

## AULA PRÁTICA II: MICROSCOPIA E PREPARAÇÕES MICROSCÓPICAS

### 1) MICROSCOPIA:

Inicialmente, examine o microscópio que lhe corresponde e observe os itens listados abaixo. Verifique as instruções do funcionamento e manuseio correto dos componentes listados.

#### 1.1) Os componentes do microscópio:

- a) Base
- b) Platina ou mesa
- c) Charriot
- d) Canhão
- e) Revolver
- f) Objetiva
- g) Ocular
- h) Parafuso macro e micrométrico
- i) Condensador
- j) Íris-diafragma
- k) Iluminar

#### 1.2) Cuidados no uso do microscópio

- a) Nunca força-lo. Todas as conexões devem funcionar suavemente. Caso contrário, chame o professor;
- b) As lentes da objetiva nunca devem tocar a lâmina. Portanto, nunca focalizar abaixando o canhão com o parafuso macrométrico olhando para a ocular;
- c) Não tocar as lentes. Se estiverem sujas, limpe-as com algodão ou com pano que serão fornecidos;
- d) Limpar sempre a objetiva de imersão após o uso. Se o óleo está endurecido, pode aplicar um pouco de xilol sobre o algodão. Cuidado, pois um excesso de xilol pode dissolver o cimento das lentes;
- e) Não esquecer a lâmina no microscópio após o uso;
- f) Manter a platina sempre limpa e seca. Limpa-la com o guardanapo apropriado.
- g) Não inclinar o microscópio, pois neste curso quase todas as técnicas empregadas exigem que a lâmina seja examinada sempre na posição horizontal;
- h) Quando o microscópio não estiver em uso, deverá ser guardado coberto ou em sua caixa;
- i) Habitue-se não deixar a fonte de luz acesa quando não estiver utilizando o microscópio.

#### 1.3) Uso do microscópio

- a) Com a amostra a ser examinada sempre na parte superior, colocar a lâmina sobre a platina, tomando o cuidado de que a parte a ser examinada esteja bem no centro;
- b) Ajustar a iluminação de forma a que passe maior quantidade possível de luz através da amostra;
- c) Colocar a objetiva de menor aumento e abaixar o canhão utilizando o parafuso micrométrico até que a lente esteja cerca de 0,5 cm da lâmina. Nunca efetuar esta operação olhando pela ocular;
- d) Olhar pela ocular e levantar levemente o canhão até obter uma focalização grosseira. Se não conseguir, repetir a operação;
- e) Após focalizar grosseiramente, utilizar o parafuso micrométrico para uma focalização fina;

- f) Acertar a quantidade de luz, movimentando o diafragma. A iluminação deve ser adequada, nem fraca nem excessiva. Nunca movimentar o condensador para baixo para diminuir a quantidade de luz. O condensador deve estar sempre em posição elevada;
- g) Se necessário um aumento maior, girar o revolver para utilizar a objetiva de aumento 45X. Reajustar a focalização com o parafuso micrométrico e a iluminação com o diafragma.
- h) Para utilizar a objetiva 100X, é necessária a colocação de uma gota de óleo sobre a lâmina depois da perfeita focalização com as objetivas de aumento 10X e 45X. Observando lateralmente, girar o revolver até encaixar a objetiva de aumento 100X, ficando esta imersa no óleo e sem que a lente toque na lâmina. A seguir, reajustar o foco com o parafuso micrométrico e a iluminação como no item f. Nunca tentar focalizar diretamente com as objetivas de maior aumento.

## 2) PREPARAÇÕES MICROSCÓPICAS PARA EXAME LABORATORIAL

A diagnose de uma doença, assim com a identificação do seu agente etiológico, nem sempre pode ser feita com base no quadro sintomatológico visual exibido pelo suscetível enfermo. Na maioria das vezes somente um exame microscópico de cortes histológicos, estruturas reprodutivas do patógeno ou raspagem de superfície de lesões nos permitem uma diagnose segura.

Para o preparo de lâminas emprega-se líquidos de montagem. Estes, geralmente, contêm em sua composição, elementos ou substâncias que conferem as propriedades de:

- Colorir esporos e outras estruturas do patógeno e/ou células e estruturas do tecido do hospedeiro. Permitindo melhor clareza na visualização ao microscópio.
- Fixar a peça ou estrutura a ser observada.
- Impedir o dessecamento da preparação e preservar sua integridade estrutural, por tempo mais ou menos longo.

### 2.1) Principais líquidos de montagem:

- Lactofenol de Amann

É o mais usado em laboratórios de fitopatologia. Excelente para coloração de esporos e micélios de fungos hialinos. Apresenta índice de refração de 1,45. Usualmente adiciona-se ao Lactofenol de Amann, azul de algodão (corante) na proporção de 0,1 a 0,5%.

Composição:

Ácido láctico p.a. -----10ml  
 Água destilada -----10ml  
 Fenol crist. ----- 10ml

- Líquido de montagem de Shear

Composição:

Acetato de potássio (solução aquosa a 2%) ----- 300ml  
 Glicerina ----- 120ml  
 Álcool etílico 95% ----- 180ml  
 Glicerina p.a.  
 Água

- Azul de Amann

Composição:

Lactofenol de Amann mais azul de algodão a 0,1 –0,5%  
 Lactofuscina  
 Fuscina ácida ----- 0,1g  
 Ácido láctico -----100ml

### 3) PRINCIPAIS TÉCNICAS USADAS

- 3.1) Fragmentação ou esmigalhamento de estrutura ou corpos frutíferos;
- 3.2) Exame de fungos cultivados em meio artificial;
- 3.3) Corte a mão livre;
- 3.4) Uso da fita adesiva
- 3.5) Raspagem da superfície de lesões.

#### 3.1) Fragmentação ou esmigalhamento de estruturas ou corpos frutíferos.

Técnica especialmente útil para o exame de estruturas de corpos frutíferos de fungos: apotécios, peritécios, picnídios, etc.

Procedimentos:

- Colocar uma gota do líquido de montagem sobre uma lâmina perfeitamente limpa, seca e flambada.
- Com o estilete limpo e flambado, remova pequena porção de material a ser examinado e deposite-o sobre a gota.
- Cubra com lâmina e comprima com batidas suaves e rápidas, executadas com o cabo do estilete.
- Exame ao microscópio. Se desejar conservar a lâmina, faça a lutagem com Zut, Asfalto, Esmalte ou outro material disponível.

#### 3.2) Exame de fungos cultivados em meio artificial

Técnica semelhante a anterior. O micélio de frutificação, transferido para a gota, sobre a lâmina, é dilacerado com auxílio de duas agulhas histológicas ou dois estiletos. Cubra com lâmina e examine.

#### 3.3) Corte a mão livre

Material necessário:

- a) Estilete histológico
- b) Recipiente com álcool (placa de petri)
- c) Lâmina de barbear ou navalha histológica
- d) Recipiente com fixador de CARNOY (placa de petri)
- e) Lâminas e lamínulas
- f) Azul de Amann e Lactofenol de Amann
- g) Medula de girassol ou sabugueiro (material plástico)
- h) Lupa
- i) Microscópio
- f) Micrótono

Procedimentos:

- a) Destaque fragmentos dos tecidos de 1x1cm aproximadamente que apresentem lesões com sinais do patógeno e coloque-os no fixador de CARNOY; Deixe-os durante 15 minutos. Após coloque os fragmentos em álcool durante 15 minutos aproximadamente, até desaparecer o cheiro do fixador (vinagre).
- b) Tome um cilindro de medula de girassol, com cerca de 2cm de altura. Corte-os ao meio, longitudinalmente, com lâmina de barbear, de modo que os dois semi-cilindros apresentem as superfícies internas lisas.
- c) Coloque os fragmentos de tecido vegetal infectado a serem selecionados entre os cilindros.
- d) Corte com um único movimento, da direita para a esquerda, trazendo a gilete na direção do seu corpo, de forma diagonal. É necessário ter paciência para se conseguir bons cortes. Os cortes

histológicos devem ser muito delgados (cerca de 10micrometros) e devem conter os sinais do patógeno.

- e) A medida que for conseguindo cortes, estes são retirados com estiletos e colocados em um recipiente contendo álcool para posterior seleção de bons cortes com auxílio da lupa.
- f) Os cortes em número de 3 ou 4 deverão ser colocados paralelamente sobre uma lâmina contendo uma gota de corante.
- g) Cubra com lamínula e observe a lâmina no microscópio.
- h) Substitua o Azul de Amann pelo Lactofenol de Amann.
- i) Seque bem a lâmina e a lamínula para a lutagem.
- j) Faça a lutagem com betume da Judéia ou outro material.
- k) Etiquetagem. Provisória e definitiva.

Recomendações:

- Cada estudante deverá providenciar a aquisição de 2 lâminas de barbear novas, de boa qualidade;
- Utilize como líquido de montagem o Azul de Amann;
- Escolha à vontade o material para trabalhar.

A título de sugestão, bons cortes podem ser conseguidos com:

*Albugo* sp (Folha de beldroega, serralha ou mostarda).

*Diplodia* sp (Picnídios em colmo de milho).

*Entomosporium* sp (Acérvulos em folha de marmeleiro).

*Pestalotia* sp (Acérvulos em folha de Nêspira).

*Puccinia* sp (Urédias em folhas de sorgo).

*Uromyces* sp (Urédias em folhas de feijoeiro).

*Taprina* sp (Ascus nus em folha de pêssego).

### 3.4) Preparações grosseiras com fita adesiva

Preparações grosseiras para exame rápido podem ser obtidas estendendo-se sobre a superfície da lesão um pedaço de fita adesiva (durex). A fita é removida cuidadosamente e readerida à lâmina. Procedendo-se a observação ao microscópio.

A técnica se presta especialmente para fungos que esporulam na superfície de lesões e cujos esporos não são produzidos no interior da frutificação.

### 3.5) Lâmina de raspagem

Material necessário:

- a) Estilete histológico
- b) Lâmina e lamínula
- c) Lamparina e álcool
- d) Azul de Amann e Lactofenol de Amann
- e) Lupa estereoscópica
- f) Microscópio
- g) Pincéis de pelo de Marta
- h) Esmalte de unhas
- i) Pinça

Procedimentos:

a) Observar a olho nu ou na lupa o material vegetal que apresenta lesões com sinais característicos de um patógeno, na sua superfície.

b) Com auxílio de um estilete histológico raspe levemente os tecidos infectados e retire algumas estruturas patogênicas.

c) Coloque-as numa lâmina, bem seca, contendo no centro uma gota de um corante (Azul de Amann).

- d) Cubra a gota de corante com uma lamínula seca.
  - e) Retire o excesso de azul de Amann, limpando a lâmina e lamínula com cuidado, sem retirar esta última de sua posição original.
  - f) Retire as bolhas de ar, que porventura tenham se formado, com calor brando.
  - g) Observe a preparação microscópica no microscópio.
- 2.8 Substitua o corante (azul de Amann), pelo líquido de montagem (lactofenol de Amann) com o auxílio de uma tira de papel mata-borrão.
- h) Observe novamente a lâmina no microscópio.
  - i) Limpe bem a lâmina e a lamínula, retirando o excesso de lactofenol de Amann.
  - f) Lute a lâmina com betume da Judéia.
  - g) Estique a lâmina.

Observação: Se o espécime a ser examinado está seco, cubra a área a ser raspada com algumas gotas de KCL (2 a 10%), por alguns minutos, antes de tentar remover as estruturas de fungo.

#### 4. Recomendações

- Lamínulas devem ser conservadas imersas em solução de álcool a 50% em recipientes próprios. São retiradas cuidadosamente com auxílio dos dedos e enxutas em pano ou papel de filtro. Nunca devem ser flambadas, pois se quebram com facilidade.
- Após o uso, as lâminas e lamínulas devem ser imersas em solução sulfocrônica:
  - Bicromato de potássio ----- 60g
  - Ácido sulfúrico ----- 60ml
  - Água destilada ----- 1000ml
- Para tanto, separe a lâmina da lamínula e deposite, cada uma, em recipiente próprio contendo solução sulfocrônica.
- Estiletos devem sempre ser flambados antes do uso. Para tanto utilize lamparina a álcool. Nunca deixe uma lamparina destampada ou acesa sem necessidade.