

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DO PANTANAL
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADE ORIENTADA DE ENSINO

**METODOLOGIAS PARA CONFEÇÃO DE LÂMINAS PERMANENTENS DE
ZOOPLÂNCTON**

Joyce Kellen Rosa da Silva

CORUMBÁ – MS

2024

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	2
3 METODOLOGIA	2
4 RESULTADOS	6
5 FIGURAS	7
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	10
7 REFERÊNCIAS	10

INTRODUÇÃO

A ecologia das águas continentais requer um grande estudo para entendimento das comunidades que habitam essas águas. A pesquisa sobre organismos zooplanctônicos é uma parte fundamental do entendimento da limnologia, e ainda é um desafio para os ecólogos pois possui poucos estudos e pouca abordagem metodológica sobre técnicas de preservação em lâminas permanentes. Segundo Neiff (1990), cursos de águas continentais são habitados por espécies como as de zooplâncton, que indicam diferentes mudanças que ocorrem na dinâmica hidrossedimentológica do sistema.

Zooplâncton é um termo genérico para um grupo de animais de diferentes categorias sistemáticas, tendo como característica comum a coluna d'água como seu habitat principal (Esteves, 2011). As espécies zooplanctônicas tem uma grande diversidade e abundância em planícies de inundação devido a sua alta capacidade de colonizar vários ambientes, incluindo estratégias de reprodução e alimentação, caracterizando assim um ecossistema bastante heterogêneo (Lansac-Tôha, 2002). Eles são a base da cadeia alimentar e são capazes de realizar inúmeros processos ecológicos essenciais para manter o equilíbrio dessas águas. Segundo Esteves (2011), o zooplâncton possui um papel central na dinâmica de um ecossistema aquático, especialmente na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia.

Uma das características principais desses organismos zooplanctônicos é a transparência, o que facilita no estudo na microscopia que utiliza lâminas para visualização da anatomia do organismo no microscópio eletrônico. A fabricação de lâminas em laboratório é utilizada para diferentes objetivos, e um dos mais importantes é a identificação e preservação do material (Cruz; Schell, Schuhli; Queiroz, 2018). De acordo com Schaden (1995), um dos meios mais apropriados para zooplânctons como os rotíferos são a glicerina e a gelatina glicerinada, dessa forma viu-se a grande importância de se elaborar uma técnica de laminação permanente em organismos zooplanctônicos em foco nas ordens de Cladocera, Copepoda e também das espécies de Tardígrados, para preservar o material e utilizá-lo em estudos futuros.

Estudar os organismos zooplanctônicos não é uma tarefa fácil, requer muita atenção e cuidado devido ao seu tamanho microscópico, e com isso seria

fundamental haver no laboratório pertencente a uma região tão diversa como o Pantanal, um acervo em laminário permanente, com espécies representativas da fauna zooplanctônica presente no pantanal sul-mato-grossense, uma área tão rica e ainda pouco estudada. Principalmente na área de elaboração de lâminas permanentes, onde não possuem um modelo padrão de montagem voltadas a Cladocera, na qual foram encontradas na literatura apenas abordagens de preparação de lâmina em que não há a necessidade de preservação do material em laminário por longo período (Kiara; Rocha, 2009).

Nesse sentido o principal objetivo deste trabalho foi realizar testes para a criação de uma metodologia de montagem de lâminas, dessa vez permanentes, com o intuito de ficarem depositadas no Laboratório de Ecologia da UFMS-CPAN, como um acervo que servirá como um facilitador de estudo e observação das espécies zooplanctônicas do Pantanal Sul-mato-grossense.

2 OBJETIVO

Desenvolver um método eficaz e duradouro de preparação de lâminas permanentes de zooplâncton, para que exista uma metodologia específica de montagem de lâmina para visualização em microscópio, e que essas lâminas preparadas fiquem expostas no laboratório de Ecologia da UFMS por muitos anos, com o intuito de ajudar em pesquisas e estudos de quem for utilizá-las.

3 METODOLOGIA

3.1. Primeiro procedimento:

Os animais manipulados nesta metodologia foram retirados do banco de amostras do Laboratório de Ecologia da Universidade Federal de Mato-grosso do Sul campus do Pantanal, na qual encontravam-se fixados em formol 4%. Inicialmente foi preparado a solução AFA (Álcool – Formalina - Ácido acético), na qual consistiu em 42,5 partes de álcool, 5 partes de formol e 2,5 partes de ácido acético glacial, para fixação dos espécimes de zooplâncton. Realizou-se a coleta dos mesmos em uma capela com uma pipeta graduada e despejados e um frasco de vidro de 100ml, para a fixação. Em seguida preparou-se uma solução de corantes, com eosina e laranja-G com concentrações iguais no álcool

etílico. Logo após, efetuou-se a mistura de fenol, salicilato de metila e bálsamo do Canadá em um eppendorf.

Depois de todos os materiais estarem em suas devidas soluções e separados, colocou-se alguns espécimes de Cladocera em um eppendorf para serem centrifugados no spin. Após a centrifugação, o material sobrenadante foi retirado e seguidamente incorporou-se a solução AFA por 10 minutos para fixar os espécimes. Após 10 minutos foi retirada a solução AFA com uma pipeta de vidro e foi colocada a solução corante por 3 minutos. A seguir retirou-se o corante e incorporou-se o fenol por 2 minutos. Retirou-se o fenol e aplicou-se o salicilato de metila no eppendorf novamente por 2 minutos. E por último retirou-se o salicilato do eppendorf e os espécimes já estavam prontos para ser preparados na lâmina com algumas gotas de Bálsamo. Todas as soluções retiradas do eppendorf com os espécimes foram despejadas em um tubo de ensaio para serem descartadas.

3.1.1. Segundo procedimento:

O segundo procedimento concebeu-se no dia seguinte ao primeiro, na qual todas as soluções estavam preparadas devido ao dia anterior e o principal objetivo era fazer lâmina com o bálsamo do Canadá sem bolhas de ar e sem a utilização das soluções corantes. Realizou-se diversas pesquisas para solucionar a adversidade do aparecimento de bolhas de ar na criação das lâminas, encontrou-se a técnica de colocar um fragmento de plástico ou qualquer outro material para apoiar a borda da lamínula para evitar que o material seja esmagado, citado em Kihara e Rocha (2009, p. 52). Colocou-se em prática a técnica na montagem da lâmina. Dessa vez coletou-se alguns espécimes no tanque da UFMS-CPAN e transferiu-se para uma placa de petri através de uma pipeta e depois alguns foram colocados em um eppendorf com a solução AFA e álcool para serem fixados. Em seguidas passaram na centrífuga e o material sobrenadante foi retirado e depois disso selecionou-se alguns espécimes para a montagem da lâmina com o bálsamo.

3.2 Metodologia 2 baseada no protocolo de Kiara & Rocha (2009)

3.2.1 Primeiro Procedimento

Nesse novo procedimento realizado baseou-se no método de montagem de lâmina com gel de glicerina, abordado na página 62 de Kiara e Rocha (2009). Primeiramente incorporou-se água destilada a gelatina incolor por aproximadamente 10 minutos em um tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se glicerina a gelatina por mais 10 minutos no tubo de ensaio e logo após colocou-se em um béquer em banho maria a aproximadamente 40° por alguns minutos até ficar homogêneo e com uma consistência de gel.

3.2.2 Segundo procedimento

No segundo procedimento ocorreu a fabricação de lâminas com o meio de montagem gelatina + glicerina preparado no dia anterior. O meio de montagem encontrava-se solidificado, portanto, foi colocado em banho maria com temperatura de aproximadamente 40°. Utilizaram-se novamente amostras da ordem Cladocera, do acervo de zooplânctons do laboratório de ecologia da UFMS-CPAN, na qual foram adicionados ao eppendorf com álcool 80%, seguindo os protocolos de fixação.

Iniciou-se a montagem da lâmina, na qual consistiu em retirar os espécimes do eppendorf com a pipeta e transportá-los para a lâmina, em seguida despejaram-se algumas gotas de glicerina e gel de glicerina na lâmina e alinharam-se os animais na superfície. Retiraram-se bolhas de ar que se formaram durante o processo e a lamínula pode ser colocada por cima.

Preparou-se no mesmo dia um novo meio de montagem para que não houvesse mais as adversidades de formação de bolhas de ar durante a preparação. Realizou-se o mesmo procedimento com a gelatina hidratada com água destilada gelada em um tubo de ensaio e após alguns minutos adicionou-se a glicerina ao tubo de ensaio através de uma pipeta volumétrica.

3.3 Metodologia 3 RV-MOUNT

Após um período de pesquisas bibliográficas e aprimoramento de técnicas relacionadas à fabricação de lâminas com diferentes meios de montagem (bálsamo do Canadá e glicerina + gel de glicerina), decidiu-se utilizar uma solução chamada RV-mount, muito utilizada na histologia e citologia, que se encontrava disponível no laboratório. Por ser um meio de montagem muito

viscoso, dificulta a mobilidade no ajuste dos animais na lâmina, por esse motivo diluiu-se a solução rv-mount com xilol em proporções iguais dos dois produtos com a finalidade de deixá-lo mais maleável para a montagem da lâmina.

3.3.1 Primeiro procedimento

Coletou-se espécimes de zooplâncton das amostras do Laboratório de Ecologia da UFMS-CPAN e adicionou-se ao eppendorf, após alguns minutos o material sobrenadante foi retirado com pipeta de vidro e adicionado álcool 80% por 3 minutos. Em seguida retirou-se o álcool e adicionou-se novamente o álcool por mais 3 minutos. Após esse procedimento, retirou-se o álcool e adicionou-se xilol por novamente 3 minutos. O procedimento foi repetido mais uma vez até que se retirou o xilol e descartou-se no béquer.

Logo depois retiraram-se os animais do eppendorf e transferiu-se para um vidro relógio para serem analisados e selecionados para testes com meio de montagem rv-mount + xilol. Após serem transferidos para a lâmina, adicionou-se o meio de montagem e em seguida a lamínula por cima com esmalte incolor seco como base de suas pontas para evitar o esmagamento dos espécimes. Devido a agitação do meio de montagem, as lâminas ficaram com muitas bolhas, dessa forma realizou-se uma nova mistura de rv-mount com xilol em um frasco pequeno com proporções iguais sem agitação para evitar a ocorrência de bolhas de ar.

Com isso, efetuou-se a preparação de uma nova lâmina com os espécimes da mesma amostra que foi fixada com álcool e xilol no eppendorf. Portanto os animais foram retirados do tudo e adicionados ao vidro relógio para serem selecionados e colocados na lâmina com o meio de montagem e logo após a lamínula foi colocada por cima com o esmalte incolor na base de suas bases. Dessa forma a lâmina encontrava-se pronta.

3.3.2 Segundo procedimento in loco

Após diversas tentativas de confecção de lâminas utilizando os zooplânctons das amostras do laboratório de ecologia da UFMS-CPAN, manipulando-os em vidro relógio para passar pelo processo de xilol + álcool, concluiu-se que este manejo estava prejudicando a integridade dos animais. Portanto decidiu-se fazer todo procedimento in loco, ou seja, na lâmina em que os animais seriam fixados com o meio de montagem.

Dessa forma, retirou-se um espécime de zooplâncton do meio em que estavam fixados com formol e transferiu-se um para cada lâmina, utilizando pinças e pipetas para serem manipulados na lupa (figura 1). Após transferir o animal iniciou-se o processo de mudanças de meios, foi adicionado álcool 50% por 3 minutos, logo após adicionado álcool 100% por 1 minuto, e novamente álcool 100% por 1 minuto. Em seguida adicionou-se o xilol por 1 minuto e logo após adicionou-se novamente xilol por mais 1 minuto. Ao final do processo foi feito uma barreira de rv-mount em volta do animal na lâmina para impedir que a lamínula o esmagasse (figura 2). Em seguida adicionou-se o meio de montagem na lâmina com muito cuidado e logo após adicionou-se a lamínula por cima (figura 3).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados da metodologia 1

Inicialmente utilizou-se uma metodologia clássica da literatura, na qual consiste na aplicação da solução AFA para retirada da água do espécime e fixação do mesmo. Na primeira experiência houve uma pequena dificuldade de visualização dos espécimes no microscópio de luz nas lâminas preparadas, pois havia algumas bolhas de ar que se formavam durante a preparação. Alguns espécimes encontravam-se em perfeitas condições para visualização enquanto outros não foram possíveis de serem visualizados em razão da formação das bolhas de ar.

No segundo procedimento as bolhas continuaram aparecendo, contudo, elas foram retiradas da lâmina com uma pinça e a visualização dos animais após esse procedimento foi aceitável.

4.2 Resultados da metodologia 2

Concluiu-se com essa metodologia que o gel de glicerina solidifica muito rapidamente em temperatura ambiente e era necessário ser exposto a temperaturas acima de 40° para que ele voltasse a sua consistência normal. Houve uma grande questão com a formação de bolhas de ar durante a adição do meio de montagem (gelatina + glicerina) na lâmina, essa dificuldade pode ter surgido devido a agitação da solução quando a gelatina estava sendo hidratada.

No segundo procedimento concluiu-se que as bolhas se formaram devido à demora da adição do meio de montagem (gelatina + glicerina) a lâmina, na qual permitiu-se que os animais secassem rapidamente e com a aplicação do meio de montagem criou-se bolhas de ar.

4.3.1 Resultados da metodologia 3.1

Concluiu-se com esse procedimento que a fixação dos animais com xilol é um pouco complexa pois possui um odor muito forte e não pode entrar em contato com plásticos e por isso exige certos cuidados. Porém essa fixação é necessária para que os animais não sequem na lâmina com o meio de montagem e não formem bolhas, porque se os animais forem retirados direto do formol 4% e adicionar-se o meio de montagem rv-mount na lâmina, acarretará na formação de bolha em volta do animal (figura 4) e prejudicaria a visualização no microscópio. Apesar dessas dificuldades na fixação, a lâmina com os animais obteve boa visualização no microscópio de luz, pois os animais ficaram claros e sua anatomia ficou nítida. Houve também um pouco de dificuldade no transporte dos animais do vidro relógio com o xilol para a lâmina com o meio de montagem pelo fato dos animais serem muito pequenos e o xilol ser um produto volátil, contudo, pode-se concluir que o rv-mount com xilol foi um meio de montagem eficiente a primeiro teste, pois não formou bolhas de ar e deixou os espécimes com boa visualização.

4.3.2 Resultados da metodologia 3.2

A mudança do local de fixação dos animais em álcool e xilol, obteve resultados bastante satisfatórios em razão da facilidade de manipulação na hora de adicionar os meios. Os animais não sofreram deformações pois não houve transferência de local na hora de adicionar álcool e xilol, e no final a lâmina obteve uma ótima visualização no microscópio figuras (5 e 6).

5 FIGURAS

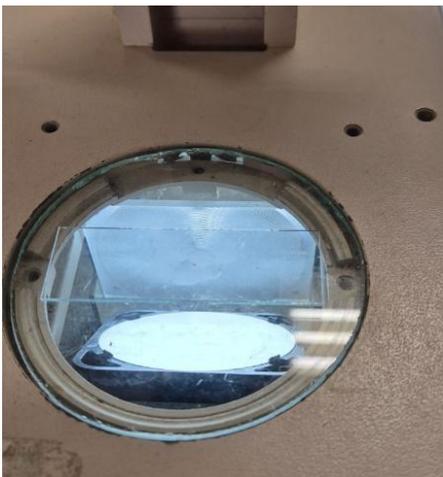


figura 1. Especime de cladocera na lâmina



figura 2. Barreira de rv mount na lâmina

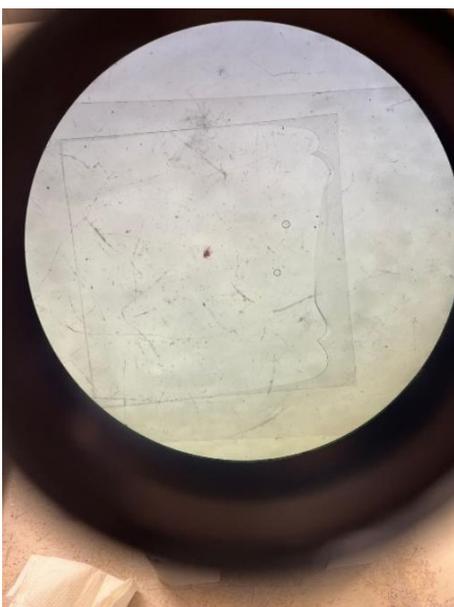


figura 3. Lâmina pronta na lupa



figura 4. Bolhas de ar em volta do Copépoda em razão da não fixação em álcool e xilol



figura 5. Lâmina de Copépoda no microscópio



figura 6. Lâmina de Cladocera no microscópio

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a confecção de lâminas permanentes que garantissem uma boa visualização sem comprometer a integridade dos indivíduos zooplanctônicos a serem estudados e que durassem por muitos anos, foram testadas duas metodologias de fabricação de lâmina já descritas na literatura, e utilizou-se um meio de montagem que ainda não tinha sido testado para essa finalidade. O meio de montagem RV-mount.

Desse modo, foram utilizados organismos armazenados no acervo do laboratório de Ecologia da UFMS/CPAN, mais especificamente espécies de Cladocera, foram utilizados para testes de fixação em laminário permanente. Os resultados da primeira e da segunda metodologia testadas não foram favoráveis pois houve diversas formações de bolhas de ar nas lâminas, o que atrapalhou na visualização dos espécimes no microscópio.

Já os resultados da aplicação da metodologia do rv- mount foram favoráveis a primeiro momento, pois o produto não mudou a cor do espécime, não interagiu com o organismo e apresentou uma boa qualidade de visualização de sua anatomia no microscópio. No entanto será necessário realizar mais testes com esse meio com diferentes tipos de espécies de cladoceros e copépodes a fim de que se garanta o êxito da técnica de utilização desse meio de montagem aplicado.

Com isso o desenvolvimento da metodologia de preparação de lâminas permanentes utilizando o meio de montagem rv-mount foi considerado um método bastante promissor, que terá grande importância no estudo dos organismos zooplanctônicos ajudando em sua identificação e taxonomia, pois ajudará a manter a integridade dos organismos para futuros estudos. Desse modo é preciso realizar mais testes para comprovação da qualidade de visualização com o decorrer do tempo, por serem organismos de tamanho milimétrico e frágeis, é necessária uma avaliação contínua dos espécimes fixados no laminário, a fim de que se confirme a boa condição de visualização anatômica deles no microscópio eletrônico depois de um tempo considerável.

REFERÊNCIAS

KIHARA, T.C.; ROCHA, C.E.F. **Técnicas para estudo Taxônomico de Copépodes Harpacticóides da Meiofauna Marinha**. Porto Alegre: Asterisco, 2009. Disponível em

http://www.senckenberg.de/files/content/forschung/abteilung/dzmb/terue_kihara/kihararocha,2009_-_tecnicas.pdf . Acesso em: 15 de agosto de 2024.

LANSAC-TÔHA, F. A.; VELHO, L. F. M.; BONECKER, C. C.; TAKAHASHI, E. M.; NAGAE, M. Y. Composição, riqueza e abundância do zooplâncton na planície de inundação do alto rio Paraná. In: **WORKSHOP A PLANÍCIE ALAGÁVEL DO ALTO RIO PARANÁ**, 2., 2002, Maringá. Maringá: PELD, 2002. p. 79-84.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

NEIFF, J. J. Ideas para la interpretación ecológica del Paraná. **Interciência**, v. 15, n. 6, p. 424-441, 1990.

CRUZ, P. C.; SCHNELL, G.; SCHUHLI; QUEIROZ, D. L. **Montagem de lâminas permanentes de Sciaridae**. Colombo: Embrapa Florestas, 2018. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 416).

SCHADEN, R. **Manual de técnicas para preparação de lâminas de coleções zoológicas**. Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo, Brasil. Disponível em: https://www.ib.unicamp.br/museu_zoologia/system/files/2022-01/10.%20Rotifera.pdf. Acesso em: 20 ago. 2024.