

TÉCNICAS BÁSICAS DE MORFOLOGIA VEGETAL

A morfologia vegetal, ao estudar a forma descrevendo as relações espaciais dos elementos estruturais, utiliza-se de recursos diversos, tais como: lupa para a análise de órgãos (escala em cm ou mm), microscópio fotônico para a observação de sistemas, tecidos e células (escala em μm), e microscópio eletrônico para o estudo de organelas celulares (escala em Å). Para que o material possa ser visualizado ao microscópio deve ser processado segundo microtécnicas vegetais.

MICROTÉCNICA VEGETAL

O material a ser observado ao microscópio deve ser fino e transparente, de modo a permitir a passagem de luz. Pode ser preparado **a fresco**, indicado para estruturas delicadas ou muito hidratadas e para testes histoquímicos; ou pode ser **fixado**, o que detém os processos vitais de autólise. As amostras são fragmentadas e diafanizadas, ou seccionadas à mão livre ou por micrótomo (de deslize, rotativo, ultramicrótomo etc.), obtendo-se preparações temporárias, semipermanentes ou permanentes.

CORTES HISTOLÓGICOS

CORTES À MÃO LIVRE

É uma técnica simples e rápida, que requer certa habilidade manual para obtenção de cortes finos, executando-se como se segue :

- selecionar parte adequada do vegetal e apará-la segundo o sentido do corte (transversal ou longitudinal);
- quando material muito rígido, reidratá-lo ou fervê-lo em água;
- quando muito delicado, incluí-lo em suporte (isopor, cortiça, medula de embaúba ou sabugueiro etc.);

- segurar o material com uma das mãos e com a outra seccioná-lo com navalha ou lâmina cortante *nova*;
- receber os cortes em vidro-de-relógio contendo água;
- seleccionar os mais delgados, transportando-os com pincel ou estilete;
- se *necessário*, diafanizar com solução de cloral hidratado a 60% ou de hipoclorito de sódio a 20%;
- lavar os cortes com água;
- corá-los com reagentes ou corantes adequados;
- para **preparação temporária**, confeccionar as lâminas utilizando como meio de montagem água ou solução de etanol a 30%, cobrindo com lamínula;
- para **preparação semipermanente**, confeccionar as lâminas com solução de glicerina a 60% ou gelatina glicerinada, cobri-las com lamínula e lutar com esmalte incolor;
- para **preparação permanente**, desidratar progressivamente os cortes em série etanólica (50, 70, 90, 100 e novamente 100%) e diafanizar em série etanol-xilólica (3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro); montar as lâminas com bálsamo-do-canadá ou resina sintética.

CORTES EM MICRÓTOMO

O micrótomo permite que se obtenham cortes com espessura definida, a partir de material rígido ou, quando frágil, infiltrado em suporte adequado. O micrótomo de deslize secciona o material em cortes individuais, enquanto que o rotatório possibilita a formação de uma “fita”, com cortes sequenciais.

O preparo das amostras para seccionamento geralmente envolve fixação, desidratação, infiltração e emblocamento.

Fixação

O processo de fixação procura preservar a estrutura celular, sem alterar a química da célula. Os fixadores são agentes físicos (calor, frio, dessecamento) ou

químicos, sendo que estes últimos, coagulam ou precipitam proteínas celulares e endurecem os tecidos.

Os fixadores químicos podem ser **simples** ou **misturas**. Os primeiros são geralmente soluções aquosas de uma única substância, como :

- ◆ etanol a 70% - precipita as proteínas e os ácidos nucleicos e dissolve os lipídios;
- ◆ ácido acético a 5% - precipita as nucleoproteínas e difunde-se com facilidade;
- ◆ acetona - poderoso solvente de lipídios e preservante de enzimas;
- ◆ tetróxido de ósmio - forte oxidante, muito volátil e irritante;
- ◆ formalina ou formaldeído a 40% - endurece os tecidos, embora não dissolva os lipídios.

Entre os segundos - as misturas - diversas substâncias têm demonstrado poder de fixação superior, a saber :

- ◆ FAA 50 ou 70 - compõe-se de formalina, ácido acético e álcool etílico. O etanol produz retração do protoplasma, no entanto o ácido acético o expande; o álcool e a formalina endurecem os tecidos, enquanto o ácido os amacia;
- ◆ FPA - modificação do fixador anterior, onde o ácido acético é substituído pelo ácido propiônico;
- ◆ Nawaschin - não causa endurecimento nem retração do material, porém possui pequena penetração.

O tempo para que ocorra fixação é variável, dependendo do fixador escolhido, do volume da peça a ser fixada e da resistência da mesma à penetração dos reagentes. Exemplificando, material delicado, como folhas membranáceas, pode ser fixado em 12h, enquanto que ramos lenhosos podem necessitar de 7 dias. Depois de fixado, o material é estocado em solução de etanol a 70% indefinidamente.

Desidratação

A desidratação remove a água dos tecidos fixados e endurecidos, para que a matriz possa penetrar nas células e tornar o material resistente ao impacto do micrótomo. O método de desidratação mais comum emprega série etanólica, onde o

material passa sucessivamente por soluções cada vez mais concentradas de etanol (50, 70, 90, 100 e 100%), por um tempo determinado.

Infiltração

Quando a matriz escolhida é insolúvel em etanol, este deve ser substituído gradualmente por um solvente onde a mesma seja solúvel, para que possa penetrar no interior da célula. No caso da matriz ser parafina, após desidratação, o material passa por série etanol-xilólica (3:1, 1:1, 1:3, xilol puro), o que o torna apto a receber a matriz. Procede-se à substituição gradativa do xilol pela parafina, adicionando-se parafina fundida em estufa ao solvente e descartando-se metade da mistura, repetidamente após tempo adequado.

Frequentemente, a matriz de escolha é a parafina, por ser menos onerosa e apresentar bons resultados. Entretanto, pode-se optar por :

- ◆ paraplast - mistura de parafina altamente purificada com polímeros plásticos e dimetilsulfóxido, que permite melhor penetração e infiltração (aderência);
- ◆ celoidina - nitrato de celulose, que se solubiliza em mistura de álcool e éter, em ambiente anidro;
- ◆ metacrilato - historresina ou metacrilato glicol diestearato, solúvel em água e usado para materiais duros.

Inclusão ou emblocamento

O material devidamente infiltrado é colocado em um molde (caixinha de papel ou de plástico), que é preenchido pela matriz, de modo a formar um pequeno bloco. Este é aparado e pode ser encaixado no micrótomo para ser seccionado.

Seccionamento em micrótomo

O bloco devidamente aparado é colocado sobre suporte, fixado no micrótomo e seccionado. A fita formada ou os cortes individuais são apoiados em fundo escuro para facilitar a visualização.

Distensão dos cortes

Os cortes são aderidos a lâminas histológicas, geralmente utilizando-se dos adesivos de Haupt ou Bissing. Essas lâminas são colocadas em placa aquecedora até distensão dos cortes (ficam translúcidos) e depois levadas à estufa para secar.

Desparafinização e diafanização

As lâminas são retiradas da estufa e imersas em xilol para retirada da parafina (matriz). São coradas, usualmente por meio de reidratação, solução de corante e desidratação, como se segue : série etanol-xilólica (1:3, 1:1, 3:1 e etanol a 100%), série etanólica descendente (100, 90, 70 e 50%), coloração com solução de corante a 50% em etanol, série etanólica ascendente (50, 70, 90, 100 e 100%) e série etanol-xilólica (3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro). O xilol favorece a transparência dos cortes.

Montagem

À lamínula adiciona-se o meio de montagem (bálsamo-do-canadá, euparal ou resinas sintéticas: Harlecco, Permout etc.) e esta é sobreposta na lâmina, deixando secar.

DISSOCIAÇÃO DE ELEMENTOS CELULARES

Os cortes histológicos apresentam as estruturas bidimensionalmente. Para se obter uma visão tridimensional, os elementos celulares devem estar isolados, mediante técnica de dissociação ou maceração. Essa técnica consiste na separação mecânica e química das células, por meio de reagentes que desintegram a lamela média. Vários métodos podem ser aplicados, tais como :

- ⇒ método de Jeffrey - mistura de ácido nítrico a 10% e ácido crômico a 10%, na proporção de 1:1;
- ⇒ método de Foster - mistura de etanol a 70% e ácido clorídrico concentrado (3:1);

⇒ método de Franklin - mistura de água oxigenada 20 vol. e ácido acético glacial (1:1).

DIAFANIZAÇÃO OU CLARIFICAÇÃO

A técnica de tornar semitransparentes peças vegetais de tamanhos variados, geralmente laminares, é denominada de diafanização ou clarificação. Basicamente consiste na dissolução do conteúdo celular, restando apenas a parede celular, o que se presta eficientemente para o estudo da nervação foliar.

Os reagentes empregados para diafanização comumente são soluções aquosas de hidróxido de sódio a 5-20%, cloral hidratado a 30-60% ou hipoclorito de sódio a 10-20%. Para se confeccionar lâminas permanentes, o material diafanizado é corado, desidratado em série etanólica e etanol-xilólica e montado com bálsamo ou resina, entre lâmina e lamínula.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Fixadores

Nawaschin

ácido crômico a 1%	75ml
ácido acético glacial	5ml
formalina	20ml

FAA 50 (ou 70)

formalina	5ml
ácido acético glacial	5ml
álcool etílico a 50% (ou 70%)	90ml

Craft III

ácido crômico a 1%	30ml
ácido acético a 10%	20ml
formalina	10ml
água destilada	40ml

Corantes e reagentes

Sudan IV

Sudan IV	5g
etanol a 80%	100ml
glicerina	10ml

Lugol

iodo	1g
iodeto de potássio	3g
água destilada	300ml

Cloreto de zinco iodado

cloreto de zinco	30g
iodo	0,9g
iodeto de potássio	5g
água destilada	14ml

Floroglucinol clorídrico

etanol a 95%	100ml
ácido clorídrico	25ml
floroglucinol	1g
água destilada	25ml

Sulfato férrico

sulfato férrico	10g
formalina	5ml
água destilada	100ml

Cloreto férrico

cloreto férrico	10g
carbonato de cálcio	traços
água destilada	100ml

Azul de astra

azul de astra	0,5g
ácido tartárico	2g
água destilada	100ml

Fucsina básica

fucsina básica	0,5g
etanol a 50%	100ml

Safranina

safranina	1g
etanol a 95%	100ml

* no momento do uso, diluir em água destilada (1:1).

Adesivos**Adesivo de Haupt**

gelatina	1g
fenol	2g
glicerina	15g
água destilada	100ml

Adesivo de Bissing

formalina	6ml
adesivo de Haupt	1,4ml
água destilada	194ml

Meio de montagem**Gelatina glicerinada de Kaiser**

glicerina	70ml
gelatina	10g
fenol	1,4g
água destilada	60ml

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

BERLYN, G.P. & MIKSCHE, J.P. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University Press, 1976.

BUCHERL, W. Técnica microscópica. 3.ed. São Paulo: Polígono, 1962.

FOSTER, A.S. Practical plant anatomy. 2.ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. Nature, London, v. 155, n. 3924, p. 51, 1945.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book, 1940.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. Mikrokosmos, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

SASS, J.E. Botanical microtechnique. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951.