UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GEOLOGIA E GEOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA

LIVIA VIANA DE GODOY FERNANDES

DESENHO EXPERIMENTAL DA ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS E A RESSURGÊNCIA DE CABO FRIO

Niterói

2018

LIVIA VIANA DE GODOY FERNANDES

DESENHO EXPERIMENTAL DA ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS E A RESSURGÊNCIA DE CABO FRIO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Instituto de Geociências, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Dinâmica dos Oceanos e da Terra.

Área de concentração: Biogeoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Ramos e Silva.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Calado

Niterói
2018

Ficha catalográfica automática - SDC/BIG
Gerada com informações fornecidas pelo autor

F363d Fernandes, Livia Viana de Godoy
Desenho experimental da acidificação dos oceanos e a ressurgência de Cabo Frio / Livia Viana de Godoy Fernandes ; Carlos Augusto Ramos e Silva, orientador ; Leandro Calado, coorientador. Niterói, 2018.
95 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PPGDOT .2018.d.05530528708

1. Acidificação dos oceanos. 2. Ressurgência. 3. Cabo Frio. 4. Lytechinus variegatus. 5. Produção intelectual. I. Silva, Carlos Augusto Ramos e, orientador. II. Calado, Leandro, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Geociências. IV. Título.

CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

LIVIA VIANA DE GODOY FERNANDES

DESENHO EXPERIMENTAL DA ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS E A RESSURGÊNCIA DE CABO FRIO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Instituto de Geociências, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Dinâmica dos Oceanos e da Terra.

Área de concentração: Biogeoquímica.

Aprovada em: _____de_____.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Carlos Augusto Ramos e Silva (Orientador)
Universidade Federal Fluminense

_____
Prof. Dr. José Antônio Baptista Neto
Universidade Federal Fluminense

_____
Prof. Dr. Ricado Coutinho
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

_____
Prof. Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia
Universidade Federal de Sergipe

_____
Prof. Dr. Estefan Monteiro da Fonseca
Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Para concretizar essa tese de doutorado precisei da ajuda e apoio de várias pessoas, tanto na vida pessoal como na profissional. Em primeiro lugar, preciso agradecer ao meu pai (Flávio Fernandes), o grande alavancador de tudo isso. Apoio incondicional na vida pessoal e profissional. Pessoa incrível (a mais incrível que eu já conheci rs). Em segundo, a minha mãe (Heloisa Fernandes) e meus filhos (Eric Fernandes e Melissa Fernandes) que seguraram todas as pontas e aguentaram firme as torrentes de uma filha/mãe fazendo uma tese.

Obrigada aos meus tios Suely Fernandes e Antônio Plastina que são todo o meu apoio em Niterói. Obrigada a Beto (Aldalberto Cruz), pai dos meus filhos, que, muitas vezes, deu o apoio necessário.

Ainda na minha vida pessoal, minha gratidão é grande a pessoas que me permitiram me clonar para os afazeres de mãe e dona de casa em mais 2 ou 3, as tias da Brinquedoteca, do Cenaq, a Selma Santiago e a Ângela Perissé.

Acho que vou ter que fazer uma grande lista das pessoas que me ajudaram, diretamente, na tese. Em um trabalho tão multidisciplinar, precisei do apoio de vários pesquisadores. Agradeço à Marinha do Brasil por tanto apoio, de infraestrutura, de pessoal, tudo. Em especial, ao Comandante Canabarro, que, em momento crítico da tese, foi responsável pela "luz no fim do túnel". A todos que tanto se empenharam, militares, civis, alunos da UFF e do IEAPM na nossa saída no querido Diadorim para as análises e coletas em nossa maravilhosa região. Carlos de Oliveira, Nicole Monteiro, Felipe Marinho, Allan Amaral, Augusto Pereira, Tenente Giuseppe, Thiago Matos, Comandante Márcio, aos militares embarcados muito obrigada.

Elizabeth Martins, você que tanto dividiu comigo seu conhecimento técnico e apoio carinhoso, obrigada.

Lohengrim Fernandes, obrigada pela parte do CTD e da clorofila, espero que eu faça virar artigo como pagamento rs.

Leandro Calado, obrigada pelo apoio e sabedoria na hora crítica da minha tese. Você não imagina o quanto foi fundamental.

Olga Danelon, querida, você faz falta da nossa convivência até hoje, obrigada por tudo.

Tânia Oda, obrigada pelos esclarecimentos.

Maria Helena Neves, obrigada pelo apoio com as algas. Luciano, também!

Augusto Pereira e Tenente Giuseppe, vou ter que agradecer de novo, obrigada!!!! Vocês me ajudaram em coisas demais, vocês têm muita paciência.

Sávio Campos, sempre grande amigo, obrigada! Você sempre trazendo soluções e grandes ideias. Às vezes grandes demais para meus braços.

Natália Saraiva, obrigada pelo gráfico lindo e pelas as análises de meteorologia.

Rogério Candella, muito obrigada! Foram tantas coisas que você me ajudou, de FUNDEP a conhecimentos técnicos. Adoro seu pseudo-mau humor.

Eliane Rodriguez, obrigada por me empurrar para o doutorado.

Ricardo Coutinho, obrigada por todas as sugestões e, principalmente, por ser o primeiro elo entre mim e meu orientador.

NAB, obrigada, foram muitas análises feitas lá, tanto no LOQ quanto com o prof. Anderson e suas alunas. Obrigada aos demais estagiários do LOQ que me ajudaram ao longo do tempo.

Obrigada, prof. Humberto Ribeiro e Ludimilla Caetano pela a análise de CO_2 e clorofila etc.

Muito obrigada, Godoy, por ter iniciado tudo comigo, pelos vários incentivos.

De modo geral, aos alunos e funcionários do IEAPM, que de alguma forma fizeram parte de tudo isso, obrigada.

Orientador Carlos Augusto, se chegamos ao final, com sucesso, fizemos valer a pena. Obrigada por insistir e persistir. Foi bom trabalhar com você, principalmente, nos lugares descontraídos. Nossas reuniões presenciais são sempre boas. Obrigada por sua presença, dedicação, correções, orientações, pelo conhecimento dividido e pelo seu tempo.

RESUMO

Em um cenário global em que há aumento crescente e acelerado da concentração de CO_2 na atmosfera, a acidificação dos oceanos é uma das suas ameaçadoras consequências. Os organismos marinhos com estruturas de carbonato de cálcio são os mais prejudicados. As regiões da costa em que há o fenômeno de ressurgência, como na cidade de Arraial do Cabo, já são expostas a águas com pH mais baixo. Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o sistema carbonato desta região. O pH variou entre 7.90 e 8.07. Os valores do estado de saturação de aragonita e calcita mostraram uma região supersaturada nesses minerais. Outro objetivo deste trabalho foi propor uma metodologia para estudar o efeito da acidificação da água do mar em larvas do ouriço *Lytechinus variegatus* de forma otimizada. O uso do citômetro de fluxo (FlowCAM) foi uma ferramenta que substituiu o microscópio, tornando a contagem e biometria das larvas muito mais rápida e em maior número amostral. Um aquário em forma de célula termostatizada foi proposta para desenvolver o experimento de acidificação com a vantagem de mantê-lo fechado para atmosfera, em contínua medição e controle do pH, por 24 h.

Palavras-chave: acidificação dos oceanos, ressurgência, Cabo Frio, *Lytechinus variegatus*, Arraial do Cabo.

ABSTRACT

In a global scenario where there is an increasing and accelerated growth of the atmospheric CO_2 concentration, the ocean acidification is one of their threatening consequences. The marine organisms with carbonate structures are the most injured. The coastal regions, where there is the upwelling phenomenon, as in Arraial do Cabo city, are already exposed to waters with lower pH values. One of the aims of this work was to evaluate the carbonate system of this region. The pH varied between 7,90 and 8,07. The aragonite and calcite saturation state values showed a supersaturated region in these minerals. Other aim of this work was to propose an optimized methodology to study the effect of sea water acidification in the sea urchin larvae of *Lytechinus variegatus*. The use of the flux cytometer (FlowCAM) was a tool to substitute the microscope, making the counting and biometry of lavaes much more faster and in a bigger sample number. An aquarium like a thermostated cell is proposed to develop the acidification experiment with the advantage to keep it closed to the atmosphere, in continuous measurement and control of pH, for 24 h.

Keywords: ocean acidification, upwelling, Cabo Frio, *Lytechinus variegatus*, Arraial do Cabo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Equilíbrio químico do sistema carbonato na água (adaptado de Dickson, 2010). Onde: CO_2(g)=dióxido de carbono atmosférico, CO_2*(aq)=ácido carbônico aquoso + dióxido de carbono aquoso, H^+(aq) = íon hidrogênio aquoso, H_2O água, HCO_3^-(aq) = íon bicarbonato aquoso, CO_3^{-2}(aq) = íon carbonato aquoso. 13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros analíticos para estudo do sistema carbonato (BOEHM et al., 2015; GATTUSO et al., 2011; GATTUSO; HANSSON, 2012; MCLAUGHLIN et al., 2015; RAMOS E SILVA, 2011). 18

SUMÁRIO

RESUMO.....7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 10
1. BASE TEÓRICA 12
1.1. Química do sistema carbonato.....13
1.2. pH.....19
1.3. Alcalinidade total (At).....20
1.4. Bombas física e biológica do carbono.....21
1.5. Registros e previsões da redução de pH nos oceanos 23
1.6. Efeito da acidificação dos oceanos sobre os organismos 24
1.7. O ouriço Lytechinus variegatus 25
1.8. Fenômeno da ressurgência e a acidificação dos oceanos.....25
1.9. Objetivos.....26
2. ARTIGOS.....26
Artigo 1:.....26
Journal of Ocean Coastal and Management (Será Submetido) 27
Speciation of carbonate system and measurement protocol to monitor ocean acidification in Cabo Frio upwelling system, South Atlantic Ocean 27
Artigo 2: Desenho experimental da acidificação nas larvas do ouriço *Lytechinus Variegatus* (Lamarck, 1816): Resultados Preliminares. 49
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74
APÊNDICE A - POP: Manual Operacional do Controlador e pH.....79
APÊNDICE B - POP controlador de pH - esquema da montagem do aparelho e instalação do software.....89

1. BASE TEÓRICA

A acidificação dos oceanos consiste no fenômeno global que vem ocorrendo, onde é confirmada a diminuição do pH dos oceanos. A causa desse fenômeno é o aumento de gás carbônico (CO_2) antrópico, na atmosfera, que se dissolve no oceano (RAVEN et al., 2005). Desde o início do século XX até 2017, a concentração de CO_2 atmosférico aumentou em 60% (de 250 para 409 ppm, Mauna Loa, Havaí), em taxas crescentes (https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/gr.html<acessado em 22/05/2017>) . Anteriormente, a maior concentração de CO_2 atmosférico, nos últimos 800 mil anos, havia sido de 300 ppm (LÜTHI et al., 2008; PETIT et al., 1999; SIEGENTHALER; STOCKER; MONNIN, 2005). Isto tem ocorrido devido ao lançamento de CO_2 antropogênico oriundo de atividades ligadas à agricultura, indústria, produção de cimento, uso de combustíveis fósseis e queimadas (BOYD, 2011; CALDEIRA; WICKETT, 2003; SABINE et al., 2004).

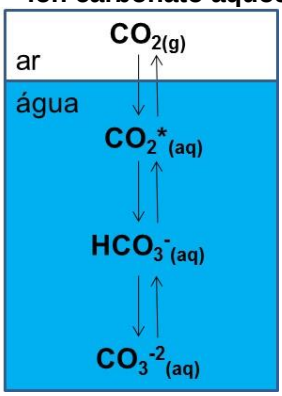
Definição da acidificação dos oceanos por Gattuso; Hansson (2012): "Acidifição dos oceanos se refere a uma redução no pH dos oceanos durante um período de, no mínimo, décadas. Isto ocorre, principalmente, pela absorção de CO_2 da atmosfera pelos oceanos. Porém, também pode ser causada pela adição ou retirada de outra substância química."

Com o aumento do CO_2 atmosférico, o gradiente, na interface água-ar dos oceanos, favorece a dissolução deste gás na água. Ou seja, a concentração do CO_2 na atmosfera fica maior do que na água do mar e, para restabelecer este equilíbrio, a água do mar absorve CO_2 da atmosfera. Desta forma, os oceanos absorvem cerca de 25% do CO_2 antropogênico (BOYD, 2011; LE QUÉRÉ et al., 2013; SABINE et al., 2004).

Uma vez dissolvido no oceano, o CO_2 forma ácido carbônico (H_2CO_3) na água do mar, o qual diminui o pH do ambiente e a disponibilidade do íon carbonato (CO_3^{2-}), como será visto com mais detalhes a diante (CALDEIRA; WICKETT, 2003; SARMIENTO; GRUBER, 2004; ZEEBE; WOLF-GLADROW, 2001).

1.1. Química do sistema carbonato

Figura 1: Equilíbrio químico do sistema carbonato na água (adaptado de Dickson, 2010). Onde: CO_2(g)=dióxido de carbono atmosférico, CO_2*(aq)=ácido carbônico aquoso + dióxido de carbono aquoso, H^+(aq) = íon hidrogênio aquoso, H_2O água, HCO_3^-(aq) = íon bicarbonato aquoso, CO_3^{-2}(aq) = íon carbonato aquoso.



Ao se dissolver em meio aquoso (Figura 1 e Equação (1)), o dióxido de carbono oriundo da atmosfera ($CO_{2(g)}$) forma duas espécies químicas: dióxido de carbono aquoso ($CO_{2(aq)}$) e ácido carbônico (H_2CO_3). O ácido carbônico logo se dissocia (Equação (2)) . Desta forma, o CO_2* é assumido com a soma de [H_2CO_3 + $CO_{2(aq)}$] (DICKSON, 2011; MILLERO, 2007; ZEEBE; WOLF-GLADROW, 2001).

$$CO_{2(g)} \rightleftharpoons CO_2{}^*{}_{(aq)} \quad \textbf{(1)}$$

$$CO_2{}^*{}_{(aq)} + H2O_{(l)} \rightleftharpoons H^+{}_{(aq)} + HCO_3{}^-{}_{(aq)} \quad \textbf{(2)}$$

$$HCO^-{}_{(aq)} \rightleftharpoons H^+{}_{(aq)} + CO_3{}^{2-}{}_{(aq)} \quad \textbf{(3)}$$

A Equação (1) se refere ao equilíbrio de solubilidade do dióxido de carbono entre ar e água.

Com a dissociação do ácido carbônico (Equação (2)), há a liberação de íon hidrogênio, o que aumenta sua concentração na água do mar. Consequentemente, leva à diminuição do pH (Tabela 1) (DICKSON, 2011; DONEY et al., 2009).

A água do mar é um excelente sistema tampão. Os equilíbrios ácido-base do sistema carbonato (Equações (2) e (3)) são os principais para conferir a água do mar esse efeito tampão. Sem este sistema tampão, o pH da água do

mar cairia mais drasticamente com essa adição do CO_2. A queda do pH da água do mar, ao longo do tempo, acaba levando à acidificação dos oceanos (GATTUSO; HANSSON, 2012; RIEBESELL et al., 2011)

Além dessas espécies químicas, há nutrientes na água do mar, como silicato, fosfato e amônia, que também possuem comportamento ácido-base. Porém, não serão representados nas equações devido sua baixa concentração na água do mar (DICKSON, 2011; MILLERO, 2007).

As relações de equilíbrio entre as concentrações dessas várias espécies podem ser escritas na forma de constantes de equilíbrio (Equações (4) à (6):

$$K_0 = [CO_2^*]/ f(CO_2) \quad \textbf{(4)}$$

$$K_1 = [H^+][HCO_3^-]/[CO_2^*] \quad \textbf{(5)}$$

$$K_2 = [H^+][CO_3^{2-}]/[HCO_3^-] \quad \textbf{(6)}$$

Onde, $f(CO_2)$ é a fugacidade do dióxido de carbono na fase gasosa. A concentração das espécies (entre colchetes) está na unidade mols por quilograma de solução. As constantes de equilíbrio estão em função da temperatura, pressão e salinidade da água do mar. Em DICKSON (2011), há uma compilação de equações a partir das quais é possível obter o valor das constantes em função da temperatura e da salinidade, considerando a pressão atmosférica de 1 atm.

Fugacidade: cujo símbolo é *f*, consiste numa função termodinâmica usada ao invés da pressão, em reações que envolvam gases reais e misturas. A fugacidade possui as mesmas unidades que a pressão e a fugacidade de um gás é igual à pressão se o gás for ideal. A fugacidade de um líquido ou de um sólido é a fugacidade do vapor com que ele está em equilíbrio. A razão entre a fugacidade e a fugacidade num estado padrão é a atividade. Para um gás, o estado padrão é escolhido por ser o estado para o qual a fugacidade é 1. A atividade é então igual à fugacidade. (ATKINS; PAULA, 2006).

Como foi visto, a partir da Equação (2), há liberação de íon hidrogênio. Devido ao baixo valor da constante de dissociação do ácido HCO^{3-} (Equação (3)), o aumento da concentração do íon hidrogênio no meio desloca o equilíbrio químico de modo a consumir o excesso deste íon. Consequentemente, o íon carbonato ($CO^{3=}$) é consumido. Desta forma, a concentração do carbonato cai na água do mar, o que prejudica os seres marinhos que, de alguma forma, o

utiliza na formação de suas estruturas (DONEY et al., 2009; MCLAUGHLIN et al., 2015).

O sal carbonato de cálcio na sua forma biogênica pode se apresentar de duas formas principais: aragonita e calcita. Aragonita e calcita são de um tipo de cristal de carbonato de cálcio polimorfo. Diferem-se na sua estrutura cristalina. Calcita é mais organizada e compacta, enquanto a aragonita é mais desorganizada e instável. Isto causa diferenças nas características físico-químicas das duas, como por exemplo, a solubilidade (ASMIL; ZULFIA, 2017; WEINER; DOVE, 2003).

O equilíbrio de dissolução da calcita e aragonita pode ser escrito assim (Equação (7)):

$$CaCO_{3(s)} \rightleftharpoons Ca^{2+}_{(aq)} + CO_3^{2-}{}_{(aq)} \quad \textbf{(7)}$$

onde, (s) indica a fase sólida (sal precipitado). A constante de equilíbrio correspondente é o produto de solubilidade (Equação (8)):

$$K_{ps} = [Ca^{2+}][CO_3^{2-}] \quad \textbf{(8)}$$

Devido suas características próprias, aragonita e calcita possuem diferentes produtos de solubilidade (K_{ps}) (Equações (9)(10)) (BUSENBERG; PLUMMER, 1989; CASELLA et al., 2017; DICKSON, 2011):

$$K_{ps(aragonita)} = [Ca^{2+}][CO_3^{2-}] \quad \textbf{(9)}$$

$$K_{ps(calcita)} = [Ca^{2+}][CO_3^{2-}] \quad \textbf{(10)}$$

O uso mais comum desse produto de solubilidade, particularmente, em pesquisas em acidificação dos oceanos, é para se calcular o estado de saturação da água do mar em relação aos sais de aragonita e calcita. O estado de saturação, Ω, é definido pela expressão (Equação (11)) (MCLAUGHLIN et al., 2015; MORSE; ARVIDSON, 2002; MORSE; ARVIDSON; LÜTTGE, 2007):

$$\Omega = [Ca^{2+}][CO_3^{2-}]/K_{ps} \quad \textbf{(11)}$$

O estado de saturação expressa a razão entre o produto da concentração medida dos íons, $[Ca^{2+}].[CO_3^{2-}]$, e o valor teórico do produto da concentração dos íons em uma solução em equilíbrio com a fase sólida do carbonato de cálcio (MORSE; ARVIDSON, 2002; MORSE; ARVIDSON; LÜTTGE, 2007). Se $\Omega = 1$, a solução está em equilíbrio com a fase sólida, está saturada. Se $\Omega > 1$, a solução é supersaturada em relação à fase sólida e a precipitação do sal ocorre. Se $\Omega < 1$, a solução está insaturada e não irá precipitar sólido (FEELY et al., 1988, 2004; JIANG et al., 2015). Em outras palavras, o estado de saturação é uma medida que mostra o quanto um ambiente está propício para formar a estrutura calcária, concha ou esqueleto.

Para o estudo do sistema carbonato são usados parâmetros analíticos que podem ser calculados ou medidos. Na Tabela 1, estão os parâmetros analíticos envolvidos, assim como as respectivas fórmulas, unidades e relação com temperatura e pressão. A alcalinidade total apresentada abaixo envolve os principais equilíbrios ácido-base da água do mar. Podem ser incluídas espécies químicas de outros equilíbrios ácido-base de constituintes que estão em baixa concentração na água do mar, como os nutrientes fosfato, silicato e amônia. Para o estudo do sistema carbonato, é preciso medir temperatura, salinidade e mais dois dos quatro parâmetros analíticos apresentados na Tabela 1: total de carbono inorgânico dissolvido, alcalinidade total, pH e/ou pressão parcial de gás carbônico. A partir destas medições, os outros parâmetros da Tabela 1 podem ser calculados, assim como os estados de saturação da calcita e aragonita e a concentração das espécies químicas envolvidas no estudo, como, por exemplo, o íon carbonato (BOEHM et al., 2015; GATTUSO; HANSSON, 2012; RIEBESELL et al., 2011). A Tabela 1 apresenta esses parâmetros, sua definição, suas unidades e sua dependência com a pressão e temperatura.

A grande vantagem de um parâmetro ser independente da temperatura e pressão (total de carbono inorgânico dissolvido e alcalinidade) é que seu valor para determinada amostra é o mesmo em qualquer temperatura ou pressão. Ou seja, para os parâmetros independentes de temperatura e pressão, os mesmos valores serão obtidos tanto se forem analisados no fundo do mar ou na superfície. Já os parâmetros dependentes de temperatura e pressão (pH e de pressão parcial de gás carbônico) terão valores diferentes caso sejam

analisados no fundo do mar ou na superfície. Para se utilizar parâmetros dependentes da temperatura e pressão, é necessário corrigir os valores, uma vez medidos na superfície, para as condições da temperatura e pressão do local da coleta (RAMOS E SILVA et al., 2017a).

Tabela 1: Parâmetros analíticos para estudo do sistema carbonato (BOEHM et al., 2015; GATTUSO et al., 2011; GATTUSO; HANSSON, 2012; MCLAUGHLIN et al., 2015; RAMOS E SILVA, 2011).

Parâmetro analítico	Fórmulas e observações	Unidade	Dependência da pressão e temperatura
Temperatura e Salinidade	Sua medição torna-se fundamental, pois as constantes de equilíbrio envolvidas nas reações químicas, estão em função da temperatura e salinidade.	ºC ‰ ou g/kg (grama de sal por quilograma de solução)	
DIC = total de carbono inorgânico dissolvido	DIC = $[CO_2^*] + [CO_3^{2-}]$	Mols por quilograma de solução	Independe de temperatura e pressão
A_T = alcalinidade total	$A_T = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] - [H^+]$ Refere-se ao balanço de carga na água do mar.		
pH = potencial de hidrogênio	pH = - log $[H^+]$	pH não é expresso em unidades. Porém, a concentração de hidrogênio ($[H^+]$) está em mols por quilograma de solução.	Depende de temperatura e pressão.
$p(CO_2)$ = pressão parcial de gás carbônico	$p(CO_2) = x(CO_2)p$ Pressão parcial do dióxido de carbono no ar em equilíbrio com a fase aquosa é uma medida do grau de saturação da amostra com o gás CO_2.	Microatmosfera	

1.2. pH

Existem diferentes escalas para a medição de pH. De modo geral, o pH é definido pela Equação (12) (DICKSON; SABINE; JAMES, 2007; MCLAUGHLIN et al., 2015; THOMPSON; TAYLOR, 2008) :

$$pH = -\log [H^+] \quad \textbf{(12)}$$

Na escala da concentração total de íon hidrogênio (pH_T), a concentração do íon hidrogênio é a concentração total do íon hidrogênio ($[H^+]_T$) (Equação (13)):

$$[H^+]_T = [H^+]_F + [HSO_4^-] \quad \textbf{(13)}$$

onde $[H^+]_F$ é a concentração de íons hidrogênio livres e $[HSO_4^-]$ a concentração do íon bisulfato. Ou seja, leva em consideração o hidrogênio complexado com o íon sulfato presente na água do mar. O íon $[H^+]_F$ está hidratado na forma de hidrônio (H_3O^+) (DICKSON; SABINE; JAMES, 2007; RAMOS E SILVA, 2011).

A escala da água do mar (pH_{SWS}) considera a (Equação (14)):

$$[H^+]_{SWS} = [H^+]_F + [HSO_4^-] + [HF^-] \quad \textbf{(14)}$$

onde [HF] é a concentração do ácido fluorídrico. Ou seja, leva em consideração o hidrogênio complexado, não apenas com o íon sulfato, mas, também, com o íon fluoreto (F^-). O íon sulfato se encontra em uma concentração muito maior do que a do fluoreto na água do mar (DICKSON, 2011; MARTZ et al., 2015; RAMOS E SILVA, 2011).

A escala de íons "livre" de hidrogênio (pH_F) considera apenas a concentração de hidrogênio livre ($[H^+]_F$), ou seja, apenas os hidrogênio hidratado na forma de hidrônio (H_3O^+).

A escala NBS (National Bureau of Standards), atualmente, chamada de escala NIST (National Institute of Standards and Technology), considera o pH

= -log a_{H+}. Esta escala é utilizada pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Ela não é ideal para a medição do pH na água do mar, e sim para água doce, porque o pH é medido segundo à atividade do hidrogênio presente no meio e não à concentração. Os tampões utilizados na escala NIST possuem força iônica baixa, o que não corresponde a força iônica da água do mar, gerando erro na medida. Esta escala, embora muito utilizada em estudos oceanográficos, não é recomendada para tal (DICKSON, 2011; RAMOS E SILVA, 2011; RAMOS E SILVA et al., 2017b, 2017a).

DICKSON (2011) e MCLAUGHLIN et al. (2015) recomendam o uso da escala da concentração total de íon hidrogênio (pH_T) para medições de pH na água do mar.

As constantes estequiométricas usadas nos cálculos para a determinação do pH, devem ser específicas para a escala de pH utilizada (DICKSON, 2011).

Os métodos de medição de pH recomendados para água do mar são: o potenciométrico com padrão do tampão Tris e o espectrofotométrico com o indicador roxo de *m*- cresol (CORNWALL; HURD, 2015; DICKSON, 2011; DICKSON; SABINE; JAMES, 2007; RAMOS E SILVA, 2011). O método potenciométrico consiste na medição da diferença do potencial gerada entre a amostra e o eletrodo combinado de vidro e calibração do aparelho com solução padrão do tampão Tris ([$CH_2OH)_3CNH_2$-Tris], tris-(hidroximetil) aminometano) (DICKSON, 1993; DICKSON; SABINE; JAMES, 2007). A força iônica/salinidade da solução tampão deve ser próxima a da água da amostra (S=35 para águas oceânicas e S=15 para águas estuarinas) (RAMOS E SILVA et al., 2017a). O método espectrofotométrico consiste na leitura da absorvância da amostra adicionada de indicador roxo de m-cresol lida no espectrofotômetro em dois comprimentos de onda diferentes (CLAYTON; BYRNE, 1993; DICKSON; SABINE; JAMES, 2007). A partir destas leituras, calcula-se o valor do pH da amostra.

1.3. Alcalinidade total (At)

A A_T é a capacidade de um meio aquoso de neutralizar ácidos (H^+). Desta forma, é a quantidade de substâncias presentes na água que agem como tampão. As espécies químicas que mais contribuem para a alcalinidade da água do mar são os íons do sistema carbonato, além do borato e da própria água (Equação (15)). Como descrito na Tabela 1, a unidade utilizada é em moles por quilograma de solução (mol/kg). A AT é um parâmetro independente da temperatura e pressão da amostra.

$$A_T = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] - [H^+] \quad (15)$$

A A_T pode ser determinada por diferentes métodos de titulação. O método mais importante é da titulação acidimétrica, no qual a água do mar é titulada com ácido clorídrico. O monitoramento da titulação é feito através de um eletrodo combinado de pH. O valor da AT é, então, calculado a partir do volume do titulante e o valor do potencial obtidos. A partir disso, constrói-se uma reta, utiliza-se o procedimento dos mínimos quadrados e ajuste de uma curva não linear. Este método pode ser utilizado com célula aberta ou fechada, com algumas alterações (CORNWALL; HURD, 2015; DICKSON, 2011; DICKSON; SABINE; JAMES, 2007; RAMOS E SILVA, 2011; VAN DER BERG; ROGERS, 1987).

1.4. Bombas física e biológica do carbono

Já foi mostrado como ocorre a troca do gás carbônico na interface atmosfera-água. Aprofundando o assunto, a incorporação do gás carbônico, sua fixação e reserva nos oceanos, depende de dois processos chamados de bomba biológica e bomba física de carbono. A bomba física ocorre nas altas latitudes, principalmente, no Oceano Austral. Por ser um local mais frio, os gases, no caso o CO_2, se dissolvem com mais facilidade da atmosfera para a superfície da água, deixando estas águas ricas em CO_2. Somado a isto, conforme a superfície do oceano vai congelando, o sal marinho é excluído dos cristais de gelo. Desta forma, as águas imediatamente abaixo do gelo tem a salinidade aumentada e, portanto, se tornam mais densas. Consequentemente,

a massa d'água que vai para o fundo dos oceanos desce rica em CO_2 sob a forma de carbonatos como descritos nas Equações (2) e (3) (HAIN; SIGMAN, 2014).

Na bomba biológica, por meio de uma sucessão de processos biológicos, como fotossíntese, respiração, alimentação, decomposição e precipitação biogênica de carbonatos, o carbono dissolvido na superfície da água é fixado e armazenado no oceano profundo. A bomba biológica inicia-se com a absorção de CO_2 pela fotossíntese, transformando carbono inorgânico em matéria orgânica. Consequentemente, com a grande retirada de CO_2 da água, a pressão parcial deste gás na superfície do oceano diminui, promovendo a absorção de mais dióxido de carbono proveniente da atmosfera. Conforme os organismos vão morrendo, essa matéria orgânica sedimenta, criando um fluxo de carbono orgânico do oceano superficial para o oceano profundo. Desta forma que a bomba biológica contribui para o armazenamento de carbono nas bacia oceânicas do planeta (HAIN; SIGMAN, 2014; HAUCK, 2015).

Na natureza, o carbono inorgânico dissolvido (CID) e a alcalinidade total (A_T) são manipulados tanto por fatores abióticos como bióticos. Por exemplo, a retirada de carbono inorgânico dissolvido do oceano pelo fitoplâncton e a formação de componentes orgânicos de carbono das células (carboidratos, gorduras, proteínas etc) fazem cair a concentração de CO_2. Por outro lado, se a célula morrer, sofrer degradação e seus constituintes se quebrarem em componentes básicos, a concentração do carbono inorgânico dissolvido se restabelece (GATTUSO; HANSSON, 2012). O saldo final é zero se a respiração aeróbica balancear a produção fotossintética, porque respiração e fotossíntese são representadas pela mesma reação química, mas em direções contrárias (ZEEBE; RIDGWELL, 2012) (Equações (16) (17)). Dependendo da fonte de nitrogênio (amônia ou nitrato), os processos de fotossíntese e respiração são representados por (GATTUSO; HANSSON, 2012):

$$106CO_2 + 16NH_4^+ + HPO_4^{2-} + 106\,H_2O \rightleftharpoons C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P + 106O_2 + 14\,H^+ \qquad (16)$$

$$106CO_2 + 16NO_3^- + HPO_4^{2-} + 122H_2O + 18\,H^+ \rightleftharpoons C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P + 138O_2 \qquad (17)$$

1.5. Registros e previsões da redução de pH nos oceanos

De fato, a média de pH das águas superficiais dos oceanos foi reduzido em mais de 0,1 unidades em comparação a média de pH de 8,17 do início da época pré-industrial. A temperatura média global da superfície da Terra aumentou em 0,78 ºC, neste período (HOEGH-GULDBERG et al., 2014). Santana-Casiano et al. (2007) e González-Dávila et al. (2010) relataram uma redução de pH de 0,0017 unidades por ano no Oceano Atlântico perto das Ilhas Canárias, durante o período de 1995-2004. Dore et al. (2009) documentaram uma tendência de diminuição de 0,0019 unidades por ano no centro do Oceano Pacífico Norte. Wootton; Pfister; Forester, (2008) reportaram uma série temporal de 8 anos de pH para águas costeiras de Washington, a qual mostrou uma significativa redução da média de pH de 0,045 unidades por ano, enquanto que a taxa de redução de pH pareceu acelerar (0,039 a 0,054). Dados paleontológicos mostram que uma diminuição da média do pH em 0,1 unidades por século não tem precedentes. Sendo isto 10 vezes mais rápido do que qualquer evento ocorrido nos últimos 300 milhões de anos (HÖNISCH et al., 2012; RIDGWELL; SCHMIDT, 2010). Por outro ponto de vista, C*aldeira*; Wickett (2005); Fabry et al. (2005) e Feely et al. (2004) mostraram que, em várias regiões dos oceanos, a camada de saturação de aragonita ficou mais estreita, menos profunda, encontrando-se de 40 a 200 m da superfície (LEINWEBER; GRUBER, 2013).

As previsões para o futuro são de que a problemática da acidificação dos oceanos se agrave. O IPCC (2014) desenha 4 cenários (Representative Concentration Pathways - RCP) possíveis que preveem o aumento da concentração de CO_2 na atmosfera e suas consequências até 2100. Os cenários RCP2.6 (o mais otimista) e RCP4.5 levam em consideração que haja diminuição da emissão antropogênica de gases do efeito estufa. As previsões para a concentração atmosférica de CO_2 é de que se atinja, até 2100, 430 a 480 ppm (para águas oceânicas: 421 ppm de CO_2, -0,14 unidades de pH, +1

ºC, -22% do íon carbonato), no cenário RCP2.6. Os cenários RCP6.0 e RCP8.5 (o mais pessimista) consideram que não haja esforço para a redução da emissão de gases do efeito estufa pelo homem. Já no cenário RCP8.5, a previsão da concentração de CO_2 na atmosfera é maior que 1000 ppm (para águas oceânicas: 936 ppm de CO_2, -0,43 unidades de pH, +3,7 ºC, -56% do íon carbonato) (HOEGH-GULDBERG et al., 2014). Essas mudanças na química da água do mar, devido ao excesso de CO_2, levariam milhares de anos para serem tamponadas pela dissolução natural de carbonato de cálcio proveniente dos sedimentos ou do intemperismo das rochas (IPCC, 2014). Até o presente, o oceano foi capaz de armazenar cerca de 25% do carbono atmosférico antropogênico (EDMUNDS; YARID, 2017; EVENSEN; EDMUNDS, 2016; GATTUSO; ALLEMAND; FRANKIGNOULLE, 1999; LE QUÉRÉ et al., 2013). Entretanto, acredita-se que até 2100 o sistema carbonato marinho irá saturar e o oceano não conseguirá mais absorver este excesso de dióxido de carbono produzido (HAIN; SIGMAN, 2014).

1.6. Efeito da acidificação dos oceanos sobre os organismos

A acidificação dos oceanos afeta os organismos marinhos. De modo geral, podem ocorrer múltiplos efeitos na funcionalidade, produtividade, crescimento e sobrevivência dos organismos (BIJMA et al., 2013; FABRY et al., 2008; GAZEAU et al., 2007; HOFMANN et al., 2010). Estágios iniciais de desenvolvimento e do ciclo reprodutivo são os mais sensíveis a influências adversas do meio ambiente (BYRNE; BYRNE, 2011). Os organismos marinhos que possuem estruturas de carbonato de cálcio, como esqueleto, concha, espinhos e tecas, são os mais afetados pela acidificação dos oceanos (JOKIEL et al., 2008; ORDOÑEZ; DOROPOULOS; DIAZ-PULIDO, 2014; RIEBESELL et al., 2000). A redução da taxa de calcificação tem sido relacionada à acidificação dos oceanos em corais, algas coralinas, coccolitoforídeos, moluscos e equinodermas (DINER et al., 2015; DUARTE et al., 2014; EDMUNDS; YARID, 2017; ORDOÑEZ; DOROPOULOS; DIAZ-PULIDO, 2014; WATSON, 2015). Por outro lado, espécies que utilizam carbono para o crescimento, como por

exemplo as algas, são beneficiadas pelo aumento de CO_2 na água do mar (CONNELL et al., 2013; CONNELL; RUSSELL, BAYDEN, 2010).

1.7. O ouriço Lytechinus variegatus

Os efeitos da acidificação dos oceanos nos ouriços-do-mar têm sido muito estudados. Esses organismos são boas opções para este tipo de estudo por serem excelentes indicadores biológicos, devido a sua grande sensibilidade ao ambiente, ao amplo conhecimento da sua embriologia e sincronismo de seu desenvolvimento (PAVILLON, 1988). Dentre as várias espécies de ouriço-do-mar brasileiras, o *Lytechinus variegatus* é muito utilizado testes toxicológicos no Brasil (MASTROTI, 2002). O *L. variegatus* se encontra em toda costa do Brasil, se estendendo até os Estados Unidos da América, é de fácil coleta e manuseio (NIPPER; PRÓSPERI; ZAMBONI, 1993).

1.8. Fenômeno da ressurgência e a acidificação dos oceanos

Alguns locais do globo já apresentam água do mar mais ácida, muitas vezes até com insaturação de aragonita. Isto ocorre em regiões de maiores latitudes, em regiões de ressurgência e em locais onde há atividade vulcânica marinha (FABRY et al., 2009; HALL-SPENCER et al., 2008; XUE et al., 2016). Desta forma, a acidificação dos oceanos é um risco ainda maior para esses locais (CAO et al., 2011; HARRIS; DEGRANDPRE; HALES, 2013; MARTZ et al., 2015).

O fenômeno da ressurgência traz à superfície ou à subsuperfície água mais fria, rica em CO_2 com menor concentração do íon carbonato e com menor valor do estado de saturação da aragonita, chamado de efeito de transporte físico (TAKAHASHI et al., 2014; XUE et al., 2016). Por outro lado, esta água é mais rica em nutrientes, o que favorece o crescimento do fitoplâncton (HALES et al., 2005). Então, consequentemente, a produção biológica vai absorvendo o CO_2, o que faz a concentração de carbonato e a saturação de aragonita aumentarem, chamado de efeito biológico. Esses dois antagônicos processos

associados à ressurgência afetam o sistema carbonato (BORGES; FRANKIGNOULLE, 2002). O conjunto de efeitos no sistema carbonato varia nos diferentes fenômenos de ressurgência. Isto depende de quanto a produção biológica consome os nutrientes aflorados (BORGES, 2005; BORGES; DELILLE; FRANKIGNOULLE, 2005; CAO et al., 2014; CHEN et al., 2004). Como exemplo, no trabalho de Feely et al., (2008) publicaram dados de um cruzeiro feito, em 2007, na costa da Califórnia, EUA, onde ocorre o fenômeno de ressurgência. Neste caso, há predominância do efeito do transporte físico sobre o efeito biológico. A água aflorada na costa, no momento do cruzeiro, é mais ácida, e tem um valor de pH de 7,6. Consequentemente, os valores de saturação de aragonita são menores que 1. Ou seja, nestas condições do ano de 2007, os organismos presentes já se encontravam em um meio que não propiciava a precipitação de sais de carbonato de cálcio, portanto, nem a calcificação de estruturas calcárias.

1.9. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Entender o sistema carbonato da região da Ressurgência de Cabo Frio, afim de:
   1.1) estipular os valores de pH utilizados nos experimentos de acidificação com larvas em laboratório, no contexto da realidade local;
   1.2) registrar a primeira análise deste tipo nesta região, seguindo os padrões internacionais.
2. Propor uma metodologia de estudo do efeito da acidificação dos oceanos sobre as larvas do ouriço *L. variegatus*, em laboratório.

2. ARTIGOS

Artigo 1:

Journal of Ocean Coastal and Management (Será Submetido)

Speciation of carbonate system and measurement protocol to monitor ocean acidification in Cabo Frio upwelling system, South Atlantic Ocean

Livia Viana de Godoy Fernandes[a], Flavio da Costa Fernandes[b], Humberto Marotta[c], Nicole Silva Caliman Monteiro[a], Carlos José de Oliveira e Silva[d], Estefan Monteiro Fonseca[a], Carlos Augusto Ramos e Silva[a,c,d*], Leandro Calado[a]

[a]Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Fluminense Federal University, Niterói/RJ, Code 24230-971, Brazil. liviadomar@hotmail.com,
[b]*Admiral Paulo Moreira Marine Research Institute,* Arraial do Cabo/RJ, Code 28930-000, Brazil.
[c]Department of Marine Biology, Fluminense Federal University (UFF), Niterói/RJ, Code 59075-970, Brazil.
[d]Center for Study of Water, Biomass and Oil (NAB), Fluminense Federal University, Niterói/RJ, Code 24210-330, Brazil.

*Corresponding author
Email: caugusto_99@yahoo.com

Keywords: ocean acidification, protocol, monitoring, upwelling

1- Introdução

Algumas regiões do planeta apresentam o fenômeno de ressurgência nos oceanos. O qual consiste na ascensão da água de camadas mais profundas para a superfície do mar. A ressurgência costeira é uma das mais comuns. Para que ocorra a ressurgência costeira é necessário um conjunto de fatores. É preciso que ventos persistentes incidam paralelamente à costa, ou seja, depende da topografia do litoral e da direção do vento. A intensidade do afloramento da água será proporcional à intensidade do vento. Conforme o vento incide, a massa de água superficial é levada 90° à costa e ao vento, devido à soma dos efeitos do transporte de Eckman e da força de Coriolis. A

massa de água deslocada é, então, substituída por camadas de água mais profundas (BAKUN et al., 2015; H; VALENTIN, 1999; RODRIGUES; LORENZZETTI, 2001).

As ressurgências costeiras mais intensas ocorrem na borda leste dos oceanos, ou seja, nas bordas oeste dos continentes. As quatro ressurgências mais intensas do planeta são: a da Corrente da Califórnia, no oeste da América do Norte; a da Corrente das Canárias, no noroeste da África e Península Ibérica; a de Humboldt ou do Peru, no oeste da América do Sul; e a da Corrente de Benguela, no sudoeste da África (WANG et al., 2015). Na borda oeste dos oceanos também pode ocorrer a ressurgência, embora de forma mais fraca. Como ocorre em na Nova Scotia, no Canadá; na Somália, no Oceano Índico; e em Arraial do Cabo, Brasil, chamada ressurgência de Cabo Frio (CHEGINI et al., 2018; DECASTRO et al., 2016; VALENTIN, 1984; VARELA et al., 2018).

Cerca de 1% das regiões costeiras do planeta estão expostas ao fenômeno da ressurgência. Apesar da baixa porcentagem de ocorrência, as regiões de ressurgência costeira são responsáveis por cerca de 20% do total de alimento marinho coletado no mundo. Por isso a importância ecológica, social e econômica dessas áreas (PAULY; CHRISTENSEN, 1995; VARELA et al., 2018). Portanto, regiões com ressurgência costeira possuem alta produção primária e grande biodiversidade (BAKUN et al., 2015).

Estas regiões são tão ricas em vida por consequência de dois efeitos inerentes do processo de ressurgência, o efeito de transporte físico e o biológico. O fenômeno da ressurgência traz à superfície ou à subsuperfície água mais fria, rica em CO_2, com menor concentração do íon carbonato e com menor valor do estado de saturação da aragonita, chamado de efeito de transporte físico (TAKAHASHI et al., 2014; XUE et al., 2016). Por outro lado, esta água é mais rica em nutrientes, o que favorece o crescimento do fitoplâncton (HALES et al., 2005). Então, consequentemente, a produção biológica vai absorvendo o dióxido de carbono (CO_2), o que faz a concentração de carbonato e a saturação de aragonita aumentarem, chamado de efeito biológico. Esses dois antagônicos processos afetam o sistema carbonato (BORGES; FRANKIGNOULLE, 2002). O conjunto de efeitos no sistema

carbonato varia nos diferentes fenômenos de ressurgência. Isto depende de quanto a produção biológica consome os nutrientes aflorados (BORGES, 2005; BORGES; DELILLE; FRANKIGNOULLE, 2005; CAO et al., 2014; CHEN et al., 2004). Como exemplo, Feely et al., (2008) mostraram a predominância do efeito do transporte físico sobre o efeito biológico durante um cruzeiro feito na costa da Califórnia, EUA, onde ocorre o fenômeno de ressurgência da Corrente da Califórnia. No momento que isto acontece, a costa é exposta a uma água mais ácida e, consequentemente, com menores valores de saturação de aragonita. Neste caso, o pH mínimo observado foi de 7,6 e valores de saturação de aragonita menores que 1 (água insaturada em aragonita).

A aragonita e calcita são as formas do sal carbonato de cálcio mais importantes para a formação das estruturas calcárias dos seres marinhos. Quando a água está insaturada em aragonita, e/ou calcita, os organismos marinhos calcificadores serão, diretamente, afetados (HARRIS; DEGRANDPRE; HALES, 2013; ORR et al., 2005; WEINER; DOVE, 2003).

Neste processo dinâmico de disputa entre efeitos de transporte físico e efeito biológico intrínseco da ressurgência, qualquer outro fenômeno ou processo que intensifique ou atenue a ressurgência, irá influenciar, de forma direta, o sistema carbonato da região. E assim, afetará seus organismos calcificadores e, conseqüentemente, o ecossistema em geral.

Os fenômenos de El Niño e La Niña são exemplos disso. Os eventos de La Niña intensificam a ressurgência na borda leste do Oceano Pacífico, enquanto o El Niño diminue a mesma. Mas este efeito não é observado em todas as ressurgências costeiras. Na ressurgência que ocorre em Java, por exemplo, El Niño intensifica o afloramento. Não há um estudo conclusivo da influência do El Niño e La Niña na ressurgência de Cabo Frio (FRANCHITO, SERGIO et al., 2008).

Por sua vez, o aquecimento global, consequência do aumento de CO_2 na atmosfera, também pode influenciar a intensidade das ressurgências. A maioria das ressurgências costeiras têm se intensificado desde o final do século XX (BAKUN et al., 2015; DECASTRO et al., 2016; VARELA et al., 2018). A

ressurgência de Cabo Frio parece estar se intensificando também, segundo VARELA et al. (2018).

A acidificação dos oceanos, outra consequência do aumento de CO_2 na atmosfera, tem levado o pH dos oceanos aberto e costeiro a diminuírem numa taxa sem precedentes na história humana (CALDEIRA; WICKETT, 2003). A absorção do CO_2 pelos oceanos, altera todo o sistema carbonato da água do mar, de uma forma análoga ao efeito do transporte físico que ocorre na ressurgência (ORR et al., 2005).

Por tudo apresentado, num cenário global de mudanças climáticas, acidificação dos oceanos e fenômenos naturais cíclicos como El Niño e La Niña, as regiões onde ocorre a ressurgência podem estar sofrendo um risco potencializado em relação à alteração do sistema carbonato na água e todas as suas consequências. Faz-se urgente o estudo dessas regiões e seu monitoramento. O presente trabalho tem como objetivo iniciar o estudo do sistema carbonato da ressurgência de Cabo Frio. Além disso, propor um protocolo para realização das medições dos parâmetros químicos e físico-químicos a ser utilizado em um monitoramento permanente na região.

2- Materiais e Métodos

2.1. Área de Estudo

A área de estudo está localizada na costa do município de Arraial do Cabo, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Fig. 1), entre as latitudes de 22°58' S a 23°06' S e as longitudes de 42°01' O a 41° 52' O. Nesta região do litoral brasileiro, o sentido do contorno da costa fica menos N-S e mais E-O. Desta forma, o vento NE passa a soprar, paralelamente, à costa, fazendo com que a água costeira superficial seja direcionada para o oceano por meio do transporte de Ekman (Silva et al., 2006). Isso traz à superfície água de maiores profundidades ricas em nutrientes (Valentin, 1984).

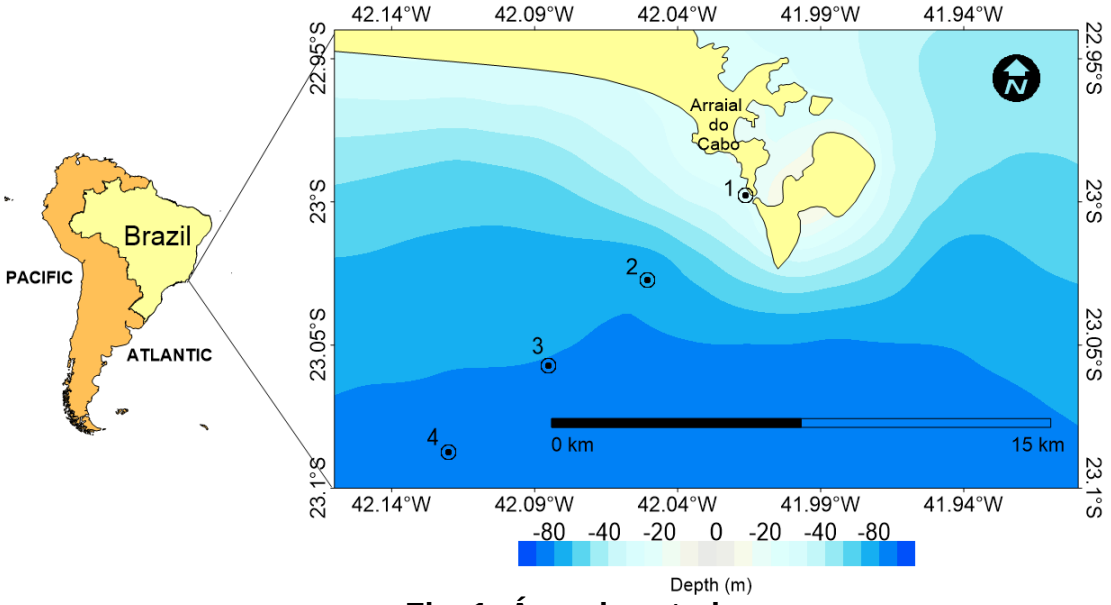


Fig. 1: Área de estudo.

Na costa da cidade de Arraial do Cabo, são encontradas três massas de água até 500 m de profundidade. Na parte externa da plataforma continental, nos primeiros 200 m da coluna d´água, é observada a Água Tropical (AT), que é caracterizada por temperatura e salinidade acima de 20 ºC e 36 psu, respectivamente (Emilsson, 1961; Silveira et al., 2000). Na faixa de 200-500 m é observada a Água Central do Atlântico Sul (ACAS), caracterizada por temperatura abaixo de 18 °C e salinidade entre 34,6 – 36 psu (Silveira et al., 2000; Valentin, 1984). A ACAS é uma massa d´água rica em nutrientes e aflora na superfície com o fenômeno da ressurgência costeira de Cabo Frio (Valentin, 1984; Campos et al., 2000). Na parte mais interna da plataforma continental, é observada a massa da Água Costeira (AC) (Kampel, 2003). Essa massa de água é formada pela combinação da mistura de águas de origem continental, com a AT e a ACAS. A AC é caracterizada por temperaturas acima de 23º C e salinidades abaixo de 34 psu (Castro and Miranda, 1998). A principal corrente presente na região é a Corrente do Brasil (CB). Essa corrente atua até 500 m de profundidade, carreando para o polo sul a AT e a ACAS (Stramma and England, 1999).

O clima da área de estudo é definido como semiárido quente (Barbiéri, 1975), proporcionando condições climáticas peculiares, em função da ressurgência, que promove o aumento na evaporação regional e uma

pluviosidade reduzida em relação às regiões contíguas, gerando um clima particularmente seco (Barbiéri, 1984).

2.2. Velocidade de ventos X temperatura da superfície do mar

Dados organizados em série temporal de velocidade de ventos e temperatura da superfície do mar (TSM) da região de Cabo Frio (RJ) foram utilizados para caracterização física do fenômeno de ressurgência marinha. As médias diárias de dados de intensidade de ventos corresponderam aos quadrantes NE (direção de 0-45°) e SW (direção de 180º - 270°) do período de september/2006 a december/2016. A série de dados de médias semanas de TSM foram referentes aos anos de 1994 a 2016 (dados do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM).

Foram tabulados de forma emparelhada os dados de velocidade média diária de direção de vento dos quadrantes NE e SW com os respectivos dados de TSM, de forma a se obter uma série temporal de médias diárias de velocidades de ventos e TSM para os anos de 2006 a 2016. Os pares de dados de velocidade média de ventos que não tinham dados correspondentes de TSM na série temporal para a referida data, teve a TSM estimada pelo método de interpolação de Krigagem. A estimativa foi obtida a partir da interpolação dos dados de TSM em uma grade regular, onde: (X) correspondeu ao tempo em dias, (Y) o tempo em anos e (Z) a TSM do dia e ano (Isaaks and Srivastava, 1989). O método de correlação utilizado para analisar o comportamento da velocidade de vento, NE e SW, em relação a sua respectiva TSM foi a relação Q-Q (quantil-quantil) (Gnanadesikan, 1977). Os dados foram confrontados com os períodos de El Niño e La Niña a fim de verificar a influência desses eventos na velocidade do vento e na TSM (NOAA, 2016). Também foram obtidas curvas de tendência relacionando a média da velocidade de vento com a TSM.

2.3. Desenho amostral

Em 20 de janeiro de 2016 foram coletadas amostras de água no Navio de Pesquisa Oceanográfico Diadorim, da Marinha do Brasil. Foi feito um transecto na direção nordeste/sudoeste. A primeira estação (1) ficou próxima

ao Boqueirão, entre a Ilha de Cabo Frio e o continente (Figura 1). A última estação (4) ficou distante 14,29 km da costa, na isóbata de 100 m. Na Tabela 1, estão todas as estações usadas nesse estudo, com as coordenadas, distâncias em relação à linha de costa e as respectivas profundidades. As profundidades das estações variam entre 20 e 100 m.

Tabela 1. Localização e profundidades das estações 1, 2, 3 e 4 ao longo do transecto.

Estação	Coordenadas (GGGºmm,m')	Coordenadas (GG,GGGº)	Distâncias (km)	Profundidade (m)
1	22º 59.9125' S 042º 00.8878 W	22,9985º S 42,0148º W	0,130	20
2	23º01.7175 S 042º 02.8203 W	23,0286º S 42,0470º W	4,84	75
3	23º03.4733 S 042º 04.7352 W	23,0579º S 42,0789º W	9,46	85
4	23º05.3426 S 042º 06.7028 W	23,0890º S 42,1117º W	14,29	100

Dois tipos de campanhas foram realizados para as coletas de água. A primeira campanha foi a "espacial", ao longo das estações 1 a 4 (Figura 1), perpendicularmente à linha de costa. A segunda campanha foi a "temporal", onde o navio ficou fundeado por 12 h na estação 2. Ambas as campanhas foram realizadas no mesmo dia.

Na campanha "espacial" amostras de água de superfície (3 m) foram coletadas, entre o período das 6:30 h às 10:00 h (hora UTC), através de uma bomba adaptada a uma mangueira. As demais amostras de água abaixo da superfície foram coletadas através de uma garrafa de Niskin de 10 L para as profundidades do meio (metade da profundidade total) e de fundo (acima de 1 a 12 m da superfície do assoalho). Como cada estação tem profundidades diferentes, os valores para meio e fundo são específicos para cada estação (Figura 1).

Na campanha "temporal" na estação 2, a água da superfície foi coletada a cada hora (total de 12 vezes), entre o período das 12:00 h às 00:00 h (hora UTC). Por outro lado, nas profundidades de meio e fundo as amostras de água

foram coletadas em horas alternadas: 12, 14, 16, 20, 22 e 0 h. Não houve coleta às 18 h.

2.4. Amostragem da Água

Tanto nas amostragens “espacial” e “temporal”, foi utilizado o CTD (Midas Valeport) para algumas determinações na água, tais como: temperatura, profundidade, fluorimetria e oxigênio dissolvido.

2.4.1. Análise

A alcalinidade total foi determinada na água coletada em frascos de reagente BOD de 300 mL (Kimble) envenenados com cloreto de mercúrio, HgCl2, (DOE, 1995). Isto foi seguido por um cálculo com um sistema de titulação de células abertas de acordo com as recomendações de Van den Berg e Rogers (1987).

O pH foi determinado in situ a partir da água coletada conforme descrito pela metodologia definida por Ramos e Silva et al. (2012). A solução eletrolítica interna do eletrodo de pH da combinação foi preenchida com NaCl 0,7 M para reduzir o potencial de junção líquida. A fem do sistema de eletrodos foi relacionada com a concentração molar do próton [HCl] por

$$\boldsymbol{E} = \boldsymbol{E^o} - \left(\frac{\boldsymbol{RT}}{\boldsymbol{F}}\right)\mathbf{ln}[\boldsymbol{H}^+]$$

onde Eo é o potencial padrão aparente na mídia NaCl. Os valores de Eo foram determinados pela titulação de cada solução de NaCl com 0,179 M HCl (Ramos e Silva et al., 2002). Todos os valores de pH foram referidos a 25 ° C para evitar um efeito de temperatura de medição de pH (Pérez, 1987). Posteriormente, os valores de pH foram corrigidos para permitir a amostragem da temperatura ambiente.

A concentração total de cálcio (Ca) e boro (B) foi obtida por meio de equações desenvolvidas por Millero (1996; 2000) utilizando o programa DAO (Ramos e Silva et al., 2017a, b, c). Um instrumento MIP OES (4200 MP-AES Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) foi usado na determinação de Ca e B.

Nossos valores analisados e calculados nas amostras de água para o B e para o Ca variaram pouco, abaixo de 10% (Table 2).

Tabela 2. Concentração de boro e cálcio, em µmol/L, na água do mar em três profundidades: superfície (s), meio (m) e fundo (f) nas quatro estações de coleta.

Estação	B^a µmol/L	B^c µmol/L	Δ µmol/L	Ca^a µmol/L	Ca^c µmol/L	Δ µmol/L
E1s	412	411	1	11073	10618	456
E1m	419	412	7	11091	10584	507
E1f	425	411	14	11126	10777	349
E2s	403	411	-8	11073	10990	84
E2m	410	411	-2	11231	10857	373
E2f	425	412	13	11423	10614	809
E3s	408	410	-2	11248	10954	294
E3m	412	411	1	11300	10772	528
E3f	418	412	6	11493	10545	948
E4s	406	410	-4	11266	10842	424
E4m	413	411	2	11353	10938	415
E4f	422	412	11	11580	10792	788

Todos os sistemas de CO2 inorgânicos (CO_2, CO_3^{2-}, HCO_3^-, DIC, ρCO_2, Ω_{Calc} and Ω_{Arag}) foram calculados usando a dissociação K do sistema carbonato, que são definidos abaixo.

- $\mathbf{lnk_B^*}$ - (Dickson, 1990).
- $\mathbf{lnk_{Si}^*}$ - (Millero, 2000).
- $\mathbf{lnk_1^*}$(H_3PO_4) – (Yao and Millero, 1994).
- $\mathbf{lnk_2^*}$ ($\mathbf{H_2PO_4^-}$) - (Yao and Millero, 1994).
- $\mathbf{lnk_3^*}$ ($\mathbf{HPO_4^{2-}}$) - (Yao and Millero, 1994).
- $\mathbf{lnk_2^*}$ ($\mathbf{CO_3^{2-}}$) – (Roy et al., 1993).

As concentrações de dióxido de carbono aquoso, pressão parcial de CO2 e fluxo de água / CO2 foram calculadas usando várias medidas obtidas de várias variáveis ambientais (temperatura, salinidade, pH e TA), e de K termodinâmica e estequiométrica (pk_1^o, pk_2^o, pk_1^* e pk_2^*) como definido por Millero et al. (2006). O programa DAO também foi utilizado para facilitar os cálculos (Ramos e Silva et al., 2017a, b, c).

Os procedimentos descritos acima foram obtidos com o programa AQM (Ramos e Silva et al., 2017), que é uma versão muito simples e simples de usar do MS Excel (Ramos e Silva et al., 2017a,b,c).

3. Resultados e discussão

3.1. Amostras longitudinais

3.1.1. Temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido

As Figs. 2, 3 e 4 mostram os dados físico-químicos obtidos nas 4 estações. As menores temperaturas foram sempre registradas no fundo de cada estação, variando de 13,9 (estação 2) a 14,7o C (estação 1). Próximo a área de estudo, no lado externo à plataforma continental, há a Corrente do Brasil fluindo para o sul. Nos primeiros 500 m há duas massas d´água, a Água Tropical mais à superfície e a ACAS entre 142 e 567 m de profundidade (Stramma and England, 1999). A AT é caracterizada por temperaturas acima de 20o C e salinidade maiores do que 36 psu. A ACAS é caracterizada por temperaturas entre 6 e 20o C e salinidade entre 34,6 e 36 psu (Silveira et al., 2000; Miranda, 1985). Mais próxima a costa, há também a Água Costeira, menos salina (Silveira et al., 2000). Ou seja, a ACAS é mais fria e menos salina do que a Água Tropical, o que explica os valores encontrados. Foi possível observar que, próximo à costa, a água ressurgiu com temperaturas e salinidades menores, assim como no fundo ao longo das estações de coleta de dados. Na superfície das estações de 3 a 4, as temperaturas da água variaram de 22,2 a 25,7 oC e as salinidades foram maiores que 36 psu. Na superfície da estação 1, mais próxima à costa, a temperatura foi de 18,2 oC e a salinidade foi de 35,59, ou seja, temperatura e salinidade menores que 20 oC e 36 psu, características da ACAS. Desta forma, também foi observada a ACAS nas estações 2, 3 e 4 nas profundidades intermediárias, onde as temperaturas variaram de 15,4 a 16,0 oC e os valores de salinidades entre 35,55 a 35,74 psu. A ACAS foi observada no fundo, em todas as estações. Conforme foi se afastando da costa, a partir da estação 2 (~5 km da costa), a temperatura e a salinidade aumentaram na superfície, caracterizando a Água Tropical.

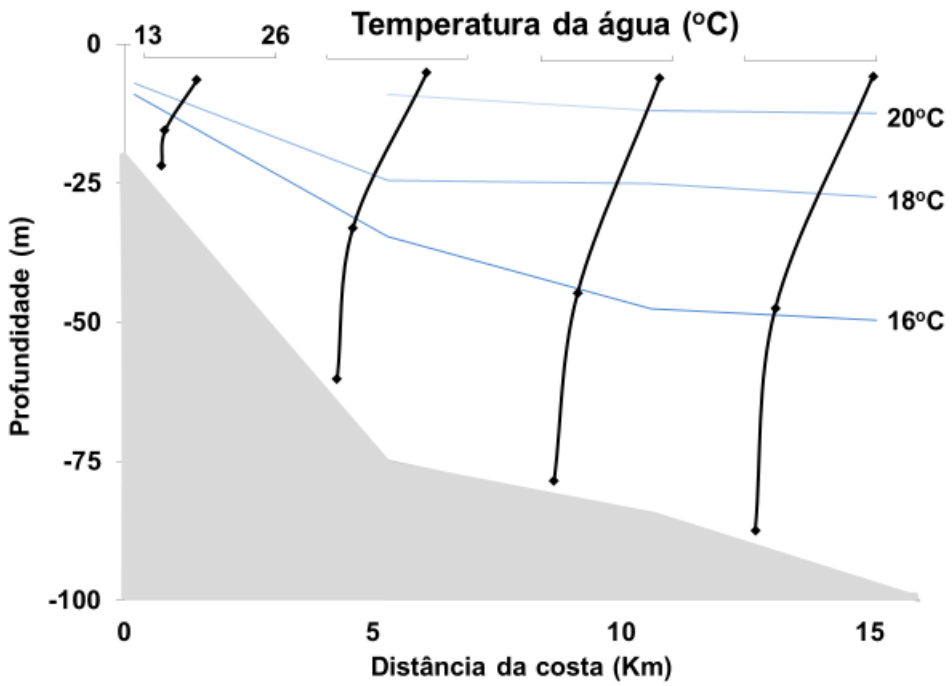


Fig. 2: Temperatura da água das amostras longitudinais, na superfície, meio e fundo da coluna d´água.

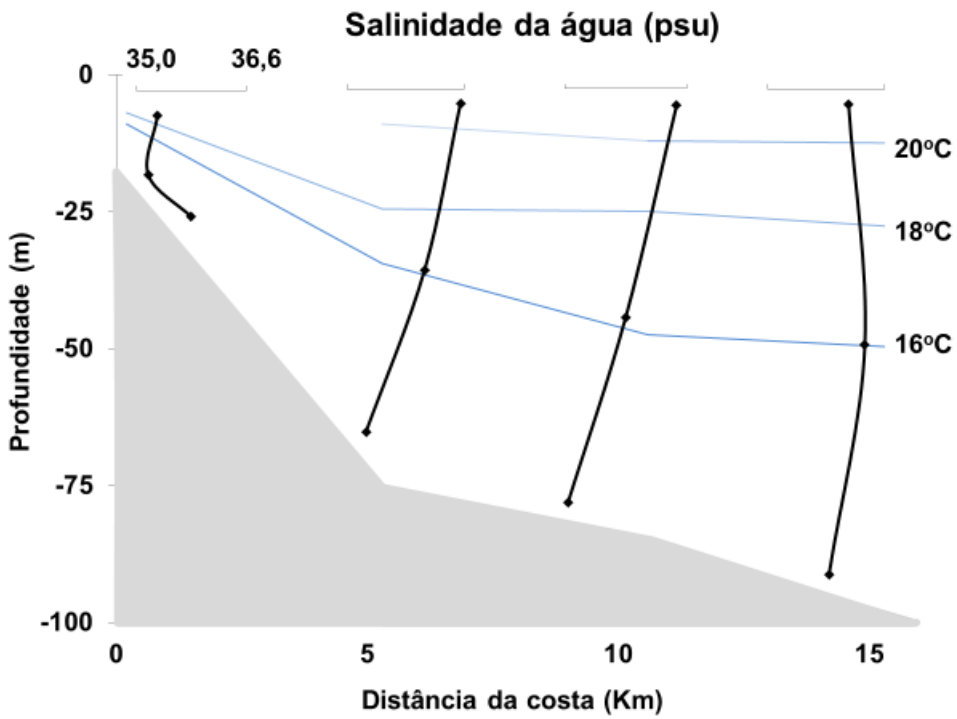


Fig. 3: Salinidade da água das amostras longitudinais, na superfície, meio e fundo da coluna d´água.

A salinidade não apresentou grandes variações entre as estações e as profundidades. Os maiores valores foram registrados na superfície de cada estação, variando de 35,59 (estação 1) a 36,37 psu (estação 2) e os menores valores foram observados no fundo, variando de 35,39 (estação 2) a 35,41 psu (estação 4). A temperatura já apresentou uma variação significativa entre as estações e as profundidades. As maiores temperaturas foram registradas na superfície de cada estação, variando de 18,2 (estação 1) a 25,7º C (estação 4), ver Fig 3.

Em todas as estações, as maiores concentrações de OD foram observadas na superfície (193 a 216 µmol/L) e as menores concentrações no fundo (180 a 196 µmol/L) (Fig. 4). A concentração de OD é maior entre 10 e 20 m de profundidade e a partir da estação 2 (~5 Km da costa), próximo à zona de mistura das massas da Água Tropical e ACAS. A ACAS é uma massa de água que vem do fundo do oceano. Nessas profundidades, a respiração predomina sobre a produção (Milici et al., 2016; Raven et al., 2005), tornando essa água rica em carbono orgânico, carbono inorgânico e nutrients (Valentin, 1992). Desta forma, quando a ACAS aflora próxima da superfície trás consigo uma água rica em CO_2 e nutrients, e pobre em O_2. Na superfície o aumento da solubilidade do oxigênio na água é favorecido pela fotossíntese e pela troca gasosa com a atmosfera (Fig.4).

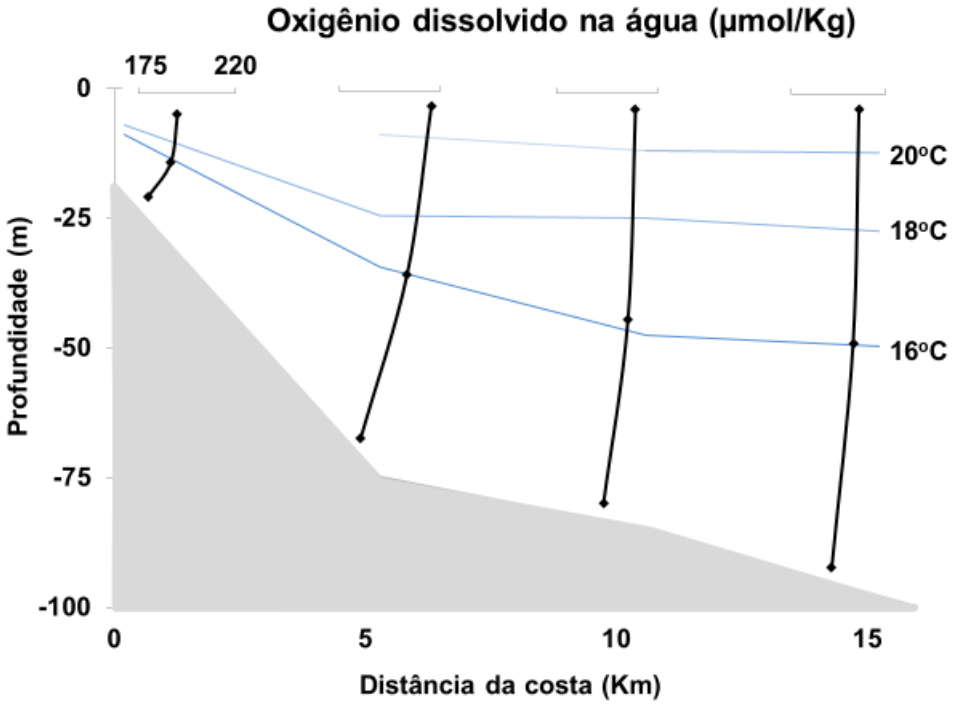


Fig. 4: Oxigênio dissolvido da água das amostras longitudinais, na superfície, meio e fundo da coluna d´água.

3.1.2. Dinâmica de Ventos e Temperatura da Superfície do Mar

Foi observado na série temporal que a relação de uma série temporal de velocidade de ventos de direção NE e SW no período de Set/2006 a Dec/2016, na região de estudo, a partir de 2010 teve um aumento da velocidade dos ventos em ambos os quadrantes (Fig 5). Tal cenário ocorreu em períodos em que a TSM estava mais baixa, tendendo a diminuir a partir de 2010 a 2016, acarretando maiores velocidades de ventos de NE e SW. Também dentro desse período, foram observados eventos de El Niño e de La Niña fracos nos anos de 2012 a 2013, sendo considerados anos normais ou sem eventos (2012 e 2013), e um aumento da intensidade da ressurgência de Cabo Frio/RJ, durante os anos de 2010 a 2016. A ressurgência pode ser constatada pelas mais baixas TSM em relação aos demais períodos da série temporal (Figs. 5 e 6).

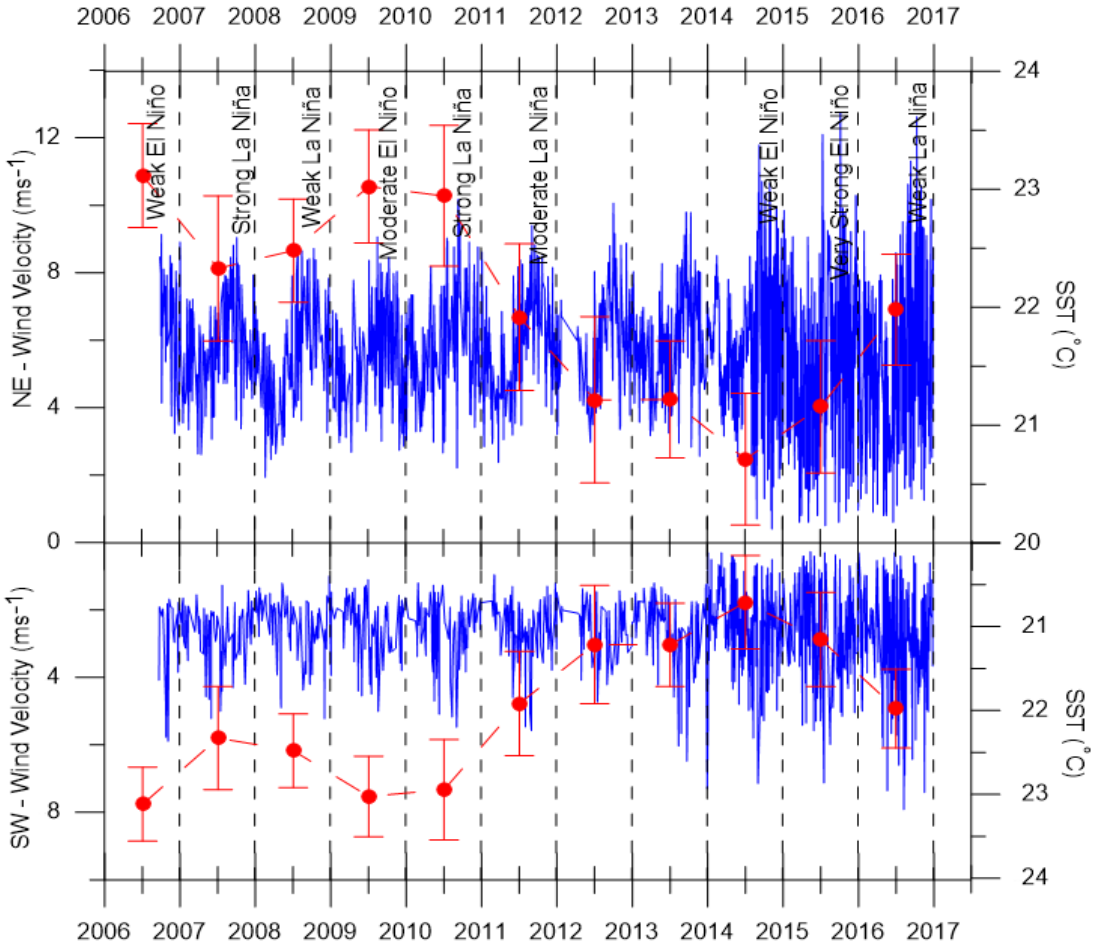


Fig 5:Velocidade dos ventos dos quadrantes SW e NE (linha azul) com a respective variação da temperature da superfície do mar (SST) da área de Ressurgência de Cabo Frio/RJ (círculo com barra vertical em vermelho), indicando a temperatura media e o desvio padrão entre o período de 09/2006 a 12/2016, em conformidade com a intensidade de eventos de El Niño e La Niña baseados em Oceanic Index (ONI).

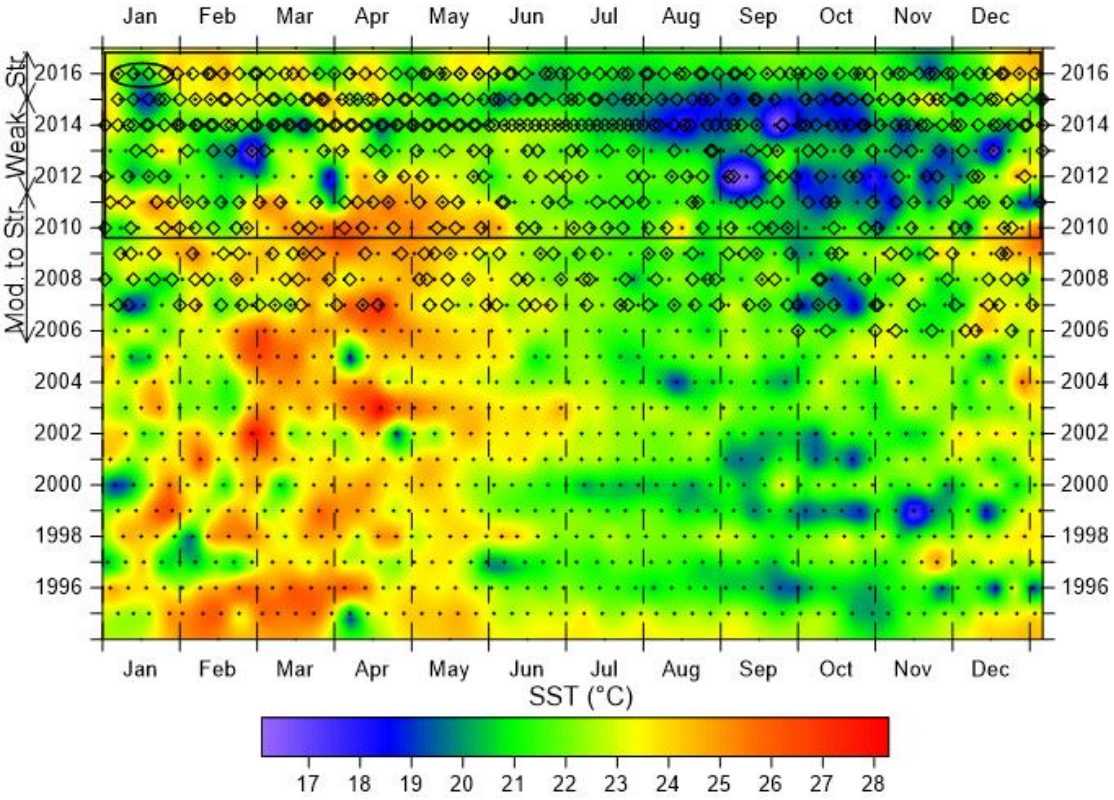


Fig 6: Grade de Temperatura da superfície do mar (SST) da ressurgência de Cabo Frio (RJ) obtida por Krigage dos dados de SST dos anos de 1995 a 2016. As manchas contíguas em azul (frias) indicam maior duração e intensidade do fenômeno de ressurgência. As manchas contíguas em vermelho (quentes) maior duração e intensidade de anomalias de temperature. Elipse indica a SST no período correspondente às estações de coleta. Retângulo indica o período que houve aumento da magnitude dos ventos referents aos anos 2010 e 2015, correspondendo aos eventos de fraca La Niña. Os de 2006 a 2010 correspondem aos eventos de moderados a fortes.

Por outro lado, em períodos anteriores a 2010, os eventos moderados a fortes, tanto de El Niño como de La Niña, interferiram no fenômeno de ressurgência de Cabo Frio/RJ, diminuindo a sua intensidade, e consequentemente foram registrados um aumento da temperatura (TSM) como uma atenuação da velocidade dos ventos (Figs. 5 e 6). Elias (2009) também observou que a intensidade do fenômeno da ressurgência de Cabo Frio está relacionada com a frequência de episódios de El Niño e de La Ninã, acarretando mudanças ao longo das estações do ano da TSM e da dinâmica de ventos. Essas mudanças de comportamento das temperaturas das massas d' água e dos ventos interferem no padrão de transporte e dispersão de nutrientes do fundo para a superfície na área de ressurgência.

No período de coleta de amostras d'água em janeiro de 2016, as temperaturas da superfície do mar estavam em elevação (em média de 20°a 22º C), devido a um episódio de forte El Ninõ, no final de 2015 para início de 2016, acarretando também a diminuição da velocidade média dos ventos de 10m/s para 8 m/s (fig. 05 e 06). Esta observação corroborou com as médias de temperaturas registradas na superfície de cada estação de coleta neste trabalho, demonstrando que para os meses iniciais de 2016, houve uma tendência de elevação de temperatura e de diminuição da velocidade dos ventos, mas com menor intensidade em relação aos anos de 2006 a 2010, período em que a TSM estava variando acima das médias de 22ºC a 24°C.

Quando os eventos de El Niño e La Niña são fracos ou ausentes (anos normais) é observado que a TSM fica mais fria e a velocidade dos ventos fica maior, resultando no aumento de intensidade da ressurgência de Cabo Frio/RJ (Figs. 5 e 6). Foi também observado que a duração dos eventos mais moderados de El Niño e de La Niña diminuem a intensidade da ressurgência, provocando um aumento da TSM e uma diminuição da velocidade de ventos de NE e SW (Figs. 5 e 6). Essa relação da TSM e das velocidades dos ventos pode ser confirmada pela comparação dos quantis de velocidade de ventos com a TSM na forma de gráfico de dispersão Q-Q plot. Esse teste estatístico demonstra que as variáveis (velocidade de ventos x TSM) possuem comportamento semelhantes em ambas as direções de ventos (NE e SW) (R^2_{NE}= 0.99 e R^2_{SW}=0.94). Além disso, as curvas de tendências obtidas por regressão linear mostram que quanto menor a TSM, maior é a velocidade dos ventos (Fig. 7).

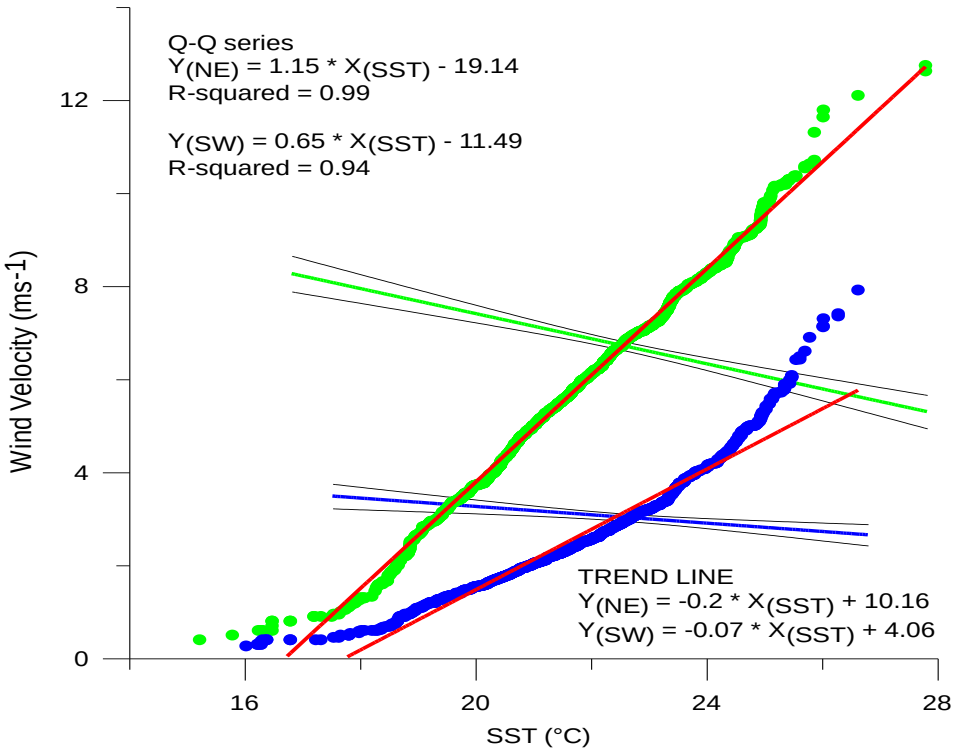


Fig 7: Q-Q plot demonstrando que a distribuição de dados SST e velocidade de ventos dos anos 2006 a 2016 possuem alta semelhança tanto na direção SW (R^2=0,94) e NE (R^2=0,99) na área de ressurgência de Cabo Frio (RJ). A linha vermelha se refere a curva de distribuição dos quantis de SST e velocidade dos ventos, sendo os pontos azus as de direção SW e em verde a de direção NE. Duas curvas de tendência (linha vermelha para NE e azul para SW) de intensidade de ventos foram ajustadas a partir dos scatterplots das distribuições, indicando que quando a SST diminui, aumenta a velocidade de ventos em ambas as direções.

Excepcionalmente, em relação aos demais anos da série temporal, esses últimos anos a partir de 2010, ocorreu a maior variação de TSM e de velocidade dos ventos (Fig. 06). Os efeitos análogos dessas recentes mudanças nos sistemas de ressurgências foram descritos por Xue et al. (2016) para compreender o estado de saturação da aragonita nas áreas das monções na Indonésia.

3.1.3. Sistema carbonato

A Fig.8 mostra que o pH não apresenta um padrão bem definido no gradiente de profundidade de cada estação e nem entre as estações. O valor

médio de pH entre as estações variou de 7,93 a 7,96. Por outro lado, as concentrações da alcalinidade total (AT) apresentaram os maiores valores na superfície em todas as estações (2.587 – 2.614 µmol/kg), sendo a maior concentração na estação 3 (2614 µmol/kg) (Fig 8). A [CO_3^{2-}] parece contribuir significativamente com os valores da AT nas estações (R = 0,95; p<0,05).

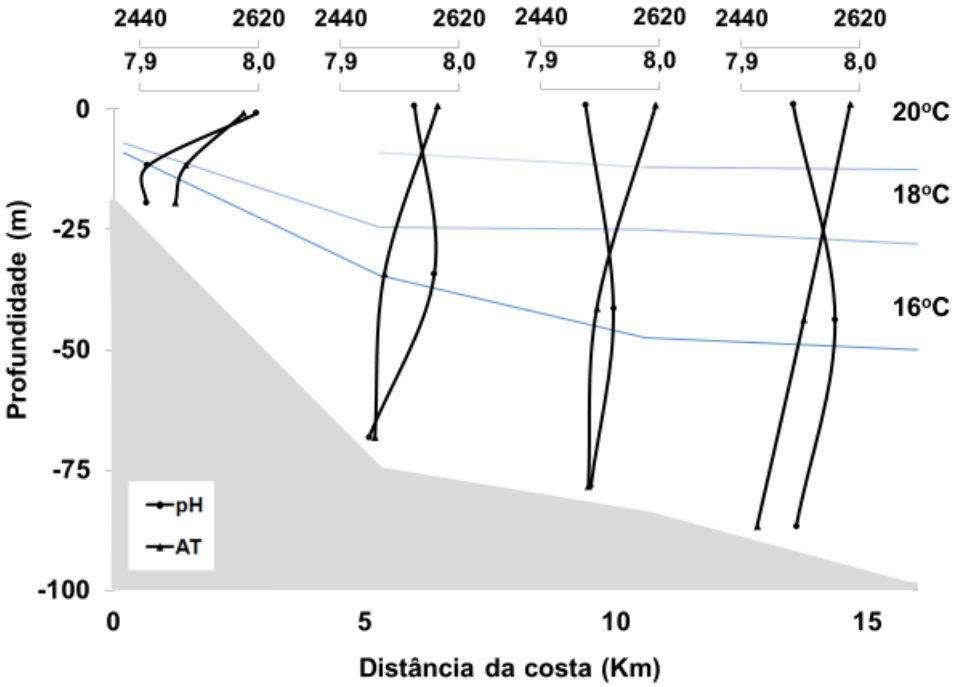


Fig. 8: Alcalinidade e pH da água das amostras longitudinais, na superfície, meio e fundo da coluna d´água.

A maior concentração média de HCO_3^-, na estação 1 (2.018 µmol/kg), parece contribuir fortemente para os valores de DIC, nessa estação (2.203 µmol/kg) (R = 0,92; p< 0,05). Parte das [HCO_3^-], na estação 1, são explicadas pela maior ρCO_2 gerada pela decomposição da matéria orgânica de origem natural gerada pela ressurgência (COELHO-SOUZA et al., 2012; GUENTHER et al., 2008), ver reações abaixo.

$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$ (reaction 3)
$CO_{2(aq)} + H_2O_{(l)} \leftrightarrow H_2CO_{3(aq)}$ (reaction 4)
$H_2CO_{3(aq)} \leftrightarrow H^+_{(aq)} + HCO_3^-{}_{(aq)}$ (reaction 5)

A ACAS também contribui como fonte de HCO_3^- para estação 1, através do fenômeno da ressurgência. Os valores de $\Omega_{Calcita}$, $\Omega_{Aragonita}$ e CO_3^{2-} foram maiores na superfície de cada estação, tais como: $\Omega_{Calcita}$ = 4,80 – 5,48; $\Omega_{Aragonita}$ = 3,10 – 3,63 e CO_3^{2-} = 189 a 216 µmol/kg. (Fig. 9). A mistura das massas de água, favorecida pela batimetria de fundo, parece influenciar nos valores altos do sistema carbonato nas águas superficiais. A ACAS rica em nutrientes em relação às outras massas de água da região (COELHO-SOUZA et al., 2012), propicia a atividade fotossintética que afeta as constantes de equilíbrio do sistema carbonato (Ramos e Silva et al., 2017), favorecendo os valores mais altos do estado de saturação do carbonato e das concentrações do carbonato e da AT. As reações em equilíbrio 4 e 5 mostram as reações do sistema carbonato.

$HCO_3^-{}_{(aq)} \leftrightarrow H^+{}_{(aq)} + CO_3^{2-}{}_{(aq)}$ (4)

$CO_3^{2-}{}_{(aq)} + Ca^{2+} \leftrightarrow CaCO_{3(s)}$ (5)

Os eventos de El Niño e de La Niña podem afetar fortemente os parâmetros do sistema carbonato, uma vez que esses parâmetros são influenciados indiretamente e diretamente pela ACAS. A influência direta ocorre pelo transporte de bicarbonato a partir da ACAS e a influência indireta é possivelmente pelo transporte de nutrientes pela ACAS que estimula a atividade fotossintética das águas superficiais (reações 4 e 5), retirando o CO_2 da água. É importante registrar que no período de amostragem (jan/2016), a ocorrência de evento de El Niño foi forte, afetando o fenômeno da ressurgência e favorecendo uma tendência de aumento da TSM, com diminuição de velocidades de ventos de NE e SW. Cenário este ainda contrário do que ocorreu nos anos anteriores a 2010, em que as médias de TSM eram maiores e de velocidade de vento menores em relação aos anos seguintes (Figs, 5, 6 e 7).

Os valores do sistema carbonato discutidos acima evidenciam que a área estuada, apresenta baixo efeito corrosivo, não se comporta como upwelled waters onde são evidenciados baixos valores de pH (<7,80) e baixo valores de estado de saturação para o carbonato (< 1,0). Isso se deve à mistura das massas de água (ACAS e AT) e à baixa intensidade da ressurgência em função

de uma diminuição da velocidade de ventos de NE (Figs. 5 e 6) 5 dias antes da coleta, caracterizando o efeito de forte El niño sobre o sistema de ressurgência de Cabo Frio/RJ.

4- Conclusão

A costa de Arraial do Cabo, nessas condições oceanográficas, não está sendo exposta a águas corrosivas. Os valores de saturação de aragonita favorecem o crescimento dos organismos calcificadores. Em um momento em que a ressurgência esteja no seu auge de intensidade, será possível observar outro cenário do sistema carbonato, talvez até uma exposição da costa à água do mar insaturada em aragonita. Faz-se necessário o monitoramento permanente da região para acompanhar a evolução das possíveis alterações no sistema carbonato da água ao longo do tempo.

Agradecimentos

Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira.

Referências Bibliográficas

BAKUN, A. et al. Anticipated Effects of Climate Change on Coastal Upwelling Ecosystems. **Current Climate Change Reports**, v. 1, n. 2, p. 85–93, 2015.

BORGES, A. V. . Do VVe Have Enough Pieces of the Jigsaw to Integrate CO2 Fluxes in the Coastal Ocean? **Estuaries**, v. 28, n. 1, p. 3–27, 2005.

BORGES, A. V; DELILLE, B.; FRANKIGNOULLE, M. Budgeting sinks and sources of CO2 in the coastal ocean: Diversity of ecosystems counts. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 14, p. 1–4, 2005.

BORGES, A. V; FRANKIGNOULLE, M. Distribution of surface carbon dioxide and air-sea exchange in the upwelling system off the Galician coast Latitude (˚ N) Longitude (˚ E). v. 16, n. 2, 2002.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 365, 2003.

CAO, L. et al. Response of ocean acidification to a gradual increase and decrease of

atmospheric CO2. **Environment Research Letters**, v. 9, n. 2, p. 024012, 2014.

CHEGINI, F. et al. Coastal Upwelling Off Southwest Nova Scotia Simulated With a High-Resolution Baroclinic Ocean Model. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 123, n. 4, p. 2318–2331, 2018.

CHEN, Y.-L. L. et al. Phytoplankton production during a summer coastal upwelling in the East China Sea. **Continental Shelf Research**, v. 24, n. 12, p. 1321–1338, 2004.

DECASTRO, M. et al. How will Somali coastal upwelling evolve under future warming scenarios? **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

FEELY, R. A et al. Evidence for upwelling of corrosive "acidified" water onto the continental shelf. **Science**, v. 320, p. 1490–1492, 2008.

FRANCHITO, SERGIO, H. et al. Interaction between Coastal Upwelling and Local Winds at Cabo Frio , Brazil : **Journal of Applied Metereology and Climatology**, v. 47, p. 1590–1598, 2008.

H, C. A. A. C.; VALENTIN, J. L. Numerical modelling of phytoplankton bloom in the upwelling ecosystem of Cabo Frio (Brazil). **Ecological Modelling**, v. 116, p. 135–148, 1999.

HALES, B. et al. Irreversible nitrate fluxes due to turbulent mixing in a coastal upwelling system. **JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH: Oceans**, v. 110, n. C10, p. 1–19, 2005.

HARRIS, K. E.; DEGRANDPRE, M. D.; HALES, B. Aragonite saturation state dynamics in a coastal upwelling zone. **Geophysical Research Letters**, v. 40, n. 11, p. 2720–2725, 2013.

NIELSEN, L. T.; JAKOBSEN, H. H.; HANSEN, P. J. High resilience of two coastal plankton communities to twenty-first century seawater acidification: Evidence from microcosm studies. **Marine Biology Research**, v. 6, p. 542–555, 2010.

ORR, J. C. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–6, 2005.

PAULY, D.; CHRISTENSEN, V. Primary production required to sustain global fisheries. **N**, v. 374, n. 6519, p. 255–257, 1995.

RODRIGUES, R. R.; LORENZZETTI, J. A. A numerical study of the effects of bottom topography and coastline geometry on the Southeast Brazilian coastal upwelling. **Continental Shelf Research**, v. 21, n. 4, p. 371–394, 2001.

TAKAHASHI, T. et al. Climatological Distributions of pH , pCO2 , Total CO2 , Alkalinity , and CaCO3 Saturation in the Global Surface Ocean , and temporal changes at selected locations.

Marine Chemistry, v. 164, p. 95–125, 2014.

VALENTIN, J. L. Analyse des paramètres hydrobiologiques dans la remontèe de Cabo Frio (Brésil). **Marine Biology**, v. 82, n. 3, p. 259–276, 1984.

VARELA, R. et al. Coastal warming and wind-driven upwelling: A global analysis. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 1501–1511, 2018.

WANG, D. et al. Intensification and spatial homogenization of coastal upwelling under climate change. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 390–394, 2015.

WEINER, S.; DOVE, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1–29, 2003.

XUE, L. et al. Aragonite saturation state in a monsoonal upwelling system off Java , Indonesia. **Journal of Marine Systems**, v. 153, n. November 2015, p. 10–17, 2016.

Artigo 2: Desenho experimental da acidificação nas larvas do ouriço *Lytechinus Variegatus* (Lamarck, 1816): Resultados Preliminares.

FERNANDES, L. V. ; Ramos e Silva C.A. ; Martins, E de S ; TENORIO, M. M. B. ; FONSECA, E. F. ; SAMPAIO, S. M. ; ALMEIDA, M. P.; PINTO, C. A. Desenho experimental da acidificação nas larvas do ouriço Lytechinus Variegatus (Lamarck, 1816): Resultados Preliminares. ***REVISTA INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS, 2018 (no prelo)***.

Desenho experimental da acidificação nas larvas do ouriço *Lytechinus Variegatus* (Lamarck, 1816): Resultados Preliminares

Fernandes L.V., Ramos e Silva C.A. [1,4,5], Martins E. de S.[2], Tenório M.M.B.[3], Fonseca E.M.[1], Sampaio M.S.[1], Almeida, M.P. [6]; Pinto, C.A.[6]

[1] Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Fluminense Federal University, Niterói/RJ, Code 24230-971, Brazil. liviadomar@hotmail.com,

[2] *Admiral Paulo Moreira Marine ResearchInstitute*, Arraial do Cabo/RJ, Code28930-000, Brazil.

[3] Marine Plankton Laboratory, Biology Institute, Federal Universityof Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Code 20530-310, Brazil.

[4] Department of Marine Biology, Fluminense Federal University (UFF), Niterói/RJ, Code 59075-970, Brazil.

[5] Center for Study of Water, Biomass and Oil (NAB), Fluminense Federal University, Niterói/RJ, Code 24210-330, Brazil.

[6] Postgraduate Program in Agricultural Science and Technology Innovation. Federal Rural University of Rio de Janeiro.

Resumo

A acidificação dos oceanos (OA) tem comprometido o desenvolvimento e a sobrevivência de muitos organismos marinhos, principalmente os que têm estruturas calcárias. Regiões onde ocorre o fenômeno de ressurgência são expostos, naturalmente, as águas mais ácidas. Vários experimentos têm sido feitos para entender esses efeitos nos organismos marinhos. Contudo, ainda há carência de informações conclusivas. Além disso, há a necessidade da padronização dos métodos de estudo em OA e de um consenso em protocolos para determinação da especiação e da concentração do sistema carbonato com alta exatidão e bom custo-benefício. Neste artigo é apresentada uma proposta de metodologia para o estudo do efeito da acidificação da água do mar, em laboratório, em larvas de ouriço *Lytechinus variegatus*. Para contagem e biometria das larvas foi utilizado um citômetro de fluxo de imagem (FlowCam). Adicionalmente, foi usado o parâmetro razão do aspecto da larva (W/L - razão entre a largura e o comprimento) como indicação de má formação larval de *L. variegatus*. A média dos valores de W/L foi de 0,85 para larva plúteo com 2 braços (48 h após fecundação). Os resultados mostram para AT, DIC, Ca, B e salinidade uma recuperação uma acima de 99%

em relação ao padrão de referência internacional. O programa de Determinação da Acidificação dos Oceanos foi validado com os resultados esperados desses padrões utilizados. Além disso, é proposta uma célula termostatizada, onde a temperatura é controlada e o sistema é "fechado" para a atmosfera. As temperaturas sugeridas para o estudo são de 25ºC, a qual é a temperatura ideal para o *L. variegatus*, e 18ºC, a qual é característica da água que aflora com a ressurgência de Cabo Frio, em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras Chave: *acidificação dos oceanos, Lytechinus variegatus, FlowCam, citometria de fluxo.*

Abstract

Ocean acidification (OA) has compromised the development and survival of many marine organisms, especially those with calcareous structures. Regions where the phenomenon of resurgence occurs are naturally exposed to the most acidic waters. Several experiments have been done to understand these effects on marine organisms. However, there is still a lack of conclusive information. In addition, there is a need for the standardization of OA study methods and a consensus in protocols to determine the speciation and concentration of the carbonate system with high accuracy and good cost-benefit. This paper presents a proposal for a methodology to study the effect of acidification of sea water in laboratory on larvae *Lytechinus variegatus*. An image flow cytometer (FlowCam) was used for counting and biometry of the larvae. Additionally, the parameter “larval aspect ratio” (W / L - ratio between width and length) was used as an indication of larval malformation of *L. variegatus*. The mean values of W/L were 0.85 for pluteal larvae with 2 arms (48 h after fertilization). The results show a recovery of over 99% in relation to the standard for AT, DIC, Ca, B and salinity of international reference. The Ocean Acidification Determination program was validated with the expected results of these standards used. In addition, a thermostatic cell is proposed, where the temperature is controlled and the system is "closed" to the atmosphere. The suggested temperatures for the study are 25ºC, which is the ideal temperature for *L. variegatus*, and 18ºC, which is characteristic of the water that emerges with the resurgence of Cabo Frio, in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil.

Keyword: *ocean acidification, Lytechinus variegatus, FlowCam, flow cytometry.*

1. Introdução

Em 2016, a concentração de CO_2 na atmosfera alcançou a faixa de 404ppm (NOAA, 2016a). Nos últimos 800 mil anos, o maior valor atingido foi de 300ppm (Lüthi et al., 2008; Petit et al., 1999; Siegenthaler et al., 2005). Este valor foi observado pela última vez por volta de 1900. Desde a Era industrial, onde essa concentração era de 250ppm, o aumento foi de aproximadamente, 60% (150ppm) e vem aumentando em taxas crescentes (NOAA, 2016b). Isto tem ocorrido devido ao lançamento de CO_2 antropogênico oriundo de atividades ligadas à agricultura, indústria, produção de cimento, uso de combustíveis fósseis e queimadas (Boyd, 2011; Caldeira and Wickett, 2003; Sabine et al., 2004).

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) prevê um cenário bastante pessimista para o ano de 2100, com concentrações de CO_2 acima de 1,000ppm atmosfera. Isso significa uma queda de 0.43 unidades de pH e um consumo de 56% das concentrações atuais de carbonato nos oceanos (Hoegh-Guldberg et al., 2014). Essa alteração na química da água do mar, causada pelo aumento da captação de CO_2 atmosférico pelos oceanos, é chamada de acidificação dos oceanos (OA)(Raven et al., 2005).

A amplitude das conseqüências da OA sobre os organismos e sobre a interação inter-específica depende da magnitude das mudanças no ambiente, das características das espécies envolvidas e da sua capacidade de adaptação (Gooding et al., 2009; Hofmann et al., 2014; Poore et al., 2013). Os organismos marinhos que possuem estruturas de carbonato de cálcio biogênico, como esqueleto, concha, espinhos e tecas, são os mais afetados pela OA.

Muitos estudos têm sido publicados sobre os efeitos da acidificação na água do mar sobre os organismos e ecossistemas marinhos. Para a maioria das espécies, podem ocorrer alterações na reprodução, no desenvolvimento e na taxa de calcificação. Esses efeitos continuam pouco esclarecidos (Browman, 2016). Além disso, a OA é uma conseqüência do CO_2 liberado pelas atividades antrópicas. O entendimento sobre os efeitos da OA sobre os organismos é complicado porque as mudanças de pH acarretam mudanças na especiação do carbono

inorgânico na água do mar, a qual tem implicações no metabolismo de vários organismos marinhos (i.e., fotossíntese, calcificação). Somado a isto, fotossíntese, calcificação e respiração afetam o pH da água do mar. Para uma compreensão do efeito da OA nos organismos é preciso juntar os conhecimentos da química do carbonato com a fisiologia dos organismos. A falta de um método experimental, como protocolo, nos estudos de OA é outro problema. Três métodos têm sido bastante utilizados nos experimentos de OA em laboratório: HCl/NAOH, HCl/$NaHCO_3$ e purgamento com CO_2 (Gattuso et al., 2011).

Nielsen *et al.*, (2010) utilizaram a FlowCams, substituindo o uso de um microscópio, como ferramenta para acompanhar o efeito da acidificação sobre o crescimento celular em comunidades planctônicas. A FlowCam consiste em um citômetro de fluxo de imagem desenvolvido pela FluidImaging Technologies. Através de detecção de luz de laser, ele captura a imagem digital de uma partícula em um fluido em fluxo (Karlson et al., 2010; Sieracki et al., 1998). A FlowCam é muito vantajosa frente ao uso do microscópio por ser muito mais rápida e prática a sua análise, permitindo a leitura de um maior número de células, aumentando assim, o universo amostral (Álvarez et al., 2013; Karlson et al., 2010).

A FlowCam tem sido usada também para quantificação e/ou identificação e/ou fazer biometria de organismos planctônicos em diversos tipos de estudos (Álvarez et al., 2013, 2012, 2011; Buskey and Hyatt, 2006; Ide et al., 2008; Jakobsen and Carstensen, 2011; Sieburth et al., 1978).

Diante do exposto, ainda há carência de informações conclusivas sobre o efeito da OA na vida marinha. Além disso, há a necessidade da padronização dos métodos de estudo em OA e de um consenso em protocolos para determinação da especiação e da concentração do sistema carbonato com alta exatidão e bom custo-benefício. No presente trabalho, é proposto uma metodologia otimizada para estudar o efeito da acidificação da água do mar sobre o desenvolvimento da larva de *L. variegatus*. A FlowCam foi utilizada como ferramenta alternativa ao microscópio para contagem e biometria de larvas de ouriço, tornando-as mais rápidas e em universo amostral maior. Por sua vez, o aquário é apresentado como célula termoestatizada fechada, que traz a vantagem de controlar as condições de temperatura e pH do experimento de forma mais eficiente, além de diminuir o consumo de CO_2. Os métodos de determinação quali e quantitativado sistema carbonato proposto são rápidos, com baixo

consumo de reagentes e com a exatidão exigida pelos protocolos internacionais atuais.

2. MATERIALS AND METHODS

A metodologia foi dividida em três partes. A primeira parte descreve a coleta dos ouriços, a desova, a fecundação e o cultivo para a obtenção das larvas para os experimentos. A segunda parte descreve o experimento preliminar desenvolvido para testar os métodos de obtenção, amostragem e biometria das larvas. A terceira parte é uma proposta de metodologia para o estudo do efeito da acidificação da água do mar nas larvas de ouriço, em laboratório.

2.1. Obtenção das larvas: coleta dos adultos, desova e fecundação

Vinte organismos foram coletados na Prainha, em Arraial do Cabo/RJ (Mastroti, 2002). Eles foram levados ao laboratório de cultivo do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). Os organismos coletados foram transportados, em um recipiente (Fig. 2), imersos na água do local de origem. Os organismos foram minimamente manipulados e levados ao laboratório o mais breve possível, mantidos à sombra, em local fresco e com um pouco de água salgada corrente por 24 horas.

Fig. 2.Ouriços adultos de Lytechinusvariegatus coletados.

Para a liberação dos gametas foi injetado de 1 a 2mL de KCl 0,55 mol/L na cavidade perivisceral (Strathmann, 1987). Os gonoporos foram mantidos submersos na água até que a desova se completasse. A água dos recipientes de vidro que continham óvulos (coloração alaranjada e se decantam no fundo) (Fig.3) foi trocada 2 vezes para retirada do fluido visceral. A solução de espermatozoides é branca, como mostrado na Fig.4.

Fig.3. Liberação de óvulos pelo ouriço *Lytechinus variegatus*.

Fig.4. Liberação de espermatozoides pelo ouriço *Lytechinus variegatus*.

Após a obtenção dos gametas, todos ouriços adultos foram devolvidos ao mar. Os óvulos, de no mínimo três fêmeas, foram colocados em um béquer de vidro de borossilicato com capacidade de 4 litros (Mastroti, 2002). Cerca de 1mL da solução de espermatozóides de pelo

menos três machos, obtida com a desova, foi misturada nesta solução de óvulos (Mastroti, 2002). Neste momento, iniciou-se a fecundação. Após alguns minutos, foi observada a membrana de fecundação.

2.2. Experimento preliminar: obtenção, amostragem, contagem e biometria das larvas

O experimento preliminar foi desenvolvido com água artificial de salinidade 35g/kg. Após 20 minutos da fecundação, os ovos foram contados na FlowCam e a concentração de ovos foi determinada. Os ovos foram filtrados em peneira de 69 micra e adicionados em béquer de 1L com um 1L de água do mar artificial. Os ovos foram mantidos nestes béqueres até 24 horas após a fecundação. Os béqueres foram colocados em um tanque em banho-maria a 23ºC. Cerca de 23 horas após a fecundação, foi introduzida a alimentação com a microalga *Dunalliela Tertiolecta* (Butcher, 1959) classe Clorophyceae, na concentração de 5cels/µL, por cerca de 30 minutos (Martins, 2008). Após 24 horas, as larvas foram filtradas em malha de 100 micra, lavadas com água do mar e colocadas em béqueres limpos de 4 litros de volume, com suas respectivas identificações. A temperatura do banho-maria passou a ser mantida a 25ºC. Este momento foi chamado de tempo zero. As vinte quatro horas posteriores (48 horas após fertilização), foram consideradas o tempo final.

No método desenvolvido no presente estudo, foi utilizada a temperatura de 25ºC por ser a temperatura ideal para o cultivo de *L. variegatus* (George et al., 2004). A temperatura de 23ºC foi escolhida para parte do cultivo por que, como será visto no item 2.3, é uma temperatura intermediária às temperaturas propostas para o experimento de acidificação.

No tempo zero e no tempo final, alíquotas de 50 mL de cada béquer foram retiradas para a leitura no contador de partículas FlowCam (versão 3.4, da FluidImaging Technologies). As larvas foram quantificadas e medidas em seu comprimento e largura (Fig.5). Foi usado para fazer biometria cerca de 10% do total de larvas contadas e, no mínimo, foram medidas 50 larvas. Esse universo amostral para a biometria foi feita, no desenvolvimento deste método, como forma de padronizar a amostragem para a biometria. Se comparado a outros estudos com a biometria feita em microscópio, a metodologia proposta no presente artigo, este universo amostral é muito maior, diminuindo ainda mais o erro envolvido na medição (Byrne et al., 2013; Clark et al., 2009; Martin et al., 2011).

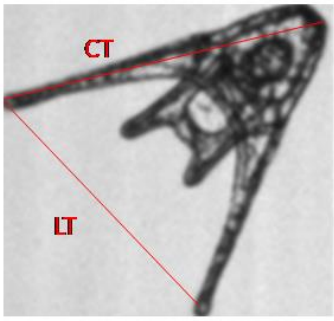


Fig.5. Foto da larvas plúteo com 2 braços registrada pela câmera da FlowCam, onde CT é o comprimento total e LT a largura total da larva.

O aparelho da FlowCam faz a medição automática do comprimento e largura totais além de calcular relação largura/comprimento (W/L), chamado também de razão do aspecto (Fig. 4). As medidas dos tamanhos de braço são feitas manualmente com o uso do programa do aparelho e as imagens registradas.

Como as amostras são analisadas imediatamente, não há necessidade do uso de conservantes.

2.3. Proposta de metodologia para o estudo do efeito da acidificação da água do mar nas larvas de ouriço, em laboratório.

Na presente proposta, as condições para o experimento de acidificação são relativas à região de Arraial do Cabo, onde ocorre o fenômeno da ressurgência de Cabo Frio (Coelho-Souza et al., 2012). Sendo assim, a água utilizada para o experimento é coletada na enseada da Ilha de Cabo Frio, onde a água não é poluída (Coelho-Souza et al., 2013; Pereira et al., 2008; Valentin, 1984). Para a desova e a fecundação, a água é filtrada através de uma membrana porosa de 0,45 µm. Para o cultivo e o experimento de acidificação, a água é filtrada com uma membrana porosa de 1 µm. Para todos os procedimentos, a água é exposta à radiação ultravioleta.

A coleta para fecundação é descrita no item 1. Após a coleta, o transporte e manutenção

dos organismos adultos devem ser feitos em recipientes individuais, evitando o estímulo à desova (Pennington, 1985). Além disso, uma cobertura sobre o recipiente deve ser usada para evitar que os ouriços caiam para fora do balde, uma vez que os ouriços tendem a subir pela parede do recipiente.

A fecundação dos gametas foi feita segundo o item 1. A obtenção e cultivo das larvas foram feitos segundo o item 2.2.

Cerca de 5 mL da solução obtida de larvas é retirada para a determinação de sua concentração na FlowCam. A partir deste momento, cerca de 24 h após a fecundação, as larvas estão no estágio inicial plúteo e prontas para o experimento de acidificação (McEdward and Herrera, 1999).

Três valores de pH, 8,1, 7,9 e 7,7, na água do mar são utilizados como tratamento para observar os seus efeitos em larvas de ouriço. Os valores de pH de 8,1 e 7,9 correspondem, respectivamente, aos valores maior e menor de pH encontrados em uma campanha oceanográfica feita em Arraial do Cabo (dados não publicados). Esses valores de pH correspondem, em pressão parcial de gás carbônico (pCO_2) em ppm, respectivamente, a: ~385 (dias atuais), ~670 (previsão para 2050), ~936 (previsões para 2100, segundo o RCP8.5) (Hoegh-Guldberg et al., 2014). Essas previsões de pH e pressão parcial de CO_2 foram feitas pelo IPCC 2014 para águas do mar de regiões tropicais (Hoegh-Guldberg et al., 2014), como é o caso da região de Arraial do Cabo. O pH de 7,9, que só seria esperado para 2050 (Hoegh-Guldberg et al., 2014), é encontrado nesta região devido ao fenômeno de ressurgência que ocorre na região, trazendo a superfície ou subsuperfície águas profundas ricas em CO_2 (Fabry et al., 2008; Valentin, 1984).

O controle do pH é feito através da injeção do gás CO_2 comprimido (0,50% de CO_2, 20,95% de oxigênio (O_2) e 78,55% de nitrogênio (N_2)) através do controlador de pH Apex, da Neptune System. Para cada experimento são utilizadas 2 réplicas para cada tratamento (pH 8,1, 7,9 e 7,7) e 2 tipos de controles (Fig. 6). O “controle A” apresenta 2 réplicas e é montado igual aos tratamentos, pois é acidificado, com a diferença de não ter organismos. O intuito deste controle é acompanhar as alterações do sistema carbonato ao longo das 24 horas sem a influência da presença dos organismos. Já o “controle B” que apresenta duas réplicas, consiste em um sistema aberto para a atmosfera, tem organismos da mesma forma que os tratamentos,

mas não tem injeção de CO_2. O controle B tem sua água previamente purgada com ar por 3 horas, de modo a garantir o equilíbrio entre os gases da atmosfera e a água. Durante o experimento, há purgamento de ar num fluxo bem baixo para manter as taxas de oxigênio, no controle B. Ambos os controles têm a mesma temperatura dos tratamentos (Fig. 6).

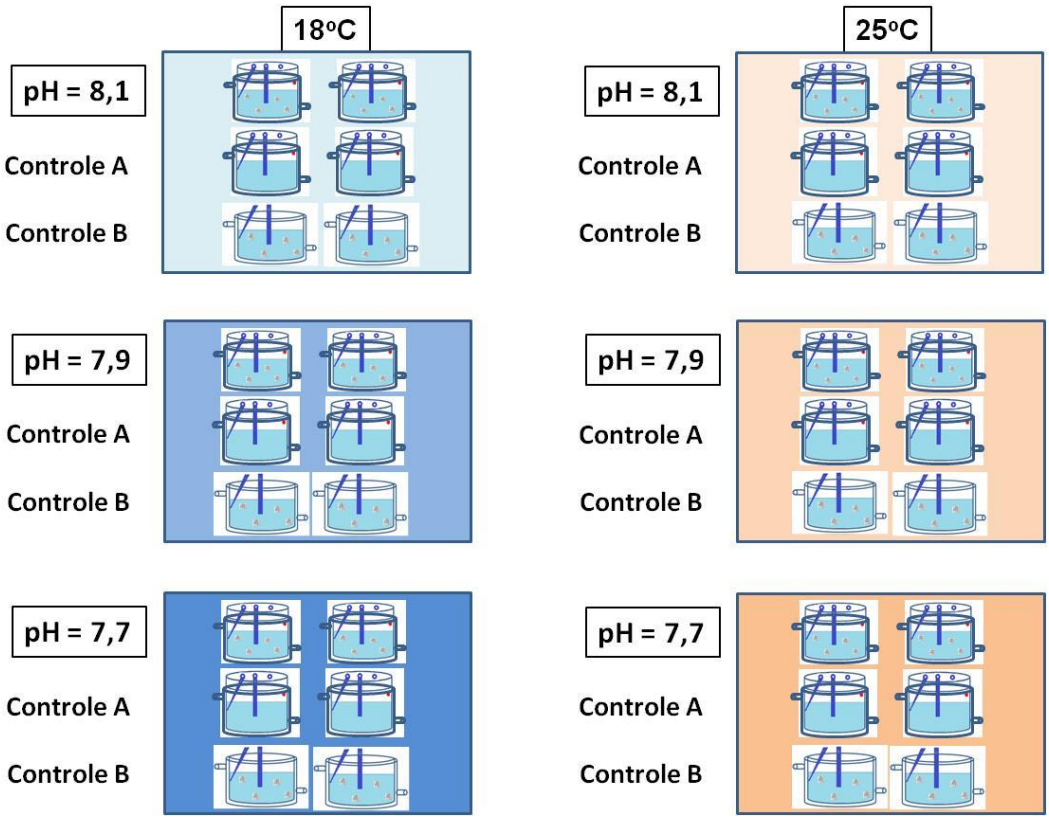


Fig. 6. Esquema do desenho amostral para o experimento do efeito da acidificação em larvas de ouriço.

São feitos 2 experimentos com esses valores de pH, um a 25º C e outro a 18º C. A temperatura de 25ºC é a temperatura ideal para este ouriço (Lawrence, 1975). Na temperatura de 18ºC, as larvas de ouriço tem um atraso em sua cronologia de desenvolvimento (Stickle, 1993). Em campo, esta temperatura é referente a uma água característica do fenômeno de ressurgência costeira da região de Arraial do Cabo (Campos *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2000; Valentin, 1984).

Os experimentos são desenvolvidos em células termostatizadas individuais para cada réplica de tratamento ou controle. Seu esquema está representado na Fig.7. O volume do aquário

é de 1,5 L. Na Fig.7, a água que entra e sai do sistema está na temperatura desejada para o experimento, 18°C ou 25°C. O volume utilizado de água para cada aquário é de 1 litro.

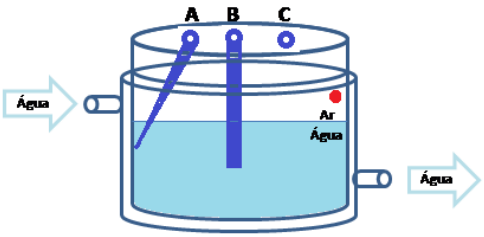


Fig.7. Esquema da célula termostatizada onde é desenvolvido os experimentos de acidificação. Na tampa da célula, a entrada "A" se refere à injeção de CO2, "B" é a entrada com o eletrodo de pH e "C" uma abertura para coleta de amostra. Na lateral do aquário, o ponto em vermelho representa uma saída bem pequena de ar para aliviar a pressão interna.

Então, as larvas no estágio inicial de plúteo são filtradas em malha de 150µm (em peneira especial) de modo a se obter 20.000 larvas determinadas na FlowCam. Essas larvas são depositadas na célula termostatizada do tratamento ou do controle (1 L – 20 larvas/mL). Portanto, a concentração larval utilizada para o experimento é de 20 larvas/mL. Uma nova contagem é feita para saber a concentração de larvas real final (amostra de 5 mL - ~100 larvas). O experimento prossegue com um volume de 995mL. Durante as amostragens, a solução é mantida sob agitação (agitador magnético) para que haja homogeneidade da solução de larvas. A retirada da amostra é feita através de uma mangueira de aquário, pela abertura na tampa da célula termostatizada.

Este momento é denominado de tempo zero (t0). As vinte quatro horas posteriores (48 horas após fertilização) são chamadas de tempo final (tf).

O desenvolvimento morfológico larval, assim como a quantificação das larvas, é feito através do contador de partículas FlowCam (versão 3.4, da Fluid Imaging Technologies). Os parâmetros analisados na biometria são: comprimento da larva, largura da larva, razão largura/comprimento (W/L), tamanho do braço anterior e do braço posterior. A partir das

concentrações inicial e final, é obtido a taxa de sobrevivência. Cerca de 10% do total das larvas de cada amostra são utilizados para a biometria e, no mínimo de 50 larvas devem ser medidas.

No tempo zero, no início do experimento são feitas as medidas de número de larvas (descrita anteriormente), comprimento e largura totais (larvas em estágio início de plúteo = 24h após fecundação). No fim do experimento, são feitas, além dessas medidas, as medidas de tamanho dos braços.

A concentração de cálcio na água é determinada em t_0 e t_f de modo a avaliar quanto de cálcio foi retirado da água. Ou seja, quanto de cálcio foi absorvido pelas larvas durante este período de exposição à acidificação.

2.4. Análise química da água

A análise química da água é realizada no início e no fim do experimento. No início, apenas uma análise foi necessária, uma vez que a mesma água é utilizada para todos os tratamentos e controles. No fim do experimento, a água de cada célula termostatizada (tratamentos e controles) é coletada e analisada.

Na presente proposta, a temperatura é medida com um termômetro digital de 2 casas decimais. A salinidade é medida através de um condutivímetro.

As determinações dos parâmetros do sistema carbonato foram feitas por métodos potenciométricos adaptados ao Titrando 905 da Metrohm. As amostras são analisadas em até 48 horas e armazenada sobre refrigeração. A alcalinidade total (AT) foi determinada nas amostras acondicionada em frascos de análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio de 300mL (Kimble) envenenadas com cloreto de mercúrio (DOE,1994). Este procedimento foi seguido pelo cálculo com célula aberta de sistema de titração de acordo com as recomedações de Vander Berg & Rogers (1987).

O pH foi determinado a partir da água coletada como descrito acima de acordo com a metodologia definida por Millero et al., (1993) onde o tampão “Tris” é assinado em laboratório com um indicador púrpura m-cresol (Clayton e Byrne, 1993; DOE , 1994) através de um

espectrofotómetro UV-1700 utilizando o programa DAO. A alíquota de tampão foi armazenado de acordo com o método de Nemzer e Dickson (2005) (Perez e Fraga, 1987). O pH é determinado, direta e continuamente, em cada célula termostatizada, ao longo do experimento. Os valores de pH das amostras são determinados na temperatura do experimento (25ºC ou 18ºC), dentro da célula termostatizada (Ramos e Silva et al., 2017). O cálcio (Ca) foi obtido através da titulação com EDTA. O boro total foi determinado por espectrometria de emissão ótica de plasma de micro-ondas através do instrumento MIP OES (4200 MP-AES AgilentTecnologies Inc.).

Os métodos adaptados para o Titrando para o Ca, a TA e o carbono inorgânico dissolvido (DIC) mostraram resultados bastante satisfatórios, alcançando uma recuperação em relação aos padrões de referência internacional (Batch #134 e CRN-134-0849) acima de 99%. O Ca recuperou acima de 99% do valor esperado do padrão preparado no laboratório.

As concentrações das demais espécies químicas do sistema carbonato (pCO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-},estados de saturação da calcita e da aragonita) também são calculadas. Os parâmetros calculados são obtidos através do programa DOA (Determinação da Acidificação dos Oceanos)(www.profcarlosaugusto.com). As constantes utilizadas nos cálculos dessas variáveis são:

$\ln k^*_B$(Dickson, 1990)

$\ln k^*_{Si}$(Millero, 2000)

$\ln k^*_1$ (H_3PO_4) (Yao and Millero, 1995)

$\ln k^*_2$ ($H_2PO_4^-$) (Yao and Millero, 1995)

$\ln k^*_3$ (HPO_4^{2-}) (Yao and Millero, 1995)

$\ln k^*_2$ (CO_3^{2-}) (Roy et al., 1993)

pK^0_1, pK^0_2, pK^*_1, pK^*_2(CO_2 aquoso e pCO_2) (Millero, 2006)

3. Resultados

A Tabela 2 mostra o crescimento da larva (µm) em 24 horas em comprimento e largura. Do estágio inicial de larva plúteo para plúteo com 2 braços completos, a larva, praticamente

dobra de tamanho, indo das médias de 266 µm para 506 µm. Cresce, em média, 240 µm.

Tabela 2. Crescimento das larvas em 24 horas, a 25ºC, entre 24 horas após a fecundação (t0) e 48 horas após a fecundação (tf).

Amostra	Comprimento (L)	Largura (W)	W/L	ΔL	ΔW	ΔW/L
At_0	251	208	0,86			
At_f	519	388	0,84	268	180	0
Bt_0	275	212	0,89			
Bt_f	511	387	0,85	236	175	0
Ct_0	260	214	0,91			
Ct_f	492	379	0,86	232	165	0
Dt_0	276	222	0,90			
Dt_f	501	381	0,84	225	159	0
$Médiat_0$	266	214	0,89			
$Médiat_f$	506	384	0,85	240	170	0

As Fig.8 e Fig.**9** ilustram as imagens não editadas obtidas pelo contador de partículas (FlowCam) para os estágios larvais início de plúteo e plúteo com 2 braços completos, respectivamente.

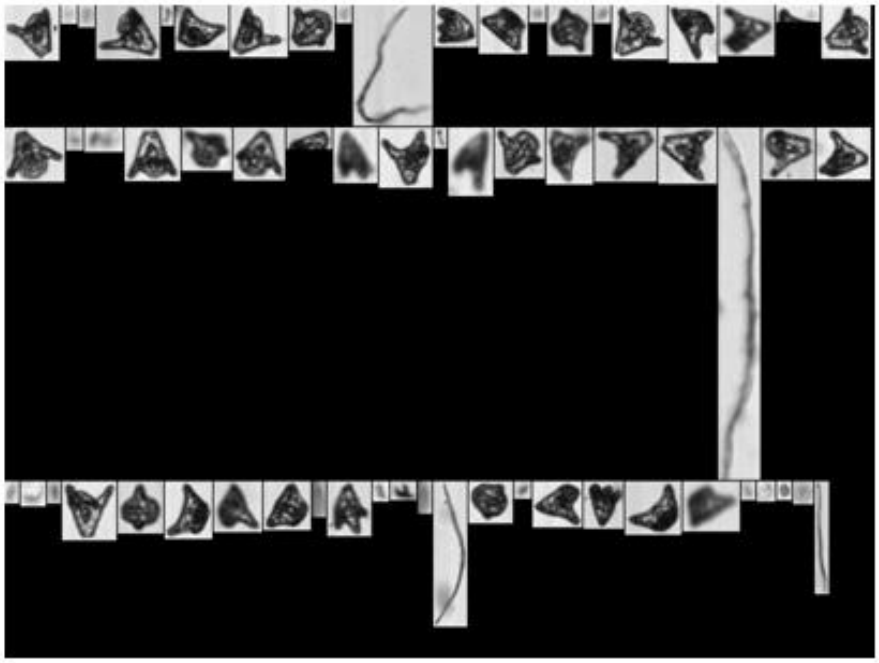


Fig.8. Imagem obtida pelo contador de partículas (FlowCam) em t0 (24 horas após a fecundação). Este estágio larval corresponde ao início da larva plúteo.

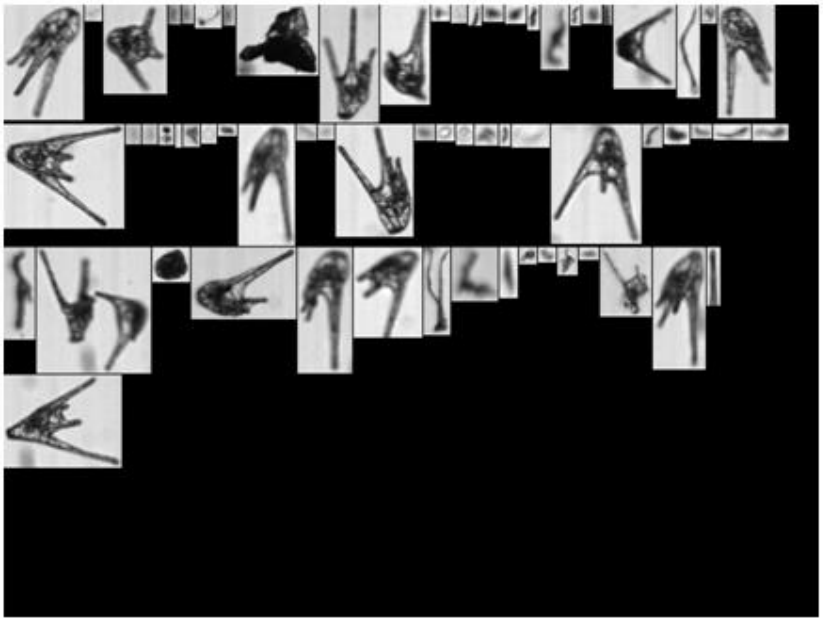


Fig.9.Imagem obtida pelo contador de partículas (FlowCam) em tf (48 h após a

fecundação). Este estágio larval corresponde a larva plúteo com 2 braços completos.

4. Discussão

A cronologia do desenvolvimento larval depende da qualidade do meio e da temperatura do cultivo e da qualidade da alimentação. Os resultados obtidos do crescimento larval são próximos aos encontrados na literatura em condições semelhantes de cultivo (Tabela3) (George et al., 2004; Mazur and Miller, 1971; McEdward and Herrera, 1999).

Tabela3. Comparação da cronologia do desenvolvimento da larva.

Artigo	Presente trabalho		Mazur and Miller (1971)		McEdward and Herrera (1999)	
Cronologiaetamanho	24 h	266	27,5 h	300	24 h	300
	48 h	506	48 h	470	48 h	470
Crescimento	240		170		170	
Alimentação	*Dunaliella*		*Chlorella*		*Dunaliella*	
Temperatura de cultivo	23 ºC		23 ºC		26 ºC	

Os valores da razão W/L são de 0,89 para início de estágio plúteo (24 h após fecundação) e 0,85 para larva plúteo com 2 braços (48 horas após a fecundação). Esses valores podem ser usados como referência para estudos futuros do efeito da acidificação da água do mar, uma vez que podem sinalizar má formação larval (Fisher et al., 2005).

O método para acidificar a água do mar na proposta apresentada é o purgamento de CO_2. Este método tem a vantagem de manter a alcalinidade total constante (Ramos e Silva et al., 2002) e de manter o ajuste do pH desejado. Além disso, facilita o entendimento da especiação do sistema carbonato, uma vez que a concentração do H+ é bem definida e a pressão exata do CO_2 conhecida, permitindo definir a reação de trabalho.

$$CaCO_{3(S)} + 2H^{+} = Ca^{2+} + CO_{2(g)}\ H_2O$$

O equilíbrio do CO_2(g) proveniente do cilindro com a água do experimento estabelece o equilíbrio da pCO_2(aq) com a pCO_2 proveniente do cilindro, sem qualquer mudança na AT. Por outro lado, o DIC aumenta, principalmente na forma de HCO_3^-.

Há um outro método que utiliza apenas ácido forte (ácido clorídrico) para acidificar a água do mar (Gattuso et al., 2011). Este método diminui a AT uma vez que consome os aceptores de prótons (HCO_3^- e CO_3^-). Por outro lado, mantém o DIC constante.

Outra forma de acidificar a solução do experimento com ácido forte é utilizar o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) o qual impede a queda da AT ocasionada pela adição do HCl. O $NaHCO_3$ também fornece um aumento do DIC principalmente como HCO_3^- (se não fosse a adição do $NaHCO_3$ o DIC aumentaria principalmente como o CO_2) (Cornwall and Hurd, 2015; Gattuso et al., 2011).

Fica claro pelo exposto acima a necessidade de definir um método (purgamento com CO_2) para entender os processos da especiação do sistema carbonato na solução de trabalho, sem os organismos, e posteriormente estudar o efeito da acidificação nos organismos. Essa não é uma tarefa fácil, uma vez que o CO_2 não afeta de forma direta os organismos marinhos. Por outro lado, o CO_2 influencia de forma direta o pH o qual afeta toda especiação do CO_2 na água do mar (incluindo a solução de trabalho). A especiação do CO_2 por sua vez afeta a fotossíntese, a respiração e a calcificação, os quais afetam o pH. A complexidade de entendimento nos experimentos de acidificação aumenta em função do metabolismo dos organismos também afetarem o pH.

Dos métodos acima comparados, o purgamento com o CO_2 parece ser o mais fácil de se implementar e de se manter as condições desejadas mais controladas.

Finalizando, a célula termostatizada apresentada tem as vantagens de fechar o sistema para a atmosfera, aliviar a pressão interna, se necessário, através de uma válvula, manter a temperatura desejada estável durante 24 horas, e, ao mesmo tempo, permitir a leitura do pH, injetar gás CO_2, coletar a amostra e definir uma reação simples e bem conhecida com essas condições de trabalho estabelecidas nesse estudo.

5. Conclusões

A proposta apresentada para estudo do efeito da acidificação em larvas de ouriço é inovadora por utilizar a tecnologia de citometria de fluxo como ferramenta de estudo. Tornando a contagem e biometria das larvas mais rápida e, potencialmente, em maior universo amostral. Por sua vez, a célula termostatizada proposta é um aquário que permite o controle e a medição do pH de forma contínua, a injeção de CO_2, a retirada de amostra e a manutenção da temperatura em valor desejado durante 24 horas sem abrir o sistema para a atmosfera. Por estas razões principais, este trabalho torna o estudo do efeito da acidificação dos oceanos em laboratório mais controlado e otimizado. Permite também implantar e disseminar um protocolo para o estudo da acidificação da água do mar nos organismos marinhos no estado larval em escala nacional.

Agradecimentos

Os autores do presente estudo são gratos ao CNPq/CAPES e FINEP pelo apoio durante a pesquisa em foco.

Referências bibliográficas

ÁLVAREZ, E.; LÓPEZ-URRUTIA, Á.; NOGUEIRA, E. Improvement of plankton biovolume estimates derived from image-based automatic sampling devices: Application to FlowCAM. **Journal of Plankton Research** 34: 454–469, 2012.

ÁLVAREZ, E.; LÓPEZ-URRUTIA, Á.; NOGUEIRA, E.; FRAGA, S. How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using FlowCAM. **Journal of Plankton Research** 33: 1119–1133, 2011.

ÁLVAREZ, E.; MOYANO, M.; LÓPEZ-URRUTIA, Á.; NOGUEIRA, E.; SCHAREK, R. Routine determination of plankton community composition and size structure: A comparison between FlowCAM and light microscopy. **Journal of Plankton Research** 1: 1–15. 2013.

BOYD, P.W. Beyond ocean acidification. **Nature Geoscience** 4: 273–274 2011.

BROWMAN, H.I. Applying organized scepticism to ocean acidification research. **Marine Science** 73: 529–536, 2016.

BUSKEY, E.J.; HYATT, C.J. Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (Karenia brevis) in natural plankton samples. **Harmful Algae** 5: 685–692, 2006.

BYRNE, M.; FOO, S.; SOARS, N.A.; WOLFE, K.D.L.; NGUYEN, H.D.; HARDY, N.; DWORJANYN, S.A. Ocean warming will mitigate the effects of acidification on calcifying sea urchin larvae (Heliocidaris tuberculata) from the Australian global warming hot spot. Journal of Experimental. Marine Biology and Ecology 448: 250–257, 2013.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M.E. **Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. Nature** 425: 365, 2003.

CAMPOS, E.J.D.; VELHOTE, D.; SIVEIRA, I.C.A. Shelf break upwelling driven by Brazil Current cyclonic. Geophysical Research Letters 27: 751–754, 2000.

CLARK, D.; LAMARE, M.; BARKER, M. Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: A comparison among a tropical, temperate, and a polar species. **Marine Biology** 156: 1125–1137, 2009.

CLAYTON, T.D., BYRNE, R.H. Spectrophotometric seawater pH measurements : total hydrogen results. Deep Sea Research 40: 2115–2129, 1993.

Coelho-Souza, S. A.; López, M.S.; Guimarães, J.R.D.; Coutinho, R.; Candella, R. N. Biophysical interactions in the Cabo Frio upwelling system, southeastern Brazil. B**razilian Journal of Oceanography**, 60(3): 353-365. 2012.

COELHO-SOUZA, S.A., PEREIRA, G.C., COUTINHO, R., GUIMARÃES, J.R.D. Yearly variation of bacterial production in the Arraial do Cabo protection area (Cabo Frio upwelling region): An evidence of anthropogenic pressure. **Brazilian Journal of Microbiology** 44: 1349–1357, 2013.

CORNWALL, C.E.; HURD, C.L. Experimental design in ocean acidification research:

problems and solutions. **Journal of Marine Science** 73: 572–581, 2015.

DICKSON, A.G. Thermodynamics of the dissociation of boric acid in synthetic seawater from 273 . 15 to 318 . 15 K. **Deep Sea Research** 37: 755–766, 1990.

DOE, 1994. DOE, in: Dickson, A.G., Goyet, C. (Eds.), **Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water. Version 2.** Oak Ridge National Lab, TN (United States), p. ORNL/CDIAC--74.

FABRY, V.J.; SEIBEL, B.A.; FEELY, R.A.; ORR, J.C. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. **Journal of Marine Science** 65: 414–432, 2008.

FISHER, R.; LEIS, J.M.; CLARK, D.L.; WILSON, S.K. Critical swimming speeds of late-stage coral reef fish larvae: Variation within species, among species and between locations. **Marine Biology** 147, 1201–1212, 2005.

GATTUSO, J.-P.; GAO, K.; LEE, K.; ROST, B.; SCHULZ, K.G. Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry, in: Riebesell, U., Fabry, V.J., Hansson, L., Gattuso, J.-P. (Eds.) **Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting**. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 41–52, 2011.

GEORGE, S.B.; LAWRENCE, J.M.; LAWRENCE, A.L. Complete larval development of the sea urchin Lytechinus variegatus fed an artificial feed. **Aquaculture** 242: 217–228, 2004.

GOODING, R.A.; HARLEY, C.D.G.; TANG, E. Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 9316–9321, 2009.

HOEGH-GULDBERG, O.; CAI, R., POLOCZANSKA, E.S.; BREWER, P.G.; SUNDBY, S.; HILMI, K.; FABRY, V.J.; JUNG, S. **The Ocean. Clim. Chang. 2014 Impacts, Adapt. Vulnerability.** Part B Reg. Asp. Contrib. Work. Gr. II to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 1655–1731, 2014.

HOFMANN, G.E.; EVANS, T.G.; KELLY, M.W.; PADILLA-GAMIÑO, J.L.; BLANCHETTE, C.A.; WASHBURN, L.; CHAN, F.; MCMANUS, M.A.; MENGE, B.A.;

GAYLORD, B.; HILL, T.M.; SANFORD, E.; LAVIGNE, M.; ROSE, J.M.; KAPSENBERG, L.; DUTTON, J.M. Exploring local adaptation and the ocean acidification seascape – Studies in the California Current Large Marine Ecosystem. **Biogeosciences** 11: 1053–1064, 2014.

IDE, K.; TAKAHASHI, K.; KUWATA, A.; NAKAMACHI, M.; SAITO, H. A rapid analysis of copepod feeding using FlowCAM. **Journal of Plankton Research** 30: 275–281, 2008.

JAKOBSEN, H.; CARSTENSEN, J.; FlowCAM: Sizing cells and understanding the impact of size distributions on biovolume of -planktonic community structure. **Aquatic Microbiology Ecology** 65: 75–87, 2011.

KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis,** UNESCO (IOC Manuals and Guides). 2010.

LAWRENCE, J.M. The effect of temperature-salinity combinations on the functional well-being of adult Lytechinus variegattus (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). The Journal of **Experimental Marine Biology and Ecology** 18: 271–275, 1975.

LÜTHI, D.; LE FLOCH, M.; BEREITER, B.; BLUNIER, T.; BARNOLA, J.-M.; SIEGENTHALER, U.; RAYNAUD, D.; JOUZEL, J.; FISCHER, H.; KAWAMURA, K.; STOCKER, T.F. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. **Nature** 453: 379–382, 2008.

MARTIN, S.; RICHIER, S.; PEDROTTI, M.-L.; DUPONT, S.; CASTEJON, C.; GERAKIS, Y.; KERROS, M.-E.; OBERHÄNSLI, F.; TEYSSIÉ, J.-L.; JEFFREE, R.; GATTUSO, J.-P.; Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin Paracentrotus lividus exposed to CO2-driven acidification. Journal of Experimental Biology 214: 1357–1368, 2011.

MARTINS, E.S., 2008. **Desenvolvimento embrionário e larval de Encope emarginata (Leske, 1778) (Echinodermata: Echinoidea), e variações morfológicas interpopulacionais ao longo da costa brasileira entre 13o S e 30o S.** Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MASTROTI, R.R. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (fertilização), in: NASCIMENTO, I.A., SOUS, E.C.P.M. de, NIPPER, M.G. (Eds.), **Métodos Em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações No Brasil.** Artes Gráficas e Indústria Ltda., pp. 91–97. 2002.

MAZUR, J.E.; MILLER J.W. **A Description of the Complete Metamorphosis of the Sea Urchin Lytechinus Variegatus Cultured in Synthetic Sea Water.** Ohio State Univ. 71: 30–36. 1971.

MCEDWARD, L.R.; HERRERA, J.C. Body form and skeletal morphometrics during larval development of the sea urchin Lytechinus variegatus Lamarck. **The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 232: 151–176. 1999.

MILLERO, F.J. **Chemical Oceonography,** 3rd ed. CRC Press, Boca Raton. 2006.

MILLERO, F.J. **The physical chemistry natural waters.** Wiler-Interscience Series in Geochemistry. 2000.

MILLERO, F.J., ZHANG, J.Z., LEE, K., CAMPBELL, D.M., Titration alkalinity of seawater. **Marine Chemistry** 44: 153–165, 1993.

NEMZER, B. V.; DICKSON, A.G.T. The stability and reproducibility of Tris buffers in synthetic seawater. **Marine Chemistry** 96: 237–242, 2005.

NIELSEN, L.T.; JAKOBSEN, H.H.; HANSEN, P.J. High resilience of two coastal plankton communities to twenty-first century seawater acidification: Evidence from microcosm studies. **Marine Biology Research** 6: 542–555. 2010.

NOAA, 2016a. **History of atmospheric carbon dioxide from 800,000 years ago until January, 2016.** [WWW Document]. U.S. Dep. Commer. | Natl. Ocean. Atmos. Adm. Earth Syst. Res. Lab. Glob. Monit. Div. URL https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/history.html (accessed 1.1.16).

NOAA, 2016b. Annual Mean Growth Rate for Mauna Loa, Hawaii [WWW Document]. URL https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/gr.html

PENNINGTON, J.T. The Ecology of Fertilization of Echinoid Eggs : The Consequences of Sperm Dilution, Adult Aggregation, and Synchronous Spawning. **Biological Discovery in Woods Hole** 169: 417–430, 1985.

Perez, F.I.Z.F., Fraga, F. The pH measurements in seawater on the NBS scale. **Marine Chemistry** 21: 315–327, 1987.

PETIT, R.J., RAYNAUD, D., BASILE, I., CHAPPELLAZ, J., RITZ, C., DELMOTTE, M., LEGRAND, M., Lorius, C., Pe, L. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. **Nature** 399: 429–413, 1999.

POORE, A.G.B.; GRABA-LANDRY, A.; FAVRET, M.; SHEPPARD BRENNAND, H.; BYRNE, M.; DWORJANYN, S.A. Direct and indirect effects of ocean acidification and warming on a marine plant-herbivore interaction. **Oecologia** 173: 1113–1124, 2013.

RAMOS e SILVA, C.A.; LIU, X.; MILLERO, F.J. Solubility of Siderite ($FeCO_3$) in NaCl Solutions. Journal **of Solution** Chemistry 31: 97–108, 2002.

RAMOS e SILVA, C.A.; SENEZ, T.M.; FONSECA, E.M.; RIBEIRO, H.M.; BAPTISTA NETO, JOSÉ, A.B.; DAMASCENO, R. Acidificação dos oceanos em um sopro: Prática educacional para construção de conhecimento das mudanças globais. **Revista de Experiências em Ensino de Ciências** 12: 1–25, 2017.

RAVEN, J.; CALDEIRA, K.; ELDERFIELD, H.; HOEGH-GULDBERG, O.; LISS, P.; RIEBESELL, U.; SHEPHERD, J.; TURLEY, C.; WATSON, A. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. **The Royal Society policy document** 12.05. Cardiff, UK: Clyvedon Press.

ROY, R.N.; ROY, L.N.; VOGEL, K.M.; PORTER-MOORE, C.; PEARSON, T.; GOOD, C.E.; MILLERO, F.J.; CAMPBELL, D.M., The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45 ° C. **Marine Chemistry** 44: 249–267 1993.

SABINE, C.L.; FEELY, R.A.; GRUBER, N.; KEY, R.M.; LEE, K.; BULLISTER, J.L.; WANNINKHOF, R.; WONG, C.S.; WALLACE, D.W.R.; TILBRUOOK, B.; MILLERO, F.J.,

PENG, T.-H.; KOZYR, A.; ONO, T.; RIOS, A.F. The oceanic sink for anthropogenic CO_2. **Science.** 305: 367–371, 2004.

SIEBURTH, J.M.; SMETACEK, V.; LENZ, J. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. **Limnology and Oceanography** 23: 1256–1263, 1978.

SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T.F.; MONNIN, E.; LÜTHI, D.; SCHWANDER, J.; STAUFFER, B.; RAYNAUD, D.; BARNOLA, J.M.; FISCHER, H.; MASSON-DELMOTTE, V.; JOUZEL, J. Stable Carbon Cycle – Climate Relationship During the Late Pleistocene. **Science** 2: 1313–1317, 2005.

SIERACKI, C.K., SIERACKI, M.E., YENTSCH, C.S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. **Marine Ecology** 168: 285–296, 1998.

SILVEIRA, I.C.A.; SCHIMIDT, A.C.K.; CAMPOS, E.J.D.; GODOI, S.S. de; IKEDA, Y. **A** Corrente do Brasil ao Largo da Costa Leste Brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia** 48: 171–183, 2000.

STICKLE, W; ROLLER, R. A.; STICKLE, W. B. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea). **Marine Biology** 116: 583–591. 1993.

STRATHMANN, M.F. **Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae.** University of Washington Press, Seattle. 1987.

VALENTIN, J.L. Analyse des paramètres hydrobiologiques dans la remontèe de Cabo Frio (Brésil). **Marine Biology** 82: 259–276, 1984.

VAN DER BERG, C.M.G., ROGERS, H. Determination of alkalinities of estuarine waters by a two-point potentiometric titration. **Marine Chemistry** 20: 219–226, 1987.

YAO, W., MILLERO, F.J. The Chemistry of the Anoxic Waters in the Framvaren Fjord , Norway. **Aquatic Geochemistry** 1: 53–88, 1995.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASMIL, D.; ZULFIA, A. Blood Cockle Shells Waste as Renewable Source for the Production of Biogenic CaCO3 and Its Characterisation Blood Cockle Shells Waste as Renewable Source for the Production of Biogenic CaCO3 and Its Characterisation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 34, n. 1, p. 012049, 2017.

ATKINS, P.; PAULA, J. The second law. In: **Physical chemistry**. 8th. ed. New York: Oxford University Press, 2006. p. 1053.

BIJMA, J. et al. Climate change and the oceans - What does the future hold? **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 2, p. 495–505, 2013.

BOEHM, A. B. et al. Ocean Acidification Science Needs for Natural Resource Managers of the North American West Coast. **Oceanography**, v. 28, n. 2, p. 170–181, 2015.

BORGES, A. V. . Do VVe Have Enough Pieces of the Jigsaw to Integrate CO2 Fluxes in the Coastal Ocean? **Estuaries**, v. 28, n. 1, p. 3–27, 2005.

BORGES, A. V; DELILLE, B.; FRANKIGNOULLE, M. Budgeting sinks and sources of CO2 in the coastal ocean: Diversity of ecosystems counts. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 14, p. 1–4, 2005.

BORGES, A. V; FRANKIGNOULLE, M. Distribution of surface carbon dioxide and air-sea exchange in the upwelling system off the Galician coast Latitude (˚ N) Longitude (˚ E). v. 16, n. 2, 2002.

BOYD, P. W. Beyond ocean acidification. **Nature Geoscience**, v. 4, n. 5, p. 273–274, 2011.

BUSENBERG, E.; PLUMMER, N. Thermodynamics of magnesian calcite solid-solutions at 25°C and 1 atm total pressure. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 53, p. 1189–1208, 1989.

BYRNE, M.; BYRNE, M. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages : Vulnerabilities and ... for persistence in a changing ocean. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, v. 49, p. 1–42, 2011.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 365, 2003.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. v. 110, p. 1–12, 2005.

CAO, L. et al. Response of ocean acidification to a gradual increase and decrease of atmospheric CO2. **Environment Research Letters**, v. 9, n. 2, p. 024012, 2014.

CAO, Z. et al. Dynamics of the carbonate system in a large continental shelf system under the influence of both a river plume and coastal upwelling. **JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH: Biogeosciences**, v. 116, n. G2, p. 1–14, 2011.

CASELLA, L. A. et al. Experimental diagenesis : insights into aragonite to calcite transformation of Arctica islandica shells by hydrothermal treatment. **Biogeosciences**, v. 14, n. 6, p. 1461–1492, 2017.

CHEN, Y.-L. L. et al. Phytoplankton production during a summer coastal upwelling in the East China Sea. **Continental Shelf Research**, v. 24, n. 12, p. 1321–1338, 2004.

CLAYTON, T. D.; BYRNE, R. H. Spectrophotometric seawater pH measurements : total hydrogen results. **Deep-Sea Research**, v. 40, n. 10, p. 2115–2129, 1993.

CONNELL, S. D. et al. The other ocean acidification problem: CO2 as a resource among competitors for ecosystem dominance. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1627, p. 1–9, 2013.

CONNELL, S. D.; RUSSELL, BAYDEN, D. The direct effects of increasing CO 2 and temperature on non-calcifying organisms : increasing the potential for phase-shifts in kelp forests. **Biological Sciences**, v. 277, n. 1686, p. 1409–1415, 2010.

CORNWALL, C. E.; HURD, C. L. Experimental design in ocean acidification research: problems and solutions. **ICES Journal of Marine Science**, v. 73, n. 3, p. 572–581, 2015.

DICKSON, A. G. The measurement of sea water pH. **Marine Chemistry**, v. 44, p. 131–142, 1993.

DICKSON, A. G. The carbon dioxide system in seawater: equilibrium chemistry and measurements. In: **Guide to best practices for ocean acidification**. [s.l.] Office for Official Publications of the European Communities, 2011. p. 17–40.

DICKSON, A. G.; SABINE, C. L.; JAMES, R. C. Guide to Best Practices for Ocean CO2 Measurements. **PICES Special Publication**, v. 3, n. 8, p. 1–191, 2007.

DINER, R. E. et al. Negative effects of ocean acidification on calcification vary within the coccolithophore genus Calcidiscus. **Marine Biology**, v. 162, n. 6, p. 1287–1305, 2015.

DONEY, S. C. et al. Ocean Acidification : The Other CO 2 Problem. 2009.

DORE, J. E. et al. Physical and biogeochemical modulation of ocean acidification in the central North Pacific. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 30, p. 12235–12240, 2009.

DUARTE, C. et al. Intraspecific Variability in the Response of the Edible Mussel Mytilus chilensis (Hupe) to Ocean Acidification. **Journal of Sea Research**, v. 85, p. 308–314, 2014.

EDMUNDS, P. J.; YARID, A. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology The effects of ocean acidi fi cation on wound repair in the coral Porites spp . **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 486, p. 98–104, 2017.

EVENSEN, N. R.; EDMUNDS, P. J. Interactive effects of ocean acidification and neighboring corals on the growth of Pocillopora verrucosa Interactive effects of ocean acidification and neighboring corals. **Marine Biology**, v. 163, n. 7, p. 1–11, 2016.

FABRY, V. J. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–6, 2005.

FABRY, V. J. et al. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, v. 65, n. 3, p. 414–432, 2008.

FABRY, V. J. et al. Ocean Acidification at High Latitudes : The Bellwether S p e c i a l Iss u e F e at u r e. n. May, 2009.

FEELY, R. A. et al. Winter-Summer Variations of Calcite and Aragonite Saturation in the Northeast Pacific. **Marine Chemistry**, v. 25, p. 227–241, 1988.

FEELY, R. A. et al. Impact of Anthropogenic CO2 on the CaCO3 System in the

Oceans. **Science**, v. 305, p. 362–366, 2004.

FEELY, R. A et al. Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the continental shelf. **Science**, v. 320, p. 1490–1492, 2008.

GATTUSO, J.-P. et al. Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry. In: RIEBESELL, U. et al. (Eds.). . **Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting**. 1st. ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2011. p. 41–52.

GATTUSO, J.-P.; ALLEMAND, D.; FRANKIGNOULLE, M. Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on interactions and control by carbonate chemistry. **American Zoologist**, p. 160–183, 1999.

GATTUSO, J.-P.; HANSSON, L. Ocean acidification: background and history. In: GATTUSO, J.-P.; HANSSO, L. (Eds.). . **Ocean Acidification**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2012. p. 1–20.

GAZEAU, F. et al. Impact of elevated CO2 on shellfish calcification. **Geophysical Research Letters**, v. 34, n. 7, p. 1–5, 2007.

GONZÁLEZ-DÁVILA, M. et al. The water column distribution of carbonate system variables at the ESTOC site from 1995 to 2004. **Biogeosciences**, v. 7, p. 3067–3081, 2010.

HAIN, M. P.; SIGMAN, D. M. **The Biological Pump in the Past**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 8

HALES, B. et al. Irreversible nitrate fluxes due to turbulent mixing in a coastal upwelling system. **JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH: Oceans**, v. 110, n. C10, p. 1–19, 2005.

HALL-SPENCER, J. M. et al. effects of ocean acidification Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. n. May, 2008.

HARRIS, K. E.; DEGRANDPRE, M. D.; HALES, B. Aragonite saturation state dynamics in a coastal upwelling zone. **Geophysical Research Letters**, v. 40, n. 11, p. 2720–2725, 2013.

HAUCK, J. On the Southern Ocean CO2 uptake and the role of the biological carbon pump in the 21st century. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 29, n. 9, p. 1451–1470, 2015.

HOEGH-GULDBERG, O. et al. The Ocean. **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, p. 1655–1731, 2014.

HOFMANN, G. E. et al. The Effect of Ocean Acidification on Calcifying Organisms in Marine Ecosystems: An Organism-to-Ecosystem Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 41**, v. 41, p. 127–147, 2010.

HÖNISCH, B. et al. The geologycal record of the ocean acidification. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1058–1063, 2012.

IPCC. Part A: Global and Sectoral Aspects. (Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change). **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability.**, p. 1132, 2014.

JIANG, L. et al. Global Biogeochemical Cycles saturation state in the global oceans. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 29, n. 10, p. 1656–1673, 2015.

JOKIEL, P. L. et al. Ocean acidification and calcifying reef organisms : a mesocosm investigation. **Coral Reefs**, v. 27, n. 3, p. 473–483, 2008.

LE QUÉRÉ, C. et al. The global carbon budget 1959-2011. **Earth System Science Data**, v. 5, n. 1, p. 165–185, 2013.

LEINWEBER, A.; GRUBER, N. Variability and trends of ocean acidification in the Southern California Current System : A time series from Santa Monica Bay. **JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH: OCEANS**, v. 118, p. 3622–3633, 2013.

LÜTHI, D. et al. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 379–382, 2008.

MARTZ, T. R. et al. Technology for ocean acidification research: Needs and availability. **Oceanography**, v. 28, n. 2, p. 40–47, 2015.

MASTROTI, R. R. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (fertilização). In: NASCIMENTO, I. A.; SOUS, E. C. P. M. DE; NIPPER, M. G. (Eds.). . **Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil**. [s.l.] Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002. p. 91–97.

MCLAUGHLIN, K. et al. Core Principles of the California Current Acidification Network : Linking Chemistry , Physics , and Ecological Effects. **Oceanography**, v. 28, n. 2, p. 109–117, 2015.

MILLERO, F. J. The Marine Inorganic Carbon Cycle. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 2, p. 308–341, 2007.

MORSE, J. W.; ARVIDSON, R. S. The dissolution kinetics of major sedimentary carbonate minerals. **Earth-Science Reviews**, v. 58, p. 51–84, 2002.

MORSE, J. W.; ARVIDSON, R. S.; LÜTTGE, A. Calcium Carbonate Formation and Dissolution. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 2, p. 342–381, 2007.

NIELSEN, L. T.; JAKOBSEN, H. H.; HANSEN, P. J. High resilience of two coastal plankton communities to twenty-first century seawater acidification: Evidence from microcosm studies. **Marine Biology Research**, v. 6, p. 542–555, 2010.

NIPPER, M. G.; PRÓSPERI, V. A.; ZAMBONI, A. J. Toxicity Testing with Coastal Species of Southeastern Brazil . Echinoderm Sperm and Embryos. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 50, n. 5, p. 646–652, 1993.

ORDOÑEZ, A.; DOROPOULOS, C.; DIAZ-PULIDO, G. Effects of Ocean Acidification on Population Dynamics and Community Structure of Crustose Coralline Algae. **The Biological Bulletin**, v. 226, n. 3, p. 255–268, 2014.

PAVILLON, J. F. Sea urchin eggs and larvae: excellent biological indicators. In: BALKEMA (Ed.). . **Echinoderm Biology**. Rotterdam: Burke, R.D.; Mladenov, P. V.; Parsley, R.L., 1988. p. 621–626.

PETIT, R. J. et al. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. **Nature**, v. 399, p. 429–413, 1999.

RAMOS E SILVA, C. A. **Oceanografia Química**. 1. ed. [s.l.] Interciência, 2011.

RAMOS E SILVA, C. A. et al. Variability and Transport of Inorganic Carbon Dioxide in a Tropical Estuary. **Journal of Oceanography and Marine Research**, v. 5, n. 1, p. 155, 2017a.

RAMOS E SILVA, C. A. et al. The impact of organic and intensive farming on the tropical estuary. **Ocean & Coastal Management**, v. 141, p. 55–64, 2017b.

RAVEN et al. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. **The Royal Society**, n. June, p. 1–68, 2005.

RIDGWELL, A.; SCHMIDT, D. N. Past constraints on the vulnerability of marine calcifiers to massive carbon dioxide release. **Nature Geoscience**, v. 3, n. 3, p. 1–5, 2010.

RIEBESELL, U. et al. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO2. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 364–367, 2000.

RIEBESELL, U. et al. **Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting**. 1st. ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2011.

SABINE, C. L. et al. The oceanic sink for anthropogenic CO2. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 367–371, 2004.

SANTANA-CASIANO, J. M. et al. The interannual variability of oceanic CO 2 parameters in the northeast Atlantic subtropical gyre at the ESTOC site. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2007.

SARMIENTO, J. L.; GRUBER, N. Oceanic carbon cycle, atmospheric CO2, and climate. In: **Ocean Biogeochemical Dynamics**. [s.l.] Princeton University Press, 2004. p. 1–99.

SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T. F.; MONNIN, E. ET AL. Stable Carbon Cycle – Climate Relationship During the Late Pleistocene. **Science**, v. 2, n. 310, p. 1313–1317, 2005.

TAKAHASHI, T. et al. Climatological Distributions of pH , pCO2 , Total CO2 , Alkalinity , and CaCO3 Saturation in the Global Surface Ocean , and temporal changes at selected locations. **Marine Chemistry**, v. 164, p. 95–125, 2014.

THOMPSON, A.; TAYLOR, B. N. Guide for the Use of the International System of Units (SI). **Special Publication (NIST SP)-811**, p. 1–90, 2008.

VAN DER BERG, C. M. G.; ROGERS, H. Determination of alkalinities of estuarine waters by a two-point potentiometric titration. **Marine Chemistry**, v. 20, p. 219–226, 1987.

WATSON, S. Giant Clams and Rising CO 2 : Light May Ameliorate Effects of Ocean Acidification on a Solar-Powered Animal. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.

WEINER, S.; DOVE, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1–29, 2003.

WOOTTON, J. T.; PFISTER, C. A.; FORESTER, J. D. Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 48, p. 18848–18853, 2008.

XUE, L. et al. Aragonite saturation state in a monsoonal upwelling system off Java , Indonesia. **Journal of Marine Systems**, v. 153, n. November 2015, p. 10–17, 2016.

ZEEBE, R.; RIDGWELL, A. Past changes in ocean carbonate chemistry. In: GATTUSO, J.-P.; HANSSON, L. (Eds.). . **Ocean Acidification**. [s.l.] Oxford University Press, 2012. p. 21–40.

ZEEBE, R.; WOLF-GLADROW, D. **CO2 in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes**. [s.l.] Elsevier Oceanography Series 65, 2001.

APÊNDICE A - POP: Manual Operacional do Controlador e pH

	Procedimento Operacional Padrão		**POP**
	Manual Operacional do Controlador de pH		**Página 01/01**
Elaborado por: Livia Godoy (Doutoranda)	**Verificado por**:	**Aprovado por**:	**Data: 15/09/2016**
			Revisão: 01

1. OBJETIVO

Servir como procedimento básico de operação do controlador de pH Apex da Neptune System para o experimento de efeito da acidificação da água do mar em organismos marinhos.

2. MATERIAIS

3. ALCANCE

Técnicos, alunos de Iniciação Científica, e estagiários, alunos da pósgraduação.

4. AMBIENTE NECESSÁRIO PARA O USO

O equipamento pode ser ligado em 110 ou 220V;

Usar o cabo de alimentação apropriado e conectar a uma tomada aterrada;

Manter longe da luz solar.

5. ESTRUTURA DO CONTROLADOR DE PH

Visor (“display”) – deve ser conectado ao sistema na entrada USB da barra de energia (ou do controlador). Dados como temperatura, pH e dados do “data logger” poderão ser visto no visor. Muitas configurações do sistema poderão ser feitas através do visor. O monitor do computador substitui este visor (“display”).

Figura 1: Visor do controlador de pH (“display”).

Barra de energia – possui 8 tomadas de energia (120 V) independentes (“outlets”) e 6 entradas USB (“AquaBus”) para conecção de acessórios. Atua como um estabilizador de energia para todos os outros acessórios.

Figura 2: Barra de energia.

Tabela1: Significado das luzes da barra de energia:

Estado da luz de LED	Estatus da barra de energia
Desligada	A barra de energia não está ligada
Amarelo pálido	Não está em modo de carregador de boot e não está configurado para o controlador.
Amarelo sólido	Está em modo de carregador de boot e está configurado para o controlador.
Verde pálido	Está em funcionamento, porém não está recebendo comandos do controlador.
Verde sólido	Está em funcionamento e recebendo comando do controlador.

Controlador de pH – está conectado à barra de energia através de cabo USB próprio. O sensor de pH é conectado ao sistema através do controlador, assim como a válvula solenoide. O controlador está ligado quando a luz está acesa.

Figura 3: Controlador de pH.

Acessório Módulo para sensor extra (“AquaController Apex Probe Module 1) = PM1 – este acessório permite adicionar um sensor de pH extra ao sistema. Nele, é conectado um sensor de pH e uma válvula solenoide. Está ligado ao sistema através de um cabo USB próprio na barra de energia (ou no controlador de pH).

Figura 4: Acessório Módulo para sensor extra (“AquaController Apex Probe Module 1) = PM1.

Sensores de pH – são ligados ao controlador de pH ou ao PM1.]

Figura 5: Sensor de pH.

Sensores de temperatura – são ligados ao sistema através de um cabo USB próprio na barra de energia (ou no controlador de pH).

Computador – é ligado ao sistema para descarregar os dados (pH e temperatura). Pode ser usado para substituir o visor (“display”).

Válvulas solenoides – controla o pH, cada sensor de pH de cada aquário (célula termostatizada) deve ter sua válvula solenoide correspondente. Esta válvula é conectada ao controlador de pH ou ao PM1 (onde estiver seu sensor de pH correspondente). A válvula solenoide recebe sinal do controlador de pH ou PM1 para abrir ou fechar a passagem do gás do cilindro. Desta forma, a válvula solenoide é ligada também ao cilindro de gás.

Figura 6: Válvula solenoide.

Cilindro de gás e o sistema do gás – a composição do cilindro é de 0,5% de CO_2, 20,95% de O_2 e 78,55% de N_2. No cilindro, há uma válvula de pressão acoplada, que também faz o ajuste fino. Após, há várias saídas de gás, uma para cada válvula solenoide. Mangueiras de diferentes calibres fazem as ligações entre as válvulas e aquários para a passagem do ar. Conectores de mangueira são necessários.

Figura 7: Cilindro de CO_2 com a válvula de pressão.

6. OPERAÇÃO

6.1. Se certificar que todos os cabos e conecções estão ligados.

6.2. Para ligar o sistema de acidificação já montado, é preciso ligar a barra de energia na tomada de 110V de um nobreak. Ligar o computador e o roteador, ambos estabilizados por um nobreak. Entrar no site do Apex Fusion e fazer o login:

6.3. usuário: oliveiracarlos

6.4. senha: CARLOS114319

6.5. Após feito o "login", o Apex Fusion atualiza o programa automaticamente.

6.6. Abrir o cilindro de CO_2. Ativar a função de controlar o pH no Fusion.

6.7. Deixar todo o sistema ligado no nobreak enquanto o pH da água estiver sendo controlado.

6.8. Observar se as cores das lâmpadas da barra (item 5) estão corretas e consertar qualquer alteração. Certificar-se que os demais componentes e acessórios estão com sua luz acesa, indicando que estão com fornecimento de energia e ligados ao sistema.

6.9. Calibrar todos os eletrodos de pH através do controlador de pH (ítem 7.2)

6.10. Definir o pH desejado para cada aquário (célula termostatizada) no controlador de pH (ítem 8).

6.11. Abrir a regulação de pressão do cilindro e as válvulas de ajuste fino. O fluxo não deve ser muito alto. Quando houver larvas no aquário, as bolhas lançadas devem ser pequenas e em baixa vazão.

6.12. Pode levar minutos ou horas para alcançar o pH desejado.

6.13. Os dados do “data logger” devem ser salvos no computador a cada 24 h no mínimo, por questões de segurança (ítem 8).

6.14. Na hora de desligar, fazer o logout no Fusion, desligar o computador e a barra de energia. Fechar o cilindro.

7. PREPARAÇÃO ANTES DO TESTE

7.1. Preparar os eletrodos (teste de desempenho) e soluções padrão de "TRIS".

7.2. Calibração do eletrodo é feita através do Display do aparelho. Clicar em Main Manu - setup - temp setup - temp calibrate. Siguir as orientações utilizando tampão padrão TRIS para água do mar nos pH de 7,00 e 10,00.

8. CONFIGURAR A FAIXA DE PH DESEJADA

Para configurar a faixa de pH desejada, no computador, ir em: Configuração - output - CO2_3_7 (por exemplo) - preencher a tela e salvar (update apex).

9. SALVAR OS DADOS DO “DATA LOGGER”.

Os dados gerados pelo APEX FUSION devem ser salvos diariamente. Para salvar no Excel é preciso:

1º - Digitalizar o IP do sistema de acidificação: 192.168.0.123, no endereço da barra do Google, dar "enter".

2º - Vai pedir usuário e senha, digitalizar:

usuário: admin

senha: 1234

Vai abrir uma página da Neptune System com os dados registrados.

3º - Abrir o Excel. Ir em Dados → Obter Dados da Web → copiar endereço da página da Neptune System e colar nessa janela → importar.

Pede de novo:

usuário: admin

senha: 1234

Então, a planilha aparece no Excel.

OBS: Este usuário e senha são obtidos no "Flash Utility" e no "Browse Utility" que constam no manual do controlador de pH.

10. ACESSO REMOTO

É possível acessar, remotamente, através de um celular ou computador, o Fusion para acompanhar os dados "on line" do controlador. Para isto é preciso que o computador do controlador esteja "logado" ao "site" e, remotamente, "logado" também com o mesmo "loging" e senha. Após o uso remoto, lembrar de desfazer o "loging". Somente, fazer o logout no computador do controlador, após fazer o "logout" do acesso remoto.

Observação: Isto aconteceu e deu erro ao fazer o "loging", novamente, no computador do controlador. Isto foi resolvido acessando o "site" através do "email" de "loging" enviado pela Neptune System.

Dependendo da qualidade da internet utilizada no celular, a atualização dos valores mostrados no celular pode estar lenta. É aconselhável utilizar uma rede *wifi* e não internet móvel.

É possível conectar de forma remota mais de um usuário. Cada usuário conectado pode ter níveis diferentes de acesso, de forma que seu acesso seja restrito em relação a visualização, controle, configuração e programação.

OBSERVAÇÕES

A senha da tela do Display é xyz.

Para mudar a temperatura de F*ahrenheit para Celsius é pelo Display: Main manu- setup - temp setup.*

Se o parelho ficar desligado por muito tempo, checar se há nova atualização do firmware mais recente.

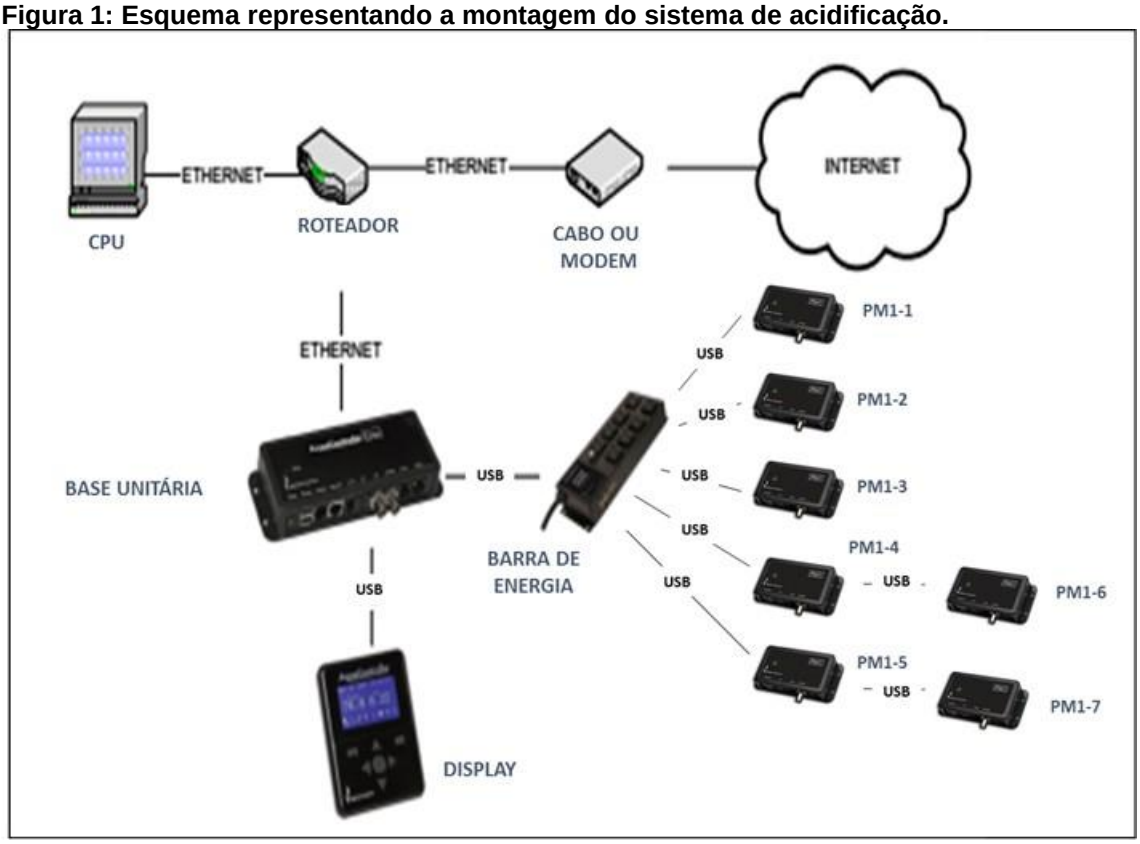
O controlador de pH sinaliza quando há troca de água em determinado eletrodo. É possível adicionar um comentário sobre, como que água foi usada, a transparência da água etc.

APÊNDICE B - POP controlador de pH - esquema da montagem do aparelho e instalação do software

ESQUEMA DA MONTAGEM DO SISTEMA FÍSICO

O esquema físico do sistema é montado como na Figura 1. Os cabos USB usados pelo Sistema do Neptune tem que ser os originais.

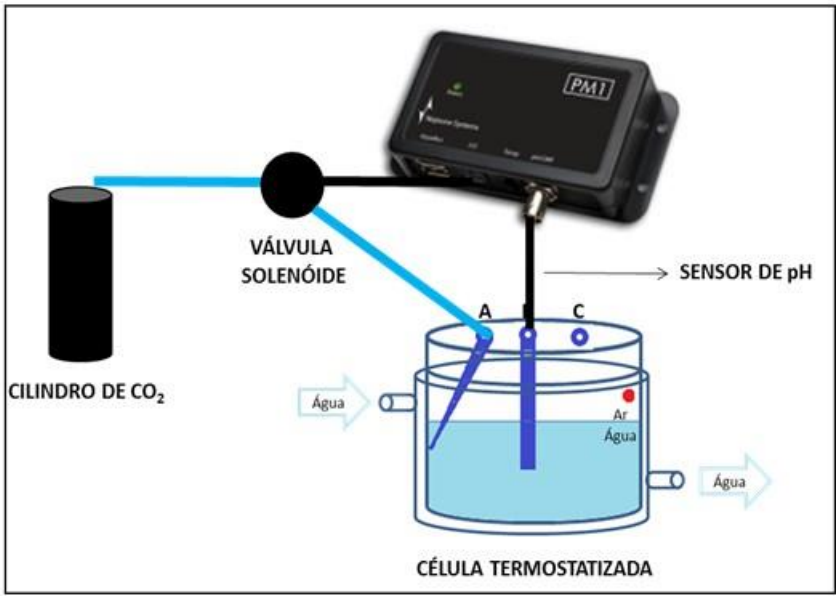
Figura 1: Esquema representando a montagem do sistema de acidificação.



Na Figura 2, estão esquematizadas as ligações que serão feitas nos PM1, a comunicação com a válvula solenóide e o sensor de pH da célula termostatizada. Todos os PM1 terão seus pH monitorados. Porém, os controles B (abertos para a atmosfera e com larvas) não terão seus pH controlados, ou seja, dois PM1 não estarão conectados com válvula solenóide e suas respectivas células termostatizadas não estarão ligados a mangueira de CO_2.

Um cilindro de CO_2 é usado para as 5 células termostatizada (3 tratamentos e 2 controles).

Figura 2: Esquema representandoa ligação de cada PM1 a uma célula termostatizada e á injeção de CO_2.



INSTALAÇÃO

O Apex Fusion é uma nuvem da internet criada para ajudar a operar o controlador de pH. O programa, somente, é rodado quando está online no site www.apexfusion.com /Apex. É preciso criar uma conta para obter login e senha através do site.

O DNS deve ser o 4.2.2.1. Ele é alterado no computador: Painel de Controle - configuração de rede - wifi - wifi status/Propriedades - Internet Protocol Version 4 (TCP/IPv4) - propriedades - advanced - DNS - adicionar - DNS servidor 4.2.2.1 - ok.

No site www.neptunesystems.com, pode-se acessar as últimas atualizações de firmware do aparelho. Vai em Support - firmware update. Fazer o download, descompactar e instalar.

IDENTIFICAÇÃO DOS PM1

Para identificar no Fusion os PM1, adiciona-se um a um à barra energia e observa-se o nome que aparece. Os nomes podem ser editados no Fusion.

IDENTIFICAÇÃO DOS OUTPUTS

Cada saída na barra de energia (E8) tem um número (de 1 a 8), como está escrito na mesma. No computador, esse número em E8 corresponde ao

último número no output. Por exemplo, o output CO2_3_7, está na saída 7 de E8. Desta forma, a válvula solenoide ligada a determinada base unitária ou PM1 deve estar ligada a saída 7 em E8.