

USO DO ACETATO DE CELULOSE DILUÍDO EM ÁCIDO ACÉTICO. PARA TOMAR IMPRESSÕES DOS ESTOMAS FOLIARES (1). DIXIER M. MEDINA. O estudo dos estomas foliares, quanto ao número, forma e abertura ou fechamento, é, em geral, feito em epidermes retiradas das folhas com o auxílio de uma pinça, montadas em água sobre lâmina de vidro e recobertas com uma laminula (2).

Para as plantas em que é difícil retirar a epiderme, procede-se espalhando sobre a folha uma camada de colódio que, ao secar, produz uma fina película impressionada com os relevos da epiderme. O emprêgo do colódio para êsse fim é antigo e várias têm sido as fórmulas empregadas. Wenzl (3) obteve resultados satisfatórios com «Zelloidina» a 5% em álcool-éter em partes iguais. Long and Clements (4) depois de numerosas experiências chegaram à conclusão de que o colódio baseado tanto no nitrato de celulose como no acetato de celulose era o que melhor resultado proporcionava. A solução de nitrato de celulose é preparada geralmente com acetona ou com uma mistura de álcool etílico e éter sulfúrico (5, 6).

O acetato de celulose é solúvel na acetona. Como êste solvente é miscível com água em tôdas as proporções, o líquido se turva quando o tempo está úmido e a película se torna branca e opaca em vez de incolor e transparente. Usa-se, por isso, dissolver o acetato em uma mistura de álcool e clorofórmio, se bem que aquêle seja insolúvel em cada um dêstes, separadamente (5). O colódio assim obtido, porém, evapora muito rapidamente e a película se torna enrugada. A nitrocelulose é insolúvel nesta mistura e o fato serve para a distinguir do outro éster da celulose.

O acetato e o nitrato são encontrados no comércio como «celulói-de» em lâminas de várias espessuras. As lâminas de acetato são facilmente amolecidas com o ácido acético glacial; uma solução a 15% pode ser preparada com 1,2 g de acetato de celulose (mais ou menos 20 cm² da lâmina com 0,15 mm de espessura dissolvidas em 8 ml de ácido acético glacial). Essa solução dá um líquido viscoso, que pode ser usado para a obtenção de películas tão boas ou melhores que as solu-

- (1) Recebida para publicação em 6 de fevereiro de 1961.
- (2) FRANCO, C. DE MORAES. Relação entre número de estomas e número de cromossomos em *Coffea*. Campinas, Instituto Agronômico, 1939. 16 p. (Boletim n.º 66).
- (3) WENZL, HANS. Die Bestimmung des Spaltöffnungszustandes mittels Zelloidinaldrucken. *Chr. Bot.* 6(11): 250-251. 1941.
- (4) LONG, FRANCIS L. & CLEMENTS, FREDERIC E. The method of collodion films for stomata. *Amer. Jour. Bot.* 21:7-17. 1934.
- (5) HOFFMANN, HARRY E. & REID, E. W. Cellulose Acetate Lacquers. *Ind. Eng. Chemistry* 21. Easton, P. A. Mark Printing Company, 1929. 1.322 p.
- (6) ULLMANN, FRITZ. Enciclopédia de Quím. Industrial. Vol. XII. Sección VII. Tomo 1. Barcelona, Gustavo Gili, 1934. 828 p.

ções comuns de acetato ou nitrato. Outras concentrações também deram bom resultado, tendo as películas fornecido impressão nítida dos estomas. Usando-se soluções mais concentradas, a película demora mais a secar. As pouco concentradas, de seca rápida, formam, porém, uma película muito fina, de mais difícil manuseio.

As primeiras películas foram preparadas com nitrato de celulose, usando-se o produto comercial «Parlodion» (Mallinckrodt), cujas fitas eram dissolvidas numa mistura de álcool e éter sulfúrico em partes iguais. Tratava-se da contagem de estomas em *Cinchona*. As películas assim preparadas mostravam-se irregulares em espessura, enrugadas, e mesmo quando montadas em água havia dificuldades de focalização, no exame ao microscópio, limitando a observação a campos muito pequenos. O «Parlodion» foi em seguida substituído pelo acetato de celulose dissolvido em ácido acético na proporção já indicada. É dessa forma que este último vem sendo usado, com sucesso, no laboratório de Citologia, para a obtenção de impressões das epidermes foliares. Algumas gotas de acetato espalhadas sobre a superfície da folha levam de uma a duas horas para secar, o que poderia ser apontado como uma desvantagem em comparação com o preparo de películas com solventes muito voláteis. Essa desvantagem, porém, é largamente compensada pela boa qualidade da película que se obtém. Não sendo quebradiça, ela pode ter vários centímetros de extensão; não apresenta as rugosidades comuns das películas que secam rapidamente; a montagem em água é feita quase sem formação de bôlhas; finalmente o exame ao microscópio é extremamente facilitado, porque toda a superfície a examinar se coloca sobre um mesmo nível, não requerendo grandes ajustes na focalização.

O processo foi aplicado com sucesso no exame dos estomas em *Coffea*, *Triticum*, *Sécale*, *Cinchona*, *Manihot*, *Hevea* e outras espécies.

Convém frisar que, nas espécies em que a epiderme é revestida de pêlos, o método de extração sucessiva de duas películas dá bom resultado: enquanto a primeira película arranca os pêlos, a segunda traz somente a impressão da epiderme, sem o inconveniente dos pêlos (*). Há, no entanto, espécies em que a penugem da epiderme se apresenta tão espessa que o método não surte efeito: é o caso de *Vitis* e *Citrullus*, em que não foi possível examinar os estomas nas películas obtidas seja com nitrato ou acetato dissolvidos em seus solventes comuns ou diluído pelo ácido acético.

Mesmo nos casos em que é possível retirar a própria epiderme da

fôlha, o método do acetato apresenta a vantagem de possibilitar a obtenção de impressões dos estomas sempre da mesma região desejada, com a maior facilidade. Além disso, quando se trata de contar estomas em grande número de plantas, as películas podem ser obtidas tôdas de uma vez, e conservadas por tempo indeterminado para se fazerem as contagens na ocasião mais conveniente. O acetato de celulose pode ainda ter uma segunda aplicação, qual seja a de servir como meio de montagem e conservação da própria epiderme em lâminas semipermanentes.

SEÇÃO DE CITOLOGIA, INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

THE USE OF CELLULOSE ACETATE DISSOLVED IN ACETIC ACID
TO TAKE STOMATA IMPRESSIONS

SUMMARY

Various substances were tried for obtaining stomata impressions from leaves. The best results were obtained with cellulose acetate dissolved in acetic acid.

The solution was prepared by dissolving 1.2 gm (about 20 cm² of a 0.15 mm thick commercial sheet) of cellulose acetate in 8 ml of glacial acetic acid. The viscous fluid thus obtained was applied to the leaf surface and after drying produced a thin film that showed the stomata impressions. These films can be stored indefinitely and be mounted in water for microscopical examination.

This method has been used with excellent results for counting stomata of *Coffea*, *Triticum*, *Secale*, *Cinchona*, *Manihot*, *Hevea*, and other species.