte.
- terpinol — 3 partes.

Além de reter restos de álcool e de uma certa quantidade de água, este solução oferece a vantagem de diafanizar os corte muito mais intensamente do que benzol ou xilol. Observamos o efeito clarificante de mistura especialmente em cortes finos (0,5 a 2 μ) de células glandulares, ovários e testículos onde, depois de coloração com hematoxilina férrica, o citoplasma torna-se tão transparente, que os outros componentes protoplasmáticos e nucleares se realçam com grande contraste. Assim, a análise das estruturas é muito mais fácil pois, nestes cortes finos, os contrastes são, em geral, fracos e, de outro lado, não se pode aplicar o dispositivo de contraste de fases em corte corados.

V. Inclusão em parafina.

a) Escolhemos como meio de inclusão a parafina, por ser esta substância a única, com que conseguimos cortar fileiras ininterruptas de cortes até menos que 1 μ . Experimentamos também celoidina e celoidina-parafina, mas sempre com resultados não satisfatórios. Observamos que o tratamento do material com éter, clorofórmio ou metanol durante as manipulações preparatórias para a inclusão em celoidina, danifica o aspecto histológico.

b) PARAFINA COM LATEX:

A parafina pura, muitas vezes, não adere suficientemente à cutícula e, além disto, altera sensivelmente a sua consistência conforme a temperatura externa. Sua elasticidade (parafina com ponto de fusão entre 56° e 58° C) é muito elevada

de modo que, em cortes finos, a camada de parafina começa a quebrar-se no momento de cortagem. Afim de evitar êstes defeitos, experimentamos muitas substâncias adicionais à parafina como cêra de abelha, cêra de cocídeos, estearina, asfalto puro etc. recomendadas por vários autores.

Os melhores resultados obtivemos conforme o seguinte método:

Dissolve-se uma certa quantidade de látex (borracha natural) cortada em pequenas porções, em parafina na estufa a 60°. Êste processo leva duas semanas. Misturam-se de vez em quando. O latex não dissolve-se inteiramente na parafina, ficando um resíduo no fundo do recipiente. Depois de filtrar o soluto no interior da estufa (a filtração demora alguns dias), dilui-se o filtrado com parafina pura na proporção de 1 parte do soluto de latex por 4 a 5 partes de parafina.

Esta parafina, um pouco amarelada ou acinzentada, conforme a qualidade do latex, adere firmemente à cutícula e é bem flexível, mas possui bastante resistência para sustentar o objeto no momento da pressão pela navalha do micrótomo.

Êste método usamos, também com os melhores resultados para emblocar material sem cutícula (músculos, ovos, gônadas etc.) que foi cortado com menos de 2 micra no micrótomo de precisão.

c) INCLUSÃO DE PEQUENOS OBJETOS:

- 1: Fixar o material e lavar em água destilada.
- 2: Colocar num vidro de relógio um pouco de um soluto a 2% de Agar em água destilada e deixar até êste se torna gelatinoso. A espessura da camada de Agar solidificado deve ser de aproximadamente 2 mm.
- 3: Pôr o material fixado sôbre o Agar e retirar o excesso de água.
- 4: Cobrir, imediatamente depois, a fôlha de Agar (inclusive o material) com outra porção de Agar, aquecido até 50°. Deixar solidificar.
- 5: Submergir o vidro de relógio com o Agar em álcool a 70%, onde o preparado endurecerá e soltar-se-á do vidro.
- 6: Cortar o Agar com o material em bloco desejado e tingir o mesmo em álcool a 90% com pouco de orange, fucsina ou outro corante, para não perder o bloco na parafina e para facilitar a orientação no micrótomo.
- 7: Desidratar o bloco e infiltrar com parafina conforme o item V. b).

Em vez de corar o bloco, muitas vêzes torna-se mais prático de tingir o material depois da fixação durante a lavagem, antes de colocar no Agar.

VI.

VI. Cortagem.

a) DESCARREGAR O MICRÓTOMO.

Sob certas condições meteorológicas (especialmente em ar frio, antes e depois da passagem de frentes frias ou massas de ar frio, em dias de forte convecção) a eletricidade estática no metal do micrótomo aumenta tanto que os cortes aderem à navalha ou ao bloco de parafina. Para desviar o excesso de eletricidade ligamos o micrótomo com a terra (ligação por arame de cobre entre o parafuso que fixa a navalha, e um bico de gas ou água).

b) TIPOS DE MICRÓTOMOS.

Os micrótomos comuns (onde o transporte do bloco resulta diretamente da rotação de um microparafuso) possuem bastante precisão para cortes de 5 μ ou mais e para cortes em grandes séries. Para estudos citológicos e cariológicos, e

para observação de cortes sem coloração sob contraste de fases, precisamos de cortes uniformes de 1 a 2 μ . Os micrótomos citados não satisfazem estas necessidades. Obtivemos os melhores resultados com o micrótomo de precisão de Jung-Heidelberg, que funciona com navalha móvel e bloco transportado sobre um plano ligeiramente inclinado. Conseguimos com este aparelho, sob condições normais (parafina com látex, temperatura entre 25° e 30°, sem ventilação), cortar o material sem cutícula em fileiras ininterruptas com grossura de 0,5 μ . O aparelho, logicamente necessita de uma limpeza rigorosa, cada vez, antes do uso, pois o acúmulo de poeira sobre as partes deslisantes das peças móveis, altera a grossura, e ainda uma camada grossa de óleo sobre as referidas partes metálicas pode provocar oscilações.

VII. Coloração.

a) HIDRATAÇÃO E DESIDRATAÇÃO DE CORTES SOBRE LÂMINAS.

Os cortes que se colam na lâmina pelo adesivo (albumina-glicerina, veja sob item VII b), fixam-se melhor aquecendo a lâmina, ligeiramente, numa chama pequena de gás, até a parafina começar justamente, a derreter-se. Este método não se deve aplicar em cortes destinados aos exames histológicos e citológicos.

A hidratação e desidratação de cortes, até a montagem em bálsamo de Canadá, seguem aos seguintes itens:

- 1: Xilol para dissolver a parafina (até 5', permanência prolongada dos cortes em xilol diminua a afinidade dos tecidos por vários corantes).
- 2: Álcool absoluto, 1' a 2'.
- 3: Álcool a 96%, 1' a 2'.
- 4: Álcool a 70%, 1' a 2'.
- 5: Álcool a 40%, 1' a 2'.
- 6: Água destilada, até 5'.
- 7: Coloração dos núcleos.
- 8: Água destilada (incluir aqui coloração contraste de corantes aquosos)
- 9: Álcool a 40%, 1' a 2'.
- 10: Álcool a 70%, 1' a 2'.
- 11: Álcool a 96%, 1' a 2' (incluir aqui coloração contraste de corantes alcoólicos).
- 12: Álcool absoluto, 1' a 2'.
- 13: Álcool absoluto, 1' a 2'.
- 14: Mistura conforme o item IV c, 5'.
- 15: Xilol, 3' a 5'.
- 16: Montagem em bálsamo de Canadá (use um bálsamo bem líquido: Deixe descorrer o excesso de bálsamo colocando a lâmina, em posição vertical, sobre papel de filtro; para diminuir a camada de bálsamo entre lâmina e lamínula, colocar-se um pequeno peso — pedaço de chumbo — sobre a última.

b) ADESIVO DE ALBUMINA E GLICERINA:

Mistura-se partes iguais de clara de ovo da galinha e glicerina pura e neutra, deixe a mistura 1 a 2 dias na temperatura do ambiente, agitando o vidro fortemente de vez em quando. Depois de filtrar adicione ao líquido alguns cristais de ácido tímico (timol) ou algumas gotas de formol para evitar o crescimento de cogumelos.

c) CONSERVAÇÃO DE CORANTES SENSÍVEIS:

Os corantes que sofrem, depois de um certo tempo, uma superoxidação e, com isso, perdem a sua intensidade de coloração (como tôdas as hematoxilinas) conservam-se inalterável, durante muitos meses, na geladeira.

d) EXAME DE CORANTES:

Para diferenciar entre corantes ácidos e alcalinos, mistura-se o soluto aquoso do corante a examinar com soluto saturado aquoso de ácido pícrico. No caso que se forma uma precipitação, o corante é de natureza alcalina (corante para núcleos), no caso que não se forma uma precipitação, o corante é de natureza ácida (corante para protoplasma).

e) COLORAÇÃO PARA ORIENTAÇÃO GERAL I.:

Em vez de usar a coloração com azocarmin, segundo Heidenhain (modificação do antigo método de Mallory), aplicamos com bons resultados, para uma orientação geral sôbre a composição dos cortes, o seguinte método:

- 1: Hidratar os cortes até água destilada.
- 2: Coloração em "Kernechtrot" (nuclear fast red), 10' a 20.
- 3: Água destilada.
- 4: Ácido fosfotungstênico (5% em água destilada), 1 a 2 horas.
- 5: Água destilada.
- 6: Coloração em azul de anilina-orange GG, 2 a 3 horas.
- 7: Água destilada.
- 8: Álcool a 40%.
- 9: Álcool a 70%.
- 10: Álcool a 96% (diferenciar, controlando a descoloração no microscópio).
- 12: Álcool absoluto.
- 13: Mistura conforme o item V c.
- 14: Xilol.
- 15: Bálsamo de Canadá.

Solutos:

- A. "Kernechtrot": Dissolve-se 0,1 g do corante em 100 cm³ de um soluto aquoso de sulfato de alumínio a 5% aquecendo-o até 90° e filtrando-o depois de ter esfriado.
- B. Azul de anilina-orange GG: Dissolve-se 0,5 g de azul de anilina (solúvel em água) e 2 g de orange GG em 100 cm³ de água destilada, adicionando-se depois 8 cm³ de ácido acético. Depois ferver, ligeiramente, esfriar e filtrar. Para o uso dilui-se 1 parte deste soluto com 2 ou 3 partes de água destilada.

Caso que se deseja analisar as estruturas mais finas (tonofribilas, membranas, fibrilas protoplasmáticas e cuticulares) é indispensável a aplicação de ácido fosfotungstênico; para uma ligeira análise de um corte, sem perder muito tempo, podemos abandonar o tratamento pelo citado ácido.

f) COLORAÇÃO PARA ORIENTAÇÃO GERAL II.:

Existem vários métodos, para orientação geral sôbre a composição de um corte, baseados em uma coloração dos núcleos com safranina, carmim etc., e em uma coloração contraste com indigocarmim-ácido pícrico. Para evitar as dificuldades permanentes que tivemos com os corantes safranina e carmim (provavelmente

causados pela temperatura elevada e instável, e ainda pela variação qualitativa dos diferentes fabricados), substituímos êstes corantes por "Kernechtrot" (nuclear fast red).

- 1: Hidratar os cortes até água destilada.
- 2: Coloração em "Kernechtrot", 10' a 20'.
- 3: Água destilada.
- 4: Coloração contraste em indigocarmim-ácido pícrico, 1' a 2'.
(1 g do corante dissolvida em 300 cm³ de um soluto aquoso saturado de ácido pícrico).
- 5: Água destilada (rapidamente).
- 6: Mergulhar duas a três vezes em ácido acético a 1% em água destilada.
- 7: Água destilada (rapidamente).
- 8: Lavar rapidamente em álcool a 70%.
- 9: Diferenciar em álcool a 96%.
- 10: Desidratar e montar em bálsamo.

g) COLORAÇÃO PARA ORIENTAÇÃO GERAL III.:

Afim de aumentar o contraste depois de uma coloração com hematoxilina segundo Weigert, usamos (segundo Domagk) a combinação ácido pícrico-vermelho de tiazina:

- 1: Hidratar os cortes até água destilada.
- 2: Coloração em hematoxilina segundo Weigert, 60 a 90 segundos.
- 3: Mergulhar em carbonato de lítio a 5% em água destilada.
- 4: Água corrente, 10' a 20'.
- 5: Coloração contraste em ácido pícrico-vermelho de tiazina, 3' a 5'.
- 6: Água destilada (rapidamente).
- 7: Álcool a 96% (controlar a diferenciação no microscópio).
- 8: Álcool a 100% (duas vezes).
- 9: Mistura conforme o item V c.
- 10: Xilol e bálsamo de Canadá.

Na coloração nuclear pode-se substituir a hematoxilina por carmim dissolvido em alúmen de crômo.

Solutos:

A. Hematoxilina segundo Weigert:

Primeiro soluto-mãe: 1 g de hematoxilina em 100 cm³ de álcool a 96%.
Segundo soluto-mãe: 1,16 g cloreto de ferro em 96 cm³ de água destilada, adicionando-se depois 1 cm³ de ácido clorídrico (peso específico: 1,124).
Antes do uso, mistura-se partes iguais dos dois líquidos. A mistura é instável.

B. Carmim em alúmen de crômo:

Dissolve-se 6 g de alúmen de crômo puro em 100 cm³ de água destilada quente e adiciona-se depois 1 g de carmim; deixar ferver 15' e esfriar para filtrar em seguida.

Duração da coloração 30' até algumas horas. Não há perigo de super-coloração.

C. Ácido pícrico-vermelho de tiazina:

Adiciona-se 7,5 cm³ de um soluto a 1% de vermelho de tiazina à 100 cm³ de um soluto saturado de ácido pícrico em água destilada.

h) COLORAÇÃO DE ESTRUTURAS CELULARES:

Uma única simples coloração com hematoxilina férrica, especialmente, depois de uma fixação com ácido ósmico, e líquidos que contêm sublimado, não produz bastante contraste para diferenciar entre os diversos componentes da célula. Para aumentar o contraste coramos e descoramos os cortes repetidamente:

- 1: Hidratar os cortes até água destilada.
- 2: Impregnação com alúmen de ferro a 2,5% a 3%, 12 horas ou mais.
- 3: Água destilada, 2'.
- 4: Hematoxilina férrica, 12 horas ou mais.
- 5: Água destilada.
- 6: Alúmen de ferro a 2,5%, até descorar os cortes.
- 7: Água destilada.
- 8: Hematoxilina férrica, 3 a 6 horas.
- 9: Água destilada, 2'.
- 10: Repetir os itens 6 a 9 uma ou duas vêzes.
- 11: Água corrente, 2 horas ou mais (depois da diferenciação definitiva em alúmen de ferro).
- 12: Água destilada e desidratação até xilol.
- 13: Montagem em bálsamo de Canadá.

i) COLORAÇÃO DOS GÂNGLIOS (NÚCLEOS E SUBSTÂNCIA TIGRÓIDE):

- 1: Hidratar até água destilada.
- 2: Coloração em galocianina-alúmen de crômio, 24 a 48 horas.
- 3: Água destilada.
- 4: Álcool a 40%.
- 5: Álcool a 70%.
- 6: Álcool a 96%.
- 7: Coloração contraste em cromotrop 2R, 1% em álcool a 96%, 10 a 20'.
- 8: Álcool a 96%.
- 9: Desidratar, clarificar e montar.

Soluto de galocianina-alúmen de crômio:

Dissolve-se 0,15 g de galocianina em 100 cm³ de um soluto de alúmen de crômio a 5% em água destilada; ferver (5'), deixar esfriar e, depois da filtragem, completar até 100 cm³. Este soluto, com P_H 2,09, cora somente os núcleos e, selectivamente, a substância tigróide; caso que se deseja uma coloração de outras estruturas das células nervosas, da neuroglia e dos dendritos e neuritos, precisa-se de um aumento do P_H até 2,60 por meio do seguinte tampão (segundo Einarson):

Soluto A: 5,30 g Na₂CO₃ em 1 000 cm³ água destilada.

Soluto B: 19,10 g Na₂B₄O₇ (+ 10 H₂O) em 1 000 cm³ água destilada.

O tampão, com P_H 11, compõe-se de 97,5 cm³ do soluto A e 2,7 cm³ do soluto B. Para obter um soluto de galocianina com P_H 2,60 mistura-se partes iguais do tampão e do soluto normal de galocianina (citado em cima).

k) COLORAÇÃO DE LIMITES CELULARES:

Para demonstrar os limites celulares e realçar mais as estruturas fibrilosas, (especialmente as tonofibrilas, cauda dos espermios, membranas etc.) fixamos

e impregnamos, concomitantemente, os tecidos em ácido ósmico e nitrato de prata. Chamamos atenção que o método dá bons resultados, somente, em peças com menos de 1 mm de espessura.

- 1: O tecido isolado é lavado em soluto isotônico (veja sob item VIII a).
- 2: Fixação e impregnação em um soluto de nitrato de prata a 2% em um soluto de ácido ósmico a 0,1%; duração 30' até 2 horas conforme a grossura do objeto.
- 3: Água destilada, lavar ligeiramente.
- 4: Ácido pirogálico a 1% ou hidroquinone a 1% em água destilada. Expor à luz do sol a fim de reduzir o nitrato em prata metálica.
- 5: Desidratar e incluir em parafina para depois cortar com menos de 5 μ de grossura.
- 6: Hidratar os cortes até água destilada, corar em galocianina (veja sob item VII i) ou "Kernechtrot" (veja sob item VII e), 24 horas ou 20', respectivamente.
- 7: Água destilada.
- 8: Álcool a 40%.
- 9: Álcool a 70%.
- 10: Álcool a 96%.
- 11: Coloração contraste com vermelho congo-orange, para distinguir a cutícula e a musculatura, 30' na estufa a 60°.
- 12: Desidratar até xilol e montar em bálsamo.

Soluto de vermelho congo-orange GG:

Mistura-se partes iguais de um soluto saturado de vermelho congo em álcool a 96% e de um soluto saturado de orange GG em álcool a 70%.

O líquido de fixação e impregnação pode ser substituído pelas seguintes misturas:

- A. 100 cm³ de ácido nítrico a 5% e 10 cm³ de nitrato de prata a 1%.
- B. 3 partes de formol (a 40%), 1 parte de ácido nítrico a 10% e 1 parte de nitrato de prata a 1%.
- C. 3% de nitrato de prata em ácido ósmico a 0,5% em água destilada.

VIII. Diversas técnicas.

a) SOLUTOS ISOTÔNICOS PARA INSETOS:

- 1. Dissolve-se em 1 000 cm³ de água destilada: 13 g de NaCl, 0,42 g de KCl e, depois da dissolução dos sais, 0,25 g de CaCl₂.
- 2. Dissolve-se em 1 000 cm³ de água destilada: 3,5 g NaCl, 0,05 g de KCl e 0,2 g de NaHCO₃ e, depois da dissolução dos sais, 0,1 g de CaCl₂.
- 3. Dissolve-se em 1 000 cm³ de água destilada: 7 g de NaCl e 3 g de KCl.

Êstes solutos possuem uma concentração suficiente de sais para evitar alterações postmortais durante 10' ou 15'; observamos os movimentos peristálticos do vaso dorsal, do intestino e dos diafragmas ainda até 30' depois da preparação.

b) INJEÇÕES NAS TRAQUÉIAS:

Sobre injeção de sulfito de cobalto, no sistema respiratório dos insetos, encontra-se um método, relativamente simples, publicado por V. B. WIGGELSWORTH, em *Quart. Journ. Micr. Sci.*, Vol. 91: 217-224.

c) EXPULSÃO DE SECREÇÕES:

Para acelerar ou bloquear a formação e a saída das secreções de células glandulares internas, usamos pilocarpina e atropina, respectivamente:

A. Aceleração da atividade glândular:

Injeção, no hemocélio, de pilocarpina (*pilocarpinum hydrochloricum*) a 0,1% em soluto isotônico. Depois de 10' a 15' injeta-se ácido ósmico a 2%, espera-se 20' para depois isolar a glândulas. Em seguida, o objeto é tratado como qualquer outro material fixado em ácido ósmico. No caso de glândula raiócrina usa-se, em vez de ácido ósmico, álcool absoluto puro.

B. Bloqueio da atividade glândular:

Injeção, no hemocélio, de atropina (*atropinum sulfuricum*) a 0,5% em soluto isotônico. Depois de 5' a 10' injeta-se ácido ósmico a 2% e, depois de 20', isola-se a glândula. Em seguida, o objeto é tratado como qualquer outro material fixado em ácido ósmico. No caso de glândula raiócrina usa-se, em vez de ácido ósmico, álcool absoluto puro.

d) DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O PÊSO DO ANIMAL VIVO E DA MASSA CUTICULAR:

- 1: Determinar o peso do animal vivo.
- 2: Colocar o animal morto em KOH a 10% e ferver no banho maria.
- 3: Lavar em água quente e colocar entre algumas folhas de papel de filtro, exercendo-se algumas vezes uma forte pressão sobre o objeto.
- 4: Repetir este último processo várias vezes até o papel ficar limpo.
- 5: Secar a massa cuticular na estufa e, em seguida, deixar o objeto alguns dias sobre pentóxido de fósforo ou outra substância higrofila.
- 6: Determinar o peso da massa cuticular e calcular a relação entre os pesos inicial e final.

e) DEMONSTRAÇÃO DOS ÓRGÃOS DE FAGOCITOSE:

- 1: Injetar, no hemocélio, uma suspensão de carmim ou tinta nanquim, diluída em soluto isotônico.
- 2: Depois de algumas horas, dissecar o animal e observar sob o microscópio binocular.
As partículas de carmim ou tinta nanquim acumulam-se nos órgãos de fagocitose.
No caso de animais pequenos é aconselhável fixar o material e controlar a série de cortes sem coloração sob contraste de fases.

f) PREPARAÇÃO DE PEQUENOS OBJETOS (SEGUNDO A. LUTZ):

A. LUTZ (1920) publicou um método para incluir e conservar pequenos objetos afim de poder examinar os mesmos de todos os lados no microscópio. Experimentando este método, obtive bons resultados, pois este permite observar todos os detalhes o que não se consegue com preparações em bálsamo de Canadá entre lâmina e lamínula.

Apresento, em seguida, um resumo do método (publicado, por extenso, de A. LUTZ em: *A Fôlha Médica*, Vol. 1, n.º 7, em 1920), agradecendo à Dra. BERTHA LUTZ pela gentileza de permitir a publicação resumida:

- 1: Objetos sem pigmentação, fixados em formol, álcool etc., são diafanizados por qualquer líquido clarificante como fenol, terpinol,

eucaliptol, salicilato de metila e benzoato de benzila na proporção de 5:3, etc. Objetos pigmentados são branqueados em fenol ou, em caso de forte pigmentação, em diafanol. Transpor os objetos, depois da diafanização, no líquido final que é o próprio líquido clarificante, citado em cima. Caso que se deseja examinar o objeto apenas externamente, basta uma inclusão em álcool-glicerina (1 parte de álcool absoluto, 1 parte de glicerina e 1 parte de água destilada). Neste método pode-se incluir, também, uma coloração em vermelho-congo, fucsina etc.

- 2: Colocar o objeto num tubo capilar de vidro, com um comprimento pouco menor de uma lâmina, fechado numa extremidade. Depois encher o tubo com o líquido final. Esta manipulação se faz por meio de centrifugação ligeira ou de uma seringa de injeção, deixando alguns milímetros do tubo sem líquido.
- 3: Fechar o tubo cuidadosamente sobre uma chama de gás.
- 4: Para observação coloca-se o tubo numa placa de vidro que contém o mesmo líquido de inclusão. As paredes do tubo desaparecem, ópticamente, quase por completo. Os objetos podem ser examinados de todos os lados.
- 5: Para conservar o material, corta-se pequenas folhas de cartolina em tamanho de uma lâmina (porta objetos) nas quais, por incisões duplas e oblíquas, se formam duas alças que seguram o tubo sobre a folha de cartolina. As indicações são anotadas sobre a mesma cartolina. O material pode ser guardado em caixas para lâminas.