

TÉCNICA DE RÉPLICA DE CARBONO PARA O ESTUDO DA SUPERFÍCIE
DE FÔLHAS DE PLANTAS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO ¹

Helena de Souza Santos²

Otto J. Crocomo³

André M. Louis Neptune⁴

RESUMO

O presente trabalho apresenta um método de réplica de superfície para o estudo da estrutura das fôlhas de vegetais ao microscópio eletrônico. O método permitiu a observação do mesmo tipo de estrutura observada por outros autores na superfície das fôlhas de couve (*Brassica oleracea*).

O método permitiu observar que nas superfícies das fôlhas de café (*Coffea arabica*) a ultraestrutura característica é praticamente desprovida do tipo de ornamentação encontrado nas fôlhas de couve.

INTRODUÇÃO

Na realização de trabalhos sobre a pulverização foliar de fertilizantes em café (MALAVOLTA et al., 1957; CROCOMO & NEPTUNE, 1961, 1965), surgiu o interesse de se conhecer o modo e a velocidade de penetração de nutrientes nas fôlhas. Como se sabe, os elementos são absorvidos através dos estômatos existentes na página inferior das fôlhas e pelas descontinuidades da cutícula da página superior. Portanto, a eficiência da aplicação de fertilizantes por via foliar depende da adesão de gotas de líquidos à superfície das fôlhas, a qual por sua vez está em relação direta com a ultra estrutura ou com o relevo sub-microscópico ⁽¹⁾ dessa superfície. Existe uma gradação contí-

¹ Recebido para publicação em 19 de setembro de 1967

² Secção de Microscopia Eletrônica, Escola Politécnica, USP

³ Cadeira de Química Biológica, ESALQ

⁴ Cadeira de Química Agrícola, ESALQ

(¹) Os termos "ultra estrutura" e "sub-microscópico" são utilizados no presente trabalho para designar aquelas estruturas dos sistemas biológicos que se acham abaixo do poder de resolução do microscópio eletrônico.

nua entre a molhabilidade da superfície de folhas, entre espécies. Ao microscópio ótico não pôde ser notada nenhuma diferença de comportamento, mesmo entre os casos extremos. BRADLEY & JUNIPER (1957) assinalaram a existência de grande diferença de morfologia estrutural entre a ultra estrutura das superfícies de folhas molháveis e as não molháveis. Aquelas que são difíceis de molhar, apresentam uma grande variedade de estruturas, enquanto que as facilmente molháveis têm suas superfícies lisas e uniformes.

O objetivo do presente trabalho é descrever o desenvolvimento de uma técnica de réplica da superfície de folhas que permitisse a observação das ultra estruturas descritas por JUNIPER (BRADLEY & JUNIPER, 1957; JUNIPER & BRADLEY, 1958; JUNIPER, 1959, a,b).

O baixo poder de penetração de um feixe de elétrons não permite que o microscópio eletrônico seja utilizado na observação direta de uma superfície (SOUZA SANTOS & SOUZA SANTOS, 1953, 1957). O problema deve ser resolvido pela utilização de réplicas, ou moldes de espessura adequada, da superfície. As técnicas mais recomendáveis seriam aquelas que empregam carbono, como a substância que constitui a película-molde, pois não envolvem o tratamento do espécimen com solventes orgânicos, uma vez que muitas folhas têm suas superfícies cobertas com uma camada de cera, que poderia ser afetada ou destruída por tal tratamento. O carbono é uma substância completamente inerte, não cristalina e pode replicar detalhes até 1 milimicron.

O exame de réplicas de carbono de superfície de folhas ao microscópio eletrônico revelou a existência de um micro relevo ou micro ornamentação, que foram interpretadas por Juniper como réplicas de carbono de saliências ou projeções da cera existente na superfície das folhas. Juniper pensa serem essas estruturas peculiares da espécie (JUNIPER, 1959, a).

TÉCNICA DE RÉPLICA

As técnicas de obtenção de réplica de carbono descritas na literatura (BRADLEY & JUNIPER, 1957; JUNIPER & BRADLEY, 1958) para o estudo da superfície de folhas envolvem materiais de que a Seção de Microscopia Eletrônica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo não dispõe usualmente. Foi então tentada uma modificação dessas técnicas; o método desenvolvido emprega também carbono vaporizado em alto vácuo e é o seguinte: a) corta-se a folha a ser replicada, em pedaços de tamanho conveniente e coloca-se sobre uma lâmina de microscópio, presos

por meio de fita adesiva; b) a lâmina é colocada em uma câmara de alto vácuo, e é feito um vácuo melhor do que 10^{-3} mm de mercúrio; c) vaporiza-se o carbono pela passagem de uma corrente elétrica alternada através das pontas de dois eletrodos de grafite; o carbono vaporizado pela faísca elétrica deposita-se como uma película sobre o espécimen; uma espessura de cerca de 200 angstroms é satisfatória; d) a lâmina é retirada da câmara de alto vácuo; sobre a folha, e portanto sobre o filme de carvão, é colocada uma camada mais ou menos espessa de um plástico (Acquanite "A" lacquer), denominado comercialmente "Zapon"; e) depois de evaporado o solvente do "Zapon", a película composta carbono-zapon pode ser destacada com a máxima facilidade (JNI - PER & BRADLEY, 1958) da superfície das folhas; nos casos onde o deslocamento é difícil é interessante congelar o conjunto antes de se tentar destacar mecanicamente; f) o filme composto é recolocado na câmara de alto vácuo, agora porém, com a réplica de carbono para o lado de cima e voltada para o filamento de onde será evaporado o metal; sobre a réplica é evaporada, obliquamente, uma película metálica (usualmente de cromo) de algumas centenas de angstroms de espessura para dar contraste e idéia do relevo; g) a película composta e assim "sombreada" com cromo, é cortada em pedacinhos que são colocados nas telas suportes próprias para microscopia eletrônica; o "Zapon" é então dissolvido por meio de vapores condensados de acetato de amila por ele absorvido, ficando sobre as telas a serem examinadas no microscópio eletrônico apenas a réplica de carvão sombreada; esta operação é feita em placas de Petri fechadas em cujo fundo se coloca acetato de amila e apoiando-se as telas suportes para microscopia eletrônica sobre uma grade metálica perfurada cuja superfície está pouco acima do acetato de amila.

Desejando-se uma réplica positiva pode-se inverter os itens c) e d) colocando-se o "Zapon" diretamente sobre o pedaço de folha, destacando-se sozinho mecanicamente e em seguida vaporizando carbono sobre a réplica negativa de "Zapon". Procedese então ao sombreamento da mesma forma já descrita.

Foi observada uma correlação entre a maior facilidade de destaque da película e a existência da micro-ornamentação na superfície das folhas; tal fato poderia ser atribuído à presença da camada de cera recobrendo a cutícula da folha e portanto estaria de acordo com a idéia de Juniper que as micro-ornamentações são devido à cera.

É interessante assinalar que com essa técnica a folha não sofre distorção apreciável pela desgaseificação no alto vácuo desde que o tempo de vácuo seja mantido o mais breve possível.

vel, nem desgasefica o suficiente para impedir a deposição do carbono, que requer uma pressão de menos de 10⁻³ mm de mercúrio. Dependendo da fragilidade do relevo da superfície da folha, a técnica produz ou uma réplica verdadeira ou o que é chamado uma pseudo-réplica: no último caso, partes da superfície original permanecem embebidas na camada de carbono; no primeiro, forma-se uma réplica consistindo somente de carbono, mostrando o relevo superficial como parte mais clara da figura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

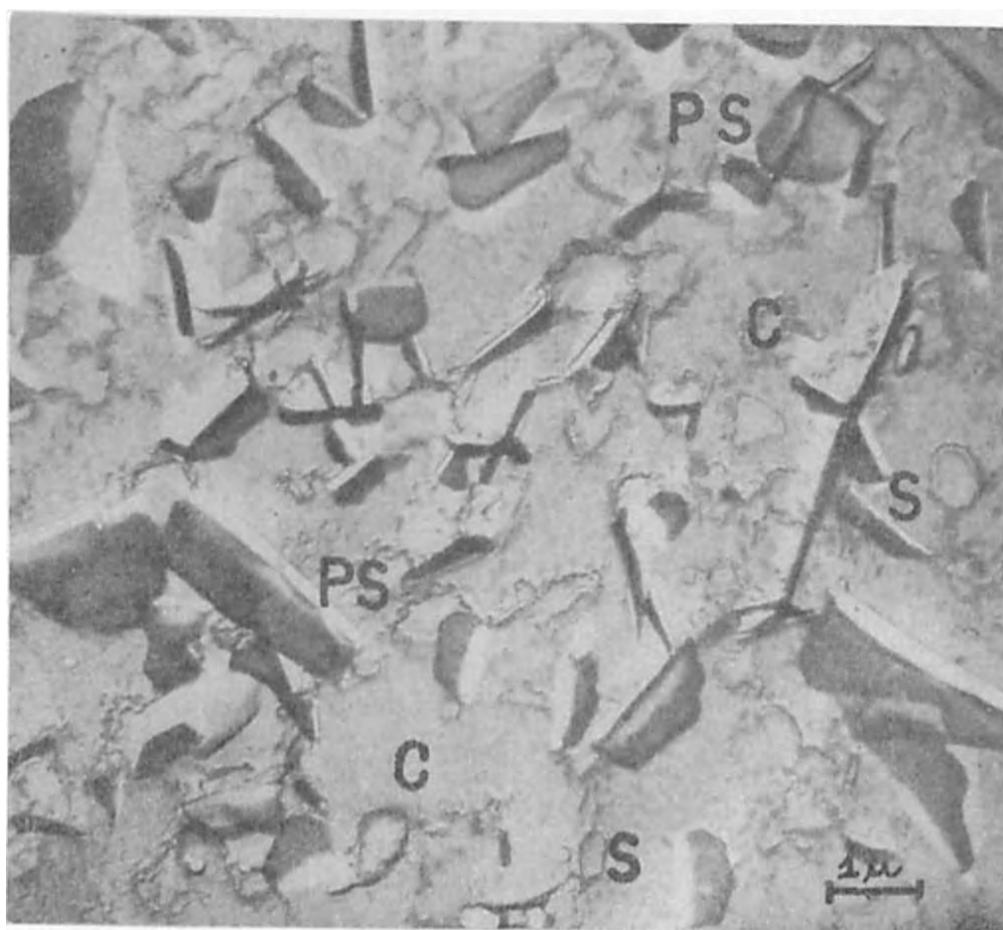
As figuras 1 e 2 apresentam micrografias eletrônicas de superfície abaxial de uma folha de couve (*Brassica oleracea*). As réplicas das micrografias apresentadas são provavelmente parcialmente pseudo-réplicas. As Figs. 3 e 4 apresentam micrografias eletrônicas de superfície abaxial de folha de café; ambas são réplicas verdadeiras. Deve-se notar quanto mais uniformes e lisas são as estruturas da superfície da folha do café comparada com a da couve.

As partes claras das Figs. 1 e 2 representam saliências na superfície da folha, de perfil arredondado (S), em contraste com a superfície da cutícula (C) que é rugosa sendo a rugosidade constituída por pequenas saliências arredondadas. Em outras regiões aparecem saliências maiores (PS) que foram arrancadas no processo de replicagem e não mantêm mais o perfil arredondado, mas possivelmente se enrolam, o que dá o aspecto tubular das partes mais escuras da figura.

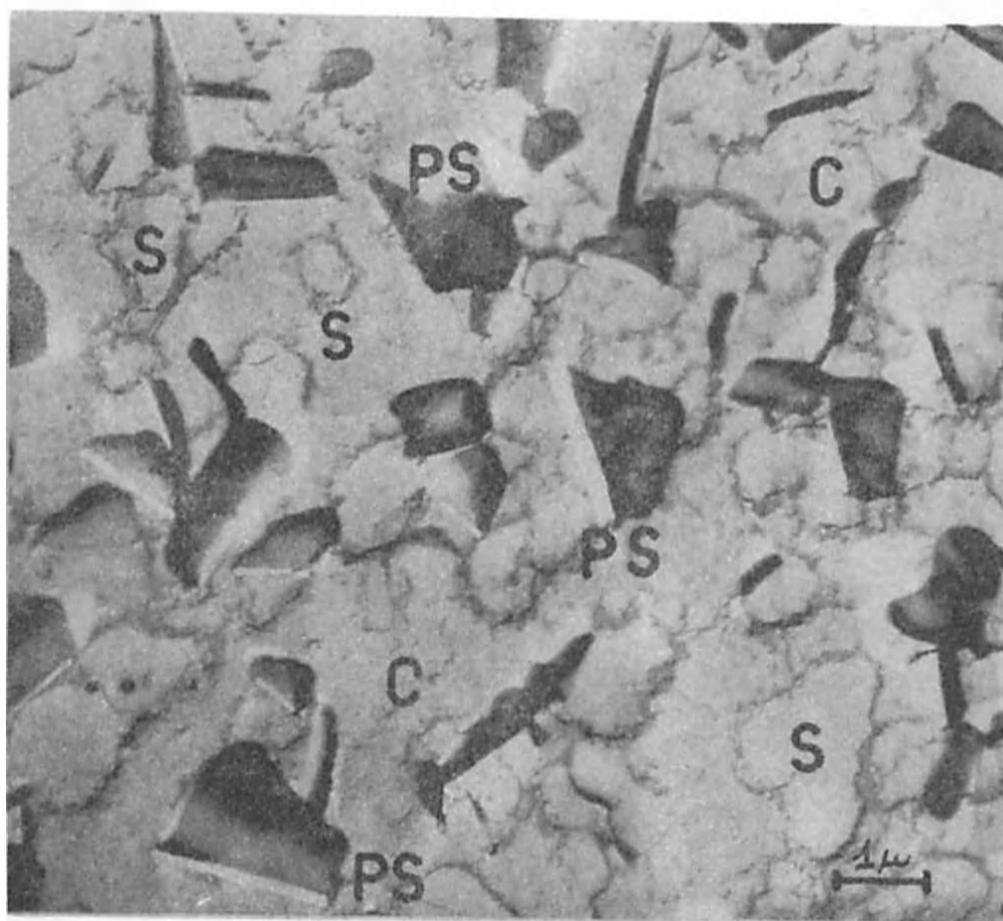
Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas réplicas da superfície de uma folha de café (*Coffea arabica*). Essas superfícies não apresentam saliências do tipo apresentado pela couve, de modo que se tem uma superfície relativamente lisa com um reticulado de sulcos (R) completamente irregular. As manchas escuras da micrografia são partículas de forma irregular que foram retiradas da superfície no processo de replicagem. A distribuição desigual, a forma irregular e as dimensões dessas partículas levam a supor que elas sejam antes partículas de poeira do que constituintes essenciais da superfície das folhas.

A natureza e o mecanismo dessas estruturas não é conhecido; a composição química é possivelmente a de uma cêra, uma vez que é solúvel sob a ação de solventes orgânicos (JUNIPER & BRADLEY, 1958).

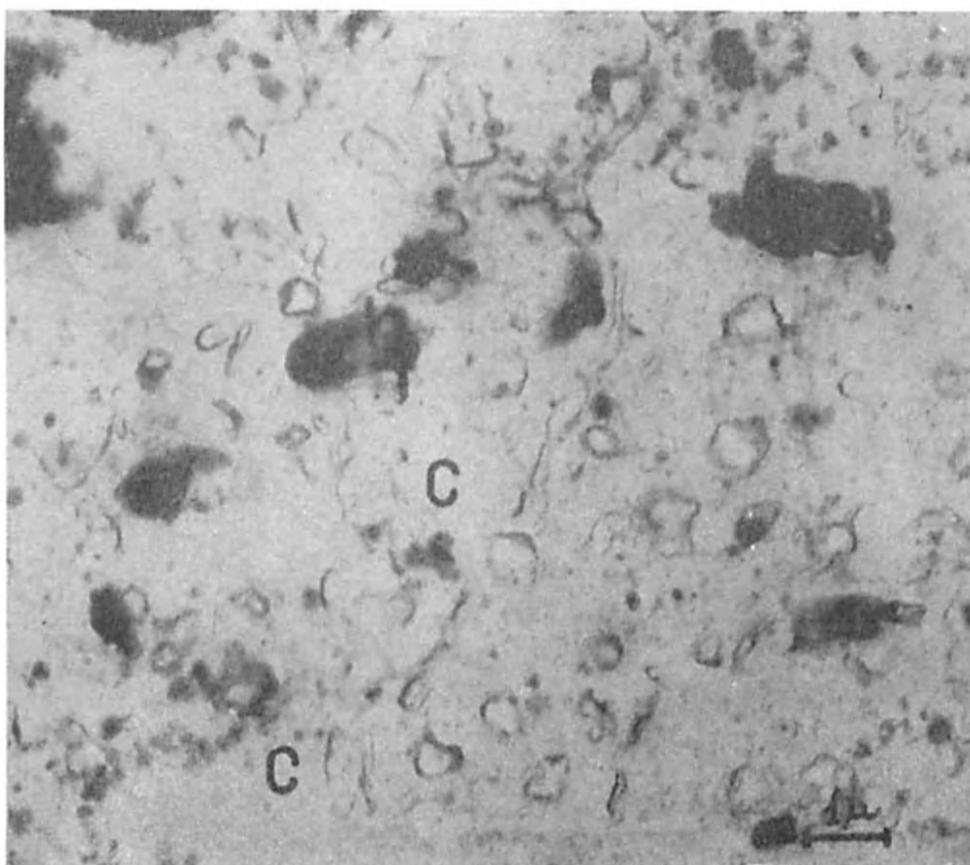
Existem diferenças entre as réplicas das superfícies abaxiais e adaxiais das folhas; contudo, parece tratar-se au-



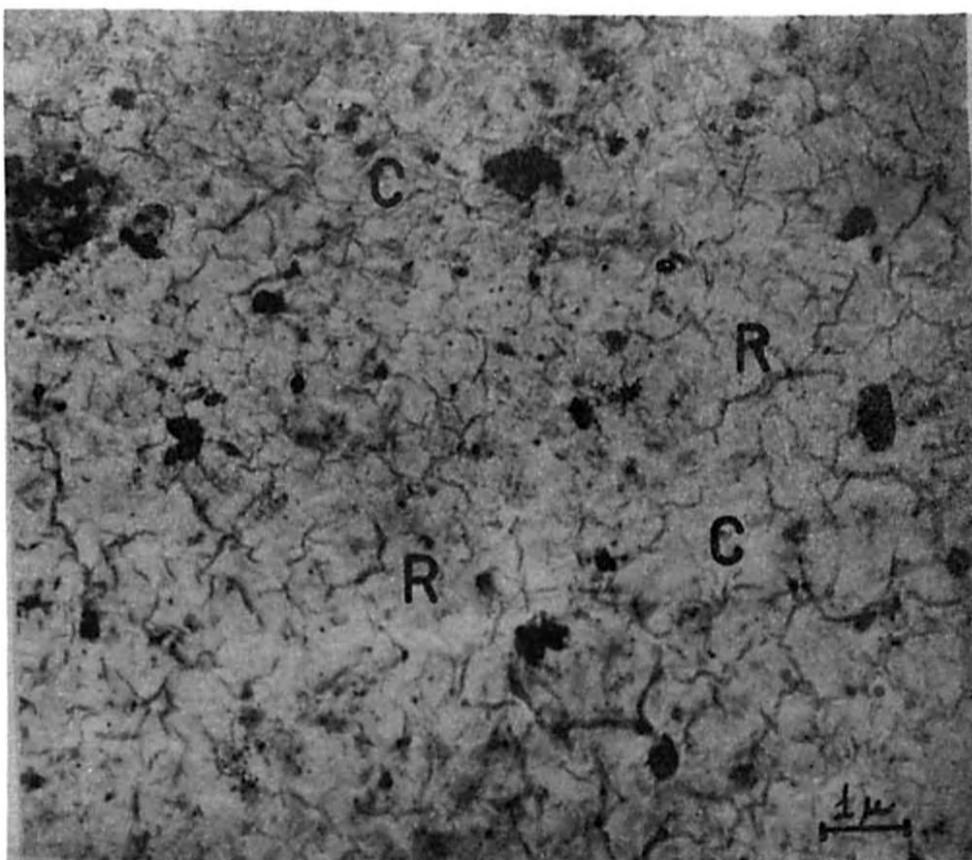
1



Figuras 1 e 2 - Micrografias eletrônicas de réplicas de superfície abaxial de fôlha de couve (*Brassica oleracea*).
 Notar saliências de perfil arredondado (S), cutícula (C) e saliências maiores (PS) que foram arrancadas no processo de replicagem, constituindo o que é chamado de pseudo-réplica. O traço marcado corresponde a um micron.



3



4

Figuras 3 e 4 - Micrografias eletrônicas de réplicas de superfície abaxial de fôlha de café. Essas superfícies não apresentam saliências do tipo da couve, mas são relativamente lisas apresentando um reticulado de sulcos (R) sobre a cutícula (C). O traço marcado corresponde a um micron.

tes de uma diferença na quantidade de relêvo do que diferenças morfológicas nas estruturas. JUNIPER & BRADLEY (1958) assinam também que as superfícies das folhas apresentam alterações de suas ultraestruturas quando ocorrem mudanças de condições ambientais tais como, por exemplo, diferenças de iluminação.

SUMMARY

A technique is described for the production of carbon negative replicas for electron microscopy, which has revealed the same type of ultrastructure observed by other authors, on leaf surfaces of the *Brassica oleracea*. The procedure follows: 1) deposition of a carbon film over the surface of the leaf to be studied; 2) the carbon film is then backed with Zapon Acquanite "A" lacquer as intermediate replica, which is applied full strength over the specimen surface and dried before a heat lamp; 3) the carbon-zapon composite film can be stripped from the leaf with no difficulty whatsoever, and is then metal shadowed; 4) the composite film is placed, carbon side down, on a specimen screen and this placed upon a coarse wiremesh back in a petri-dish. Amyl acetate as solvent for the zapon is added until it just wets the support screen and the dish is covered. Thus the zapon is dissolved by the condensed amyl acetate vapors.

The method has, also, allowed to observe that in the *Coffea arabica* leaf surfaces the characteristics ultrastructure does not present the microprojections found on the *Brassica oleracea*.

LITERATURA CITADA

- BRADLEY, D.E. & B.E. JUNIPER, 1957 Electron microscopy of leaf substances *Natura* 180: 330.
- CROCOMO, O.J. & A.M. LOUIS NEPTUNE, 1961 Estudos sobre a distribuição do S³⁵ em cafeeiro (*Coffea arabica* L., var. Bourbon) Garcia de Orta (Lisboa) 9:601.
- CROCOMO, O.J. & A.M. LOUIS NEPTUNE, 1965 Absorción de iones por las plantas. Ed. pela Imprenta Univ., Univ. del Zulia (Venezuela): 188+XIII pág.
- JUNIPER, B.E. & BRADLEY, D.E., 1958 The carbon replica technique in the study of the ultrastructure of leaf surfaces. *J. Ultrastructure Res.* 2:16.

- JUNIPER, B.E., 1959a The effect of pre-emergent treatment of peas with trichloroacetic acid on the sub-microscopic structure of the leaf surfaces. *New Phytologist* 58:1.
- JUNIPER, B.E., 1959b The surface of plants. *Endeavour* 18:20
- MALAVOLTA, E., A.M.L. NEPTUNE & W.L. LOTT, 1957 Aplicação do fósforo radioativo em cafeeiro. *Res. Comun. X. Reun. An. SBPC São Paulo*, pág. 22.
- NEPTUNE, A.M.L., O.J. CROCOMO, F. PIMENTEL GOMES & H. de CAMPOS, 1962 Spray of potassium fertilizers on coffee plants. *Potash Review*, subject 27 (junho).
- SOUZA SANTOS, H. & P. SOUZA SANTOS, 1953 O microscópio eletrônico e suas aplicações à química e à tecnologia. *Rev. Politécnica* 49: 41.
- SOUZA SANTOS, P. e H. SOUZA SANTOS, 1957 Microscopia eletrônica. Técnicas e aplicações em Odontologia. *Rev. Ass. Paulista Cirurgiões Dent.* 11: 13.