

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA

MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS



MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS

8. PLATELMINTOS (TEMNOCEFÁLIDOS, TREMATÓDEOS, CESTÓIDES, CESTODÁRIOS) E ACANTOCÉFALOS

JOSÉ FELIPE RIBEIRO AMATO

SÃO PAULO

1985

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA
MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

São Paulo, SP

1985

8. PLATELMINTOS (TEMNOCEFALIDOS, TREMATÓDEOS,
CESTÓIDES, CESTODÁRIOS) E ACANTOCEFALOS

JOSÉ FELIPE RIBEIRO AMATO

I. INTRODUÇÃO

Os temnocefalídeos, os trematódeos (abrangendo Monogenoidea, Aspidocotylea, e Digenea), os cestóides e os cestodários são todos platelmintos; porém, as técnicas de coleta, morte, fixação e coloração apresentam muitas particularidades, que devem ser respeitadas, para que o especialista, e principalmente o principiante, não tenham dificuldade de localizar os caracteres taxonômicos diagnósticos. Os acantocéfalos, mesmo sendo um ramo à parte, são tratados como sendo cestóides. A técnica precisa e minuciosa, utilizada na preparação desses helmintos, é a segurança de uma determinação genérica e específica correta.

II. REGISTRO DOS PARASITOS

É muito importante que se tenha um sistema de registro numérico dos helmintos coletados (Fig. 1). Este registro será útil para a identificação do hospedeiro, seus dados morfométricos e de coleta, e, também, para facilitar a individualização dos helmintos durante o processamento (morte, fixação, coloração e montagem). Cada lote ou infrapopulação (= helmintos da mesma espécie encontrados em um determinado órgão ou local: Esch *et al.*, 1975), deve ser processado de uma só vez. Seria muito difícil ter-se uma etiqueta com todos os dados do hospedeiro e local de coleta dos helmintos. Assim, apenas uma etiqueta com a identificação numérica os acompanha até serem transferidos para o meio de montagem.

Cada infrapopulação recebe um número, completamente individual. Jamais outro lote de helmintos terá número igual. Por exemplo: o primeiro lote encontrado em um hospedeiro será numerado assim: JFA-501-1-1-9. As *letras* são as iniciais do nome do coletor, as quais individualizam e separam lotes de mesmo número, porém de pesquisadores diferentes; *501* é o número de ordem de necrópsia do hospedeiro, separa lotes do mesmo, porém de necrópsias diferentes; *1* é o primeiro lote de parasitos encontrados no hospedeiro n.º 501; *1-9* são números indicativos do tamanho de cada infrapopulação, importante quando os nove helmintos estiverem montados em lâminas individuais. A primeira lâmina receberá o n.º JFA-501-1-1; a segunda JFA-501-1-2; e assim por diante. Desta forma será possível manter-se separado e devidamente individualizado cada parasito encontrado. A etiqueta que acompanhará os helmintos dentro da peneirinha de coloração sempre deverá ser também mergulhada nos líquidos. Deverá ser feita com papel cartão de ótima qualidade, e a inscrição ser feita com tinta à prova d'água (terral Ink, Higgins, Faber-Castel n.º 813) ou com tinta nanquim. No primeiro caso, depois de seca a tinta, a etiqueta deverá ser passada sob um jato de água de torneira para a remoção do transportador da tinta. No segundo, o nanquim deverá estar bem seco.

O tamanho desta etiqueta não deverá ser maior do que a boca dos frasquinhos que receberão os helmintos, e deverá caber também dentro das peneirinhas de coloração, de modo que cada etiqueta seja feita apenas uma vez.

III. ONDE COLETAR

1. *Temnocefalídeos*

Os temnocefalídeos são, na verdade, turbelários ectocomensais que vivem na cavidade paleal de moluscos aquáticos (Ex. *Pomacea*), sobre o exoesqueleto de crustáceos dulceaquícolas e nas axilas de quelônios de água doce.

2. *Trematódeos monogenéticos*

Os trematódeos monogenéticos são, na sua maioria, ectoparasitos no corpo ou nas brânquias de peixes. Algumas espécies, porém, podem ser encontradas na boca, nas narinas, na face interna dos opérculos dos peixes, na bexiga urinária e ductos urinários dos vertebrados. Outras, ainda, podem ser encontradas sobre o corpo de girinos, ou, ainda, como hiperparasitas sobre o exoesqueleto de crustáceos parasitos de peixes.

Formulário para necrópsia

N.º

.....
nome genérico

.....
nome específico

.....
nome vulgar

.....
sexo

Hospedeiro	Data da coleta:				
	Local da coleta:				
	Armazenagem:	sim	não	refrigerador	congelador
	Data do exame:	Fator de condição:			
	Peso: g	Comp. total:	cm	Comp. stand:	cm
	Modo de captura:				
Parasitos	Opérculo:				
	Boca:				
	Brânquias:				
	Esôfago:				
	Estômago:				
	Cecos intestinais:				
	Intestino delgado:				
	Intestino grosso:				
	Reto:				
	Fígado:				
	Vesícula biliar:				
	Bexiga urinária:				
	Bexiga natatória:				
Cavidade abdominal:					
Nadadeiras:					
Musculatura:					

Fig. 1. Modelo de formulário para necrópsia de peixes.

3. *Aspidocotíleos*

Os aspidocotíleos são endoparasitos e podem ser encontrados no tubo digestivo de teleósteos e tartarugas, na vesícula biliar de peixes elasmobrânquios, ou na cavidade pericárdica, rim e brânquias de moluscos bivalvos de água doce (Ex.: Família Unionidae).

4. *Trematódeos digenéticos*

Os trematódeos digenéticos, isto é, que utilizam dois ou mais hospedeiros, vivem no sistema digestivo, respiratório, aparelho urinário, sistema circulatório, ductos pancreáticos, vesícula biliar e ductos biliares de vertebrados. Raras espécies são encontradas no tubo digestivo de hirudíneos. Outras possibilidades incomuns de "habitat" incluem: o ducto naso-lacrimal, a membrana nictitante, a bolsa de Fabricius e os oviductos das aves; podem, ainda, estar encistados no duodeno de anfíbios; encistados aos pares, em nadadeiras, face interna dos opérculos, tecidos dos arcos branquiais e filamentos branquiais de peixes.

4.1. *Formas larvais*

Os trematódeos digenéticos apresentam uma sucessão de estádios larvais que nem sempre habitam o mesmo hospedeiro, ou podem, ainda, ser de vida livre.

Ovos, geralmente, passam ao ambiente, dos quais pode-se obter miracídios, mediante incubação sob condições controladas. Esporocistos, rédias, rédias filhas (quando existem) e cercárias, geralmente, podem ser obtidos diretamente dos moluscos hospedeiros intermediários, por simples dissecação em solução salina fisiológica a 0,65%. As cercárias podem ser obtidas, muitas vezes, sem o sacrifício dos moluscos, por isolamento em recipientes pequenos e pelo estímulo com uma fonte luminosa e térmica. As metacercárias poderão estar encistadas e aderidas a substratos vegetais (Ex.: *Fasciola*), ou poderão estar encistadas em outros moluscos ou invertebrados. A dissecação de artrópodos permite o excistamento mecânico e/ou químico das metacercárias. Em alguns gêneros (Ex.: *Postharmostomum*), as metacercárias são coletadas diretamente da cavidade pericárdica dos moluscos, já que não encistam.

5. *Cestóides*

Os cestóides adultos podem ser encontrados em qualquer classe dos vertebrados, praticamente sempre confinados ao intestino, raramente na cavidade celomática, nos ductos biliares ou pancreáticos. Isto limita os órgãos que deverão ser examinados.

5.1. *Formas larvais*

Os cestóides em fase larval podem ser encontrados encistados ou livres no celoma ou na musculatura de vertebrados, ou na hemocele de artrópodos. Alguns grupos (Ex.: Ordem Tetraphyllidea) têm seus plerocercóides livres no intestino dos peixes teleósteos. Helmintos encistados sempre devem ser removidos das membranas císticas antes de serem submetidos ao fixador.

6. *Cestodários*

Os cestodários são encontrados na válvula espiral (intestino) de peixes elasmobrânquios, principalmente Holocephali (Ex.: Gycorotylidea) ou no intestino e na cavidade celomática de peixes teleósteos e tartarugas (Ex.: Amphilinidea).

7. *Acantocéfalos*

Os acantocéfalos são encontrados exclusivamente no intestino dos hospedeiros definitivos, isto é, qualquer classe de vertebrados.

7.1. Formas larvais

As formas larvais dos acantocéfalos compreendem: o acântor, que é a larva completamente embrionada capaz de infectar o artrópodo hospedeiro invertebrado, e pode ser encontrado nas fezes do hospedeiro, ou fixo através de filamentos polares (geralmente em espécies aquáticas) em plantas submersas; a acantela, que é o acântor transformado, pode ser encontrada na hemocele ou junto à serosa intestinal dos artrópodos; e o cistacanto ou juvenil, que é a larva infectante envolta em um envelope hialino, resultante do desenvolvimento da acantela, pode ser encontrado tanto em tecidos do artrópodo como em hospedeiros paratênicos vertebrados.

IV. COMO COLETAR E MATAR

1. *Temnocefalídeos*

Os temnocefalídeos devem ser coletados com pincel e removidos para uma placa de Petri contendo água doce não clorada. Devem ser comprimidos como os trematódeos digenéticos pequenos.

2. *Trematódeos monogenéticos*

- a. Separar os hospedeiros por espécie;
- b. Submergir cada grupo de hospedeiros (depende do tamanho) da mesma espécie, ou cada hospedeiro individualmente, em um recipiente contendo formalina 1:4.000;
- c. Após mais ou menos uma hora, agitar o recipiente 50 vezes e retirar os hospedeiros, passando o conteúdo através de uma peneira de cobre com 150 μm de malha, ou simplesmente decantar o sobrenadante até que o sedimento possa ser examinado ao estereomicroscópio;
- d. Caso haja interesse exclusivamente nos trematódeos monogenéticos de brânquias, o procedimento acima deve ser utilizado individualmente para as brânquias de um determinado hospedeiro, ou mesmo para cada arco branquial separadamente;
- e. Os helmintos muito pequenos são mortos pelo fixador a frio;
- f. Os helmintos grandes são tratados como trematódeos digenéticos, assim como os trematódeos monogenéticos endoparasitos, tais como aqueles da bexiga urinária de anfíbios.

3. *Trematódeos digenéticos e aspidocotíleos*

- a. Cada órgão examinado deve ser aberto em placa de Petri individual, de forma a não misturar os helmintos de um órgão com os do outro, ou mesmo de secções diferentes, por exemplo, do intestino;
- b. O conteúdo de cada órgão deve ser passado através de uma peneira com 150 μm de malha, ou sofrer decantação do sobrenadante;
- c. Após a lavagem do conteúdo e do órgão, sob jato de água de torneira, todo o material deve ser transferido para placas de Petri; o órgão deve ser transferido para outra placa de Petri, ambas contendo água de torneira;
- d. Com pipeta, transferir os helmintos para placas de Petri limpas, contendo solução salina fisiológica a 0,65% (para animais pecilotérmicos) e a 0,85% (para animais homeotérmicos);
- e. Após o exame de todos os órgãos e a coleta de todos os helmintos, passar à etapa da compressão;
- f. Comprimir entre lâminas os helmintos grandes (Ex.: *Fasciola* e *Eurytrema*), e entre lâmina e lamínula os helmintos pequenos; aqueles extremamente pequenos não devem ser comprimidos, pois a compressão é feita para diminuir a altura do parênquima;
- g. Quando a compressão for com duas lâminas, estas devem ser amarradas com linha Urso 00 (Fig. 2) e deixadas de pé, em um recipiente com fixador frio;

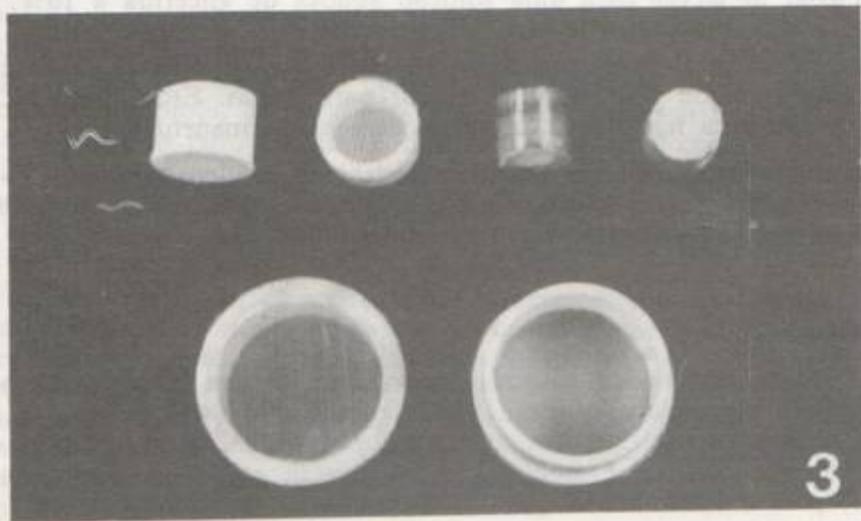
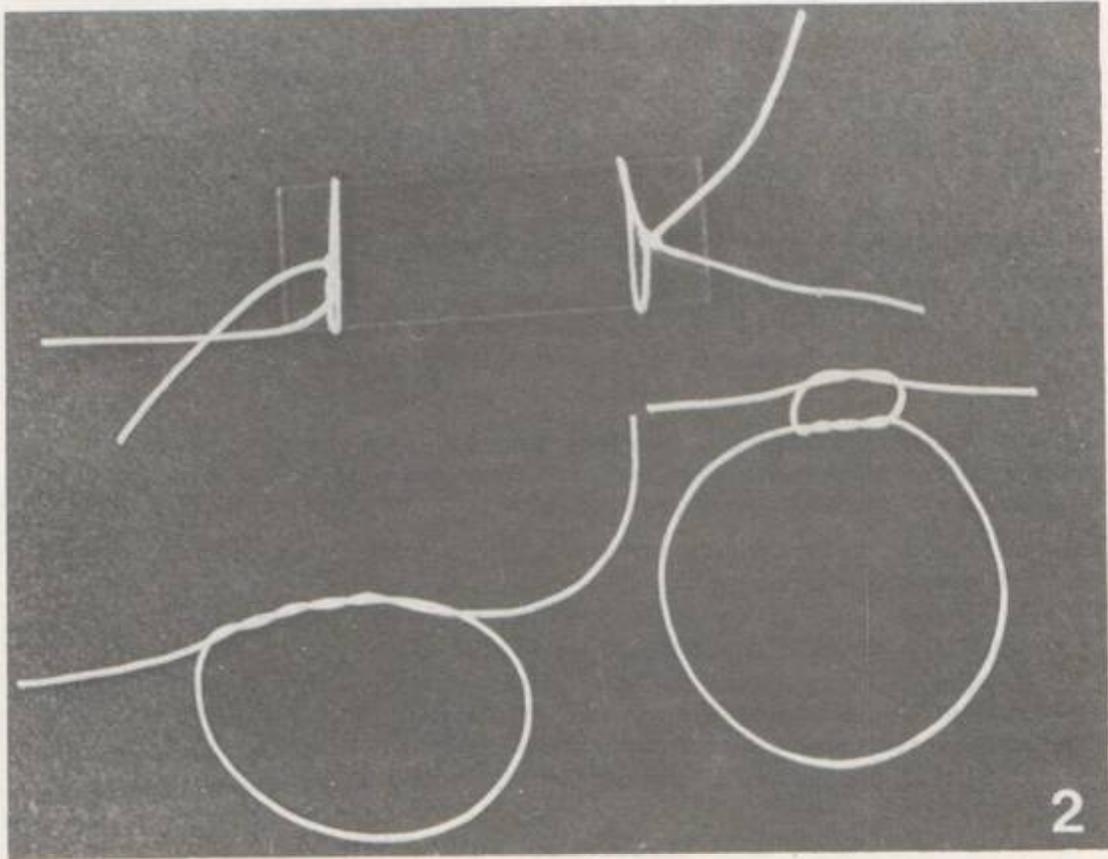


Fig. 2 — Nós, feitos com linha URSO-00, para a compressão de helmintos entre lâminas. Fig. 3 — Peneirinhas para a coloração de helmintos.

h. O tempo de compressão para helmintos grandes será de 24 horas; os pequenos estarão comprimidos em torno de 30 minutos;

i. Os helmintos pequenos, que serão comprimidos entre lâmina e lamínula, deverão, primeiro, ser colocados sobre uma gota generosa de solução salina fisiológica; sobre eles a lamínula, pequenos pesos, não metálicos. Poderão ser utilizados vidrinhos muito pequenos, que poderão ser preenchidos com água ou chumbinhos de caça, para regular o peso necessário;

j. Esta preparação deve ter sido montada dentro de uma placa de Petri, após o que o fixador frio deve ser colocado com muito cuidado, de modo que o conjunto fique submerso;

k. A compressão por tempo demasiado faz com que os helmintos fiquem aderidos ao vidro; neste caso, um pincel delicado ajuda na sua remoção. Esta operação deve ser realizada ao estereomicroscópio;

i. Os helmintos muito delicados e que, por isto, não são comprimidos, devem estar mortos antes de receberem o fixador.

3.1. *Formas larvais*

Os miracídios saídos dos ovos que foram incubados são coletados com pipetas e mortos em solução de nitrato de prata.

Impregnação de miracídios pela prata (Cable, 1969)

Esta técnica, adaptada por Lynch, é utilizada para o delineamento das células epidérmicas de miracídios, as quais não podem ser vistas pelos métodos usuais.

a. Pipetar os miracídios vivos sobre uma solução de nitrato de prata a 0,5% quente (60-70°);

b. Esperar que as larvas cheguem ao fundo do recipiente e lavar com três mudanças de água destilada, e;

c. Colocá-las em placa de Petri, para exposição direta à luz solar, por 3-10 minutos, até que os limites das células epidérmicas fiquem bem delineados pela redução do nitrato de prata;

d. Lavar novamente os miracídeos com várias mudanças de água destilada;

e. Desidratar, clarificar e montar da forma usual, ou;

f. Passar as larvas para uma solução aquosa de glicerina a 10%, e permitir que a água evapore, deixando-as finalmente na glicerina pura;

g. Neste caso, a montagem deve ser feita em gelatina de glicerina e a lутagem com lacre ou com esmalte incolor para unhas. Estas preparações em gelatina de glicerina não devem ser consideradas permanentes.

As demais formas larvais dos trematódeos digenéticos são tratadas como adultos pequenos, e não devem ser comprimidas. Exceto as metacercárias, que após o excistamento, devem ser comprimidas como trematódeos pequenos.

4. *Cestóides*

Os cestóides devem ser coletados através da mesma técnica utilizada para trematódeos digenéticos adultos. A diferença é que estes devem ser mortos sob ação de frio, no refrigerador, e em água destilada, para que haja o relaxamento da musculatura. É importante ter certeza que o escólice tenha sido removido, pois é fundamental para o diagnóstico.

Após a morte, todo o cestóide (quando for pequeno) ou secções contendo o escólice, e segmentos das porções imatura, madura e grávida do estróbilo devem ser comprimidos entre lâminas, e, então colocadas no fixador frio. Deve-se ter cuidado para que as lâminas fiquem de pé, no frasco, de forma que umas não façam peso sobre as outras.

Dependendo do grupo, é necessário o estudo de cortes histológicos transversais dos proglótides maduros. Neste caso, alguns exemplares devem ser fixados *sem compressão*, em formalina neutra a 10%.

4.1. Formas larvais

As formas larvais que se encontram encistadas, como os plerocercos de *Trypanorhyncha*, devem ser liberadas mecanicamente, com agulhas histológicas, para que possam morrer em água destilada no refrigerador, e desenvolver os tentáculos.

As formas larvais não encistadas devem ser tratadas como os trematódeos digenéticos pequenos.

5. Cestodários

Os cestodários devem ser tratados como os grandes trematódeos digenéticos.

6. Acantocéfalos

Os acantocéfalos devem ser coletados do intestino e levados à solução salina fisiológica. Devem então ser transferidos para água destilada e deixados no refrigerador para que morram com a probóscida extrovertida. Caso a probóscida contenha restos de tecidos do intestino do hospedeiro, deve-se remover os detritos com auxílio de um pincel, antes da fixação.

6.1. Formas larvais

As formas larvais encistadas em hospedeiros intermediários e/ou paratênicos (cistacantos) devem ser removidas do cisto e então serem tratadas como os adultos. As formas não encistadas (acantelas) são também tratadas como os adultos.

V. COMO FIXAR

Os helmintos que forem mortos em água destilada no refrigerador e aqueles que tiverem sido comprimidos devem ser fixados com o fixador A.F.A. (Álcool - Formalina - Ácido acético) frio. Os helmintos devem permanecer no máximo 48 horas no fixador, sendo depois transferidos para álcool 70%, onde podem permanecer por tempo indefinido.

VI. COMO CORAR

Os dois processos básicos de coloração são: o PROGRESSIVO e o REGRESSIVO. No primeiro, o corante é bem diluído, e os helmintos permanecem no corante por um longo período, até que cada órgão ou tecido, com sua cromofilia própria, adquira uma intensidade característica. No segundo, o corante é utilizado puro ou pouco diluído. Neste caso, cora-se em excesso, e, posteriormente, procede-se à diferenciação em álcool clorídrico à 0,5%. O processo regressivo é mais recomendável por ser mais rápido e mais controlável, além de permitir a remoção de partículas de corante que normalmente ficam aderidas à superfície externa do helminto.

Os temnocefalídeos, os trematódeos monogenéticos, aspidocotíleos e digenéticos adultos, os cestóides adultos e os acantocéfalos podem ser corados pela hematoxilina ou pelo carmim. A hematoxilina, por ser um corante nuclear, oferece vantagens por corar principalmente os núcleos e evidenciar estruturas internas muito delicadas, tais como canais deferentes, canais excretores, etc. Os carmins produzem preparações mais brilhantes e bonitas, mas dificultam a observação de estruturas delicadas. Já os cestodários devem ser corados pelo carmim de Semichon.

Como a hematoxilina é dissolvida em meio aquoso, o processo que a utiliza é mais longo do que o do carmim. O carmim é sempre alcoólico (mesmo o carmim de Semichon deve ser diluído em álcool 70%), permitindo que os helmintos em álcool 70% passem diretamente do meio conservador (álcool 70%) para o corante.

SEQÜENCIA PARA A COLORAÇÃO DE HELMINTOS PELA HEMATOXILINA PELO PROCESSO REGRESSIVO

1. Álcool 70%	15 min	
2. Álcool 50%	15 min	Hidratação
3. Álcool 30%	15 min	
4. Hematoxilina	tempo variável (1)	
5. Água destilada	lavagem rápida	
6. Água de torneira	15 min	Oxidação (2)
7. Álcool 30%	15 min	Desidratação
8. Álcool 50%	15 min	
9. Álcool 70% clorídrico a 0,5%	tempo variável (3)	Diferenciação
10. Álcool 70%	15 min	
11. Álcool 90%	15 min	Desidratação
12. Álcool absoluto	15 min	
13. Álcool absoluto	15 min	
14. Creosoto de faia	tempo variável (4)	Clarificação
15. Creosoto/bálsamo 3:1	tempo variável	
16. Creosoto/bálsamo 1:1	tempo variável	
17. Creosoto/bálsamo 1:3	tempo variável até a montagem	

SEQÜENCIA PARA COLORAÇÃO DE HELMINTOS PELO CARMIM PELO PROCESSO REGRESSIVO

1. Álcool 70%	15 min
2. Carmim	tempo variável
3. Álcool 70%	lavagem rápida
4. Álcool 70% clorídrico a 0,5%	tempo variável
5. Álcool 90%	15 min
6. Álcool absoluto	15 min
7. Álcool absoluto	15 min
8. Creosoto de faia	tempo variável
9. Creosoto/bálsamo 3:1	tempo variável
10. Creosoto/bálsamo 1:1	tempo variável
11. Creosoto/bálsamo 1:3	tempo variável até a montagem

Observações :

- (1) O tempo na hematoxilina é variável de acordo com o helminto, seu tamanho e diluição do corante. A diluição correta deve ser aquela que permite a leitura de letras impressas de jornal através de sua cor (alguns milímetros de altura na placa de Petri).
- (2) A água de torneira tem o objetivo de oxidar a hematoxilina, mudando sua coloração no tecido, de roxa para azul.
- (3) A diferenciação pelo álcool-ácido deve ser processada ao estereomicroscópio, de modo a clarificar o tegumento e o parênquima. Esta etapa é crucial. Exige atenção e um pouco de experiência, pois o helminto, ainda não clarificado, deverá ser removido do diferenciador, antes do ponto certo, já que deverá perder um pouco mais de corante, à medida que passar pela etapa da desidratação.
- (4) O creosoto de faia é utilizado como clarificador. Também ajuda a completar a desidratação. O tempo necessário para a clarificação de um helminto depende do tamanho do espécimen; porém, quase sempre, a clarificação está completa em alguns segundos. Os helmintos grandes, em alguns minutos estarão transparentes. É desejável que os helmintos fiquem pelo menos 24 horas no creosoto de faia, mas não há inconveniente se ficarem mais tempo.

- (5) A peneirinha de plástico e tecido, utilizada na coloração, não deve ser colocada no creosoto. Os helmintos devem ser removidos da peneira ainda no 2.º álcool absoluto, de onde devem ser passados com pincel, um a um, para o creosoto.

VII. MONTAGEM

O processo de montagem é iniciado no momento em que os helmintos saem do creosoto de faia. A passagem para o meio de montagem definitivo deve ser gradual, pois existe muita diferença entre as viscosidades do creosoto e do bálsamo. Caso a passagem não seja gradual, há a possibilidade de que os helmintos fiquem retorcidos e/ou com o tegumento colapsado.

O meio de montagem ideal é o bálsamo do Canadá sintético. Outros meios modernos devem ser evitados, pois não se conhece o seu comportamento a longo prazo. Alguns desses meios modernos são susceptíveis de apresentarem microrrachaduras a partir da periferia da lamínula, as quais aparecem como uma região amarela que progride com o tempo, eventualmente destruindo o espécimen.

O tamanho da lamínula deve ser criteriosamente escolhido. Helmintos pequenos exigem lamínulas pequenas. Deve-se sempre deixar espaço para a etiqueta definitiva, no lado esquerdo da lâmina. É interessante que o número da etiqueta seja transferido para a lâmina com o auxílio de um lápis de vidro ou diamante.

É importante que cada helminto seja montado na posição correta. Deve-se ter em mente que o microscópio produz uma imagem invertida, o que exige que um trematódeo seja colocado na lâmina com a face ventral para cima e a região anterior para baixo.

O processo de secagem pode ser apressado, com cuidado, em estufa, onde se tenha certeza que a temperatura não subirá acima de 50°C.

Lâminas que tenham recebido bálsamo demais só devem ser limpas após a secagem, com o auxílio de uma lâmina de barbear.

VIII. UTENSÍLIOS

1. Peneiras para coleta

Peneiras de cobre são utilizadas normalmente para a separação de areias com granulometria diferente, ou em Parasitologia, para a coleta de helmintos.

Uma adaptação das peneiras comercialmente produzidas é a confecção de pequenas peneiras com tubos de PVC em tamanhos de 6 e 10 cm de diâmetro. As mais úteis são as de 6 cm porque facilitam o manuseio sob jato de água de torneira, já que podem ser fechadas com quatro dedos de uma mão, de modo a permitir o acúmulo de água, para depois terem a água liberada de forma intermitente. A lavagem é eficiente, não necessitando que se use pincel ou qualquer outro instrumento que poderia danificar os helmintos presentes. Uma peneira de 10 cm de diâmetro é sempre útil quando os hospedeiros são grandes. A tela deve ser de cobre*, nas medidas de 37 µm, 150 µm e 250 µm, e colada com adesivo plástico especial para tubos e conexões de PVC rígido.

2. Peneirinhas para coloração (Fig. 3)

Sua função é transportar grande número de helmintos através da bateria de coloração. Desta forma, pode-se, com o auxílio de uma pinça, transferir a peneira, evitando que os helmintos sejam tocados.

Pode-se fazer estas peneirinhas com tubos de PVC de pequeno diâmetro, mousseline de nylon, e adesivo plástico.

* A Tecimetal S. A. de São Paulo, SP, produz telas de cobre, aço inoxidável e nylon. A tela de aço também pode ser utilizada e tem a vantagem de ser muito mais barata.

Este adesivo não resiste ao creosoto de faia, fato que obriga a remoção dos helmintos antes de sua transferência para o agente clarificador. Do 2.º álcool absoluto em diante os helmintos devem ser transferidos por meio de um pincel de poucas cerdas.

A altura das peneirinhas deve ser tal que permita a colocação de várias, lado a lado, em uma mesma placa de Petri, com tampa, para que os líquidos da bateria evaporem o mínimo possível.

IX. FÓRMULAS

1. <i>Fixador A. F. A. (Alcool - Formalina - Ácido Acético)</i>	
Alcool 70%	93 partes
Formalina comercial (37-40%)	5 partes
Ácido acético, glacial	2 partes

2. <i>Formalina 1:4.000</i>	
Água destilada	4.000 ml
Formalina comercial	1 ml

3. <i>Diferenciador Alcool 70% — Clorídrico 0,5%</i>	
Alcool 70%	200 ml
Ácido clorídrico	1 ml

4. <i>Hematoxilina de Mayer (Humason, 1972)</i>	
Hematoxilina em pó	1 g
Iodato de sódio	0,2 g
Alúmen de potássio (KAl(SO ₄).12H ₂ O)	50 g
Ácido cítrico	1 g
Hidrato de cloral	50 g
Água destilada	1.000 ml

Modo de fazer

- Adicione a hematoxilina à água destilada;
- Aqueça levemente e adicione o iodato de sódio e o alúmen de potássio;
- Aqueça até a dissolução completa, e então adicione o ácido cítrico e o hidrato de cloral;
- Deixe amadurecer por 6-8 semanas. Pode, no entanto, ser usada após 1-2 semanas.

5. <i>Hematoxilina de Delafield (Humason, 1972)</i>	
Hematoxilina em pó	4 g
Alcool etílico absoluto	25 ml
Alcool metílico	100 ml
Alúmen de amônia (NH ₄ Al(SO ₄) ₂ .12H ₂ O)	400 ml
Glicerina	100 ml

Modo de fazer

- Dissolva a hematoxilina no álcool etílico absoluto;
 - Misture gradualmente a solução saturada aquosa de alúmen de amônia (aproximadamente 1 parte de alúmen em 11 partes de água destilada);
 - Deixe exposto à luz por 3-5 dias, em um balão volumétrico com tampa de algodão;
 - Filtre;
 - Ao filtrado, adicione a glicerina e o álcool metílico;
 - Deixe amadurecer pelo menos por 6 semanas.
- | | |
|---|--------|
| 6. <i>Carmalúmen de Mayer (Humason, 1972)</i> | |
| Carmim em pó | 5 g |
| Alúmen de potássio (KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O) | 6 g |
| Ácido acético, glacial | 25 ml |
| Água destilada | 100 ml |

Modo de fazer

- a. Dissolva o carmin e o alúmen na água destilada fervendo;
- b. Deixe esfriar;
- c. Adicione o ácido acético;
- d. Deixe amadurecer por 10 dias;
- e. Filtre e adicione alguns cristais de timol, o qual impede o aparecimento de fungos;
- f. Dilua de acordo com a necessidade, antes de usar.

7. *Carmim de Semichon* (Cable, 1969)

Carmim em pó	até a saturação
Ácido acético, glacial	100 ml
Água destilada	100 ml

Modo de fazer

- a. Adicione o ácido à água;
- b. Adicione o carmin até a saturação;
- c. Aqueça a 95-100°C por 15 min;
- d. Deixe esfriar e filtre;
- e. Adicione alguns cristais de timol;
- f. O filtrado é a solução estoque, que deve ser diluída na proporção de 1:1 com álcool 70%, imediatamente antes do uso.

8. *Carmim alcoólico clorídrico de Langeron*

Carmim em pó	5 g
Ácido clorídrico	5 ml
Álcool 70%	250 ml
Água destilada	5 ml

Modo de fazer

- a. Adicione o ácido à água;
- b. Adicione o carmin, misturando bem, de preferência em um gral;
- c. Leve ao fogo e deixe cozinhar por uma hora, em um balão com tampa de algodão;
- d. Filtre.

9. *Gelatina de glicerina* (Cable, 1969)

Gelatina granulada	6 g
Fenol	1 g
Glicerina	50 ml
Água destilada	40 ml

Modo de fazer

- a. Coloque a gelatina na água destilada e deixe de molho por 15 minutos;
- b. Depois, derreta a gelatina em banho-maria e filtre através de várias camadas de nylon molhada em água quente;
- c. Dissolva o fenol na glicerina e adicione, agitando, a solução à gelatina;
- d. Guarde em frascos escuros bem fechados;
- e. Na hora de usar, aqueça a gelatina de glicerina em banho-maria.

X. REFERÊNCIAS

- Cable, R. M., 1969. *An illustrated laboratory manual of Parasitology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., USA, 165 pp.
- Esch, G. W., J. W. Gibbons, & J. E. Bourque, 1975. An analysis of the relationship between stress and parasitism. *Amer. Midl. Nat.* 93:339-353.
- Humason, G. L., 1972. *Animal Tissue Technique*. W. E. Freeman and Co., San Francisco, USA, 641 pp.

BRASILEIRA DE ZOOLOGIA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA
MANUAL DE TÉCNICAS PARA A PREPARAÇÃO DE
COLEÇÕES ZOOLOGICAS

LISTA DE FASCÍCULOS

- | | |
|--|--|
| 1. Generalidades | 22. Pantopoda |
| 2. Esponjas marinhas* | 23. Arachnida (Scorpionida, Solifugae,
Pseudoscorpiones, Ricinulei,
Opiliones, Palpigradi, Uropygi,
Amblypygi, Araneae) |
| 3. Esponjas de água doce* | 24. Acari |
| 4. Cnidaria | 25. Crustacea |
| 5. Ctenophora | 26. Myriapoda (Chilopoda, Symphyla,
Pauropoda, Diplopoda) |
| 6. Gnathostomulida | 27. Insetos imaturos* |
| 7. Plathelminthes (Turbellaria)* | 28. Insetos |
| 8. Platelmintos (Temnocefálidos,
Trematódeos, Cestóides, Cesto-
dários) e Acantocéfalos* | 29. Mollusca |
| 9. Nemertinea (Rhynchocoela) | 30. Sipuncula |
| 10. Rotifera* | 31. Phoronida |
| 11. Gastrotricha* | 32. Brachiopoda |
| 12. Cephalorhyncha (Priapulida,
Nematomorpha e Kinorhyncha) | 33. Chaetognatha |
| 13. Nematoda | 34. Echinodermata |
| 14. Entoprocta e Ectoprocta
(Bryozoa) | 35. Hemichordata, Urochordata e
Cephalochordata |
| 15. Annelida (Polychaeta) | 36. Peixes |
| 16. Annelida (Oligochaeta) | 37. Anfíbios |
| 17. Annelida (Hirudinea) | 38. Répteis* |
| 18. Tardigrada | 39. Aves |
| 19. Echiura | 40. Mamíferos |
| 20. Onychophora | |
| 21. Pentastomida (Linguatulida) | |

* Já publicados.