

RADIOAUTOGRAFIA DE TECIDOS

HENRIQUE BERGAMIN FILHO

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de S. Paulo - Piracicaba

INTRODUÇÃO

A radioautografia é um método de localização e avaliação de material radioativo em tecidos e órgãos vegetais e animais, que faz uso da propriedade que as partículas alfa, beta e radiações gama, têm de impressionar as chapas fotográficas. Grande parte dos autores, (ARONOFF, 1956; DUGGER, 1957; FRANCIS e outros, 1954), que tratam desse assunto, discutem a radioautografia sob dois tipos: radioautografia de órgãos ou organismos inteiros, ou radioautografia geral, e radioautografia de cortes histológicos ou detalhada. A radioautografia geral é o resultado obtido quando o organismo ou órgão inteiro que contém o radioisótopo, é pôsto em contacto, durante certo tempo, com uma emulsão fotográfica, que é posteriormente revelada. Nesse caso, a imagem obtida mostra a distribuição do isótopo no órgão estudado. A radioautografia histológica é obtida quando a peça que contém o isótopo (corte de 1 a 50 μ) é posta em contacto íntimo com a emulsão fotográfica. Nesse último caso, a correlação entre os grãos revelados da emulsão e os tecidos do corte é feita pelo exame ao microscópio.

TEORIA DA FORMAÇÃO DA IMAGEM

Os princípios físicos, que permitem a obtenção da radioautografia, são os mesmos que regem a formação da imagem pela luz nas emulsões fotográficas. Estas são constituídas, principalmente, por uma dispersão de cristais muito pequenos, de AgBr, em gelatina. Esses cristais apresentam várias imperfeições, que são explicadas (MEES, 1954): a) pelas fortíssimas tensões mecânicas que o cristal sofre por parte da gelatina; b)

pela presença de AgI, que é adicionado ao AgBr e que cristaliza simultaneamente com êste.

Essas irregularidades na rede cristalina do AgBr deformam certas malhas, pondo "em falso" alguns íons de prata e favorecem o movimento de íons dentro do cristal.

Além disso, na interfase gelatina-cristal aparecem alguns pontos sensíveis constituídos por átomos livres de prata e Ag₂S, provenientes da decomposição parcial da superfície do cristal, pelos constituintes da gelatina (MEES, 1954).

Quando a emulsão é exposta à luz, ou a uma fonte de outra energia qualquer, capaz de produzir pares de íons, essa energia pode alcançar um cristal de AgBr e atuar sôbre o íon Br⁻, segundo a equação:



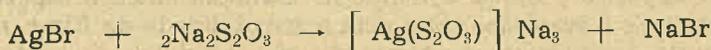
O eletrônio libertado salta do nível N do bromo para o nível O da prata. Mas, no conjunto de íons de prata do cristal, os numerosos níveis O, vazios, formam uma zona onde os elétrons podem circular livremente, até encontrar um nível de energia ligeiramente inferior, constituído pelos "centros de sensibilidade" (Ag + Ag₂S). Forma-se aí, pela chegada de novos elétrons, um campo elétrico negativo. Alguns íons Ag, por se encontrarem mal colocados na rede do cristal movimentam-se com maior facilidade e são atraídos pelo campo elétrico negativo. Ali chegando, descarregam-se e imobilizam-se. Como os íons Ag têm velocidade menor que a dos elétrons, êles não chegam a tempo de neutralizar o campo elétrico negativo formado pela chegada dos primeiros elétrons, o que impede a chegada de novos elétrons, freando a formação da imagem. Assim se forma a imagem latente, com estrutura descontínua, constituída por pontos microscópicos, disseminados pelo cristal e formados por grupos de átomos de prata (DUGGER, 1957; MEES, 1954).

TEORIA DA REVELAÇÃO

Todo o processo fotográfico depende agora de fazer visíveis os cristais de prata AgBr que receberam luz ou outra radiação. Nisto consiste a revelação. Existem dois métodos básicos (MEES, 1954), por meio dos quais se obtém a revelação dos grãos de AgBr: o primeiro, que é o mais usual, é o método químico: a emulsão é mergulhada em uma solução que contém um redutor e êste reduz os íons Ag⁺ a Ag. Neste caso,

todos os cristais de AgBr serão reduzidos com o tempo. Porém, nas regiões onde existe a imagem latente, a reação é extremamente mais rápida, devido à ação catalítica da prata. Consegue-se, assim, limitando-se o tempo de ação do revelador, uma imagem de prata somente nos locais atingidos pela energia radiante ou pelas partículas alfa e beta durante a exposição.

Restam ainda na emulsão os cristais onde o AgBr não foi reduzido; estes podem ser eliminados por meio de uma substância que forme complexos solúveis. Por exemplo, o Na₂S₂O₃ é muito usado, pois os produtos da reação



são facilmente solúveis na água.

O outro é o método físico. O AgBr da emulsão é inicialmente dissolvido com o Na₂S₂O₃, ficando os grãos microscópicos de Ag, que formavam a imagem latente.

Depois de lavada, a emulsão é tratada por uma solução de um redutor (da mesma natureza do usado no método anterior) que contém ainda um sal solúvel de prata, como fonte de íons Ag⁺.

Os íons Ag⁺ serão reduzidos a prata metálica, somente sobre os grãos da imagem latente, formando a imagem visível. Este método admite muitas variantes e seus resultados dependem de muitos fatores, às vezes difíceis de controlar.

EMULSÕES EMPREGADAS EM RADIOAUTOGRAFIA

Na obtenção de radioautografia, podem ser usados vários tipos de emulsão. A escolha depende do tipo de radiação, do tipo de radioautografia e do material a ser radioautografado. Para a radioautografia geral, usa-se mais frequentemente o filme para raios X do tipo "nonscreen". Esse filme é muito sensível às radiações, porém, a definição é pequena e o velado de fundo é grande. Quando se deseja maior definição, poderão ser usados os filmes diapositivos modernos, que são muito menos sensíveis, porém de ótima definição.

As emulsões chamadas nucleares são as mais usadas para a radioautografia histológica (FRANCIS & outros, 1954; KAMEN, 1951; MEES, 1954). Essas são emulsões especiais, com alta concentração de AgBr (80% do peso da emulsão é constituído por AgBr, enquanto que nas emulsões óticas só 40% do peso constitui AgBr), grãos extremamente finos e regulares,

maior espessura da emulsão (10 mu para as emulsões óticas, de 25 a 600 mu para as nucleares).

Podem ser encontradas no comércio emulsões desse tipo como as emulsões NT da Kodak (NTA, NTB, NTB2, NTB3 etc.) e G da Ilford. Algumas dessas, assim como as emulsões dispositivas, podem ser obtidas na forma "striping", e a maioria delas pode ser obtida na forma de gel.

EXPOSIÇÃO

A exposição, isto é, o tempo de contacto entre o espécime radioativo e a emulsão, varia com a sensibilidade do filme, com a energia das partículas emitidas, com a atividade do material (ARONOFF, 1956; KAMEN, 1951; WAINWRIGHT & outros, 1954), etc. Com tantos fatores a serem considerados, torna-se difícil estabelecer uma regra para o cálculo da exposição.

A sensibilidade ótica das emulsões é determinada, principalmente, pelo número de "centros de sensibilidade" e pelo tamanho dos grãos. Outros fatores fazem variar a sensibilidade da emulsão, tais como: riqueza em AgBr e espessura da emulsão.

Quanto maior o grão, menor será o poder resolutivo (FRANCIS & outros, 1954; MEES, 1954) ou definição da radiografia e quanto mais espessa a emulsão, mais difícil se torna a revelação da mesma. O problema do grão não é muito grande quando se trata de radioautografia geral, porém, quando se pretende radioautografar cortes histológicos, emulsões de grão fino devem ser usadas para aumentar a definição. A espessura de emulsão pode ir até 600 mu (certas emulsões nucleares), desde que se adotem métodos especiais de revelação. Esse problema foi resolvido nas emulsões para raio X, cobrindo-se ambas as faces do suporte transparente com emulsão. Desta maneira, o filme fica com espessura dupla para as partículas que o atravessam, mas apresenta ao revelador 2 camadas de espessura simples. Certos filmes para raios X apresentam ainda sobre a camada da emulsão ou dispersa na emulsão, uma capa fluorescente do tungstato de cálcio. Isso multiplica 30 a 40 vezes a sensibilidade da emulsão, porém, diminui de tal forma a definição, que não devem ser empregados em radioautografia filmes desse tipo. São preferíveis os filmes "non screen".

A atividade do material a ser radiografado deve ser tal que permita uma boa imagem no menor tempo possível de exposição, e não tão grande que possa vir a ser danosa para o tecido. Alguns autores (ARONOFF, 1956; DUGGER, 1957; FRANCIS

& outros, 1954; KAMEN, 1951; SCHWEITZER & WHITNEY, 1949; WAINWRIGHT & outros 1954), estabeleceram que são necessários 10^6 a 10^8 emissões B por cm^2 para produzir uma imagem no filme "nonscreen". Suponhamos que seja um nível seguro de radiação, aquêle de um tecido qualquer (1 fôlha de cafeeiro de 30 cm^2 por exemplo), que possua 10^{-4} de radiosfósforo por cm^2 . Essa fôlha apresentará 13×10^6 desintegrações por hora. Como para a radioautografia só interessam as partículas B que tomem a direção do filme e introduzindo ainda um fatôr para a absorção do tecido, teremos uma eficiência de aproximadamente 10%. Pôsto isso, teremos 13×10^5 elétrons que alcançam 1 cm^2 de filme por hora. Para atingir aquêle número estabelecido de elétrons, serão necessárias, aproximadamente 10 horas de exposição ($13 \times 10^5 = 1,3 \times 10^7$). Porém, a determinação da quantidade absoluta de radioisótopos presente na fôlha, exige uma análise química que pode ser dispensada. E' bastante determinar a atividade do exemplar com um contador Geiger. Suponhamos uma fôlha que apresente uma atividade de 30.000 contagens por minuto com um contador, cuja janela meça 2 cm^2 e cuja geometria apresente uma eficiência de 10%. Serão, desta maneira, 1500 eletrônios por cm^2 a atingir o filme por minuto. Para alcançar a cifra de 10^7 eletrônios, serão necessários então 5 dias de exposição.

Pelo exposto, nota-se que os cálculos são aproximados, permitindo uma estimativa mais ou menos grosseira do tempo de exposição. Por essa razão, aconselha-se que ao preparar um radioautógrafo, façam-se várias montagens, com cortes do mesmo tecido (radioautografia histológica) ou com diversos pedaços do mesmo órgão, ou diversas fôlhas da mesma planta, se for o caso. Calculado o tempo da exposição, pelo método anteriormente descrito, os radioautógrafos irão sendo revelados a intervalos, antes e depois do tempo de exposição calculado (DUGGER, 1957).

TÉCNICAS RADIOAUTOGRÁFICAS

Quando se trata de radioautografia geral, a técnica não apresenta maiores dificuldades: o tecido é mantido apertado sobre a emulsão fotográfica da qual é separado por uma fôlha muito fina de alumínio, ou um filme plástico (COMAR, 1955). Essa separação é feita para evitar injúrias químicas na emulsão, por parte das substâncias que o tecido pode possuir (KAMEN, 1951). Quando a energia das partículas B é tão pequena que não possa atravessar mesmo um filme fino de plástico

(C14, por exemplo), a separação pode ser omitida, desde que se faça um ensaio em branco, isto é, que se faça uma radioautografia de um tecido semelhante, sem radioisótopos, para poder-se avaliar o velado produzido pelos produtos químicos do tecido.

Quando se trata de tecido vegetal (fôlha, etc.), êste pode ser preparado antes da exposição, como espécime de herbário, depois comprimido sôbre a emulsão sem separação nenhuma. Isso, porém, não evita que haja translocação do radioisótopo depois de colhido o material. Essa translocação pode ser evitada, secando-se o material entre fôlhas de papel absorvente, a baixa temperatura. A exposição, nesse caso, também se faz a baixa temperatura (entre 2° e 10° C).

Depois de exposto, o filme é revelado, e depois de sêco poderá ser comparado com o material original, ou com uma fotografia do mesmo, previamente tirada.

No caso da radioautografia histológica, a dificuldade é maior, pois o alinhamento perfeito entre a emulsão e o corte histológico deve ser mantido desde a exposição até depois da chapa revelada, para que se possa fazer a correlação perfeita entre a imagem radiográfica e as partes correspondentes do corte. Várias técnicas têm sido propostas; dentre elas, as mais usadas são :

a) — Método de LACASSAGNE & HAMILTON (FRANCIS & outros, 1954).

O corte é montado sôbre a emulsão em uma chapa de vidro, para a exposição. Para revelar a emulsão, esta é separada do corte, que é então colorido da maneira conveniente. Depois de sêca a chapa e pronto o corte, são examinados lado a lado, no microscópio. É uma técnica das mais simples, porém não é de muita precisão.

b) — Método de EVANS (ARONOFF, 1956; DUGGER, 1957; FRANCIS & outros, 1954).

Os cortes montados em parafina são feitos flutuar em água e daí colhidos pela chapa fotográfica. Depois de sêca, a montagem é deixada em repouso pelo tempo necessário à exposição, e depois revelada. Logo o corte é desparafinado e colorido, sem ser removido de sôbre a emulsão.

c) — Método da emulsão líquida (ARONOFF, 1956; DUGGER, 1957; FRANCIS & outros, 1954; KAMEN, 1951).

O corte é preparado de maneira normal e montado em uma lâmina de vidro, e logo coberto com um filme muito fino

de colódio. Sobre o colódio é espalhada a emulsão líquida. Esta pode ser conseguida por aquecimento a pouco menos de 40°C (38-39°C). A exposição e revelação da emulsão são executadas da maneira usual.

d) — Método do "stripping film" (ARONOFF, 1956; DUGGER, 1957; FRANCIS & outros, 1954; KAMEN, 1951).

Certos filmes podem ser conseguidos na forma do "stripping film", isto é, com a emulsão destacável da base. A emulsão destacada é aplicada, unida sobre o corte já preparado, montado em lâmina de vidro. Depois da exposição, a emulsão é revelada de maneira usual.

REVELAÇÃO

Uma das operações que merece o maior cuidado do pesquisador, é a revelação dos radioautogramas. E' nesta fase que pode aparecer a maioria dos defeitos da radioautografia.

Quando se trata da radioautografia geral, o interesse está em que apareça o maior contraste possível entre as áreas que receberam radiação e as áreas virgens. Não tem grande importância o velado de fundo, nem a grandeza dos grãos. Usa-se então, nesse caso, um revelador rápido de contraste elevado. Existem várias receitas, aconselhadas pelas diversas fábricas dos filmes. A mais usada é a conhecida por D-11 da Kodak. E' um revelador rápido, dá negativos contrastados.

No caso de radioautografia detalhada, o que importa mais é a definição. Esta depende principalmente do tamanho dos grãos revelados. Quanto mais fino o grão, maior a definição. Deve-se evitar também o véu de fundo. Aqui é interessante usar uma receita baseada na parafenilenodiamina, que dá os reveladores que produzem o grão mais fino possível e com menor velado de fundo. São muito conhecidas as receitas Sease que usam p-fenilenodiamina-glicina.

RECEITAS

| | Sease n. 4 | D II |
|---------------------------|------------|---------|
| Metol (Elon, Rodol, etc.) | — | 1 g |
| Sulfato de sódio anidro | 90 g | 75 g |
| Parafenilenodiamina | 10 g | — |
| Hidroquinona | — | 9 g |
| Glicina | 12 g | — |
| Carbonato de sódio anidro | — | 25 g |
| Brometo de potássio | — | 5 g |
| Água até | 1000 ml | 1000 ml |

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES SÔBRE A REVELAÇÃO

a) Todos os banhos devem ter a mesma temperatura, e esta não deve ser maior que 25°C; b) todos os banhos devem ser filtrados antes do uso; c) durante a revelação, a única luz permitida é a recomendada pelo fabricante do filme. Para os filmes de Raios X, pode ser usada qualquer lâmpada vermelha de segurança; d) os banhos devem ser agitados durante o processo. No caso de radioautografia histológica, deve-se tomar cuidado para evitar que o corte seja desligado da emulsão.

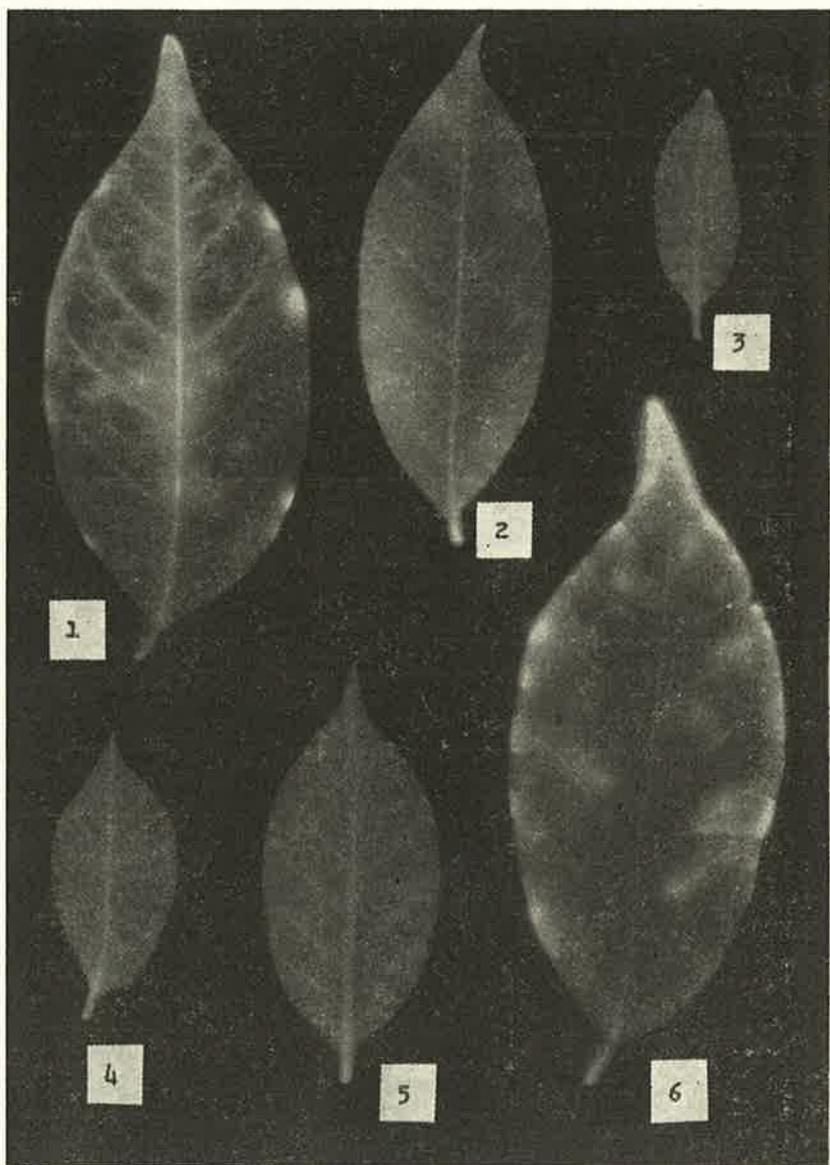
APLICAÇÕES DA RADIOAUTOGRAFIA EM FISIOLOGIA VEGETAL

A radioautografia tem sido de grande utilidade nos estudos relativos à absorção de diversos elementos pelos vegetais, sua acumulação e translocação nos diversos órgãos. Assim tem sido usada a radioautografia geral para estudar: a absorção de P32 pelo tomateiro em solução nutritiva e sua acumulação em folhas e frutos jovens (DUGGER, 1957; KAMEN, 1951; MALAVOLTA & CARLTON, 1953). Absorção pelas folhas e translocação do P32, em tomateiro (MALAVOLTA & CARLTON, 1953). Influência do método de aplicação de superfosfato na absorção de P32 pelo cafeeiro (*) (sobre esse experimento são dados detalhes adiante). Influência do Al na absorção e translocação de P32 em cevada (DUGGER, 1957), demonstrando que o Al inibe a translocação do P32, fazendo-o acumular-se nas raízes. Absorção e distribuição de S35 pela raiz de trigo (DUGGER, 1957). Absorção e translocação de S35 em feijão, beterraba e tomate (DUGGER, 1957). Comparação da disponibilidade de Ca45 aplicado em diversas formas, em tomate, alfafa, etc. (DUGGER, 1957). Absorção e distribuição de Zn65 em tomates (MALAVOLTA & CARLTON, 1953). Comparação entre a distribuição de Fe, EDTA e Fe 55 SO4, etc. (DUGGER, 1957). Além dessas, muitas outras aplicações têm sido feitas com a radioautografia detalhada, tanto para o estudo de microorganismos, como para estudos citológicos.

As figuras de ns. 1 a 6 referem-se ao trabalho que estudou a influência do método de aplicação de superfosfato na absorção de P32 pelo cafeeiro.

Foram aplicados em cafeeiros de 18 meses de idade, Bourbon amarelo, 150 g por cova de superfosfato marcado como P32, da seguinte maneira :

(*) — Trabalho ainda não publicado.



RADIOAUTOGRAFIAS DE FÓLHAS DE CAFÉ PULVERIZADO COM SUPERFOSFATO MARCADO COM P32: 1 e 6 — fôlhas que receberam a pulverização; 2, 3, 4 e 5 — fôlhas nascidas após a pulverização, demonstrando a translocação do P32 das fôlhas mais velhas para as mais novas

a) em coroa; b) em meia coroa; c) superficial; d) pulverização.

Algum tempo depois foram feitos radioautógrafos das folhas que receberam aplicação direta do superfosfato dos cafeeiros pulverizados e de folhas que nasceram depois da aplicação.

Tendo os radioautógrafos mostrado grande absorção, foram feitas contagens e análises. Os resultados obtidos foram os seguintes :

| Tratamento | Absorção |
|------------|----------|
| 2 | 1,7% |
| 1 | 2,5% |
| 3 | 10,0% |
| 4 | 40,0% |

(Estas porcentagens referem-se a fósforo marcado: fósforo total nas folhas).

LITERATURA CITADA

- ARONOFF, SAM, 1956 — *Techniques of radiobiochemistry*, The Iowa State College Press, Ames, 228 pp.
- COMAR, C. L., 1955 — *Radioisotopes in Biology and Agriculture*, Mc Graw Hill, New York.
- DUGGER JR., W. M., 1957 — Autoradiography with plant tissue. *Bot. Rev.* 6: 351-387.
- FRANCIS, G. F., W. MULLIGAN, & A. WORMALL, 1954 — *Isotopic tracers*, The Athlone Press, London, 306 pp.
- KAMEN, MARTIN, 1951 — *Radioactive tracers in Biology*, 2nd Ed., Academic Press Inc., New York, 429 pp.
- MALAVOLTA, E. & A. B. CARLTON, 1953 — Nota preliminar sobre a distribuição do radiozinco no tomateiro. *An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz"* 10: 121-126.
- MEES, G. E. KENNETH, 1954 — *The theory of the photographic process* The Macmillan Co., New York, 1133 pp.
- SCHWEITZER, GEO. K., & I. B. WHITNEY, 1949 — *Radioactive tracer techniques*, D. Van Nostrand Co. Inc., New York, 241 pp.
- WAINWRIGHT, WILLIAM W., E. C. ANDERSON, P. C. HAMMER, & C. A. LEHAMN, 1954 — Simplified autoradiography exposure calculation. *Nucleonics* 12: 19-21.

BRASIL-OESTE

Revista mensal — Seções especializadas de

- AGRICULTURA
- PECUÁRIA
 - AVICULTURA
 - ECONOMIA
 - ATUALIDADES

Em tôdas as edições documentários sôbre o
Estado de Mato Grosso e a Amazônia

ASSINATURA ANUAL CR\$ 140,00

Pedidos a *Brasil-Oeste Editôra Ltda.*

Praça da República, 386 -- 3.º - Cj. 33-A -- S. Paulo -- S. P.
Representante no Rio de Janeiro (DF):

Dr. Edson Nogueira Paim

R. 13 de Maio, 13 — Conj. 1804, sala 10 — Tel. 42-9219

A ADUBAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Pelos Engenheiros-Agrônomos

Frederico Pimentel Gomes e Eno de Miranda Cardoso

Um livro completo e moderno sôbre a adubação da cana
Capítulos principais: 1. A Cana-de-Açúcar no Brasil e
no Mundo. 2. Os Adubos mais Importantes. 3. Cálculos
de Adubação. 4. Princípios Básicos de Adubação. 5. Ne-
cessidades Mineraias da Cana-de-Açúcar. 6. Sintomas Vi-
suais de Carência Mineral em Cana-de-Açúcar. 7. A Adu-
bação Mineral da Cana. 8. A Adubação Orgânica da Ca-
na. 9. A Adubação Verde da Cana. 10. A Adubação com
Vinhaça. 11. Resultados Experimentais Típicos. 12. A
Influência dos Adubos Sôbre a Composição da Cana. 13.
Modo e Época de Aplicação dos Adubos.

PREÇO: Cr\$ 120,00

Pedidos a: *Frederico Pimentel Gomes* — Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba, S. P.
ou à: *Editôra Agronômica "Ceres" Ltda.* — R. Barão
de Paranapiacaba, 93, 2.º andar — Sala 27 — Caixa
Postal 3.917 — S. Paulo, S. P.