



Todo o conteúdo deste periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons.

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License.

Todo el contenido de esta revista, excepto dónde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0102-3306&lng=es&nrm=iso.

Acesso: 14 nov. 2013.

Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável

José Geraldo Antunes de Paiva¹, Suzane Margaret Fank-de-Carvalho¹, Maurício Pimenta Magalhães¹ e Dalva Graciano-Ribeiro^{1,2}

Recebido em 3/07/2004. Aceito em 31/08/2005

RESUMO – (Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável). Há diferentes meios de montagem comercializados a preço relativamente alto para a produção de lâminas permanentes de tecidos vegetais corados. Esses meios endurecem à medida que secam e possibilitam a manutenção do material botânico em boas condições de conservação por tempo indeterminado. Os meios de montagem mais utilizados em anatomia vegetal são: Bálsamo-do-canadá, Euparal[®], Entellan[®] e Permout[®]. Visando a redução dos custos de produção de lâminas permanentes para anatomia vegetal, foram testados meios alternativos, produzidos por empresas brasileiras, principalmente para uso em artesanato. Entre os diferentes meios sintéticos testados, o verniz vitral incolor 500[®] demonstrou propriedades compatíveis para o uso eficiente como meio de montagem, em substituição às resinas sintéticas importadas, com custo baixo e sem alteração do processo rotineiro de trabalho. O verniz vitral incolor 500[®] permitiu a montagem de lâminas permanentes com órgãos seccionados a mão livre ou em micrótopo rotatório, após o embocamento em parafina ou historresina, mantendo inalteradas as características dos materiais vegetais e da coloração. Os resultados evidenciaram que os meios de montagem tradicionais podem ser substituídos pelo verniz vitral incolor 500[®], sem comprometimento da qualidade das lâminas.

Palavras-chave: verniz vitral incolor 500[®], meio de montagem, anatomia vegetal, resina sintética

ABSTRACT – (Verniz vitral incolor 500[®]: a mounting medium alternative and economically viable). There are different imported mounting mediums commercialized at a relative high price for producing permanent slides of stained plant sections. These mounting mediums become harder as they dry and preserve the good conditions of the plant material for indetermined time. The most used mouting mediums to plant anatomy are: Canada balsam, Euparal[®], Entellan[®] and Permout[®]. Aiming to reduce costs of producing permanent plant anatomy slides, alternative mediums produced by brazilian industries, used mostly in artesanal work, were tested. Among the different synthetic mediums tested, the verniz vitral incolor 500[®] showed properties compatible to be used as an efficient mounting medium, in substitution to the imported synthetic resins, at a lower cost and without alterations in the routine process. The verniz vitral incolor 500[®] allowed the production of permanent slides with plant organs sectioned hand free as well in rotatory microtome, after paraffin or historesin embedding, keeping unaltered the tissue and color characteristics. The results showed that the tradicional resins can be replaced by the verniz vitral incolor 500[®], not compromising the quality of the slides.

Key words: verniz vitral incolor 500[®], mounting medium, plant anatomy, synthetic resin

Introdução

A montagem de lâminas histológicas consiste em depositar o material biológico numa lâmina de vidro e cobrir com lamínula. É necessário colocar um meio junto com o material, que o preservará por algum tempo e garantirá a união da lamínula com a lâmina (Kraus & Arduin 1997). A preservação de tecidos vegetais corados em meios de montagem duros e duráveis (permanentes) é mais satisfatória do que em meios macios, facilmente danificáveis (temporários ou semi-permanentes) (Sass 1958). Lâminas permanentes são

indispensáveis para a ilustração de cursos de botânica básicos e avançados (Sass 1958) e também são utilizadas nas pesquisas de cunho eminentemente anatômico, nas pesquisas de anatomia aplicada à taxonomia-cladística, de farmacognosia ou de fisiologia vegetal, e nas aulas de biologia das escolas brasileiras de ensino médio.

Nos estudos anatômicos, uma lâmina bem preparada é primordial para a análise e, conseqüentemente, para a discussão dos resultados. Vários estudos têm sido feitos visando a aprimorar a confecção dessas: o estudo de Rupp (1964) dissertou sobre a

¹ Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal, Campus Universitário Darcy Ribeiro, C. Postal 04457, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil

² Autor para correspondência: graciano@unb.br

inclusão de materiais em polietilenoglicol; Fisher (1968) indicou o uso de corantes específicos para localização de proteínas; Feder & O'Brien (1968) defenderam o uso de fixadores não coagulantes e indicaram o meio plástico metacrilato para a embebição; O'Brien *et al.* (1973) discutiram o uso de fixadores coagulantes e não coagulantes; Sakai (1973) indicou o uso do corante azul de toluidina O para materiais emblocados em parafina; Luque *et al.* (1996) recomendaram a substituição do corante azul de astra por azul de alciano 8GS ou azul de alciano 8GX; Magistris *et al.* (2000) comunicaram o uso de fita adesiva e esmalte incolor, entre outros.

A montagem de lâminas em resinas sintéticas constitui-se no método tradicionalmente utilizado nos laboratórios de histologia vegetal. Devido às suas características de secagem e transparência, bem como pela capacidade de preservação do material em boas condições de visualização por tempo indeterminado, as resinas sintéticas Euparal®, Entellan® e Permount® são as mais utilizadas, atualmente, como meios de montagem em anatomia vegetal (Kraus & Arduin 1997).

Entretanto, as resinas utilizadas são importadas e de custo elevado, encarecendo as pesquisas em anatomia vegetal no Brasil. Considerando as políticas de contenção de despesas nas Instituições Públicas brasileiras e visando à redução dos custos de montagem de lâminas permanentes de órgãos vegetais para os diferentes usos, este trabalho espera obter um meio de montagem alternativo, mais barato e tão eficiente quanto às resinas importadas, pelo teste de diferentes substâncias sintéticas, especialmente as do tipo verniz, produzidas e comercializadas no Brasil.

Além disso, é importante salientar que, embora existam estudos relacionados à confecção de lâminas histológicas (Feder & O'Brien 1968; Fisher 1968; Magistris *et al.* 2000), não foram encontrados relatos de pesquisas relacionadas à adaptação ou desenvolvimento de novos meios de montagens.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é analisar os resultados obtidos com o uso de resinas alternativas e assim, encontrar o melhor substituto das resinas usuais.

Material e métodos

Foram testados, como meios de montagem, os compostos vendidos comercialmente com os nomes de goma-laca® (das marcas Acrilex e Gato Preto), verniz cristal (das marcas Acrilex, Suvinil e Coral), verniz (das

marcas Suvinil e Coral) e verniz vitral (verniz vitral incolor 500®, da marca Acrilex - Acrilex 2003).

Para a realização do teste, foram montadas seis lâminas para cada meio de montagem, em cada uma das técnicas (material fresco seccionado a mão livre, material fixado seccionado a mão livre, material fixado e emblocado em parafina, material fixado e emblocado em metacrilato, material fixado e emblocado em epóxi).

Foram montadas lâminas com secções de diferentes órgãos vegetais de *Otachyrium seminudum* Sendulsky & Soderstrom, *Lychonophora ericoides* Mart. e *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase. O material foi seccionado em micrótomo de bancada marca Reichert-Jung Heidelberg (mod. 26896), clarificado e desidratado em série etanólica crescente de acordo com metodologias usuais em laboratórios de anatomia vegetal. Os materiais foram corados com safranina e verde firme e, em seguida, montados entre lâmina e lamínula nos diferentes meios de montagem.

As resinas histológicas utilizadas foram metacrilato, da marca Leica (Technovit-7100®) para as espécies *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. (folha) e *Gomphrena arborescens* L.f. (caule e raiz); e da marca Polysciences (JB4) para as espécies *O. seminudum* e *Adiantopsis radiata* Fèe (folha). A historresina do tipo epóxi de Spurr foi utilizada para a embebição da folha de *G. arborescens* (Souza *et al.* 1998).

Secções de materiais vegetais emblocados em parafina (*D. furfuracea*, *G. arborescens* e *L. erioides*) e em historresina, obtidas em micrótomo rotatório Leica RM-4125 ou no ultramicrótomo Leica Supernova, foram submetidas à coloração com safranina e verde firme (Johansen 1940) ou à coloração com azul de toluidina (Feder & O'Brien 1968), respectivamente, e montados entre lâmina e lamínula com os diferentes meios.

Os meios de montagem também foram testados para a visualização e conservação de folhas diafanizadas das espécies *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, *D. furfuracea*, *G. arborescens* e *Miconia albicans* (Sw.) Triana, pelo método modificado de Shobe & Lersten (1967) e montadas integralmente entre duas placas de vidro com espessura de 1-2 mm.

Duas lâminas histológicas montadas com verniz vitral incolor 500® foram submetidas a testes em diferentes temperaturas (-20 e 60 °C) pelo período de sete dias corridos, a fim de verificar a estabilidade do meio de montagem.

Para a determinação do melhor solvente a utilizar para cada meio de montagem em teste, fez-se a

dissolução das resinas em xileno e em acetato de butila, solventes usualmente utilizados em anatomia vegetal. O índice de refração do verniz vitral foi medido com o refratômetro Rayner no Laboratório de Gemologia do Instituto de Geociências da Universidade de Brasília.

O material montado ficou sob observação por 18 meses, para verificação de alterações eventuais nos tecidos, na coloração e na visibilidade dos detalhes. As lâminas foram conservadas em laminários de madeira, abrigadas da luz excessiva.

Resultados e discussão

A goma-laca, de ambas as marcas, é utilizada normalmente como impermeabilizante. Esse produto não é recomendável como meio de montagem, pois as secções montadas apresentaram-se borradas e pouco visíveis devido à opacidade do meio. Além disso, o próprio meio de montagem ficou impregnado pelos corantes utilizados, na coloração do material vegetal.

O verniz (das marcas Suvinil e Coral) é normalmente utilizado para dar brilho em superfícies diversas. Não é recomendado o uso do mesmo como meio de montagem, pois ambas as marcas deixaram o material vegetal amarelado e borrado, além da secagem ser mais lenta.

O uso do verniz cristal como meio de montagem gerou lâminas opacas e escurecidas com a passagem do tempo. O solvente indicado pelos fabricantes para o mesmo é a aguarrás. O verniz mostrou imiscível com o xileno e com o acetato de butila. Como alternativa, testou-se a retirada do solvente original do verniz sobre placa aquecedora (temperatura não superior a 70 °C) e redissolução da pasta resultante com xileno. Revelou-se um método ineficiente, tanto pela perda de tempo quanto pela toxicidade do processo de secagem, que é altíssima mesmo se realizada na capela de exaustão, sendo desaconselhado seu uso.

Entre todos os compostos testados, a resina sintética que se mostrou mais apropriada foi o verniz vitral incolor 500[®]. Apresentou alta transparência, conservação dos corantes e tecidos, resistência à submissão ao frio e ao calor (sem alterações perceptíveis) e dissolução, em temperatura ambiente, em xileno e acetato de butila. Indicado pelo fabricante como verniz de alta qualidade, o verniz vitral incolor 500[®] é uma resina acrílica alquídica estirenada, em solvente incolor e tem consistência suficientemente líquida.

A análise dos resultados obtidos na montagem de lâminas com secções a mão livre, de raiz *Echinolaena inflexa* (Fig. 1-2) e caule de *Lychonophora ericoides*

(Fig. 3) montados em verniz vitral incolor 500[®] mostrou nitidez do contorno dos materiais e transparência. Não foram percebidas variações nos matizes de vermelho e verde obtidos com a coloração com safranina e verde firme, realizada para ambos os materiais.

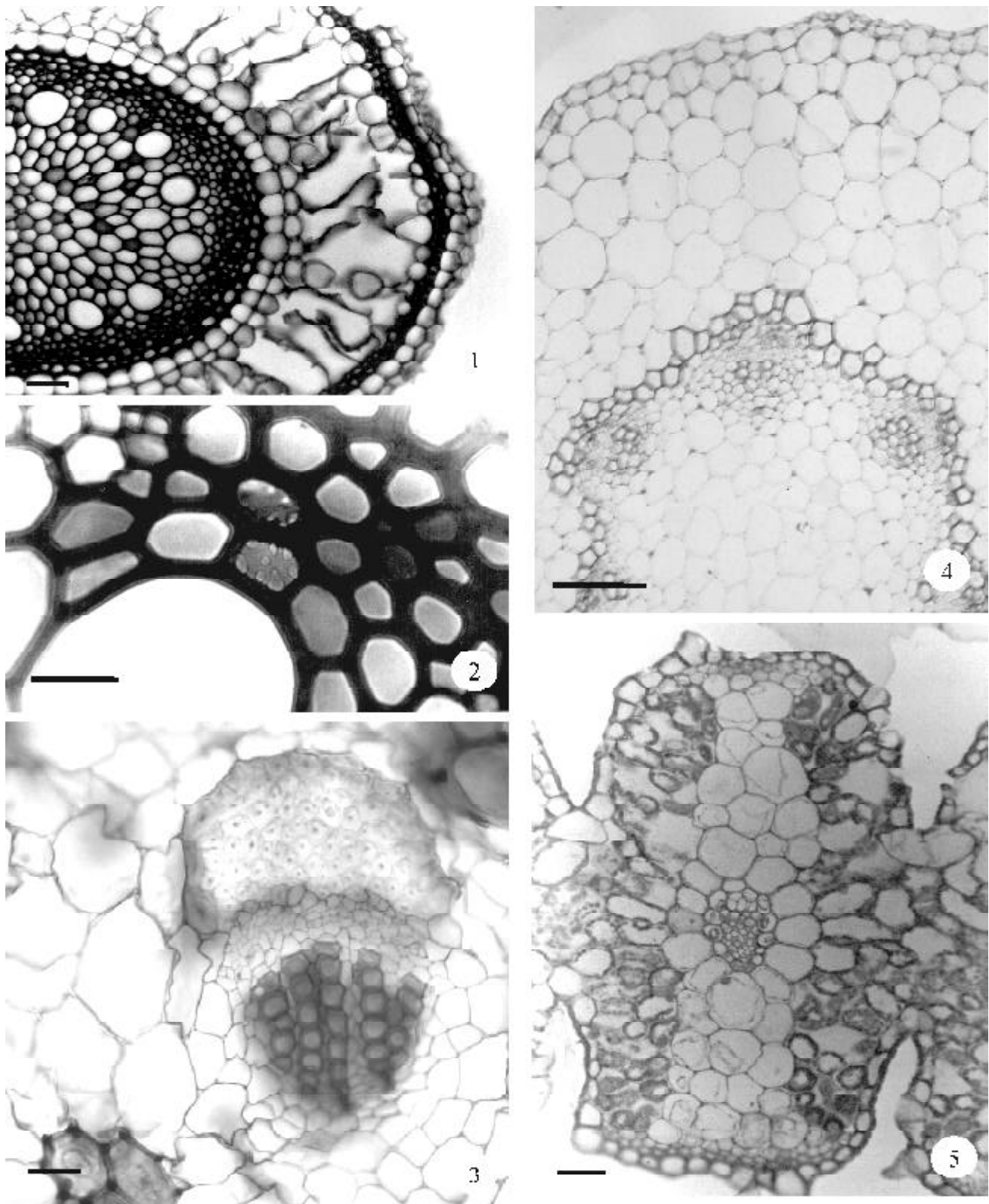
As espécies *Gomphrena arborescens* e *Otachyrium seminudum*, cujos órgãos foram emblocados em metacrilato, tiveram suas secções montadas em verniz vitral incolor 500[®] (Fig. 4-5) e em Entellan[®] (Fig. 6). Novamente, o contorno dos materiais se mostrou nítido em ambos os meios de montagem, com resultado similar de visualização. A coloração de todas as secções não apresentou variação em função do meio de montagem.

As folhas de *G. arborescens*, emblocadas em epóxi, foram coradas com azul de toluidina e montadas em verniz vitral incolor 500[®] (Fig. 7) e em Entellan[®] (Fig. 8). O material, seccionado em ultramicrótomo, apresenta grande nitidez no contorno e na preservação de organelas, com boa visualização, independentemente do meio de montagem utilizado.

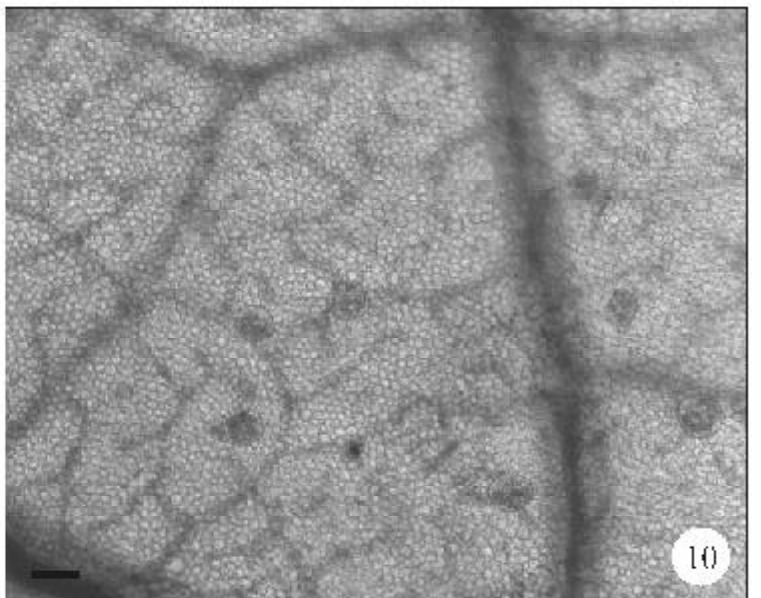
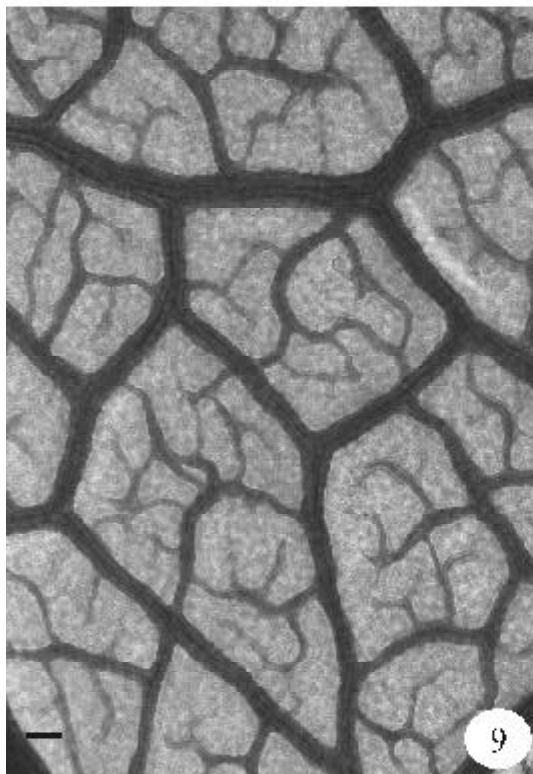
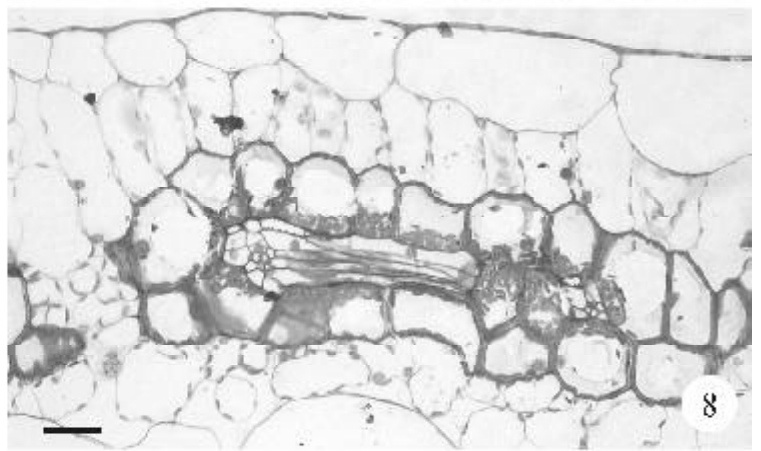
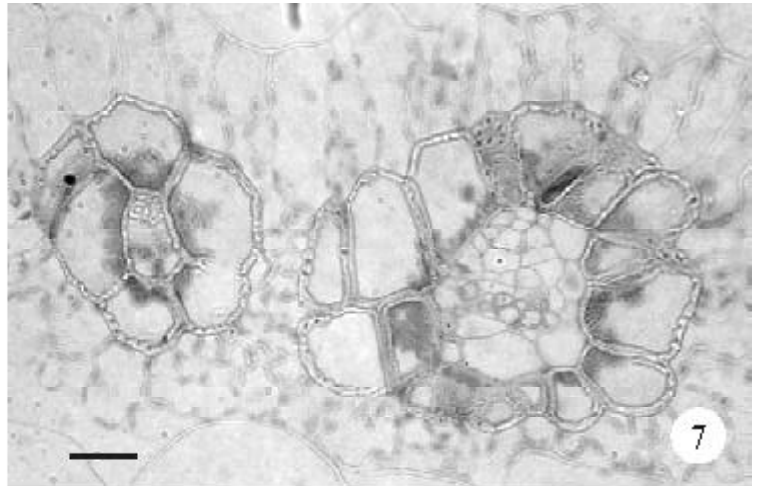
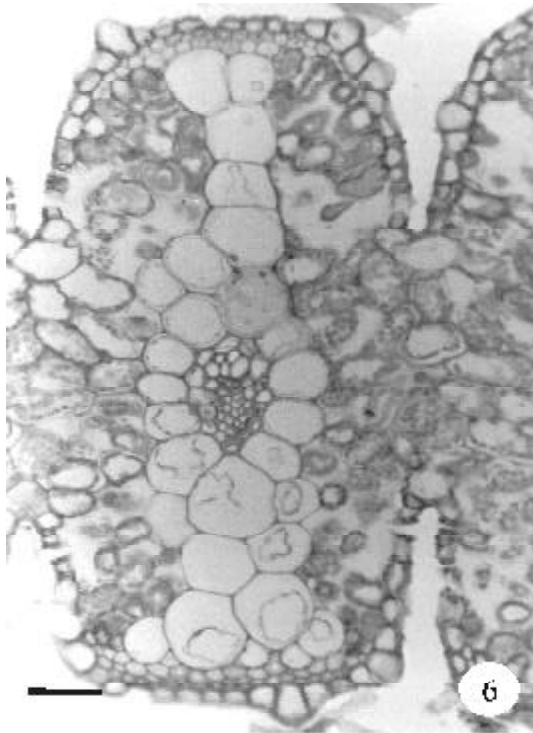
As folhas diafanizadas das espécies *Byrsonima coccolobifolia* (Fig. 9) e *Miconia albicans* (Fig. 10), montadas em verniz vitral incolor 500[®]; de *G. arborescens* (Fig. 11) e *M. albicans* (Fig. 12) montadas em Entellan[®], não mostraram diferenças no contorno e na coloração do sistema de ramificação das veias e vênulas. Nas folhas diafanizadas, a limitação da amplificação sob o microscópio, não esteve relacionada ao meio de montagem utilizado, mas à espessura das placas de vidro utilizadas para o acondicionamento dos materiais.

Secções do caule de *Lychonophora ericoides* e folhas de *Duguetia furfuracea* emblocadas em parafina, foram montadas em verniz vitral incolor 500[®] (Fig. 13-14) e em Entellan[®] (Fig. 15). Esses materiais apresentaram semelhanças quanto ao meio de montagem, confirmando que o verniz vitral incolor 500[®] permite uma alta transparência e conservação dos corantes e tecidos.

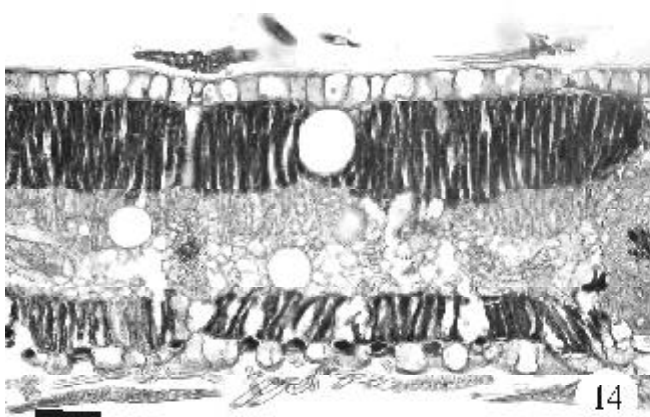
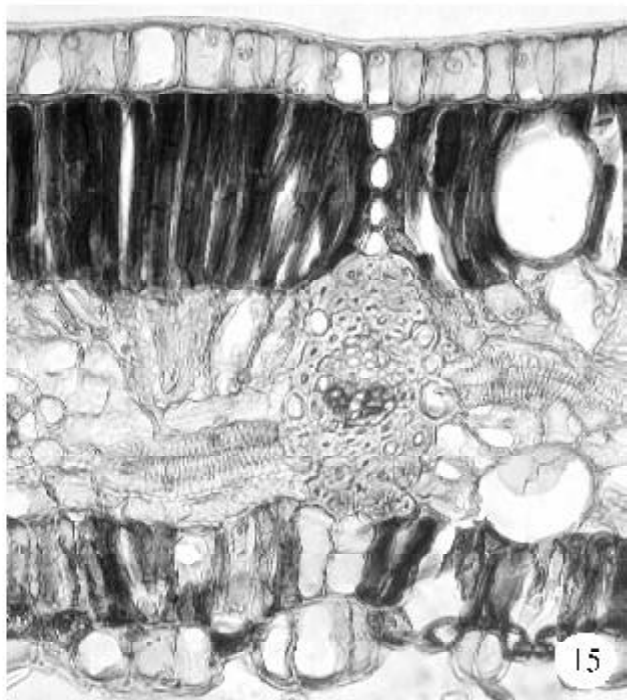
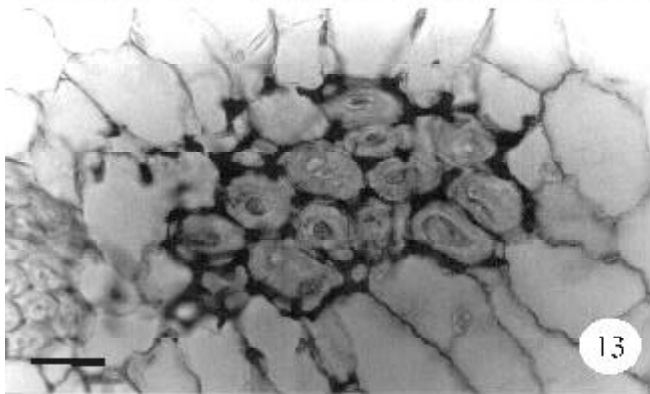
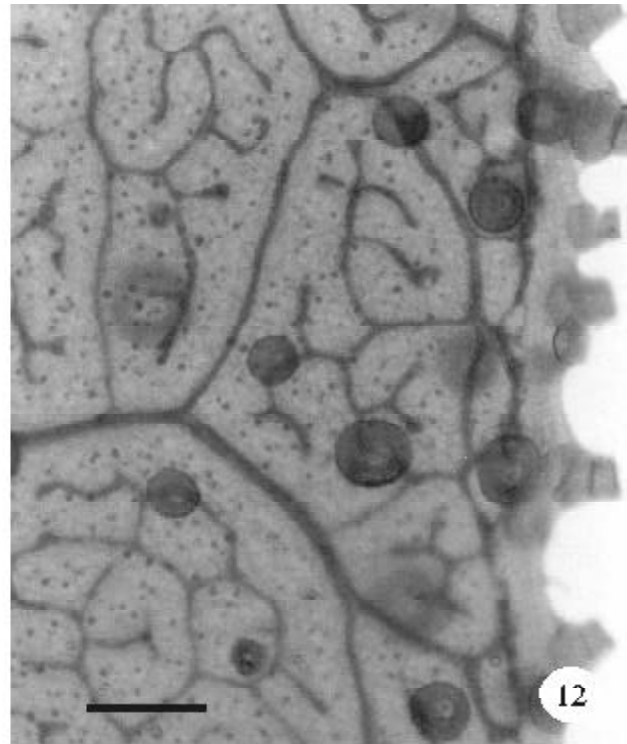
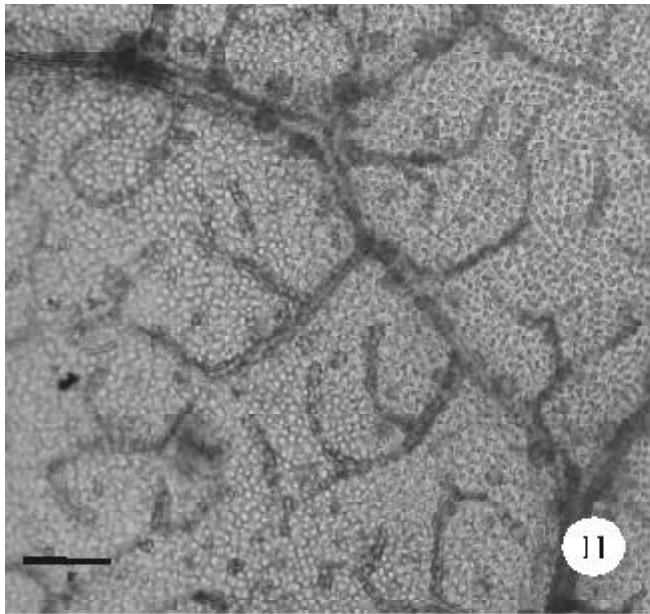
O verniz vitral incolor 500[®] foi utilizado em simples substituição aos meios de montagem usuais e permitiu a montagem de lâminas com secções de tecidos frescos e fixados, obtidos a mão livre ou em micrótomo rotatório, com manutenção das características do tecido e dos corantes. Para os cortes realizados a mão livre foi importante a desidratação em série etanólica crescente e a passagem em xileno ou acetato de butila puros, antes da montagem, pois a permanência de água nos tecidos torna os cortes opacos e favorece a formação de bolhas.



Figuras 1-5. Secções transversais. 1-2. Raiz de *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase, a mão livre, montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 60 µm e 25 µm). 3. Caule de *Lychnophora ericoides* Mart., a mão livre, montado em verniz vitral incolor 500® (barra = 100 µm). 4. Caule de *Gomphrena arborescens* L.f. embocado em metacrilato e montado em verniz vitral incolor 500® (barra = 200 µm). 5. Folha de *Otachyrium seminudum* Sendulsky & Soderstrom embocada em metacrilato e montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 50 µm).



Figuras 6-10. Folha - Secções transversais e diafanização. 6. *Otachyrium seminudum* Sendulsky & Soderstrom emblocada em metacrilato e montada em Entellan® (barra = 60 μ m). 7. *Gomphrena arborescens* L.f. emblocada em epóxi e montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 80 μ m). 8. *Gomphrena arborescens* emblocada em epóxi e montada em Entellan® (barra = 80 μ m). 9. Detalhe de folha diafanizada de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 200 μ m). 10. Detalhe de folha diafanizada de *Miconia albicans* (Sw.) Triana montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 200 μ m).



Figuras 11-15. Diafanização foliar e secções transversais. 11. Detalhe de folha diafanizada de *Miconia albicans* (Sw.) Triana montada em Entellan® (barra = 200 µm). 12. Detalhe de folha diafanizada de *Gomphrena arborescens* L.f. montada em Entellan® (barra = 200 µm). 13. Caule de *Lychnophora ericoides* Mart., emblocado em parafina e montado em verniz vitral incolor 500® (barra = 20 µm). 14. Folha de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook., emblocada em parafina e montada em verniz vitral incolor 500® (barra = 60 µm). 15. Folha de *Duguetia furfuracea*, emblocada em parafina e montada em Entellan® (barra = 100 µm).

Para facilitar a montagem, pode-se adicionar de 1 a 2 ml do solvente (xileno ou acetato de butila) a 37 ml do verniz e homogeneizar completamente, otimizando a manipulação do meio. Evitar a adição de grande quantidade de solvente, o que favoreceria a formação de bolhas de ar sobre os cortes histológicos durante o processo de secagem, podendo inviabilizar o uso das lâminas.

O tempo médio de secagem do verniz vitral foi de 24 horas. Nos bordos da lamínula, o meio encontra-se seco em cerca de uma hora. O tempo médio de secagem de grandes peças, como folhas diafanizadas, foi de 30 dias; nesse caso, não é recomendável a utilização de pesos ou presilhas.

Embora a montagem permanente de lâminas de material embocado em historresina e corado com azul de toluidina não seja recomendada por alguns especialistas, devido à perda da metacromasia e a impossibilidade de corar novamente as secções (S.M. Carmelo-Guerreiro, comunicação pessoal), as secções obtidas com esses materiais e montadas com verniz vitral também não sofreram alterações significativas em 18 meses.

A refração é um fenômeno óptico que ocorre quando a luz atravessa dois meios diferentes (por exemplo, água e ar, ar e vidro, vidro e água), causando uma alteração angular na sua trajetória. A velocidade máxima da luz ocorre no vácuo e no ar, onde o índice de refração é igual a um; em qualquer outro meio, o índice de refração é maior, atingindo 1,33 na água, 1,50 no vidro, 1,49 no acrílico e 1,90 na glicerina (Jensen 1962; Educar 2004).

O índice de refração do verniz vitral é de 1,49 - similar ao encontrado em outros meios de montagem usualmente utilizados, como Entellan® (1,49-1,50), Euparal® (1,48) e bálsamo-do-canadá (1,53). Se o índice de refração do verniz vitral fosse muito diferente ao desses meios de montagem, poderia haver alteração no poder de resolução dos microscópios ópticos utilizados (Sass 1958), o que não foi perceptível neste experimento. Segundo Jensen (1962), o meio de montagem deve ter o mesmo índice de refração do vidro (1,50) e não deve afetar a coloração do tecido em análise. Assim, baseando-se no índice de refração e análise dos resultados obtidos, o uso do verniz vitral pode ser recomendado como meio de montagem para lâminas de tecidos vegetais.

A análise geral evidenciou que o verniz vitral incolor 500®, entre os novos meios testados, foi o mais adequado nas condições do experimento, podendo ser utilizado em substituição das resinas usuais como meio

de montagem. Embora a validação desse meio de montagem como substituto definitivo dos meios sintéticos usuais possa ser confirmada somente após um período de tempo superior ao observado, o uso desse produto pode ser justificado pela manutenção da qualidade no curto a médio prazo, manutenção dos demais procedimentos operacionais envolvidos na confecção das lâminas, custo baixo e facilidade de aquisição.

Agradecimentos

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Vegetal e à Professora Dra. Márcia Abrahão Moura, do Instituto de Geociências, Laboratório de Gemologia, ambos da Universidade de Brasília.

Referências bibliográficas

- Acrilex. 2003. **Verniz Vitral**. Disponível em http://www.acrilex.com.br/pintura_decorativa/pintura_decorativa.html. Acesso em 15/10/2003.
- EDUCAR – Programa Educar CDCC – USP SC (2004). Refração. Disponível em <http://www.vestibular1.com.br/revisao/refracao.doc>. Acesso em 3/12/2004.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** **55**(1): 123-142.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochem** **16**: 92-96.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry - principles and practice**. USA, W.H. Freeman and Company.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. London, McGraw-Hill Book Company.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, EDUR.
- Luque, R.; Sousa, H.C. & Kraus, J.E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica** **10**(2): 199-211.
- Magistris, A.A.; Angyalossy-Alfonso, V. & Castro, M.A. 2000. Técnica histológica modificada para el estudio anatómico de cortezas. **Boletín Sociedad Argentina de Botánica** **35**(1-2): 85-90.
- O'Brien, T.P.; Kuo, J.; McCully, M.E. & Zee, S.Y. 1973. Coagulant and non-coagulant fixation of plant cells. **Australian Journal Biological Sciences** **26**: 123-150.
- Rupp, P. 1964. Polyglykol als Einbettungsmedium zum Schneiden botanischer Präparate. **Mikroskosmos** **53**: 123-128.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology** **48**(5): 247-249.
- Sass, J.E. 1958. **Botanical microtechnique**. 3 ed. The Iowa State University Press, Ames.

Shobe, W.R. & Lersten, N.R. 1967. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. **Botanical Gazette** **127**(2): 150-152.

Souza, W. (ed.) 1998. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise.