



## ANÁLISE QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA DE RAIO-X POR DISPERSÃO ENERGIA (EDS): ADAPTAÇÃO APLICADA À RAÍZES DE DENDEZEIRO (*Eleais guineensis* JACQ.)

Adam da Cruz Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Catarina Siqueira Furtado<sup>2</sup>, Marcelo Murad Magalhães<sup>3</sup>, Fernanda Ilkiu-Borges<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural da Amazônia. adamcrodrigues@gmail.com

<sup>2</sup> Graduando em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural da Amazônia. furtadoanacatarina@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Lab. de Análise de Sistemas Sustentáveis, marcelo.magalhaes@embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Botânica, fernanda.ilkiu@embrapa.br

**Resumo:** Espectrometria de raios-x por dispersão de energia (EDS) é uma análise realizada por um equipamento acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) que permite fazer uma avaliação química qualitativa e semiquantitativa de amostras. A microscopia eletrônica de varredura é um método amplamente utilizado em diversas áreas de estudo. Este trabalho objetivou desenvolver um protocolo para análise da composição química de células dos tecidos de raízes de dendezeiro (*Eleais guineensis* Jacq.) por EDS. Vários ensaios foram realizados seguindo método padrão, com modificações, até a seleção de procedimento ideal para análise de raízes de dendezeiro. As amostras de raízes de *E. guineensis* devem ser coletadas e fixadas em FAA 50% ou FNT. Para submissão ao ponto crítico o material deve ser seccionado no tamanho máximo de 0,5 cm de altura, após desidratação em série alcoólica etílica, para posterior metalização em ouro. As raízes devem ser seccionadas e os pontos devem ser uniformemente distribuídos entre tecidos específicos. Os pontos de leitura apresentaram resultados mais consistentes quando localizados no conteúdo celular. Quando o ponto é posicionado na parede celular dos tecidos, torna-se difícil a detecção de alguns elementos químicos. O procedimento do ponto crítico é fundamental para obtenção de melhores resultados. A análise química semiquantitativa em EDS é um método que, quando devidamente conduzido, pode contribuir com estudos em diversas áreas do conhecimento.

**Palavras-chave:** MEV, protocolo, semiquantitativo, qualitativo

### Introdução

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método amplamente utilizado em diversas áreas de estudo, pois fornece informações através de detalhes, em aumentos de até 300.000 vezes dependendo do equipamento utilizado (DUARTE et al., 2003). As imagens eletrônicas são geradas por meio da incidência de um feixe de elétrons, sob condições de vácuo, gerando diversos efeitos na superfície da amostra, destacando-se a emissão de elétrons, os quais são captados para gerar as imagens, e a ionização de átomos, que produz os raios-x (COSTI, 2013; DUARTE et al., 2003).

A análise química por espectroscopia de raios-x por dispersão de energia (EDS), é uma análise realizada por um equipamento acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, que permite fazer uma



avaliação qualitativa e semiquantitativa, a partir da emissão de raios-x característicos; tal artifício permite a indicação da presença de elementos químicos em diversos tipos de componentes da amostra, seja mineral ou orgânico (COSTI, 2013; DUARTE et al., 2003). Na botânica, este procedimento é bastante utilizado para a identificação da composição química de cristais muito presentes em tecidos vegetais, principalmente nas folhas.

A cultura do dendezeiro é uma cultura de grande importância econômica no mundo todo, devido o grande mercado consumidor que possui, principalmente no Brasil. Tem sido um dos principais objetos de estudo nas últimas décadas devido à doença Amarelecimento Fatal (AF), que ainda possui causa desconhecida. Durante a realização dos ensaios para cumprimento de atividades relacionadas à anatomia de órgãos vegetativos de dendezeiro foi observado que o método padrão de preparo de amostras para análises em EDS não era adequado para raízes, portanto, foi percebida a necessidade de desenvolver um protocolo ideal para observação desse órgão. Tendo isso em vista, este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para análise da composição química de células dos tecidos de raízes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) por EDS.

### **Material e Métodos**

Vários ensaios foram realizados seguindo método padrão, com modificações, até a seleção de procedimento ideal para análise de raízes de dendezeiro. Foram coletadas amostras de raízes de cinco plantas de *E. guineensis* Jacq., do tipo Tenera, sob condições de campo, em uma área pertence a empresa MARBORGES Agroindústria S.A.

As raízes coletadas foram cortadas em tamanhos de 10, 5 e 3 cm e imediatamente fixadas em FAA 50% (Formol, Álcool e Ác. Acético) e FNT (Formalina Neutra Tamponada), onde foram mantidas por 7, 5 e 2 dias até troca para álcool etílico 70%, para conservação (DEMARCO, 2012).

Posteriormente, as amostras foram seccionadas no tamanho máximo de 0,5 cm de altura e selecionados aleatoriamente para serem desidratados em bateria alcoólica de 70%-100%, por um período de 1:30 horas, por tratamento. Parte das amostras foram submetidas ao procedimento de ponto crítico para posterior metalização em ouro, procedimento obrigatoriamente necessário à microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS) (POTIGUARA et al., 2013). As amostras que não passaram por esse estágio, foram secas ao ar e submetidas diretamente à metalização. As raízes foram seccionadas no plano transversal, de forma que na mesma imagem pudessem ser selecionados 30 pontos uniformemente distribuídos entre 4 tecidos das raízes: aerênquima, endoderme, xilema e floema. As análises foram realizadas no Laboratório de Microanálises - MEV – MICROSSONDA – do Instituto de Geociências da UFPA. O equipamento utilizado foi o MEV modelo LEO-1430, com EDS Sirius-Gresham acoplado.

As condições para as análises em EDS foram: corrente do feixe de elétrons = 90  $\mu$ A, voltagem de



aceleração constante = 20 kv, distância de trabalho = 15 mm. Tempo de contagem para análise dos elementos = 30 s. Tais parâmetros são padrões de análise estabelecidos pelo laboratório para esse equipamento, onde variaram apenas a ampliação das imagens devido a diferença de tamanho em diâmetro entre as amostras. Foram observados os elementos químicos alumínio, cálcio, enxofre, fósforo, silício e zinco.

### **Resultados e Discussão**

A partir dos ensaios realizados, observou-se que os dois fixadores utilizados se mostraram eficientes na conservação dos tecidos, independentemente do tempo de exposição das amostras, ou seja, o fixador utilizado será escolhido de acordo com as substâncias que se deseja analisar nas amostras, uma vez que o FAA é mais eficiente na conservação de substâncias hidrofílicas e o FNT na conservação de substâncias lipofílicas presentes nas células (DEMARCO, 2012).

A fixação dos materiais se mostrou mais eficiente nas amostras cortadas abaixo dos 5cm, uma vez que o fixador pode penetrar melhor nos tecidos do córtex, agindo de forma mais eficiente, sem bolhas de ar dentro dos tecidos. Isso ocorre porque o fixador não penetra de forma eficiente pela epiderme da raiz, devido uma camada de células imediatamente abaixo da epiderme, que conforme as raízes vão envelhecendo, tornam-se mais lignificadas, conferindo maior rigidez às raízes mais velhas e maiores em diâmetro (CARVALHO, 2000).

Em relação a fase de ponto crítico, as amostras que não passaram por esse estágio apresentaram rasgaduras, isto é, células rompidas, além de perda de conteúdo celular nos tecidos mais frágeis, como parênquimas e o aerênquima. No entanto, as amostras submetidas ao ponto crítico, permaneceram muito bem conservadas e sem danos na fase final de análise, ficando evidente que o ponto crítico é essencial para a obtenção de resultados, uma vez que preserva melhor os tecidos da amostra e o conteúdo das células, tornando mais consistente e facilitando a obtenção dos dados pelo equipamento, pois evita discrepância entre as leituras nos diferentes pontos de interesse.

A leitura dos elementos químicos pelo equipamento depende muito da localização do ponto. Os pontos selecionados apresentaram resultados de leitura mais consistentes quando localizados no conteúdo celular dos tecidos analisados, ou seja, com resultados acima de 1% (limite de detecção considerado). Os melhores resultados de leitura foram obtidos no aerênquimas e endoderme, por causa da maior presença de conteúdo nas suas células. Quando o ponto de leitura é posicionado na parede celular dos tecidos, torna-se difícil a detecção de alguns elementos, uma vez que a parede celular é uma estrutura composta basicamente de celulose e outros elementos estruturais como a lignina. Carvalho (2000), observou, em raízes de dendezeiro, que em alguns tecidos na camada interna do córtex, próximos ao cilindro vascular como a endoderme, por exemplo, também tendem a se lignificar com o envelhecimento.



### **Conclusões**

Foi desenvolvido um protocolo para análise da composição química de células dos tecidos de raízes de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) por EDS, observando que o preparo adequado das amostras é essencial para obtenção de resultados mais confiáveis. Os procedimentos que devem ser consideradas para análises de raízes de dendezeiro são: as amostras devem ter tamanho inferior a 5cm quando fixadas em FAA ou FNT, para melhor fixação dos tecidos; as secções, com até 0,5 cm de altura devem ser submetidas ao ponto crítico, garantindo a máxima preservação do conteúdo celular, onde os pontos de leitura devem ser localizados prioritariamente. Dessa forma, esse trabalho vai contribuir para a otimizar estudos em raízes desta espécie, que utilizem a técnica MEV/EDS, em diversas áreas do conhecimento.

### **Agradecimentos**

Ao Instituto Tecnológico Vale (ITV) e ao Laboratório de Microanálises da Universidade Federal do Pará pelo suporte à pesquisa e à FADESP pela concessão da bolsa.

### **Referências Bibliográficas**

- CARVALHO, C. J. R. de. Ecofisiologia do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: VIÉGAS, I. de J. M.; MÜLLER, A. A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 89-124.
- COSTI, H. T. Análises químicas semiquantitativas por espectroscopia de Raio-x por dispersão de energia (EDS). In: POTIGUARA, R. C. V.; SILVA, R. J. F.; KIKUCHI, T. Y. P. S.; LUCAS, F. C. A.; MACEDO, E. G. (Org.). **Estruturas vegetais em microscopia eletrônica de varredura**. Belém, PA: Museu Paraense Emílio Goeldi: Universidade do Estado do Pará, 2013.
- DERMARCO, D. **Curso: Técnicas em anatomia vegetal**. Belém, PA: Universidade Federal do Pará: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2012. 34 p. Apostila.
- DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.
- POTIGUARA, R. C. V.; SILVA, R. J. F.; KIKUCHI, T. Y. S.; LUCAS, F. C. A.; MACEDO, E. G. (Org.). **Estruturas vegetais em microscopia eletrônica de varredura**. Belém, PA: Museu Paraense Emílio Goeldi: Universidade do Estado do Pará, 2013. 116 p.