

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS DE ESTUDO DE PALINOMORFOS**

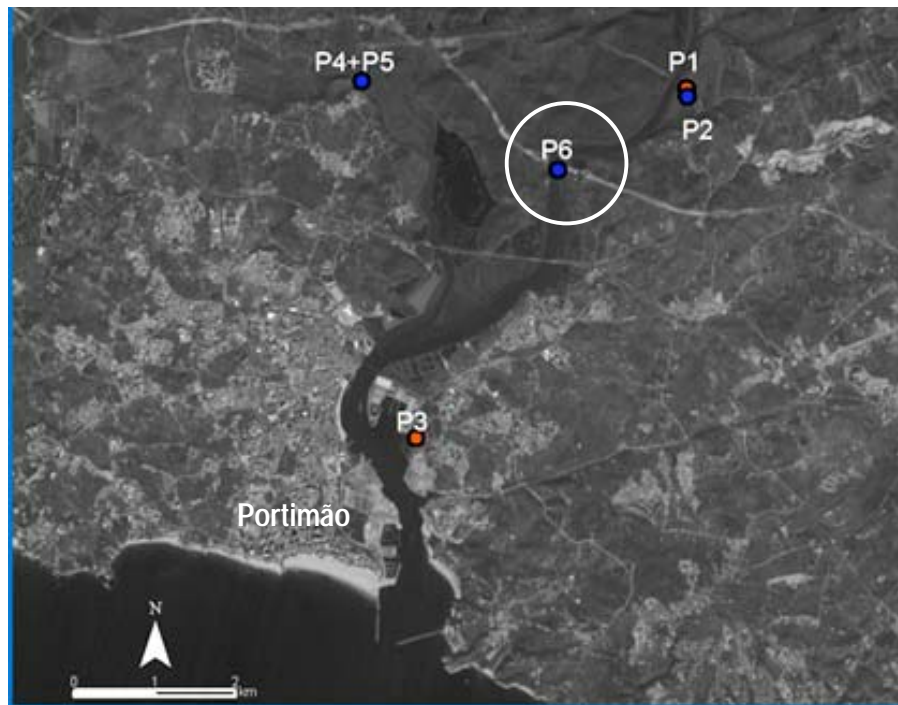
---

### **3.1 AMOSTRAGEM**

As amostras utilizadas neste trabalho foram retiradas dos testemunhos de duas sondagens realizadas no Algarve, no estuário do rio Arade (P6) e no estuário do rio Guadiana (CM5). Ambas as sondagens foram executadas pelo ex-Instituto Geológico e Mineiro – INETI; os testemunhos foram recolhidos metro a metro e recuperados em tubos de polietileno semi-rígido do tipo coreline 6”, para serem transportados para a Universidade do Algarve onde foram abertos em duas metades, das quais uma foi arquivada para futura utilização.

#### **3.1.1. SONDAGEM P6**

As primeiras amostras utilizadas correspondem à sondagem P6, realizada na margem do Rio Arade em Janeiro de 2001, com a localização: Latitude 37°09’42”N e Longitude 08°30’15”W. A sua localização está assinalada na figura 3.1.



**Figura 3.1** – Localização da sondagem P6 do Rio Arade (retirado de [www.ualg.pt/cima/reflecs/](http://www.ualg.pt/cima/reflecs/)).

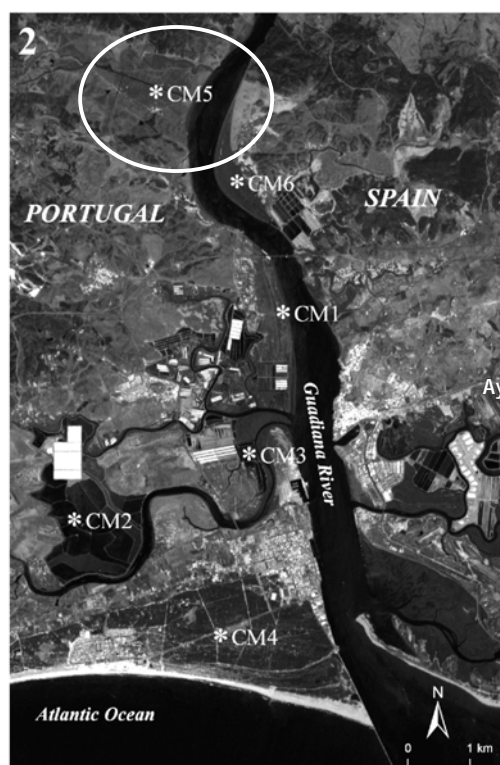
O Rio Arade encontra-se localizado no Sul de Portugal (Algarve) desaguando próximo de Portimão. A bacia hidrográfica apresenta uma área de 966 km<sup>2</sup> e um comprimento de 73 km. Os afluentes de maior significado são a Ribeira de Boina, com 85 km<sup>2</sup> de área e 23 km de desenvolvimento e a Ribeira de Odelouca, com 514 km<sup>2</sup> de área e 103 km de comprimento, ambos afluentes da margem direita (Instituto Portuário do Sul, 2003).

A rede hidrográfica atravessa diferentes litologias, nomeadamente: os sienitos nefelínicos do Maciço de Monchique (Cretácico Superior), as Formações de Mira e da Brejeira Grupo do Flysch do Baixo Alentejo (Carbonífero), os Arenitos de Silves (Triásico), os calcários do Jurássico e mais próximo da foz do rio, sedimentos do Cenozóico (Carta Geológica de Portugal, 1/200 000, folha 7, 1984).

Em anexo (Anexo I) encontra-se a coluna estratigráfica referente a esta sondagem. Uma vez que os testemunhos da mesma se encontram arquivados na Universidade do Algarve, foi fácil recolher das meias-sondagens ainda existentes 17 amostras. Destas, apenas são apresentados dados relativos a 14 amostras, que foram recolhidas, colocadas em frascos (para evitar contaminações) devidamente identificados e pesado o seu conteúdo.

### 3.1.2. SONDAGEM CM5

O segundo conjunto de amostras corresponde à sondagem CM5. Esta foi recolhida em Novembro de 1999 com a localização: Latitude  $37^{\circ}15'56''N$  e Longitude  $07^{\circ}27'08''W$ . Este local insere-se no Sapal da Beira, junto à Ribeira de Belixe, tributária do Rio Guadiana. A figura 3.2 apresenta a sua localização geográfica.



**Figura 3.2** – Localização da sondagem CM5 da Ribeira de Belixe (Foto cedida pelo Centro de Investigação Marinha e Ambiental – Universidade do Algarve).

O Rio Guadiana é um dos principais rios da Península Ibérica, com um comprimento total de 730 km, dos quais os últimos 200 km contituem como uma fronteira natural entre Portugal e Espanha (*e.g.* Boski, T. *et al.*, 2002). A bacia hidrográfica cobre uma área de 66.960 km<sup>2</sup> e a altitude média em Portugal é 237 metros (Farinha & Trindade, 1994).

A sua extensão faz com que este rio se encaixe em diferentes litologias. No entanto no que diz respeito ao troço final em terras algarvias o rio atravessa as Formações de Mira e de Mértola, ambas do Grupo do Flysch do Baixo Alentejo (Carbonífero) e os últimos 5 km cortam os calcários do Cretácico e do Jurássico. As diferentes litologias são responsáveis pela “forma” do seu canal, sendo mais profundo e estreito nos metassedimentos do Carbonífero e tornando-se mais amplo a partir do momento em que há uma alteração de litologias (Carta Geológica de Portugal, 1/200 000, folha 8, 1992).

A ribeira de Belixe, onde foi realizada a sondagem CM5, é um dos últimos tributários do Rio Guadiana. A sua junção dá-se a cerca de 10 km da foz do Rio Guadiana. A sua bacia hidrográfica, com 116 km<sup>2</sup>, encontra-se na zona este algarvia, sempre em litologias do Paleozóico.

Ao contrário das amostras do P6, as amostras do CM5 já haviam sido retiradas do testemunhos aquando da chegada destes às instalações da Universidade do Algarve. Estas foram logo colocadas em frascos, devidamente identificados e congeladas. Por isso estas amostras foram retiradas do congelador, colocadas numa estufa a 40° para descongelar e pesadas depois de secas. Foram utilizadas apenas 6 amostras, uma vez

que já haviam poucas disponíveis; estas apenas representam uma parte da sondagem, a sua totalidade encontra-se descrita na coluna estratigráfica do Anexo II.

### **3.2 MÉTODOS LABORATORIAIS PARA O ESTUDO DE PALINOMORFOS**

Para que seja possível a observação dos palinomorfos em lâmina delgada há que realizar procedimentos laboratoriais que permitam retirá-los da matriz onde se encontram (sedimento ou fragmento de rocha). Com estes procedimentos, os palinomorfos podem ser “isolados”, concentrados e em alguns casos “aclareados” para que seja otimizada a sua observação. Desde os primeiros trabalhos palinológicos têm sido utilizadas diversas metodologias.

No entanto, tornou-se claro que cada laboratório aperfeiçoou a sua própria técnica. Muitas vezes são híbridas, e os procedimentos podem reflectir as condições do laboratório (Jansonius & McGregor, 2002).

Para preparar os palinomorfos para a observação ao microscópio a partir de uma amostra, esta é tradicionalmente tratada com ácido clorídrico e fluorídrico concentrados (Riding & Kyffin-Hughes, 2004). O uso de HF em preparações palinológicas foi introduzido por Assarson & Granlund (*in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004). O HCl e o HF removem os carbonatos e os silicatos respectivamente, destruindo desta forma a matriz da rocha, daí resultando um resíduo de material orgânico e alguns minerais resistentes (exemplo: rutilo e turmalina) (Riding & Kyffin-Hughes, 2004). No que respeita à aplicação do HF, surgem diferentes metodologias o

que, tal como foi referido anteriormente, também está relacionado com os materiais disponíveis no laboratório e/ou com as verbas necessárias para a sua aquisição.

Sarmiento (*in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004) utilizou o ácido ortofosfórico ( $H_3PO_3$ ) para remover os carbonatos referindo que este é menos agressivo que o HCl. Apesar disso, o  $H_3PO_3$  não substituiu o HCl na dissolução dos carbonatos na maioria dos laboratórios.

A utilização dos ácidos fortes, apesar de ser a mais utilizada, acarreta algumas desvantagens. São reagentes dispendiosos, requerem instalações adequadas, nomeadamente no que diz respeito a uma hotte que permita a utilização de HF. Os resíduos que resultam da sua utilização deverão ser correctamente acondicionados e eliminados para evitar a contaminação do meio ambiente.

O ácido fluorídrico é, sem dúvida, o reagente utilizado na palinologia que apresenta maior perigosidade. As suas propriedades únicas, que o tornam tão útil na digestão dos minerais da amostra, torna-o igualmente mais perigoso que o HCl ou o  $HNO_3$ . O HF causa queimaduras graves e pode tornar-se fatal se estas corresponderem a mais de 5% da superfície corporal. Devido à sua elevada solubilidade em lípidos, o ácido penetra rapidamente na pele e, após ionização, os iões de flúor causam uma rápida e duradoura destruição dos tecidos moles e ósseos (*e.g.* Riding & Kyffin-Hughes, 2004).

Um dos problemas que podem surgir com a utilização dos ácidos fortes é a precipitação de sais de fluoreto de cálcio ( $CaF_2$ ), cujo precipitado é difícil de ser

removido. Para evitar esta situação, sempre que for adicionado HCl à amostra há que retirar todos os iões de cálcio antes de ser adicionado o HF.

Após o tratamento com os ácidos, os palinomorfos que permanecem no resíduo são separados e concentrados de diferentes formas. Estas incluem uma breve oxidação, normalmente com ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), para limpar o resíduo de quaisquer materiais finos de matéria orgânica (Funkhouser & Evitt *in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004). Outros métodos de “limpeza” dos palinomorfos incluem o tratamento com ultrasons, separação por densidade de quaisquer minerais resistentes e a passagem pelo crivo para a eliminação de matéria orgânica fina disseminada (Caratini; Ediger *in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004). As técnicas de separação por densidade, normalmente envolvem centrifugação ou agitação do resíduo para separar a fracção mineral, densa, da fracção orgânica que é menos densa. São utilizados líquidos densos como: bromofórmio ( $\text{CHBr}_3$ ), politungstato de sódio ( $2\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_4$ ), brometo de zinco ( $\text{ZnBr}_2$ ) e cloreto de Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Davis; Kummel & Raup; Munsterman & Kerstholt; *in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004).

Forster & Fenley (*in* Jansonius & McGregor, 2002) desenvolveram, recentemente, um procedimento de centrifugação por gradiente de densidade que separa misturas orgânicas heterogéneas. Utilizando uma solução de iodeto de potássio, as partículas orgânicas (pólenes, esporos, detritos orgânicos) podem ser separadas pela sua flutuabilidade. Desta forma, determinados compostos orgânicos podem ser removidos pela sua localização específica na coluna de separação. Este procedimento pode ainda separar os palinomorfos por grupos de taxa.

Outros autores têm apresentado diferentes alternativas, nomeadamente a utilização do álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) para remoção dos palinórfos a partir do resíduo, sendo esta técnica particularmente adequada para amostras com muito material carbonizado ou rochas com poucos palinórfos. A utilização de solventes com elevada densidade específica ou óleos, recorrendo à flutuação, também é referida (Riding & Kyffin-Hughes, 2004).

Encontrar uma metodologia que não implique a utilização de HF abriria a possibilidade de serem desenvolvidos trabalhos no âmbito da palinologia em laboratórios simples, que não disponham de uma hotte preparada para utilizar este ácido. Riding & Kyffin-Hughes (2004) referem diferentes técnicas utilizadas ao longo dos tempos sem o uso de ácidos fortes. A técnica por eles aplicada é de fácil implementação, tendo em conta as instalações mais comuns; recorre à utilização do hexametáfosfato de sódio  $[(NaPO_3)_6]$ , na sua versão comercial, o Calgon<sup>®</sup>, que é desfloculante de uso corrente em máquinas de lavar, especialmente em zonas de águas calcárias.

Os fosfatos em solução possuem uma carga iónica elevada, e mesmo em pequenas concentrações, actuam em suspensões de partículas coloidais (van Wazer; Bates *et al.*; *in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004). Os fosfatos são normalmente conhecidos como desfloculantes e dispersantes. Reduzem a tendência coesiva das argilas porque o ião fosfato é fortemente absorvido pelas partículas de argila, que se quebram devido à elevada carga iónica. As cargas à superfície previnem a refloculação da argila (Riding & Kyffin-Hughes, 2004).

No entanto, qualquer que seja a técnica de extracção utilizada, é necessário concluir o processamento da amostra. A acetólise é um procedimento muito comum na extracção dos palinomorfos; remove a celulose, recorrendo à utilização do anidrido acético [(CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O] e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado numa proporção de 9:1.

Se os resíduos apresentam palinomorfos muito escuros, especialmente os de idade mais antiga, há que realizar uma oxidação, mas, como esta pode destruir a exina, é um procedimento que requer grande cuidado. A oxidação pode ser realizada com a solução de Schulze's ou com o ácido nítrico fumegante (HNO<sub>3</sub>).

A observação, identificação, e se necessária microfotografia, dos pólenes e esporos pode ser realizada com material não corado. A acetólise, normalmente, deixa os pólenes com uma cor amarelada, a qual pode não ser adequada para as preferências de certos palinólogos. Outros, no entanto, preferem acentuar os contrastes na imagem óptica da parede celular sendo este aspecto particularmente útil, em alguns casos mesmo essencial, quando é necessária a fotografia (Moore *et al.*, 1991). Podem ser utilizados diferentes corantes, por exemplo: castanho de Bismarck, vermelho Congo, fucsina, verde de Metileno, azul de Metileno, safranina, verde Vert e diferentes corantes alimentares (Artusy & Artusy; Clarke; Wilson & Goodman *in* Riding & Kyffin-Hughes, 2004).

Em relação às lâminas delgadas, os palinólogos adoptaram uma variedade de meios de montagem, variando desde xarope de milho a polímeros de plástico, adaptados a objectivos de pesquisa específicos ou aos materiais à mão. Alguns meios mais utilizados são a glicerina, bálsamo do Canadá, óleo silicioso e elvacite (Jansonius &

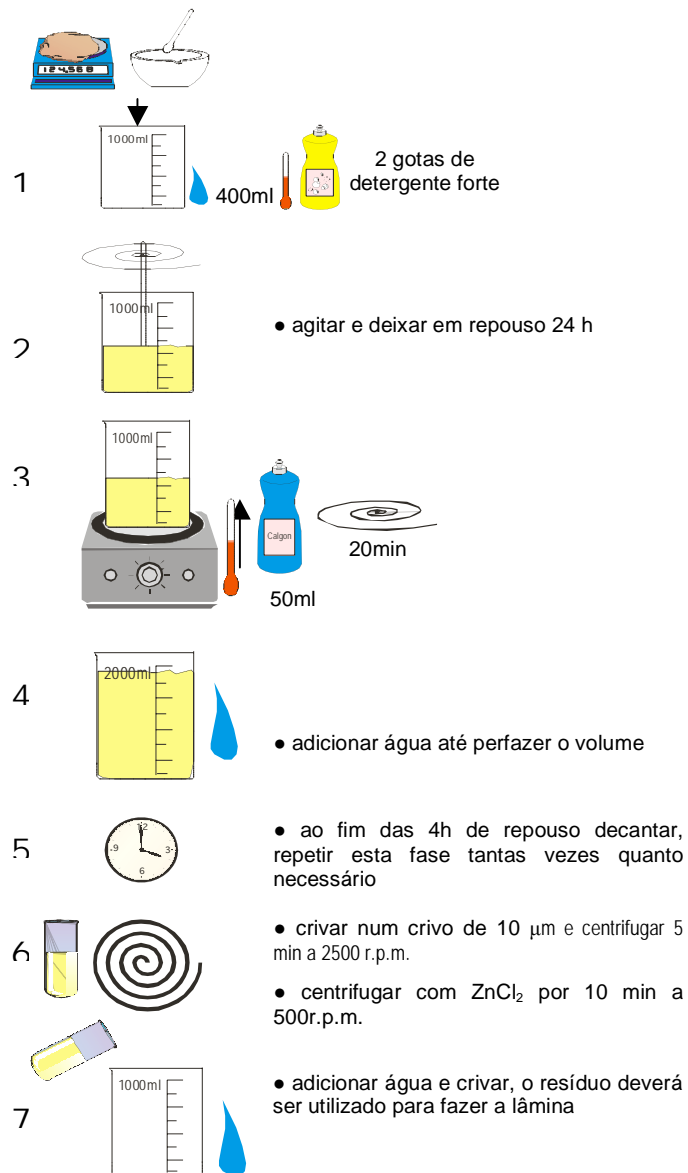
McGregor, 2002). Estes diferem em durabilidade, propriedades ópticas e efeitos nos palinórfos. O óleo silicioso é utilizado por quem quer rodar os palinórfos para permitir observação completa (Andersen *in* Jansonius & McGregor, 2002). Uma ligeira pressão na lamela permite a desejada rotação. A glicerina oferece um índice de refração bom para a fotografia. O elvacite e outros bioplásticos são duráveis e endurecem rapidamente, a lamela não precisa de ser selada. Alguns polímeros de plástico endurecem em minutos quando expostos à luz ultravioleta (Jansonius & McGregor, 2002).

### **3.3 PREPARAÇÃO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS**

As amostras recolhidas foram preparadas laboratorialmente recorrendo às duas técnicas laboratoriais que a seguir se descrevem.

#### **3.3.1 RECORRENDO A HEXAMETAFOSFATO DE SÓDIO**

A figura 3.3 representa, esquematicamente, o procedimento com o recurso a hexametáfosfato de sódio. Este é uma adaptação do procedimento de Riding & Kyffin-Hughes, (2004). Uma descrição mais pormenorizada encontra-se no anexo III.



**Figura 3.3** – Representação esquemática do procedimento de extracção de palinomorfos recorrendo ao hexametáfosfato de sódio.

É sempre possível colocar as amostras sob a acção do ácido clorídrico antes de iniciar o procedimento para, previamente, eliminar os carbonatos, o que poderá eliminar alguns dinoflagelados.

### 3.3.2 RECORRENDO A ÁCIDOS FORTES

A figura 3.4 representa, esquematicamente, o procedimento adaptado de Moore *et al.* (1991) recorrendo ao uso de ácidos fortes. Em anexo (Anexo III) encontra-se descrito com mais pormenor.

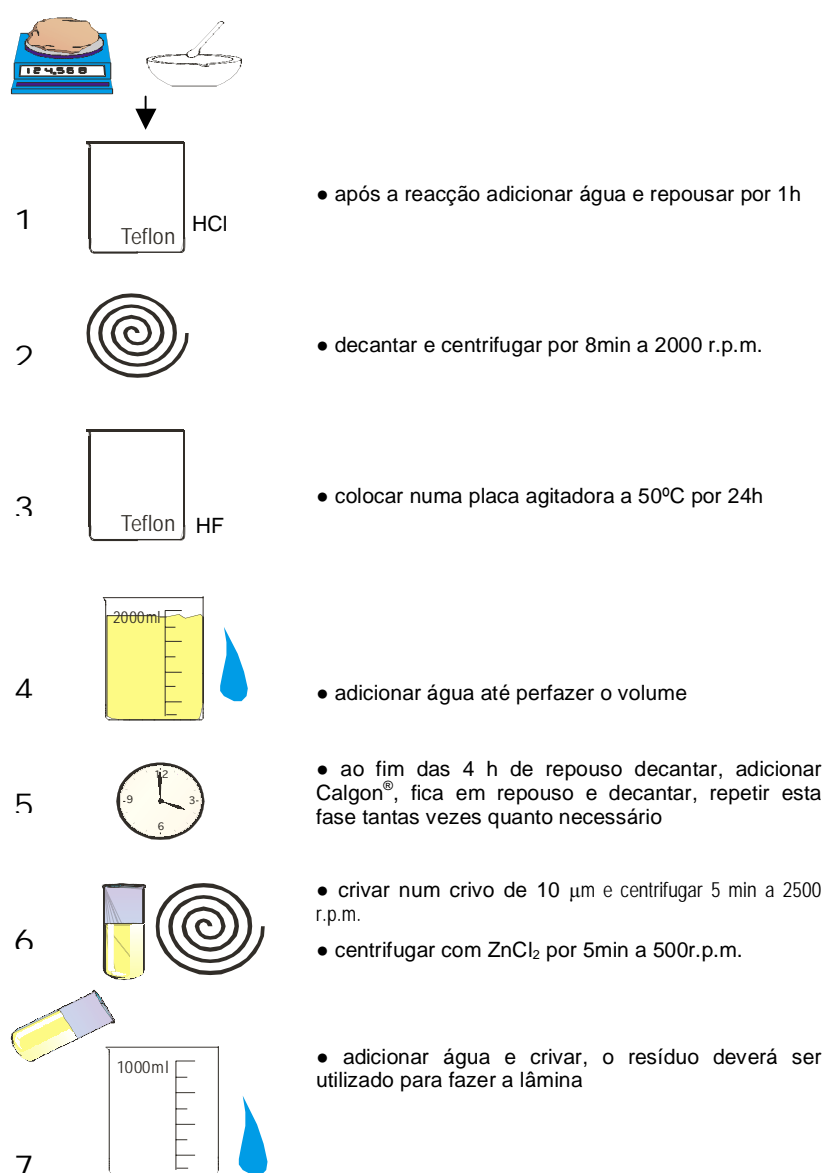


Figura 3.4 – Representação esquemática da extracção de palinomorfos recorrendo aos ácidos fortes.

### 3.3.3 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES EXÓTICOS

A adição do marcador exótico deverá ser feita no início do procedimento, para que o marcador possa passar por todas as etapas que os palinomorfos que estão na amostra passam. No entanto, como os esporos ou pólenes incluídos na pastilha do marcador estão unidos por um adesivo de natureza carbonatada, há que adicionar algumas gotas de HCl à pastilha, dissolve-la e depois adicioná-la à amostra.

### 3.4 MONTAGEM DE LÂMINAS E REGISTOS FOTOGRÁFICOS

Após a obtenção do resíduo e extracção dos palinomorfos procedeu-se à montagem das respectivas lâminas. Para tal utilizou-se uma micropipeta com volume de 200 µl. Pipetou-se a partir do resíduo tendo o cuidado de o agitar previamente. Colocou-se a lâmina com o resíduo numa placa de aquecimento, assim que a água se evaporou retirou-se e adicionou-se uma gota de resina (Entellan Microscopy – Merck). Sobre esta colocou-se a lamela, etiquetou-se a lâmina e aguardou-se que a resina solidificasse. As observações foram realizadas num microscópio Olympus BX51 e as fotos obtidas com a câmara fotográfica Color View III integrada no microscópio. A colocação de escala nas fotos foi possível devido à utilização do software Cell A da Olympus. As observações foram realizadas com objectiva de ampliação 40x e oculares de ampliação 10x. Por não se dispor de objectiva de 60x, as fotografias também foram realizadas com a objectiva de 40x. Foi observada uma lâmina por amostra, tendo sido identificados e quantificados todos os palinomorfos presentes na mesma. As fotografias das estampas foram realizadas com a objectiva de 50x e com óleo de imersão.

A consulta de Reille, M. (1999); Valdes, B. *et al.* (1986) e van Campo, E. (1978) permitiu a identificação dos palinomorfos existentes e a consulta de Strasburger, E. *et al.* (1994) a organização sistemática.