

Método combinado de observação em microscopia óptica e electrónica de varrimento para estudo de palinomorfos

Combined LM-SEM method for palynomorphs study

M. VIEIRA^{*(a)}; R. ZETTER^{***(c)}; L. CASTRO^{****(d)}; J. PAIS^{****(e)} & D. PEREIRA^{*(b)}

Palavras-chave: Palinologia, palinomorfos, observação combinada, microscópio óptico, microscópio electrónico de varrimento.

Resumo: Apresenta-se método combinado de observação que permite o estudo do mesmo palinomorfo recorrendo aos microscópios óptico e electrónico de varrimento.

Muitas vezes, a simples observação dos palinomorfos ao microscópio óptico e/ou electrónico não são suficientes para identificar e caracterizar as diferentes formas.

A correcta identificação e classificação são essenciais para a obtenção de resultados sistemáticos mais seguros, o que pode ser facilitado através da observação do mesmo palinomorfo recorrendo aos dois tipos de microscopia. Este método, inédito em Portugal, permite visualizar todos os detalhes morfológicos dos palinomorfos e contribui para aumentar o número de táxones identificados.

O estudo de palinomorfos é importante para a caracterização de paleoambientes, paleoclimas e biostratigrafia.

Keywords: Palynology, palynomorphs, combined assertion, optical microscope, scanning electron microscope.

Abstract: A combined Light Microscope and Scanning Electronic Microscope (LM-SEM) technique for observation and study of the same palynomorph is presented.

Usually, the simple observation of the palynomorphs at LM or SEM, currently, is not enough for the positive identification of the different species.

The correct identification of the different forms allows obtaining better systematic characterization of the palynomorphs through the observation of the same specimen at LM and SEM. This method, new in Portugal, allows observe all the palynomorph morphologic details and contribute to increase the number of identified taxa.

The study of palynomorphs is important for the characterization of palaeoenvironments, palaeoclimates and biostratigraphy.

1. INTRODUÇÃO

Em estudos de palinologia, às vezes, é difícil caracterizar sistematicamente os palinomorfos por estes não apresentarem características morfológicas suficientemente distintas e/ou não se encontrarem na melhor posição para serem identificados. Quando se efectua um estudo estatístico normalmente ficam por identificar

alguns espécimes que poderiam vir a ser utilizados como indicadores biostratigráficos, ecológicos ou climáticos.

Ao realizar a caracterização do conteúdo palinológico num sedimento, é necessário identificar com o máximo rigor o maior número possível de formas de pólenes e de esporos de modo a obter reconstituições o mais fiáveis possíveis. A maioria dos dinoflagelados são frágeis, muitas vezes encontrando-se dobrados e/ou partidos

* CGUP/Núcleo Ciências da Terra/Univ. Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal;

** Department of Palaeontology/Univ. Vienna, Geocentre, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria;

*** Centro de Investigação em Ciências e Engenharia Geológica, Faculdade de Ciências e Tecnologia/Univ. Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica Portugal;

(a) manuelvieira@dct.uminho.pt; (b) insuad@dct.uminho.pt

(c) reinhard.zetter@univie.ac.at

(d) lscastro@fct.unl.pt; (e) jjp@fct.unl.pt.

tornando impossível a classificação taxonômica o que os leva a ser considerados indeterminados.

A maioria dos palinomorfos é observada e reconhecida recorrendo ao Microscópio Óptico (MO). O recurso a Microscópio Electrónico de Varrimento (MEV) tem custos elevados e só é utilizado esporadicamente. Na generalidade das situações, o reconhecimento das diferentes formas e a correspondência das imagens obtidas em MO e MEV é feita por simples comparação morfológica o que, em muitas situações, se revela complicado. O ideal seria poder observar o mesmo espécime em MO e em MEV, o que não tem sido fácil de conseguir, dadas as dimensões dos palinomorfos.

No presente trabalho, descreve-se o procedimento que visa estudar o mesmo exemplar de palinomorfo recorrendo a estes dois equipamentos com o auxílio do Microscópio Óptico Invertido e da Lupa Binocular. Os palinomorfos descritos como exemplo provêm de sedimentos neogénicos; no entanto, este procedimento pode ser efectuado em materiais de qualquer idade.

2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

2.1 Tratamento laboratorial

A quantidade de sedimento a tratar em laboratório depende da sua natureza. Para material argiloso e areno-argiloso devem pesar-se em média 40 g; 10-15 g para diatomitos e cerca de 5 g para lignitos.

Após pesagem, os sedimentos são colocados em copos de teflon por serem resistentes ao ácido fluorídrico (HF). De seguida, procede-se à eliminação progressiva da fracção mineral através de ataques com produtos químicos comerciais, nomeadamente ácido clorídrico a frio (HCl a 37% para sedimentos ricos de carbonatos até deixar de fazer efervescência) e ácido fluorídrico a quente (HF a 51%-55% para sedimentos ricos de sílica). Em amostras não carbonatadas, pode adicionar-se de imediato HF. O ataque com HF, com duração média de 4h, pode ser repetido, se a percentagem de sílica for muito elevada. A destruição da fracção mineral é mais eficaz quando os copos são colocados num agitador orbital com aquecimento durante o tempo de espera (fig. 1).

Após a eliminação de carbonatos e silicatos adiciona-se água desionizada para lavagem da amostra que deve ser decantada após 4 horas no mínimo. O líquido sobrenadante é eliminado, adicionando-se HCl a quente durante cerca de 5 minutos, para solubilizar os fluoretos formados. Efectuam-se novas lavagens e decantações através de centrifugação (2500 rpm durante 2 minutos) até a água ficar límpida.

Em amostras muito ricas de matéria orgânica convém efectuar acetólise. Para isso, o resíduo é colocado num tubo de ensaio de 45 ml; adicionam-se 15 ml de solução de clorato de sódio (NaClO_3), 30 ml de ácido acético glacial (CH_3COOH) e quatro gotas de HCl concentrado. Coloca-se a mistura em banho-maria à temperatura de, aproximadamente, 90°C durante 5 minutos. Centrifuga-se (2500 rpm durante 2 minutos) e, após três lavagens por centrifugação com água destilada, faz-se uma lavagem com ácido acético glacial de forma a remover a água da amostra, pois a presença desta, causaria uma reacção violenta na fase seguinte. Segue-se o processo de acetólise propriamente dito: remove-se o ácido acético do topo da amostra e adiciona-se a solução de acetólise de Erdtman – 9 ml de anidrido acético [$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$] e 1 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 95%-97%. A amostra é colocada em banho-maria (90°C) e agitada intermitentemente durante 5 minutos. Enche-se o tubo com ácido acético glacial, centrifuga-se (2500 rpm durante 2 minutos) e decanta-se. Faz-se nova lavagem com ácido acético glacial seguida de mais três lavagens com água.

Para a limpeza final dos palinomorfos deverá ser eliminada a matéria inorgânica fina (partículas de dimensão do silte ou argila) que tenha resistido ao ataque dos ácidos, assim como matéria orgânica solúvel (compostos sapropélicos e betuminosos). Pode utilizar-se hexametáfosfato de sódio [$(\text{NaPO}_3)_6$, vulgarmente “calgon”], diluído em água quente, para desflocular o resíduo, mantendo os materiais finos em suspensão e tornando possível a sua eliminação nas decantações. A duração de



Fig. 1 – Amostras em tratamento com banho ácido em agitador orbital.

– Samples in treatment with acid in orbital shaker.

cada decantação será de cerca de 4 horas. Procede-se, então, a várias lavagens até que a água esteja límpida. Segue-se crivagem reservando os materiais inferiores a 125 μm . No final desta fase, deverá efectuar-se observação preliminar do resíduo palinológico ao microscópio de forma a determinar o estado de limpeza e concentração dos palinórfos.

Quando se verifica que a eliminação da fracção mineral pelos ácidos não foi completamente eficaz, recorre-se à separação do material orgânico por densidades, utilizando líquidos densos, como cloreto de zinco (ZnCl_2) ou brometo de zinco (BrCl_2) com densidade mínima de 2,0.

Sempre que no resíduo obtido ainda exista uma quantidade significativa de matéria orgânica desorganizada, o mesmo deverá ser colocado em solução aquosa com cerca de 2-3 g (conforme a quantidade de matéria orgânica) de perborato de sódio ($\text{NaBO}_2\text{H}_2\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e aquecido até à ebulição durante cerca de 5 minutos. Neste procedimento é usual formarem-se bolhas; sempre que a reacção for demasiado violenta adicionam-se algumas gotas de água com vista à sua atenuação. Após este procedimento o resíduo deverá ser lavado três vezes recorrendo a centrifugações (2500 rpm durante 1 minuto).

2.2 Selecção de palinórfos para observação em microscopia electrónica de varrimento

O resíduo final obtido deve ser colocado num frasco pequeno com glicerina líquida (a 87-99%) de modo a formar uma suspensão. Com o auxílio de uma pipeta retira-se uma gota da suspensão e transfere-se para uma lâmina delgada de vidro. Com uma agulha de dissecação faz-se esfregaço da amostra ao longo da lâmina e de seguida observa-se ao microscópio óptico invertido, o que permite observar os palinórfos e fazer a sua movimentação.

Para separar e movimentar os palinórfos presentes na lâmina deve fixar-se à extremidade da agulha de dissecação um pêlo das sobrancelhas. Este utensílio permite deslocar para a margem do esfregaço os palinórfos para serem identificados, bem como seleccionar os que serão observados no MEV. Cada palinórfos seleccionado é transferido para outra lâmina de vidro com uma pequena gota de glicerina (Zetter, 1989; Zetter *et al.*, 2002) para serem novamente observados e fotografados, sempre que possível em posição polar e equatorial, em microscópio óptico normal (fig. 2). Este procedimento é



Fig. 2 – Combinação de material óptico para estudos de microscopia electrónica de varrimento. Da esquerda para a direita, lupa binocular, microscópio óptico invertido e microscópio óptico normal.

- Optical equipment for scanning electron microscopy studies.
From left to right: Binocular microscope; inverted microscope; optical microscope.

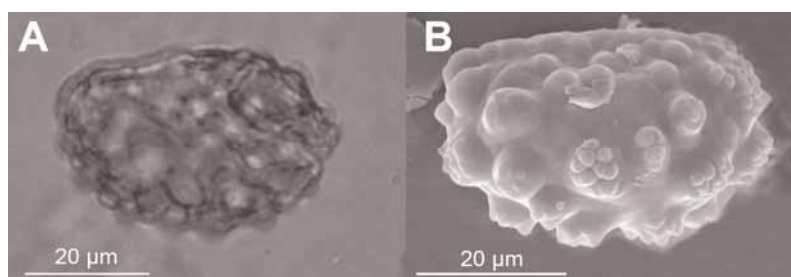


Fig. 3 – Fotografia do esporo gén. *Davallia* em MO (A) e MEV (B).

– Photomicrograph of spore gen. *Davallia* in OM (A) and SEM (B).

minucioso e deve ser efectuado com cuidado para que o palinomorfo não se perca na transferência.

Após a observação em microscopia óptica, os palinormorfos são transferidos, com o auxílio da agulha de dissecação com o pêlo da sobrançelha, para um suporte de alumínio (“stub”) de MEV previamente limpo, utilizando o microscópio invertido e lupa binocular. Com a ajuda de uma pipeta coloca-se uma pequena gota de Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ a 99%) e o palinomorfo. O etanol tem a função de remover os restos de glicerina que ainda estejam aderentes à superfície dos palinormorfos, para que estes possam ser observados no MEV. É necessário colocar uma pequena gota de etanol por palinomorfo até serem adicionados todos os palinormorfos (uma média de oito a dez por “stub”). As gotas de etanol devem ser colocadas com muito cuidado pois em excesso podem atirar os palinormorfos para fora do “stub”.

Posteriormente a amostra é metalizada com ouro e observada ao MEV.

3. Resultados

Apresentam-se exemplos resultantes da observação combinada dos mesmos exemplares de palinormorfos em MO e MEV (figs. 3, 4, 5 e 6):

- esporo do Género *Davallia* Linné, 1753 (fig. 3): tamanho médio (26-50 µm), com forma elipsoidal, abertura monolete; a exina possui tubérculos com pequenas verrugas na superfície (característica morfológica foi observada por Gonzales em 1980) características deste género, só são possíveis de reconhecer no MEV, e que permitem distinguir este género de *Polypodium*.
- pólen da Família Lythraceae, Género *Lythrum* Linné, 1753 (fig. 4): tamanho pequeno a médio (15 a 35 µm), isopolares e com simetria radial; possuem forma oblato-esferoidal a prolato-esferoidal: em vista equatorial são elípticos e em vista polar subcirculares; quanto às aberturas, são hexazonoheterocolpados. Possuem ectoaberturas tipo colpo: 3 simples e cur-

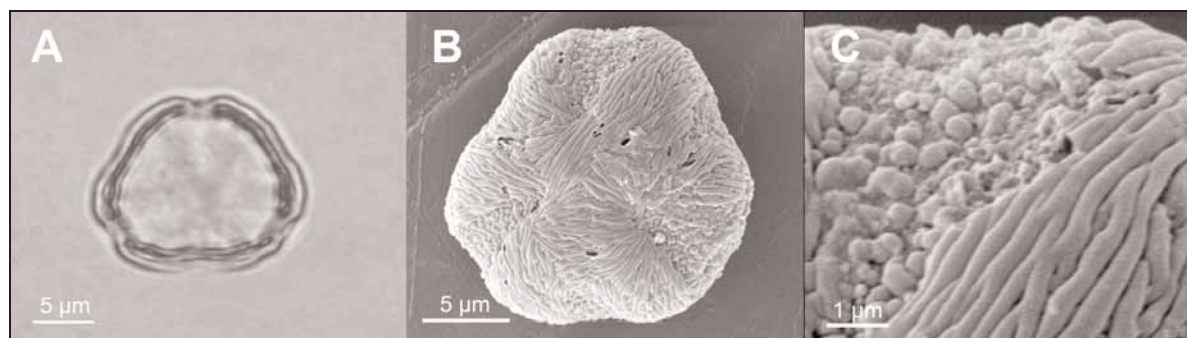


Fig. 4 – *Lythrum* sp. em MO (A) e MEV (B e C-detalle da ornamentação da exina).

– *Lythrum* sp. in OM (A) and SEM (B and C-detail of the exina ornamentation).

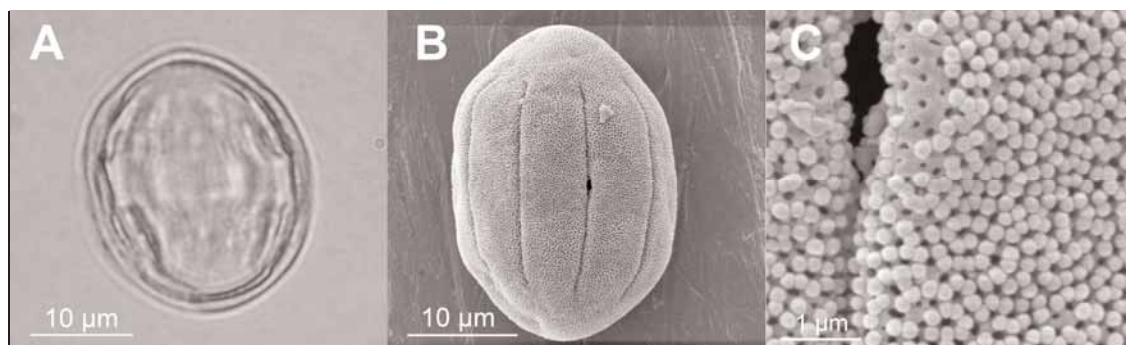


Fig. 5 – *Borago* sp. em MO (A) e MEV (B e C- detalhe da ornamentação da exina).

– *Borago* sp. in OM (A) and SEM (B and C-detail of the exina ornamentation).

tas e 3 compostas (colporadas); a exina tem 1,5 µm de espessura média e ornamentação com estrias finas e compridas.

- pólen da Família Boraginaceae, Género *Borago* Linné, 1753 (fig. 5): tamanho médio (26-50 µm), isopolares, com simetria radial, relativamente elípticos em vista equatorial e circulares em visão polar; em termos de aberturas são 10-zonocolporados, podendo variar entre 9-11-zonocolporados; as ectoaberturas tipo colpo são subterminais, estreitas e de extremos arredondados; exina de 4 µm de espessura, tornando-se mais espessa na zona dos pólos; superfície coberta por granulos, ou pequenos báculos, entre os quais é possível observar perfurações estreitas.
- quisto de dinoflagelado de *Cleistosphaeridium placacanthum* Davey *et al.*, 1966 emend. Eaton *et al.*,

2001 (fig. 6): corpo esférico a ligeiramente ovóide e circular em secção equatorial. Apresenta grande número de processos que estão alinhados de forma a dividir a totalidade da superfície em placas, aproximadamente poligonais, como áreas ou campos de tamanho variável e em que cada campo está separado do vizinho por uma área destituída de apêndices; os processos são sólidos, de forma variável, algo sinuosos, simples ou ramificados com extremidades pontuadas ou em forma de martelo, dilatados na base; às vezes, as bases de dois ou mais processos estão ligadas por estruturas semelhantes a pontes; ocasionalmente, os ápices podem coalescer ou estar ligados por uma estrutura delicada; não possuem arranjo equatorial especial e a superfície da cápsula é finamente reticulada. A parede é cons-

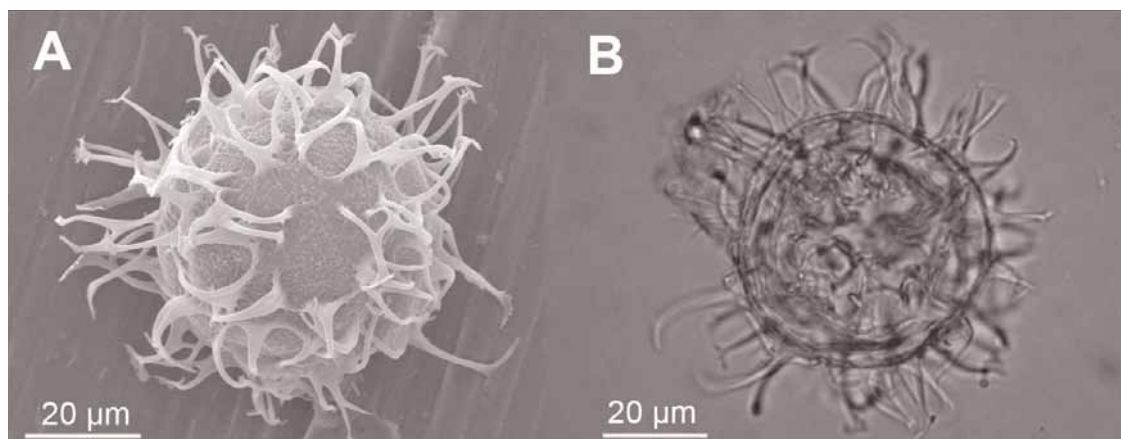


Fig. 6 – *Cleistosphaeridium placacanthum* em MO (A) e MEV (B).

– *Cleistosphaeridium placacanthum* in OM (A) and SEM (B).

tituída por duas camadas (o endofragma parece ser mais espesso que o perifragma) e composta por um arranjo de báculos próximos, dando um aspecto reticulado à superfície do quisto; o perifragma é liso, estreitamente ligado ao endofragma, formado dentro de dobras suturais suportando grande distância e distalmente com espinhos bifidos com campos de contorno intratabulares representando placas equivalentes; os espinhos são sinuosos, delgados, proximamente expandidos, simples ou ramificados e, distalmente, bifidos. A paratabulação é 4', 6'', 6c, 5'', 1p, 1''', 6s. A placa antapical tem forma de feijão. O paracíngulo é identificado por uma fila simples de espinhos, emparelhadas ou não, com bases alongadas em direcção ao cíngulo. O parassulco contém grupos isolados de espinhos, representando campos de placas intratabulares, contornando uma placa sulcal posterior, dois pares de placas medianas e uma placa sulcal anterior; geralmente, o parassulco é bem desenvolvido estando o sulco directamente abaixo do entalhe sulcal do arqueópilo. O arqueópilo é formado pela remoção do opérculo simples, correspondendo às placas 1', 2', 3' e 4'. O comprimento do corpo central é de 57-63 µm, a largura 48-63 µm e o comprimento dos processos é de 5-20 µm.

Com o método combinado é fácil comparar resultados, sendo possível reconhecer e evidenciar pormenores morfológicos que de outro modo não seriam observáveis.

4. Conclusões

Sempre que se efectua um estudo de paleopalynologia, a utilização desta técnica combinada MO-MEV para observação do mesmo palinomorfo, inédita em Portugal, possibilita o reconhecimento pormenorizado de caracteres morfológicos dos palinomorfos e permite aumentar o número de *taxa* identificados.

Para além disso, comparando os *taxa* fósseis com os actuais permite a obtenção de melhores informações paleoambientais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação para a Ciência e Tecnologia por financiar as deslocações inseridas no projecto de doutoramento Ref. SFRH/BD/18754/2004.

REFERÊNCIAS

- GONZALES, N. (1980) – Contribución al estudio de las esporas de helechos de Canarias. I (*Polypodiaceae*, *Davalliaceae*). *Bot. Macaronésia*, 7: 53-66.
- ZETTER, R. (1989) – Methodik und Bedeutung einer routinemäßig Kombinierten lichtmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung fossiler Mikroflora. *Courier Forschungsinst. Senckenberg*, 109: 41-50.
- ZETTER, R., HESSE, M. & HUBER, K.H. (2002) – Combined LM, SEM and TEM studies of late Cretaceous Pollen and Spores from Gmünd, Lower Austria. *Stapfia*, 80: 201-230.

*Artigo recebido em Agosto de 2009
Aceite em Outubro de 2009*