

METODOLOGIA PARA OBSERVAÇÃO DA CAMADA DE CERA EM MAÇÃS, UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA¹

LUIS ANTÔNIO SUITA DE CASTRO², ROSA MARIA VALDEBENITO SANHUEZA³, RUFINO FERNANDO FLORES CANTILLANO², NARA ELIANE MOREIRA ROCHA²

RESUMO - A estrutura mais superficial da epiderme dos frutos é constituída por fina camada de cera, responsável por mecanismos de proteção, principalmente relacionados à evapotranspiração e ao ataque de patógenos. A visualização de cera por microscopia eletrônica de varredura apresenta dificuldades no processamento da amostra, pois os métodos rotineiramente utilizados ocasionam sérios danos a esta camada ou, simplesmente, provocam sua eliminação devido ao processo de solubilização causado pelos reagentes utilizados. Alguns autores têm utilizado temperaturas baixas (-90°C) para o processamento de amostras. No Brasil, tentativas de observação de cera em maçãs, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, têm sido realizadas; entretanto, os resultados não foram satisfatórios. No Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa Clima Temperado, foi adaptado um método simples e que tem apresentado bons resultados. Para este experimento, foram retiradas pequenas porções da casca de maçãs da região equatorial dos frutos. As amostras foram fixadas em lâminas histológicas, utilizando fita adesiva nas extremidades. Posteriormente, foram colocadas em dessecador contendo sílica gel, para que ocorresse a desidratação. Após 72 horas, foram retirados fragmentos para fixação em stubs e metalização com ouro. Foi usado um microscópio eletrônico ZEISS (DSM-940A), regulado à distância de trabalho de 15mm, voltagem de aceleração de 10 kV e ampliação de 3.000 X. As imagens obtidas permitiram avaliar a interferência dos fatores ambientais utilizados no processo de frigoconservação de maçãs.

Termos para indexação: *Malus domestica*, epiderme, visualização.

METHODOLOGY FOR OBSERVATION OF THE WAX LAYER IN APPLES, USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ABSTRACT - The fruit epidermis is covered by a thin layer of wax which gives protection to the fruit, mainly against water loss and pathogenic organisms. Several studies using scanning electron microscope have been developed to study that wax. The wax layer visualization through the scanning microscope is difficult due to some problems of sample preparation. The usual procedures cause serious damages to the wax layer or even eliminate it because of its solubilization by some of the reagents. Several researchers have kept the samples at very low temperature (-90°C) during the preparation. Wax observations in Brazil by using electronic scanning microscope have been performed, however in some of them results were not consistent. A relatively simple procedure at the Laboratory of Electron Microscopy at Embrapa Temperate Climate has been tried to overcome such difficulties. Such procedure consists of collecting a small piece of the fruit epidermis (1cm²) taken from the equatorial part of the apples. After sampling it the piece of epidermis is placed on a glass slide hold by the extremes with a sticky tape. The sample on glass slide is kept for 72 hours into a dessicator containing drierite for the sample dehydration. Then, small pieces of the sample (2 mm²) were taken and hold on stubs followed by metalization in gold. Following that, the sample is observed using a Zeiss (DSM - 940A) electronic microscope at a working distance of 15 mm and acceleration voltage of 10 KV. The obtained images made possible to evaluate the action of some experimental treatments which have been used on apples during cold storage.

Index terms: *Malus domestica*, visualization, epidermis.

O crescimento dos frutos envolve estádios de divisão celular, alongação das células e formação dos espaços intercelulares. A epiderme é a camada mais externa de células e apresenta antocianinas responsáveis pela coloração. A estrutura mais superficial é constituída por fina camada de cera, responsável por mecanismos de proteção, principalmente relacionados à evapotranspiração e ao ataque de patógenos. Vários trabalhos foram realizados utilizando microscopia eletrônica de varredura na observação dessa camada (Amelunxen et al., 1961; Troughton & Donaldson, 1972). Recentemente, o interesse sobre a cera que reveste os frutos tem aumentado por constituir-se em um mecanismo importante no processo de frigoconservação.

Em razão da condição natural hidratada, amostras biológicas apresentam relativa complexidade de processamento para microscopia eletrônica de varredura. Somente amostras com teor de água muito baixo (< 10%), como sementes, espículas, etc., podem ser observados com tratamento preliminar mínimo. Em sua grande maioria, o preparo das amostras inclui diversas etapas (Kessel & Shih, 1976; Murphy, 1982).

Como princípio básico, a amostra deve ser representativa da situação a ser analisada, evitando-se causar modificações que possam resultar na formação de avaliações equivocadas. Basicamente, as amostras devem possuir a dimensão mínima necessária para o estudo, embora, muitas vezes, seja importante trabalhar com objetos grandes. Quanto maior a dimensão, maiores serão as dificuldades encontradas para uma boa imagem.

No procedimento básico, as amostras são estabilizadas por

fixação química. Da mesma forma que em outras estruturas, a fixação química inicial responde pela integridade da amostra. O espécimen, devidamente fixado por agentes químicos, que o tornam resistente, é desidratado com acetona ou etanol, e posteriormente substituídos por gás carbônico liqüefeito, na câmara do aparelho de ponto crítico (Silveira, 1989; Robinson et al., 1987, Hayat, 1972). Entretanto, este procedimento não é eficiente para a visualização da camada de cera que recobre frutos. Os métodos rotineiramente utilizados ocasionam sérios danos a esta estrutura ou, simplesmente, provocam sua eliminação devido ao processo de solubilização causado pelos reagentes utilizados.

Alguns autores têm utilizado temperaturas baixas (-90°C) para o processamento de amostras (Gough & Shutak, 1972; Roy et al., 1994), obtendo bons resultados. No Brasil, algumas tentativas de observação de cera em maçãs, por meio de microscopia eletrônica de varredura, têm sido realizadas; entretanto, os resultados não foram satisfatórios.

Com o objetivo de dispor de uma metodologia simples e rotineira que permita avaliar a camada de cera presente em maçãs, utilizando microscopia eletrônica de varredura, foi desenvolvido um novo método.

Foram retiradas porções retangulares (0,5 x 2,0 cm) da casca de maçãs da região equatorial de 56 frutos armazenados em diferentes condições de frigoconservação. As amostras foram fixadas em lâminas histológicas, utilizando fita adesiva nas extremidades (Figura 1). Posteriormente, foram colocadas em dessecador contendo sílica gel para que ocorresse a desidratação. Este procedimento visou à substituição da metodologia-padrão utilizada em microscopia eletrônica, responsável

¹ (Trabalho 039/2002). Recebido: 09/03/2002. Aceito para publicação: 24/10/2002.

² Embrapa Clima Temperado. BR 392 KM 78, CP 403, CEP 96001-970 - Pelotas-RS. suita@cpact.embrapa.br

³ Embrapa Uva e Vinho. CP 130. CEP 95.700-000, Bento Gonçalves - RS. rosa@cnpuv.embrapa.br

pela eliminação dos componentes solúveis presentes na camada cerosa que reveste a película de maçãs.

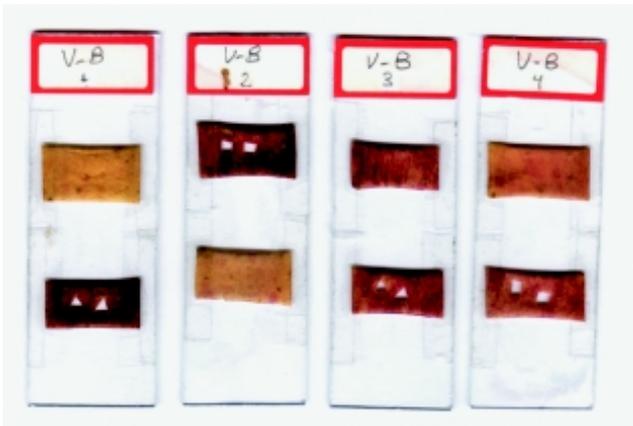


FIGURA 1 - Montagem das porções da casca de maçãs, retiradas da região equatorial dos frutos em lâminas histológicas, fixadas com fita adesiva nas extremidades, utilizadas, após dessecação, para a coleta dos fragmentos com 2mm² observados em microscopia eletrônica.

Após 72 horas, foram retirados dois fragmentos (1,0 x 1,0 mm) de cada amostra para observação ao microscópio. Os fragmentos foram montados no suporte porta-amostras do microscópio ("stub"), considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e do coletor de elétrons secundários. Como adesivo, foi utilizada fita adesiva bordada com um filete de prata coloidal para melhorar a condutividade.

O trabalho de montagem foi realizado sob lupa estereoscópica, levando-se em consideração que as amostras secas ficaram extremamente frágeis, necessitando de cuidados para a sua montagem. A avaliação realizada envolveu a obtenção de informações topográficas da superfície, utilizando elétrons secundários (baixa energia) provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécimen. O material foi coberto com uma camada condutora de ouro, evaporada em vácuo, utilizando metalizador marca EMITECH, modelo K550, regulado a 35mA / 2 minutos. A espessura dessa camada foi programada para ser suficientemente fina e não influir na resolução da imagem, mas suficientemente espessa, para garantir uma produção copiosa de elétrons secundários, usados para formar a imagem.

Foi utilizado um microscópio eletrônico ZEISS (DSM-940A), regulado à distância de trabalho de 15 mm, voltagem de aceleração de 10 kV e ampliação de 3.000 X.

O registro fotográfico foi feito em negativos Kodak (Plus-X pan 5-PXP120). Paralelamente, foram captadas imagens diretamente do microscópio eletrônico, por meio de sinais de vídeo.

Considerando as atividades realizadas anteriormente, as dificuldades encontradas e os resultados obtidos, as atividades desenvolvidas neste experimento proporcionaram resultados bastante consistentes quando comparados com informações obtidas em levantamento bibliográfico sobre o assunto em estudo. A documentação fotográfica está apresentada na Figura 2.

Quando o interesse maior é obter informações topográficas, o microscópio eletrônico de varredura é o instrumento mais versátil para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas (Dawes, 1971; Dykstra, 1993). A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10 μ m para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X. Esta característica possibilita obter imagens estereoscópicas bem focadas com espécimens até macroscópicos. Além disso, no microscópio eletrônico de varredura, a amostra pode ser inclinada e rotacionada, sob o feixe eletrônico, em todas as orientações; logo, precisa estar bem preservada nas três dimensões. As imagens que

foram obtidas permitiram avaliar a interferência de alguns fatores experimentais no processo de frigoconservação de maçãs. Foi possível observar que determinadas condições mantêm a camada de cera em condições adequadas (Figura 2A, 2B), enquanto outras causam prejuízos (Figura 2C), permitindo inclusive o desenvolvimento de fungos (Figura 2D).

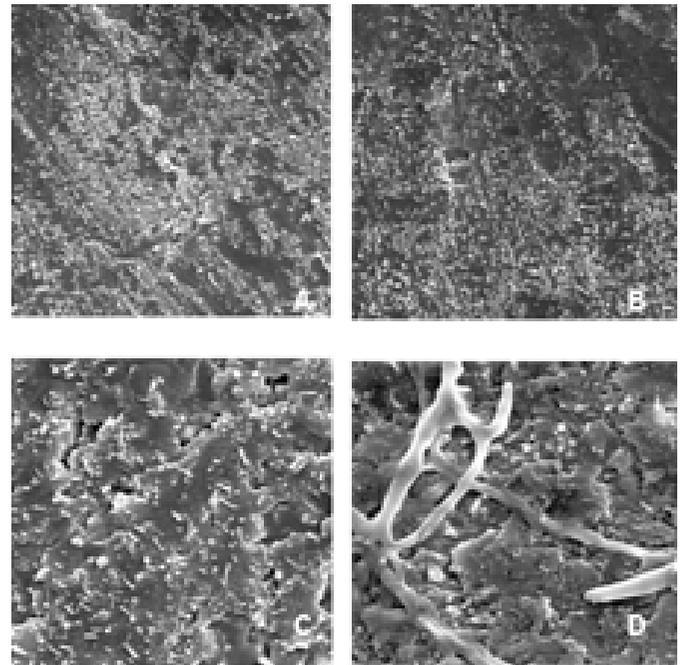


FIGURA 2 - Eletromicrografias de varredura da camada de cera que recobre maçãs (3.000x). Camada de cera intacta (A e B). Camada de cera danificada (C). Camada de cera com incidência de fungo (D).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMELUNXEN, F.; MORGENROTH, K.; PICKSAK, T. Untersuchungen na der epidermis mit dem stereoscan-elektrom-mikroskop. *Z. Pflanzenphysiol.*, v.57, p.79-95, 1961.
- DAWES, C.J. **Biological techniques in electron microscopy**. New York: Barnes & Noble, 1971. 193p.
- DYKSTRA, M.J. **A Manual of applied techniques for biological electron microscopy**. New York: Plenum Press, 1993. 257p.
- GOUGH, R.E.; SHUTAK, V.G. Fine structure of the apple cuticle and storage scald. *HortScience*, Alexandria, v.7, n.6, p.561-562, 1972.
- HAYAT, M.A. **Basic electron microscopy techniques**. New York: UNR, 1972. 119p.
- KESSEL, R.G.; SHIH, C.Y. **Scanning electron microscopy in biology**. New York: Springer-Verlag, 1976. 190p.
- MURPHY, J. **Specimen preparation for Scanning Electron Microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1982. 220p.
- ROBINSON, D.G.; EHLERS, U.; HERKEN, R.; HERRMANN, B.; MAYER, F.; SCCHÜRMAN, F.W. **Methods of preparation for electron microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1987. 190p.
- ROY, S.; CONWAY, W.S.; WATADA, A.E.; SAMS, C.E.; ERBE, E.F.; WERGIN, W.P. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in "Golden Delicious" apples. *HortScience*, Alexandria, v.29, n.9, p.1056-1058, 1994.
- SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. USP, São Paulo: v.1, 1989. p.71-79.
- TROUGHTON, J.; DONALDSON, L.A. **Probing plant structure**. London: Chapman and Hall, 1972.