

PREPARAÇÃO DE CUTÍCULAS DE PLANTAS PALEOZÓICAS

FERNANDO CILENTO FITTIPALDI
OSCAR RÖSLER

Instituto de Geociências, Universidade
de São Paulo

ABSTRACT

This paper deals with the preparation of cuticles of Paleozoic plants and has two main objectives: 1) Summarize the conventional techniques, responding to the increasing interest shown by South American paleobotanists in the study of cuticles of fossil plants; 2) Present some unconventional aspects of these techniques, according to our own experience in studying cuticles of Lower Permian fossil plants of the Paraná Basin. This is useful, as the preparation of cuticles, especially those found in Paleozoic sediments, presents various particularities according to the diagenetic and postdiagenetic conditions to which the cuticle was exposed.

INTRODUÇÃO

O método de preparação de material cuticular praticamente se iniciou com o trabalho de SCHULZE (1855), quando foi aplicado ao estudo de linhitos da Alemanha. Desde então, vários autores sugeriram técnicas para a preparação e estudo de materiais incarbonizados.

Além da aplicação de procedimentos mais gerais, para cada material há necessidade de uma adaptação metodológica, em função de sua procedência e idade.

O presente trabalho tem por objetivo expor alguns procedimentos simples, em parte convencionais, que envolvem, porém, adaptações e cuidados que utilizamos e desenvolvemos durante alguns anos de trabalho com material da Formação Rio Bonito (Permiano Inferior) da Bacia do Paraná.

Esta experiência acumulada na Bacia do Paraná poderá propiciar facilidades para estudos futuros, principalmente levando em conta que, em grande parte dos casos, os autores que tem estudado as cutículas não tem feito referência a respeito das técnicas utilizadas.

OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE CUTÍCULAS

Fundamentalmente, o método de obtenção e preparação de cutículas segue os passos

abaixo relacionados:

Obtenção de cutículas:

1. Retirada da película carbonosa do sedimento.
2. Maceração em solução de Schulze.
3. Lavagem em solução de KOH 10%.
4. Lavagem em água destilada.
5. Separação das cutículas das faces superior e inferior.

Preparação de cutículas:

1. Para microscópio óptico
 - A. Aquecimento da gelatina ao "hot plate".
 - B. Colocação da cutícula na gelatina logo que esta se funde.
 - C. Colocação da lamínula, evitando-se a formação de bolhas.
2. Para microscópio eletrônico de varredura:
 - A. Secagem de cutícula ao aparelho de ponto crítico para CO₂.
 - B. Montagem no "stub" sobre uma fita adesiva de dupla face.
 - C. Metalização pelo processo de "sputtering".

Estas etapas exigem cuidados especiais, cujos detalhes damos a seguir.

OBTENÇÃO DE CUTÍCULAS

Como etapa inicial, fragmentos da película carbonosa, correspondente à compressão foliar, são cuidadosamente retirados do sedimento, com o auxílio de um pincel fino. Em geral esta operação é facilitada se a película carbonosa ou o pincel forem ligeiramente umedecidos. Nos casos em que a película esteja fortemente aderida, fragmentando-se excessivamente ao ser retirada, pode ser usado, como recurso extremo, um estilete, destacando-se, juntamente com fragmentos, uma fina camada da matriz. Este procedimento, entretanto, apresenta o inconveniente de destruir a impressão foliar, dificultando uma posterior identificação de aspectos morfológicos. Uma outra opção, nestes casos em que a película carbonosa está muito aderida e a impressão não deve ser destruída, é mergulhar toda a amostra na solução macerante, desde que a matriz apresente solidez suficiente. Os resultados obtidos com este procedimento foram excelentes, com a impressão totalmente preservada.

Normalmente esta etapa inicial é realizada em laboratório. Bons resultados, no entanto, foram obtidos quando procedeu-se a retirada da película carbonosa em amostras recém coletadas no próprio afloramento, e conservando-se a mesma em solução de Schulze 5% até a maceração. Este método foi aplicado diante da suposição de que evitaria o ressecamento e conseqüente fragmentação da película, bem como os danos causados pelo atrito mecânico durante o transporte, suposição esta amplamente confirmada.

A seguir, os fragmentos são colocados em uma placa de Petri e cobertos por solução de Schulze (ácido nítrico concentrado e solução saturada de clorato de potássio em partes iguais), para oxidação e conseqüente diafanização da fração orgânica incarbonizada. Esta solução macerante, criada por Schulze (1855), é amplamente empregada nos estudos cuticulares, sendo utilizada pela maioria dos autores. De acordo com o material, entretanto, é indicado o uso de outros líquidos macerantes como ácido nítrico concentrado (OLDHAN, 1976), ácido nítrico diluído (PANT & SINGH, 1974) e álcali diluído (ARCHANGELSKY, 1966). SOMMER (1950), trabalhando com material terciário, utilizou oxidantes como água de Javelle, hipoclorina e água sanitária. A maceração processa-

-se geralmente em 3 dias (temperatura ambiente), porém em alguns casos pode prolongar-se até 7 dias. Nestes casos, é conveniente trocar diariamente a solução macerante, para acelerar o processo. Normalmente a maceração é efetuada à temperatura ambiente. Pode, entretanto, para acelerar o processo, ser efetuada a quente (ARCHANGELSKY, 1976 e BALDONI, 1980).

Quando as películas apresentam-se suficientemente clareadas (ou seja, mostrando uma coloração marrom), são retiradas da solução macerante e tratadas durante alguns minutos com solução de KOH 10% para completa solubilização dos restos de substâncias húmicas, responsáveis pela coloração escura. Constatou-se que para este tipo de material, a solução de KOH é a mais indicada. Grande parte dos autores (ARCHANGELSKY, 1976; ASH, 1970; BARNARD & MILLER, 1976; CHALONER *et al.*, 1979; MENSAH & CHALONER, 1971; OLDHAN, 1976; PANT & SINGH, 1974; PANT & CHOUDHURY, 1977 e THOMAS, 1977), entretanto, prefere usar NH₄OH em concentrações variáveis. Os restos de substâncias húmicas, correspondendo principalmente a alterações do mesófilo e células epidérmicas e, portanto, acumulados entre as cutículas das faces superior e inferior, foram eliminados posteriormente através de uma lavagem em água destilada. Esta lavagem é caracterizada pelo aparecimento de turvações que se desprendem do material, provocando um completo escurecimento da água. Finalmente as cutículas das faces superior e inferior, às vezes levemente aderidas, são separadas mecanicamente, sob lupa binocular. Esta separação é efetuada em meio líquido com o auxílio de um pincel fino, tendo-se o cuidado de eliminar eventuais impurezas aderidas às cutículas. Se necessário, as cutículas já separadas são reconduzidas à solução de Schulze, para um melhor clareamento.

Cabe lembrar, que um recurso que tem sido utilizado por inúmeros pesquisadores, para eliminar as impurezas da cutícula, é a vibração ultrasônica em meio líquido (ARCHANGELSKY & BALDONI, 1972; BALDONI, 1980 e THOMAS, 1974).

As cutículas podem ser mantidas em água destilada por tempo indeterminado, desde que dentro dos frascos esterilizados para evitar o desenvolvimento de microorganismos.

PREPARAÇÃO DE CUTÍCULAS PARA MICROSCÓPIO ÓPTICO

O meio de montagem utilizado para análise ao microscópio óptico é a gelatina-glicerina. Esta é composta de 7 gramas de gelatina branca em folha, 19 cm³ de água destilada, 33 gramas de glicerina e 1 grama de fenol, este último para evitar a proliferação de fungos e de outros microorganismos. Embora a gelatina-glicerina seja o meio de montagem mais utilizado nos estudos cuticulares, as cutículas podem também ser montadas em produtos como bálsamo do Canadá (CHALONER, *et al.*, 1974), "Euparal" (CHALONER, *et al.*, 1979), "Diaphane" (EDWARDS, 1968), "Piccolyte" (REIHMAN & SCHABILION, 1976), "Clearcol" e "DePeX" (OLDHAN, 1976).

Para a montagem, uma lâmina com um pequeno bloco de gelatina é levada a um "hot plate" aquecido a uma temperatura de cerca de 30°C. Por intermédio de um pincel fino, as cutículas são mergulhadas na gelatina logo que esta se funde. No caso de fragmentos diminutos, ao invés de pincel, aconselha-se utilizar um conta-gotas para esta operação. A gelatina não deve permanecer sobre o "hot plate" mais do que o tempo estritamente necessário, para não sofrer escurecimento. Antes da colocação da cutícula, as bolhas existentes na gelatina devem ser eliminadas. Normalmente esta operação é demorada. Para um bom resultado, deve-se deslocá-las em direção à margem, utilizando-se uma pinça ou estilete. Finalmente, a gelatina é coberta cuidadosamente por uma lamínula, procurando-se evitar a formação de bolhas.

Para o estudo ao microscópio óptico não houve necessidade de se corar as cutículas. Contudo, corantes como a safranina tem sido bastante utilizados em materiais de diferentes idades (BARNARD & MILLER, 1976; MENSAH & CHALONER, 1971; PANT & SINGH, 1968; PANT & BASU, 1979 e TRAVERSO, 1966).

PREPARAÇÃO DE CUTÍCULAS PARA MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

A técnica de preparação de material cuticular para o exame ao microscópio eletrônico de varredura foi obtida após uma série de expe-

rimentos, onde se variou as formas de secagem, de montagem e de metalização do material. Estes experimentos foram efetuados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP.

A primeira etapa é a eliminação de toda a matéria volátil contida nos espécimes em estudo. A secagem deste material, obtido pelo processo de maceração e mantido em água destilada é efetuada ao Aparelho de Ponto Crítico para CO₂ (KIYOHARA *et al.*, 1978). Este método se mostrou o mais simples e o mais seguro para secar amostras finas e delicadas sem as distorções e enrugamentos causados pelas forças de tensão superficial (quando o espécime é seco ao ar). No Aparelho de Ponto Crítico, o material é seco na ausência de uma interface líquido-vapor, preservando, portanto, inalterada sua geometria, particularmente no que se refere às estruturas tridimensionais.

Após a secagem, as cutículas são montadas no suporte metálico do microscópio de varredura ("stub"). O material é montado com o auxílio de um pincel fino e seco sobre uma fita adesiva de dupla face. O uso desta representa vantagem sobre a utilização de cola de prata ("silver conducting paint") pelo fato de não haver extravasamento ou preenchimento de cavidades, o que poderia dificultar a interpretação das estruturas cuticulares. Outro adesivo que tem sido usado é o "Durofix" (OLDHAN, 1976 e CHALONER *et al.*, 1974). Dependendo dos aspectos a serem observados, as cutículas das faces superior e inferior são montadas preferencialmente com a superfície interna voltada para cima, já que a superfície externa, sendo lisa, apresenta poucos detalhes. O material deve estar bem aderido para evitar que se rompa ao alto vácuo.

As cutículas não devem ser colocadas diretamente sobre o "stub" e sim sobre uma lamínula de cantos arredondados afixada sobre ele. Este procedimento permite que o "stub" seja reaproveitado sem a destruição das amostras.

Imediatamente após a montagem, as cutículas são metalizadas pelo processo de "sputtering" (ARRUDA, *et al.*, 1978), onde são bombardeadas por partículas de ouro, recebendo uma delgada camada daquele metal. É conveniente metalizar as cutículas logo após sua montagem no "stub", para impedir que elas absorvam umidade do ar.

Este tipo de metalização se mostrou bastante eficiente. Normalmente, porém, a metalização é feita com ouro-paládio (ARCHANGELSKY & BALDONI, 1972; BALDONI, 1977; BALDONI, 1980; BARNARD & MILLER, 1976; CHALONER, *et al.*, 1974); OLDHAN, 1976 e THOMAS, 1977).

Finalmente, as cutículas, já metalizadas, podem ser examinadas ao alto vácuo do microscópio eletrônico de varredura.

AMOSTRAS PROPÍCIAS PARA A OBTENÇÃO DE CUTÍCULAS

De uma maneira geral, as amostras propícias para a obtenção de cutículas são aquelas em que a película carbonosa, resultante do processo de incarbonização, está preservada e pouco fragmentada.

Mesmo as amostras com um certo grau de oxidação podem oferecer boas cutículas. Neste caso, entretanto, por já ter sofrido um processo de maceração natural, a película carbonosa deve ser submetida a um tempo menor de maceração.

PRINCIPAIS CAUSAS DE INSUCESSOS

O fato da cutícula apresentar-se muito fragmentada após o processo de maceração pode ser devido a fatores diversos. A cutícula pode

de estar excessivamente desgastada e, portanto, com uma menor resistência à oxidação. A película carbonosa pode também após a coleta, ter sofrido um ressecamento e conseqüente fragmentação.

Quando, após o processo de maceração, a cutícula permanece escura, o fato se deve, na grande maioria dos casos, a uma oxidação insuficiente. É recomendável, portanto, submeter a cutícula a uma nova maceração, até que ela esteja suficientemente clareada.

A presença de bolhas sobre a cutícula, após a montagem da lâmina, é devida certamente à inabilidade na colocação da lamínula. Em alguns casos, a bolha pode ser eliminada, reconduzindo-se a lâmina ao "hot plate" e pressionando-se a lamínula com uma pinça ou estilete. Noutros casos, porém, é aconselhável desfazer a lâmina, levando-se a mesma ao "hot plate" e adicionando-se algumas gotas de água destilada para que a gelatina se dilua, liberando a cutícula.

Há casos, porém, em que mesmo após esse tratamento, em virtude de determinadas condições geoquímicas durante a diagênese, as cutículas permanecem demasiadamente escuras para exame com microscópio óptico. Nestes casos, pode-se tentar o uso de luz infravermelha, tal como exposto para palinórfos (ARCHANGELSKY & GAMERRO, 1980, GAMERRO & ARCHANGELSKY, 1981).

BIBLIOGRAFIA

- ARCHANGELSKY, S. — 1966 — *New gymnosperms from the Ticó Flora, Santa Cruz Province, Argentina*, Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Geol., 13 (5): 259-295, 8 est., 39 fig., 1 mapa.
- ARCHANGELSKY, S. — 1976 — *Vegetales fósiles de la Formación Springhill, Cretácico, en el subsuelo de la Cuenca Magallánica, Chile*. Ameghiniana, 13 (2): 141-158, 5 est.
- ARCHANGELSKY, S. & BALDONI, A.M. — 1972 — *Revisión de las Bennettitales de la Formación Baqueró (Cretácico Inferior) Provincia de Santa Cruz. I. Hojas*. Rev. Mus. La Plata (n.s.) Pal., 7 (44):195-265, 16 est.
- ARCHANGELSKY, S. & GAMERRO, J.C. — 1980 — *Palinórfos pérmicos del subsuelo de la Cuenca Colorado en la Plataforma del Mar Argentino, Provincia Buenos Aires*. Bol. IG., Instituto de Geociências USP, 11: 119-124, 2 est.
- ARRUDA, P., KIYOHARA, P. & SANTOS, H. — 1978 — *Aparelho para metalização de espécimes pelo processo de "Sputtering"*. Res. V Congresso Panamericano de Anatomia e VI Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica (São Paulo, 1978): 148-149.

- ASH, S.R. — 1970 — *Dinophyton, a problematical new plant genus from the Upper Triassic of the south-western United States*, *Palaeontology*, 13 (4): 646-663, 3 est., 6 fig.
- BALDONI, A.M. — 1977 — *Nota sobre Sueria rectinervis Menéndez del Cretácico Inferior de la Formación Baqueró, Provincia de Santa Cruz*. *Ameghiniana*, 14 (1/4): 301-304, 1 est.
- BALDONI, A.M. — 1980 — *Revisión de las especies del género Xylopteris (Corystospermaceae) en el Triásico de Argentina, Australia y Sudáfrica*. *Ameghiniana*, 17 (2): 135-155, 3 est., 2 fig., 1 tab.
- BARNARD, P.D.W. & MILLER, J.C. — 1976 — *Flora of the Shemshak Formation (Elburz, Iran) part 3: Middle Jurassic (Dogger) Plants from Katumbargah, Vasek Gahand Imam Manak*. *Palaeontographica B*, 155 (1-4): 31-117, 15 est., 28 fig.
- CHALONER, W.G., LEISTIKOW, K.U. & HILL, A. — 1979 — *Brasilodendron gen. nov. e B. pedroanum (Carruthers) comb. nov., a Permian lycopod from Brazil*. *Rev. Paleobot. Palynol.* 28 (2): 117-136, 4 est., 4 fig.
- CHALONER, W.G., MENSAH, M.K. & CRANE, M.D. — 1974 — *Non-vascular land plants from the Devonian of Ghana*. *Palaeontology*, 17 (4): 925-947, 5 est., 1 fig., 2 tab.
- EDWARDS, D. — 1968 — *A new plant from the Lower Old Red Sandstone of South Wales*. *Palaeontology*, 11 (5): 683-690, 3 est.
- GAMERRO, J.C. & ARCHANGELSKY, S. — 1981 — *Hallazgo de Palinomorfos Permicos en sedimentitas de la Formación Piedra Shotel, Estancia La Casilda y en la Perforacion Cañadon Pastos Blancos (YPF Ch CPB es-1), Chubut, Argentina*. *An. II Congresso Latino-Americano de Paleontologia*, 1: 169-179, 3 est., 1 fig., 1 tab.
- KIYOHARA, P., ARRUDA, P. & SILVEIRA, M. — 1978 — *Aparelho de Ponto Crítico para CO₂*. *Res. V Congresso Panamericano de Anatomia e VI Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica (São Paulo, 1978)*: 150-151.
- MENSAH, M.K. & CHALONER, W.G. — 1971 — *Lower Carboniferous lycopods from Ghana*. *Palaeontology*, 14 (2): 357-369, 3 est., 2 fig.
- OLDHAN, T.C.B. — 1976 — *Flora of the Wealden plant debris beds of England*. *Palaeontology*, 19 (3): 437-502, 26 est., 2 fig., 7 tab.
- PANT, D.D. & BASU, N. — 1979 — *Some further remains of fructifications from the Triassic of Nidpur, India*. *Palaeontologia B*, 168 (4-6): 129-146, 6 est., 8 fig., 1 tab.
- PANT, D.D. & CHOUDHURY, A. — 1977 — *On the genus Belemnopteris Feistmantel*. *Palaeontographica B*, 164 (4-6): 153-166, 6 est., 6 fig., 1 tab.
- PANT, D.D. & SINGH, K.B. — 1968 — *On the genus Gangamopteris McCoy*. *Palaeontographica B*, 124 (4-6): 83-101, 6 est., 6 fig., 1 tab.
- PANT, D.D. & SINGH, R.S. — 1974 — *On the stem and attachment of Glossopteris and Gangamopteris leaves. Part II — Structural features*. *Palaeontographica B*, 147 (1-3): 42-73, 13 est., 11 fig., 1 tab.
- REIHMAN, M.A. & SCHABILION, J.T. — 1976 — *Cuticles of two species of Alethopteris*. *Amer. J. Bot.*, 63 (8): 1039-1046, 4 est.
- SCHULZE, F. — 1855 — *Bemerkungen über das Vorkommen Wohlerhaltener Cellulose in Braunkohle und Steinkohle*. *Ber. Verhandl. K. Preuss. Akad. Wiss. Berl.* 1855: 676-678.
- SOMMER, F.W. — 1950 — *Métodos de Pesquisa Paleobotânica. A maceração, base da Análise Cuticular*. *An. Acad. Bras. Ciências*, 22 (4): 421-439, 20 fig.
- THOMAS, B.A. — 1974 — *The Lepidodendroid stoma*. *Palaeontology*, 17 (3): 525-539, 6 est., 3 fig.
- THOMAS, B.A. — 1977 — *Epidermal studies in the interpretation of Lepidophloios species*. *Palaeontology*, 20 (2): 273-293, 4 est., 7 fig.
- TRAVERSO, N.E. — 1966 — *Brachyphyllum tigrense, nueva confífera de la Formación Baqueró, Cretácico de Santa Cruz*. *Ameghiniana* 4 (6): 189-194, 2 est.