

## AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE OXIDAÇÃO COMUMENTE EMPREGADAS NA LIMPEZA DE VALVAS SILICOSAS

Rosemeri Segecin Moro \*

Valmir de Santi \*\*

Simone Segecin \*\*\*

### Resumo

Um estudo da viabilidade de oito métodos de oxidação de sedimento, levando em conta a facilidade de sua execução, rapidez e boas condições de preservação e limpeza da valva de diatomácea, indicou os métodos de Moreira Filho e Teixeira (1963), Patrick e Reimer (1966), Battarbee (1986) e Florin (s/d), de oxidação moderada a branda, como os de melhor desempenho. Os métodos de Valente-Moreira (1975), Simonsen (1974), De Oliveira (1985) e Kühn *et al.* (1981) não apresentaram resultados satisfatórios em comparação com os citados. Elaborou-se um roteiro detalhado de procedimentos, com indicação precisa de volumes e concentrações empregados, bem como o tempo de duração das diversas etapas.

### Abstract

This paper checks eight methods for sediment diatoms cleaning, comparing performing facilities time spending and good preservation of valves. Moreira Filho & Teixeira (1963), Patrick & Reimer (1966), Battarbee (1986) and Florin (wd) were performed

better than Valente-Moreira (1975), Simonsen (1974), De Oliveira (1985) and Kühn *et al.* (1981). Laboratory guidelines of all were provided.

### Introdução

Diatomáceas são microalgas marrom-douradas (Bacillariophyceae), extremamente disseminadas em lagos, rios e mares, cujos conteúdos celulares estão inclusos em duas paredes celulares, as valvas, impregnadas de sílica. Ao morrer, as valvas de diatomáceas tornam-se incorporadas ao sedimento de fundo desses corpos d'água e constituem alguns dos mais abundantes e comuns microfósseis em depósitos lacustres e marinhos (BRADBURY, 1988).

Uma extensa gama de interpretações sobre as condições pretéritas de um corpo d'água e, por extensão, do paleoambiente ao seu redor, pode ser obtida a partir da determinação da comunidade fóssil de diatomáceas, como pH, composição química, salinidade, estado trófico, profundidade, grau de turbulência e estratificação, entre outros.

Estas interpretações são objeto de estudo da paleolimnologia, parte da ecologia especializada no estudo do passado de lagos e outros corpos de água

\* Doutoranda em Biologia Vegetal. Docente da UEPG.

\*\* Especialista em Química. Docente da UEPG.

\*\*\* Mestre em Ciências Biológicas. Docente da UNIPAR.

doce. A reconstrução da história desses locais pode fornecer informações preciosas quanto ao impacto de desmatamentos e incêndios, bem como mudanças climáticas ocorridas ao longo do tempo (DAVIS, 1989).

O estudo dessa comunidade fóssil compreende a determinação, ao microscópio, dos gêneros, das espécies e das variedades de diatomáceas depositados no local, levando-se em consideração, entre outros, aspectos morfológicos, como poros, fendas, e demais detalhes da parede celular silicosa.

Para a perfeita observação desses detalhes morfológicos, há a necessidade de se providenciar a limpeza das valvas através de processos oxidativos mais ou menos rigorosos. Tal oxidação, entretanto, não pode ser tão branda que deixe as valvas impregnadas de restos orgânicos, nem tão intensa que destrua partes da estrutura.

Os diversos métodos citados na literatura especializada variam consideravelmente entre si no que diz respeito ao emprego e concentração de reagentes, bem como no tempo de exposição a esses agentes oxidantes. Notou-se também que muitos autores omitem detalhes de seus procedimentos, gerando dúvidas a quem for repetir a técnica.

Neste trabalho, pretendeu-se estudar a viabilidade de diversos métodos aplicados a um sedimento lacustre (Lagoa Dourada - Parque Estadual de Vila Velha - Ponta Grossa - PR), levando em conta a facilidade de sua execução, rapidez e boas condições de preservação e limpeza da valva. O objetivo principal foi elaborar um roteiro detalhado de procedimentos, bem como o tempo de duração das diversas etapas, possibilitando aos usuários em potencial a possibilidade de escolha do método mais conveniente.

## 1. Procedimentos Metodológicos

Foram empregadas sub-amostras de 1 cm<sup>3</sup> cada, de sedimento superficial, isto é, lodo do fundo da lagoa.

Foram testadas oito técnicas de oxidação consideradas moderadas: Calcinamento (VALENTE-MOREIRA, 1975), MOREIRA FILHO e TEIXEIRA (1963), BATTARBEE (1986), DE OLIVEIRA (1985), FLORIN (s/d), SIMONSEN (1974), PATRICK e REIMER (1966) e KUHN *et al.* (1981), e duas variações.

Optou-se por não testar MULLER-MELCHERS e FERRANDO (1956) por tratar-se reconhecidamente de um método de oxidação violenta, à base de ácido sulfúrico e ácido nítrico, a quente.

Para todas as técnicas, anotaram-se cuidadosamente as concentrações e volumes utilizados, bem como o tempo necessário para a execução de cada operação, detalhes omitidos na maioria das metodologias consultadas na literatura especializada.

Todas as centrifugações, quando não houver indicação diversa, foram realizadas a 1.500 rpm por 2 minutos (MOREIRA FILHO e TEIXEIRA, 1963)

Após o término de cada teste, o material foi decantado por 10 dias; após o quê, foram verificadas, ao microscópio ótico, as condições de preservação do material e sua abundância.

Confeccionaram-se lâminas semipermanentes do sedimento, usando-se glicerina a 50%. O material foi observado num fotomicroscópio Carl Zeiss, em aumentos de 400 e 1000 vezes.

Para o estudo comparativo entre os diversos métodos, foram considerados os seguintes parâmetros:

a) Facilidade de execução do método - com relação aos reagentes de fácil obtenção e manipulação; à necessidade ou não de equipamento especial; à segurança da execução. Os métodos testados foram classificados em muito fácil, fácil, regular, difícil e muito difícil.

b) Rapidez na execução das etapas - os métodos testados foram classificados em muito rápido, rápido, regular, lento e muito lento.

c) Condições de limpeza da valva - com relação à inexistência de restos orgânicos aderidos à parede e às condições de preservação da valva. As condições

foram classificadas em excelente, boa, regular, ruim e péssima.

## 2. Resultados e Discussão

A seguir, transcrevem-se as técnicas da maneira que se apresentam nos originais consultados, seguidas das modificações e observações, julgadas relevantes, que surgiram no decorrer do trabalho:

### 2.1 Valente-Moreira (1975) - Calcinamento

Colocar a amostra diretamente sobre a lamínula e levar à mufla a 1000°C, até que o sedimento se torne cinzento ou amarronzado.

#### Observações:

Duração média da técnica: 5 h (3h para atingir a temperatura desejada, 1 h na mufla e 1 h para resfriar o sedimento);

- a 1000°C verificou-se que a lamínula funde; deve-se colocar o sedimento em um cadinho de porcelana;

- após a exposição, algumas frústulas apresentaram-se íntegras, com as estrias bem visíveis, porém houve acúmulo de detritos por fora da parede; outras apresentaram contorno impreciso, possivelmente devido à destruição de parte da parede;

- prolongou-se a calcinação por mais 4 horas a 400°C, mas não se obtiveram melhores resultados.

### 2.2 Moreira Filho e Teixeira (1963)

a) Tomar 0.5 g da amostra homogeneizada e ferver 10 minutos em 20 ml de HCL a 50%.

b) Após repouso de 12 horas, submeter o sedimento à solução de  $\text{KMnO}_4$  a 10% durante 24 horas, em estufa a 35-40°C.

c) Após esse tempo, passar a amostra para um cadinho de porcelana e adicionar 2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.; cobrir a mistura com  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 volumes, tomando precaução quanto à emanação de gases.

d) O sedimento obtido, após 6 horas de repouso, é lavado cinco vezes com água destilada em centrífuga.

#### Observações:

Duração média da técnica: 44 horas;

- iniciar o trabalho com a amostra já num tubo de centrífuga de aproximadamente 10 ml. (Não há necessidade de passar ao cadinho de porcelana para o tratamento com ácido sulfúrico);

- após o primeiro tratamento, com HCl a 50% (diluiu-se ácido concentrado 1:2), a amostra foi centrifugada 3 min. e o sobrenadante desprezado;

- sobre o sedimento foram colocados 10 ml de solução de  $\text{KMnO}_4$  a 10%;

- novamente a amostra foi centrifugada, por 3 min., e o sobrenadante desprezado;

- lavou-se o sedimento com água destilada, centrifugando-se por 2 min.;

- sobre o sedimento foram colocados 2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. (Esta reação é fortemente exotérmica e deve-se acrescentar o ácido lentamente, pelas paredes do tubo); após isso, completou-se o volume até 10 ml com  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 volumes, também muito lentamente (há desprendimento de gás). O sedimento torna-se branco;

- pode ocorrer perda do material menos denso pela excessiva manipulação de sobrenadantes;

- a reação exotérmica pode provocar acidentes.

### 2.3 Patrick e Reimer (1966)

Recomenda-se que a limpeza de diatomáceas fósseis seja feita de acordo com o substrato em que estão imersas. Se for calcareo:

a) Tratar a amostra com HCl 10%, para remover

carbonatos, aquecendo por 20 minutos.

Se também houver matéria orgânica.

b) Tratar em seguida com dicromato de potássio em  $\text{HNO}_3$  concentrado, a quente (adicionar o volume necessário para deixar a amostra marrom). Se houver argila.

c) Usar  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30%.

Em todos os casos, após:

d) Lavar repetidas vezes, por centrifugação ou decantação, com água destilada, até o pH atingir 7.

#### Observações:

Duração média da técnica: 1,5 hora;

- iniciar o trabalho com a amostra num béquer de 50 ml;

- a amostra foi tratada com 25 ml de HCl 10%, em fogo brando;

- a solução de dicromato de potássio em  $\text{HNO}_3$  empregada foi o Reativo de Agulhon, preparado dissolvendo-se 0,5 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em 100 ml de  $\text{HNO}_3$  (em capela);

- na amostra em estudo, 4 ml da solução acima foram suficientes para deixar a amostra marrom;

- as valvas apresentaram-se íntegras, com as estrias bem visíveis, com pouco acúmulo de detritos pela parede;

- pode ocorrer perda do material menos denso pela excessiva manipulação de sobrenadantes.

#### 2.4 Simonsem (1974), mod. por Moreira Filho e Valente-Moreira (1981)

a) Passar 1  $\text{cm}^3$  da amostra para um tubo de centrifuga de 12 ml e desmanchar o sedimento em água destilada;

b) Centrifugar a 1.000 r.p.m. por 2 minutos.

c) Lavar, com água destilada, pelo menos mais três vezes, desprezando o sobrenadante a cada centrifugação.

d) Sobre o sedimento adicionar 1,5 ml de solução saturada de  $\text{KMnO}_4$  e deixar agir por 24 horas em temperatura ambiente.

e) Adicionar à mistura cerca de 2,5 ml de HCl concentrado.

f) Aquecer em banho-maria a cerca de  $50^\circ\text{C}$ , o tempo que for necessário, para que a mistura adquira coloração amarelo-pálida.

g) Centrifugar a 1.000 r.p.m. por 2 minutos, desprezando o sobrenadante.

h) Lavar, com água destilada, pelo menos mais cinco vezes.

#### Observações:

Duração média da técnica: 97 horas.

- foram necessárias 72 h no Banho-Maria para que a mistura adquirisse coloração amarelo-pálida;

- as frústulas se apresentaram íntegras, com as estrias bem visíveis, mas acumularam-se detritos pelas paredes;

- pode ocorrer perda do material menos denso pela excessiva manipulação de sobrenadantes;

- pode haver destruição do material após certo tempo de estocagem, porque não há preocupação em se controlar o pH final do sedimento limpo.

#### 2.5 De Oliveira (1985)

a) Colocar 1  $\text{cm}^3$  da amostra em um bequer.

b) Digerir a amostra em 70 ml de ácido nítrico concentrado, a quente, por 20 minutos, ou até que toda matéria orgânica visível seja removida.

c) Após resfriar, centrifugar as amostras em baixíssima rotação entre 10 e 30 minutos.

d) Lavar, centrifugando repetidas vezes com água destilada até o sobrenadante atingir pH em torno de 5 ou 6.

#### Observações:

Duração média da técnica: 5 horas.

- a digestão foi realizada em B.M. a  $50^\circ\text{C}$  por 3 horas. Foram utilizados 10 ml de  $\text{HNO}_3$  em um tubo de centrifuga de 12 ml;

- a primeira centrifugação durou 15 minutos; as

demais, em número de quatro, 7 minutos cada uma;  
- pode ocorrer perda do material menos denso pela excessiva manipulação de sobrenadantes.

### 2.6 Battarbee (1986)

a) Secar a amostra em temperatura ambiente até peso constante. Manter em um dessecador.

b) Manter a amostra numa solução de  $H_2O_2$  a 30% durante 24 horas numa estufa ou B.M. a  $50^\circ C$ .

c) Lavar pelo menos três vezes, por centrifugação, com água destilada.

d) Se a amostra for calcárea, tratar também o sedimento, adicionando HCl a 10%. Deixar 15 minutos a  $50^\circ C$ .

e) Lavar repetidas vezes, por centrifugação, com água destilada.

#### Observações:

Duração média da técnica: 49 horas; como o clima desta região é úmido, substituiu-se a secagem em temperatura ambiente por estufa a  $30^\circ C$  por 24 horas. Foram utilizados 20 ml de solução de  $H_2O_2$  a 30% (feita a partir de uma solução a 100 volumes);

- a amostra não foi tratada com HCl;

- pode ocorrer perda do material menos denso pela excessiva manipulação de sobrenadantes.

### 2.7 Florin (s/d)

a) Cobrir a amostra com  $H_2O_2$  a 30%, a frio, pelo menos por 12 horas.

b) Se necessário, aquecer lentamente até fervura por 5 a 10 segundos.

#### Observações:

Duração média da técnica: 13 horas;

- testou-se também uma variante utilizando  $H_2O_2$  a 30 volumes;

- centrifugou-se por 5 vezes com água destilada.

### 2.8 Kuhn *et al.* (1981)

a) Colocar a amostra em um béquer de 1000 ml com 200 ml de  $H_2O_2$  a 27%, deixando por pelo menos 2 horas.

b) Usando a mão, enluvada em borracha, separar cuidadosamente o sedimento.

c) Acidificar a amostra e lavar em água destilada.

#### Observações:

Duração média da técnica: 3 horas;

- o volume da amostra não está indicado; para  $1\text{ cm}^3$  foi utilizado um décimo do volume de reagente indicado - um béquer de 100 ml com 20 ml de  $H_2O_2$  a 27%;

- a separação do sedimento foi feita com um bastão de vidro;

- embora a técnica não o mencione expressamente, supõe-se que a acidificação seja para equilibrar o pH, portanto, utilizou-se aproximadamente 1,0 ml de HCl até pH em torno de 7.0.

Percebeu-se que os métodos apurados têm preocupação com a natureza da amostra (Quadro I), aconselhando, para a remoção de carbonatos, tratamento com HCl, em proporções que vão do concentrado até 10% e, para amostras argilosas, tratamento com  $H_2O_2$ , variando de 27% a 30%, ou então de 10 a 30 volumes de oxigênio.

Igualmente, controlar o pH final do sedimento é importante, levando em consideração que o sedimento será estocado para estudos futuros. As técnicas que mencionam tal cuidado sugerem desde pH 5 até em torno de 7.

Com exceção dos métodos de calcinamento, Florin e Kuhn *et al.*, todos os demais podem levar à perda de material menos denso pelo grande número de centrifugações e/ou decantações.

**Quadro I:**

Relação entre os métodos testados e a preocupação expressa com o controle de variáveis.

Variáveis	Métodos
natureza da amostra	Moreira Filho e Teixeira Patrick e Reimer
pH final	Patrick e Reimer De Oliveira Kuhn et al.

**Quadro II:**

Tempo aproximado de execução e equipamentos utilizados pelos métodos de oxidação testados

Método	Tempo (h)	Necessita saber natureza da amostra	Reagentes empregados	Equipamentos utilizados
1 Calcinação 1,0 h	5	não	nenhum	mufla; cadinho
2 Calcinação 5,0 h	9	não	nenhum	mufla; cadinho
3 Moreira Filho e Teixeira (1963)	44	sim	HCl 50% KMnO <sub>4</sub> 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10v	B. M. ou estufa centrífuga
4 Patrick e Reimer (1966)	2	sim	HCl 10% K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> HNO <sub>3</sub> conc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	capela centrífuga
5 Simonsen (1974) mod. 97	97	não	HCl conc. KMnO <sub>4</sub> sat.	centrífuga B. M.
6 De Oliveira (1985)	5	não	HNO <sub>3</sub> conc.	capela B. M. centrífuga
7 Battarbee (1986)	49	sim	HCl 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	estufa centrífuga B. M. dessecad.

6 De Oliveira (1985)	5	não	HNO <sub>3</sub> conc.	capela B. M. centrífuga
7 Battarbee (1986)	49	sim	HCl 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	estufa centrífuga B. M. dessecad.
8 Florin 30%	13	não	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	nenhum
9 Florin 30V	13	não	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30v	nenhum
10 Kuhn <i>et al</i> (1981)	3	não	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 27% HCl conc.	nenhum

Observou-se que os métodos podem ser agrupados em 04 grupos, os quais utilizam estratégias e reagentes semelhantes:

A. Métodos de oxidação física: Calcinação. (Valente-Moreira, 1975)

B. Métodos de oxidação química rigorosa: De Oliveira (1985).

C. Métodos de oxidação química moderada: Moreira Filho e Teixeira (1963), Patrick e Reimer (1966) e Simonsen (1974).

D. Métodos de oxidação química branda: Battarbee (1986), Florin (s/d) e Kühn *et al.* (1981)

### Quadro III:

Classificação dos métodos de oxidação testados

Método	Facilidade de execução	Velocidade	Condições de limpeza
1 Calcinação 1,0 h	muito fácil	rápido	regular a ruim (raro bom)
2 Calcinação 5,0 h	muito fácil	rápido	regular a ruim (raro bom)
3 Moreira Filho e Teixeira (1963)	difícil	lento	bom a excelente
4 Patrick e Reimer (1966)	regular	muito rápido	bom a excelente
5 Simonsen (1974) mod.	regular	muito lento	bom a regular
6 De Oliveira (1985)	regular	rápido	regular a ruim (raro bom)
7 Battarbee (1986)	fácil	lento	excelente
8 Florin 30%	fácil	regular	bom a excelente (raro ruim)
9 Florin 30V	fácil	regular	bom a excelente (raro ruim)
10 Kuhn <i>et al.</i> (1981)	fácil	rápido	regular a ruim (raro bom)

## Conclusão

Os métodos que melhor resultado ofereceram em termos de limpeza da valva foram Moreira Filho e Teixeira (1963), Patrick e Reimer (1966), Battarbee (1986) e Florin (s/d), de oxidação moderada a branda. Todos possuem em comum o fato de utilizarem peróxido na oxidação, com adição de ácido clorídrico ou não.

Dos métodos recomendados, Battarbee (1986) e Florin (s/d) destacam-se pela grande facilidade de manuseio, embora não sejam os mais rápidos. Patrick e Reimer (1966), ao contrário, é muito rápido e, no entanto, sua execução é mais elaborada e com maiores riscos, tanto para a amostra quanto para o operador. Moreira-Filho e Teixeira (1963) é lento e relativamente difícil, tanto na operosidade quanto nos riscos.

## Bibliografia

1. BATTARBEE, R. W. Diatom Analysis. In: BERGLUND, B.E. (ed.) **Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology**. John Wiley & Sons, 1986. p. 527-570.
2. BRADBURY, J. P. **Fossil Diatoms and Neogene Paleolimnology**. *Palaeog.*, *Palaeocl.*, *Palaeoecol.*, 62:299-316, 1988.
3. DAVIS, R.B. **The scope of Quaternary paleolimnology**. *J.Paleolimn.*, 2:263-283, 1989.
4. DE OLIVEIRA, P. **The paleoecology of Lake Cunro, Ecuador with evidence from diatoms, sedimentary pigments and inorganic cations**. Dissertação de Mestrado, University of Cincinnati, 154p. 1985.
5. FLORIN, M-B. **Late-glacial diatoms of Kirchner Marsh - Southeastern Minnesota**. *Nova Hedwigia*, (s/v):667-756. s/d.
6. KUHN, D.L. *et al.* **Qualitative characterization of aquatic environments using diatom life-form strategies**. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 100 (2):165-182, 1981.
7. MOREIRA FILHO, H.; TEIXEIRA, C. **Noções gerais sobre as diatomáceas** (Chrysophyta Bacillariophyceae). *Bol.Univ.Par., Curitiba*, 11:01-26, 1963.
8. MOREIRA FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I.M. **Avaliação taxonômica e ecológica das diatomáceas** (Bacillariophyceae) epífitas em algas pluricelulares obtidas nos litorais dos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Bol. Mus. Bot. Mun., Curitiba*, (47):1-17, 1981
9. MULLER-MELCHERS, F. C.; FERRANDO, H. **Técnicas para el estudio de las diatomeas**. *Bol. Inst. Oceanogr., São Paulo*, 7(1,2):151-160, 1956
10. PATRICK, R.; REIMER, C.W. **The diatoms of the United States**. vol. 1. Monographs of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1966. 688p.
11. SIMONSEN, R. **The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R.V. Meteor, 1964-66**. *Meteor Forschungsergeb Reihe D-Biol.*, 9:166, 1974.
12. VALENTE-MOREIRA, I. M. **Contribuição ao estudo das Bacillariophyceae (Diatomáceas) em diatomitos brasileiros**. *Acta Biol. Par., Curitiba*, 4(3/4):135-198, 1975.