



PROCYP Programa de Investigación de Celulosa y Papel

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Misiones. República Argentina
<http://www.unam.edu.ar/procyp/index.html>
<http://www.fceqyn.unam.edu.ar> www.unam.edu.ar

Texto libre para usos sin fines de lucro, si se cita de la siguiente manera: 'Carlos Eduardo Núñez – PROCYP – Universidad Nacional de Misiones – Argentina -2006'.
Por favor comunique errores, sugerencias, etc. a:
c_e_nunez@fceqyn.unam.edu.ar

CONFECCIÓN DE PREPARADOS PARA MICROSCOPIA DE FIBRAS

Se llama 'preparado' para microscopía al conjunto de muestras y soportes que hacen posible la observación de aquellas en el microscopio, principalmente por medio de la luz transmitida. Se pueden realizar para una observación *ad hoc* o para su conservación en archivos o colecciones. En la Figura N° 1 se pueden ver las partes constituyentes: 1 es el vidrio sostén que se llama **portaobjetos**, 2 son los vidrios delgados que se colocan encima de las muestras y que se denominan **cubreobjetos**, 3 es la **etiqueta de identificación** del preparado, 4 representa uno de los dos posibles tipos de muestras a estudiar en microscopía de fibras que en este caso es un **corte de madera**, y 5 es una **preparación de fibras**, ya sea madera disgregada, pulpas o papeles, que es el otro tipo de muestras que se analizan. Hay un sexto elemento no indicado que es el vehículo en el que se sumergen las muestras, que puede ser *ad hoc* o permanente.

El término inglés para esta preparación es *slide*, que se traduce como 'extendido', utilizado principalmente para las muestras de sangre y otros líquidos orgánicos que se extienden sobre el portaobjetos por medio de otro vidrio. Por ello si bien se puede utilizar como traducción creemos que no es suficientemente específica dado que los preparados de microscopía de fibras no se forman de esta manera.

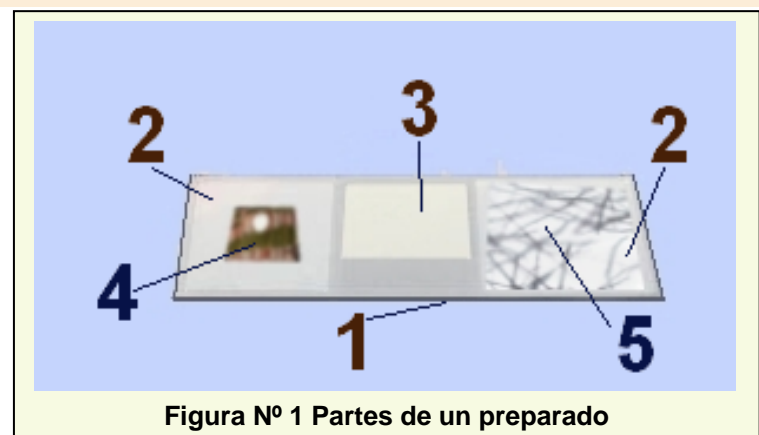


Figura N° 1 Partes de un preparado



Portaobjetos (Glass slides)

Se utiliza una sola clase de formato de vidrio portaobjetos, que es el de 76,2 mm de largo (3 pulgadas) x 25,4 mm de ancho (1 pulgada) x 2 mm de espesor. Al comprar portaobjetos no está de más fijarse en estos parámetros, porque a veces hay en el mercado vidrios de dimensiones parecidas pero no iguales, particularmente en el espesor, y ese tipo no entra en las ranuras de las cajas de colección. Dependiendo de los recursos del laboratorio los portaobjetos se pueden reciclar o tirar cuando los preparados no tienen más valor. Si se quiere reciclar conviene ir juntando los preparados ya inútiles en un recipiente de boca ancha conteniendo agua o mejor una solución de carbonato de sodio al 2 - 5% que posee una alcalinidad regulada. Esta alcalinidad no es suficiente para atacar el vidrio pero si para saponificar los lípidos (aceites y grasas) e hinchar y ablandar los pegamentos y el papel de los rótulos.



Limpeza de portaobjetos

Tanto estos elementos como los cubreobjetos deben estar absolutamente libres de polvo pero particularmente de cualquier tipo de grasitud antes de utilizarlos. Si son nuevos generalmente no es necesario limpiarlos mientras se mantenga la caja cerrada entre usos. Si son recuperados es imprescindible, después de sacarlos de la solución limpiadora y haber hecho la limpieza gruesa, hacerles el lavado final con extremada pulcritud. Para ello hay que limpiarse primero los dedos con detergente o con algún producto antigrasa, y a posteriori frotar escrupulosamente las superficies con los dedos o con algún pequeño cepillo utilizando algún producto antigrasa de los de nueva generación como el de las marcas CIF, Procenex, Brasso, etc.. Hay que remarcar que no puede ser cualquier producto limpiador, sino que debe ser antigrasa.

Los productos antigrasa comerciales están compuestos principalmente por detergentes aniónicos y no iónicos disueltos en éteres glicólicos. No contienen compuestos clorados.

Una vez frotada toda la superficie se los enjuaga bajo chorro de agua y se los coloca a escurrir de manera vertical, y en ese momento se sabe si están perfectamente limpio, porque el agua debe escurrir como un flujo continuo y parejo sin dejar sectores secos en los que el agua se retira rápidamente, lo que indica que la superficie no ha quedado exenta de grasitud. Este cuidado no es caprichoso, sino que sucede que en el trabajo posterior, particularmente si se trabaja con suspensiones de fibras, el líquido no moja el vidrio y el preparado queda defectuoso porque no se pueden extender las fibras en toda la superficie.

Una vez secos los vidrios recuperados hay que realizar una última inspección para ver si se limpiaron bien o si quedaron opacos por ataque al vidrio. Hay marcas de portaobjetos, las

más económicas, que usan vidrio de muy baja calidad que se esmerila rápidamente y estos vidrios deben desecharse.



Cubreobjetos (Cover slips)

Los cubreobjetos son los vidrios muy finos que se colocan encima de las muestras o especímenes para protegerlos, evitar el accidental contacto con los objetivos, y permitir que el líquido o la resina de inclusión que se use forme una película homogénea. Hay de varios tamaños. En la Figura N° 2 se pueden observar de dos tamaños diferentes, los de una pulgada cuadrada que son los más utilizados y los de 2 x 1 pulgada que también se usan principalmente para cortes de madera.



Figura N° 2. Izquierda; cubreobjeto rectangular de 1 X 2 pulgadas. Centro; cubreobjetos cuadrados de 1 x 1 pulgadas, que son los más utilizados. Derecha; caja de cubreobjetos como se presentan en el comercio.

Los cubreobjetos deben tener necesariamente **0,17 mm de espesor o menos** porque de ser mayor no se llega a enfocar con el aumento de 100 X, dado que su distancia focal es justo algo mayor.



Medios de inmersión y montaje

Prácticamente nunca se observan las muestras o especímenes secos, principalmente porque el aire tiene un índice de refracción muy bajo, 1,002, y eso sumado a que las células son huecas, hace que si no están empapadas en algún vehículo no se distingan los detalles. Para

trabajos rápidos se utiliza agua, por ejemplo como control de proceso, o para alguna comprobación cualitativa rápida.

El agua tiene un índice de refracción de 1,33 que es intermedio entre el del vacío 1,000 y el de los solventes más refringentes que están en el orden de 1,54 - 1,56. Tiene la ventaja de su simpleza e inocuidad, pero se evapora fácilmente, o sea que si se hace un preparado con agua, este durará un corto tiempo inmerso. El agua, por otro lado, hincha los polisacáridos y si bien este hecho no es ni negativo ni positivo en si mismo, hay que tenerlo en cuenta porque las dimensiones de los elementos van a ser mayores que en medios hidrofóbicos.

Los líquidos que se utilizan si se quieren mantener humectados los preparados por mucho tiempo, son aquellos que poseen la misma polaridad que el agua pero puntos de ebullición altos, como el etilenglicol (197 °C) y la glicerina (294 °C). Éstos dos líquidos se pueden considerar como 'agua fija' en microscopía, y como son miscibles en agua se pueden limpiar tan bien como dicha sustancia. Sus viscosidades son altas, mucho más la glicerina que tiene consistencia aceitosa, que el etilenglicol. De todas maneras ninguno de estos tres líquidos pueden utilizarse para preparados permanentes, porque por su carácter fluido se van difundiendo lentamente de entre los vidrios, y además, obviamente, no pueden guardarse de manera vertical.

Pare ello se utilizan los medios de montaje que consisten el líquidos que se endurecen o polimerizan quedando al estado sólido. Originariamente se utilizaron algunas oleorresinas naturales dentro de las cuales la más común era el bálsamo de Canadá, que se extrae de la corteza del Abeto Balsámico, *Abies balsamea* del Hemisferio Norte. La gente de edad suficiente seguramente se acordará de este producto y lanzará algún improperio al aire por lo incómodo y pringoso que era trabajar con el. Se utilizaba porque era una de las sustancias conocidas que tenía la propiedad de endurecerse con el tiempo, ser transparente e insoluble en agua. Sin embargo lo de endurecerse era a medias, porque siempre quedaba pegajoso y se iba escurriendo a las cajas dejándolas prácticamente inutilizables. Por otro lado con el tiempo se iba amarilleando hasta hacerse sólo traslúcida, y además es opaco a la luz ultravioleta que a veces se utiliza. Por eso la llegada de productos sintéticos simplificó en mucho este tipo de tareas.

Dentro de los medio de montaje sintéticos, los que más se usan son los acrílicos, acrilatos o poliacrilatos.

La diferencia entre estos conceptos no es clara, o no he encontrado la información pertinente, por lo que pido que si algún lector sabe sobre el tema que me escriba.

Hay varias marcas comerciales que los surten. Con la que tengo experiencia es la de Merck, que se llama *Entellan*. Viene en recipientes de 100 mililitros, es un producto costoso, pero si no se derrocha puede durar años. El número de catálogo es 7961 y en la etiqueta se presenta como un alquilacrilato disuelto en xileno.

Es importante entender que, a diferencia de otros acrilatos que se usan corrientemente como el pegamento conocido coloquialmente como 'la gotita', no se polimeriza al usarlo. Es una solución del polímero ya reaccionado en un solvente adecuado. Por lo tanto el endurecimiento se debe a la evaporación de dicho solvente, y se puede volver a diluir. Esto es importante porque con el abrir repetido del frasco se va espesando, y por ello cada tanto conviene agregarle fracciones de xileno. Mantener la viscosidad original es importante, porque si

está muy pastoso no fluye ni se introduce por todos los intersticios de los tejidos vegetales, y si está muy diluido al evaporarse el solvente van quedando huecos secos en el preparado sin cubrir, Figura N° 3.

El *Entellan* se seca casi instantáneamente y no requiere curado. Prácticamente después de agregarlo se puede iniciar la observación. Tiene una duración de unos 6 - 8 años, y luego comienza a modificarse a una forma similar a la vítrea y se llena de líneas como de fractura que hacen incómoda o imposible la observación del preparado, Figura N° 4.

He probado a utilizar algunos otros productos sintéticos. Por ejemplo la citada 'gotita', pero no es práctico, se polimeriza demasiado rápido, y con frecuencia no queda perfectamente

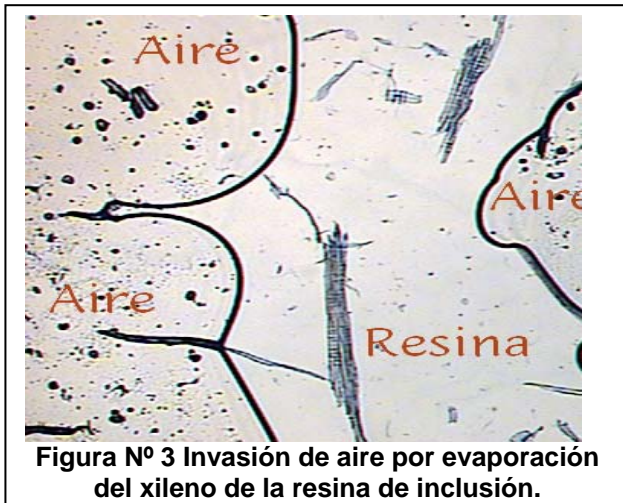


Figura N° 3 Invasión de aire por evaporación del xileno de la resina de inclusión.

traslúcido. Quedaría por probar de conseguir el polímero alquilacrilato y disolverlo en xileno, y de esta manera conseguir un producto seguramente mucho menos costoso que el comercial.



Figura N° 4. Zona de un preparado montado con *Entellan* que originariamente estaba lisa. Luego de seis años de realizado hay rajaduras y bandas estriadas.



Conservación de preparados

Con frecuencia en los laboratorios, tanto académicos como de institutos o empresas, es necesario o conveniente realizar una colección de preparados que sirven como referencia para docencia, investigación o los servicios que se realicen. Para ello se utilizan cajas especialmente construidas que se pueden confeccionar artesanalmente o adquirir en los comercios. Ejemplos de ellas se pueden ver en la Figura N°s 5 y 6. Artesanalmente se pueden hacer realizando prolijas ranuras en dos tablitas de una buena madera como la de cedro (género *Cedrela* no *Cedrus*), y luego alineándolos a la distancia adecuada. Nuestra experiencia es que

lo puede hacer cualquier persona con alguna habilidad manual y la paciencia necesaria. Poder hacerse las cajas de preparados, al margen del placer que da de suyo, tiene la ventaja de que las comerciales son de difícil consecución. Se pueden conseguir en el comercio de varios tamaños, sin embargo son pocas las casas que las venden, y solamente en lugares de mucha



Figura N° 5 Cajas de madera y cuerina para la colección de preparados



Figura N° 6 Caja de preparados de plástico para cincuenta muestras.

salida. En el caso de Argentina a veces y no siempre se consiguen en Buenos Aires. Las más comunes son de plástico y tienen capacidad para cincuenta preparados. Un laboratorio como el nuestro del PROCYP que trabaja en docencia, investigación y servicios, tiene una 12 - 15 cajas de esas, recolectadas en un lapso de unos veinte años. Las que se muestran en la Figura N° 4 son un lujo para nosotros.

Una sugerencia conveniente de hacer es que conviene ir teniendo una caja para cada tipo de muestras. En nuestro caso separamos los cortes de madera, los disgregados de madera, las pulpas, los papeles, y las impurezas y materiales varios de papeles.



Preparación de las muestras

Hay dos clases bien diferenciadas de muestras a observar en el área papeleras; las de los tejidos tal cual se hallan naturalmente y en aquellos que ya fueron desfibrados, o sea los disgregados, las pulpas y los papeles. Generalmente los tejidos naturales son de consistencia dura dado que principalmente son de maderas o de algún otro recurso leñoso como las cañas. De ellos hay que cortar láminas finísimas para que puedan ser vistas con luz transmitida en los microscopios.

Para ello existe la herramienta llamada micrótomo (del griego *micro* = pequeño y *tomo* = que corta), que consiste, en el caso de las maderas y similares, de un riel por el que se desliza una cuchilla y un sistema micrométrico para regular el espesor de los cortes. Un ejemplo es el de la figura N° 7: 1 es el carro de deslizamiento, 2 es la cuchilla que corre con un cierto ángulo respecto al eje de deslizamiento, 3 es la muestra en el portamuestra y 4 son perillas de regulación del ascenso del portamuestras en función al espesor que se desea realizar los cortes. La microtomía es una técnica en si misma de la que no vamos a hablar en este texto, pero vale decir que se obtienen láminas de entre 5 y 20 micrones de espesor que son las que sirven.

El otro tipo de muestra, como ya se dijera, es aquel en el que los elementos celulares ya están separados. En este caso se necesita solamente hacer una suspensión acuosa con los mismos y depositarlos, de acuerdo a ciertas técnicas, sobre el portaobjeto, y evaporar el agua posteriormente, Figura N° 8

Los cortes al micrótomo se van sacando con un pincel humedecido en glicerina y colocados en un pequeño recipiente. Se llevan a una mesa adecuada y por medio de la observación visual o con una pequeña lupa se van separando los que tengan la calidad adecuada.

Tinción

Posteriormente hay que teñirlos y ello se puede hacer colocándolos en una solución de colorantes apropiados, lavándolos luego por operaciones sucesivas y secándolos en estufa a 50 - 60°, o sino *in vitro*, es decir irlos colocando en el portaobjeto en el lugar en el que van a quedar y agregándoles una gota del colorante. Después se pone en cubreobjetos y se lava con agua haciendo escurrir los lavados por medio de un papel secante colocado en uno de los bordes. El primer método genera tinciones mejores y más parejas pero es más lento. Con el segundo método se hace la tinción de manera rápida y sencilla, pero los cortes suelen no quedar teñidos de forma homogénea en toda su extensión.

Respecto a los colorantes a utilizar hay considerable citas en la bibliografía y cada grupo de investigación tiene sus colorantes preferidos. Mi experiencia es que para la mayoría de los casos es indistinto utilizar cualquiera de los colorantes que toman la lignina o los polisacáridos que son la generalidad. En última instancia es una elección subjetiva particularmente por la sensibilidad o la apreciación de los colores de cada uno, e inclusive por el deseo que tenga en ese momento. Hay algunas limitaciones a lo dicho: por ejemplo hay que tener en cuenta que si se sacan fotografías o se usa la observación visual

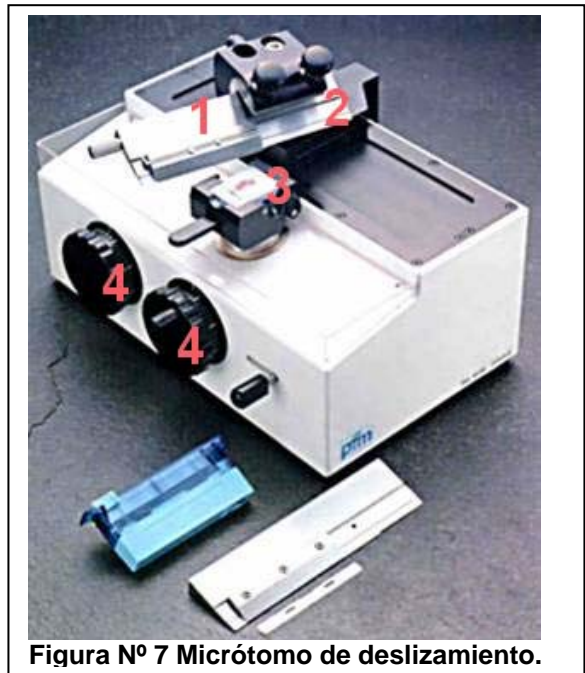


Figura N° 7 Micrótomo de deslizamiento.



Figura N° 8. Portaobjeto con la suspensión acuosa a ambos lados.

directamente, dado que las iluminaciones corrientes de los microscopios poseen un espectro en el que predomina el rojo y el amarillo, los fondos se suelen ver anaranjados. Por eso es conveniente utilizar colorantes con tonos que contrasten con dicho fondo, es decir la gama de los fríos, como verde, índigo o azul.

Los colorantes más utilizados son los siguientes: Safranina, Verde de Malaquita, Verde Brillante, *Fast Green*, Rojo Congo y Violeta de Genciana, de una serie que abarcará aproximadamente cincuenta sustancias utilizables. Personalmente uso con frecuencia, particularmente utilizando un analizador de imágenes digital, una mezcla compuesta de solución de amarillo de acridina con una gotas de safranina para darle más oscuridad a la tinción obtenida.

En biología, y particularmente en botánica se suelen utilizar tinciones complejas de dos o más colorantes con técnicas que controlan tiempo, temperaturas y concentraciones. Estas tinciones son diferenciales, es decir que tiñen de un color distinto cada tipo de tejido. Ello en nuestro caso es muy limitado porque se trabaja prácticamente con xilema muerto, y no hay diferenciación considerable de composición química celular para que esto ocurra. Hay algunos casos en el que se puede realizar, por ejemplo en coníferas resinosas en las que se tiñe distinto el tejido leñoso que la resina, y en algunos casos de madera atacada por hongos, en los que se consigue un color especial para éstos.

Las técnicas de tinción en microscopía de materiales lignocelulósicos son muy sencillas. Generalmente consisten en tratar por un cierto tiempo corto los tejidos o disgregados con el colorante en forma directa, haciéndose posteriormente un lavado con agua. No hacen falta las complicadas deshidrataciones que se requieren en los tejidos vivos con las células con masa protoplasmáticas. La experiencia consiste más que nada en saber la concentración de los colorantes para que no queden los preparados demasiado teñidos. El rango corriente es de 0,5 a 0,01%, en casi todos los casos disueltos en agua.



Montado

La operación de montado (o 'montaje' usando un galicismo), consiste en la ubicación y posterior fijado de las muestras a observar en el preparado. En el caso de los cortes de madera se colocan los fragmentos secos sobre el portaobjetos, se alinean de alguna manera, se agrega el líquido que se va a utilizar, agua, glicerina, la resina de montado, etc., y se coloca arriba el cubreobjetos. Por capilaridad el fluido se va extendiendo sobre todo el cubreobjetos. Se espera un minuto más o menos y el preparado ya se puede colocar en el microscopio para observación. El escurrido y embebido completo del líquido es muy rápido en el caso de que las células estén separadas, es decir en disgregados, pulpas o papeles, y tarda un poco más en los cortes de madera. Con cierta frecuencia quedan burbujas de aire ocluidas que si son

muchas dificultan la observación y van a aparecer en las fotografías o en las imágenes capturadas de forma digital, Figura N° 9.

Hay algunas maneras no muy efectivas de sacar las burbujas de aire en el momento que se forman. Una de ellas es prensar los vidrios con broches de la ropa y a veces las burbujas se mueven hacia el borde del cubreobjeto siguiendo el movimiento del líquido. Otra manera es ir apretando el cubreobjeto con una aguja de disección haciendo que se desplacen hacia afuera. Si bien no hay alguna fórmula mágica para que no se formen, se evitan bastante cuidando de poner el líquido sobre los cortes de madera o los preparados de fibras lentamente haciendo que el aire tenga tiempo de escurrirse. Ayuda también en el caso de la resina de inclusión que el fluido tenga la viscosidad adecuada: si es muy alta es más fácil que ocluya aire, y si es muy baja van a quedar burbujas vacías al evaporarse el exceso de xileno.

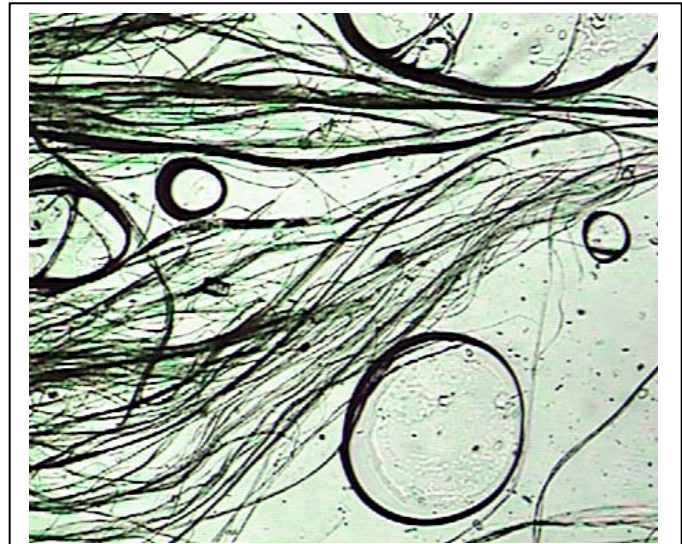


Figura N° 9. Burbujas de aire ocluido entre fibras.

A diferencia del bálsamo de Canadá los preparados fijados con resinas sintéticas se secan en pocos minutos y se pueden guardar enseguida en las cajas correspondientes.



Secuencia simplificada de realización de un preparado

Para cortes de madera u otros tejidos leñosos:

- 1) Preparar la madera por tratamiento con agua hirviente por el tiempo necesario.
- 2) Realizar los cortes con el micrótopo.
- 3) Seleccionar, teñir y secar los cortes.
- 4) Preparar los portaobjetos poniendo el rótulo correspondiente.
- 5) Colocarlos sobre el portaobjetos y agregarle encima la resina, tratando de que desplace el aire de los tejidos.
- 6) Cubrir con los cubreobjetos y esperar que fluya la resina.

Para suspensiones fibrosas

- 4) Preparar los portaobjetos dividiéndolos en tres sectores con marcador de pintura y rótulo en el centro.
- 5) Preparar la suspensión fibrosa en un tubo de ensayos.

- 6) Colocar en la estufa el portaobjeto y agregarle aproximadamente un mililitro de la suspensión a cada lado y dejar evaporar (tarda aprox. media hora).
- 7) Sacar de la estufa, teñir y lavar. Volver a colocar en estufa para secar el agua (unos pocos minutos).
- 8) Sacar de la estufa, colocar en cada lado una gota de la resina sintética y agregar encima los cubreobjetos acomodándoles con los dedos para que no sobresalgan del portaobjetos.
- 9) Esperar unos minutos hasta que la resina fluya por toda la sección con muestra.

