

Preparações temporárias e definitivas

Em microscopia óptica as preparações podem ser temporárias ou definitivas, se apresentam, respectivamente, curta ou longa duração.

Índice da ficha

A. Preparações temporárias

1. Introdução
2. Técnicas para realizar preparações temporárias
 - a. Montagem
 - b. Esfregaço
 - c. Esmagamento
 - d. Cortes finos
3. Coloração
 - a. Técnicas de coloração
 - b. Classificação com base no pH – corantes selectivos
 - i. Básicos
 - ii. Ácidos
 - iii. Neutros
 - c. Classificação com base na origem
 - i. Artificiais
 - ii. Naturais
 - d. Identificação de substâncias orgânicas
 - e. Identificação de estruturas celulares
4. Vantagens do uso de preparações temporárias
5. Desvantagens do uso de preparações temporárias

B. Preparações definitivas

1. Introdução
2. Etapas de realização de preparações definitivas
3. Vantagens e desvantagens do uso de preparações definitivas

A. Preparações temporárias

1. Introdução:

Em microscopia óptica as preparações podem ser temporárias ou definitivas, se apresentam, respectivamente, curta ou longa duração.

As preparações temporárias permitem fazer a observação de células no seu meio normal de vida: água salgada, água doce, soro fisiológico ou plasma sanguíneo.

Por vezes, no estudo de microrganismos e de tecidos animais ou vegetais, temos necessidade de observar o material "*in vivo*", no seu estado natural, sem uso de fixadores ou corantes que de algum modo sempre criam algo de artificial no material da observação.

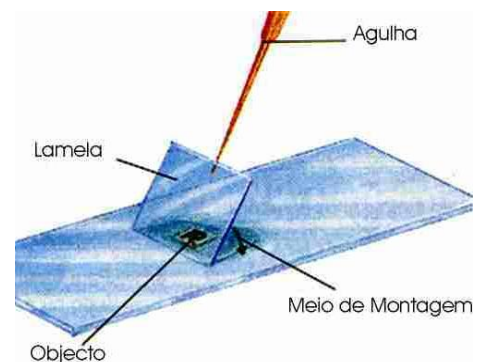
A preparação temporária tem uma duração curta, isto porque pode ocorrer evaporação de meio aquoso, acompanhada de um processo de degradação da célula – decomposição – e autodestruição – autólise.

2. Técnicas para realizar preparações temporárias

a. Montagem

O material a observar é colocado entre a lâmina e a lamela: segurando a lamela, com a ajuda de uma agulha de dissecação, de modo a que ela faça um ângulo de 45° com a lâmina, deixa-se cair lentamente.

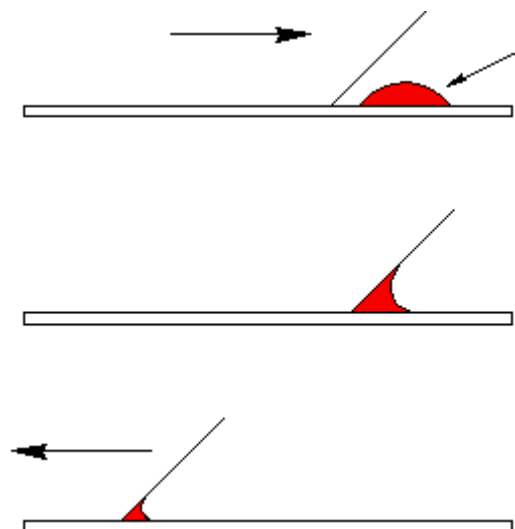
Esta técnica pode ser considerada como um complemento de outras.



b. Esfregaço

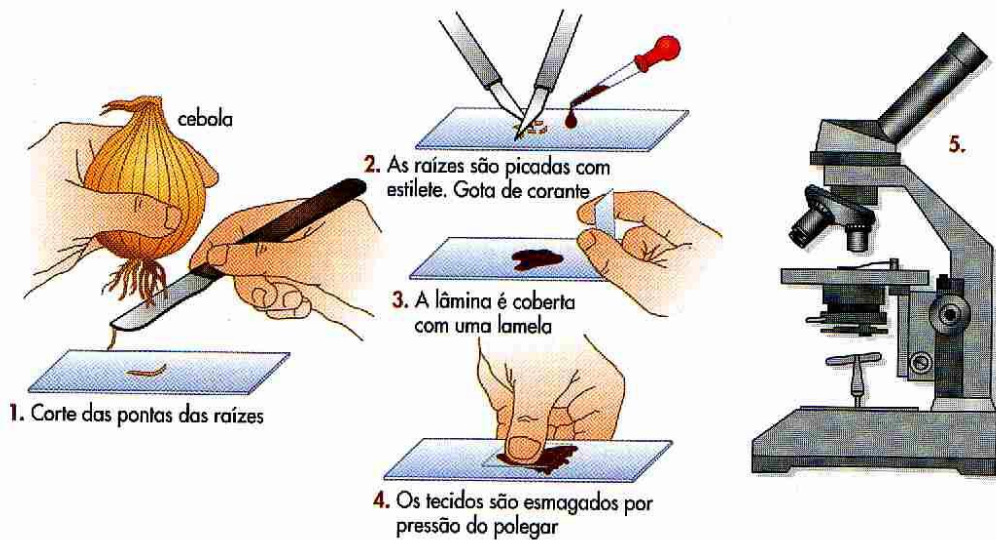
É uma técnica que permite a separação de células em meio líquido. Consiste em espalhar um fragmento de tecido ou de uma colónia sobre uma lâmina de vidro, o que provoca a dissociação de alguns elementos celulares e a sua aderência ao vidro. Forma-se assim uma fina camada de células, facilitando a observação.

Este método é usado na observação de sangue e outros líquidos orgânicos, em que se coloca uma gota do líquido sobre uma lâmina, e com a ajuda de uma outra lâmina ou lamela se espalha bem. Depois de seco o material pode ser corado e fixado.



c. Esmagamento

Este método é usado nos casos em que existe uma aderência fraca entre as células do tecido a observar. Para visualizar as células, basta colocar um pequeno fragmento do tecido entre a lâmina e a lamela e fazer uma pequena pressão com o polegar. Provoca-se assim um esmagamento do tecido, o que faz com que as células se espalhem, formando uma fina camada, que é facilmente atravessada pela luz. (Ex.: Polpa de Tomate)



d. Cortes finos

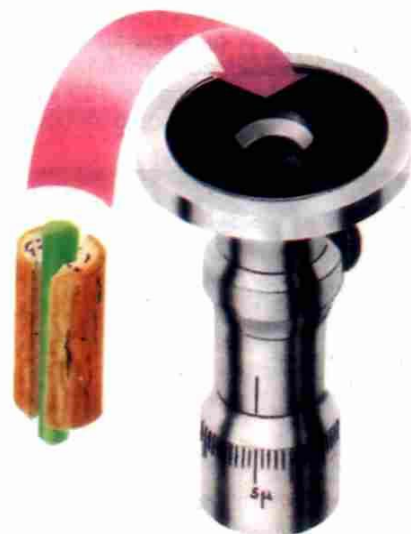
É uma técnica mais complexa e frequentemente usada em histologia. Consiste em cortar o material biológico em finas camadas, susceptíveis de serem atravessadas por raios luminosos.

Foi a técnica utilizada por Hooke na observação da cortiça e utiliza-se sempre que se pretende discernir por transparência os pormenores da estrutura celular de um órgão ou tecido que não é possível com a técnica de esmagamento (pois altera a ordem das células).

Contudo, deve-se ter em conta que se está a observar uma fina camada de uma célula ou organelo e que a realidade tridimensional pode ser muito diferente.

A fim de se obter cortes de espessura regular e finos usa-se um aparelho denominado micrótopo. O material a cortar é inserido em medula de sabugueiro e o conjunto é incluído no cilindro central oco do micrótopo de Ranvier. Para microscopia óptica fazem-se cortes de 5 a 12mm.

Com algum treino e perícia é possível obter cortes de boa qualidade para microscopia óptica usando simplesmente uma lâmina afiada.



Micrótomo de mão improvisado:

Realiza-se uma incisão longitudinal sobre um pequeno fragmento de medula de sabugueiro ou de uma rolha de cortiça. Na incisão introduz-se o material biológico a submeter a corte. Aperta-se com um fio todo o conjunto, apara-se o material que vai para além de face de corte e fazem-se cortes o mais finos possível.

O meio de montagem poderá ser a água ou um corante de actuação rápida. Para observações mais prolongadas utilizam-se líquidos quimicamente mais complexos como o soro fisiológico, o soluto de Ringer, de Knopp ou Locke – líquidos conservadores. O soluto de Ringer é um líquido fisiológico que permite manter as células vivas.

3. Coloração

Quando se observam ao microscópio óptico, preparações de material biológico fresco, pouco se distingue da estrutura interna das células, ao contrário do que acontece no microscópio electrónico. As diferentes estruturas celulares apresentam pouco contraste óptico, isto é, têm um determinado grau de transparência à luz, de modo que, aparentemente, o conteúdo celular é homogéneo, por isso temos de recorrer a estratégias que permitam melhor visualização do conteúdo celular. Para superar este problema os citologistas (cientistas que estudam a célula) desenvolveram técnicas de coloração que consistem em mergulhar a célula numa substância denominada corante, capaz de tingir diferencialmente uma ou mais partes celulares.

No microscópio electrónico não se usam corantes porque a imagem obtida é sempre a preto e branco.

Para realizar preparações temporárias utilizam-se corantes vitais porque podem ser usados em células vivas sem as matarem. Encontram-se em concentrações muito baixas (0,01%), a fim de diminuir a toxicidade nas células. Os corantes podem ser vitais ou não vitais, conforme permitam colorar células vivas e mantê-las assim ou não. O mesmo corante pode ser vital ou não, dependendo da concentração em que se encontra. Ex.: Azul de metileno – pode ser um corante vital se estiver em baixa concentração; O soluto de Lugol é um corante não vital pois mata rapidamente o material biológico.

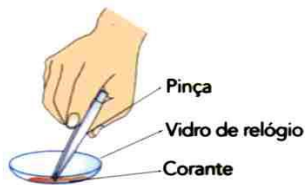
Não existe uma técnica de coloração que ponha em evidência todas as estruturas celulares.

A coloração das células deve-se sobretudo à combinação dos corantes com as proteínas, dependendo portanto da sua carga eléctrica e pH. Por esta razão, o facto de os corantes poderem corar especificamente um organelo e não outro (**corantes selectivos**) está relacionado com a diferença de cargas eléctricas existente entre as proteínas dos diferentes organelos celulares, tendo os corantes uma especificidade para determinada carga eléctrica ou pH, que permita atracção pelo seu próprio e que ocorram ligações químicas. Assim, quando colocamos corante azul numa preparação podemos verificar da início que toda a preparação fica azul, mas se lavarmos a preparação fazendo correr água pelo esguicho, o corante que não se encontra ligado a nenhuma estrutura sai.

a. Técnicas de coloração

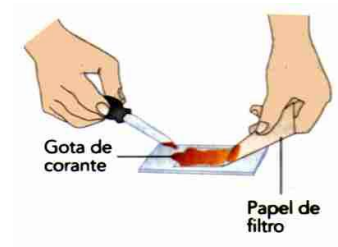
Imersão

O material biológico fica imerso durante alguns minutos no corante seleccionado.



Irrigação

Substitui-se o meio de montagem de uma preparação já efectuada por outro, que neste caso é o corante.



b. Classificação com base no pH - Corantes selectivos:

i. Básicos

Os corantes básicos ou nucleares, coram elementos celulares basófilos. As moléculas ácidas como o DNA e o RNA são basófilas, pois têm afinidade para os corantes básicos.

Corante	Estrutura evidenciada	Cor
Azul de metileno	Núcleo	Azul
Vermelho neutro	Vacúolos	Vermelho
Água iodada	Núcleo Amiloplastos	Roxo escuro

ii. Ácidos

Os corantes ácidos ou citoplasmáticos, coram elementos celulares acidófilos. O citoplasma tem proteínas básicas ou acidófilas.

Corante	Estrutura evidenciada	Cor
Eosina	Citoplasma	Vermelho
Fucsina ácida	Citoplasma	Vermelho

iii. Neutros

Os corantes neutros coram elementos celulares neutrófilos.

Corante	Estrutura evidenciada	Cor
Violeta de Genciana	Cromossomas de células vivas em divisão	Violeta
Soluto de Lugol	Grãos de amido Peredes celulósicas	Azul escuro

c. Classificação com base na origem:

- i. Artificiais - se são fabricados em laboratório
- ii. Naturais - se provêm da natureza.

Corantes naturais	Origem
Açafrão	Estames de <i>Crocus sativus</i>
Anil	Anileira – papilionácea
Carmim	Ovários de um insecto - Cochonilha
Hematoxilina	leguminosa
Orceína	Líquen

d. Identificação de substâncias orgânicas

Substância	Corante/Reagente	Procedimento	Observação característica	
Água	Sulfato de cobre anidro	Num vidro de relógio coloque sulfato de cobre anidro. Junte algumas gotas de água.	O sulfato de cobre anidro toma a cor azul	
Ião cloro	Nitrato de prata	Num tubo de ensaio deite 2 ml de cloreto de sódio e algumas gotas de nitrato de prata.	Forma-se um precipitado branco de cloreto de prata (escurece na presença da luz).	
Ião cálcio	Oxalato de amónio	Num tubo de ensaio deite 2 ml de água de cal e algumas gotas de oxalato de amónio.	Forma-se um precipitado branco de oxalato de cálcio.	
Ião sulfato	Cloreto de bário	Num tubo de ensaio deite 2 ml de sulfato de cobre e algumas gotas de cloreto de bário. Junte ainda 2 gotas de ácido clorídrico.	Forma-se um precipitado branco de sulfato de bário. O precipitado não desaparece.	
Glicose e glícidos redutores	Licor de Fehling ou reagente de Benedict	Num tubo de ensaio deite 2 ml de solução de glicose e adicione 1 cm ³ de solução cúprica de licor Fehling e ainda 1cm ³ de solução alcalina de licor de Fehling. Aqueça até á ebulição.	Forma-se um precipitado cor de tijolo.	
Amido	Soluto de Lugol	Num vidro de relógio coloque amido em pó. Adicione algumas gotas de soluto de Lugol.	O amido toma a cor azul intensa (arroxeados).	
Lípidos	Sudão III	Num tubo de ensaio junte a 2 ml de azeite, igual quantidade de água. Agite. Adicione algumas gotas de solução de Sudão III.	Forma-se uma película de gotas de gordura, de cor avermelhada á superfície da água.	
Péptidos e proteínas	Reacção do bureto	Hidróxido de sódio	Num tubo de ensaio junte a 2 ml de solução de gelatina, igual quantidade de hidróxido de sódio.	Formam-se flocos azuis de hidróxido de cobre.
		Sulfato de cobre	Seguidamente, junte 4 gotas de sulfato de cobre. Agite o tubo, e depois deixe-o em repouso.	O líquido torna-se violeta.
Proteínas	Reacção xantoproteica	Ácido nítrico	Num tubo de ensaio junte 2 ml de solução de gelatina e 1 ml de ácido nítrico. Aqueça.	Aparece uma coloração amarela.
		Amónia	Deixe arrefecer e junte algumas gotas de amónia.	Surge uma coloração alaranjada.
Vitamina C	Água iodada	Num tubo de ensaio junte a 2 ml de água iodada ácido ascórbico gota a gota.	A água iodada perde a sua coloração.	

e. Identificação de estruturas celulares

Estrutura evidenciada	Corante
<u>Amiloplastos</u>	Soluto de Lugol ou Água iodada
<u>Cariossomas (falsos nucléolos)</u>	Hematoxilina ou fucsina básica. (São Feulgen positivo)
<u>Centrossoma</u>	Hematoxilina férrica
<u>Citoplasma</u>	Eosina ou Fucsina ácida ou vermelho do Congo
<u>Complexo de Golgi</u>	Sais de nitrato de prata
<u>Cromossomas</u>	Orceína acética ou Carmim acético ou Violeta de genciana ou Feulgen positivo ou P-A-S- negativo ou hematoxilina e demais corantes básicos...
<u>DNA</u>	Reação de Feulgen
<u>Matriz do hialoplasma</u>	Reativo de Millon (reativo nitroso-mercúrico)
<u>Membrana plasmática</u>	Tetróxido de ósmio (OsO4)
<u>Mitocôndrias</u>	Verde-janus B ou ácido ósmico ou hematoxilina férrica
<u>Núcleo</u>	Azul de metileno ou Água iodada ou Hematoxilina
<u>Parede celular (bactérias)</u>	Método de gram
<u>Parede celular (plantas)</u>	Soluto de Lugol
<u>Plasmossomas (nucléolos verdadeiros)</u>	Verde de metil-pironina (São Feulgen negativo)
<u>Reticulo endoplasmático</u>	Tetróxido de ósmio
<u>Reticulo endoplasmático rugoso</u>	Hematoxilina
<u>Ribossomas</u>	Difenilamina ou azul de toluidina
<u>RNA</u>	Reação de Galocianina
<u>Vacúolos</u>	Vermelho neutro
<u>Vasos condutores de seiva</u>	Carmim de Grenache ou Solução verde iodo

4. Vantagens do uso de preparações temporárias:

- A quantidade de artefactos que pode ser produzida é muito reduzida.
- Possibilita a visualização de material biológico "in vivo", no seu estado natural.

5. Desvantagens do uso de preparações temporárias:

- As preparações não se conservam por muito tempo, mesmo quando se empregam líquidos conservantes; passado algum tempo começam a aparecer sinais de degenerescência, acabando com a morte do material biológico.
- Apenas se pode aplicar a material suficientemente transparente.
- As células grandes ou bastantes frágeis apresentam, por vezes artefactos devido ao peso da lamela.
- Não se pode observar no microscópio electrónico.

B. Preparações definitivas

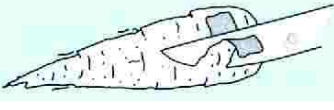
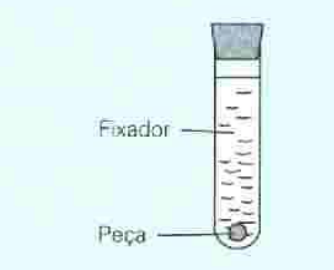
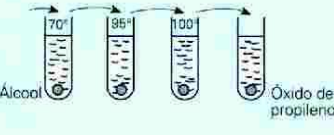
1. Introdução

Embora seja possível o estudo microscópico de células vivas, muitas vezes há vantagem em obter uma preparação definitiva, na qual as células fiquem preservadas, isto é, fixadas e coradas para melhor demonstração dos seus componentes, permitindo posteriores observações.

O material biológico tem, por isso, de ser submetido a diversas operações que permitam que não se decomponha. Uma preparação definitiva ideal deveria mostrar as células com a mesma estrutura microscópica e composição química que possuíam quando vivas. Isto, porém, não é possível, e todos os preparados citológicos apresentam artefactos produzidos pelas técnicas utilizadas.

Um artefacto da técnica é um objecto ou defeito produzido artificialmente, isto é, é produzido pelas técnicas usadas. É algo artificial que não existe na natureza.

2. Etapas de realização de preparações definitivas

	Colheita - Obtenção do material que se pretende observar
 <p>Fixador</p> <p>Peça</p>	Fixação - Paragem rápida de toda a actividade vital, estabilizando a estrutura. Tem como objectivos conservar o mais possível a estrutura que se apresentam enquanto viva, impedindo a acção das enzimas autolíticas. São utilizados fixadores como o álcool, ácido acético, ácido ósmico, mistura de álcool e éter em partes iguais, líquido de Carnoy e líquido de Bouin (fixador universal). Esta etapa também pode ser conseguida através de agentes físicos: por congelação, embebendo a peça num banho frio (por exemplo, azoto líquido de -160 a -190°C). Seguidamente procede-se à remoção dos cristais de gelo, introduzindo a peça no vácuo a temperaturas baixas. No vácuo o gelo sublima e o vapor de água é removido.
 <p>70°</p> <p>95°</p> <p>100°</p> <p>Álcool</p> <p>Óxido de propileno</p>	Desidratação - Consiste na eliminação de água da peça que se está a preparar. Utiliza-se uma série de álcoois de graduação crescente até ao álcool absoluto, passando finalmente pelo óxido de propileno.

 <p>Molde</p>	<p>Inclusão - O material é mergulhado em banho de parafina fundida que o reveste completamente e penetra em todas as suas cavidades. Nestas condições é mantido na estufa durante cerca de 24 horas à temperatura de 56°C. Obtém-se, por arrefecimento da parafina, um bloco que tem incluída a peça, podendo ser posteriormente submetida ao corte. A parafina e a água não são miscíveis. Em substituição da parafina podem utilizar-se outras substâncias como gelatina, araldite, etc.</p>
 <p>Bloco de parafina Porta-objecto móvel Volante Bloco fixo sobre o micrótomo Série de cortes Fita de cortes Faca metálica</p>	<p>Corte - Os cortes da peça incluída no bloco devem ser finos, de poucos micrómetros de espessura, utilizando-se, para isso, aparelhos especiais – os micrótomos.</p>
 <p>Lâmina Platina quente</p>	<p>Colagem - Consiste em fazer aderir o corte à lâmina. Para isso coloca-se a lâmina em placa aquecida (40°C). Sobre ela coloca-se uma gota de água albuminada e o corte, que se distende com o auxílio de uma agulha. Com papel de filtro absorve-se a água em excesso. Vai para a estufa a 40°C durante 24 horas.</p>
 <p>Xilol 100% 95% 70% Álcool</p>	<p>Desparafinação e Hidratação - Eliminação de toda a parafina que serviu para realizar o corte. É obtida através de banhos de xilol. Seguidamente o xilol é retirado, introduzindo a peça numa série de banhos em álcool de graduação decrescente.</p>
 <p>1 2 3</p>	<p>Coloração - Os cortes são introduzidos nos corantes, que vão permitir uma visão diferenciada das várias partes da preparação. Os corantes são substâncias químicas que necessitam de água para se poderem ligar quimicamente a determinadas estruturas celulares.</p>
 <p>70% 95% 100% Álcool Xilol</p>	<p>Desidratação - Eliminação da água da peça que estamos a preparar. Utiliza-se a técnica de banho numa série de álcoois de graduação crescente.</p>
 <p>Bálamo-do-canadá</p>	<p>Montagem - O material é colocado em condições de poder ser observado ao microscópio. Como meio de montagem pode utilizar-se uma resina como o bálamo-do-canadá. Cobre-se a preparação com uma lamela, evitando a formação de bolhas de ar. O bálamo solidifica, fazendo aderir entre si a lâmina e a lamela. A secagem do bálamo é lenta e demora, por vezes, uns dias (em estufa, três dias).</p>

3. Vantagens e desvantagens do uso de preparações definitivas

Vantagens

Duração longa – permite posteriores observações

Permite observação no microscópio electrónico

Desvantagens

O material biológico observado tem de ser morto

Há um maior risco de produzir artefactos devido aos procedimentos utilizados

Adaptado de <http://www.prof2000.pt/users/biologia/pdefinitivas.htm>
e de <http://www.prof2000.pt/users/biologia/ptemporarias.htm>

Por Ana Capelo
Outubro 2008