

Protocolos laboratoriais para observação de espículas de esponjas: assembleia moderna e material sedimentar

Laboratory Protocols for the Observation of Sponge Spicules: Contemporary Assemblages and Sedimentary Material

Mauro Parolin¹, Tainara da Silva Camargo², Luan Maler de Oliveira^{2*}, Marcos Antonio dos Santos¹

Recebido: 12 jul. 2026

Aceito: 14 set. 2026

Publicado: 25 set. 2026

1. Universidade Estadual do Paraná, Campo Mourão .

2. Universidade Estadual de Maringá, Maringá .

*luan-m@live.com



Copyright: trabalho de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição Creative Commons, que permite aos usuários copiarem e distribuírem o material em qualquer meio ou formato, apenas em sua forma original, para fins não comerciais e desde que seja feita a devida atribuição ao criador.



Resumo: As espículas silicosas de esponjas possuem importância taxonômica e constituem indicadores relevantes em reconstruções paleoambientais. Este estudo avaliou o peróxido de hidrogênio a 130 volumes como alternativa ao protocolo convencional com ácido nítrico a 65% para remoção da matéria orgânica e preparação de lâminas permanentes. Foram analisadas amostras de *Oncosclera navicella*, *Sterrastrolepis brasiliensis* e *Drulia browni*, além de Organossolo com elevado teor de matéria orgânica (65%). Para cada material, realizaram-se duas digestões independentes por reagente, seguidas de centrifugação, lavagens até pH próximo de sete, montagem das lâminas e avaliação qualiquantitativa em microscopia óptica. O peróxido reduziu os resíduos orgânicos em *O. navicella* e *D. browni* e proporcionou maior recuperação de espículas inteiras no Organossolo, em *O. navicella* e *S. brasiliensis*. Contudo, *S. brasiliensis* apresentou mais resíduos após o tratamento alternativo, enquanto *D. browni* apresentou número ligeiramente superior de espículas inteiras com ácido nítrico. Os resultados demonstram que a eficiência da digestão depende das características do material analisado. Nas condições experimentais adotadas, o peróxido de hidrogênio mostrou-se uma alternativa tecnicamente viável ao ácido nítrico, podendo ser empregado em estudos taxonômicos, paleolimnológicos e paleoambientais,

mediante controle da reação e observância das medidas adequadas e rigorosas de segurança laboratorial.

Palavras-chave: Porifera, Demospongiae, Micropaleontologia, Paleoambientes.

Abstract: Siliceous sponge spicules are taxonomically important and constitute relevant indicators for paleoenvironmental reconstructions. This study evaluated 130-volume hydrogen peroxide as an alternative to the conventional protocol using 65% nitric acid for organic matter removal and preparation of permanent slides. Samples of *Oncosclera navicella*, *Sterrastrolepis brasiliensis*, and *Drulia browni*, as well as an organic soil with a high organic matter content (65%), were analyzed. For each material, two independent digestions were performed with each reagent, followed by centrifugation, washing until a pH close to seven was reached, slide preparation, and qualitative and quantitative assessment using light microscopy. Hydrogen peroxide reduced organic residues in *O. navicella* and *D. browni* and resulted in greater recovery of intact spicules in the organic soil, *O. navicella*, and *S. brasiliensis*. However, *S. brasiliensis* showed more residual material after the alternative treatment, whereas *D. browni* showed a slightly higher number of intact spicules after nitric acid treatment. The results demonstrate that digestion efficiency depends on the characteristics of the material analyzed. Under the experimental conditions adopted, hydrogen peroxide proved to be a technically feasible alternative to nitric acid and may be used in taxonomic, paleolimnological, and paleoenvironmental studies, provided that the reaction is carefully controlled and appropriate and rigorous laboratory safety measures are followed.

Keywords: Porifera, Demospongiae, Micropaleontology, Paleoenvironments.

Introdução

As esponjas, reunidas no filo Porifera, constituem um dos grupos mais antigos de metazoários e apresentam hábito predominantemente sésil. Em muitas espécies, o esqueleto é sustentado por elementos microscópicos denominados espículas, frequentemente constituídos por sílica (SiO_2)². De modo geral, as espículas podem ser classificadas em megascleras e microscleras, categorias empregadas tanto na descrição de esponjas marinhas quanto de águas continentais. As megascleras correspondem, proporcionalmente, às maiores espículas do corpo da esponja e participam principalmente da sustentação esquelética, enquanto as microscleras são elementos menores e morfologicamente diversos, podendo apresentar relevância taxonômica. Em determinados grupos também ocorrem espículas associadas às gêmulas, denominadas gemoscleras¹⁻³.

A resistência das espículas silicosas favorece sua preservação após a morte e a decomposição da matéria orgânica dos organismos, possibilitando sua incorporação e permanência nos sedimentos⁴. Essa característica confere às espículas expressivo potencial como dados *proxy* em estudos paleoambientais⁵⁻⁶. Sua importância não se restringe à identificação de assembleias pretéritas: a especificidade ecológica e ambiental de determinadas espécies permite que a ocorrência de um único táxon forneça informações relevantes sobre condições ambientais passadas. Mesmo espículas não diagnósticas em nível específico podem contribuir para interpretações paleoambientais, por exemplo, ao indicar a presença pretérita de ambientes aquáticos ou condições de maior disponibilidade de umidade.

O emprego de espículas de esponjas em reconstruções paleoambientais possui trajetória internacional anterior à consolidação desses estudos no Brasil. Entre os trabalhos pioneiros, destaca-se aquele que abordou restos espiculares de esponjas de águas continentais⁷. Posteriormente, a aplicação dessas estruturas como indicadores paleoambientais foi ampliada em diferentes contextos sedimentares e regiões biogeográficas. Na região Neotropical, levantamentos bibliográficos demonstram a expansão dessa abordagem: foram identificados 23

trabalhos de caráter paleontológico publicados entre 2000 e 2017⁸, enquanto 31 estudos relacionados ao emprego de espículas na região Neotropical foram reconhecidos⁴. Esses números, por se restringirem a recortes temáticos e geográficos específicos, sugerem que a produção mundial relacionada ao uso paleoambiental de espículas seja mais ampla.

No Brasil, as pesquisas avançaram com a identificação de espículas preservadas em diferentes depósitos sedimentares e sua utilização na interpretação de condições ambientais pretéritas. Entre os desdobramentos conceituais, destaca-se a proposição do termo espongo fácies, empregado para caracterizar sequências sedimentares nas quais predominam espículas de espécies de esponjas continentais associadas a condições paleoambientais específicas⁹. Estudos posteriores ampliaram o uso dessas estruturas em reconstruções paleoambientais, inclusive em investigações relacionadas a variações costeiras e do nível do mar¹⁰. Esse desenvolvimento reforçou a relevância das espículas para estudos paleoecológicos, paleolimnológicos, sedimentológicos e de reconstrução da dinâmica ambiental.

A utilização das espículas nesses estudos depende de procedimentos laboratoriais capazes de isolá-las da matéria orgânica presente tanto nos corpos das esponjas quanto nos sedimentos. O protocolo tradicionalmente empregado para esse isolamento baseia-se na digestão oxidativa da matéria orgânica com ácido nítrico (HNO₃ 65%), seguida de etapas de lavagem e da confecção de lâminas permanentes para microscopia óptica¹¹.

Considerando que o ácido nítrico (HNO₃ 65%) é enquadrado como Produto Controlado pelo Exército (PCE), sua aquisição e utilização por instituições de pesquisa estão inseridas no regime de fiscalização estabelecido pelo Regulamento de Produtos Controlados, aprovado pelo Decreto nº 10.030, de 30 de setembro de 2019¹², e pela Portaria nº 118-COLOG, de 4 de outubro de 2019¹³, que inclui o ácido nítrico na lista de produtos químicos de interesse militar sujeitos a controle. Além disso, o exercício de atividades com PCE, inclusive a utilização em laboratórios e em pesquisa, está condicionado às exigências de

registro e controle previstas na regulamentação do Sistema de Fiscalização de Produtos Controlados, entre elas a Portaria nº 56-COLOG, de 5 de junho de 2017¹⁴, ou norma posterior que a substitua. Esse conjunto normativo implica procedimentos administrativos para aquisição, armazenamento, utilização e movimentação do reagente, podendo dificultar ou retardar a continuidade de rotinas laboratoriais.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, tem sido empregado na remoção oxidativa de matéria orgânica durante a preparação de outros *proxies* e materiais biogênicos silicosos, especialmente fitólitos e diatomáceas. Na literatura, sua eficiência tem sido avaliada em comparação ou associação com diferentes estratégias de limpeza e isolamento da sílica biogênica, incluindo tratamentos com ácidos, outros agentes oxidantes e métodos físicos, como a calcinação em mufla. Estudos com fitólitos mostram o uso recorrente de H_2O_2 na oxidação da matéria orgânica, enquanto avaliações experimentais com diatomáceas compararam diretamente H_2O_2 , HCl e HNO_3 com tratamentos térmicos em mufla, evidenciando que a escolha do método pode influenciar tanto a eficiência de remoção da matéria orgânica quanto a preservação das estruturas silicosas¹⁵. Além disso, um protocolo de extração de espículas de esponjas de águas continentais para estudos paleolimnológicos apresenta o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como uma das alternativas para a digestão da matéria orgânica, juntamente com tratamentos baseados em ácido nítrico¹⁶. Nesse contexto, o H_2O_2 constitui uma alternativa metodológica potencial ao protocolo convencional baseado em ácido nítrico, cuja eficiência e capacidade de preservar as características morfológicas das espículas devem ser avaliadas experimentalmente.

Metodologia

Para avaliar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 130 v) como alternativa ao protocolo convencional baseado em ácido nítrico (HNO_3), foram realizados ensaios comparativos utilizando material proveniente de três espécies de esponjas

de águas continentais: *Oncosclera navicella* (Carter, 1881) e *Sterrastrolepis brasiliensis* (Volkmer-Ribeiro & De Rosa-Barbosa, 1978), pertencentes à família Potamolepidae, e *Drulia browni* (Bowerbank, 1863), pertencente à família Metaniidae. Também foi analisada uma amostra de Organossolo com elevado teor de matéria orgânica (65%), previamente conhecida por conter espículas de esponjas.

Foram utilizadas duas amostras de cada espécie de esponja (~1 g). Para o material sedimentar, empregou-se 1 g de Organossolo por tratamento. Nos ensaios comparativos, manteve-se a mesma quantidade de material entre os tratamentos. Para cada tipo de material e para cada reagente foram realizadas duas repetições, de modo que cada repetição correspondeu a uma digestão realizada separadamente, e não apenas à confecção de múltiplas lâminas provenientes de uma mesma digestão.

Em cada repetição foram empregados aproximadamente 1 g de material e 2,5 mL do respectivo reagente. Os tratamentos diferiram quanto ao agente utilizado para a digestão oxidativa da matéria orgânica: (i) ácido nítrico a 65% (HNO₃ 65%), correspondente ao protocolo convencional; e (ii) peróxido de hidrogênio a 130 volumes (H₂O₂), avaliado como protocolo alternativo.

No tratamento convencional, o material foi acondicionado para digestão com 2,5 mL de HNO₃ 65% e submetido a aquecimento em chama de lamparina. O aquecimento foi mantido até aproximadamente 4 segundos após o início da fervura do material. Em seguida, o material foi lavado via centrifugação durante 3 minutos a 1.000 rpm. As lavagens foram realizadas sucessivamente até a estabilização do pH em valor próximo à neutralidade (pH ≈ 7), aferido com pHmetro digital, assegurando a remoção do reagente e dos resíduos provenientes da digestão.

No tratamento alternativo, a mesma massa de material foi submetida a 2,5 mL de H₂O₂ a 130 volumes, mantendo-se o delineamento experimental e as etapas de processamento equivalentes às adotadas no tratamento com HNO₃. O aquecimento em chama de lamparina foi mantido até aproximadamente 4

segundos após o início da fervura do material. Posteriormente, o material foi centrifugado durante 3 minutos a 1.000 rpm e submetido a lavagens sucessivas até a estabilização do pH em aproximadamente 7, verificada por meio de pHmetro digital. Após a neutralização, o material foi destinado à preparação das lâminas permanentes.

A figura 1 apresenta de forma resumida os processos envolvidos na preparação das lâminas.

Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Estudos Paleoambientais da Fecilcam (LEPAFE/UNESPAR), Campus de Campo Mourão, Paraná. As etapas envolvendo HNO_3 e H_2O_2 foram realizadas em capela de exaustão, com utilização de equipamentos de proteção individual adequados aos riscos associados aos reagentes. Foram observadas as informações constantes nas respectivas Fichas com Dados de Segurança (FDS), as disposições aplicáveis da Norma Regulamentadora nº 6 (NR-06)¹⁷ e as normas técnicas pertinentes à identificação de perigos, proteção respiratória e segurança química em laboratório, incluindo as ABNT NBR 14725¹⁸, NBR 13697¹⁹ e NBR 13698²⁰.

Após o processamento, o material recuperado foi utilizado na confecção de lâminas permanentes de microscopia, montadas com Entellan®. As preparações foram examinadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ei®, e os registros fotográficos foram obtidos com câmera Multivision® de 5 megapixels. As figuras foram posteriormente organizadas com auxílio do software CorelDRAW®.

Para a avaliação de cada tratamento foram examinadas três lâminas, percorrendo-se três transectos por lâmina. A análise foi qualiquantitativa e realizada visualmente ao microscópio óptico, considerando-se como critérios principais a remoção da matéria orgânica residual, a limpeza e transparência das preparações e a condição das espículas recuperadas.

Figura 1. Esquema dos protocolos propostos para a montagem de lâminas permanentes para microscopia óptica: 1a) esponja; 1b) sedimento; 2a) ácido nítrico 65%; 2b) peróxido de hidrogênio 130 volumes; 3a) oxidação com ácido nítrico com auxílio de lamparina; 3b) oxidação com peróxido de hidrogênio no qual o excesso de matéria orgânica provocou extravasamento de material – necessidade de se reduzir o volume a ser oxidado; 3c) oxidação ideal com peróxido de hidrogênio, sem extravasamento de material; 4) água destilada acrescida; 5) centrifugação (1.000 RPM/3 min); 6) material sobre lâminas; 7) secagem em chapa aquecedora (~60°C); 8) adição de Entellan® e cobertura com lamínula; 9) lâmina pronta.



A eficiência dos tratamentos com HNO_3 e H_2O_2 foi comparada visualmente. A presença de matéria orgânica residual foi avaliada pela ocorrência ou ausência de resíduos nos campos microscópicos percorridos e pelo grau de limpeza das lâminas. A recuperação das espículas foi examinada concomitantemente, considerando-se sua visualização nas preparações e a preservação de suas características morfológicas.

Além da remoção da matéria orgânica, foi verificada a preservação morfológica das espículas após os tratamentos, observando-se a integridade geral das estruturas e de sua ornamentação, bem como a ocorrência de fragmentação. Dessa forma, a comparação entre os protocolos foi baseada, principalmente, em três variáveis-resposta qualiquantitativas: (i) ausência ou presença de matéria orgânica residual nos campos analisados, representadas por fragmentos de matéria orgânica não eliminada no processo; (ii) limpeza das preparações e das espículas, representada pela ausência de fragmentos de matéria orgânica aderida às espículas; e (iii) preservação morfológica das espículas após a digestão, número de espículas inteiras.

Resultados e Discussão

Os resultados evidenciaram diferenças entre os protocolos de oxidação com ácido nítrico a 65% (HNO_3) e peróxido de hidrogênio a 130 volumes (H_2O_2), tanto na remoção da matéria orgânica quanto na preservação das espículas. De maneira geral, o tratamento com H_2O_2 apresentou desempenho satisfatório, embora sua eficiência tenha variado de acordo com a espécie e o tipo de material analisado (Figura 2).

Quanto aos traços de matéria orgânica presentes nas lâminas, o H_2O_2 proporcionou menores valores para o solo, *Oncosclera navicella* e *Drulia browni*, com 35, 18 e 25 ocorrências, respectivamente. Nos mesmos materiais, o tratamento com HNO_3 resultou em 40, 24 e 28 ocorrências. Para *Sterrastrolepis brasiliensis*, entretanto, o H_2O_2 apresentou 42 ocorrências, enquanto o HNO_3 resultou em 35. Esses dados indicam que o peróxido foi mais eficiente na remoção

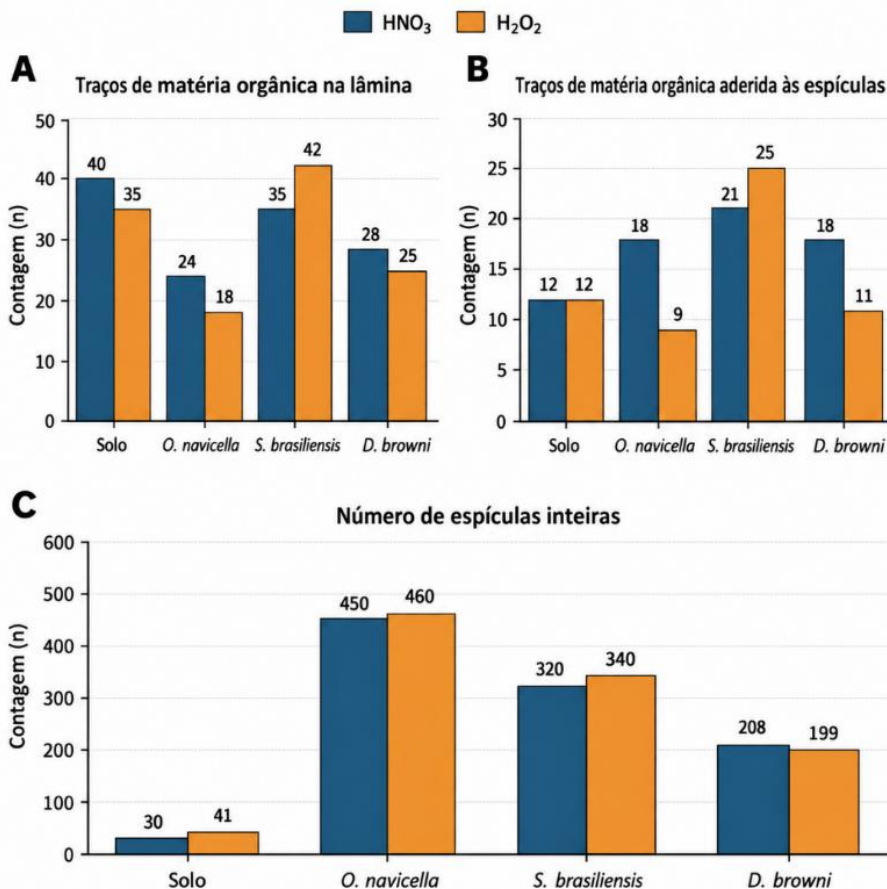
da matéria orgânica em três dos quatro materiais avaliados, mas também demonstram que sua ação não ocorreu de maneira uniforme.

Em relação à matéria orgânica aderida às espículas, os dois protocolos apresentaram o mesmo resultado para o solo, com 12 ocorrências. Para *O. navicella*, o H_2O_2 reduziu os resíduos aderidos de 18 para 9 ocorrências, o que corresponde a uma diminuição de 50% em comparação ao HNO_3 . Em *D. browni*, também foi observada maior eficiência do peróxido, com 11 ocorrências, diante das 18 registradas no tratamento convencional. Em contrapartida, *S. brasiliensis* apresentou 25 ocorrências após o tratamento com H_2O_2 e 21 com HNO_3 (Figura 2).

A menor quantidade de resíduos observada em *O. navicella* e *D. browni* demonstra que o H_2O_2 pode favorecer a obtenção de preparações mais limpas e transparentes. Essa condição facilita a visualização da ornamentação e de outros caracteres morfológicos empregados na identificação taxonômica das espículas. A resposta distinta de *S. brasiliensis*, porém, sugere que a composição e a organização da matéria orgânica associada ao esqueleto podem influenciar a eficiência da digestão, tornando necessário ajustar o protocolo conforme o material analisado.

A avaliação da integridade das estruturas mostrou que o tratamento com H_2O_2 proporcionou maior número de espículas inteiras no solo, em *O. navicella* e em *S. brasiliensis*. No material sedimentar, foram contabilizadas 41 espículas inteiras com H_2O_2 e 30 com HNO_3 , representando um aumento descritivo de aproximadamente 36,7%. Para *O. navicella*, foram registradas 460 espículas inteiras com H_2O_2 e 450 com HNO_3 , enquanto, para *S. brasiliensis*, os valores foram de 340 e 320, respectivamente. Em *D. browni*, verificou-se comportamento diferente, com 208 estruturas inteiras no tratamento com HNO_3 e 199 no tratamento com H_2O_2 (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 2. Comparação dos protocolos de oxidação com ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) quanto à presença de traços de matéria orgânica na lâmina (A), traços de matéria orgânica aderida às espículas (B) e número de espículas inteiras (C), considerando amostras de solo, *Oncosclera navicella*, *Sterrastrolepis brasiliensis* e *Drulia browni*.



A maior recuperação de estruturas inteiras no material sedimentar é particularmente relevante para estudos paleoambientais. Antes do processamento laboratorial, as espículas depositadas nos sedimentos podem ter sido submetidas a fragmentação, transporte, dissolução e retrabalhamento. Dessa forma, um método que reduza danos adicionais contribui para preservar os caracteres necessários à identificação e, conseqüentemente, aumenta a confiabilidade das interpretações paleoecológicas, paleolimnológicas e sedimentológicas.

Os resultados também demonstram que a remoção da matéria orgânica e a preservação das espículas devem ser consideradas conjuntamente, mas avaliadas

como respostas distintas. Em *S. brasiliensis*, por exemplo, o H_2O_2 preservou maior número de estruturas inteiras, apesar da maior permanência de resíduos orgânicos. Para *D. browni*, o peróxido promoveu melhor limpeza, enquanto o HNO_3 resultou em número ligeiramente superior de espículas intactas. Portanto, uma lâmina mais limpa não representa necessariamente maior recuperação de estruturas inteiras.

Figura 3. Espículas de esponjas (*Oncosclera navicella*, *Drulia Brawni* e *Sterrastrolepis brasiliensis*) oxidadas com ácido nítrico (65%) e peróxido de hidrogênio a 130 volumes.

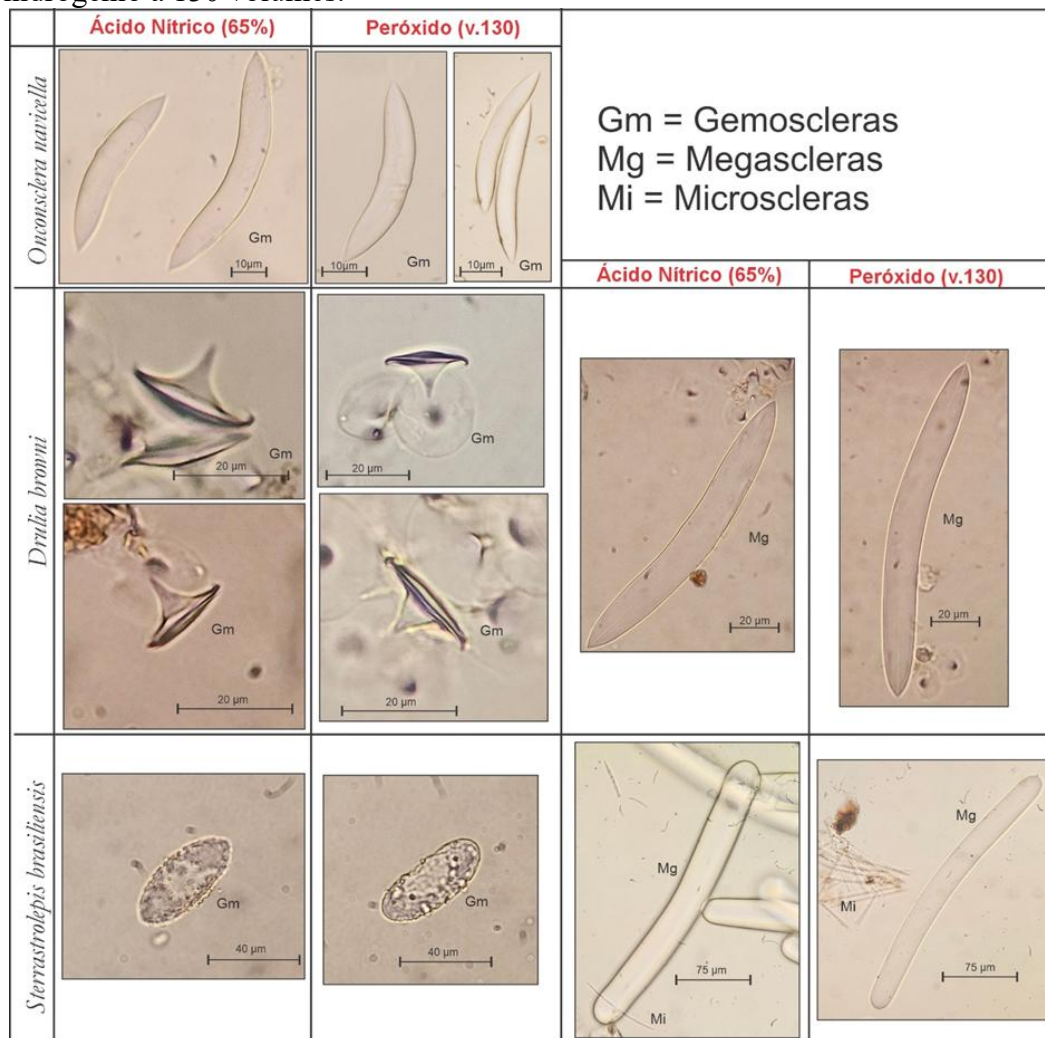
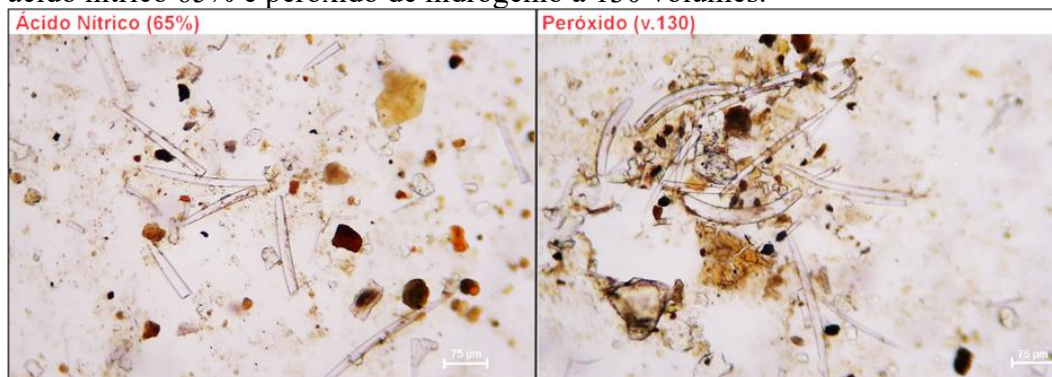


Figura 4. Material sedimentar contendo espículas de esponjas preparado com ácido nítrico 65% e peróxido de hidrogênio a 130 volumes.



O desempenho do H_2O_2 está de acordo com sua utilização na preparação de outros materiais biogênicos silicosos, como fitólitos e diatomáceas, e com sua indicação como alternativa para a digestão da matéria orgânica em protocolos envolvendo espículas de esponjas¹⁵⁻¹⁶. Entretanto, a variação observada entre as amostras indica que a eficiência do tratamento pode ser influenciada pela espécie, pelo teor e pela composição da matéria orgânica, assim como pela massa processada, pelo volume do reagente e pelas condições de aquecimento.

Durante os procedimentos, a reação mais intensa do H_2O_2 em materiais com elevada quantidade de matéria orgânica demonstrou a necessidade de reduzir ou controlar rigorosamente o volume de material submetido à oxidação. Esse cuidado é fundamental para evitar extravasamentos e perdas de amostra, principalmente no processamento de Organossolos e de outros sedimentos ricos em matéria orgânica. Embora sua aquisição seja menos burocrática do que a do HNO_3 , o H_2O_2 a 130 volumes é um agente oxidante concentrado e deve ser manipulado em capela de exaustão, com os equipamentos de proteção individual adequados.

De maneira geral, o H_2O_2 apresentou melhor desempenho na remoção da matéria orgânica em *O. navicella* e *D. browni*, além de favorecer a recuperação de espículas inteiras no solo, em *O. navicella* e em *S. brasiliensis*. Esses resultados sustentam seu potencial como alternativa ao protocolo convencional com HNO_3 . Contudo, considerando que a análise foi predominantemente quali-quantitativa e

descritiva, as diferenças observadas não permitem afirmar a superioridade estatística de um tratamento. Estudos posteriores deverão ampliar o número de repetições e materiais analisados, incorporar medidas de dispersão e testes estatísticos e avaliar diferentes concentrações, volumes e tempos de exposição, permitindo maior padronização do protocolo.

Conclusões

O peróxido de hidrogênio a 130 volumes mostrou-se uma alternativa tecnicamente viável ao ácido nítrico a 65% para a digestão da matéria orgânica e preparação de lâminas permanentes para observação de espículas de esponjas. O tratamento apresentou desempenho satisfatório na remoção de resíduos e na preservação das estruturas silicosas, tanto em amostras de esponjas atuais quanto em material sedimentar. Entretanto, a eficiência do protocolo variou entre os materiais analisados, indicando que as características da amostra devem ser consideradas na escolha e no ajuste do tratamento. Assim, o H_2O_2 apresenta potencial para aplicação em estudos taxonômicos, paleolimnológicos e paleoambientais, desde que sejam observadas condições adequadas de processamento e segurança laboratorial.

Referências

1. Volkmer-Ribeiro C, Pauls SM. Esponjas de agua dulce (Porifera, Demospongiae) de Venezuela. *Acta Biológica Venezuelica*. 2000; 20 (1): 1-28.
2. Volkmer-Ribeiro C, Parolin M. As esponjas. In: Parolin M, Volkmer-Ribeiro C, Leandrini JÁ. (org.). *Abordagem ambiental e interdisciplinar em bacias hidrográficas no Estado do Paraná*. Campo Mourão: Editora da FECILCAM; 2010. p. 105-130
3. Ereskovsky AV, Lavrov AI. Asexual reproduction in sponges: a review. *Molecular Reproduction and Development*. 2026; 93(1): e70083. <https://doi.org/10.1002/mrd.70083>
4. Docio L, Parolin M, Pinheiro U. A contribution to adequate use of freshwater sponges as a proxy in paleoenvironmental studies. *Zootaxa*. 2021; 4915(4): 506-528. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4915.4.3>

5. Zviejkovski IP, Stevaux JC, Leli IT, Parolin M, Campos JB. Sponges as a complement of sedimentary facies analysis in island deposits of Upper Paraná River. *Journal of South American Earth Sciences*. 2017; 79: 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2017.07.013>

6. Silvestre CP, Silva ALC, Silva MAM, Martins MA, Baptista Neto JA, Parolin M, Macario KCD, Souza RCCL, Fernandez GB, Amaral DF. Sedimentary facies and Holocene depositional evolution of the Maricá Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 2021; 111: 103438. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2021.103438>.

7. Racek AA. Spicular remains of freshwater sponges. In: Cowgill UM, Hutchinson GE, Racek AAv, Patrick R, Tsukada M (ed.). *The history of Laguna de Petenxil: a small lake in northern Guatemala*. New Haven: Yale University; 1966. v. 17, p. 78-83.

8. Oliveira MRF, Costa C, Benedito E. Trends and gaps in scientific production on freshwater sponges. *Oecologia Australis*. 2020; 24(1): 61-75. <https://doi.org/10.4257/oeco.2020.2401.05>.

9. Parolin M, Volkmer-Ribeiro C, Stevaux JC. Use of spongofacies as a proxy for river-lake paleohydrology in Quaternary deposits of central-western Brazil. *Revista Brasileira de Paleontologia*. 2008; 11(3): 187-198. <http://dx.doi.org/10.4072/rbp.2008.3.05>

10. Silva KC, Parolin M, Bissa WM. Espículas de esponjas vs. variações do nível relativo do mar na região de Iguape, Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Paleontologia*. 2012; 15(3): 319-326. <https://doi.org/10.4072/rbp.2012.3.07>

11. Volkmer-Ribeiro C. Esponjas de água doce. In: *Manual de técnicas para preparação de coleções zoológicas*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoologia; 1985. n. 3, p. 1-6.

12. Presidência da República (Brasil). Decreto nº 10.030, de 30 de setembro de 2019. Aprova o Regulamento de Produtos Controlados. D. O. U., Brasília, DF; 30 set. 2019. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/decreto/d10030.htm

13. Ministério da Defesa (Brasil). Exército Brasileiro. Comando Logístico. Portaria nº 118-COLOG, de 4 de outubro de 2019. Dispõe sobre a lista de Produtos Controlados pelo Exército e dá outras providências. Brasília, DF: Comando Logístico; 2019. https://www.sgex.eb.mil.br/sg8/006_outras_publicacoes/07_publicacoes_diversas/06_comando_logistico/port_n_118_colog_04out2019.html

14. Ministério da Defesa (Brasil). Exército Brasileiro. Comando Logístico. Portaria nº 56-COLOG, de 5 de junho de 2017. Dispõe sobre procedimentos administrativos relativos ao registro e às atividades com produtos controlados pelo Exército. Brasília, DF: Comando Logístico; 2017. https://www.sgex.eb.mil.br/sg8/006_outras_publicacoes/07_publicacoes_diversas/06_comando_logistico/port_n_056_colog_05jun2017.html
15. Jain R, Dhali S, Nigam H, Malik A, Malik HK, Satyakam R. Recovery of diatom bio-silica using chemical, thermal, and plasma treatment. *Bioresource Technology Reports*. 2022; 18: 101035. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101035>
16. Rasbold GG, Calheira L, Domingos-Luz L, Pessenda LCR, Pinheiro U, McGlue MM. A morphological guide of neotropical freshwater sponge spicules for paleolimnological studies. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2023; 10: 1067432. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1067432>
17. Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil). Norma Regulamentadora nº 6 (NR-6): equipamento de proteção individual: EPI. Brasília, DF: Ministério do Trabalho e Emprego; 2025.
18. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 14725: produtos químicos — informações sobre segurança, saúde e meio ambiente: aspectos gerais do Sistema Globalmente Harmonizado (GHS), classificação, FDS e rotulagem de produtos químicos. Rio de Janeiro: ABNT; 2023.
19. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 13697:2010: equipamento de proteção respiratória: filtros para partículas. Rio de Janeiro: ABNT; 2010.
20. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 13698:2011: equipamento de proteção respiratória: peça semifacial filtrante para partículas. Rio de Janeiro: ABNT; 2011.

Conflito de interesse: Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Financiamento: Apoio financeiro da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (CP 23/2024 - TC 576/25).

Agradecimentos: Os autores agradecem a Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior e a Fundação Araucária (TC 575/25), pelo apoio financeiro, também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de produtividade (Processo nº 308093/2023-2) a M.P.; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas por meio dos Processos nº 88887.157443/2025-00 (T.S.C.) e nº 88887.905477/2023-00 (L.M.O.).

Como citar:

Parolin M, Camargo TS, Oliveira LM, Santos MA. Protocolos laboratoriais para observação de espículas de esponjas: assembleia moderna e material sedimentar. Revista Acta Biologica Brasiliensia. 2026; 9: e20260005. <https://doi.org/10.18554/acbiobras.9257>