

MÉTODO PRÁTICO DE PREPARAÇÃO PALINOLÓGICA EM SEDIMENTOS DO PRÉ-MESOZOICO

PRACTICAL METHOD OF PALYNOLOGIC PREPARATION OF PRE-MESOZOIC SEDIMENTS

Luiz Padilha de Quadros e José Henrique Gonçalves de Melo¹⁾

RESUMO — As rochas sedimentares pelíticas não oxidadas contêm, normalmente, matéria orgânica. É necessário um ataque ácido para separar esse conteúdo orgânico da parte inorgânica. Apresenta-se uma metodologia expedita de preparação palinológica, dirigida principalmente aos sedimentos do Pré-Mesozóico.

(Originais recebidos em 03-VI-87.)

1 — INTRODUÇÃO

Existem inúmeras metodologias para extrair a matéria orgânica das rochas. Apresenta-se, a seguir, o método que vem sendo empregado no Laboratório de Palinologia do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES) da PETROBRÁS em sedimentos do Pré-Mesozóico.

Para a preparação palinológica são indispensáveis uma série de reagentes químicos, equipamentos adequados e cuidados durante o manuseio dos ácidos. Como todo produto colocado na amostra durante a preparação deverá ser eliminado pelo menos em parte, convém evitar a adição de muitos produtos químicos, que irão redundar em perda de tempo no preparo das amostras.

2 — AMOSTRAS PRÉ-MESOZÓICAS

Sedimentos pré-mesozóicos contêm, usualmente, restos de vegetais, pólenes, esporos, *Acritarchae*, *Chitinozoa*, fungos, escolecodontes, algas, foraminíferos quitinosos, etc. Os *Chitinozoa*, em especial, exigem uma série de cuidados, diversos daqueles necessários no preparo de amostras pós-paleozóicas.

Os oxidantes (ácido nítrico, clorato de sódio e água oxigenada) são evitados no preparo de amostras pré-mesozóicas, uma vez que a classificação das formas oferece maior facilidade que as do material pós-paleozóico. Em alguns casos onde os esporos estão muito escuros, entretanto, não se pode prescindir desses oxidantes.

3 — PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE PALINOLÓGICA

O procedimento sistemático do preparo das amostras e recuperação dos microfósseis é descrito a seguir.

A amostra deverá conter informações sobre procedência, posição estratigráfica, se possível, profundidade (no caso de poços) e bacia sedimentar (fig. 1). O laboratório aporá um número que corresponde ao registro geral da amostra no CENPES.

O peso ideal para processar uma amostra de folhelho é de cerca de 20 gramas (fig. 2). No caso de calcários, às vezes são necessários até 60 gramas. Em amostras de calha (trituras pela broca durante a perfuração do poço), inicia-se o processo de preparação com a lavagem da amostra em água corrente, a fim de eliminar os restos da lama de perfuração que a contaminam. No caso de amostras de superfície ou testemunhos de poços, é preciso triturar a amostra, com um martelo, após colocá-la dentro de um saco plástico, posto sobre uma bigorna (fig. 3). Tanto as amostras de calha como as trituradas deverão ser passadas em peneira com malha de 2,83 mm (fig. 4). Fragmentos com dimensões superiores a 2,83 mm dificultam o ataque ácido e, no caso das amostras de calha, poderão estar contaminados por desmoronamentos ocorridos durante a perfuração do poço.

O material peneirado é colocado em béquer de plástico (1 000 ml). No caso

1 - Setor de Bioestratigrafia e Paleocologia, Divisão de Exploração, Centro de Pesquisas.



Fig. 1 - Início do processamento: numerar a amostra.

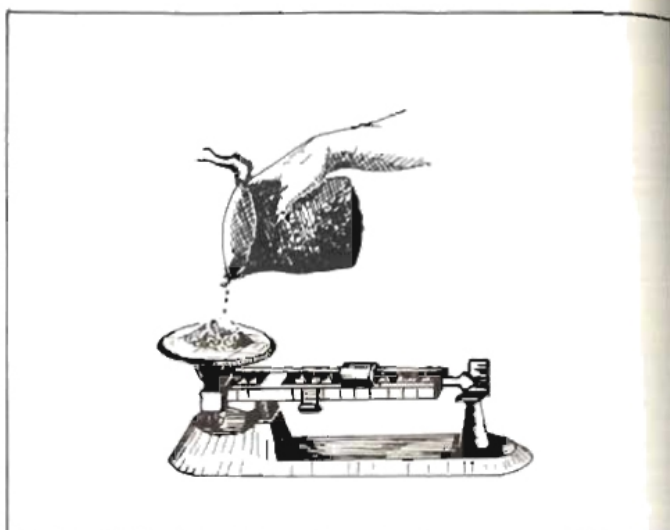


Fig. 2 - Pesar aproximadamente 20 g de material.

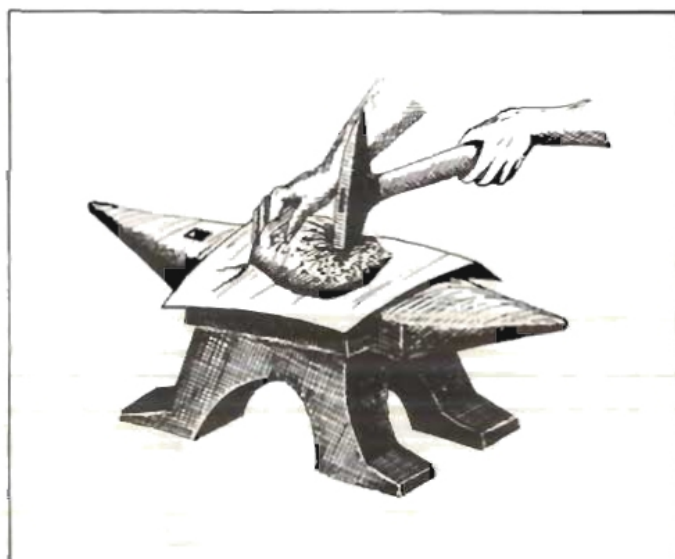


Fig. 3 - Antes de trituração de uma nova amostra, limpar bem o martelo e a bigorna, para evitar contaminações.



Fig. 4 - Passar o material pela peneira de malha de 2,83 mm, Tyler 7. Caso fiquem retidos fragmentos na malha, retirá-los e triturá-los com martelo sobre uma bigorna, recolocando-os em seguida na peneira. Repetir o processo enquanto necessário.

de calcários, inicia-se a operação com ácido clorídrico (37%) e continua-se por ataque com ácido fluorídrico (42 a 52%). Nos casos de folhelhos, siltitos e argilitos, inicia-se o processo de tratamento com um teste da presença de carbonatos, utilizando-se algumas gotas de ácido clorídrico; havendo efervescência, prolonga-se o ataque (30 minutos) com ácido clorídrico; descarbonatada a rocha, a providência seguinte é obter, com ácido fluorídrico, a digestão total da parte silicosa da rocha (cerca de 16 horas de ataque ácido são suficientes) (figs. 5 e 6). É indispensável, no manuseio do ácido fluorídrico e de outros

ácidos, a utilização de luvas, óculos plásticos de segurança e capela com exaustão adequada.

Após o ataque ácido, o próximo passo é lavar a amostra, para remoção dos ácidos que restaram durante o ataque (figs. 7-10).

A seguir, é necessário isolar a matéria orgânica dos resíduos inorgânicos que não foram destruídos durante o ataque ácido. A parte em suspensão é eliminada com o auxílio de ácido clorídrico (1:1), conforme ilustrado na figura 11. Os resíduos mais pesados são extraídos com o

emprego de cloreto de zinco ($D = 1,9$). As figuras de 12 a 19 ilustram esse procedimento. Para evitar a formação de agregados de matéria orgânica, lava-se inicialmente a amostra com ácido clorídrico (figs. 20-22) e adiciona-se metafosfato de sódio (fig. 23). A seguir, a amostra é agitada e deixada em repouso por uma hora (fig. 24). O excesso de metafosfato de sódio é retirado por meio de lavagem e centrifugação (fig. 25).

Nessa fase, a matéria orgânica estará pronta para ser analisada sob microscópio, uma vez que seja colocada em lâminas. Para isto, é necessário retirar um

pouco de resíduo do vidro (fig. 26) e colocá-lo em lâmnula previamente umedecida com goma de acácia (figs. 27 e 28). Com auxílio de um palito ou alça de platina, o resíduo é espalhado sobre a lâmnula (fig. 29). Para evitar qualquer tipo de contaminação, o palito é descartado, e, se utilizado o fio de platina, este deverá ser aquecido em bico de *bunsen*

até ficar rubro, para completa oxidação dos resíduos orgânicos, e a seguir mergulhado em vasilhame com álcool. O material orgânico que foi colocado na lâmnula deverá ser desidratado em chapa aquecedora (fig. 30). A montagem da lâmina é feita com bálsamo do Canadá ou produto similar, que garante preservação indefinida para o resíduo

orgânico (fig. 31). Essa lâmina, denominada total, deverá ser examinada em microscópio biológico com aumento entre 500 e 1 000 vezes (fig. 32).

Existindo palinomorfos, passa-se a uma segunda fase de processamento do resíduo orgânico, que consiste na subdivisão desse material total em duas frações, de-

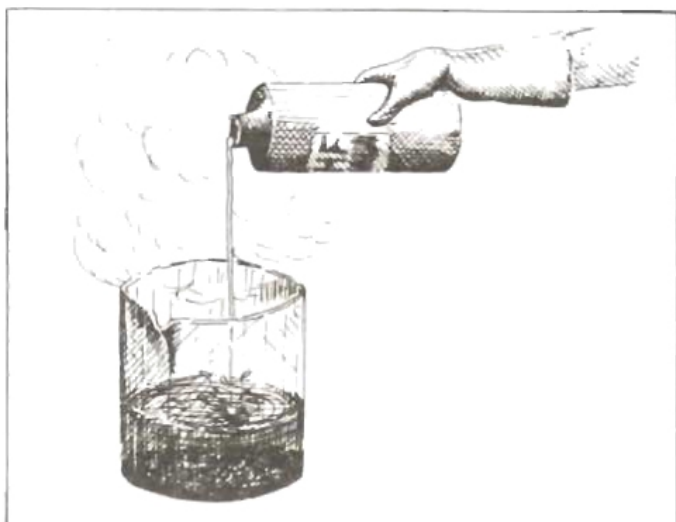


Fig. 5 - Colocar o material peneirado em um béquer plástico de 1 000 ml. Antes do ataque com HF, aqui ilustrado, cobrir o material com o dobro do volume de HCl (37%) e aguardar o fim da reação (em geral até 15 min). Comprovar se a reação prossegue com a adição de mais um pouco de ácido clorídrico. Lavar três vezes por centrifugação (vide figs. 7-9). Retornar o material a um béquer limpo e adicionar de 2 a 5 ml de H_2O_2 e HF em dobro do volume de material.



Fig. 6 - Deixar em repouso na capela pelo menos por 16 horas.



Fig. 7 - Decantar cuidadosamente o HF (se estiver límpido).

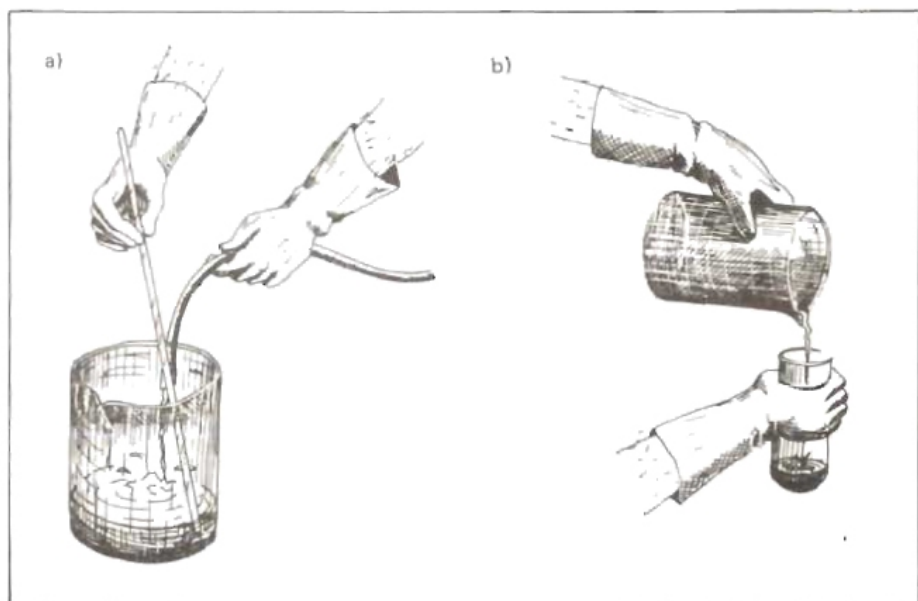


Fig. 8 - a) Adicionar um pouco de água e agitar com um bastão metálico; b) derivar a suspensão em tubo plástico de 250 ml até atingir aproximadamente dois terços da altura do tubo.

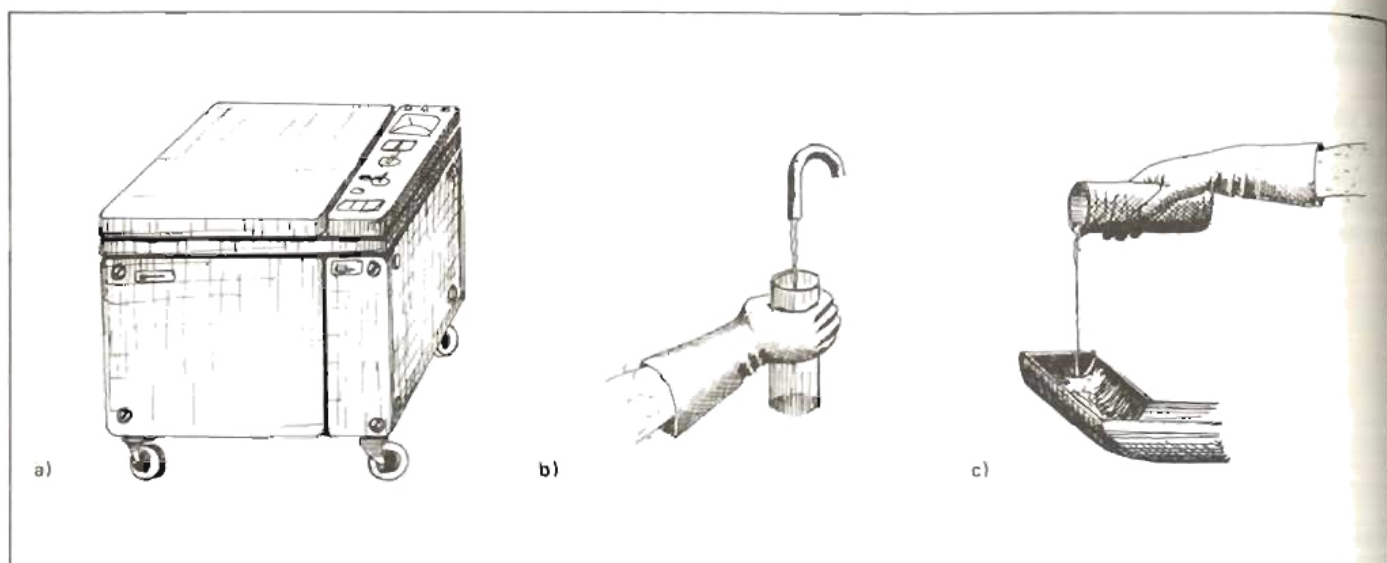


Fig. 9 - a) Centrifugar durante cinco minutos, a 1 200 rpm. Antes, certificar-se de que todos os tubos tenham aproximadamente o mesmo peso; b) adicionar água (altura máxima igual a dois terços da altura do tubo); c) se a água estiver límpida, decantá-la. Caso contrário, repetir a centrifugação. Em média, três centrifugações são suficientes.

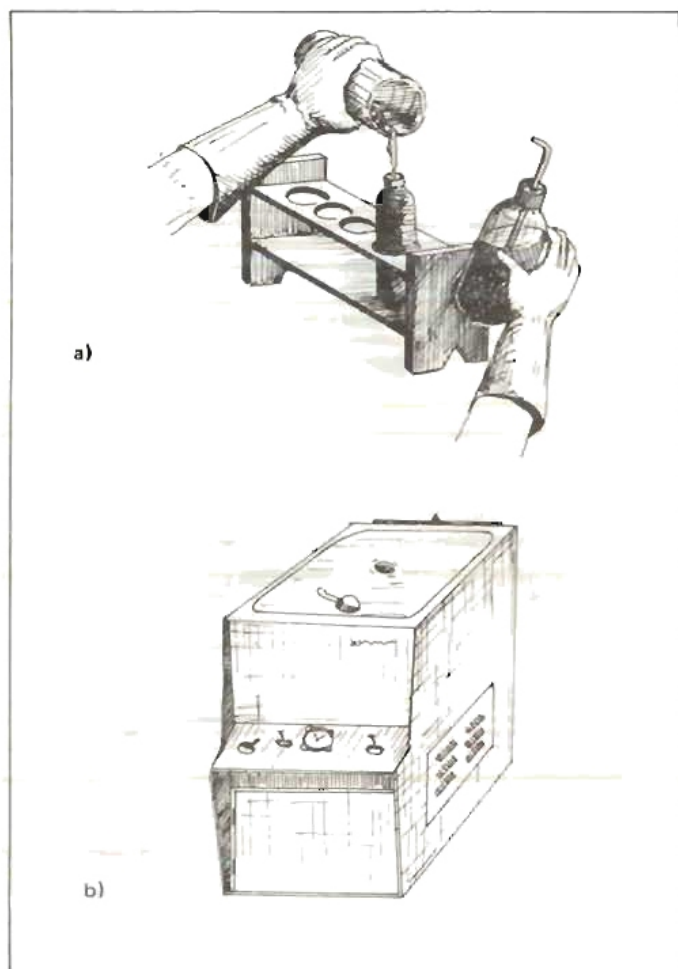


Fig. 10 - a) Com auxílio de um pissete com água desmineralizada e leves pancadas na base do tubo plástico, desprender o material de fundo e transferi-lo para um tubo de 50 ml (polipropileno); b) centrifugar durante cinco minutos, a 1 200 rpm.

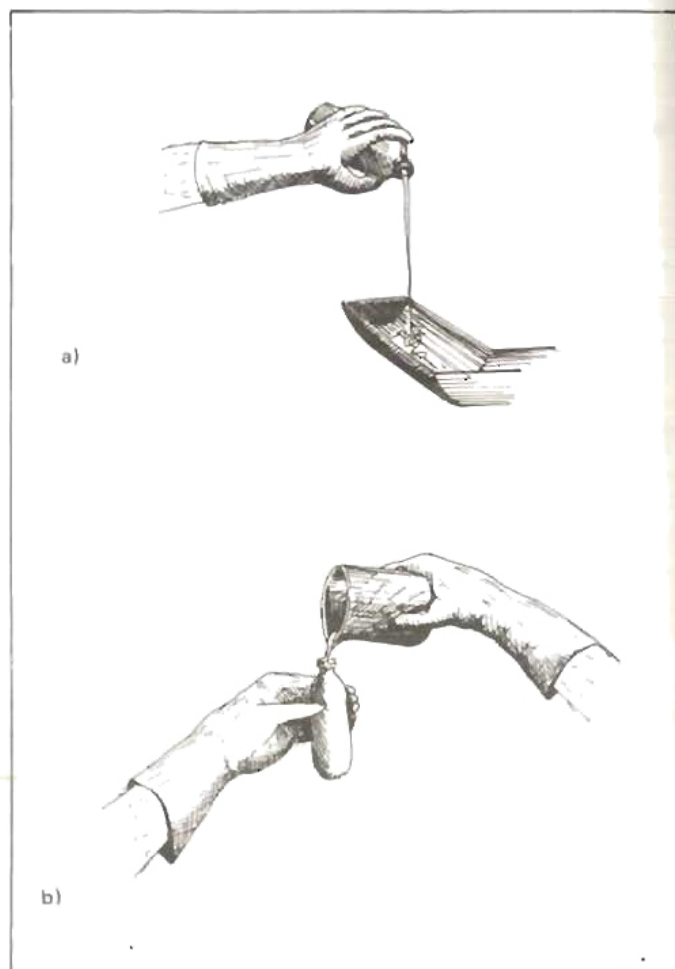


Fig. 11 - a) Decantar o líquido sobrenadante; b) adicionar HCl diluído (1:1) até próximo da boca.

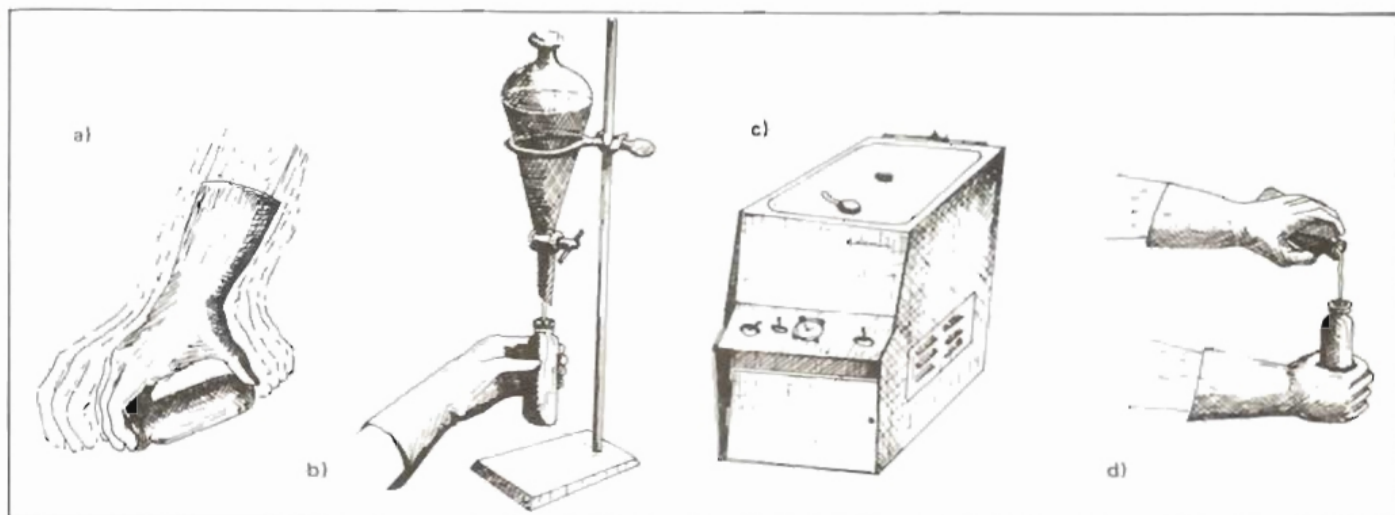


Fig. 12 - a) Agitar vigorosamente e centrifugar (5 min, 1 200 rpm); b) tendo decantado o HCl, adicionar cloreto de zinco, duas vezes o volume de resíduo. Agitar vigorosamente o tubo, para homogeneizar a suspensão; c) centrifugar (30 min, 1 500 rpm); d) após a primeira centrifugação, transferir o cloreto de zinco com a suspensão para um novo tubo de 50 ml, previamente limpo. Desprezar o resíduo de fundo. Após a transferência, adicionar cloreto de zinco até a metade do tubo de 50 ml. Centrifugar (30 min, 1 500 rpm).

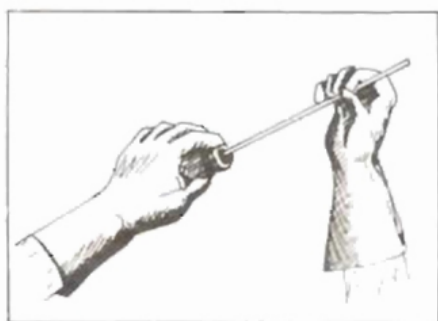


Fig. 13 - Soltar o colar sobrenadante de matéria orgânica das paredes do tubo com o auxílio de um bastão de vidro.

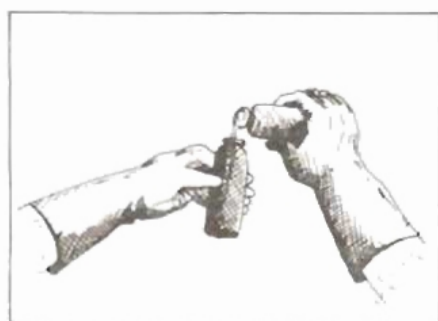


Fig. 14 - Transferir o colar para um novo tubo de 50 ml, evitando ao máximo a vinda da suspensão de cloreto de zinco sob o colar. Porém, se não se tiver formado colar, transferir um pouco da própria suspensão até cerca de um terço da altura do tubo.

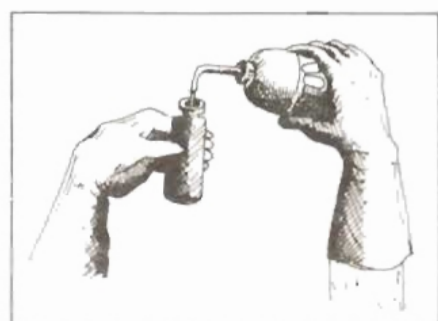


Fig. 15 - Completar até a boca com álcool e agitar vigorosamente.

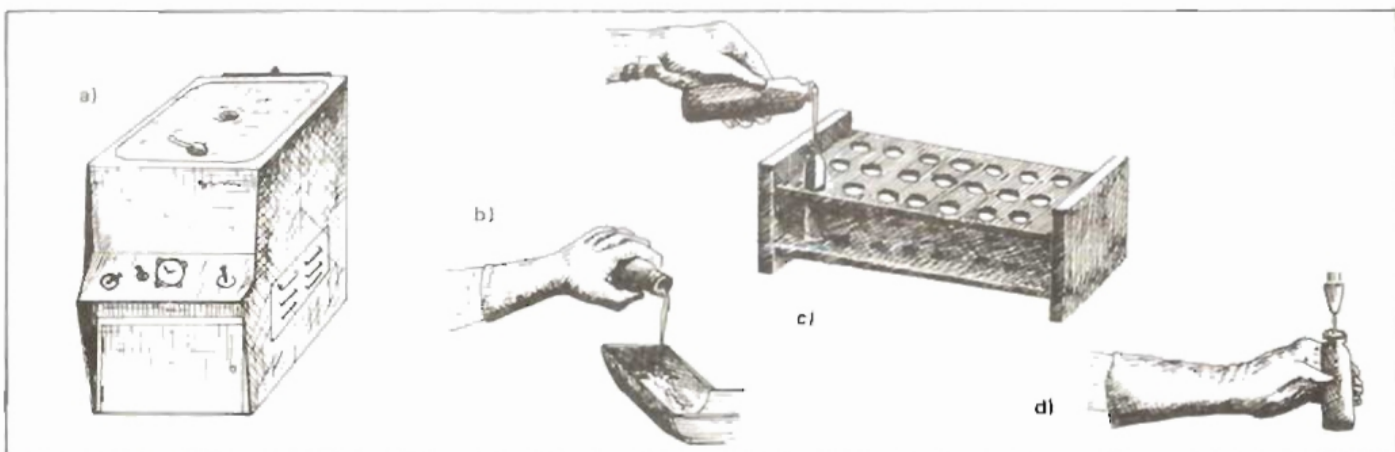


Fig. 16 - a) Centrifugar (5 min, 1 200 rpm); b) decantar o líquido sobrenadante; c) transferir o material para o tubo de vidro de 10 ml; d) adicionar água desmineralizada e agitar. Repetir mais uma vez a centrifugação e a decantação.

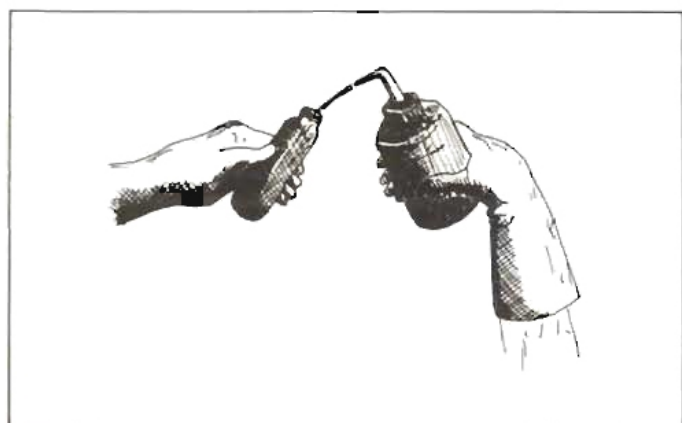


Fig. 17 - Com um pisete de água desmineralizada, desprender o material aderente às paredes do tubo de 50 ml e transferi-lo para o vidro de 10 ml. Repetir o processo enquanto necessário.

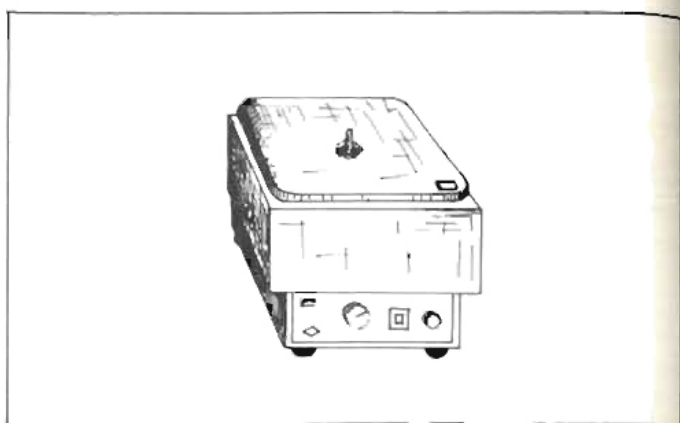


Fig. 18 - Centrifugar (1 min, 1 200 rpm).

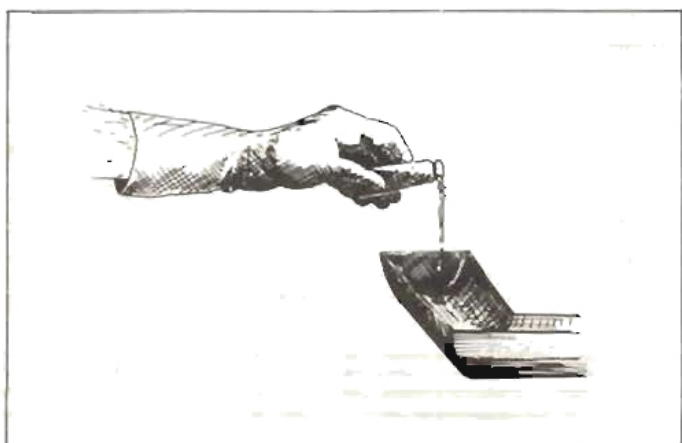


Fig. 19 - Decantar a água, se estiver límpida; caso contrário, repetir a centrifugação.

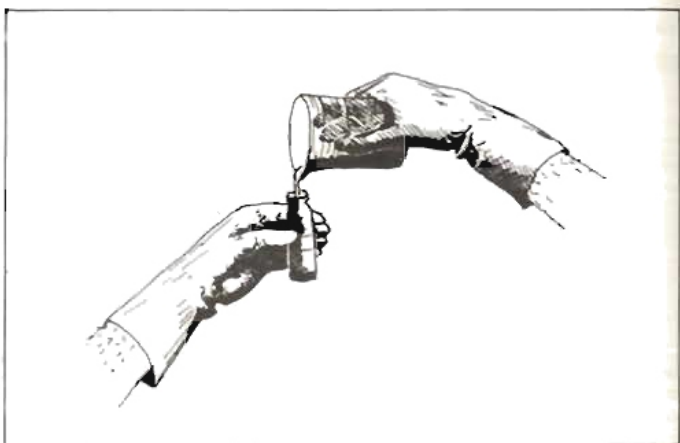


Fig. 20 - Encher o vidro com HCl diluído (1:1).



Fig. 21 - Agitar vigorosamente.

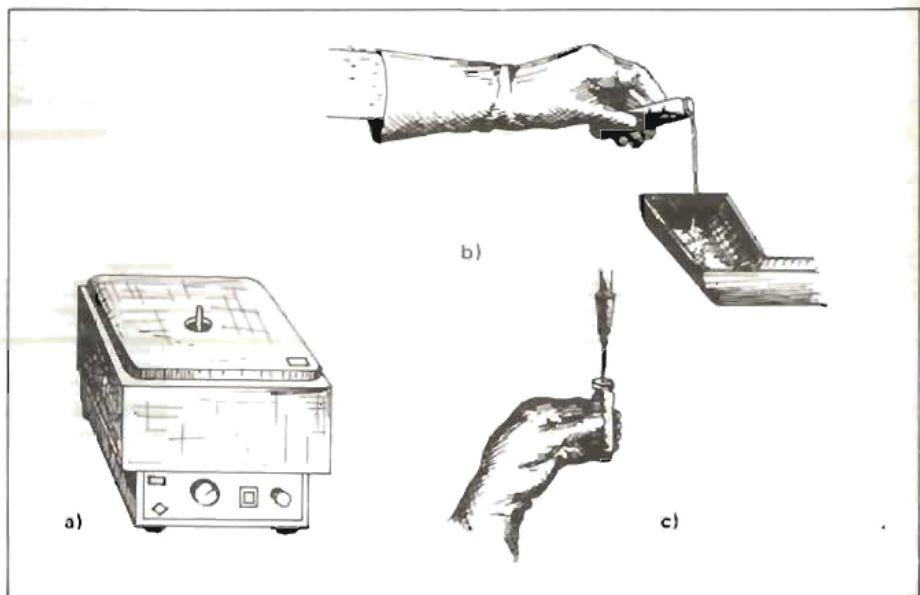


Fig. 22 - a) Centrifugar (1 min, 1 200 rpm); b) decantar o líquido sobrenadante; c) encher o vidro com água desmineralizada. Repetir a centrifugação e de-cantação mais duas vezes.

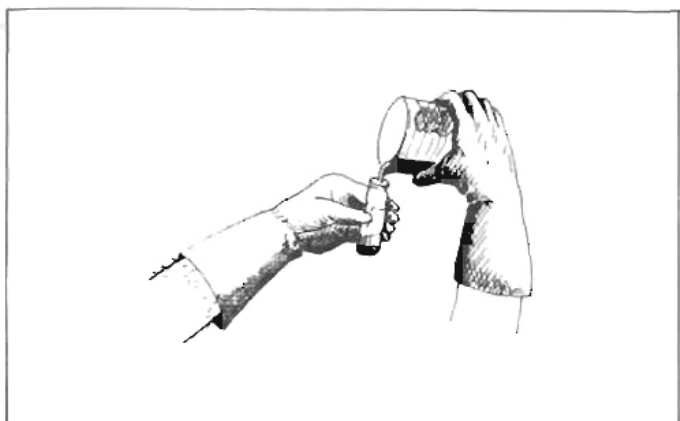


Fig. 23 - Encher o vidro com dispersante (metafosfato de sódio).

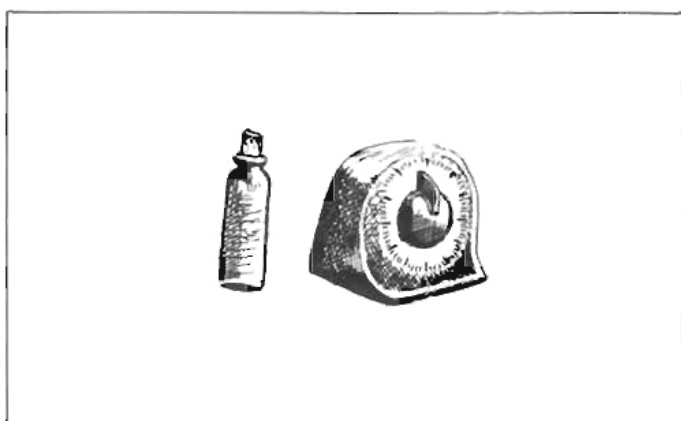


Fig. 24 - Após agitar, colocar a suspensão em repouso por uma hora.

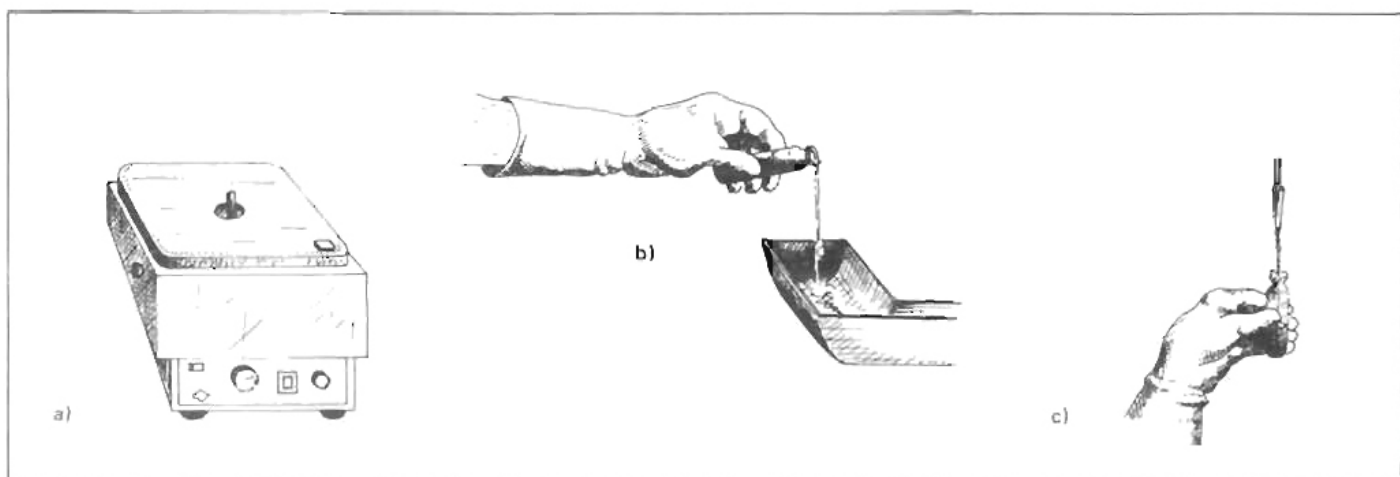


Fig. 25 - a) Centrifugar (1 min, 1 200 rpm); b) decantar o líquido sobrenadante; c) encher o vidro com água desmineralizada.



Fig. 26 - Retirar um pouco de resíduo orgânico com canudo de refresco.

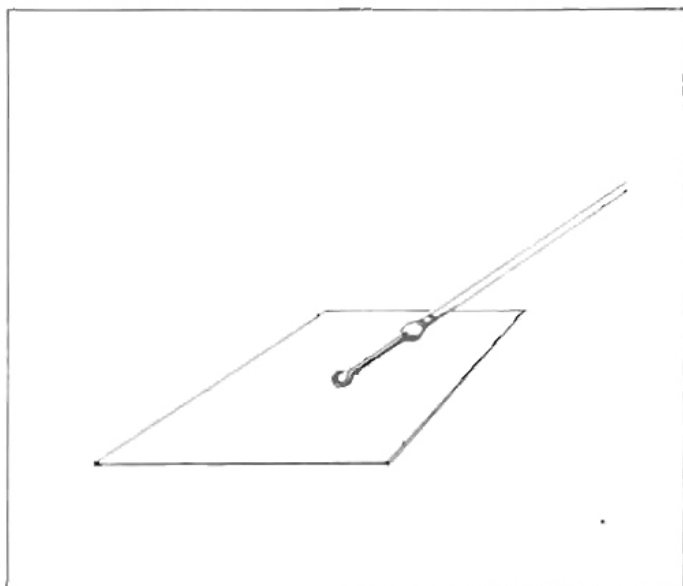


Fig. 27 - Espalhar sobre a lamínula (24 x 32 mm) goma de acácia com auxílio de alça de platina.

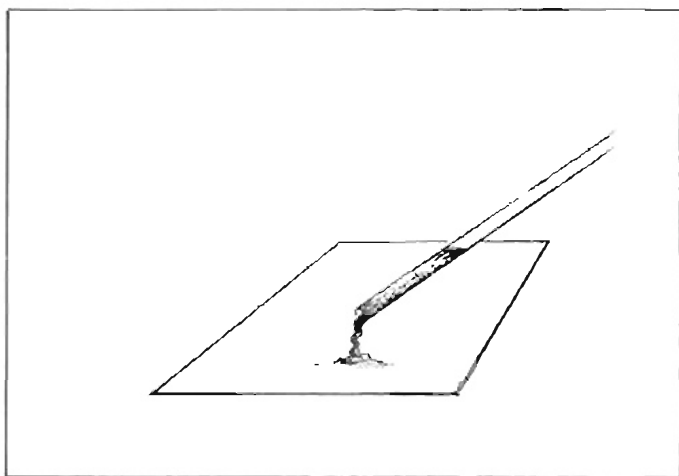


Fig. 28 - Colocar na lamínula uma gota do resíduo orgânico.

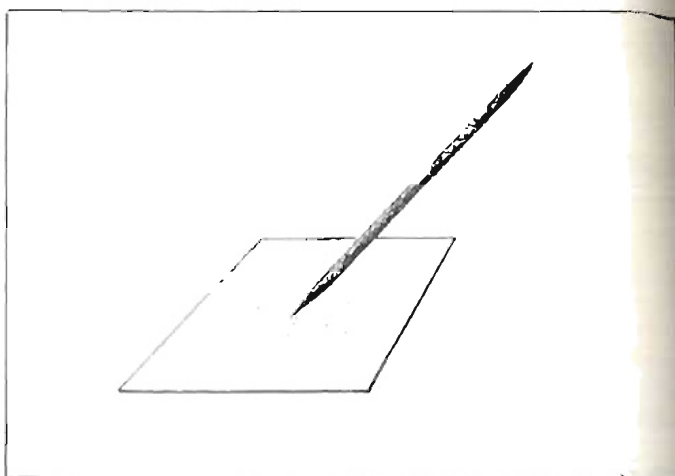


Fig. 29 - Com auxílio de um palito, espalhar o resíduo orgânico.

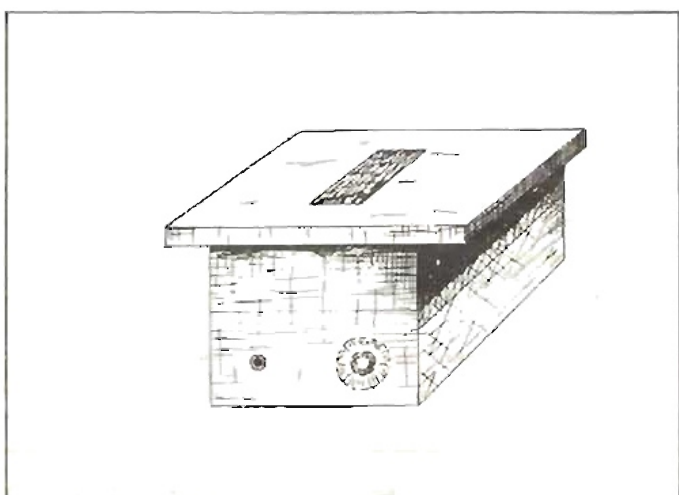


Fig. 30 - Colocar a lamínula com o resíduo orgânico em chapa aquecedora (35 a 40°C) até a evaporação da água.

nominadas fina e grossa (fig. 33). A fração grossa é colocada sob lupa binocular (fig. 34), onde será executado um trabalho de seleção dos microfósseis, como *Chitinozoa*, esporos e outros organismos. Para maior facilidade durante a seleção, utiliza-se como fundo um papel de filtro umedecido e com linhas numeradas, a fim de facilitar o trabalho de varredura (FREDERICO W. LANGE, comunicação pessoal). Para a recuperação de microfósseis desse papel de filtro, utiliza-se uma haste flexível (plástico ou pena de galinha) pontiaguda ou um palito. Esse tipo de recuperação visa complementar a perda, por falta de tensão superficial, de muitas formas quando a montagem da lâmina total é feita classicamente. Essa lâmina complementa, portanto, a lâmina total no que diz respeito aos espécimes maiores que 0,088 mm. Por intermédio do microscó-

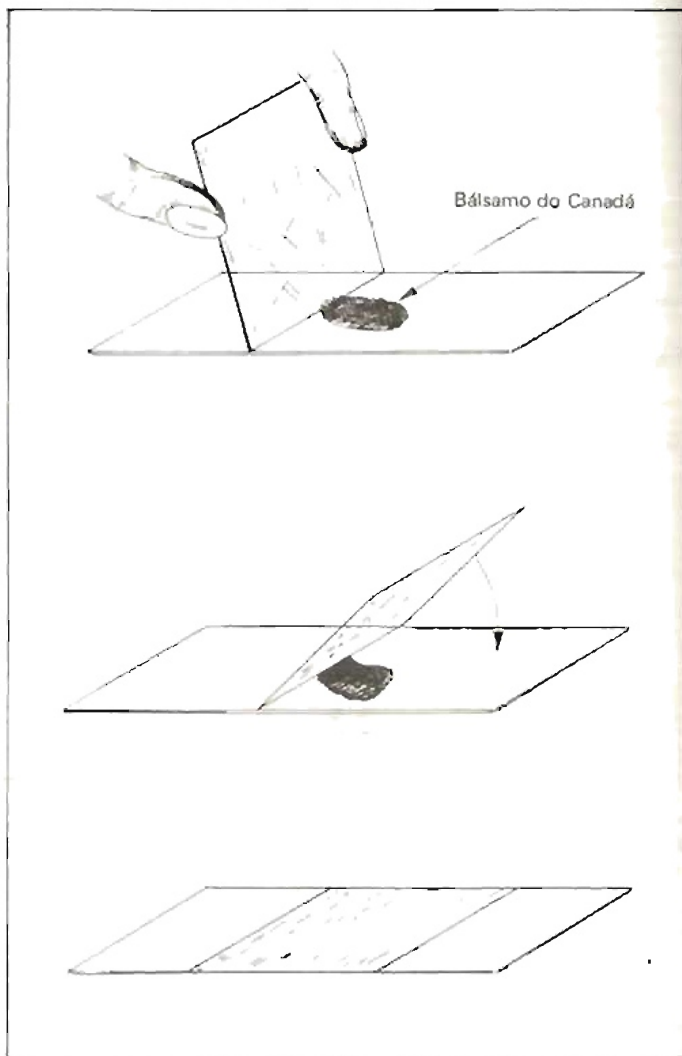


Fig. 31 - Colocar a lamínula com matéria orgânica sobre a lâmina (24 x 76 mm) com bálsamo do Canadá.

pio biológico (fig. 32), os resíduos orgânicos serão devidamente classificados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pesquisadores Frederico Waldemar Lange, Roberto Ferreira Daemon e Nâmio Uesugui, que nos transmitiram suas experiências relativas aos tratamentos palinológicos.

Agradecemos também ao colega Armando Hashimoto, pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

GRAY, J. Palynological techniques. In: KUMMEL, B. & RAUP, D., eds. *Handbook of paleontological techniques*. San Francisco, W. H. Freeman, 1965. p. 471-81.

UESUGUI, N. Palinologia: técnicas de tratamento de amostras. *B. téc. PETROBRÁS*, Rio de Janeiro, 22 (4), 1979. p. 229-40.

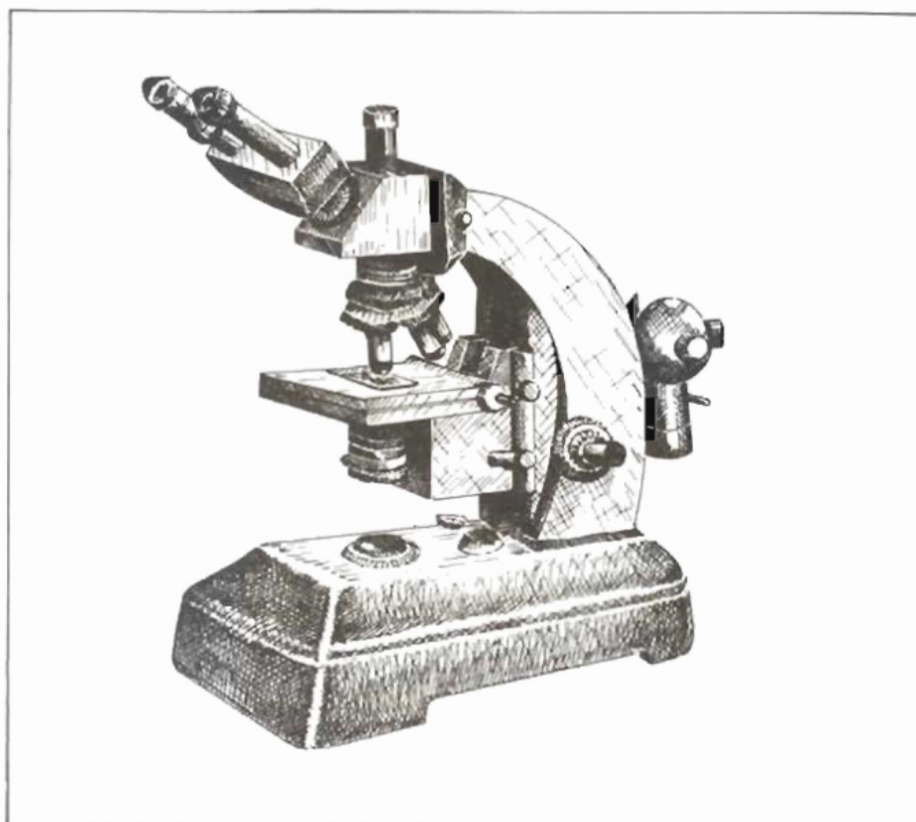


Fig. 32 - Após secagem do bálsamo do Canadá, examinar a lâmina total sob microscópio com aumento de 500 a 1 000 x.



Fig. 33 - Em sedimentos paleozóicos, é importante fracionar o resíduo orgânico total em grosso ($>0,088$ mm) e fino ($<0,088$ mm). Passar o resíduo em peneira de malha de 0,088 mm, colocando o material fino em vidrinho, para montagem de lâmina, e o material grosso em papel de filtro, para seleção dos microfósseis na lupa.

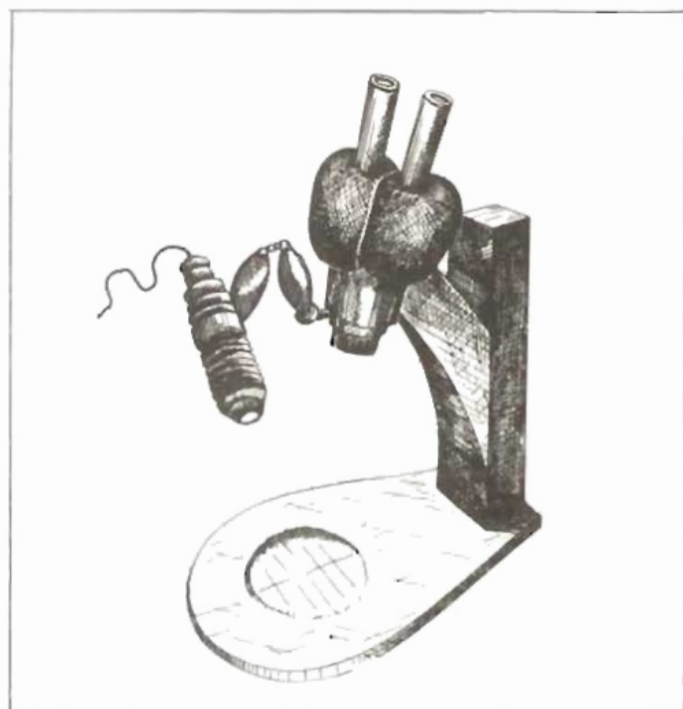


Fig. 34 - Em lupa binocular, com aumento entre 10 x a 50 x, selecionar os microfósseis e colocá-los em gotas de água desmineralizada em lamínula. Montar as lamínulas em lâminas como em 31 e examiná-las como em 32.

ABSTRACT

Non-oxidized pelitic sedimentary rocks normally contain some organic matter. It is necessary to submit them to treatment with acids in order to isolate this organic content from inorganic remainders. There are several ways to achieve this. The method herein described has currently been employed at the palynological laboratory of PETROBRÁS Research Center (Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello - CENPES).

Several chemical reagents, appropriate equipment and care in handling acids are indispensable requirements to successful palynological preparation. Since nearly all reagents added to the sample under treatment are to be eliminated, it is advisable to avoid addition of many of them; otherwise there will be an unnecessary waste of time.

Pre-Mesozoic sedimentary rocks may contain plant remains, pollen, spores, acritarchae, chitinozoa, fungi, scolecodonts, algae, foraminifera, etc. Recovery of chitinozoa in particular demands special techniques different from those usually employed for post-Paleozoic samples.

In most cases, oxidants (nitric acid, sodium chlorate and hydrogen peroxide) are to be avoided in the preparation of pre-Mesozoic samples, since this makes

classification of the recovered forms much easier. However, if the spores and pollens are too darkened by baking, oxidants are evidently required.

Illustrations accompanying a description of the preparation of palynological samples are intended to help the reader to understand the several steps.

The sample delivered to the laboratory should include information on provenance, stratigraphic position, depth (in the case of boreholes) and sedimentary basin. It is an ordinary procedure at CENPES to assign a registration number to the sample.

Ideally, the weight of a sample should be nearly 20 g for shales, and up to 60 g for limestones. Ditch samples must be carefully washed in flowing water so as to eliminate possible sources of contamination represented by drilling mud. Outcrop or core samples have to be crushed. Both ditch and crushed samples must be passed through a 2.83 mm sieve. Fragments above this in size would delay the acid corrosion, and may include cavings that would contaminate the sample.

The sieved material is put into a 1,000 ml plastic beaker. Limestones are first submitted to attack by 37% hydrochloric acid, followed by treatment with 42-52%

hydrofluoric acid. Shales, siltstones and mudstones are first tested for possible limestone cement by dropping some hydrochloric acid on the samples; if effervescence does occur, the subsequent attack should last some 30 min at least. Once the limestone is completely leached away, the next step will be the digestion of silica, the sample being left in rest in hydrofluoric acid for sixteen hours. Gloves, plastic safety glasses and an operating fume hood are indispensable when handling the hydrofluoric acid.

The next thing to do is to isolate the organic matter from inorganic remains that have not been destroyed by the acids. The suspension is eliminated by means of 1:1 hydrochloric acid. Heavier residues are extracted by using zinc chloride ($D = 1.9$). After this, the organic matter will be ready for microscopic inspection. Slides are assembled with Canada balsam or similar materials, so as to enable better preservation of the organic residues. Firstly, the organic matter is passed through a 0.088 mm sieve. The coarser fraction will be inspected under binocular lenses for recovery of chitinozoa, spores and other remains. This procedure is intended to compensate the loss of forms larger than 0.088 mm, due to lack of superficial tension, during mounting of total slides by classic methods. After this, the organic residues are finally ready for classification in a biological microscope.