

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1. Material

Para a avaliação da formação de biofilme, foram confeccionados por usinagem, cupons de teste em aço API X80, material usado em dutos de petróleo, para os testes dinâmicos e estáticos. A figura 10 apresenta a vista lateral do cupom circular utilizado no ensaio dinâmico, de diâmetro igual a 8,0 mm e vista lateral com altura de 3,0 mm. A área superficial dos cupons, exposta ao fluido de teste, foi de 0,5 mm². Há uma redução do diâmetro inferior do cupom, que resulta na formação de ângulo de 5° C. Foram confeccionadas 70 unidades.

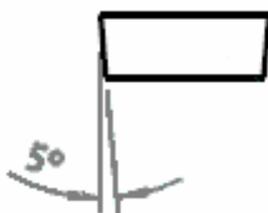


Figura 10 – vista lateral do cupom de prova (dimensões em milímetros).

Os cupons para o teste estático, conforme a figura 11, possuem formato retangular de comprimento igual a 3 cm e largura de 1 cm. As duas faces do material foram expostas ao fluido oleoso totalizando uma área de 6 cm². Foram confeccionadas 60 unidades.

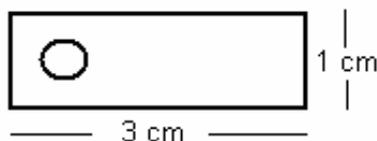


Figura 11 – vista do topo do cupom de prova.

A composição química, dada em porcentagem em peso, do aço utilizado está apresentada na tabela 1. A diferença no balanço de massa representa o percentual de ferro.

Tabela 1 – Composição química dos aços API X80 (% em peso).

Aço X80	C	Mn	Si	P	S	Nb	V	N	Ti	Cr	Mb	Al
	0,05	1,77	0,22	0,015	0,003	0,068	0,020	0,030	0,018	0,13	0,26	0,030

Antes dos testes os cupons foram jateados com microesfera de vidro em equipamento Poloar, cabine pp 50 para retirada de impurezas e incrustações. Após o tratamento descrito, os cupons foram colocados em acetona por 24 horas.

4.2. Fluido de processo

Foi utilizado óleo cru proveniente da produção de plataformas de petróleo localizados no ativo norte da Bacia de Campos – RJ. Este óleo foi coletado no terminal de Barra do Furado. A temperatura do local de coleta é de aproximadamente 23° C e salinidade de 70g/L. O óleo apresenta um BSW (Basic Sediments Water) de 1%. Devido à capacidade de bombeio do “Looping” ser reduzida, foi necessário à adição de 12% v/v de gasolina em 25L de fluido oleoso. Este fluido oleoso utilizado para o ensaio apresenta viscosidade $\eta = 0,02068\text{Pa}\cdot\text{s}$ (figura 12), bem abaixo da viscosidade do óleo da Bacia de Campos.

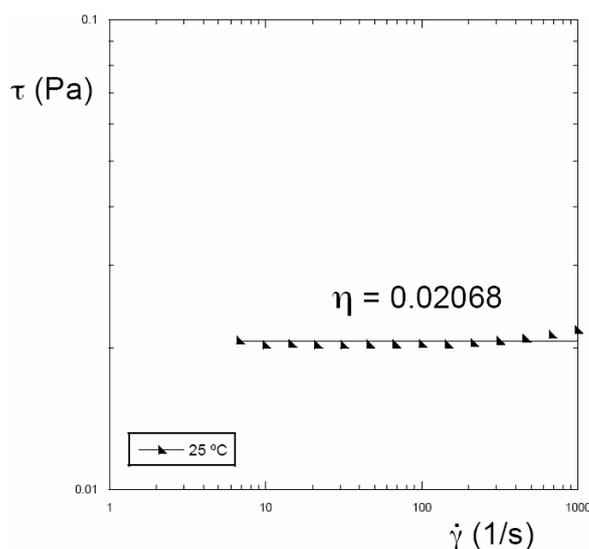


Figura 12 - Análise da viscosidade do óleo

4.3. Ensaio dinâmico



Figura 13 – Sistema “Looping”.

Para os ensaios dinâmicos foi utilizado um sistema “looping” (Figura 13), fechado, onde tanto a base quanto a tubulação foram confeccionados em polipropileno. A tubulação possuía 1,9 cm de diâmetro interno, entrada para 20 corpos de prova, conectados a um reservatório de 25 litros de capacidade com tampa de acrílico. Todas as conexões foram feitas com material polimérico. Foi acoplado ao sistema um rotâmetro para medida da vazão, e sistema de registro para controle da vazão. Este equipamento simula as condições de campo, onde a vazão não varia durante o processo. Os dados do processo estão mostrados na tabela 2:

Tabela 2 – Dados do processo.

<ul style="list-style-type: none"> • Vazão: 8,3 LPM 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: 32±1 °C
<ul style="list-style-type: none"> • Velocidade de escoamento: 0,5 m/s 	<ul style="list-style-type: none"> • Regime de processo: Turbulento Re= 9.481

Na figura 14 destaca-se o rotâmetro que foi acoplado ao sistema para medida de vazão.



Figura 14 – Rotâmetro inserido no sistema.

O controle das vazões foi realizado através do manejo de válvulas (tipo esfera de fechamento rápido) instalado no sistema (figura 15), com o objetivo de manter o fluxo constante.



Figura 15 – Válvula de controle da vazão.

A circulação do fluido de processo foi realizada com auxílio de uma bomba magnética NH-30PX-T em polipropileno, Motor 10 Watts e 220 Volts, conexão de sucção \varnothing 3/4" Rosca NPT-M, conexão de descarga \varnothing 3/4" Rosca NPT-M, Rotor \varnothing 62 mm, montagem horizontal, selagem com acoplamento magnético, vazão de 8,3 LPM, pressão de descarga 3,0 m.c.a., pressão de sucção afogada, densidade 1, à temperatura ambiente (Figura 16).



Figura 16 – Bomba magnética NH-30PX-T

O detalhe do dispositivo do suporte do cupom de teste pode ser visualizado na figura 17.



Figura 17 – Suporte do cupom no “loop”

Com a finalidade de simular as condições de escoamento de óleo nos oleodutos e as condições de crescimento de culturas mistas, sésseis e planctônicas, para este fluido oleoso foi realizado de 3 ensaios.

Os ensaios ocorreram em seqüências sendo assim, o mesmo fluido oleoso foi utilizado para todos os ensaios. Inicialmente foram colocados 15 corpos de prova no “Looping”, onde a cada período de tempo eram retirados 3 cupons (2 para microscopia eletrônica e 1 para análise microbiológica) somando um total de 15 corpos de prova constituindo o ensaio 1. Após a retiradas de todos os corpos de prova do ensaio 1 foram colocados 10 corpos de prova por 15 dias para a formação do biofilme, em seguida foram acrescentados mais 10 corpos de prova, completando os 20 espaços do sistema. Iniciando o ensaio 2 e 3 foi adicionado 30ppm do agente biocida THPS e após 24 horas de interação deste ao sistema foi retirado os corpos de prova para cada tempo.

Ensaio 1 – sem adição de THPS

Avaliação da cinética de formação do biofilme para períodos de 24, 96, 168, 264 e 360 horas por microscopia eletrônica e contagem bacteriana em fluido oleoso. Foram avaliados 10 cupons, sendo 5 para análises de microscopia (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Os grupos analisados foram, bactérias precipitantes de ferro (BPF), bactérias facultativas heterotróficas (BFHT), bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias anaeróbicas heterotróficas (BANHT).

Para avaliação das imagens foram utilizados os protocolos 2 e 3 que serão descritos mais a frente.

Ensaio 2 – com adição de THPS

Avaliação da cinética de formação do biofilme por períodos de 24, 96, 168, 264 e 360 horas para microscopia eletrônica e contagem bacteriana, sob a influência de 30ppm de agente biocida THPS (sulfato tetrakis(hidroximetil)fosfônio). Foram analisados 10 cupons, sendo 5 para análises de microscopia (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Foram quantificados os mesmos grupos bacterianos do ensaio 1.

Ensaio 3 –THPS após biofilme formado

Avaliação da influência da adição de THPS (concentração 30ppm) sobre o biofilme já formado, a retirada dos cupons ocorreram nos períodos dos ensaios anteriores (24, 96, 168, 264 e 360 horas). Foram analisados 10 cupons, sendo 5 para análises de microscopia (1 cupom para cada tempo) e 5 para contagem bacteriana (1 cupom para cada tempo). Foram quantificados os mesmos grupos bacterianos do ensaio 1.



Figura 18 – Retirada do suporte do “looping” contendo o cupom.

Os cupons destinados para contagem bacteriana foram coletados em solução redutora (Figura 19B) e os destinados para microscopia eletrônica de varredura coletados em solução de tampão cacodilato contendo Tween 80 (Figura 19A).



Figura 19A – Cupom na solução de tampão cacodilato

Figura 19B – Cupom na solução redutora.

Após a retirada de cada suporte contendo o cupom este eram substituídos por uma rosca para manter o sistema fechado e não ocorrer vazamento (Figura 20).



Figura 20 – Rosca para manter o sistema fechado.

4.4. Ensaio Estático

Esse método foi utilizado com a finalidade de avaliar o desenvolvimento de biofilmes em condições estáticas de fluxo e simular uma situação de armazenamento do fluido oleoso em tanques.

Esta simulação foi realizada utilizando frascos tipo antibiótico (Figura 21), contendo 50mL de fluido oleoso. O estudo foi conduzido segundo o modelo apresentado para condições dinâmicas, onde para cada ponto de avaliação cinética foram utilizados frascos individuais.



Figura 21 – Sistema estático

4.5. Meios de cultura e soluções

4.5.1. Solução redutora para preservação de biofilme bacteriano

Essa solução foi preparada em água do mar sintética e utilizada para lavagem dos corpos de prova retirados do “looping” de forma a remover as bactérias planctônicas, para os procedimentos de extração do biofilme (raspagem) dos corpos de prova que precederam o inóculo e os métodos de contagem das bactérias. O preparo da solução salina redutora foi realizado sob purga de nitrogênio. O pH foi corrigido ao valor de 7,8. Posteriormente o meio foi distribuído em frascos tipo antibiótico, tampados e selados. Foram então esterilizados por 15 minutos a 121°C (Penna, 2004). Os componentes dessa solução está descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Composição da solução salina redutora.

Reagentes	Quantidade
Triglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Solução de resazurina de 0,025% (m/v)	4 ml
Água do mar sintética	1 000 ml

4.5.2. Meio Postgate E – modificado para bactérias redutoras de sulfato mesófilas (m-BRS)

Meio nutritivo usado para a seleção de culturas de BRS e também para a contagem de populações (Postgate, 1984). Esse meio deve ser incubado em anaerobiose. O sal de ferro, na concentração de 0,5% é usado com propósito de diagnóstico. A formação de um precipitado preto de FeS, escurecendo o meio, evidencia a redução bacteriana de sulfato. A adição de Ágar-ágar na quantidade de 1,9 g/l para a formação de meio semi-sólido foi baseada na indicação de Surinach (1986) para facilitar o processo de adesão no Agar. A resazurina, um indicador da atividade microbológica em anaerobiose foi introduzida no meio de cultura.

O preparo do meio é realizado cozinhando-se o Agar em água do mar sintética, sob agitação, até que ele esteja completamente dissolvido, quando então o aquecimento é desligado, mantendo-se agitação, e os componentes restantes são adicionados. O pH é ajustado para 7,6 com uso de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. O meio recebe purga de nitrogênio durante todo o preparo e o estado de anaerobiose é detectado pela mudança de cor da resazurina, de azul para róseo. Ao final, é acondicionado em vidros tipo antibiótico de 10mL ou 50mL. Os vidros recebem uma tampa de borracha e lacre de alumínio. A esterilização é feita em autoclave durante 15 minutos após atingir a temperatura de 121° C. Após a esterilização, parte do ágar-ágar apresenta-se em forma de flocos e o meio apresenta-se incolor ou róseo. A composição do meio Postgate E modificado e dada na tabela 4.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura Postgate E modificado.

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	Água do mar sintética	1 000 ml
2	Agar-agar	1,9 g
3	KH_2PO_4	0,5 g
4	Na_2SO_4	1,0 g
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,608 g
6	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,83 g
7	Extrato de levedura	1,0 g
8	Ácido ascórbico	0,1000 g
9	Lactato de sódio 50% m/v	7,0 ml
10	Solução de res azurina 0,025% m/v	4,0 ml
11	NaCl	5,0 g
12	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
13	NH_4Cl	1,0 g

4.5.3. Meio de cultura para bactérias precipitante de ferro (BPF)

Foram quantificadas pela técnica de contagem de colônias (unidades formadoras de colônias), utilizando-se o meio contendo Citrato Férrico Amoniacal de composição descrita na tabela 5.

Tabela 5 – Composição do meio de cultura BPF.

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	Água do mar sintética	1 000 ml
2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
3	NaNO_3	0,5 g
4	K_2HPO_4	0,5 g
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
6	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,134 g
7	Citrato férrico amoniacal	10,0 g
8	Ágar	15,0g

O meio foi preparado em água do mar sintética, o pH do meio foi ajustado para 6,6 antes da esterilização à 0,5° C por 20 minutos. Após a inoculação o meio foi incubado à 30° C por 5 dias (CETESB, Norma L5. 207), quando procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc).

4.5.4. Meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas (BANHT)

Esse meio de cultura foi usado nos experimentos realizados no sistema dinâmico de fluxo de óleo e no sistema estático para a seleção de culturas de bactérias anaeróbias heterotróficas. Os componentes desse meio aparecem na tabela 6.

O meio foi preparado em água do mar sintética, recebeu purga de nitrogênio durante todo o preparo, o pH é ajustado para 7,6. Ao final, é acondicionado em vidros tipo antibiótico de 10mL. Os vidros recebem uma tampa de borracha e lacre de alumínio. A esterilização é feita em autoclave durante 15 minutos após atingir a temperatura de 121° C (Penna, 2004).

Tabela 6 – Composição do meio de cultura para bactérias anaeróbias heterotróficas.

Ordem de adição do reagente	Reagentes	Quantidades
1	Água do mar sintética	1000 ml
2	Glicose	5,0 g
3	Peptona universal	4,0 g
4	Extrato de levedura	1,0 g

4.5.5. Meio de cultura para bactérias facultativas heterotróficas (BFHT).

Foram quantificadas pela técnica de contagem de colônias (unidades formadoras de colônias), utilizando-se o meio contendo BFHT de composição descrita na tabela 8. O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes da esterilização à 0,5° C por 20 minutos. Após a inoculação o meio foi incubado à 30° C por 2 dias, quando procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc).

Tabela 7 – Composição do meio de cultura para bactérias facultativas heterotróficas .

Ordem de adição do reagente	Reagente	Quantidade
1	Água do mar sintética	1 000 ml
2	Glicose	1,0 g
3	Peptona universal	5,0 g
4	Extrato de levedura	1,0 g
5	Extrato	0,1 g
6	Ágar	15,0 g

4.5.7. Solução de Tampão Cacodilato

A solução de tampão cacodilato é utilizada para preparar o glutaraldeído e o tetróxido de ósmio e para as lavagens das amostras processadas para microscopia eletrônica. Esta solução deve sempre ser preparada a 0,1M e com pH 7,6.

4.5.8. Solução de Glutaraldeído

A solução de glutaraldeído é utilizada para o procedimento de fixação na microscopia eletrônica de varredura. O preparo da solução de glutaraldeído 5% foi realizado da seguinte forma: foi preparado o tampão cacodilato 0,1M com pH 7,6 e depois adicionado o glutaraldeído, temperatura ambiente. Esta solução é guardada na geladeira protegida da luz.

4.5.9 Solução de Clarke

A solução de Clarke foi utilizada para decapagem dos cupons de aço baixa liga para permitir a contagem de pites. A composição da solução de Clarke é composta de 1L de ácido clorídrico, 20g de trióxido de antimônio e 50g de cloreto estanoso. A solução foi mantida a temperatura ambiente, e utilizada segundo.

4.5.10. Solução de Tetróxido de Ósmio

A solução de tetróxido de ósmio é utilizada para uma pós-fixação no preparo de amostras para a microscopia eletrônica. Seu preparo requer muito cuidado por ser um reagente muito volátil e tóxico, devendo ser manuseada na capela com luva. O OsO₄ deve ficar a 1%, deste modo é diluído em tampão cacodilato 0,1M com pH 7,6 e posteriormente armazenado na geladeira em frasco âmbar, protegido da luz.

4.6. Biocida

THPS (Tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato) é uma nova classe de agentes antimicrobianos que oferece superior atividade antimicrobiana para controlar o crescimento de bactérias, algas e fungos, com um mínimo de efeitos sobre o meio ambiente.

Os benefícios do THPS incluem baixa toxicidade na sua forma oxidada, baixa dosagem e uma rápida degradação no meio ambiente. A aplicação industrial e/ou comercial ocorre no controle de recirculação da água no sistema de refrigeração

industrial no campo petrolífero é usado para controlar o crescimento microbiano na produção de óleo, incluindo o controle do crescimento bacteriano em testes hidrostáticos para oleodutos, sistemas de tratamento de água, para injeção e reinjeção de H₂O produzido, etc.

Em uma das etapas do experimento realizado foi utilizado o biocida THPS com fórmula $[(\text{CH}_2\text{OH})_4\text{P}]_2\text{SO}_4$, este produto é hidrossolúvel e o líquido apresenta coloração amarelo claro.

Tabela 8 – Característica do THPS.

Propriedades	Valor
Atividade contendo fósforo	3.0 ~ 11.5 %
pH	1.5 ~ 4.5
Densidade, g/cm ³ na temperatura de 20°C	até 1.39
Massa molecular	406.28g

4.7. Detecção e quantificação das bactérias

A detecção e a quantificação das bactérias foram realizadas no fluido de processo (bactérias planctônicas) e no biofilme aderido à superfície metálica (bactérias sésseis).

Para as bactérias planctônicas foi recolhida alíquota de cerca de 50,0 mL do fluido de processo, em frasco tipo antibiótico (Figura 22). Para o estudo dinâmico e para o estudo estático, após a retirada do cupom, foi realizada a inoculação direta do frasco do experimento nos meios de cultura específicos.



Figura 22 – Imagem ilustrativa da coleta de amostra para contagem de bactérias planctônicas.

No caso das bactérias sésseis, o procedimento de contagem e detecção foi precedido da remoção dos biofilmes formados através de raspagem mecânica por espátula (Figura 23). Esta raspagem foi realizada em frasco contendo solução redutora com adição de solução de Tween 80 (2 gotas) (Figura 24).

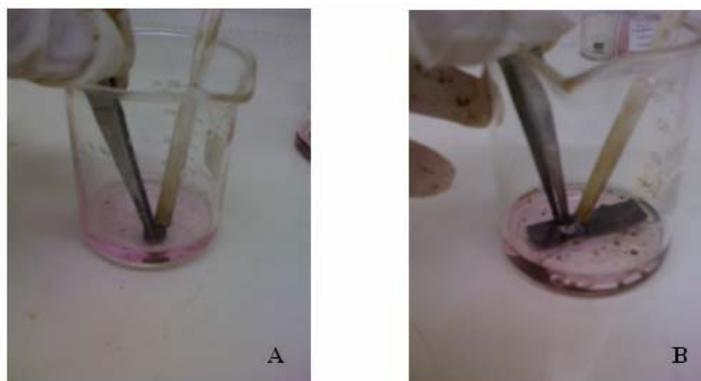


Figura 23 - A imagem A mostra a ação mecânica realizada em um cupom do sistema dinâmico e a B do sistema estático.



Figura 24 – Solução de Tween 80 gotejada sobre o cupom antes da ação mecânica.

As suspensões formadas foram inoculadas nos meios específicos para cada grupo microbiano (Figura 25). Foi feita avaliação de atividade metabólica das BRS. Para tal foram inoculados 5mL de suspensão celular em 45mL de meio Postgate-E modificado.



Figura 25 – Suspensão celular de bactérias sésseis.

Foi realizada a técnica das diluições sucessivas, após o período da incubação, foi realizada a contagem do número mais provável (NMP) (Figura 26). A manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.



Figura 26 – Inoculação nos Kits contendo meios de cultura específicos para crescimento de BRS e BANHT.

Para a quantificação de bactérias BPF e BFHT foi realizado plaqueamento através do método “pour plate” para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 27). A manipulação das amostras foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.

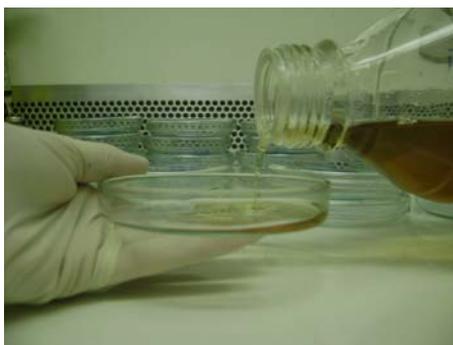


Figura 27 – Inoculação em placas de Petri contendo meios de cultura específicos para o crescimento de BPF e BFHT.

Após cada inoculação, os kits e as placas foram incubados em estufa bacteriológica a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante vinte e oito dias para as BRS e BANHT, 48 horas para culturas bactérias facultativas heterotróficas totais (BFHT) e 5 dias para as bactérias precipitantes do ferro.

4.8. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Energia Dispersiva de raios X (EDS)

As análises por MEV foram realizadas nos cupons retirados do sistema dinâmico e estático. Após a retirada do sistema, os cupons foram submetidos a diferentes protocolos de preparo. A seguir estão descritos estes protocolos.

Protocolo 1 – os cupons retirados do sistema foram colocados em solução de glutaraldeído 5% em tampão de cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente por 3 horas, e em seguida, dessalinizados e parcialmente desidratados. A dessalinização consistiu em lavagens sucessivas em soluções contendo água do mar sintética esterilizada e água destilada também estéril em diferentes proporções, começando da solução mais concentrada (30% de água destilada) até chegar a 100% de água destilada (Figura 28 A). Para a etapa de desidratação mergulha-se a amostra em diversas soluções apresentando concentrações crescentes de acetona em água destilada entre 30% v/v e 100% v/v (Figura 28 B).

Protocolo 2 – os cupons foram lavados em solução de tampão cacodilato 0,1M com 3 gotas de tween 80 por 30 minutos, depois fixados por 3 horas em solução de glutaraldeído 5% em tampão de cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente. Após a retirada do fixador os cupons foram lavados novamente em solução de tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos, e em seguida, dessalinizados e parcialmente desidratados. A dessalinização consistiu em lavagens sucessivas em soluções contendo

água do mar sintética esterilizada e água destilada também estéril em diferentes proporções, começando da solução mais concentrada (30% de água destilada) até chegar a 100% de água destilada. Para a etapa de desidratação mergulha-se a amostra em diversas soluções apresentando concentrações crescentes de acetona em água destilada entre 30% v/v e 100% v/v.

Protocolo 3 – Após a retirada do sistema, os cupons foram lavados em solução de tampão cacodilato 0,1M com 3 gotas de Tween por 30 minutos, depois fixados por 3 horas em solução de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,6 a temperatura ambiente e protegido da luz. Após a retirada do fixador os cupons foram lavados novamente em solução de tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos, e em seguida, pós-fixados por 1 hora em tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato 0,1 M no escuro. Após esta etapa o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente.

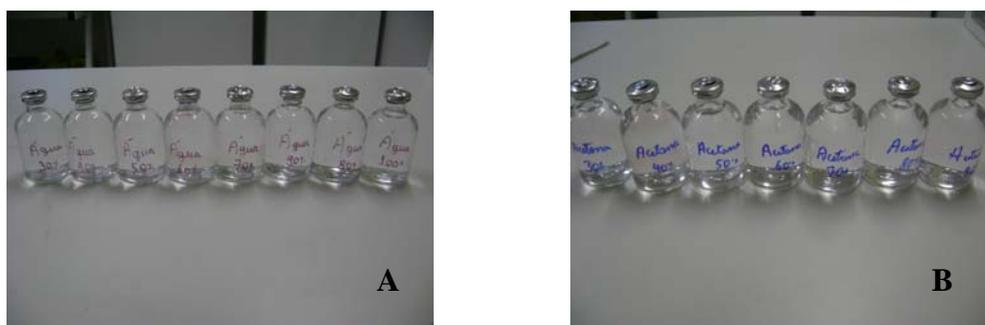


Figura 28 – A imagem A representa a bateria de dessalinização e a B representa a bateria de desidratação.

Após esta primeira etapa, a secagem da amostra foi concluída no aparelho de Ponto Crítico modelo CPD-030 do fabricante Balzers (Figura 29).



Figura 29 – Aparelho de ponto crítico.

Após estes procedimentos as amostras foram metalizadas no equipamento Sputter Coater Bal-Tec SCD 005 com alvos de prata (Ag) e com Carbon Evaporation Supply Bal-Tec CEA 035 (Figura 30).



Figura 30 – Metalizador

Posteriormente, foi realizada análise por MEV e EDX utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Leica S440 (Figura 31), equipado com sistema de microanálise por dispersão de energia (EDS) Link ISIS L300 com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II, de resolução de 133 eV para 5,9 keV e software para operação automática, inclusive do MEV. A metalização com a prata tem o objetivo de visualizar o enxofre presente na amostra através da análise de EDS, tendo em vista que outros metais como o ouro, se superpõem ao pico do enxofre, impossibilitando a sua visualização.



Figura 31 – Microscópio Eletrônico de Varredura

4.9. Contagem de Pites

A contagem de pites foi importante para avaliar como a corrosão localizada se desenvolveu ao longo do ensaio.

À medida que os cupons foram retirados do “looping”, estes foram inicialmente utilizados para a raspagem do biofilme e posteriormente utilizados para a contagem de pites sendo preservados em verniz. Após secagem dos cupons, estes foram acondicionados em dessecador. Antes de realizar o procedimento para contagem de pites, as amostras foram submetidas ao ultrassom por 25 minutos com acetona para remoção do verniz. Após esta etapa a acetona foi retirada e às amostras foram colocadas em solução de Clarke por 10 minutos, lavadas em água e preservadas em acetona. O processo foi realizado em capela.

As amostras após o procedimento foram levadas ao microscópio ótico utilizando como auxílio o programa Axion Vision. A contagem de pites foi realizada conforme a norma Standard Guide for Examination and Evaluation of Pitting Corrosion (G 46-94) – Annual Book of ASTM Standard, onde são analisadas 15 (quinze) áreas de $1.47E^{-6} \text{ m}^2$. Para cada pite foram medidas a área (abertura) e a profundidade.