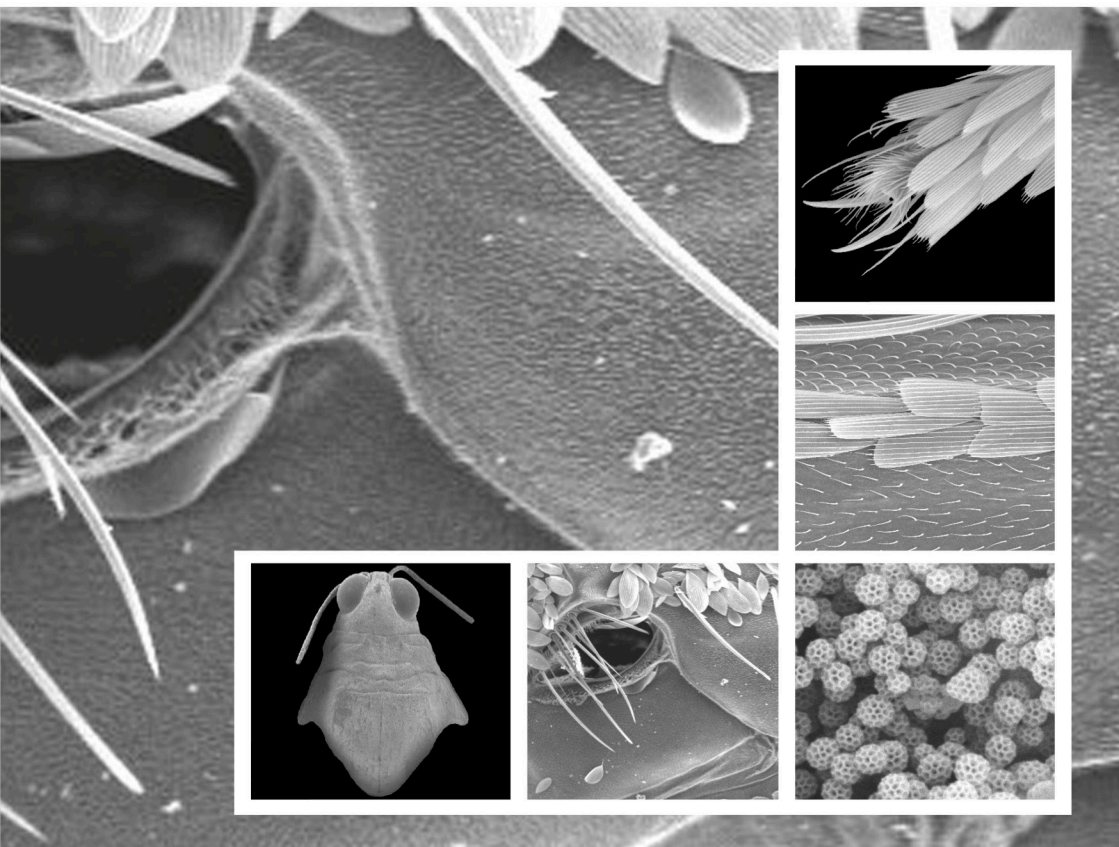


Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura





Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1806-9193

Outubro, 2008

versão
ON LINE

Documentos 230

Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura

Editores Técnicos

Wilson Sampaio de Azevedo Filho

Luis Antônio Suita de Castro

Marcos Botton

Dori Edson Nava

Pelotas, RS
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392, km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275 8199
Fax: (53) 3275 8219 - 3275 8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro
Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia
Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro, Sadi Macedo Sapper, Regina das Graças V. dos Santos
Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Revisor de texto: Sadi Macedo Sapper
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos
Editoração eletrônica: Oscar Castro
Arte da capa: Oscar Castro

1ª edição

1ª impressão 2008: 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com
microscópio eletrônico de varredura / Wilson Sampaio de Azevedo Filho

...

[et al.]. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.
34 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 230).

ISSN 1516-8840

Entomologia - Inseto - Microscopia Eletrônica - Amostra - MEV -
Preparo - Processamento. I. Azevedo Filho, Wilson Sampaio. II. Série.

CDD 595.7

Autor

Wilson Sampaio de Azevedo Filho
Biólogo, Dr., Ex-Bolsista de PDJ/CNPq
Embrapa Uva e Vinho
Departamento de Ciências Exatas e da Natureza
Campus Universitário da Região dos Vinhedos
Universidade de Caxias do Sul
Caixa Postal 32, 95700-000
Bento Gonçalves, RS
(wsafilho@ucs.br)

Luis Antônio Suita de Castro
Eng. Agrôn., MSc., Fitopatologia
Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403,
96001-970, Br 392, km 78, Pelotas, RS
(suita@cpact.embrapa.br)

Marcos Botton
Eng. Agrôn., Dr., Entomologia
Embrapa Uva e Vinho
Caixa Postal 130, Bento Gonçalves, RS
(marcos@cnpuv.embrapa.br)

Dori Edson Nava
Eng. Agrôn., Dr., Entomologia
Embrapa Clima Temperado
Caixa Postal 403, 96001-970
Br 392, km 78, Pelotas, RS
(nava@cpact.embrapa.br)

Apresentação

A obtenção de imagens de alta resolução para estudos com pequenos organismos e detalhes de estruturas de macroorganismos tem sido uma constante pelos profissionais da microscopia. O microscópio eletrônico de varredura (MEV), apesar de não ser um equipamento desenvolvido recentemente, sempre teve o seu uso limitado a alguns centros de pesquisas. Atualmente, a disponibilidade deste tipo de equipamento em diferentes instituições e a difusão de técnicas para o seu uso tem otimizado o seu emprego, apesar do custo de manutenção e preparo de amostras.

O estudo de materiais biológicos envolve, na grande maioria dos casos, informações de topografia da superfície e, para isto, o MEV é o instrumento ideal. O equipamento pode ser usado em todas as áreas, inclusive na entomologia. Estudos de detalhes de estruturas de partes do corpo dos insetos podem ser obtidos utilizando-se técnicas simples de preparo das amostras. Embora o seu uso para a Entomologia seja simples, são poucos os trabalhos que utilizam tal técnica.

A difusão de seu uso para estudos entomológicos (taxonomia, morfologia e biologia) e a apresentação de técnicas de preparo de amostras é de fundamental importância para o aprimoramento da pesquisa. Nesta publicação, são apresentadas algumas técnicas que foram adaptadas para

estudos com insetos realizados na Embrapa Clima Temperado,
Embrapa Uva e Vinho e em outras instituições parceiras.

Waldyr Stumpf Junior

Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura	9
Introdução	9
Preparação de insetos que apresentam estrutura externa resistente a deformações	13
Limpeza dos espécimes	13
Observação de espécimes inteiros	14
Observação de partes de insetos	14
Dissolução da musculatura dos espécimes	15
Montagem do material no porta-amostra (<i>stub</i>)	17
Secagem do material	19
Preparação de insetos que apresentam fragilidade nas estruturas externas	19
Estabilização da forma	20
Desidratação da amostra	20
Metalização das amostras	21

Mudanças de posição das estruturas a serem observadas	22
Utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura em material tipo	24
Visualização no Microscópio Eletrônico de Varredura	24
Finalização das imagens de Microscópio Eletrônico de Varredura	25
Considerações finais	26
Literatura complementar	27
Agradecimentos	33
Referências	33

Técnicas de preparação de amostras para estudos de insetos com microscópio eletrônico de varredura

Introdução

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um versátil instrumento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não biológicas. O interesse maior é obter informações topográficas. A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10 μm para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X. Esta característica possibilita obter imagens estereoscópicas e bem enfocadas com espécimens até macroscópicos. Além disso, no MEV, a amostra pode ser inclinada e girada sob o feixe eletrônico em todas as orientações, necessitando para isso estar bem preservada nas três dimensões (CASTRO, 2001).

Os melhores microscópios ópticos têm um poder de resolução de 0,2 μm (=200 nm) e, portanto, aumentam a resolução do olho nu em cerca de 500 vezes. É teoricamente impossível a construção de um microscópio óptico capaz de melhor resolução. O fator limitante é o comprimento de onda de luz, que varia de 0,4 μm para a violeta até 0,7 μm para a vermelha (HAYAT, 1972).

É importante observar que o poder de resolução e a ampliação são diferentes. Usando o melhor microscópio óptico, se for tirada uma fotografia de dois pontos que distem menos de 200 nm não, será possível distingui-los como pontos isolados, independente da magnificação obtida (SILVEIRA, 1989).

Sem ajuda, o olho humano tem um poder de resolução de 1/10 mm, ou 100 μ m. Isto significa que, se alguém olhar para duas linhas que estão separadas por menos de 100 μ m, elas parecerão uma só linha. Para que se possam distinguir estruturas que estejam mais próximas que este valor, é necessário antepor entre o olho do observador e o objeto, algo que separe o feixe de fótons antes que atinja a retina, como por exemplo lentes ou conjunto de lentes (microscópio) (CASTRO, 2001).

A resolução do MEV ou Scanning Electron Microscope (SEM) é de 10 nm nos instrumentos convencionais, podendo chegar a 1 nm, quando se utiliza canhão de emissão de campo (*field emission*), constituindo-se em uma ferramenta bastante útil em atividades de pesquisas. As aplicações do MEV incluem desde o estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização *in situ* de organelas subcelulares. O MEV usa elétrons emitidos ou retro-espalhados a partir da superfície da amostra. O canhão eletrônico do MEV gera um fino pincel de elétrons que atua como uma sonda, a qual passa rapidamente para frente e para trás em zigue-zague sobre a amostra, num rastreamento que pode ser controlado em fração de segundo a vários segundos. As variações topográficas da superfície da amostra afetam o padrão da emissão ou retro-espalhamento, resultando em uma imagem tridimensional. Somente estruturas superficiais podem ser examinadas com o MEV; conseqüentemente, este é utilizado para estudar células inteiras, tecidos e superfícies estruturais (CASTRO, 2001).

O estudo de materiais biológicos envolve na grande maioria dos casos, informações de topografia da superfície, e para este tipo de imagem usam-se elétrons secundários (baixa energia),

provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécime. No estudo de materiais biológicos, geralmente são usadas tensões aceleradoras de 5 a 10 KV, podendo variar até 25 KV (SILVEIRA, 1989).

Para assegurar uma melhor imagem, o operador deve cuidar do alinhamento correto das lentes e do canhão, de ajuste do foco, da compensação do astigmatismo, etc.

A preparação incorreta da amostra pode ocasionar modificações consideráveis no material em estudo, resultando em diagnósticos totalmente equivocados ou imprecisos. O adequado levantamento bibliográfico sobre o assunto em estudo será fundamental para o desenvolvimento do trabalho. É necessário considerar atividades realizadas anteriormente, resultados obtidos, dificuldades encontradas. Regulagens incorretas de equipamentos podem ocasionar deformações nas estruturas a observar. Amostras coletadas em condições adversas, mal acondicionadas, submetidas a variações de umidade e temperatura, podem apresentar variações não condizentes com a realidade (GRANG & KLOMPARENS, 1988).

Como norma geral, amostras que podem sofrer variações devem ser coletadas e colocadas na solução fixadora apropriada o mais rapidamente possível, visando paralisar os processos metabólicos que estão se desenvolvendo e que poderão interferir na análise do resultado final. Devem ser preparadas com o máximo de rigor técnico e assegurar a reprodutibilidade de resultados (SILVEIRA, 1989).

Em geral, a utilização do MEV pela comunidade científica ainda é restrita, porém, ao longo dos anos, sua utilização vem crescendo devido à aquisição destes equipamentos por muitas instituições de ensino e pesquisa, atendendo a várias áreas do conhecimento. O MEV é uma ferramenta adequada aos estudos entomológicos principalmente os relacionados à caracterização da morfologia dos insetos. O equipamento possui alta

resolução e grande profundidade de foco, o que permite o levantamento e ilustração de um grande número de caracteres (Figura 1).

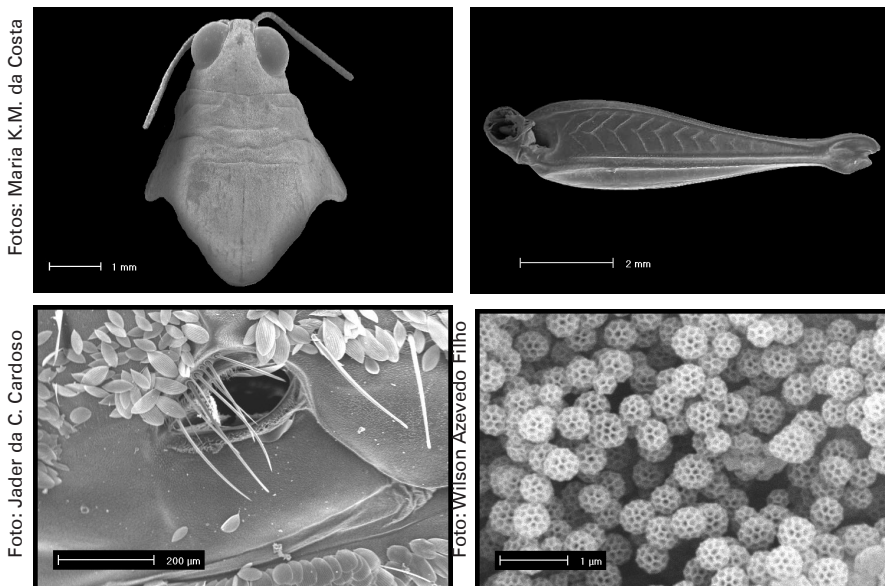


Figura 1. A-B. *Paulinia acuminata* (De Geer, 1773) (Orthoptera: Pauliniidae - gafanhoto) - A) Cabeça e pronoto (vista dorsal); B) Fêmur (vista lateral interna). C) *Toxorhynchites* sp. (Diptera: Culicidae - mosquito) - espiráculo. D) *Oncometopia fusca* Melichar, 1925 (Hemiptera: Cicadellidae - cigarrinha) - broccosomos de tegumento.

Como a maioria dos Centros de Microscopia Eletrônica não dispõe de técnicos para o preparo do material entomológico, sendo estes, muitas vezes exemplares únicos, é de fundamental importância que o próprio pesquisador prepare suas amostras.

As técnicas para preparação de amostras de insetos para observação com MEV, de um modo geral, não são difíceis, no entanto, exigem do pesquisador um treinamento de motricidade fina devido à natureza frágil de muitas das estruturas envolvidas no estudo. Dessa forma, é importante

que sejam realizados testes preliminares, com amostras que possam ser descartadas, para uma melhor adequação das técnicas ao material entomológico que se pretende examinar. A seguir, serão descritos alguns procedimentos que podem ser adaptados para a obtenção de melhores resultados, considerando insetos que apresentam estrutura externa resistente a deformações e com estruturas passíveis de deformações durante os procedimentos de laboratório necessários à preparação do espécime em estudo.

Preparação de insetos que apresentam estrutura externa resistente a deformações

Os insetos devem ser inicialmente narcotizados para preservar a forma distendida. Por apresentarem exoesqueleto, não exigem preparações mais sofisticadas. Secagem em estufa a 37°C, fixação ao porta-amostra (*stub*) utilizando tinta prata ou fita adesiva de face dupla com carbono para melhorar a condutividade e metalização são os procedimentos necessários em observações rotineiras (CASTRO, 2001).

· Limpeza dos espécimes

Para retirar traços de poeira e detritos que ficam aderidos aos espécimes coletados em campo, é necessária uma lavagem com álcool 70% (ou água destilada) por alguns minutos. Em casos extremos, como insetos coletados com armadilhas adesivas, os exemplares devem ficar imersos em éter etílico por cerca de sete dias para a retirada da cola. A limpeza pode ser auxiliada através da raspagem com agulhas de insulina, tanto dos insetos inteiros quanto de suas partes. Este último procedimento depende da resistência das estruturas que serão observadas.

A poeira acumulada sobre os insetos depositados em coleções pode ser removida com um pincel (números 0, 00 ou 000) e álcool 70%.

A limpeza, embora seja importante para obter uma imagem final satisfatória, não deve ser realizada em alguns grupos de insetos (mosquitos - Diptera, p. ex), pois estes exemplares são coletados a seco para conservação de suas escamas, que são de importância taxonômica (Figura 2).

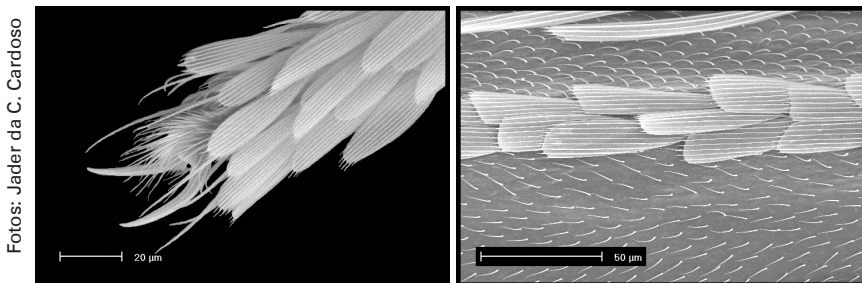


Figura 2. A-B. *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae - mosquito). A) ápice do tarso e pós-tarso (vista lateral). B) textura da asa destacando as escamas e cerdas.

- Observação de espécimes inteiros

A observação de espécimes inteiros é possível, desde que suas dimensões estejam adequadas à câmara de microscopia. Assim, o procedimento é mais adequado a grupos de menor tamanho, como: pequenos besouros (Coleoptera), mosquitos (Diptera), formigas (Hymenoptera), entre outros.

- Observação de partes de insetos

A extração das partes (pernas, asas e outras) pode ser realizada com a ajuda de estiletos, pinças e agulhas histológicas. Em muitos casos, é necessário adaptar agulhas de insulina e cateteres intravenosos para proporcionar instrumentos de corte adequados para dissecação de estruturas delicadas (Figura 3).

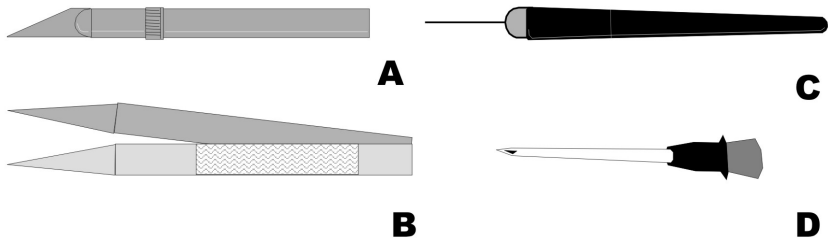


Figura 3. Instrumentos utilizados no preparo da amostra. A) Estilete. B) Pinça tipo relojoeiro. C) Agulha histológica. D) Cateter intravenoso.

Dissolução da musculatura dos espécimes

Em alguns casos, os insetos ou suas partes devem ser incluídos em tubos de ensaio contendo solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) ou hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (a frio) para dissolução da musculatura por aproximadamente 24 horas; em seguida lavados com água destilada por cerca de 10 minutos e conservados em álcool a 70%. Preparações rápidas também podem ser realizadas aquecendo-se os tubos de ensaio por 5 a 10 minutos, ou ainda fervendo-os em banho-maria por 30 minutos. Este procedimento permite o amolecimento e a retirada de peças mais facilmente, como as da genitália dos insetos. Porém, deve ser realizado com cautela, pois o tempo que as estruturas podem ficar sob a ação destas soluções pode variar de acordo com o tamanho dos espécimes envolvidos e o grau de esclerotinização das peças. É importante lembrar também que estas soluções enfraquecem as peças estruturalmente, o que pode acarretar deformações nos processos de secagem e metalização que ocorrerão posteriormente (Figura 4).

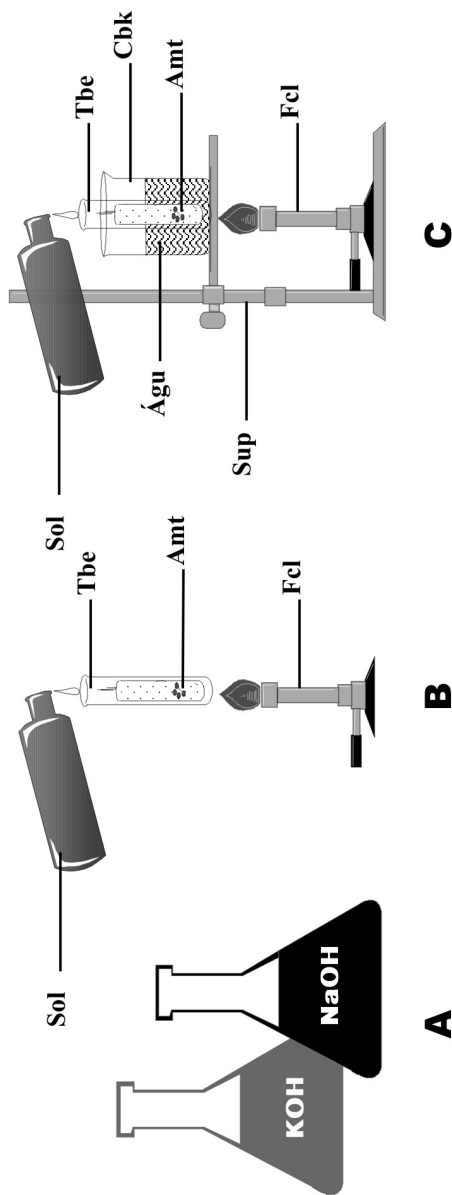


Figura 4. A) Soluções. B) Procedimento 1 - aquecimento direto. C) Procedimento 2 - aquecimento em banho-maria. Águ, água; Amt, amostra; Cbk, copo becker; Fcl, fonte de calor; Sol, solução; Sup, suporte; Tbe, tubo de ensaio.

- Montagem do material no porta-amostra (*stub*)

Esta é uma das etapas mais importantes e talvez a mais crítica, pois são necessários cuidados especiais na manipulação, principalmente de peças delicadas sob um microscópio estereoscópico. A fixação do espécime ou parte dele sobre o porta-amostra pode ser feita com a utilização de uma cola de prata em pasta, contudo este procedimento pode acarretar a perda do material entomológico, dependendo do tamanho da estrutura que poderá ficar coberta pela pasta. Logo, o uso de uma fita adesiva de carbono (fita do tipo dupla-face) parece ser mais indicado, pois é capaz de fixar a amostra possibilitando a sua remoção facilmente e não encobrindo partes importantes do inseto a ser examinado. O manuseio das estruturas (principalmente as de menor tamanho) deve ser feito, sempre que possível, em meio líquido, facilitando o posicionamento da peça. Isto é possível colocando-se uma gota de álcool 70% sobre o porta-amostra e em seguida incluindo a peça a ser observada (sob luz fraca ou fria para evitar o calor, que pode provocar uma rápida desidratação e conseqüentemente a deformação da estrutura). Um outro procedimento consiste em colocar a peça já contida em uma gota de álcool 70% sobre o porta-amostra. Este último tem a vantagem de possibilitar uma maior segurança em relação à perda do material entomológico durante a fixação (Figura 5).

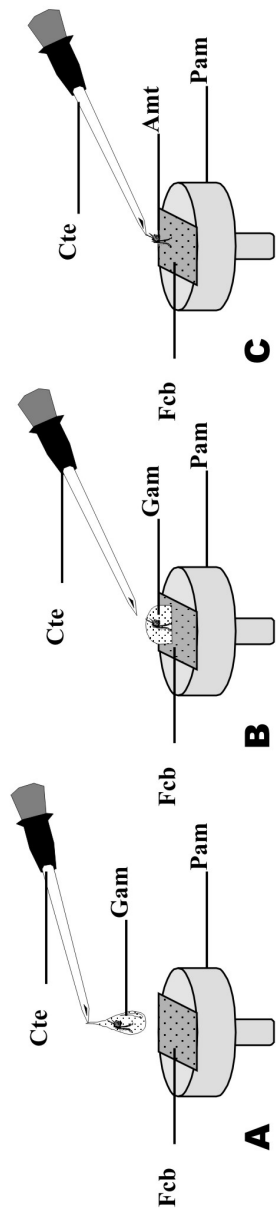


Figura 5. A-C. Sequência para fixação do material no porta-amostra. Amt, amostra; Cte, cateter; Fcb, fita adesiva de carbono; Gam, gota de álcool 70% contendo a amostra; Pam, porta-amostra.

• Secagem do material

Após a fixação no porta-amostra, o material deve passar por um período de secagem, cujo tempo vai depender do tamanho da amostra (se são exemplares inteiros ou em partes). As peças de menor tamanho, como as da genitália, secam em aproximadamente dois dias, mas em alguns casos pode ser necessário um desumidificador. As peças não devem passar por um processo de secagem com o uso de lâmpadas incandescentes, pois a rápida desidratação provoca a deformação das estruturas.

Preparação de insetos que apresentam fragilidade nas estruturas externas

Insetos muito pequenos, que apresentam estruturas delicadas, ou larvas, passíveis de deformações por secagem direta, necessitam ser desidratados no aparelho de “ponto crítico” após o processo de fixação convencional. O procedimento usual segue a ordem: fixação/desidratação/secagem pelo método do “ponto crítico” envolvendo as seguintes etapas:

- Fixação durante 2 h até 24 h ou mais.
- Lavagem em solução tampão cacodilato ou fosfato, várias vezes.
- Pós-fixação em 1 ou 2% OsO₄ tamponado, durante 1 h.
- Lavagem novamente em solução tampão.
- Desidratação em banhos duplos de álcool (ou acetona): 30, 50, 70, 80, 95% e 100% de concentração. Várias trocas são necessárias para assegurar a remoção completa da água.
- Secagem das amostras no aparelho de “ponto crítico”, usando gás carbônico.

- Estabilização da forma

As amostras geralmente são estabilizadas por fixação química, responsável pela integridade física da amostra.

Na formulação do fixador, ajustam-se as condições ideais de concentração, pH, molaridade, etc., de acordo com o material. O fixador é geralmente aplicado à temperatura ambiente, por imersão. O tempo de ação do fixador pode ser de algumas horas até vários dias, quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime (HAYAT, 1972).

A utilização do glutaraldeído como fixador para microscopia eletrônica pode ser recomendada para a maioria dos tecidos animais, devido às suas propriedades de penetração e por precipitar prontamente as substâncias protéicas da célula, assegurando ótima preservação da ultra-estrutura (MURPHY, 1982).

Vários agentes químicos de uso corrente em laboratório apresentam propriedades irritantes ou tóxicas. Todas devem ser manipuladas com prudência. Agentes carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos são, por definição, as substâncias que induzem aberrações químicas irreversíveis no DNA cromossômico. Outros agentes são alergênicos, e podem levar ao desenvolvimento de alergias devido à exposição continuada, seja por contato ou inalação. Recomenda-se, portanto, o máximo cuidado na manipulação das substâncias químicas, bem como dos resíduos decorrentes das experiências realizadas. O tetróxido de ósmio (OsO_4) precisa ser manipulado com o máximo cuidado, por gerar vapores extremamente cáusticos. Por isso, utilizar o mesmo sempre em capela com boa ventilação (SILVEIRA, 1989).

- Desidratação da amostra

O processo de desidratação de insetos que apresentam estruturas delicadas e que podem sofrer deformações durante

o processo de preparação para análise no MEV envolve duas etapas (MURPHY, 1982).

Inicialmente, após o processo de fixação, há necessidade de retirar a água presente na amostra e substituí-la por álcool etílico ou acetona. A desidratação é feita através de uma bateria de álcool etílico diluído de 30 a 100%. Os intervalos dependem do tipo de amostra, com banhos sucessivos por cerca de 15 a 20 minutos (ROBINSON et al., 1987).

A etapa seguinte consiste no uso do aparelho denominado “ponto crítico”. No espécime, após a desidratação com acetona ou etanol, é feita a substituição desses produtos por gás carbônico liquefeito, utilizando o aparelho de secagem ao ponto crítico (ASPC). Ponto crítico de uma substância refere-se a condições de temperatura e pressão sob as quais ela co-existe na fase líquida e gasosa. O ponto crítico do CO_2 é de cerca de 31°C e 80 kg/cm^2 . A amostra após ser transferida para o ASPC e banhado com CO_2 líquido a $5\text{-}10^\circ\text{C}$ é removida e recolocada em CO_2 para eliminar resíduos do solvente, sofrendo um aquecimento gradual. A cerca de 31°C ocorre o ponto crítico, quando a densidade da fase líquida se iguala a da fase gasosa desaparecendo o menisco, eliminando-se a tensão superficial. Prosegue-se o aquecimento da câmara até 40°C , para evitar-se a recondensação do CO_2 . Após a despressurização lenta da câmara até à pressão atmosférica, o espécime é removido seco da câmara, sem alterações sensíveis de forma podendo ser montado sobre o porta-amostra e observado no MEV.

Metalização das amostras

A amostra seca é colocada no porta-amostra com ou sem utilização do aparelho de ponto crítico, devendo sofrer deposição de uma fina camada de metal (geralmente ouro, ou liga ouro/paládio) para que sua superfície se torne boa condutora e emissora de elétrons (CASTRO, 2001). A espessura da camada de ouro deve ser suficientemente fina para não

influir na resolução da imagem, mas suficientemente espessa, para garantir a produção de elétrons secundários, que serão usados para formar a imagem. O equipamento comumente utilizado é o "sputter-coater". Os "stubs" são colocados em uma câmara onde se faz um vácuo da ordem de 0,1 mm Hg (de uma bomba rotativa convencional), substituindo-se a seguir o ar por argônio. Os "stubs" ficam em uma plataforma abaixo de uma placa de ouro. É estabelecida entre a plataforma e a placa uma diferença de potencial suficiente para gerar um plasma de argônio que bombardeia a placa de ouro, gerando uma nuvem do metal que se deposita sobre a amostra. Logo após este procedimento, o material está pronto, para ser levado ao MEV (CASTRO, 2001).

Mudanças de posição das estruturas a serem observadas

Devido à limitação no ângulo de inclinação do suporte onde são fixados os porta-amostras é necessária uma mudança de posição das estruturas para uma melhor ilustração dos detalhes. Para que isto seja possível, uma seqüência de passos deve ser seguida. Esta seqüência tem início na etapa de montagem da amostra: a peça deve ser colocada em posição ventral ou dorsal e fotografada; uma quebra de vácuo da câmara de microscopia é necessária; o porta-amostra é removido e sobre o microscópio estereoscópico, um pequeno sulco deve ser feito na fita adesiva de carbono ao lado da peça que se deseja mudar de posição; a peça é então tombada em posição lateral sobre o sulco; realizando-se um novo processo de metalização antes de retomar as observações junto ao MEV (Figura 6). Uma outra alternativa é montar o inseto na extremidade de uma agulha entomológica de calibre adequado e prender o conjunto no centro do "stub". Os detalhes do inseto são observados utilizando o sistema de inclinação e giro das amostras do MEV.

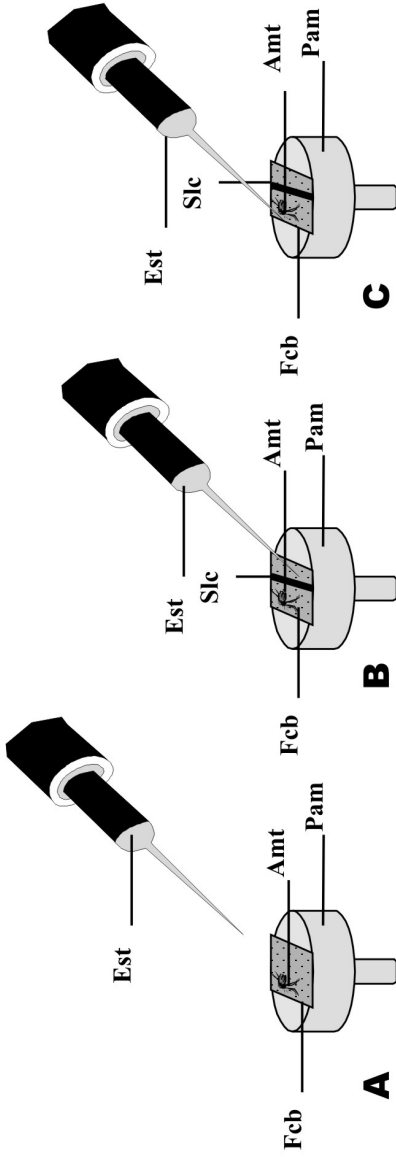


Figura 6. A-C. Sequência para mudança de posição da estrutura a ser observada. Amt, amostra; Est, estilete; Fcb, fita adesiva de carbono; Pam, porta-amostra; Slc, sulco.

Utilização do MEV em material tipo

A utilização do MEV em material tipo (parátipos/ holótipos) ainda é controversa. Muitos curadores nem levantam a hipótese do uso deste equipamento devido aos danos que podem ser causados às estruturas, porém, se forem manipuladas com o devido cuidado, tal prática é possível de ser executada. O único inconveniente é a necessidade do revestimento das peças em ouro ou outro filme condutor. O MEV de pressão variável pode ser usado (instrumento no qual a câmara onde se aloja a amostra fica a uma pressão consideravelmente maior, e se permite examinar amostras semi-úmidas e sem a necessidade de se metalizar). O perigo de danificar as peças está mais relacionado à remoção destas do porta-amostras, o que poder ser realizado pelo pesquisador desde que tenha treinamento para tal. Também seria interessante que as coleções entomológicas fossem providas de locais apropriados para o armazenamento de porta-amostras contento estes materiais.

Visualização no MEV

Para estudo de materiais biológicos, geralmente são usadas tensões aceleradoras de 5 a 10 KV, podendo variar até 25 KV.

Para assegurar melhor imagem, o operador deve cuidar do alinhamento correto das lentes e do canhão, do ajuste do foco, da compensação do astigmatismo, etc. O registro fotográfico é, em geral, feito em negativos que têm dimensão menor do que o visor onde a imagem é formada; assim, a qualidade do filme usado e as condições do registro adequadas (brilho, velocidade da varredura, contraste) são também importantes. Existe ainda a possibilidade de captura de sinais digitais, atualmente presente na maioria dos aparelhos, permitindo a obtenção de um maior número de imagens devido à redução de custos com equipamentos e materiais fotográficos no caso de revelação química.

Finalização das imagens de MEV

Muitas publicações, principalmente de nível internacional, não aceitam imagens que tenham sido retocadas de forma a melhorar a qualidade visual, exigindo, inclusive, a apresentação do negativo fotográfico como documento do resultado obtido. Atualmente, apesar da larga utilização da imagem digital e dos recursos disponíveis nesta área, o microscopista deve ter em mente que a imagem obtida é resultado de um longo processo, onde cada etapa deve ser desenvolvida com extrema competência, resultando em uma prova documental do experimento (imagem), que não deve ser adulterada e que comprova o rigor científico do pesquisador em relação ao trabalho que realizou.

Entretanto, podem ocorrer casos de falta de contraste, excesso de brilho, pequenos artefatos que comprometem a estética da imagem obtida. Frequentemente, como muitas das imagens das estruturas de insetos geradas pelo MEV não ocupam todo o campo de visualização, trechos em que a fita adesiva de carbono pode ficar exposta são comuns.

Dependendo de como e onde esta imagem será utilizada, pode-se recorrer ao uso de recursos computacionais, ou seja, editores de imagem (Corel Draw; Adobe Photoshop; Microsoft Paint, Microsoft Photo Editor ou mesmo softwares livres como GIMP e IrfanView) para possibilitar uma homogeneização da figura, o que melhora o resultado da aparência tridimensional das estruturas ou, até mesmo colorir imagens originalmente obtidas em preto e branco (Figura 7). Esse procedimento deve ser realizado, sempre que possível, pelo próprio pesquisador, de forma a não comprometer sua idoneidade profissional. Em muitos casos, a edição final das ilustrações por pessoas com pouco ou nenhum conhecimento sobre a forma das estruturas pode acarretar o obscurecimento de áreas importantes para o estudo.

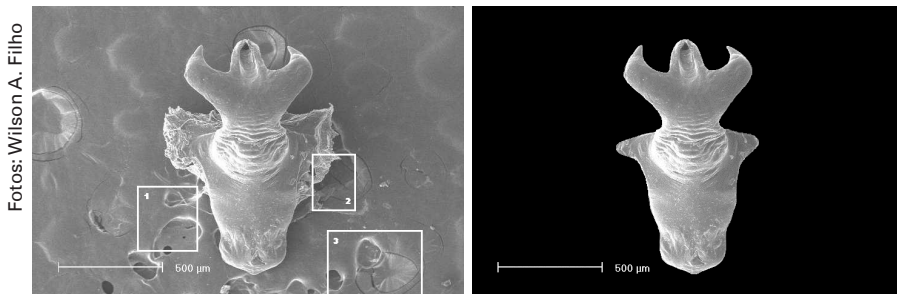


Figura 7. A-B. *Homalodisca ignorata* Melichar, 1924 (Hemiptera: Cicadellidae - cigarrinha) - genitália do macho, eedeago (vista ventral). A) Ilustração não editada. B) Ilustração editada. 1 e 3, imperfeições do segundo plano provocadas pela fita de carbono; 2, trecho com parte do tegumento não relevante para a definição da imagem.

Considerações finais

Embora o uso do MEV pelos entomólogos esteja se tornando rotineiro, os procedimentos envolvidos ainda são, em certa medida, caros e trabalhosos. Assim, é necessário um estudo prévio sobre a adequação deste recurso à pesquisa que será realizada, pois muitas vezes fotografias ou mesmo desenhos confeccionados com microscópio óptico ou estereomicroscópio, equipados com máquina fotográfica ou câmara clara, podem fornecer informações mais relevantes a um custo mais baixo. É importante ressaltar também que o MEV é geralmente utilizado para observações de superfície, destacando a forma das estruturas e suas texturas, não estando adequado à observação de detalhes que somente podem ser visualizados por transparência ou de áreas relevantes mais ou menos esclerotinizadas nos espécimes.

O entomólogo deve conscientizar-se de que o MEV é mais um instrumento de pesquisa, que pode e deve ser utilizado para melhorar a qualidade dos trabalhos de pesquisa. É injustificável as dificuldades que muitos centros de microscopia oferecem

aos possíveis usuários. Nada substitui o olho do interessado que deve se envolver em todas as etapas do preparo da amostra e de seu exame, obviamente que após um treinamento sobre como preparar as amostras e definir o tipo de imagem que se espera visualizar, distinguindo fatos de artefatos.

Literatura complementar

A seguir serão listados trabalhos sobre microscopia eletrônica de varredura para diferentes ordens de insetos, contemplando estudos de taxonomia, morfologia e biologia:

Coleoptera

CABRERA, N.; LÁZARO, H.; NASCA, A. Caracterización morfológica y presencia de *Maecolaspis monrosi* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae: Eumolpinae) en el cultivo de soja en Tucumán. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina*, v. 29, n. 2, p. 277-284, 2000.

CAXAMBÚ, M.G.; ALMEIDA, L.M. Descrição dos estágios imaturos e redescricao de *Lamprosoma azureum* Germar (Chrysomelidae, Lamprosomatinae). *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, v. 16, supl. 1, p. 243-256, 1999.

CHERNAKI, A.M.; ALMEIDA, L.M. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, v. 18, n. 2, p. 351-363, 2001.

DIAZ, N.B.; LOIÁCONO, M.S.; COSCARÓN, M.C.; LANTERI, A. A. Importancia taxonomica de las piezas bucales en la tribu Naupactini. I. Genero *Cyrtomon* Schoenherr y taxa afines (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba*, v. 34, n. 4, p. 861-876, 1990.

GAIGER, F. Systematic revision and cladistic analysis of the genus *Rhigus* Schoenherr, 1823 (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 43-85, 2001.

LOPES-ANDRADE, C.; GUMIER-COSTA, F.; SPERBER, C. Why do male *Xylographus contractus* Mellié (Coleoptera: Ciidae) present abdominal fovea? Evidence of sexual pheromone secretion. *Neotropical Entomology*, Vacaria, v. 32, n. 2, p. 217-220, 2003.

PECCHIONI, M. T. D.; CABRERA, N.; LAGUZZI, S. M.; NOVARA, C. R. Aspectos morfológicos y poblacionales de *Diabrotica speciosa speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) en condiciones de laboratorio. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 29, n. 2, p. 285-294, 2000.

Diptera

BONATTO, S.R.; CARVALHO, C.J.B. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 13, n. 3, p. 707-726, 1996.

Hemiptera

AZEVEDO-FILHO, W.S.; CARVALHO, G.S. Descrição de uma nova espécie de *Reticana* DeLong & Freytag, 1964 (Hemiptera, Cicadellidae, Gyponinae). *Biociências*, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 133-136, 2000.

AZEVEDO-FILHO, W. S.; CARVALHO, G. S. Giponíneos (Hemiptera, Cicadellidae) associados à cultura de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck no Rio Grande do Sul, Brasil: I - *Sordana* e *Reticana*. *Biociências*, Porto Alegre, v. 9, n.1, p. 121-139, 2001a.

AZEVEDO-FILHO, W.S.; CARVALHO, G.S. Giponíneos (Hemiptera, Cicadellidae) associados à cultura de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck no Rio Grande do Sul, Brasil: II - O gênero *Curtara*. *Biociências*, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 121-135, 2001b.

AZEVEDO-FILHO, W.S.; CARVALHO, G.S. Giponíneos (Hemiptera, Cicadellidae) associados à cultura de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck no Rio Grande do Sul, Brasil: III - *Gypona Germar*, 1821. *Biociências*, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 57-74, 2002.

SCHWERTNER, C.F.; ALBUQUERQUE, G.S.; GRAZIA, J. Descrição dos estágios imaturos de *Acrosternum* (*Chinavia*) *ubicum* Rolston (Heteroptera: Pentatomidae) e efeito do alimento no tamanho e coloração das ninfas. *Neotropical Entomology*, Vacaria, v. 31, n. 4, p. 571-579, 2002.

Hymenoptera

AZEVEDO, C.O. On the neotropical *Rhabdepyris* Kieffer (Hymenoptera, Bethyridae) of the subgenus *Chlorepbris*. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 887-897, 1999.

CÔNSOLI, F. L.; ROSSI, M.; PARRA, J.R.P. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 43, p. 271-275, 1999.

CÔNSOLI, F.L.; KITAJIMA, E.; PARRA, J.R.P. Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic wasps *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae). *Microscopy Research and Technique*, Hanover, v. 45, p. 313-314, 1999.

GUMOVSKY, A.; BOUCEK, Z. A new genus of Entedoninae (Hymenoptera: Eulophidae) from Brazil. *Neotropical Entomology*, Vacaria, v. 32, n. 3, p. 443-447, 2003.

LOIÁCONO, M.S.; MARGARÍA, C.B.; QUIRÁN, E.; MOLAS, B.C. Revision of the myrmecophilous diapriid genus *Bruchopria* Kieffer (Hymenoptera, Proctotrupoidea, Diapriidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 46, n. 3, p. 231-235, 2002.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Caracterização morfológica de dez espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) registradas na América do Sul. *Neotropical Entomology*, Vacaria, n. 32, n. 4, p. 597-613, 2003.

SCHLINDWEIN, C.; MOURE, J.S. *Panurgillus* gênero novo de Panurginae, com a descrição de quatorze espécies do sul do Brasil (Hymenoptera, Andrenidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 397-439, 1998.

THOMAZINI, M.J.; NETO, J.L.; COSTA, V.A.; FILHO, E.B. Caracterização morfológica das fases imaturas e tempo de desenvolvimento de *Muscidifurax uniraptor* Kogan & Legner (Hymenoptera: Pteromalidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 29, n. 4, p. 691-696, 2000.

Isoptera

COSTA-LEONARDO, A.M.; BARSOTTI, R.C. Soldier head morphology of the neotropical termites: *Embiratermes festivellus* (Silvestri) and *Spinitermes brevicornutus* (Desneux) (Isoptera, Termitidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 321-330, 1996.

SOARES, H.X.; COSTA-LEONARDO, A.M. Survey of the leg exocrine glands in termites (Isoptera). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 1-6, 2002.

Lepidoptera

ANTUNES, F.F.; MENEZES-JUNIOR, A.O.; TAVARES, M.; MOREIRA, G.R.P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: I. *Eueides isabella dianasa* (Hübner,

1806). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 601-610, 2002.

DARRAULT, R.O.; SCHLINDWEIN, C. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 429-443, 2002.

DUARTE, M.; ALMEIDA, G.L.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. Notes on the last instar larva and pupa of *Hemiargus hanno* (Stoll) (Lepidoptera, Lycaenidae, Polyommatainae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 1097-1105, 2001.

DUARTE, M.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. Morfologia externa do adulto de *Hemiargus hanno* (Stoll) (Lepidoptera, Lycaenidae, Polyommatainae, Polymmatini). I. Cabeça. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 225-238, 2001.

KAMINSKI, L.A.; TAVARES, M.; FERRO, V.G.; MOREIRA, G.R.P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 977-993, 2002.

PALUCH, M.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. Estágios imaturos de *Actinote surima* (Schaus) (Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 16, supl. 2, p. 129-140, 1999.

PALUCH, M.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. Estágios imaturos de *Actinote carycina* Jordan (Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 883-896, 2001.

PARRA, J.; MILANO, P.; CÔNSOLI, F.L.; ZERIO, N.; HADDAD, M. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Pyralidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 28, p. 49-57, 1999.

TAVARES, M.; KAMINSKI, L.A.; MOREIRA, G.R.P. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. II. *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 19, n. 4, p. 961-976, 2002.

Mantodea

JANTSCH, L.J.; POZZA, M. Genitália de *Coptopteryx gayi* e *C. argentina* (Mantodea, Vatiidae, Photiniinae). *Biociências*, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 45-50, 2001.

Neuroptera

LARA, R.I.R.; FREITAS, S. Caracterização morfológica de adultos de *Nusalala tessellata* (Gerstaecker, 1888) (Neuroptera, Hemerobiidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 521-528, 2002.

LARA, R.I.R.; FREITAS, S. Caracterização morfológica de espécies de *Hemerobius* Linnaeus, 1758 (Neuroptera, Hemerobiidae) associadas a cultivos de café (*Coffea arabica* L.), milho (*Zea mays* L.) e erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). *Revista Brasileira de Entomologia*, Curitiba, v. 47, n. 3, p. 427-434, 2003.

Agradecimentos

Aos pesquisadores Dr. Jader da Cruz Cardoso (Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul) e Dra. Maria Kátia Mattiotti da Costa (PUCRS) por disponibilizar imagens de microscopia eletrônica de varredura (Diptera e Orthoptera, respectivamente).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Pós-Doutorado Júnior (PDJ) concedida ao primeiro autor.

Ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo e Drs. Carolina Marques Castro e Juliana Degenhardt da Embrapa Clima Temperado pela análise crítica do trabalho.

Referências

- CASTRO, L. A. S. de. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 37 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).
- CRANG, R. F. E.; KLOMPARENS, K. L. Artifacts in biological electron microscopy. New York: Plenum Press, 1988. 233 p.
- HAYAT, M. A. Basic electron microscopy techniques. New York: UNR, 1972 . 119p.
- MURPHY, J. Specimen preparation for scanning electron microscopy. New York: Springer-Verlag, 1982. 220 p.
- ROBINSON, D. G.; EHLERS, U.; HERKEN, R.; HERRMANN, B.; MAYER, F.; SCCHÜRMANN, F.W. Methods of preparation for electron microscopy. New York: Springer-Verlag, 1987. 190 p.
- SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SILVEIRA, M. (Ed.). Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. São Paulo: USP, 1989. V. 1, p. 71-79.

