

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA MOCELIN DE CAMARGO

Abundância e toxicidade de *Pseudo-nitzschia* spp. e sua relação com as concentrações de ferro dissolvido em águas do Atlântico Sul (27°S)

PONTAL DO PARANÁ

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA MOCELIN DE CAMARGO

Abundância e toxicidade de *Pseudo-nitzschia* spp. e sua relação com as concentrações de ferro dissolvido em águas do Atlântico Sul (27°S)

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos. Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr. Eunice da Costa Machado.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Laurenno Mafra Jr.

Linha de Pesquisa: Biogeoquímica e Poluição Marinha

PONTAL DO PARANÁ

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Liliam Maria Orquiza - CRB-9/712

C172f Camargo, Luana Mocelin de
Ferro dissolvido em águas costeiras do Atlântico Sul (27°S) e sua relação com a abundância e toxicidade de *Pseudo-nitzschia spp.* / Luana Mocelin de Camargo. – Pontal do Paraná, 2015.
53 f.; 29 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice da Costa Machado.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Ácido domóico. 2. Micronutrientes. 3. AdCSV. 4. LC-UVD. I.Título. II. Machado, Eunice da Costa. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.481



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR

Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil

Tel. (41) 3511-8644 - Fax (41) 3511-8648 - www.cem.ufpr.br - E-mail: pgsisco@ufpr.br

Ata da sessão pública de Defesa de Dissertação para obtenção do grau de Mestra em Sistemas Costeiros e Oceânicos, área de concentração Biogeoquímica e Poluição Marinha. Aos trinta dias do mês de março de 2015, no anfiteatro do Centro de Estudos do Mar, às 16 horas, reuniu-se em sessão pública a Banca Examinadora da prova de Defesa de Dissertação da candidata ao Título de Mestra em Sistemas Costeiros e Oceânicos, **Luana Mocelin de Camargo**, composta pelos seguintes membros: Dra. Eunice da Costa Machado (FURG), como orientadora e presidente, Dr. Frederico Pereira Brandini (USP), Dr. Luis Antonio de Oliveira Proença (IFSC) e Dr. Guilherme Sippel Machado (CEM/UFPR), como examinadores. Após os esclarecimentos prestados pelo candidato às arguições feitas pelos membros da Banca, o Sr. Presidente suspendeu temporariamente a sessão a fim de que a Banca se reunisse em sessão secreta para deliberar sobre o resultado. Reaberta a sessão, o Sr. presidente deu conhecimento a candidata que, de conformidade com o Art. 67 da Resolução 65/09 CEPE, a dissertação foi APROVADA, apenas condicionada à apresentação, no prazo de sessenta dias, da redação final com as alterações sugeridas.

Pontal do Paraná, 30 de março de 2015.

Dra. Eunice da Costa Machado (FURG)
Orientadora e Presidente

Dr. Frederico Pereira Brandini (USP)
Membro Examinador

Dr. Luis Antonio de Oliveira Proença (IFSC)
Membro Examinador

Dr. Guilherme Sippel Machado (CEM/UFPR)
Membro Examinador

Título da Dissertação: "Ferro dissolvido em águas costeiras do Atlântico Sul (27°S) e sua relação com a abundância e toxicidade de *Pseudo-nitzschia* spp."

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus orientadores, Prof. Dr. Eunice Machado e Prof. Dr. Luiz Mafra Jr., pelo apoio e ensinamentos. Mais do que grandes profissionais, são pessoas maravilhosas, com quem tive o privilégio de conviver.

À Capes, pelo financiamento.

Ao Laboratório de Biogeoquímica Marinha e Laboratório de Microalgas do CEM, às minhas técnicas queridas Liciane e Vanessa e a todos os “amigos de lab”.

Ao Instituto Oceanográfico da USP, em especial ao Prof. Dr. Frederico Brandini, por possibilitar a participação no cruzeiro oceanográfico a bordo do N. Oc. Alpha Crucis, e aos que auxiliaram 24h por dia no trabalho embarcado: Pedro Marone, Diana Italian e à técnica Marisa.

Ao Grupo de Química Ambiental da UFPR, por tentar implementar o método para análise de ferro dissolvido por voltametria. Em especial ao Prof. Dr. Marco Grassi e à Msc. Simone Silva, pela dedicação e auxílio.

À Bruna e ao Ícaro, por terem contribuído com o trabalho, na contagem e identificação do microfitoplâncton, respectivamente.

Ao Prof. Dr. Luciano Fernandes, por identificar as espécies de Pseudo-nitzschia e por intermediar junto ao Prof. Dr. Frederico Brandini a vaga no N. Oc. Alpha Crucis.

Ao Laboratório de Hidroquímica da FURG, por possibilitar as análises de ferro dissolvido. Em especial ao Prof. Dr. Luis Felipe Niencheski, ao Dr. Leonardo Contrini e à Camila Sukekava, pelo auxílio e ensinamentos.

Ao Laboratório de Algas Nocivas do IFSC, por possibilitar as análises de ácido domóico. Aos sempre muito atenciosos Prof. Dr. Luis Proença, Prof. Dr. Mathias Shramm e Prof. Msc. Thiago Alves. Em especial ao Msc. Cristian Klemann, pela análise de muitas e muitas amostras.

Ao Dr. Jason Smith e Dra. Holly Bowers, do Monterey Bay Aquarium Research Institute – MBARI, por ceder a cepa tóxica de Pseudo-nitzschia multiseriada utilizada no experimento.

À Mirella Leis e ao Mihael Machado, pelos auxílios gráficos.

Ao Prof. Dr. Mauricio Camargo e ao Eliandro Gilbert, Guilherme Seiji e Mihael Souza pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Centro de Estudos do Mar.

A todos os professores que tive na vida. Pessoas que dedicam a vida a ensinar merecem toda a gratidão. Obrigada por me tornarem uma pessoa melhor.

Aos meus amigos do GRR 2008, por sempre estarem presentes. Amo vocês!

À minha família, que sempre me apoiou em tudo e nunca mediu esforços para que realizasse meus sonhos! Amo vocês!

“Mar calmo nunca fez bom marinheiro”

Autor desconhecido

PREFÁCIO

A dissertação, apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, pelo Programa da Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná (UFPR), segue as orientações do modelo proposto pelo manual do mestrando, no formato de artigo científico. Primeiramente é apresentado um resumo segundo as normas da UFPR, e em seguida um artigo científico, de acordo com as exigências da revista pretendida para publicação. O estudo faz parte do conjunto de atividades no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Mar “Centro de Oceanografia Integrada” (INCT-Mar COI) e foi desenvolvido em um transecto perpendicular à costa localizado na margem continental e região oceânica contígua do estado de Santa Catarina. O objetivo principal foi o de investigar as relações entre o ferro dissolvido e o microfitoplâncton, sobretudo a abundância e produção de toxinas por diatomáceas penadas do gênero *Pseudo-nitzschia*. No posfácio encontram-se informações extras consideradas necessárias para a dissertação.

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial ao metabolismo vital do microfitoplâncton marinho. Sua disponibilidade biológica está relacionada também à produção e liberação da neurotoxina ácido domóico (AD) pela diatomácea *Pseudo-nitzschia* spp. (*Ps-n*). O AD é capaz de quelar ferro, o que potencialmente representa uma vantagem competitiva em relação aos demais componentes do plâncton marinho. No entanto, por ser um aminoácido, necessita de ferro para sua biossíntese. Alguns estudos mostraram que as taxas de liberação de AD aumentam significativamente em células Fe-deficientes, provavelmente como alternativa para acelerar a absorção do nutriente; outros concluíram que a produção total diminui drasticamente, pois as células perdem a capacidade de sintetizar a toxina. Esse estudo, descritivo e experimental, investigou a distribuição de macronutrientes inorgânicos dissolvidos, ferro dissolvido total e biodisponível em diferentes profundidades (até 200 m) na margem continental e região oceânica contígua de Santa Catarina e relacionou-os à abundância do microfitoplâncton e de *Ps-n*. O experimento *in vitro* testou a influência de diferentes concentrações de ferro-deficientes (D) ou suficiente (S) (D1=0 nmol.L⁻¹, D2=1,7 nmol.L⁻¹, D3=10 nmol.L⁻¹, S=100 nmol.L⁻¹) sobre as taxa de crescimento e a produção de AD por *P. multiseriis*. Os maiores valores de silicato nas estações de margem continental podem estar relacionados à ressurgência de borda de plataforma. Para o nitrato e fosfato, por outro lado, ocorreu uma intrusão em regiões mais afastadas, provavelmente relacionada à presença da Água Central do Atlântico Sul (ACAS). As concentrações de ferro dissolvido total no ambiente foram em geral elevadas (média 131 nmol.L⁻¹), por ser uma região dominada pelas águas oligotróficas da Corrente do Brasil, e a fração considerada biodisponível representou ~5% do total. Houve uma inversão na dominância de grupos do microfitoplâncton, com diatomáceas nas estações dos máximos subsuperficiais de clorofila-*a* (MSC) e mais próximas à costa, onde ocorre o acúmulo de nutrientes, e dinoflagelados nas regiões mais afastadas. A análise de regressão múltipla identificou o ferro dissolvido biodisponível, em associação ao silicato e à salinidade, como os fatores mais determinantes ($R^2 = 0,7$) para a distribuição do microfitoplâncton total na região durante o período investigado. O gênero *Pseudo-nitzschia* representou apenas 3,1% da abundância total, atingindo um máximo de 183 cel.L⁻¹, tendo sido identificada a ocorrência de três espécies: *P. pungens*, *P. delicatissima* e *P. americana*, nenhuma considerada altamente tóxica. A concentração de AD particulado e dissolvido nas amostras de campo não foi quantificável. Resultados do experimento mostraram curvas de crescimento similares das células de *P. multiseriis* sob condições suficientes e deficientes de ferro, o que evidencia a eficiência do AD na adsorção do micronutriente, evitando a limitação do crescimento por ferro. Os conteúdos intracelulares de toxinas, por outro lado, foram significativamente maiores nas células *Fe-suficientes* em relação às *Fe-deficientes*, isso porque (i) as primeiras foram capazes de sintetizar maiores quantidades de AD e (ii) as últimas liberaram grande parte do AD no meio para manter suas taxas de crescimento frente ao estresse causado pela limitação. Provavelmente por este mesmo motivo, as concentrações de AD dissolvido no meio não diferiram significativamente entre os tratamentos ($p = 0,9$) durante a fase exponencial de crescimento. Nas fases estacionária e de declínio, diferentemente, a concentração de AD na fração dissolvida foi até 20 vezes maior no tratamento *Fe-suficiente* ($p \leq 0,03$), pois as células já deveriam estar altamente Fe-estressadas no outro tratamento e não conseguiram sintetizar AD abundantemente.

Palavras-chave: ácido domóico, micronutrientes, AdCSV, LC-UVD

SUMÁRIO

ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1. MATERIAIS EMÉTODOS	7
2.1 Área de estudo.....	7
2.2 Delineamento amostral.....	8
2.3 Descritores da estrutura físico-química da coluna d'água.....	9
2.4 Microfitoplâncton: identificação e abundância.....	11
2.5 Experimento <i>in vitro</i>	12
2.6 Ácido domóico.....	13
2.7 Tratamento dos dados e análises estatísticas.....	14
3. RESULTADOS	15
3.1 Descritores da estrutura físico-química da coluna d'água.....	15
3.2 Microfitoplâncton.....	19
3.3 Experimento <i>in vitro</i>	25
4.DISSCUSSÃO	27
4.1 Nutrientes inorgânicos dissolvidos no ambiente e seu papel na distribuição do microfitoplâncton.....	27
4.2 Efeitos do ferro sobre o crescimento e toxicidade de <i>Ps-n</i> spp.....	32
5. CONCLUSÃO	37
PÓS-FÁCIO	37
REFERÊNCIAS	38
MATERIAL SUPLEMENTAR	46

Abundância e toxicidade de *Pseudo-nitzschia* spp. e sua relação com as concentrações de ferro dissolvido em águas do Atlântico Sul (27°S)

Abundance and toxicity of *Pseudo-nitzschia* spp. and its relationship with dissolved iron concentration in South Atlantic waters (27°S)

Revista Pretendida: *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, ISSN (0967-0645), Fator de Impacto = 2.763, Qualis Capes = Estrato A2.

Luana Camargo^{1*}; Luiz Mafra Jr.¹; Luciano Fernandes²; Bruna Sobrinho¹; Ícaro Cuesta¹;
Leonardo Contrini³; Eunice Machado¹.

¹Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 50.002, 83225-000, Pontal do Paraná, PR, Brasil

²Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

³Instituto Oceanográfico da Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: lumocelin@gmail.com; fone: +554188073755

Abstract. Diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* (*Ps-n*) produce the marine neurotoxin domoic acid (DA), linked to amnesic shellfish poisoning. Distribution of dissolved inorganic macronutrients, dissolved total and bioavailable iron was analyzed at South Atlantic waters (27°S) at different depths (until 200 m) and related to microphytoplankton and *Ps-n* abundance. Dissolved total iron concentrations were high (avg. 131 nmol.L⁻¹), despite the region is dominated by Brazilian Current (BC) oligotrophic waters, and the bioavailable fraction represented ~5% of the total. There was an inversion in the dominance of microphytoplankton groups: diatoms were more abundant nearshore and in deep chlorophyll maximum (DCM), because nutrient accumulation, and dinoflagellate offshore. Multiple regression analysis identified that the most determining factors ($R^2 = 0,7$) to distribution of total microphytoplankton in the region during the investigated period were bioavailable iron, silicate and salinity. *Ps-n* spp. represented only 3,1% of the total abundance (max. 183 cell.L⁻¹) and the analysis by electron microscopy revealed the occurrence of three species: *P. pungens*, *P. delicatissima* e *P. americana*, none of them considered highly toxic in previous investigations. Particulate and dissolved DA concentrations were below the quantitation limit of the method used (LC-UVD). We also investigated how Fe availability affects the production of domoic acid (DA), an aminoacid able to chelate Fe in seawater, but whose biosynthesis requires minimum intracellular levels of Fe, by *P. multiseriis*. Growth rates of *Fe-deficient* and *Fe-sufficient* cells were similar, suggesting that DA efficiently increased iron intake. Intracellular DA quotas, on the other hand, are significantly greater in *Fe-sufficient* relative to *Fe-deficient* cells, because (i) the first are able to synthesize larger amounts of DA and (ii) the latter released most DA to the medium in order to sustain their relatively fast growth rates under the stress caused by Fe-deficiency. This probably also explains the similar concentrations ($p = 0.9$) of dissolved DA measured in the medium of all treatments during the exponential growth phase. Conversely, at both stationary and decline phases dissolved DA concentrations were up to 20 times higher in *Fe-sufficient* relative to *Fe-deficient* cells ($p \leq 0.03$), which must have lost their ability to synthesize large amounts of DA. The results of this study are of importance for the risk assessment of harmful algal blooms in coastal regions with high Fe concentrations.

Keywords: domoic acid, micronutrients, AdCSV, LC-UVD

1 Introdução

O ferro é um elemento traço que exerce papel fundamental na dinâmica dos oceanos. É um micronutriente essencial ao metabolismo dos organismos, requerido nos processos de fotossíntese, respiração, fixação e redução de nitrogênio (Withfield, 2001). As principais fontes desse elemento em regiões costeiras são o aporte fluvial, a deposição atmosférica, a ressurgência e a ressuspensão de sedimentos e a descarga de água subterrânea. Suas concentrações no ambiente marinho são relativamente altas próximo às fontes e diminuem rapidamente com o distanciamento destas, devido à alta reatividade e à insolubilidade do ferro na água do mar (Johnson *et al.*, 1997; Wu; Luther, 1996). As fontes de ferro dissolvido nas zonas fóticas incluem tanto aportes externos, chamados “fontes novas”, quanto “regeneradas”, recicladas *in situ*. Os principais aportes são provenientes de deposição de partículas atmosféricas, misturas verticais e ressurgência, aporte de rios e sedimentos de fundo e a reciclagem biogênica de ferro celular em águas superficiais (Wells *et al.*, 1994). Assim, a biogeoquímica marinha do ferro é determinada por sua baixa solubilidade, especiação redox e o papel que desempenha nos ciclos biológicos (Worsford *et al.*, 2014). Em algumas regiões oceânicas as concentrações superficiais são inferiores a 20-30 pM (Martin *et al.*, 1991), limitantes para manutenção de elevada biomassa fitoplanctônica (Wells *et al.*, 1994).

Nos ambientes marinhos, a fração do ferro presente disponível para incorporação biológica varia de acordo com as formas químicas dominantes, a preferência específica dos organismos fitoplanctônicos por algumas destas, o balanço das reações de troca entre as células e os mecanismos de captura específico de cada espécie de fitoplâncton (Wells *et al.*, 1994). Não há uma concordância entre os pesquisadores para descrever e quantificar a fração biodisponível do Fe. Sabe-se que a grande maioria do ferro dissolvido na água do mar, especialmente em regiões costeiras, não está na fase lábil, mas sim fortemente

complexado a uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, considerados, na sua maioria, não prontamente disponíveis para os organismos (Velasques *et al.*, 2002). No processo de incorporação biológica, dificilmente o microfitoplâncton consegue absorver os complexos mais estáveis, especialmente os compostos por matéria orgânica, utilizando preferencialmente o Fe na forma iônica livre ou complexado fracamente, que penetra mais facilmente através da membrana celular (Öztürz *et al.*, 2003).

Estudos investigaram o papel ecológico da produção de toxinas por estas diatomáceas (Bates *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2002; Rue,; Bruland, 2001; Wells *et al.*, 2005), sendo que uma das hipóteses mais aceitas atualmente é a de que o ácido domóico (AD) exerce a função de quelante de ferro e cobre. Dessa forma, essas diatomáceas desenvolveram estratégias mais eficientes de aquisição de ferro dissolvido em relação a outras espécies microfitoplanctônicas (Wells *et al.*, 2005), possibilitando-as crescer eficientemente na água do mar mesmo sob condições limitantes deste micronutriente (Rue; Bruland, 2001). O processo de quelação do ferro ocorre, provavelmente, através dos três grupos carboxílicos presentes na molécula de AD (Bates *et al.*, 2001) (Fig. 1). Em concentrações elevadas, o AD é capaz de competir com outros ligantes orgânicos pela captura do ferro dissolvido (Rue; Bruland, 2001). Em menores níveis, facilita a absorção do micronutriente aumentando as taxas de troca entre os ligantes em solução e na superfície da célula (Albrecht-Gary; Crumbliss, 1998).

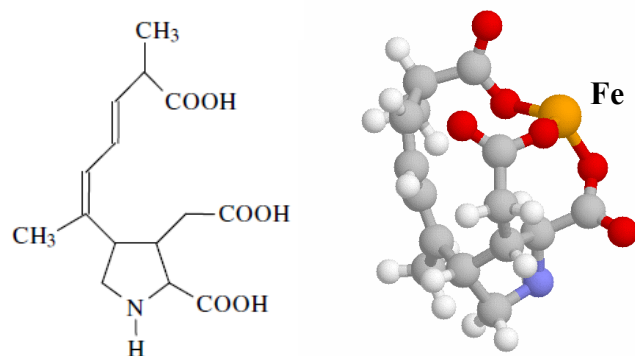


Fig. 1: Estrutura química do ácido domóico e a ligação do ferro no complexo hipotético AD-Fe (Bates *et al.*, 2001).

O AD é uma neurotoxina marinha que atua diretamente no sistema nervoso central e nas funções viscerais dos organismos, sendo relacionada à ocorrência da síndrome amnésica por consumo de mariscos (“*Amnesic Shellfish Poisoning*” – ASP) (Adams *et al.*, 2009). O seu impacto já foi observado em vários níveis da teia alimentar: a toxina pode contribuir com a mortalidade massiva de mamíferos e aves marinhas, afetar atividades de aquicultura e causar a intoxicação de humanos por consumo de frutos-do-mar contaminados (Trainer *et al.*, 2012).

O gênero de diatomáceas *Pseudo-nitzschia* spp. é frequente e abundante nas águas brasileiras, principalmente durante o final da primavera e o verão, quando as populações mais costeiras podem atingir concentrações acima de um milhão de células por litro (Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes; Brandini, 2004; Mafra *et al.*, 2006; Odebrecht *et al.*, 2001; Villac; Tenenbaum, 2001). Em janeiro de 2009 houve o primeiro caso de detecção de concentrações de AD superiores à 20 mg/kg em carne de mexilhões no litoral do estado de Santa Catarina, o que resultou no embargo da comercialização por um período de 31 dias em virtude do potencial risco à saúde humana (Fernandes *et al.*, 2013). Naquele episódio, a abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. atingiu $22,5 \times 10^6$ cel.L⁻¹, sendo grande parte composta por *P. pseudodelicatissima* e *P. calliantha*, espécies moderadamente

tóxicas. Estudos anteriores identificaram, na margem continental sul brasileira, espécies de *Pseudo-nitzschia* spp. que são capazes de produzir altas concentrações de AD e causar a contaminação de moluscos bivalves e a mortalidade massiva de aves e cetáceos ao redor do mundo: *P. australis*, *P. multiseriata*, *P. seriata*; *P. calliantha* e *P. pseudodelicatissima* (Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes; Brandini, 2010; Odebrecht *et al.*, 2001; Procopiak *et al.*, 2007). Assim, como toda a costa sul do Brasil e a plataforma continental possuem condições oceanográficas semelhantes, o risco, embora pequeno, de ocorrer florações tóxicas, como a relatada na Baía Sul de Florianópolis, se estende para toda a região (Fernandes; Brandini, 2010).

Os estudos sobre a produção e a liberação de AD em relação à disponibilidade de ferro dissolvido ainda são contraditórios. Bates *et al.* (2001) acreditam que a produção de AD decresce dramaticamente sob baixa disponibilidade do micronutriente, por reduzir a capacidade de captar nitrogênio e produzir energia fotossintética, dois processos que requerem ferro e são essenciais para a produção da toxina (Bates *et al.*, 2001). Os estudos mais recentes, por outro lado, têm mostrado que, apesar da concentração de AD intracelular diminuir, as taxas de liberação no meio tendem a aumentar, como alternativa para a absorção do nutriente frente a uma situação de limitação (Maldonado *et al.*, 2002; Rue; Bruland *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2005).

A eventual ocorrência de níveis elevados de AD pode afetar fortemente a produção nacional de moluscos bivalves, já que Santa Catarina é o maior produtor nacional de ostras e mexilhões cultivados [>90% da produção, ou ~5 milhões de toneladas (EPAGRI, 2015)]. Os ecossistemas do Atlântico Sul também podem ser afetados, pois aves das ordens Pelecaniformes (atobás, fragatas) e Charadriiformes (gaivotas, trinta-réis) utilizam as ilhas costeiras da região como local de nidificação e abrigo (Branco, 1999).

Os objetivos desse estudo são: (i) investigar a distribuição do ferro dissolvido total e biodisponível em um transecto localizado em parte da margem continental e região oceânica contígua do estado de Santa Catarina, Brasil, e (ii) contribuir para o conhecimento, por meio de levantamentos *in situ* e experimento *in vitro*, investigando o papel do ferro na abundância do microfitoplâncton e de *Pseudo-nitzschia* spp., e nas taxas de produção e liberação de ácido domóico por esta espécie de diatomácea.

2 Material e Métodos

2.1 Área de Estudo

A Margem Continental Sudeste Brasileira (MCSB) abrange a plataforma e o talude continental desde o Cabo de São Tomé (22°S), Rio de Janeiro, ao Cabo de Santa Marta (28,3°S), Santa Catarina (Castro *et al.*, 2006). A área localizada entre 27°S e 24°S é uma zona de transição entre a dominância da Corrente Costeira do Brasil (CCB) e a Corrente do Brasil (CB), com uma progressiva diminuição dos aportes terrígenos na plataforma exterior e talude, onde há forte influência da CB, caracterizada por águas oligotróficas (Nagai *et al.*, 2014). A região abrangida por esse estudo (Fig. 2) é formada pela mistura de três massas de água distintas: Água de Plataforma (AP), Água Tropical (AT) e Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (Castro *et al.*, 2006). A AP origina-se da mistura da Água Subtropical com outras duas massas d'água, AT e Água Costeira (AC), e caracteriza-se por temperatura superior a 20 °C e salinidade entre 35 e 36, apresentando teores variáveis de nutrientes. Ao longo do talude continental e próximo à quebra da plataforma, observa-se o domínio da AT na camada superficial (0–200 m de profundidade), caracterizada por temperaturas superiores a 20 °C e salinidades acima de 36,4. A AT possui águas quentes e oligotróficas, com produção primária baixa (<0,2 g C/m²/dia), mantida pela regeneração de nutrientes na zona eufótica (Metzler, 1997). Abaixo da AT, encontra-se a ACAS (200–500

m de profundidade), com temperatura < 20 °C e salinidades entre 34,6 e 36,4. As águas frias ricas em nutrientes inorgânicos dissolvidos da ACAS ocupam estratos inferiores da zona afótica. Movimentos ascendentes dessa massa d'água rompem a pycnoclina, aumentando a produtividade na zona eufótica (Gaeta; Brandini, 2006). A produção primária na região é marcada pela variabilidade temporal e espacial, as taxas são mais elevadas durante a primavera e verão, a partir da intrusão da ACAS (Castro *et al.*, 2006).

2.2 Delineamento amostral

As coletas foram realizadas em um cruzeiro oceanográfico, a bordo do NOc Alpha Crucis, durante o período de primavera austral (NOV/2013). Foi realizado um transecto perpendicular à costa (entre as isóbatas de 100 e 3500 metros) em 27,2°S (Fig. 2). Foram investigadas dez estações amostrais (E) em estratos verticais distintos distribuídos até 200 m de profundidade (superfície, máximo subsuperficial de clorofila-*a*, e camada inferior). Utilizou-se garrafas de Niskin do sistema CTD/Roseta para coleta de água em profundidades definidas com base em perfis prévios de clorofila-*a* na coluna d'água, registrados com um sensor de fluorescência Teledyne®.

Analisou-se os seguintes descritores da estrutura físico-química da coluna d'água: temperatura, salinidade, macronutrientes inorgânicos dissolvidos e concentração total e biodisponível de ferro dissolvido, além da abundância total de microfitoplâncton e de *Pseudo-nitzschia* spp., e as concentrações de ácido domóico intra- e extra-celulares.

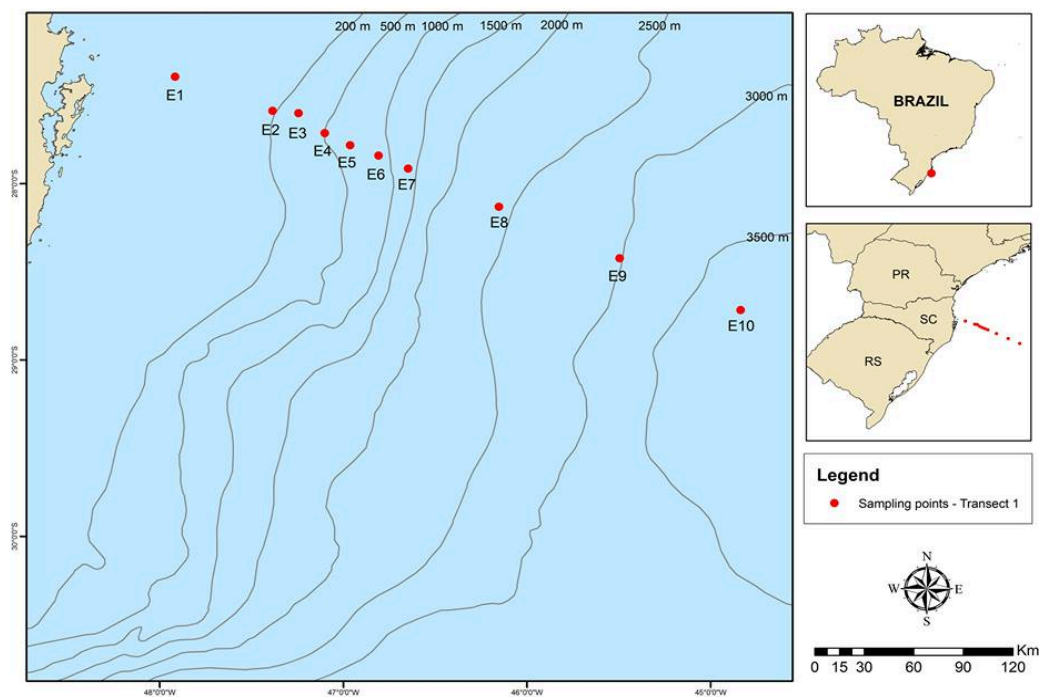


Fig. 2 Mapa de localização das estações amostrais em transecto perpendicular à costa de Santa Catarina, Brasil (27,2°S).

2.3 Descritores da estrutura físico-química da coluna d'água

As amostras para a análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos foram filtradas em filtros de microfibras de vidro Whatman GF/C e os teores de nitrato, nitrito, silicato e fosfato foram determinados segundo o método colorimétrico descrito por Grashoff *et al.* (1983) por espectrofotometria na região visível (UV-1601, Shimadzu). Os dados de temperatura e salinidade foram registrados por um sensor CTD Teledyne® (“*Conductivity, Temperature, Depth*”) acoplado à roseta.

Para a determinação do ferro dissolvido foi empregada a técnica de voltametria de redissolução catódica adsortiva (AdCSV) com varredura de onda quadrada, na presença do ligante (complexante orgânico) 2-3-dihidroxi-naftaleno (DHN J. T. Baker®), do tampão ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-propanossulfônico (HEPPS, pH 8, J. T. Baker®) e do oxidante e intensificador de sinal Bromato de Potássio (KBrO₃, J. T. Baker®). O método

foi adaptado de Obata e Van den Berg (2001) para determinação de ferro dissolvido na água do mar (ver Apêndice D para detalhes da metodologia). A vidraria utilizada foi descontaminada com água ultra-pura (Milli-Q[®]), emersa em banho ácido (HNO₃, 5 mol.L⁻¹) por cinco dias e enxaguada por diversas vezes em água ultra-pura (Milli-Q[®]). Os reagentes foram descontaminados com MnO₂ 0,05 mol.L⁻¹ e filtrados (nitrato de celulose, porosidade 0,2 μm). O equipamento utilizado para as análises foi um Processador Polarógrafo 663 VA (Metrohm) com célula eletroquímica convencional, composta por um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3M), contra eletrodo de platina e eletrodo de trabalho de mercúrio. O ferro dissolvido total foi determinado após filtração das amostras (acetato de celulose, porosidade 0,2 μm), a fim de remover o material particulado e coloidal, acidificação a pH 2,5 (ácido clorídrico suprapuro Merck[®]), seguida de exposição à radiação UV por um período de 6 h (para destruição dos complexos metálicos fortes) e diluição em água ultra-pura (Milli-Q[®]) em um fator de 10. As concentrações foram determinadas a partir da equação da reta padrão de cada amostra, construída com concentrações de 0, 5, 10 e 15 nmol.L⁻¹. A fração biodisponível foi determinada após o procedimento de filtração, somente. Desta forma, procurou-se estimar a fração correspondente aos íons livres e aos que foram descomplexados pela adição do ligante orgânico sintético. O termo “biodisponível” aqui utilizado, portanto, refere-se à concentração da alíquota não digerida, posto que a especiação química não foi completa. A exemplo do ferro total, também foi uma reta padrão para cada amostra a partir da adição de 0, 5, 10 e 15 nmol.L⁻¹ da solução de ferro.

Para ambas análises, foram utilizadas alíquotas de 10 mL e adicionados 20 μL de DHN 20 mmol.L⁻¹, 0,5 mL de Bromato de Potássio 0,4 mol.L⁻¹ e 0,5 mL de HEPPS 1 mol.L⁻¹ (pH 8). Uma solução estoque de ferro 0,5 μmol.L⁻¹ foi preparada a partir de um padrão analítico de 1000 mg.L⁻¹ (Merck[®]). O tempo de purga inicial foi 300 s, tempo de

deposição 60 s (-0,1 V), tempo de equilíbrio 10 s e potencial variando de -0,1 a -0,8 V. Considerou-se como limite de detecção (L. Q.) o valor do branco de análise. Na análise de ferro dissolvido total (dFe) e biodisponível, todas as retas padrão apresentaram coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95 e o valor do L.D. = 6,2 nmol.L⁻¹.

2.4 Microfitoplâncton: identificação e abundância

Um volume conhecido (10-20 L) das amostras superficiais e do máximo subsuperficial de clorofila-*a* foi concentrado por filtração reversa em peneira confeccionada com malha de nylon de 10 µm. Parte do material foi reservado em frascos de vidro âmbar e fixada com solução de lugol neutro em concentração final de 1%, para posterior identificação e determinação da abundância total do microfitoplâncton e de *Pseudo-nitzschia* spp.. com microscópios invertidos Olympus IX-70 e Zeiss Axiovert 40C, seguindo Utermöhl (1958). Pelo menos 200 células foram contadas por amostra para deixar os erros de estimativa inerentes ao método em um valor aceitável (Venrick, 1978).

Outra fração foi distribuída por micropipetagem seriada em placas de cultivo contendo meio de cultura *f/2* (Guillard, 1975), mantidas em estufa incubadora sob condições constantes de temperatura, salinidade, irradiância e foto-período para posterior isolamento e cultivo de células de *Pseudo-nitzschia* spp. Esse material foi utilizado para a identificação taxonômica por microscopia eletrônica de transmissão (Jeol[®] JMI200 EXII), utilizando-se a técnica de Hasle e Fryxell (1970) para limpeza e preparação de lâminas permanentes. Além das amostras provenientes do embarque, foi cultivada uma cepa de *Pseudo-nitzschia multiseries* comprovadamente tóxica, proveniente da costa da Califórnia, EUA (cedida gentilmente pelo Monterey Bay Aquarium Research Institute – MBARI), para a o experimento.

2.5 Experimento in vitro

Para o experimento foi utilizada uma cepa tóxica de *P. multiseriis* cultivada por seguidas gerações em meio f/2 (Guillard, 1975) adaptado (concentração de metais a 5% do protocolo original), para diminuir a contaminação por Fe nos tratamentos amostrais. Durante o período do experimento, as células foram mantidas em água marinha artificial contendo a concentração de sais do meio *Aquil* (Sunda *et al.* 2004) e de nutrientes, vitaminas e metais traço (exceto ferro) do meio f/2 + Si (Guillard, 1975). O meio sintético contendo inicialmente sais e nutrientes foi preparado em água ultra-pura (Milli-Q[®]), filtrado em Resina Chelex 100 (de acordo com o procedimento de Price *et al.* (1989)), e esterilizado em micro-ondas em frascos de vidro (Keller *et al.*, 1988). Posteriormente, o meio foi enriquecido com soluções de vitaminas e EDTA-metais traço, com exceção do ferro. A solução de Fe-EDTA foi adicionada separadamente, em diferentes concentrações, para criar os tratamentos experimentais: *Fe-suficiente* e *Fe-deficientes*. Para o tratamento *Fe-suficiente*, foi preparada a concentração de ferro padrão indicada no meio f/2 + Si ($S = 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e para os demais tratamentos *Fe-deficientes* o micronutriente foi adicionado nas seguintes concentrações finais: D1 = 0 nmol.L^{-1} ; D2 = $1,7 \text{ nmol.L}^{-1}$ e D3 = 10 nmol.L^{-1} . Para cada tratamento, foram quatro réplicas em frascos individuais contendo 400 mL do meio de cultivo, inoculados com 80 ml do cultivo de *P. multiseriis* (fase estacionária) mantido por uma geração em meio f/2 + Si sem adição de ferro.

Amostras de 30 mL para análise da produção de AD foram tomadas em quatro momentos distintos ao longo da curva de crescimento: início e fim da fase exponencial (dias 4 e 8), fase estacionária (dia 17) e fase de declínio (dia 30), cujas durações foram determinadas a partir de uma curva de crescimento prévia. Adicionalmente, alíquotas de 10 mL foram coletadas a cada 2-3 dias, e preservadas em solução de lugol neutro (1%)

para determinação da densidade de células vivas e mortas (células.L⁻¹), por meio de contagens em microscópio ótico em lâminas de Sedgewick-Rafter com quadrículas, contando um mínimo de 200 células por amostra.

2.6 Ácido Domóico

As análises de AD foram efetuadas por cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta (LC-UVD), de acordo com a metodologia descrita por Mafra *et al.* (2009) (ver Apêndice D para detalhes da metodologia). Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida Chromaster VWR Hitachi acoplado a um detector de foto diodo modelo 5430. Como fase estacionária usou-se uma coluna C18 Purospher®STAR RP-18 endcapped, e a fase móvel foi composta por: A) água acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e B) acetonitrila com 0,1% de TFA. Foram realizadas injeções de 80 µL de amostra, no método de eluição por gradiente (de 5 a 25% de B em 25 min; mantendo por 2 min e retornando a 5% de B em 3 min).

Alíquotas de 100 mL dos concentrados de campo foram gentilmente filtradas (Millipore, porosidade 0,22 µm) e os filtros expostos ao contato de sonda de ultrassom para liberação do conteúdo intra-celular. Posteriormente, filtro e filtrado foram analisados para determinação da concentração de AD nas frações particulada e dissolvida. Para as amostras do experimento, utilizou-se alíquotas de 30 mL, seguindo o mesmo procedimento. Todas as amostras foram pré-concentradas em cartuchos C18 para aumentar o poder de detecção de baixos níveis de toxina. A quantificação do ácido domóico foi a partir do método de padrão externo com soluções de calibração de AD nas concentrações 5, 10, 50, 100, 250 e 300 ng.ml⁻¹. Os limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q.) foram calculados estatisticamente pelas fórmulas $L.D. = [(3*DP)/b]$ e $L.Q. = [10*DP/b]$, onde “DP” é o desvio padrão da área do pico a partir de repetidas análises da concentração

mínima mensurável de AD em uma solução padrão (n=5) e “b” é a inclinação da curva de calibração (adaptado de Mafra *et al.*, 2009).

2.7 Tratamento dos dados e análises estatísticas

Os mapas de interpolação foram elaborados no programa Surfer 11.0[®], utilizando o método vizinho natural, e os gráficos de barra em Excel 2010[®]. Os demais gráficos e análises no ambiente R 2.13.1. (R *development core team*, 2012), com auxílios dos pacotes GAD (Sandrini-Neto; Camargo, 2010) e vegan (Oksanen *et al.*, 2009). Foi empregada uma técnica multivariada (i) para os dados coletados *in situ* e univariada (ii) para os resultantes do experimento *in vitro*: (i) Regressão Múltipla, a fim de relacionar os dados abióticos e biológicos; (iii) Análises de Variância (ANOVA) unifatoriais para comparar as concentrações de ácido domóico intra e extra-celular entre os tratamentos amostrais. Foi realizada uma ANOVA para cada tempo da curva de crescimento: início e fim da fase exponencial, fase de estabilização e de declínio. A normalidade e homocedasticidade dos dados, pressupostos da análise de variância, foram testadas pela análise de Shapiro Wilk e Bartlett e, quando não atendidas, os dados foram transformados por log(x) ou raiz quadrada.

As regressões múltiplas foram realizadas utilizando as abundâncias de microfitoplâncton total, diatomáceas, dinoflagelados e *Pseudo-nitzschia* spp. como variáveis independentes e os dados ambientais como dependentes (temperatura, salinidade, nitrato + nitrito, fosfato, silicato, ferro dissolvido total e biodisponível). Os melhores modelos foram selecionados a partir do procedimento automático de step do programa R, o qual utiliza o *Akaike Information Criterion* (AIC) como um critério de inclusão de variáveis, sendo o modelo com menor valor de AIC considerado o melhor (Borcard *et al.*, 2011). Os modelos viáveis são selecionados de acordo com as *AIC Differences* ($\Delta_i = AIC_i - AIC_{min}$, onde AIC_i é o valor do modelo i e o AIC_{min} é o valor do melhor modelo).

Valores de $\Delta i < 2$ dão substancial suporte para um modelo candidato enquanto valores maiores indicam que o modelo é improvável (Burnham; Anderson, 2010).

3 Resultados

3.1 Descritores da estrutura físico-química da coluna d'água

A média de temperatura para a coluna d'água até 200 m de profundidade foi de 21,6 °C (mín. 13,9 e máx. 23,7° C), com um gradiente dos valores mais elevados para os mínimos a partir da superfície (Fig. 3a). A salinidade média na mesma região foi de 36,5 (mín. 34 e máx. 37), aumentando com o distanciamento da costa (Fig. 3b). A distribuição caracteriza a presença da AP em amostras das estações E1 e E2 (mais próximas à costa), AT em aproximadamente 80% das amostras investigadas e da ACAS nas amostras mais profundas das estações E1/E2/E3/E8/E9/E10. As concentrações médias dos macronutrientes para as profundidades analisadas (5 a 200m) foram de 2,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para silicato (mín. 1,5 e máx. 7,6) (Fig. 4a); 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para fosfato (mín. 0,1 e máx. 2,4) (Fig. 4b); 1,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (mín < L.D. e máx. 15,4) para nitrato (Figura 4c) e 0,09 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (mín. 0,02 e máx. 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) para nitrito (ver apêndice A para resultados detalhados). O silicato apresentou uma diminuição nítida das concentrações com o afastamento da costa, os maiores valores são encontrados nas estações E1 e E2, onde está localizada a AP próximo à superfície e a ACAS abaixo. Para o fosfato e nitrato, por outro lado, valores mais elevados estão relacionados principalmente à intrusão da ACAS.

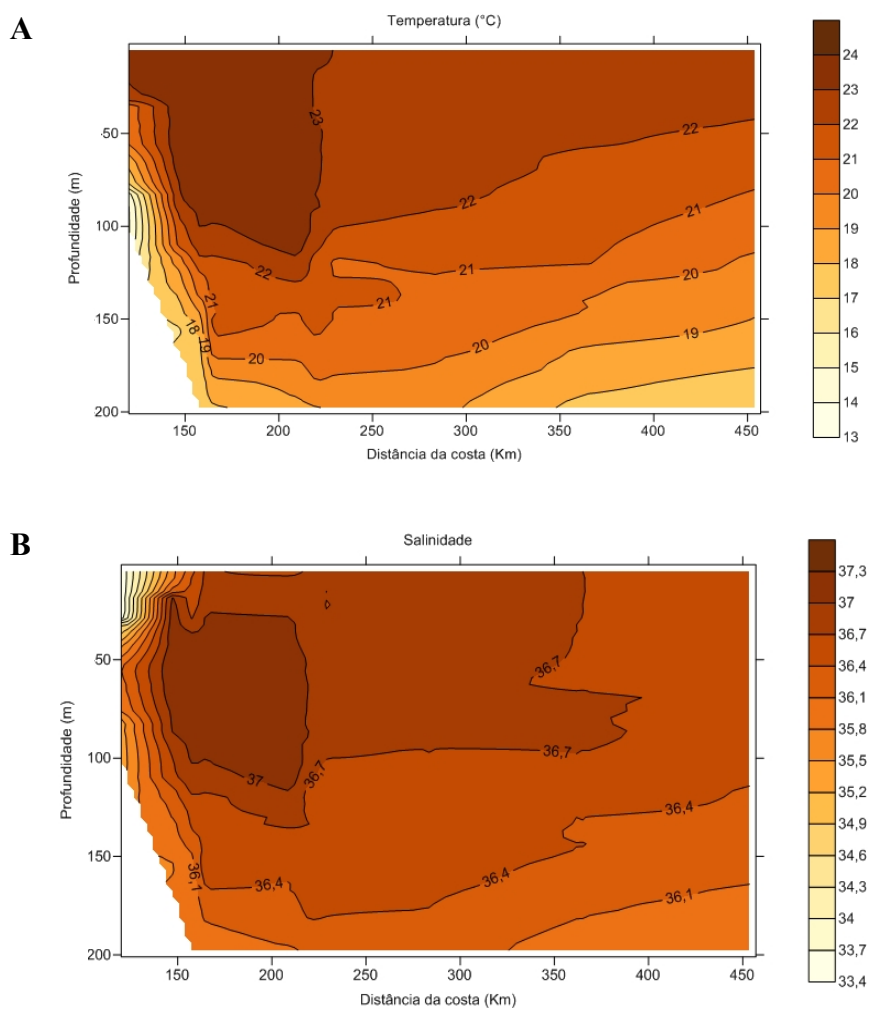


Fig. 3: Distribuição de (A) temperatura (°C) e (B) salinidade para o transecto perpendicular à costa de Santa Catarina, Brasil (27,2 °S).

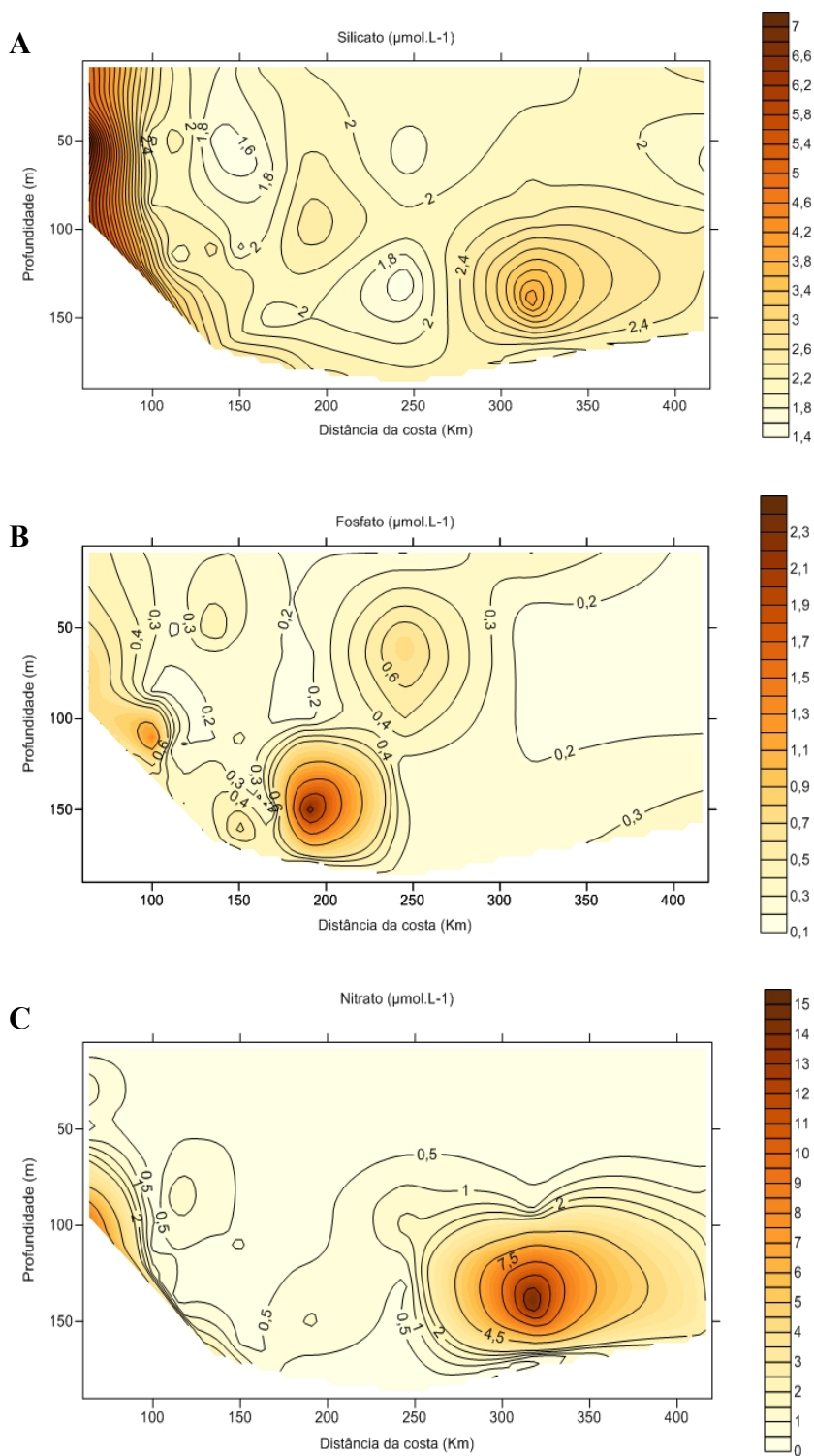


Fig. 4: Distribuição de macronutrientes inorgânicos dissolvidos: silicato (A), fosfato (B) e nitrato (C) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para o transecto perpendicular à costa de Santa Catarina, Brasil (27,2°S).

As concentrações de dFe foram elevadas e variaram de 34 a 619 nmol.L⁻¹ (média de 131 nmol.L⁻¹). Os valores, no geral, foram mais elevados nas estações mais próximas à costa e à superfície, diminuindo gradativamente com o afastamento destas (Fig. 5a). Para o ferro dissolvido biodisponível (dFe biodisponível), as concentrações variaram de < L.D. a 16,9 nmol.L⁻¹, com média de 6 nmol.L⁻¹, o que representa ~5% do total (Fig. 5b). Os resultados não seguiram claramente a tendência do ferro total, no entanto, as maiores concentrações também foram encontradas em amostras costeiras ou superficiais (ver apêndice B para resultados detalhados).

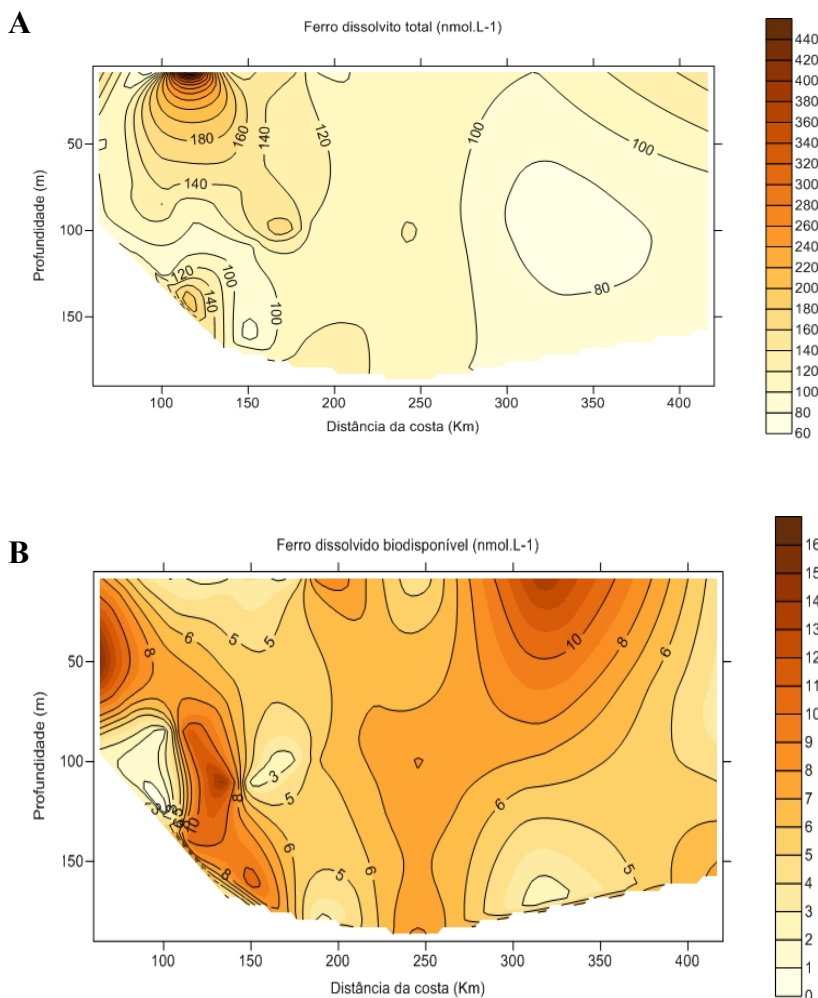


Fig. 5: Distribuição de (A) ferro dissolvido total e (B) ferro dissolvido biodisponível (nmol.L^{-1}) para o transecto perpendicular à costa de Santa Catarina, Brasil ($27,2^{\circ}\text{S}$).

3.2 Microfitoplâncton

A abundância total do microfitoplâncton variou de 190 a 2918 células. L^{-1} (ver apêndice C para resultados detalhados). Como esperado, os valores mais elevados foram encontrados nas profundidades de máximo subsuperficial de clorofila-*a*.. Houve também um decréscimo bem marcado na densidade celular com o distanciamento da costa (Fig. 7a). As diatomáceas dominam o microfitoplâncton nos máximos subsuperficiais de clorofila-*a* entre as estações E1 e E6 em relação à superfície, cuja abundância foi baixa ao longo de todo o transecto. Os táxons mais frequentes em todas as amostras e os mais

abundantes entre diatomáceas e dinoflagelados estão apresentados na Tab. 1. A abundância média de diatomáceas foi de 435 cél.L⁻¹, enquanto a de dinoflagelados 254 cél.L⁻¹, havendo uma inversão de predominância entre estes grupos das estações costeiras para oceânicas (Fig. 7a). *Pseudo-nitzschia* spp. foi o quinto táxon mais abundante de diatomáceas, representando apenas 3,1 % da abundância total de microfitoplâncton, com frequência de 60%. A sua abundância variou de 0 a 183 cél.L⁻¹, sendo mais elevada nas profundidades de máximo subsuperficial de clorofila (Fig. 7b).

Tabela 1: Táxons de microfitoplâncton mais frequentes na margem continental de Santa Catarina (%) e táxons mais abundantes dentre diatomáceas e dinoflagelados (média dos pontos amostrados em cél.L⁻¹).

Táxons mais frequentes		Táxons mais abundantes de diatomáceas		Táxons mais abundantes de dinoflagelados	
	%		Cél.L ⁻¹		Cél.L ⁻¹
<i>Gyrodinium</i> spp.	95	<i>Chaetoceros</i> spp.	63	<i>Gymnodinium</i> spp.	40
<i>Thalassiosira</i> spp.	90	<i>Nitzschia</i> spp.	57	Peridiniales	45
<i>Nitzschia</i> spp.	90	<i>Thalassionema nitzschioides</i>	52	<i>Gyrodinium</i> spp.	34
<i>Prorocentrum gracile</i>	90	<i>Thalassiosira</i> spp.	45	<i>Oxytoxum</i> spp.	32
<i>Chaetoceros</i> spp.	85	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	23	<i>Prorocentrumscutellum</i>	16

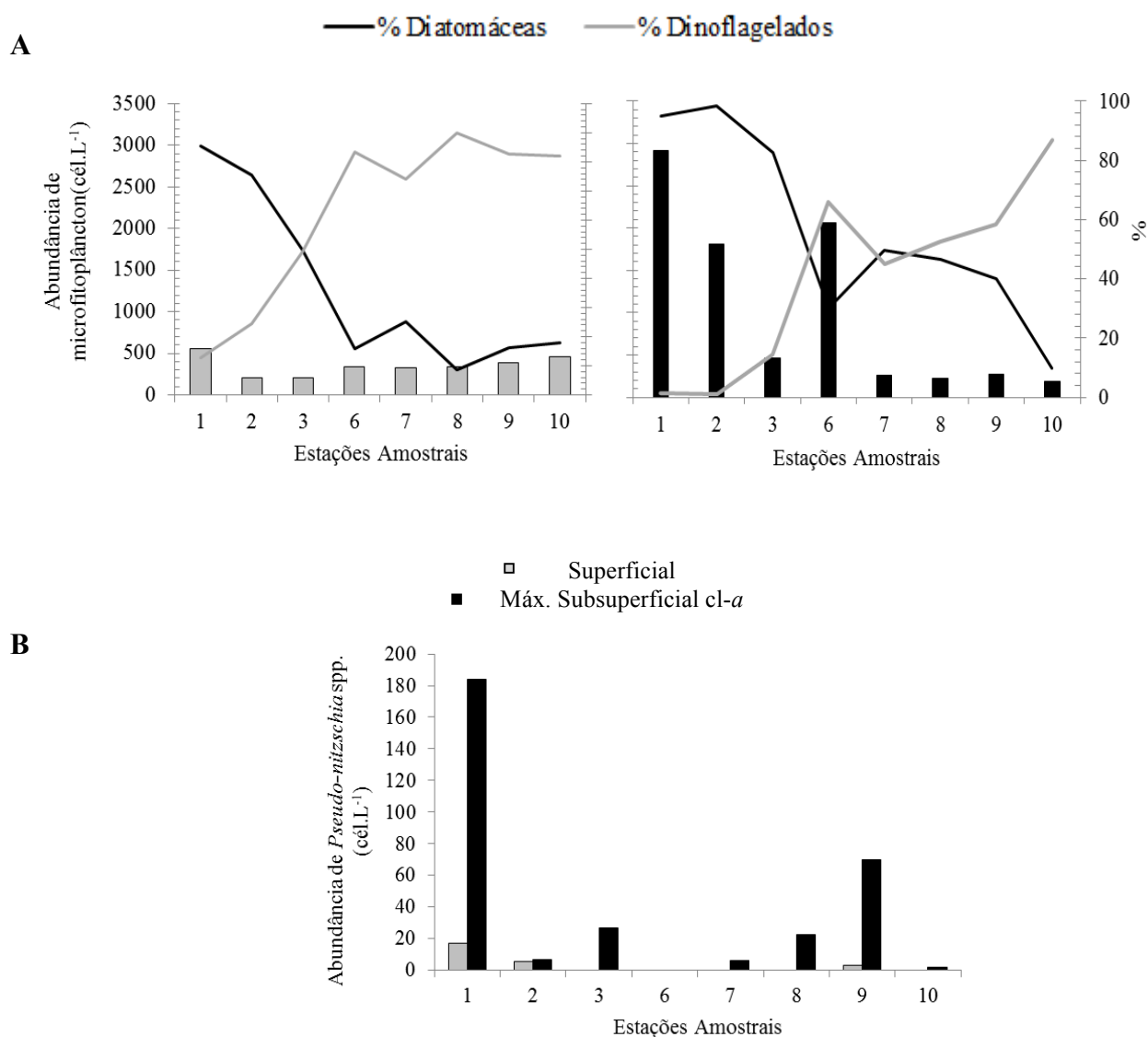


Fig. 7: (A) Abundância total de microfitoplâncton (cél.L⁻¹), representada por barras, e porcentagem de diatomáceas e dinoflagelados, representada por linhas. (B) Abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. (cél.L⁻¹). *As estações amostrais 4 e 5 foram desconsideradas por problemas no processamento do material coletado.

Foram identificadas três espécies de *Pseudo-nitzschia* na margem continental de Santa Catarina em novembro/2013. *Pseudo-nitzschia americana* (Fig. 8 A e B) e *delicatissima* (Fig. 8 C e D), identificadas por microscopia eletrônica de transmissão, estavam presentes em cultivos provenientes da área oceânica, a 420 e 253 km da costa, respectivamente. A *pseudo-nitzschia pungens* (Fig. 8 E e F), identificada por microscopia

óptica a partir de amostras fixadas, ocorreu em diversas estações amostrais, inclusive próxima à costa.

Os níveis de AD, investigados nas frações particulada e dissolvida, resultaram em valores abaixo do limite de quantificação para todas as estações amostrais. Para a análise de ácido domóico no ambiente, a curva de calibração apresentou alto coeficiente de determinação ($R^2 > 0,999$) e os limites de detecção e quantificação foram baixos: L.D. = 0,349 ng/ml e L.Q. = 1,162 ng/ml (correspondente a 93 pg na coluna cromatográfica para uma injeção de 80 μ L).

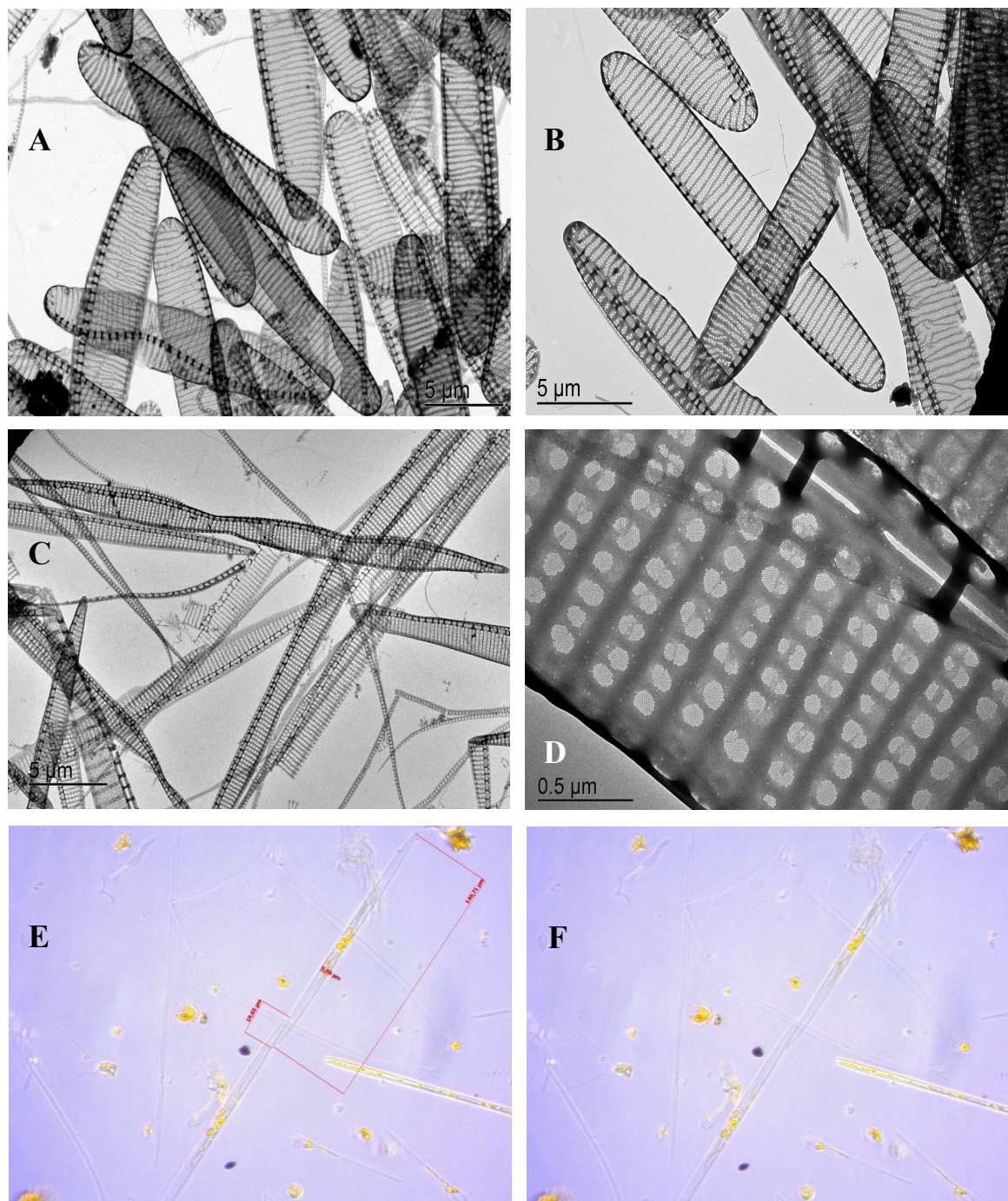


Fig 8: A/B. *Pseudo-nitzschia americana*; C. *Pseudo-nitzschia delicatissima* e D. Em detalhe o padrão de perfuração das aréolas da frústula, característico da espécie; E/F. *Pseudo-nitzschia pungens*.

Os modelos lineares de regressão múltipla considerados viáveis pelo critério de seleção de Akaike ($\Delta i < 2$) são apresentados abaixo (Tab. 2). Os resultados mostram quais combinações de parâmetros explicam ($> R^2$) a distribuição da abundância total de microfitoplâncton, abundância de *Pseudo-nitzschia* spp., diatomáceas e dinoflagelados.

Tabela 2: Modelos lineares de regressão múltipla que apresentaram $\Delta i < 2$.

Modelo	AIC	Δi	R^2
(1) Abundância total ~ Silicato + Salinidade + Ferro dissolvido biodisponível	204,53	0	0,7
(2) Abundância total ~ Silicato + Salinidade + Ferro dissolvido biodisponível + NO ₃ + NO ₂	206,11	1,58	0,7
(1) Abundância de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. ~ Silicato + Salinidade + Nitrogênio inorgânico dissolvido	93,97	0	0,9
(2) Abundância de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. ~ Silicato + Salinidade + Nitrogênio inorgânico dissolvido + Temperatura	94,12	0,15	0,9
(3) Abundância de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. ~ Silicato + Salinidade + Nitrogênio inorgânico dissolvido + Temperatura + Ferro dissolvido biodisponível	95,27	1,3	0,9
(1) Abundância de Diatomáceas ~ Silicato + Salinidade	196	0	0,7
(2) Abundância de Diatomáceas ~ Silicato + Salinidade + Nitrogênio inorgânico dissolvido + Temperatura	197,09	1,09	0,7
(1) Abundância de Dinoflagelados ~ Nitrogênio Inorgânico Dissolvido	186,43	0	0,06
(2) Abundância de Dinoflagelados ~ Nitrogênio Inorgânico Dissolvido + Salinidade	186,43	0,	0,2
(3) Abundância de Dinoflagelados ~ Nitrogênio Inorgânico Dissolvido + Salinidade + Ferro dissolvido biodisponível	188,18	1,59	0,2

3.3 Experimento in vitro

O efeito dos diferentes níveis de ferro nas taxas crescimento, produção e liberação de AD em culturas de *P. multiseriis* durante o experimento está representado na Fig 9. Os quatro tratamentos amostrais resultaram em abundâncias celulares similares durante todas as fases da curva, não havendo diferenças significativas entre os cultivos expostos a condições *Fe-suficientes* e *Fe-deficientes* (Tab. 3). As concentrações intracelulares de AD não diferiram estatisticamente entre os tratamentos no início da fase exponencial (dia 4) ($p = 0,06$), provavelmente porque os valores ainda eram muito baixos. No final dessa fase (dia 8), os tratamentos apresentaram variabilidade significativa, sendo os maiores conteúdos de toxinas encontrados nas células *Fe-suficientes* em relação aos demais tratamentos ($p = 0,004$). Na fase estacionária de crescimento (dia 17), não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p = 0,06$), mas os valores permaneceram mais elevados no tratamento *Fe-suficiente* (Fig. 9b). Durante a fase de declínio (dia 30), os conteúdos de toxina voltaram a ser significativamente mais elevados no tratamento *Fe-suficiente* ($p = 0,002$). Para as concentrações de AD dissolvido no meio de cultivo, não houve diferença significativa ($p = 0,9$) entre os tratamentos durante a fase exponencial (dias 4 e 8), diferente das fases estacionária ($p = 0,02$) e declínio ($p = 0,03$), quando as taxas de liberação de AD pelas células *Fe-suficientes* foram significativamente mais elevadas do que as demais (Fig. 9, Tab. 3).

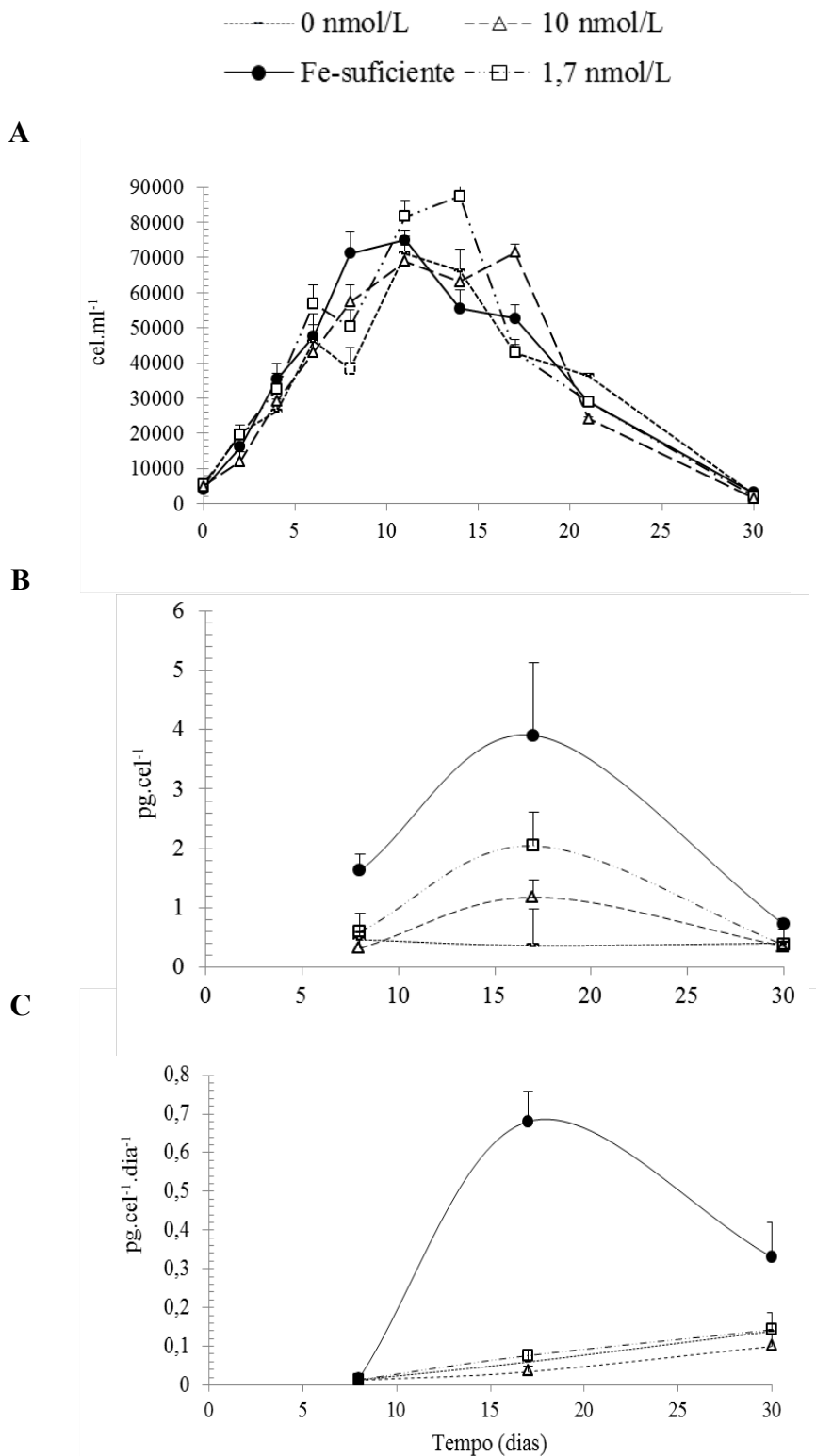


Fig. 9: (A) Taxas de crescimento referentes aos quatro tratamentos amostrais. (B) Concentração de ácido domóico intracelular (pg.cel^{-1}) nos tratamentos amostrais ao longo do tempo. (C) Taxa de liberação de ácido domóico por dia ($\text{pg.cel}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) nos tratamentos amostrais ao longo do tempo. As barras correspondem ao erro padrão.

Tabela 3: Resultados da análise de variância (ANOVA) para o conteúdo intra-celular (“Particulado”) e a taxa de liberação (“Dissolvido”) de ácido domóico entre os tratamentos amostrais *Fe-deficientes* e *Fe-suficiente* para as fases exponencial (dia 4 e 8), estacionária (dia 17) e de declínio de crescimento (dia 30). Destacados em negrito os resultados de *p* valor significativos (<0,05). G.L = Grau de liberdade, M.Q. = Média dos quadrados.

	G. L.	M. Q.	F	<i>p</i>
<i>Particulado</i>				
D4	3	0,02	3,896	0,0551
Resíduo	8	0,005		
D8	3	2,25	8,41	0,0043*
Resíduo	10	2,67		
D17	3	0,81	2,961	0,0659
Resíduo	12	0,27		
D 30	3	0,43	8,851	0,00145*
	12	0,048		
<i>Dissolvido</i>				
D4	3	2,3.10 ⁻⁵	0,102	0,946
Resíduo	6	2,3.10 ⁻⁵		
D8	3	1,1.10 ⁻⁵	0,082	0,968
Resíduo	9	1,3.10 ⁻⁴		
D17	3	7,34	5,98	0,0188*
Resíduo	8	1,23		
D30	3	0,96	4,32	0,0303*
Resíduo	11	0,22		

4 Discussão

4.1 Nutrientes inorgânicos dissolvidos no ambiente e seu papel na distribuição do microfitoplâncton

As concentrações de silicato são variáveis no sistema marinho, principalmente quando consideramos margens continentais e águas superficiais superficiais (até 200 m), podendo variar de 1 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (nas regiões costeiras) (Braga; Niencheski, 2006). Esse macronutriente é um importante traçador de aporte continental, apresentando decréscimo das concentrações com o aumento da salinidade, resultado consistente ao encontrado por Ciotti *et al.* (1995); Braga *et al.* (2008) e Niechenski *et al.* (2015) (Fig. 4a). Essa co-

variância provavelmente explica a alta correlação encontrada na regressão múltipla. Os maiores valores foram encontrados nas estações E1 e E2, onde identificou-se a presença da AP nas amostras mais superficiais, a qual pode apresentar concentrações relativamente elevadas de SiO_4 , por se tratar da mistura entre a AT, oligotrófica, e a AC, rica em aportes continentais de nutrientes. Para o fosfato, os valores nas águas acima de 200 m de profundidade normalmente são bastante homogêneos, como observamos nos resultados. Valores bastante altos ($>1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), como o encontrado em 150 m de profundidade a ~200 km da costa, são associados à intrusão das águas frias ricas em nutrientes da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (Braga, Niencheski, 2006). Os valores de nitrato são relativamente baixos, em relação a regiões costeiras, pois em mais de 80% da área investigada há o domínio da AT. No entanto, observou-se uma intrusão de fundo significativa a ~350 km de distância da costa, confirmando a importância dos aportes provenientes da ACAS na região.

As fontes mais relevantes para a entrada de ferro dissolvido na margem continental do Atlântico Sul são os aportes fluviais, atmosféricos e a descarga de água subterrânea ("*Submarine Groundwater Discharge*", SGD) (Window *et al.*, 2006; Niencheski *et al.*, 2015). A bacia de drenagem do Prata é a segunda maior da América do Sul e atinge níveis máximos de descarga nos meses de outubro-novembro (Depetris; Paolini, 1991). Estima-se que o fluxo de ferro pelo rio Paraná, que representa cerca de 90% do Rio da Prata, é de $\sim 1,2 \times 10^6$ mol/dia (Window *et al.*, 2006). Os aportes atmosféricos também são significativos na camada superficial, pois 4,3% da crosta é composta por ferro e 1 a 10% desse montante é solúvel (Zhuang *et al.*, 1990). As principais fontes de partículas minerais atmosféricas são as regiões áridas e semiáridas dos continentes Americano e Africano (Middleton, 1995). Próximo à costa eles são ainda mais intensos, relacionados à influência antrópica, pelo aporte de grandes centros urbanos e industriais (como São Paulo, Rio de

Janeiro e Buenos Aires) (Evangelista *et al.*, 2010). Estima-se um fluxo de $\sim 3,8 \times 10^6$ mol/dia de dFe atmosférico para todo o Atlântico Sul (Duce; Tindale, 1991). A descarga pela SGD através dos sedimentos é importante não apenas pela magnitude ($\sim 3,2 \times 10^5$ mol/dia para a plataforma continental no Atlântico Sul), mas pela penetração do micronutriente a mais de 600 km da costa, podendo ser a fonte mais significativa de entrada nas regiões afastadas, e essencial para a manutenção da produtividade nesses ambientes (Window *et al.*, 2006, Niencheski *et al.*, 2015). Niencheski *et al.*, (2015) mostraram, através da atividade do Rádio-228, um bom traçador de contribuição da SGD em águas costeiras, que esta é a principal fonte de ferro na região da Plataforma Continental Sul.

Os aportes continentais podem gerar grandes variações espaciais e temporais na concentração do ferro dissolvido nas regiões de margem continental (Wells, 1999) e os valores são normalmente de 100 a 1000 ordens de magnitude maiores em relação aos encontrados nas regiões oceânicas (Sunda; Huntsman, 1995). Em plataformas continentais, entre 0-100 m de profundidade, a concentração média global de dFe é de $0,66 \pm 1,14$ nmol (n = 382) (Tagliabue *et al.*, 2012). Apesar do número de amostragens de tal levantamento global ser considerado alto para uma área relativamente pequena do oceano, ele incluiu dados de coletas repetidas em algumas regiões particulares, como o Mar de Ross, e, portanto, pode não refletir as condições do Atlântico Sul. Os valores de dFe encontrados nesse estudo são extremamente elevados em relação aos registrados na maioria dos estudos feitos na margem continental do Oceano Atlântico (Tab. 4) e cerca de 100 vezes maiores do que a média para as regiões oceânicas do Atlântico Sul ($<1 \text{ nmol.L}^{-1}$). (Vink; Measures, 2001; Bergquist; Boyle, 2006). Os valores são semelhantes aos encontrados por Window *et al.* (2006) em transectos perpendiculares à Lagoa dos Patos (RS), região costeira. No entanto, a região abordada nesse estudo não está localizada em região costeira, mas de

margem continental e oceânica contígua, dominada pelas águas tropicais oligotróficas da Corrente do Brasil, distantes da SDG e drenagem do Rio da Prata. Dessa forma, acredita-se que os valores elevados podem estar relacionado a um processo de contaminação durante a amostragem no navio, visto que não foram seguidas todas as recomendações do GEOTRACES (Cutter *et al.*, 2010), e a própria embarcação pode contribuir como fonte de Fe.

Tabela 4: Comparação das concentrações de ferro dissolvido total (nmol.L^{-1}) com outros estudos realizados em margens continentais do Oceano Atlântico. Entre parênteses está representada a amplitude dos dados.

Localização	Profundidade	dFe Total nmol.L^{-1}	Metodologia	Referência
Transecto 27 °S; 60-420 km da costa Atlântico Sul	0 – 200m	méd. 131,3 (34 - 619)	Voltametria de redissolução catódica adsortiva (AdCSV)	<i>Presente estudo</i>
Transecto 31 °S 0-90 km da costa Atlântico Sul	Superficial	(5-1000)	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (AA)	Windom <i>et al.</i> (2006)
24,5°S; 36°W Atlântico Sul	Superficial (0-52 m) Picloclina (60–550 m)	méd. 0,37 méd. 0,27	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	Bergquist,Boyle (2006)
15°S; 0°W Atlântico Sul	5 – 10 m	méd. 0,32 (0,5 – 10)	Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	Powell <i>et al.</i> (1995)
Baía de Delaware ao Mar do Sargasso Atlântico Norte	5 – 10 m	méd. 2,9 (0,3 – 14)	Voltametria de redissolução catódica adsortiva (AdCSV)	Wu; Luther (1996)
Plataforma Continental (levantamento global; $n = 382$)	0-100m	méd. 0,61± 1,14	Diversas	Tagliabue <i>et al.</i> (2012)

De acordo com Johnson *et al.* (1999), uma razão de C/Fe de 27.000 é estimada para o crescimento de culturas de diatomáceas costeiras em taxas máximas. Desta forma, são necessários 5 nmol de Fe para cada 20 μmol de nitrato ($20 \mu\text{mol N} \times 106 \mu\text{mol C}/16 \mu\text{mol N} \times 1 \mu\text{mol Fe}/27,000 \mu\text{mol C}$) para que as diatomáceas consumam todo o nitrato disponível. Considerando-se as profundidades das estações em que houve análise de nitrato e ferro dissolvido biodisponível concomitantemente e estabelecendo-se a razão acima, conclui-se que não houve limitação da produtividade por dFe durante o período de

amostragem. As taxas de crescimento do experimento *in vitro*, em que foram testados níveis de ferro semelhantes aos encontrados em campo, também permitem concluir isso.

O modelo linear de regressão múltipla que melhor explicou a distribuição da abundância total de microfitoplâncton foi composto pelas variáveis abióticas salinidade, silicato e ferro dissolvido biodisponível. Há uma forte co-variância entre salinidade e o silicato e a inversão da predominância de espécies de diatomáceas nas regiões próximas à costa (E1 a E6), com águas bem misturadas e ricas em nutrientes, para dinoflagelados, capazes de se adaptar à ambientes estratificados e se locomover em busca de recursos (Smayda; Reynolds, 2001). Como a abundância de diatomáceas, no geral, é mais elevada (ver apêndice C), o silicato prevaleceu como nutriente mais significativo na relação com a abundância do microfitoplâncton. O dFe biodisponível aparece como um fator importante ao crescimento do microfitoplâncton como um todo, apesar de não limitar a produtividade na região. A intensa formação de complexos orgânicos em regiões costeiras, pouco ou não incorporados pelo microfitoplâncton, justifica a sua relevância em detrimento do dFe total.

Os fatores que mais afetaram a distribuição das diatomáceas, separadamente, foram silicato e salinidade. A sílica dissolvida desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dessas microalgas, como uma necessidade vital à formação das frústulas (Reynolds, 2006). As diatomáceas dominam o microfitoplâncton nos máximos subsuperficiais de clorofila-a (MSC) entre as estações E1 e E6 em relação à superfície, característica comum em águas oligotróficas, onde as camadas superiores da zona eufótica apresentam depleção de nutrientes e um MSC ocorre dentro da picnoclina, associado a uma nutriclina. A intrusão da ACAS fertiliza a base da zona eufótica onde o fitoplâncton se desenvolve melhor do que nas camadas da zona de mistura pobres em nutrientes, apesar da maior disponibilidade de luz (Brandini, 1990b).

Para a abundância específica de *Pseudo-nitzschia* spp., por outro lado, os fatores principais foram nitrogênio inorgânico dissolvido (nitrato + nitrito), salinidade e silicato. Isso evidencia a capacidade elevada que essas espécies tem de incorporar ferro, em relação às demais. Como o AD aumenta as taxas de troca de Fe entre os ligantes em solução e a superfície da célula, o gênero possivelmente absorve mais facilmente o ferro dissolvido, não dependendo fortemente da fração considerada prontamente biodisponível, correspondente principalmente aos íons livres. De acordo com os resultados da regressão múltipla, o nitrogênio, com menores concentrações em amostras da região costeira e da camada superficial, foi o nutriente mais relevante para a distribuição deste táxon. No entanto, devemos considerar os erros inerentes ao método.

Os dinoflagelados, por outro lado, apresentaram uma correlação muito baixa com os parâmetros abióticos, mesmo no melhor modelo ($R^2 = 0,06$), o que se explica, provavelmente, por uma influência maior dos fatores biológicos. Cerca de metade dos dinoflagelados são heterotróficos ou mixotróficos (Sarmiento; Gruber, 2003), sendo a mixotrofia considerada uma habilidade facultativa de suplementar a absorção de nutrientes sob condições limitantes à produção primária (Li *et al.*, 2000; Riemman *et al.*, 1995). Nesse estudo (Tabela 1), *Gymnodinium* spp., *Gyrodinium* spp., Peridinales, apresentam comportamento mixotrófico e heterotrófico (e. g. Gaines; Elbrächer, 1987; Taylor; Pollinger, 1987).

4.2 Efeitos do ferro sobre o crescimento e toxicidade de *Pseudo-nitzschia* spp.

Estudos recentes investigaram os mecanismos moleculares de diatomáceas relacionados à sobrevivência e estratégias competitivas para enfrentar as oscilações na disponibilidade de ferro no ambiente marinho e que as possibilitam proliferar rapidamente em condições favoráveis. Os mecanismos principais são (i) a redução da densidade celular

da população (“*Programmed cell death*”, PCD), para reduzir a competição pelo ferro disponível; (ii) a realocação do ferro e nitrogênio dentro de componentes chave da célula, para garantir as funções básicas de sobrevivência e defesa, e (iii) o aumento da abundância de proteínas anti-oxidantes e anti-PCD para enfrentar o estresse (Luo *et al.*, 2014).

Uma estratégia importante de aclimatação adotada pelas diatomáceas a fim de crescer em ambientes deficientes em ferro é diminuir o volume celular, a fim de aumentar a relação da superfície área/volume maximizando os mecanismos de transporte e as taxas de absorção do micronutriente, e as taxas de crescimento (Marchetti; Harrison, 2007), no entanto, as curvas de crescimento de *P. multiseriis* durante o presente experimento demonstram que esses organismos podem também se adaptar eficientemente à redução das concentrações deste nutriente (Wells *et al.*, 2005), devido à redução incomum das necessidades celulares de Fe:C (Maldonado *et al.*, 2002) e à capacidade acima da média de capturar o micronutriente. Nesse caso, as células podem ser consideradas Fe-estressadas (provavelmente houve redução do volume, eficiência fotossintética e níveis de clorofila-a), mas por definição não estão Fe-limitadas, pois mantiveram as taxas de crescimento semelhantes às Fe-suficientes (Marchetti; Harrison, 2007). Bates *et al.* (2001) também encontraram taxas de crescimento similares para tratamentos *Fe-deficiente* e *Fe-suficiente*. A resposta dessas microalgas tóxicas ao estresse causado pela diminuição dos níveis de Fe é notavelmente diferente de outros grupos de microfitoplâncton marinho; seu crescimento é bem mais rápido do que de outras espécies costeiras para um mesmo nível de ferro (Maldonado *et al.*, 2002).

Alguns autores (Maldonado *et al.*, 2002; Rue; Bruland, 2001; Wells *et al.*, 2005), mostraram que células *Fe-deficientes* de *P. multiseriis* liberam maiores quantidades de AD ao meio se comparadas às *Fe-suficientes* durante a fase exponencial de crescimento, restando, porém, apenas uma pequena fração (~5%) da toxina dentro das células

(Maldonado *et al.*, 2002). Bates *et al.* (2001), por outro lado, relataram que a produção total de AD por *P. multiseriis* diminuiu devido à limitação por ferro durante a fase estacionária de crescimento. Segundo os autores, essa diminuição está relacionada à redução da habilidade de captar nitrogênio e produzir energia fotossintética, dois processos que requerem ferro e são essenciais para a produção da toxina. Com o intuito de elucidar as contradições anteriores, Lelong *et al.* (2012) compilaram as informações disponíveis. De acordo com os autores, Bates *et al.* (2001) mensuraram apenas o AD total (particulado + dissolvido), o que dificulta a comparação com os dados da fração dissolvida apresentados pelos outros estudos. Além disso, o primeiro analisou a fase estacionária e os demais a exponencial de crescimento, sendo que as células na fase estacionária devem estar mais Fe-estressadas (Fe-limitadas) do que na exponencial, o que possivelmente influenciou o resultado. Como sugerido pelos resultados do presente estudo, é provável que células *Fe-deficientes* menos stressadas (i.e., em fase exponencial de crescimento) consigam incorporar ferro eficientemente, através da rápida liberação de AD ao meio e do mecanismo de quelação, possibilitando-as desenvolver suas funções fisiológicas normalmente. Em contrapartida, durante a fase estacionária, as células “Fe-limitadas”, possivelmente perdem capacidade de metabolizar nitrogênio e sintetizar quantidades suficientes de clorofila-*a* e AD.

Desta forma, o presente estudo gera um conhecimento novo à medida que investiga todas as fases da curva de crescimento e as frações dissolvida e particulada da toxina, separadamente, o que permite entender, de forma integrada, o efeito do ferro na produção e liberação de AD por *P. multiseriis*. Os resultados mostraram que o conteúdo de AD intracelular foi significativamente maior ao longo de toda a curva de crescimento para as células não limitadas, o que evidencia (i) a importância do ferro na biossíntese de AD e (ii) a rápida liberação de moléculas de AD por células *Fe-deficientes*, a fim de absorver maior

quantidade possível de ferro. O AD é um aminoácido e o ferro é o componente principal da enzima nitrato redutase, essencial para aquisição de nitrogênio e síntese da glutamina, enzima responsável pela conversão de amônia em aminoácido. Esse, entre outros processos, revelam porque os níveis de ferro intracelular são inversamente relacionados aos de AD (Bates *et al.*, 2001).

Na análise da liberação da toxina no meio (fração dissolvida), não houve diferença significativa entre os tratamentos durante a fase exponencial, provavelmente porque grande parte do AD intracelular já havia sido liberado ao meio pelas células *Fe-deficientes*, que conseguiram, efetivamente, manter os níveis de crescimento celular semelhantes aos das *Fe-suficientes*. Nas fases estacionária e de declínio, por outro lado, as taxas de liberação de AD ao meio pelas células *Fe-suficientes* foram até 20 vezes maiores, provavelmente porque as *Fe-deficientes* já estavam altamente “Fe-estressadas” e os níveis de ferro intracelular não foram suficientes para sustentar a síntese de AD.

Esse conhecimento é de grande relevância, pois o incremento natural ou artificial de ferro em regiões costeiras e oceânicas pode gerar efeitos negativos ao ecossistema e à produção de frutos-do-mar. O aumento da produção de toxinas por *Pseudo-nitzschia* spp. sob concentrações elevadas de dFe pode ser uma resposta negativa dos experimentos de fertilização por ferro em áreas de altas concentração de nutrientes e baixas concentrações de clorofila-*a* (“*High Nutrient Low Chlorophyll*”, HNLC). Apesar do aumento significativo da produção primária e biomassa fitoplanctônica e, conseqüentemente, no sequestro de carbono atmosférico em regiões profundas, o enriquecimento artificial de Fe pode favorecer a ocorrência de florações nocivas destas diatomáceas tóxicas, o que representa um risco ao ecossistema. De fato, na maioria dos experimentos realizados, os blooms de diatomáceas foram dominados por *Pseudo-nitzschia* spp., incluindo estudos realizados no Pacífico Equatorial (Coale *et al.*, 1996; Landry *et al.*, 2000); e Oceano

Austral (Coale *et al.*, 2004; Gervais *et al.*, 2002). Trick *et al.* (2010) comprovaram, através de experimentos utilizando água de uma região HNLC, que a adição de ferro aumenta a capacidade de produção e o conteúdo intracelular de AD em *P. turgidula* e *P. cf granii*. No entanto, ainda não está claro se as concentrações de toxina em oceano aberto atingiriam níveis elevados o suficiente para causar danos aos organismos pelágicos na camada superficial.

Mudanças nas concentrações de ferro dissolvido podem, ainda, causar alterações nas razões elementares em *Pseudo-nitzschia* spp. A razão C:N tende a aumentar com a diminuição do Fe, sugerindo um rápido decréscimo na incorporação do nitrogênio, visto que o ferro é um co-fator da nitrato e nitrito redutase. O conteúdo celular de Si em a relação a outros nutrientes também deve ser aumentado, pois o ferro controla as taxas de absorção de silício nas diatomáceas (Sarmiento; Gruber., 2003).

As espécies de *Pseudo-nitzschia* que ocorreram na margem continental de Santa Catarina e zona oceânica contígua durante o período desde cruzeiro não são consideradas altamente tóxicas pela literatura, mas isso pode refletir lacunas no conhecimento em algumas regiões e a utilização de metodologias pouco precisas. A *P. americana* não é considerada tóxica, mas é uma espécie pouco estudada, pois ocorre principalmente no Atlântico Sul. Baixos níveis de toxinas foram detectados em *P. delicatissima* e *P. pungens* na costa oeste dos Estados Unidos ($<0,5 \text{ pg.cel}^{-1}$) e Nova Zelândia ($<0,07 \text{ pg.cel}^{-1}$) (Baugh *et al.*, 2006; Rhodes *et al.*, 1998; Trainer *et al.*, 1998). Esse fato, associado à baixa abundância do gênero durante o período investigado, justificam os níveis não detectáveis de toxina nas amostras de campo.

As concentrações extremamente elevadas de ferro dissolvido na região, aliadas à alta capacidade de absorção de dFe, uma vantagem competitiva em relação às demais espécies de fitoplâncton, são condições propícias para altas taxas de crescimento, produção

e liberação de toxinas por *Pseudo-nitzschia* spp., desencadeando possíveis, apesar de raros, eventos tóxicos. Além disso, Tammilehto *et al.*, (2015) demonstraram que, na costa oeste da Groenlândia, a toxicidade de *P. seriata* aumentou significativamente na presença de copépodes, a partir de sinais químicos que induzem a resposta celular da diatomácea, como um mecanismo de defesa contra a predação. A elevada produção de AD por *Pseudo-nitzschia* spp. na presença de herbívoros pode resultar em uma rápida redução da pastagem, o que representaria mais uma vantagem competitiva do gênero. No entanto, em águas tropicais, onde a teia alimentar é muito variada, essas respostas devem ser mais complexas.

5 Conclusão

As concentrações de ferro dissolvido foram elevadas, acima do esperado para margens continentais e regiões oceânicas. A disponibilidade de ferro se mostrou diretamente correlacionada com a produção e liberação de ácido domóico por *Pseudo-nitzschia multiseries* em laboratório, resultado importante para a avaliação do potencial de ocorrência de florações tóxicas nesta e demais regiões com intenso aporte natural do micronutriente, e serve como um alerta aos experimentos de enriquecimento artificial.

POSFÁCIO

Recomendações para estudos futuros

Em estudos futuros, recomenda-se seguir as normas do GEOTRACES (Cutter *et al.*, 2010), para minimizar os riscos de contaminação durante as análises de ferro. A coleta deve ser realizada com um sistema roseta “*ultra-clean*” e o armazenamento em contêiner apropriado, com controle de partículas. Pode haver um aumento geral nas concentrações de

ferro dissolvido em todas as amostras relacionado às falhas na amostragem e estocagem das amostras.

Para a análise de ácido domóico em amostras de campo de regiões de plataforma continental e talude, recomenda-se a concentração (por filtração reversa) de um volume grande de água do mar para que os níveis de AD sejam detectáveis pelas metodologias existentes, mesmo em períodos de baixa abundância de *Pseudo-nitzschia* spp. Caso possível, a concentração de 100 litros de água do mar em 0,1 L de amostra final, por exemplo, possibilitaria a detecção de concentrações inferiores a 0,03 pg AD.cél⁻¹ em amostras com abundâncias celulares similares às do presente estudo.

Referências

ADAMS, A. L.; DOUCETTE, T. A.; JAMES, R.; RYAN, C. L. (2009). Persistent changes in learning and memory in rats following neonatal treatment with domoic acid. **Physiology & Behavior**, v. 96, p. 505-512.

ALBRECHT-GARY, A. M.; CRUMBLISS, A. L. (1998). Coordination chemistry of siderophores: Thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 35, p. 239-327.

ARAÚJO, L. M.; FRANÇA, A. B.; POTTER, P. E. (1999). Hydrogeology of the Mercosul aquifer system in the Paraná basin, South America, and comparison with the Navajo–Nugget aquifer system, USA. **Hydrogeology Journal**, v. 7, p. 317-336.

BATES C. L.; SATCHWELL, M; BOYER, G. L. (2001). **The effects of iron on domoic acid production by *Pseudo-nitzschiamultiseri***. In: Proceedings of the 9th International Conference On Harmful Algal Blooms. Paris: Intergovernment Oceanography Commission of UNESCO, p. 320-323.

BAUGH, K. A.; BUSH, J. M.; BILL, B. D.; LEFEBVRE, K. A.; TRAINER, V. L. (2006). Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. **African Journal of Marine Science**, v. 28, p. 403–407.

BERGQUIST, B. A.; BOYLE, E. A. (2006). Dissolved iron in the tropical and subtropical Atlantic Ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 20, p. 1-14.

BORCARD, D; GILLET, F.; LEGENDRE, P. (2011) **Numerical ecology with R**. New York: Springer. 319 p.

BRAGA, E. S.; NIENCHESKI, L. F. H. (2006). **Composição das massas de água e seus potenciais produtivos na área entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS)**. In: O ambiente oceanográfico da plataforma continental e do talude na região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. p. 161-218.

BRAGA, E. S. ; CHIOZZINI, V. G. ; BERBEL, G. B. B. ; MALUF, J. C. C. ; AGUIAR, V. M. DE C. ; CHARO, M. ; MOLINA, D. ; ROMERO, R. ; EICHLER, B. B. (2008). Nutrients distribution over the Southeastern South Atlantic continental shelf from Mar del Plata (Argentina) to Itajaí (Brazil): Winter-summer aspects. **Continental Shelf Research**, v. 28, p. 1649-1661.

BRANCO, J. O. (1999). **Biologia do Xiphopenaeus kroyeri (Heller, 1862) (Decapoda: Penaeidae), análise da fauna acompanhante e das aves marinhas relacionadas a sua pesca, na região de Penha, SC-Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, São Paulo. 147p.

BRANDINI, F.P. Primary production and phytoplankton photosynthetic Characteristics in the southeastern Brazilian coast. *Bolm. Inst. Oceanogr.*, São Paulo, v. 48, n.2, p.147-159, 1990b.

BURNHAM, K. P. AND ANDERSON, D. R. (2010). **Model selection and multimodel inference**. New York: Spring Verlag. 485 p.

BUTLER, B. I.; SCHOONEN, M. A. A.; RICKARD, D. T. (1994). Removal of dissolved oxygen from water. **Talanta**, v. 41, p. 211-215.

CASTRO, B. M.; LORENZZETTI, J. A.; SILVEIRA, I. C. A.; MIRANDA, L. B. ARAUJO, C.E.S.; KAMPEL, M. (2006). (2006). **Estrutura termohalina e circulação na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS)**. In: O ambiente oceanográfico da plataforma continental e talude na região sudeste-sul do Brasil. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 11-121.

COALE, K. H. *et al.* (1996) A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. **Nature**, v. 383, p. 495-501.

CAMPOS, P. C.; MÖLLER JR. O. O.; PIOLA, A. R.; PALMA, E. D. (2013). Seasonal variability and coastal upwelling near Cape Santa Marta (Brazil). **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 118, p. 1420-1433.

CIOTTI, A. M.; ODEBRECHT, C.; FILLMAN, G., MÖLLER JR., O. O. (1995) Freshwater out flow and subtropical convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. **Continental Shelf Research**, v. 15, p. 1737-1756.

COALE, K. H., *et al.* (2004) Southern Ocean iron enrichment experiment: Carbon cycling in high- and low-Si waters. **Science**, v. 304, p. 408-414.

CRESPO, R.; SOARES GOMES, A. (2002). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência. 382 p.

DAVIDSON, K.; GOWEN, R. J.; HARRISON, P. J.; FLEMING, L. E.; HOAGLAND, P.; MOSCHONAS, G. (2014). Anthropogenic nutrients and harmful algae in coastal waters. **Journal of Environmental Management**, v. 148, p. 206-216.

DEPETRIS, P. J.; PAOLINI, J. E. (1991). **Biogeochemical Aspects of South American Rivers: The Paraná and the Prinoco**. In: Biogeochemistry of Major World Rivers. New York: John Wiley & Sons, p. 105-125.

DUCE, R.A.; TINDALE, N. W. (1991). Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. **Limnology and Oceanography**, v. 36, p. 1715-1726.

EPAGRI (2015). **Cultivo de moluscos**. Disponível em: http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=657. Acessado em 12/02/15.

EVANGELISTA, H.; MALDONADO, J. SANTOS, E. A.; GODOI, R. H. M.; GARCIA, C. A. E.; GARCIA, V. M. T.; JONHSON, E.; CUNHA, K. D.; LEITE, C. B.; VAN GRIEKEN, R. VAN MEEL, K., MAKAROVSKA, H., GAIERO, D. M. (2010). Inferring episodic atmospheric iron fluxes in the Western South Atlantic. **Atmosferic Environment**, v. 44, p. 703-712.

FERNANDES, L. F.; BRANDINI, F. P. (2004). Diatom associations in shelf waters off Parana State, Southern Brazil: annual variation in relation to environmental factors. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 1, p. 19-34.

FERNANDES, L. F.; BRANDINI, F. P. (2010). The potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the Paraná and Santa Catarina States, Southern Brazil. **Iheringia**, v. 65, p. 47-62.

FERNANDES, L. F.; CAVALCANTE, K. P.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. (2013). Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *P. calliantha*, and associated domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast. **Diatom Research**, v. 28, p. 381-393.

GAETA, S. A.; BRANDINI, F. P. (2006). **Produção primária do Fitoplâncton na região entre Cabo de São Tomé (RJ) e Chuí (RS)**. In: O Ambiente Oceanográfico da Plataforma Continental e do talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo p. 210-264.

GAINES, G.; ELBRACHTER, M. (1987). **Heterotrophic nutrition**. In : The biology of dinoflagellates. Oxford: Blackwell Scientific, p. 229-267.

GERVAIS, F.; RIEBESELL, U.; GORBUNOV, M. Y. (2002) Changes in primary productivity and chlorophyll a in response to iron fertilization in the Southern Polar Frontal Zone. **Limnology and Oceanography**, v. 47, p. 1324-1335.

GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. (1983). **Methods of Seawater Analysis**. Verlag Chemie. 419 p.

GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum Press, p. 26-60.

HASLE, G.R.; FRYXELL, G.A. (1970). Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. **Transactions of the American Microscopical Society** **84**, v. 4, p. 469-474.

JOHNSON, K. S.; GORDON, R. M.; COALE, K. H. (1997). What controls dissolved iron concentration in the world ocean? **Marine Chemistry**, v. 57, p. 137-161.

JOHNSON, K. S.; CHAVEZ, F. P.; FRIEDERICH, G. E. (1999). Continental-shelf sediments as a primary source of iron for coastal phytoplankton. **Nature**, v. 398, p. 697-700.

KELLER, M. D., W. K. BELLOWS, AND R. R. L. GUILLARD. (1988). Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 117, p. 279-283.

LANDRY, M. R.; ONDRUSEK, M. E.; TANNER, S. J.; BROWN, S. L.; CONSTANTINOU, J.; BIDIGAREI, R. R.; COALE, K. H.; FITZWATER, S. (2000). Biological response to iron fertilization in the eastern equatorial Pacific (IronEx II). I. Microplankton community abundances and biomass. **Marine Ecology Progress Series**, v. 201 p. 27-42.

LELONG, A.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; BATES, S. S. (2012). *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. **Phycologia**, v. 51, p. 168-216.

LI, A.; STOECKER, D. K.; COATS, D. W. (2000). Mixotrophy in *Gyrodinium galatheanum* (Dinophyceae): grazing responses to light intensity and inorganic nutrients. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 33-45.

LOUREIRO, S.; GARCES, E.; FERNANDEZ-TEJEDOR, M.; VAQUE, D., CAMP, J. (2009). *Pseudonitzschia* spp. (Bacillariophyceae) and dissolved organic matter (DOM) dynamics in the Ebro Delta (Alfacs Bay, NW Mediterranean Sea). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 83, p. 539-549.

LUO, C.; LIANG, J.; LIN, Q.; LI, C.; BOWLER, C.; ANDERSON, D. M.; WANG, P.; WANG, X.; GAO, Y. (2014). Cellular Responses Associated with ROS Production and Cell Fate Decision in Early Stress Response to Iron Limitation in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 5510-5523.

MAFRA, L. L.; FERNANDES, L. F.; PROENÇA, L. (2006). Harmful Algae and Toxins in Paranaguá Bay, Brazil: Bases for Monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107-121.

MAFRA, L. L. J.; LÉGER, C.; BATES, S. S.; QUILLIAM, M. A. (2009). Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without

derivatization, using UV or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 6003-6011.

MALDONADO, M. T.; HUGHES, M. P.; RUE, E. L. (2002). The effect of the Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. **Limnology and Oceanography**, v. 47, p. 515-526.

MARCHETTI, A.; HARRISON, P. J. (2007). Coupled changes in the cell morphology and the elemental (C,Nand Si) composition of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia* due to iron deficiency. **Limnology and Oceanography**, v. 52, p. 2270-2284.

MATHIAS, G. L.; NAGAI, R. H.; TRINDADE, R. I. F.; MAHIQUES, M. M. (2014). Magnetic fingerprint of the late Holocene inception of the Río de la Plata plume onto the southeast Brazilian shelf. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 415, p. 183-196.

MARTIN, J. H.; GORDON, R. M. (1988). Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity. **Deep-Sea Research**, v. 35, p.177-196.

MARTIN, J. H.; GORDON, R. M.; FITZWATER, S. E. (1991) The case of iron. **Limnology and oceanography**, v. 36, p. 1793-1892.

METZLER, P. M. (1997). New and regenerated Production in the South Atlantic off Brazil. **Deep-Sea Research**, v. 44, p. 363-384.

MIDDLE, N. J. (1995). Effect of drought on dust production in the Sahel. **Nature**, v. 316, p. 431-434.

NIENCHESKI, L. F.; WINDOW, H. L.; MOORE, W. S. Controls on water column chemistry of the southern Brazilian continental shelf. **Continental Shelf Research**, v. 88, p. 126-139.

OBATA, H.; van DEN BERG (2001). Determination of Picomolar Levels of Iron in Seawater Using Catalytic Cathodic Stripping Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2522 -2528.

ODEBRECHT, C.; FERRARIO, M.E.; CIOTTI, A.M.; KITZMANN, D.; MOREIRA, M.O.P.; HINZ, F. (2001). **The distribution of the diatom *Pseudo-nitzschia* off southern Brazil, and relationships with oceanographic conditions**. In: Proceedings of the 9th International conference on harmful algal blooms. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, p. 42-45.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. .H; WAGNER, H. (2009). **vegan: Community Ecology Package**. R package version 1.16 - 12. Disponível em: <http://vegan.r-forge.r-project.org/>

ÖZTÜRZ, M; BIZSEL, N. (2003). Iron speciation and biogeochemistry in different nearshore waters. **Marine Chemistry**, v. 83, p. 145-156.

PIOLA, A. R.; MATANO, R. P.; PALMA, E. D.; MÖLLER, J. R. O.; CAMPOS, E. J. D. (2005). The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf. **Geophysical Research Letter**, v. 32, p. 1-4.

POWELL, R.T.; LANDING, W.M.; BAUER, J.E. (1995). Colloidal trace metals, organic carbon and nitrogen in a southeastern U.S. estuary. **Marine Chemistry**, v. 55, p. 165-176.

PRICE, N. M.; HARRISON, G. L.; HERING, J. G.; HUDSON, R. J.; NIREL, P. M. V.; PALENIK, B.; MOREL, F. M. M. (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium aquil. **Journal of marine biology and oceanography**, v. 6, p. 443-462.

PROCOPIAK, L. K.; FERNANDES, L. F.; MOREIRAFILHO, H. (2007). Diatomáceas (Bacillariophyta) marinhas e estuarinas do Parana, Sul do Brasil: lista de espécies com ênfase em espécies nocivas. **Biota Neotropica**, v. 3, p. 1-28.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012). **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Austria. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

REYNOLDS, C. S. (2006). **Nutrient uptake and assimilation in phytoplankton** In: The ecology of phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, p. 145-175.

RIEMMAN, B.; HAVSKUM, H.; THINGSTAD, F.; BERNARD, C. (1995) **The role of mixotrophy in pelagic environments**. In: Molecular ecology of aquatic microbes. Berlin: Springer-Verlag, Berlin, p. 87-114.

RHODES, L.; SCHOLIN, C.; GARTHWAITE, I. (1998). Pseudo-nitzschia in New Zealand and the role of DNA probes and immunoassays in refining marine biotoxin monitoring programmes. **Natural toxins**, v. 6, p. 105-111.

RUE, E. L.; BRULAND, K. W. (2001). Domoic acid binds iron and copper: A possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudonitzschia*. **Marine Chemistry**, v. 76, p. 127-134.

SANDRINI-NETO, L.; CAMARGO, M. G.; THE R DEVELOPMENT CORE TEAM. (2010). **General ANOVA Design (GAD): Analysis of variance from general principles**. R package version 1.0.

SARMIENTO, S. L.; GRUBER, N. (2003). **Ocean Biogeochemical Dynamics**. New Jersey and Los Angeles: Princeton University Press. 275 p.

SMAYDA, T. J.; REYNOLDS, C. S. (2001) Community assembly in marine phytoplankton; application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. **Journal of Plankton Research**, v. 23, p. 447-461.

SUGIE, K.; YOSHIMURA, T. (2013). Effects of pCO₂ and iron on the elemental composition and cell geometry of the marine diatom *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. **Journal of Phycology**, v. 49, p. 475-488.

SUNDA, W. G.; HUTSMAN, S. A. (1995). Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: Biological and geochemical implication. **Limnology and Oceanography**, v. 40, p. 1404-1417.

SUNDA, W. G.; PRICE, N.; MOREL, F. (2004). **Trace metal ion buffers and their use in culture studies**. In: Algal Culturing Techniques. New York: Academic Press, p. 35-63.

TAGLIABUE, A.; MTSALI, T.; AUMONT, O.; BOWIE, A. R.; KLUNDER, M. B.; ROYCHOUDHURY, A. N.; SUART, S. (2012). A global compilation of dissolved iron measurements: focus on distributions and processes in the Southern Ocean. **Biogeosciences**, v. 9, p. 2333-2349.

TAMMILEHTO, A., NIELSEN, T. G.; KROCKD, B.; MØLLER, E. F.; LUNDHOLM, N. (2015). Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 52-61.

TAYLOR, F.G.R.; POLLINGHER, U. (1987). **Ecology of dinoflagellates**. In: Biology of Dinoflagellates. Oxford: Blackwell Scientific Publication, p. 398-502.

TRAINER, V. L.; ADAMS, N. G.; BILL, B. D.; ANULACION, B. F., WEKELL, J. C. (1998). Concentration and dispersal of a *Pseudo-nitzschia* bloom in Penn Cove, Washington, USA. **Natural Toxins**, v. 6, p. 113–126.

TRAINER, V.L.; BATES, S. S.; LUNDHOLM, N; THESSSEN, A. E.; COCHLAN, W. P.; ADAMS, N. G.; TRICK, C. G. (2012). *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. **Harmful Algae**, v. 14, p. 271-300.

TRICK, C. G.; BILLB, B. D.; COCHLANB, W. P.; WELLS, M. L.; TRAINERC, V. L.; PICKELLD, L. D. (2010). Iron enrichment stimulates toxic diatom production in high-nitrate, low-chlorophyll areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, p. 5887-5892.

TRUDA PALAZZO Jr., J. (2006). **Espécies de Cetáceos no Atlântico Sul: Status do Conhecimento Atual**. In: Atlântico Sul: um santuário de baleiras. Recife: Fundação Mamíferos Aquáticos e da Companhia de Navegação Norsul, p. 16-17.

UTERMÖHL, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitative phytoplankton methodik. **Mitt Int Verein Theor Angew Limnology**, v. 9, p. 1 -38.

VELASQUES, I. B.; JACINTO, G. S.; VALERA, F. S. (2002). The speciation of dissolved copper, cádmium and zinc in Manila Bay, Philippines. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 210-217.

VENRICK, E.L. (1978). **The implications of subsampling**. In: Phytoplankton Manual. Paris: United Nations Educational-Scientific and Cultural Organization, p. 75-87.

VILLAC, M. C.; TENENBAUM, D. R. (2001). **The coastal *Pseudo-nitzschia* from the state of Rio de Janeiro, Brazil**. In: Proceedings of the 9th International conference on harmful algal blooms. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, p. 34-37.

VINK, S.; MEASURES, C. I. (2001). The role of dust deposition in determining surface water distributions of Al and Fe in the south west Atlantic. **Deep Sea Research Part II**, v. 48, p. 2787-2809.

WELLS, M. L.; PRICE, N. M.; BRULAND, K. W. (1994). Iron chemistry in seawater and its relationships to phytoplankton: a workshop report. **Marine Chemistry**, v. 48, p. 157-182.

WELLS, M. L. (1999). Manipulating iron availability in nearshore waters. **Limnology and Oceanography**, v. 44, p. 1002-1008.

WELLS, M. L.; TRICK, C. G.; COCHLAN, W. P.; HUGHES, M. P.; TRAINER, V. L. (2005). Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. **Limnology and Oceanography**, v. 50, p. 1908-1917.

WINDOM, H. L.; MOORE, W. S.; NIENCHESKI, L. F. H.; JAHNKE, R. A. (2006). Submarine groundwater discharge: A large, previously unrecognized source of dissolved iron to the South Atlantic Ocean. **Marine Chemistry**, v. 102, p. 252-266.

WITHFIELD, M. (2001). Interactions between phytoplankton and trace metals in the ocean. *Advances in marine biology*. **Advances in Marine Biology**, v. 41, p. 3-128.

WORSFOLD, P. J.; LOHAN, M. V.; USSHER, S. J.; BOWIE, A. R. (2014) Determination of dissolved iron in seawater: a historical review. **Marine Chemistry**, v. 166, p. 25-35.

WU, J.; LUTHER, G. W. (1996). Spatial and temporal distribution of iron in surface water of the northwest Atlantic Ocean. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 60, p. 2729-2741.

ZHUANG, G.; DUCE, R. A.; KESTER, D. R. (1990). The dissolution of atmospheric iron in surface seawater of the open ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 95, p. 16207-16216.

XU, K.; XU, F.; HUTCHINS, D. A. (2014) Comparative responses of two dominant Antarctic phytoplankton taxa to interactions between ocean acidification, warming, irradiance, and iron availability. **Limnology and Oceanography**, v. 59, p. 1919-19.

Material Suplementar

Apêndice A: Concentração de macronutrientes inorgânicos dissolvidos ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e salinidade em cinco diferentes profundidades amostradas em cada estação amostral.

Estação	Profundidade (m)	Silicato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Nitrito ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	T ($^{\circ}\text{C}$)	S
E1							
E1A1	5	5,2	0,48	0,05	0,06	23,1	33,4
E1A2	30	5,3	0,52	1,55	0,01	22,6	33,7
E1A3	50	7,6	0,64	0,20	0,06	20,3	35,9
E1A4	80	6,4	0,91	4,73	0,13	15,7	35,5
E1A5	95	6,3	0,72	9,28	0,15	13,9	35,3
E2							
E2A1	5	2,6	0,27	0,04	0,04	23,1	35,7
E2A2	50	1,9	0,35	0,00	0,04	23,7	37,2
E2A3	85	2,1	0,18	0,04	0,29	22,4	37,0
E2A4	110	3,0	1,40	0,20	0,13	21,3	36,6
E2A5	125	3,4	0,63	1,23	0,13	19,0	36,1
E3							
E3A1	5	2,1	0,28	0,15	0,02	23,2	36,3
E3A2	50	2,4	0,15	0,32	0,07	23,6	37,1
E3A3	85	2,1	0,15	1,42	0,09	23,4	37,1
E3A4	115	2,0	0,19	0,47	0,15	22,1	36,8
E3A5	140	3,2	0,30	0,36	0,10	19,8	36,3
E4							
E4A1	5	1,8	0,26	0,24	0,04	23,5	36,8
E4A2	50	1,5	0,53	0,39	0,09	23,6	37,1
E4A3	110	2,5	0,19	0,33	0,12	22,5	36,9
E4A4	130	2,3	0,37	0,16	0,29	21,3	36,6
E4A5	170	2,8	0,29	2,78	0,07	20,1	36,4
E5							
E5A1	5	1,8	0,29	0,18	0,02	23,5	36,5
E5A2	60	1,4	0,24	0,39	0,03	23,7	37,2
E5A3	110	1,7	0,33	0,59	0,12	23,3	37,1
E5A4	130	2,4	0,23	0,13	0,08	22,0	36,7
E5A5	160	2,2	0,65	0,29	0,06	20,6	36,4

Estação	Profundidade (m)	Silicato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Nitrito ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	T ($^{\circ}\text{C}$)	S
E6							
E6A1	5	2,2	0,20	0,05	0,05	23,7	36,8
E6A2	65	1,8	0,21	0,17	0,01	23,2	37,0
E6A3	100	2,1	0,18	0,08	0,03	22,7	36,9
E6A4	150	1,8	0,25	0,64	0,12	21,4	36,7
E6A5	180	2,9	0,40	0,56	0,05	20,2	36,4
E7							
E7A1	5	1,9	0,19	0,18	0,03	22,9	36,7
E7A2	65	2,3	0,17	0,16	0,04	22,5	36,7
E7A3	100	2,6	0,17	0,21	0,03	22,0	36,7
E7A4	150	2,0	2,39	1,11	0,14	21,0	36,6
E7A5	180	2,4	0,27	0,04	0,24	20,0	36,4
E8							
E8A1	5	1,9	0,16	0,08	0,05	23,0	37,0
E8A2	60	1,7	0,78	0,39	0,02	22,9	37,0
E8A3	100	2,1	0,50	1,74	0,08	21,5	36,6
E8A4	130	1,4	0,21	0,40	0,13	20,8	36,5
E8A5	190	2,4	0,23	0,16	0,08	19,5	36,3
E9							
E9A1	5	1,9	0,43	0,09	0,10	22,6	36,7
E9A2	50	2,1	0,10	0,16	0,05	22,4	36,7
E9A3	90	2,3	0,15	0,62	0,17	21,5	36,7
E9A4	140	4,0	0,22	15,38	0,10	20,0	36,4
E9A5	170	2,1	0,26	0,08	0,10	18,8	36,2
E10							
E10A1	5	2,3	0,14	0,09	0,02	22,4	36,4
E10A2	60	1,7	0,15	0,07	0,03	21,4	36,6
E10A3	80	1,9	0,12	1,00	0,04	21,0	36,6
E10A4	100	2,5	0,18	1,60	0,05	20,5	36,5
E10A5	160	2,2	0,37	2,27	0,19	18,7	36,1

Apêndice B. Concentração de ferro dissolvido total (nmol.L^{-1}) e biodisponível (nmol.L^{-1}) em três diferentes profundidades de cada estação amostral, profundidade local (m) e distância da costa (Km).

	Profundidade amostrada (m)	Profundidade local (m)	Distância da costa (Km)	dFe total (nmol.L^{-1})	dFe biodisponível (nmol.L^{-1})
E1A1	5	111	60	192	8,1
E1A3	50			98,5	16,9
E1A5	95			91	2,8
E2A1	5	265	100	34	2,1
E2A3	85			141	1,1
E2A5	125			82	ND
E3A1	5	262	113	619	3,1
E3A3	85			106	11,7
E3A4	140			208	10,3
E4A1	5	474	135	136	1,3
E4A3	110			87	14,9
E4A5	170			123	1,4
E5A1	5	625	150	125	5,4
E5A3	110			87	2
E5A5	160			67	11,2
E6A1	5	887	170	173	1,1
E6A3	100			183	1,9
E6A5	180			134	7,7

	Profundidade amostrada (m)	Profundidade local (m)	Distância da costa (Km)	dFe total (nmol.L ⁻¹)	dFe biodisponível (nmol.L ⁻¹)
E7A1	5	1300	190	91	9,8
E7A3	100			103	6,2
E7A5	180			135	2,3
E8A1	5	2425	245	116	3,8
E8A3	100			122	8,1
E8A5	190			107	8,5
E9A1	5	2425	317	101	14,2
E9A3	90			64	7,4
E9A5	170			91	1,9
E10A1	5	3509	420	154	4,1
E10A3	80			89	3,3
E10A5	160			80	7,6

Apêndice C. Abundância total de microfitoplâncton, diatomáceas, dinoflagelados e *Pseudo-nitzschia* spp. (cél.L⁻¹) em três diferentes profundidades de cada estação amostral, e as respectivas distâncias da costa (Km).

	Profundidade (m)	Distância da Costa (Km)	Abundância total de microfitoplâncton (cél.L ⁻¹)	Abundância de diatomáceas (cél.L ⁻¹)	Abundância de dinoflagelados (cél.L ⁻¹)	Abundância de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.(cél.L ⁻¹)
E1A1	5	60	558,4	478,1	71	16,8
E1A3	50		2917,8	2765,4	42,6	183,8
E2A1	5	100	205,4	155,3	50,2	5,3
E2A3	85		1808,5	1777,1	22,4	6,7
E3A1	5	113	211,4	105,1	104,6	0
E3A3	85		463,9	383,2	67,2	36,8
E6A1	5	170	339,4	54,2	283,7	0
E6A3	100		2060	620	1360	0
E7A1	5	190	320,5	80,7	237,6	0
E7A3	100		256,4	127,3	115,6	6,3
E8A1	5	245	342,1	30	307,8	0
E8A3	100		223,2	104	117,4	22,4
E9A1	5	317	383,9	62,7	318,2	3
E9A3	90		273,4	109,4	159,6	69,9
E10A1	5	420	454,2	82,2	372,02	0
E10A3	80		190,9	18,8	165,8	1,79

Apêndice D.

Detalhamento das Técnicas analíticas utilizadas: AdCSV e LC-UVD

A determinação e especiação química do ferro, entre todos os elementos traço, é a que representa o maior desafio analítico, devido às concentrações extremamente baixas nos oceanos e à sua própria natureza, que aumenta o poder de contaminação em todas as etapas do método: coleta, filtração e estocagem para análises de água do mar (Bruland; Rue, 2001). O método voltamétrico vem sendo amplamente utilizados em estudos de especiação química de ferro no ambiente marinho por apresentar algumas vantagens, como facilidade operacional e baixos limites de detecção (Van den Berg; Kramer, 1984). A variante mais difundida é a voltametria de redissolução catódica, em que um agente ligante é adicionado à amostra de água do mar, formando um complexo com o Fe (III), o qual é adsorvido no eletrodo de trabalho e reduzido por redissolução catódica. O DHN é um dos ligantes mais comumente utilizados (Obata; Van den Berg, 2001). Essa mesma técnica é empregada para determinar a capacidade de complexação do Fe (III) com ligantes naturais e, desta forma, estimar o ferro biodisponível livre e/ou complexado fracamente (Buck *et al.*, 2012; Croot; Johansson, 2000; Hassler *et al.*, 2013; Hawkes *et al.*, 2013; Town; van Leeuwen, 2005; Wu; Jin, 2009).

A cromatografia líquida com detecção ultravioleta (LC-UVD) foi o primeiro método desenvolvido para detecção do ácido domóico, aplicado exaustivamente para análise em moluscos e tecidos de peixe (Quilliam *et al.*, 1995). O método clássico não foi empregado nesse artigo pois as concentrações de toxinas em células fitoplanctônicas e na água do mar são várias ordens de magnitude menores do que as detectadas no tecido de organismos suspensívoros, o que torna necessário um método mais sensível de detecção (Mafra *et al.*, 2009). O método desenvolvido por Mafra *et al.* (2009) representa uma alternativa mais precisa, rápida e menos complicada em relação às demais técnicas disponíveis, uma vez

que não utiliza etapas de pré-concentração da amostra ou derivatização. O uso da eluição por gradiente permite a análise direta de grandes volumes de amostras (e.g. 80 µL), resultando em alta seletividade e sensibilidade.

Referências

BUCK, K. N.; MOFFETT, J.; BARBEAU, K. A.; BUNDY, R. M.; KONDO, Y.; WU, J. (2012). The organic complexation of iron and copper: an intercomparison of competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry (CLE-ACSV) techniques. **Limnology and Oceanography**, v. 10, p. 496-515.

BRULAND, K. W.; RUE, E. L. (2001). **Iron: Analytical methods for the determination of concentrations and speciation**. In: The biogeochemistry of iron in seawater. New Jersey: John Wiley and Sons. p. 255-289.

HASSLER, C. S.; LEGIRET, F. E.; BUTLER, E. C. V. (2013). Measurement of iron chemical speciation in seawater at 4 °C: the use of competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Marine Chemistry**, v. 149, p. 63-73.

HAWKES, J. A.; GLEDHILL, M.; CONNELLY, D. P.; ACHTERBERG, E. P. (2013). Characterisation of iron-binding ligands in seawater by reverse titration. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 53-60.

MAFRA, L. L. J.; LÉGER, C.; BATES, S. S.; QUILLIAM, M. A. (2009). Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 6003-6011.

OBATA, H.; van DEN BERG (2001). Determination of Picomolar Levels of Iron in Seawater Using Catalytic Cathodic Stripping Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2522-2528.

QUILLIAM, M. A.; XIE, W. R.; HARDSTAFF, J. (1995). Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 543-554.

SOUZA, R. B.; ROBINSON, I. S. (2004). Lagrangian and satellite observations of the Brazilian Coastal Current. **Continental Shelf Research**, v. 24, p. 241-262.

TOWN, R. M.; VAN LEEUWEN, H. P. (2005). Measuring marine iron(III) complexes by CLE-AdSV. **Environmental Chemistry**, v. 2, p. 80-84.

van DEN BERG, C. M. G.; KRAMER, J. R. (1984). Determination of complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) with natural organic

ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions. **Marine Chemistry**, v. 15, p. 1-18.

Van DEN BERG, C. M. G. (1995). Evidence for organic complexation of iron in seawater. **Marine Chemistry**, v. 50, p. 139-157.

WU, J. F., JIN, M. (2009). Competitive ligand exchange voltammetric determination of ironorganic complexation in seawater in two-ligand case: examination of accuracy using computer simulation and elimination of artifacts using iterative non-linear multiple regression. **Marine Chemistry**, v. 114, p. 1-10.

