



MARINHA DO BRASIL  
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MARINHA

DEBORA COSTA BRITO DA SILVA

**ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE COPEPODA  
(CRUSTACEA) POR MEIO DE IMAGEAMENTO SEMI-  
AUTOMÁTICO NA REGIÃO DE RESSURGÊNCIA EM ARRAIAL DO  
CABO, RJ**

Arraial do Cabo-RJ

2019

MARINHA DO BRASIL  
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

DEBORA COSTA BRITO DA SILVA

**ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE COPEPODA (CRUSTACEA) POR  
MEIO DE IMAGEAMENTO SEMI-AUTOMÁTICO NA REGIÃO DE  
RESSURGÊNCIA EM ARRAIAL DO CABO, RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha. Área de concentração Biologia Marinha. Linha de Pesquisa: Bio-Recursos Marinhos.

Orientador: Dr. Lohengrin Dias de Almeida Fernandes

Arraial do Cabo, RJ

2019

DEBORA COSTA BRITO DA SILVA

**ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE COPEPODA POR MEIO DE  
IMAGEAMENTO SEMI-AUTOMÁTICO NA REGIÃO DE RESSURGÊNCIA EM  
ARRAIAL DO CABO, RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Lohengrin Dias de Almeida Fernandes (Orientador)  
IEAPM – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

---

Prof. Dr. Ricardo Coutinho (Membro Interno)  
IEAPM – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

---

Prof. Dr. Eduardo Vianna de Almeida (Membro Externo)  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Jean Louis Valentin (Suplente)  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Arraial do Cabo, RJ

2019

*Dedico esta dissertação a todos os brasileiros que acreditam na educação como força transformadora da sociedade.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo em todos os momentos e por não permitir que eu desanimasse no meio dessa jornada.

Ao meu orientador Dr. Lohengrin Fernandes, por toda a atenção dada desde o primeiro dia que me conheceu. Seus ensinamentos, conselhos, experiências e sua amizade foram fundamentais à minha formação profissional e pessoal.

Aos meus pais Ednaldo e Vânia, pelo amor em todos esses anos e pelo incentivo a continuar estudando.

Ao meu namorado Ramon pelo apoio e compreensão das minhas ausências na maioria dos finais de semana em prol dos estudos. Além de sempre escutar meus desabafos, histórias, explicações (ele até já sabe o que são os copépodes rs) e por se alegrar comigo a cada etapa vencida.

Às minhas amigas (e amigos) do PPGBM pelos churrascos, pelos cafezinhos sempre acompanhados de uma receitinha light, pelos dias de semana (e finais de semana) de intenso estudo compartilhando saberes acerca de cada disciplina, pelos memes via whatsapp e pelo compartilhamento das dores e alegrias da pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Plâncton que, mesmo em meio a correria com seus experimentos e atividades, sempre me ajudaram quando eu precisava.

Ao Márcio, Wanda e Judson por terem participado desse trabalho, seja através de coletas, preparação ou identificação dos copépodes.

Ao Departamento de Química e de Biotecnologia Marinha por todo o suporte durante este trabalho.

À Marinha do Brasil e ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira por ter cedido sua estrutura para que esse estudo fosse realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração – Ressurgência de Cabo Frio (PELD-RECA) pela bolsa concedida durante a realização desse estudo.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa jornada. Meu muito obrigado!

*“A lua anda devagar mas atravessa o mundo”*

*Provérbio Africano*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	3
<b>2 CAPÍTULO I: “SISTEMA DE IMAGEAMENTO SEMI-AUTOMÁTICO FLOWCAM COMO FERRAMENTA NA CLASSIFICAÇÃO DE COPEPODA (CRUSTACEA)”.....</b>	<b>4</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	4
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.3 RESULTADOS.....	12
2.4 DISCUSSÃO .....	20
2.5 CONCLUSÃO .....	23
<b>3 CAPÍTULO II: “DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA ASSEMBLEIA DE COPEPODA FRENTE A EVENTOS DE RESSURGÊNCIA E SUBSIDÊNCIA”.....</b>	<b>24</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.2.1 Área de Estudo .....	28
3.2.2 Procedimento de coleta.....	29
3.3 RESULTADOS.....	34
3.3.1 Parâmetros ambientais .....	34
3.3.2 Estrutura da assembleia de copépodes.....	39
3.4 DISCUSSÃO .....	49
3.4.1 Parâmetros ambientais .....	49
3.4.2 Estrutura da assembleia de copépodes.....	50
3.5 CONCLUSÃO .....	53
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACAS – Água Central do Atlântico Sul

AC – Água Costeira

AT – Água Tropical

CB – Corrente do Brasil

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ESD – Equivalent Spherical Diameter

FlowCAM – Flow Cytometer And Microscopy

°C - Graus Celsius

µm - Micrômetro

Org.m<sup>-3</sup> - Organismos por metro cúbico

PELD-RECA – Pesquisas Ecológicas de Longa Duração da Ressurgência de Cabo Frio

T - Temperatura

TSM – Temperatura da superfície do mar

VSP – Visual Spreadsheet

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Segmentação do corpo de um copépode. P = prossoma; U = urossoma.....	4
Figura 1.2 Sequência de etapas automáticas de remoção de fundo (preto), fundo (cinza) e suavização de apêndices para medição dos eixos da elipse e estimativa do comprimento do prossoma. A) imagem original obtida pela FlowCAM; B) imagem resultante após remoção de fundo preto; C) imagem resultante após remoção de fundo cinza; e D) imagem de elipses circunscritas com eixo maior $\geq 100\mu\text{m}$ .....	12
Figura 1.3 Correlação entre a área ( $\text{pixel}^2$ ) e o comprimento do prossoma ( $\text{pixel}$ ) dos copépedes.....	13
Figura 1.4 Correlação entre o diâmetro ESD (VSP) e o comprimento do prossoma dos copépedes (Algoritmo no ImageJ). N=76.671 imagens. Esquerda) Relação linear: comprimento do prossoma= a (diâmetro ESD); Direita) Relação logarítmica: comprimento do prossoma= $f(x)=\log_a(\text{diâmetro})$ .....	14
Figura 1.5 Imagens de copépedes segmentadas com superposição da circunferência (círculos azuis superpostos) utilizada pelo VSP para estimativa do Diâmetro Esférico Equivalente (ESD, linha preta). Note as discrepâncias em relação ao Comprimento do Prossoma (linha branca) na maioria das imagens selecionadas.....	15
Figura 1.6 Correlação entre a estimativa da abundância total de copépedes mensurada por duas técnicas distintas: FlowCAM e microscopia óptica convencional.....	16
Figura 1.7 Correlação entre a estimativa da abundância total de copépedes e da abundância de copepoditos da espécie <i>Paracalanus quasimodo</i> .....	17
Figura 1.8 Dispersão temporal da abundância total de copépedes (linha preta contínua) e da abundância total de <i>Paracalanus quasimodo</i> (linha cinza contínua) estimadas pela FlowCAM e pela microscopia óptica convencional.....	18
Figura 1.9 Correlação entre a estimativa da biomassa mensurada pela FlowCAM e pela balança (peso úmido).....	19
Figura 2.1 Mapa de localização do município de Arraial do Cabo, RJ.....	28
Figura 2.2 Variação interanual da TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante a série temporal.....	35
Figura 2.3 Variação sazonal da TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante a série temporal.....	35
Figura 2.4 Variação interanual da concentração de clorofila-a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) durante a série temporal.....	36

Figura 2.5 Variação sazonal da concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) durante a série temporal.....	37
Figura 2.6 Correlação entre TSM e concentração de clorofila-a durante a série temporal.....	38
Figura 2.7 Média mensal da TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) e da concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) durante a série temporal.....	38
Figura 2.8 Histograma do grupo I ( $100 - 500\mu\text{m}$ ).....	39
Figura 2.9 Histograma do grupo II ( $501 - 1000\mu\text{m}$ ).....	40
Figura 2.10 Proporção de ocorrência da razão entre copépodes da classe de tamanho I ( $<500\mu\text{m}$ ) e copépodes da classe de tamanho II ( $>501\mu\text{m}$ ).....	40
Figura 2.11 Frequência de ocorrência de copépodes da classe de tamanho I ( $<500\mu\text{m}$ ; coluna preta) e copépodes da classe de tamanho II ( $>501\mu\text{m}$ ; coluna cinza) durante a série temporal.....	41
Figura 2.12 Distribuição interanual da abundância de copépodes durante a série temporal.....	43
Figura 2.13 Distribuição sazonal da abundância de copépodes durante a série temporal.....	44
Figura 2.14 Distribuição interanual da biomassa de copépodes durante a série temporal.....	46
Figura 2.15 Distribuição sazonal da biomassa de copépodes durante a série temporal.....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Coeficiente de Correlação Produto-Momento de Pearson R ( $R^2$ ) para os parâmetros estimados automaticamente (área, eixo maior da elipse, eixo menor da elipse e diâmetro Feret) e o prossoma dos copépodes em vista lateral e/ou dorsal.....	13
Tabela 1.2: Estimativa do erro residual (Soma e média dos quadrados dos desvios) das funções linear ( $y=ax$ ) e logarítmica ( $y=\log_{10}(x)$ ), e Coeficiente de Correlação Linear (R) da estimativa do comprimento do prossoma (variável dependente Y) a partir do diâmetro ESD (variável independente X).....	14
Tabela 1.3: Exemplos de medições realizadas para uma mesma partícula pela FlowCAM e pelo algoritmo criado no ImageJ.....	15
Tabela 1.4 Correlação Linear entre as distintas estimativas da abundância das espécies e/ou estádios em Copepoda mais frequentes durante a série temporal.....	16
Tabela 2.1 Estatística descritiva calculada para os parâmetros ambientais (temperatura da superfície do mar e concentração de clorofila-a), nos anos de 2010 a 2014.....	34
Tabela 2.2 Porcentagem (%) de ocorrência de copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu$ m) e copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu$ m) frente aos eventos de ressurgência e subsidência.....	42
Tabela 2.3 Estatística descritiva calculada para a abundância de copépodes, nos anos de 2010 a 2014.....	42
Tabela 2.4 Modelo de regressão linear múltipla para a abundância de copépodes tendo a TSM e a concentração de clorofila-a como variáveis preditoras.....	45
Tabela 2.5 Estatística descritiva calculada para a biomassa de copépodes, nos anos de 2010 a 2014.....	45
Tabela 2.6 Modelo de regressão linear múltipla para a biomassa de copépodes tendo a TSM e a concentração de clorofila-a como variáveis preditoras.....	48

## RESUMO

Um dos grandes desafios do monitoramento de ecossistemas marinhos é reduzir o tempo gasto em procedimentos de laboratório, sem perder a capacidade de analisar um grande volume de dados. Com o intuito de otimizar ambos aspectos, muitos sistemas semi-automáticos de imageamento têm sido desenvolvidos em todo o mundo nos últimos anos. Nessa tendência, o presente estudo busca adotar o sistema de imageamento FlowCAM (*Fluid Imaging Technologies*, Maine, USA) como uma ferramenta para monitorar as alterações na assembleia de copépodes associadas aos ciclos de ressurgência. Para tal, buscou-se os seguintes objetivos: avaliar a eficácia do sistema de imageamento semi-automático denominado FlowCAM e avaliar a variação sazonal e interanual na estrutura das classes de tamanho de copépodes frente às oscilações na temperatura da superfície do mar e da concentração de clorofila-a. Coletas mensais foram realizadas entre janeiro de 2010 a dezembro de 2014, na Ilha do Cabo Frio em Arraial do Cabo, RJ. Imediatamente após as coletas, foram medidos a temperatura da superfície do mar e a concentração de clorofila-a. Um total de 180 amostras de plâncton foram analisadas e os copépodes (menores que 1000  $\mu\text{m}$ ) foram classificados de acordo com suas características morfométricas por meio do *Visual Spreadsheet Software* (VSP). Subamostras de 2010 a 2012 foram analisadas em microscopia óptica convencional para validar as contagens obtidas na série temporal. Todas as imagens obtidas pelo VSP foram analisadas posteriormente por um algoritmo criado no ImageJ para mensurar o comprimento do prossoma dos copépodes. As medidas dos copépodes feitas pelo VSP foram positivamente correlacionadas ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 0,95$ ) às obtidas pelo algoritmo em ImageJ. No total, 76.671 copépodes foram medidos e classificados em dois grupos distintos: copépodes de pequeno porte ( $< 500\mu\text{m}$ ) dominantes em águas quentes e copépodes de grande porte ( $\geq 501\mu\text{m}$ ) dominantes em águas frias e ressurgidas. *Paracalanus quasimodo* foi a espécie mais bem representada entre a assembleia de copépodes ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 0,71$ ). A abundância, biomassa e o comprimento do prossoma da assembleia de copépodes variou ao longo de toda a série temporal apresentando média (e desvio padrão) 563  $\text{org.m}^{-3}$  ( $\pm 530$ ), 3,4  $\text{mg C m}^{-3}$  ( $\pm 2,8$ ) e 353  $\mu\text{m}$  ( $\pm 79$ ; copépodes de pequeno porte) - 634  $\mu\text{m}$  ( $\pm 114$ ; copépodes de grande porte) respectivamente. Os períodos de ressurgência, quando os copépodes de grande porte dominaram, foram marcados por maior abundância e biomassa, mas não pela concentração de clorofila-a. Houve indícios de que o zooplâncton controlou o crescimento do fitoplâncton durante a ressurgência, levando a baixas concentrações de clorofila-a. De qualquer forma, o acoplamento do algoritmo ImageJ às medidas obtidas pelo

VSP revelou uma boa correlação com as técnicas tradicionais, como a microscopia, no monitoramento de mudanças sazonais e interanuais na abundância e na estrutura de tamanho dos copépodes.

**Palavras-chave:** Copépodes, análise semi-automática, algoritmo, classes de tamanho, série temporal, ecologia pelágica.

## ABSTRACT

One of the biggest challenge in monitoring marine ecosystems is to reduce the time spent in laboratory procedures while increasing capacity of big data analyses. In order to optimize both issues, many semi-automatic imagery systems have been developed worldwide last years. Following this trend, the current study aimed to adopt the semi-automatic Imagery System FlowCAM (*Fluid Imaging Technologies*, Maine, USA) as a tool to monitor changes in copepod assemblage related to upwelling cycles. The objectives of this study was to evaluate the effectiveness of the FlowCAM semi-automatic imaging system, and to evaluate the seasonal and interannual variation in the structure of copepod size in relation to the oscillations in the sea surface temperature and the chlorophyll-a concentration. Changes in copepod abundance, size-structure, and biomass were addressed based on zooplankton samples taken monthly from January 2010 to December 2014. Sea surface temperature (SST) and Chlorophyll a were measured immediately after sampling. In total, 180 samples were analyzed and the copepods (smaller than 1000 $\mu\text{m}$ ) were classified according to its properties by means of Visual Spreadsheet Software (VSP). Subsamples from 2010 to 2012 were also counted and measured by traditional microscopy technique in order to validate the whole time series. All images from VSP were post-analyzed by an algorithm specially designed in ImageJ to measure copepods prosome. Copepod measurements done in VSP were positively correlated ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.95$ ) to those obtained in ImageJ algorithm. In total, 76.671 copepods were measured and then sorted into two distinct groups: small copepods ( $< 500\mu\text{m}$ ) that dominate in warm waters, and large copepods ( $\geq 501\mu\text{m}$ ) that dominate in cold upwelled waters. *Paracalanus quasimodo* was the most well represented species among copepod assemblage ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.71$ ). Abundance, biomass, and prosome size of copepod assemblage over the entire time series averaged (and standard deviation) respectively 563  $\text{N}\cdot\text{m}^{-3}$  ( $\pm 530$ ), 3.4  $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}$  ( $\pm 2.8$ ), and 353  $\mu\text{m}$  ( $\pm 79$ ; smaller copepods) – 634  $\mu\text{m}$  ( $\pm 114$ ; larger copepods). Upwelling periods, when larger copepods dominate, are marked by increased abundance and biomass, but no Chlorophyll a. We hypothesized that zooplankton controlled phytoplankton growth during upwelling, leading to low chlorophyll-a concentration. Anyway, the coupling of the ImageJ algorithm to VSP measurements revealed good correlation to traditional techniques as microscopy in monitoring seasonal and interannual changes in copepod abundance and size-structure.

**Keywords:** Copepods, semi-automatic analysis, algorithm, size class, time series, pelagic ecology.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância dos oceanos para a humanidade ressalta números tão expressivos como o massivo recobrimento (70%) da superfície da Terra, a produção da maior parte da matéria orgânica nova a partir da luz solar (50% da Produção Primária Global) (DANOVARO et al., 2011) e o acúmulo de mais de 50 vezes a quantidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera (EUZEN et al., 2017). Valores como esses dimensionam a importância dos oceanos para a vida, mas também destacam a importância de se acompanhar ocasionais mudanças e seus efeitos no bioma marinho.

Dentre os organismos potencialmente mais afetados por oscilações naturais ou antrópicas nos oceanos pode-se citar os organismos planctônicos. Esses organismos pertencem a diversos grupos taxonômicos de diferentes tamanhos, e são a base da cadeia alimentar marinha (BOLTOVSKOY, 1981). Eles possuem grande capacidade natatória que na maioria das vezes é limitada pelas correntes marinhas (LALLI; PARSONS, 1997). Ademais, seus ciclos fenológicos têm estreita relação com a temperatura, a concentração de CO<sub>2</sub> e a concentração de nutrientes nos mares (JI et al., 2010; HORNE et al., 2016).

De acordo com Brandini et al., (1997), mudanças em todos os níveis tróficos do ecossistema marinho podem ser explicadas a partir de mudanças na comunidade planctônica. Devido ao seu caráter dinâmico, com altas taxas de perda e reprodução, alterações físico-químicas no ambiente marinho são rapidamente percebidas pelas comunidades planctônicas. Ademais, uma comunidade planctônica é estabelecida de acordo com os ciclos de variação nos parâmetros físicos, químicos e biológicos da região à qual ela está localizada, respeitando as condições meteorológicas, geomorfológicas, o regime hidrográfico e as ações antropogênicas no meio. Em síntese, as condições ambientais locais, as fontes de alimento e as interações na cadeia trófica definem a dinâmica e a estrutura das comunidades planctônicas (HART; BYCHEK, 2011), as quais podem ser usadas como um diagnóstico, por exemplo, do status da produção primária do bioma marinho.

Estudos de monitoramento ecológico demandam tempo e profissionais altamente qualificados para estimar os impactos que atividades antrópicas e até mesmo as mudanças climáticas causam no ecossistema (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998). Para uma análise rápida da comunidade planctônica, sistemas de imageamento semi-automático tem sido desenvolvidos ao redor do mundo (BENFIELD et al., 2007). A maioria desses sistemas

possuem câmeras acopladas que filmam ou fotografam as partículas presentes no meio, além de usarem algoritmos para estimar a abundância e a biomassa e para medir o tamanho das partículas (CULVERHOUSE et al., 2006; ÁLVAREZ; LÓPEZ-URRUTIA; NOGUEIRA, 2012). Portanto, tem-se uma rápida resposta a respeito de quais grupos planctônicos são encontrados, além de suas características morfométricas.

Diante do cenário apresentado, esta dissertação foi escrita em dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta e discute a eficiência da análise de copépodes (inferiores a 1000  $\mu\text{m}$ ) a partir da utilização de um sistema de imageamento semi-automático. Para tal recorreu-se à microscopia óptica convencional, ao software ImageJ e à FlowCAM®, como um mecanismo semi-automatizado e ainda em desenvolvimento, para contagem e medição dos copépodes.

O segundo capítulo faz um estudo de caso para a região de Arraial do Cabo com base na aplicação dessas tecnologias em condições reais. Assim, esse capítulo apresenta e discute a distribuição temporal da assembleia de Copepoda durante eventos de ressurgência e subsidência. A abundância, biomassa e tamanho dos copépodes foram analisados frente às variáveis ambientais de temperatura da superfície do mar e concentração de clorofila-a.

## 1.1 OBJETIVOS

A pesquisa “Distribuição Temporal de Copepoda por meio de Imageamento Semi-Automático na Região de Ressurgência em Arraial do Cabo, RJ” é um projeto vinculado ao Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração da Ressurgência de Cabo Frio (PELD-RECA) que tem por macro objetivo o monitoramento de longo prazo das interferências antrópicas no ecossistema da ressurgência de Cabo Frio.

O presente trabalho teve como objetivo geral implantar em rotina o monitoramento das variações no mesozooplâncton, com ênfase em Copepoda, por meio de imageamento que contribua para o PELD-RECA em longo prazo.

A hipótese central que norteia essa dissertação prediz que a FlowCAM é uma ferramenta eficiente para contagem e medição de copépodes em escala temporal adequada ao monitoramento das variações na estrutura da assembleia de copépodes (inferiores a 1000  $\mu\text{m}$ ) frente à dinâmica dos sistemas de ressurgência e subsidência. Para testar a hipótese, foram elaborados objetivos específicos para cada capítulo:

- a) Avaliar a eficácia do sistema de imageamento semi-automático denominado FlowCAM, combinado ao desenvolvimento de um algoritmo específico para copépodes pelo software ImageJ, como ferramenta para estimativa da abundância e da biomassa de Copepoda, a partir da medição das características morfométricas, no primeiro capítulo.
- b) Avaliar a variação sazonal e interanual na estrutura das classes de tamanho de copépodes, frente às oscilações na temperatura da superfície do mar e concentração de clorofila-a, no segundo capítulo.

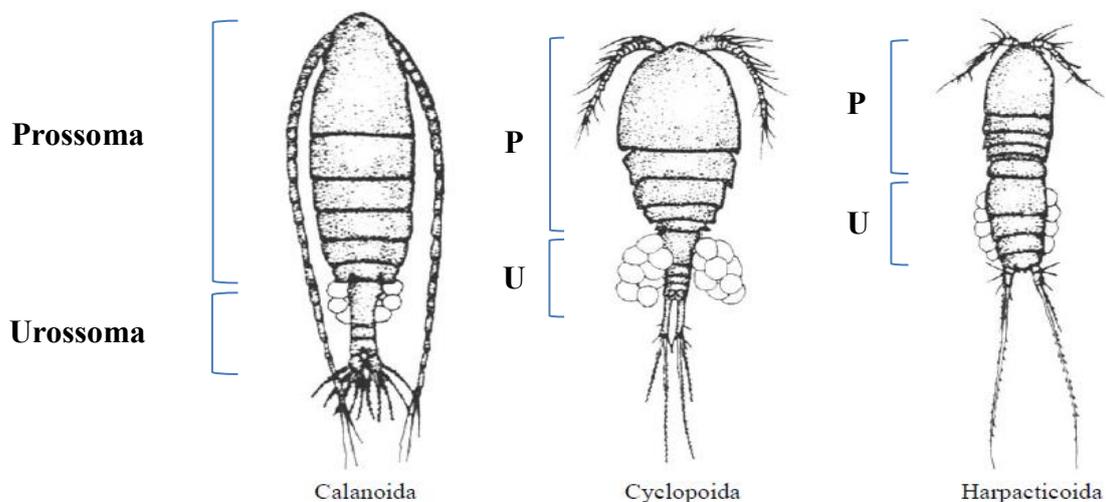
## 2 CAPÍTULO I: “SISTEMA DE IMAGEAMENTO SEMI-AUTOMÁTICO FLOWCAM COMO FERRAMENTA NA CLASSIFICAÇÃO DE COPEPODA (CRUSTACEA)”.

### 2.1 INTRODUÇÃO

Copépodes são microcrustáceos, que geralmente dominam diversas classes de tamanho do mesozooplâncton, sendo os mais importantes em termos de diversidade, abundância e biomassa (DIAS; ARAÚJO, 2006; CAMPOS, 2014). Podem ser encontrados em ambientes dulciaquícolas, estuarinos e marinhos, apresentando-se adaptados a uma grande variação de temperatura e regimes de salinidade (DIAS; ARAÚJO, 2006). Os copépodes possuem diversos hábitos alimentares, podendo ser filtradores, herbívoros, carnívoros, onívoros, detritívoros ou parasitas (BRANDINI et al., 1997; TURNER, 2004). Eles ainda são considerados os principais responsáveis pela produção secundária nos oceanos e servem de alimento para diversas espécies de peixes (FERNANDES; NETTO; COUTINHO, 2017).

O corpo de um copépole é dividido em duas porções: uma porção anterior e uma porção posterior. A porção anterior é denominada prossoma e é composta pelos apêndices cefálicos, cefalossoma e somitos torácicos. A região posterior é denominada urossoma e é composta pelos somitos genitais e pela furca (BOLTOVSKOY, 1981; WITTY, 2004; DIAS; ARAÚJO, 2006) (Figura 1.1).

Figura 1.1: Segmentação do corpo de um copépole. P = prossoma; U = urossoma.



Fonte: Modificado de Smith e Fernando, 1978

A análise taxonômica e quantitativa do plâncton tradicionalmente é feita através da microscopia óptica. Esse método utiliza um microscópio com o objetivo de identificar, classificar e contar a amostra que está sendo analisada. Porém, é um método que exige tempo, impondo limitações no número de amostras a serem processadas, e um profissional altamente especializado na identificação das espécies (ÁLVAREZ et al., 2014; LE BOURG et al., 2015). Apesar dessa técnica tradicional ser considerada a mais precisa, nas últimas três décadas várias tecnologias foram desenvolvidas com o objetivo de otimizar a identificação e contagem de um elevado volume de amostras planctônicas através de sistemas de imageamento.

O presente trabalho optou por utilizar uma técnica para medir, contar e classificar as amostras zooplantônicas através do equipamento “*Flow Cytometer and Microscopy - FlowCAM*” (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; JAKOBSEN; CARSTENSEN, 2011). A FlowCAM é um sistema que combina a função de um microscópio e um citômetro de fluxo através de um sistema de imageamento semi-automático (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998). Além de classificar taxonomicamente os organismos processados, a FlowCAM mensura as características morfométricas e estima a abundância e biomassa das partículas em processamento.

Benfield et al. (2007) e Bi et al. (2015) realizaram uma síntese dos sistemas de imageamento que tem sido utilizados para processamento de amostras planctônicas. Esses sistemas podem ser usados *in situ*, como o *Video Plankton Recorder – VPR* (BENFIELD et al., 1996; TANG et al., 1998), *Underwater Vision Profiler – UVP* (GORSKY et al., 2002), *ZOOplankton VISualization System – ZOOVIS* (TREVORROW; MACKAS; BENFIELD, 2005), *Lightframe On-sight Keyspecies Investigation System - LOKI* (SCHULZ et al., 2009; SCHMID et al., 2016), *Shadow Image Particle Profiling Evaluation Recorder – SIPPER* (LUO et al., 2004), *In Situ Ichthyoplankton Imaging System – ISIS* (COWEN; GUIGAND, 2008) e *FlowCytobot* (SOSIK; OLSON, 2007). Ou portáteis em laboratório, como o *ZooScan* (GROSJEAN et al., 2004), e *Flow Cytometer e Microscopy – FlowCAM* (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; ZARAUZ; IRIGOIEN; FERNANDES, 2009).

Sieracki et al. (1998) foram pioneiros nos estudos sobre a análise do microzooplâncton utilizando a FlowCAM. Os autores demonstraram como ocorre a variação do microzooplâncton de acordo com as mudanças nas massas d’água, a partir da análise da abundância e biomassa feita pela FlowCAM.

Um estudo comparativo da alimentação de copépodes utilizando microscópio convencional e a FlowCAM realizado por IDE et al. (2008) concluiu que a FlowCAM

conseguiu distinguir o zooplâncton do fitoplâncton através da intensidade da fluorescência, mostrando ser uma ferramenta eficiente para estudos de onivoria. Ela também obteve contagens de abundância similares as contagens realizadas pelo microscópio convencional. Embora a identificação taxonômica obtida através da FlowCAM seja feita ao nível de gênero, a utilização da mesma foi satisfatória para o estudo em questão. Além de reduzir o tempo para processamento da amostra, que em média demorou cerca de 2 horas quando utiliza-se o microscópio convencional, em 10 minutos a amostra foi processada e analisada pela FlowCAM.

Álvarez et al. (2011) realizaram um estudo comparativo do tamanho estrutural da comunidade planctônica de amostras fixadas utilizando microscópio convencional e a FlowCAM. Os autores concluíram que a FlowCAM pode ser usada para estimar o tamanho da comunidade planctônica fixada, pois a sua estimativa foi similar a estimativa realizada pelo microscópio convencional. Porém, ao comparar amostras vivas, a FlowCAM não foi uma boa ferramenta pois a estimativa foi muito diferente da realizada pelo microscópio convencional.

Outro estudo comparativo sobre classificação da comunidade metazooplanctônica utilizando microscópio convencional e a FlowCAM foi realizado por Le Bourg et al. (2015). A classificação da comunidade metazooplanctônica foi feita ao nível de ordem e os autores não encontraram diferença significativa nas abundâncias entre as duas técnicas. Além de evidenciarem a vantagem em estudar a comunidade zooplanctônica pela FlowCAM visto que as imagens obtidas após o processamento das amostras ficam disponíveis a comunidade científica e pode-se verificar a precisão dos resultados a qualquer momento.

Recentemente, Bonecker et al. (2017) estudaram a estrutura espacial e temporal nas comunidades micro e mesozooplanctônicas na Bacia de Campos. Os autores processaram as amostras obtidas na FlowCAM e estimaram a abundância e biomassa durante dois períodos (chuvoso e seco), e identificaram os principais grupos componentes do micro e mesozooplâncton nestes períodos. Eles identificaram 23 grupos microzooplanctônicos, 32 grupos mesozooplanctônicos e constataram que o grupo Radiolaria dominou o microzooplâncton, enquanto o grupo Copepoda foi mais abundante na presença de todas as massas d'água que banhavam a região e em todos os períodos estudados.

Karnan et al. (2017) compararam a estimativa do biovolume calculado pelo algoritmo do diâmetro baseado na área e pelo algoritmo do diâmetro esférico equivalente dos copépodes. Os autores concluíram que somente a estimativa do biovolume feita pelo algoritmo do diâmetro baseado na área foi mais eficiente que a estimativa feita pelo microscópio convencional. Em contrapartida, a estimativa feita pelo diâmetro esférico equivalente foi menos eficiente do que

a estimativa feita pelo microscópio convencional, pois o algoritmo do diâmetro esférico equivalente superestimou o real biovolume dos gêneros dos copépodes.

Como pôde-se observar, grande parte dos estudos os quais utilizaram o sistema de imageamento semi-automático FlowCAM analisaram a comunidade fitoplanctônica, a nanoplanctônica ou a microzooplanctônica. Poucos estudos foram feitos a respeito da utilização da FlowCAM na análise semi-automática da comunidade mesozoplanctônica, particularmente em copépodes menores que 1000 $\mu$ m. Inserido nesse contexto e considerando a importância ecológica de Copepoda no ecossistema marinho, os objetivos do presente estudo foram: I - Avaliar a eficácia do sistema de imageamento semi-automático FlowCAM como ferramenta para estimativa da abundância e biomassa de Copepoda, a partir da medição das características morfométricas. II - Implantar em rotina o monitoramento das variações no mesozoplâncton, com ênfase em Copepoda, por meio de imageamento que contribua para o PELD-RECA em longo prazo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de plâncton são coletadas semanalmente desde outubro de 1994, em triplicatas em uma estação fixa próximo à Ilha do Cabo Frio e somam até o presente mais de 3000 amostras como parte integrante do Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD, CNPq) da Ressurgência de Cabo Frio (PELD-RECA, [cnpq.br/sítios-peld](http://cnpq.br/sítios-peld)). Um subconjunto de 180 amostras foi analisado no presente estudo em distintas perspectivas, considerando aquelas coletadas entre janeiro de 2010 a dezembro 2014. As coletas foram feitas através de arrastos horizontais subsuperficiais (~1 metro de profundidade), com duração de 3 minutos, com rede cilíndrico-cônica de abertura de 40 cm de boca, malha de 100 $\mu$ m com fluxômetro calibrado (Modelo 2030R Mechanical Flowmeter, General Oceanics Inc., Miami, FL) acoplado à boca da rede para estimativa do deslocamento e, por consequência, do volume filtrado. Em cada coleta foram obtidas três amostras sequenciais, destinadas às análises quali- e quantitativas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em solução aquosa de formaldeído 4% neutralizado com tetraborato de sódio. Em laboratório, as amostras coletadas foram divididas em duas partes com o fracionador do tipo FOLSOM (BOLTOVSKOY, 1981). Uma parte foi guardada para posterior análise pela microscopia óptica convencional e a outra parte da amostra foi destinada ao processamento e análise através da FlowCAM. Apenas as amostras de 2010 a 2012 foram processadas em microscopia óptica convencional. Todo o conjunto de 2010 a 2014 foi processado pela FlowCAM.

Do material destinado ao processamento e análise através da FlowCAM, uma alíquota foi retirada com uma pipeta stempel de 1ml. Essa alíquota foi filtrada previamente em uma malha de Nylon (Nytex) de 1000 $\mu$ m e lavada com água destilada até um volume final, que variou entre 50 e 100 ml, para que todos os organismos maiores que 1000 $\mu$ m fossem removidos. Somente as partículas maiores que 100 $\mu$ m e menores que 1000 $\mu$ m foram fotografadas, medidas e classificadas. As análises foram feitas no Visual Spreadsheet Software (VSP), versão 3.4.5 (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012) (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012) (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012) (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012).

Para processamento da amostra, foi utilizado o modelo Benchtop B3 FlowCAM configurada no modo de autoimagem com objetiva de 2x, célula de fluxo de 2000 $\mu$ m de largura e 200 $\mu$ m de profundidade. As imagens foram capturadas em resolução de 2400 dpi (pixels por

polegada), com tamanho de 1024 x 768 pixels. Um agitador magnético foi utilizado para manter as partículas em suspensão e a concentração da subamostra homogênea durante a análise.

Após o processamento da subamostra, procedeu-se à classificação e medição dos copépodes no VSP a partir da montagem de uma biblioteca de treinamento do software. Cerca de 100 imagens de copépodes foram selecionadas para a criação de um filtro digital (biblioteca de treinamento) com base nas características morfométricas. A classificação das partículas em copépodes foi checada individualmente para todas as amostras a fim de eliminar os erros de automação. Em seguida, foram criados filtros digitais de classificação em Copepoda.

Para avaliar a variação na estrutura de classes de tamanhos dos copépodes ao longo do tempo, os organismos foram medidos em distintos parâmetros. Para as estimativas de comprimento do organismo, foi utilizado o comprimento do prossoma. Essa estimativa foi baseada na razão entre os eixos maior e menor da elipse circunscrita (Aspect Ratio), que levam em consideração também a posição do copépode na imagem.

Para medição do comprimento do prossoma dos copépodes, foi desenvolvido um algoritmo específico em ImageJ para aplicação às imagens obtidas na FlowCAM. Em primeiro lugar, foi removido automaticamente o fundo preto (background). Em seguida, foi removido o fundo cinza e mantido apenas o organismo, com suavização de antenas e urossoma, por meio da seleção de limiar do tom de cinza (Threshold Default). Ao final, foi extraída a elipse circunscrita, a partir da qual foram tomadas as medidas dos eixos da elipse circunscrita (Figura 1.2). Um subconjunto de 62 copépodes foi escolhido ao acaso para medição manual, validação e estimativa do erro. Desses organismos foram estimados manualmente o comprimento total, o comprimento do prossoma, o ângulo do copépode na imagem e a posição (vista dorsal, lateral ou frontal). Apenas copépodes em vista dorsal e lateral foram aceitos na análise.

A partir da correlação das medidas obtidas pelo software ImageJ às medidas obtidas pelo software VSP foi definido o melhor parâmetro para estimativa do comprimento do prossoma. Originalmente, todos os valores das medidas manuais foram gerados em pixels, sendo convertidos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) na razão de  $2,97 \text{ pixels} = 1,0 \mu\text{m}$ .

Para monitorar a variação na assembleia de copépodes entre 100 e 1000  $\mu\text{m}$  ao longo do tempo, foi estimado a abundância dos organismos. A estimativa da abundância ( $\text{organismo.m}^{-3}$ ) foi feita com base nas contagens de organismos obtidos nos filtros de classificação. Para tal levou-se em consideração o volume imageado, o volume inicial da amostra, o volume da subamostra e o volume filtrado pela rede em cada arrasto, expressos pela equação:

$$Ab = \{(N*VI)/VS\} * (V0/VR), \text{ onde}$$

Ab = abundância de copépodes (organismos.m<sup>-3</sup>)

N = número de copépodes contados (organismos)

VI = volume imageado (mL)

VS = volume da subamostra (mL)

V0 = volume inicial (mL)

VR = volume filtrado pela rede (m<sup>3</sup>)

Para o cálculo do volume filtrado multiplicou-se o número de rotações do fluxômetro pela a área de abertura da boca da rede e pelo fator de calibração do fluxômetro utilizado. Ao final da análise, o cálculo da concentração de copépodes nas amostras foi comparado com as concentrações de copépodes obtidas pela microscopia óptica convencional para os anos de 2010-2012. Para tal, utilizou-se as estimativas de abundância do número total de copépodes e das espécies mais frequentes, identificadas através da microscopia óptica convencional. Para diminuir a variabilidade interna da concentração média da densidade e revelar a tendência geral, os valores foram transformados pela média móvel (janela igual a três).

Para monitorar a variação na biomassa dos copépodes entre 100 e 1000 µm ao longo do tempo, foi estimado o biovolume dos organismos. Para as estimativas de biovolume de copépodes, foi utilizado o volume esférico equivalente. As medidas de volume esférico equivalente foram baseadas no diâmetro esférico equivalente (Equivalent Spherical Diameter) estimado pela FlowCAM, que é considerada uma estimativa eficaz (ÁLVAREZ et al., 2011; ÁLVAREZ; LÓPEZ-URRUTIA; NOGUEIRA, 2012) do volume do organismo, e comparada posteriormente à medida do comprimento do prossoma calculada por meio de um algoritmo no software ImageJ. É esperada correlação positiva significativa entre o diâmetro equivalente e o comprimento do prossoma. A estimativa da biomassa (mg C.m<sup>-3</sup>) foi feita com base no volume ESD calculado após o processamento das amostras e classificação dos copépodes. Essa variável foi gerada através da fórmula do volume de uma esfera em µm<sup>3</sup>. Para converter os valores obtidos de volume em µm<sup>3</sup> para massa em mg, assumiu-se que 1 mm<sup>3</sup> equivale a 1 mg de peso úmido (HERMAN; HARVEY, 2006; SCHULTES; LOPES, 2009). A validação foi realizada pela comparação com a biomassa do seston para a amostra analisada. A biomassa do séston foi obtida previamente em balança de precisão Shimadzu 82D (e=0,0001g) pelo método do Peso Úmido (OMORI, IKEDA, 1984). Copépodes são usualmente os organismos mais abundantes

no plâncton e espera-se que haja uma correlação positiva significativa entre a biomassa do seston e a biomassa de copépodes. O valor da biomassa de copépodes foi calculado como a somatória do volume ESD de cada organismo processado, levando em consideração o volume imageado, o volume inicial da amostra, o volume da subamostra e o volume filtrado pela rede em cada arrasto, expressos pela equação:

$$B_{\text{cop}} = \{(\sum V_{\text{ESD}} * VI) / VS\} * (V0/VR), \text{ onde}$$

$B_{\text{cop}}$  = Biomassa de copépodes ( $\text{mg C.m}^{-3}$ )

$V_{\text{ESD}}$  = volume estimado equivalente ( $\text{mm}^3$ )

$VI$  = volume imageado (mL)

$VS$  = volume da subamostra (mL)

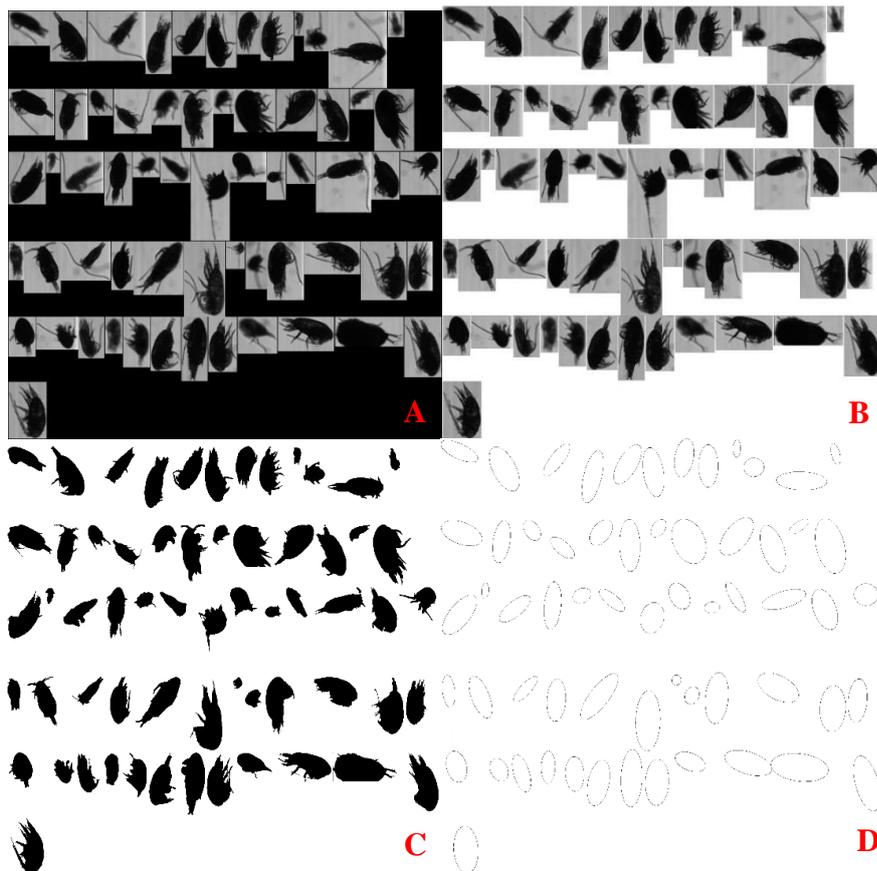
$V0$  = volume inicial de diluição (mL)

$VR$  = volume filtrado pela rede ( $\text{m}^3$ )

### 2.3 RESULTADOS

Dos 62 copépodes selecionados para o teste do algoritmo., apenas 43 (69%) estavam em posição lateral ou dorsal passível de utilização no algoritmo, dos quais apenas 37 (60%) exibiam com clareza o limite entre prossoma e urossoma para medição no ImageJ (Figura 1.2).

Figura 1.2: Sequência de etapas automáticas de remoção de fundo (preto), fundo (cinza) e suavização de apêndices para medição dos eixos da elipse e estimativa do comprimento do prossoma. A) imagem original obtida pela FlowCAM; B) imagem resultante após remoção de fundo preto; C) imagem resultante após remoção de fundo cinza; e D) imagem de elipses circunscritas com eixo maior  $\geq 100\mu\text{m}$ .



A maior correlação positiva ( $R^2=0,83$ ) foi observada entre a área do copépode estimada automaticamente pela elipse circunscrita, e o comprimento do prossoma medido manualmente

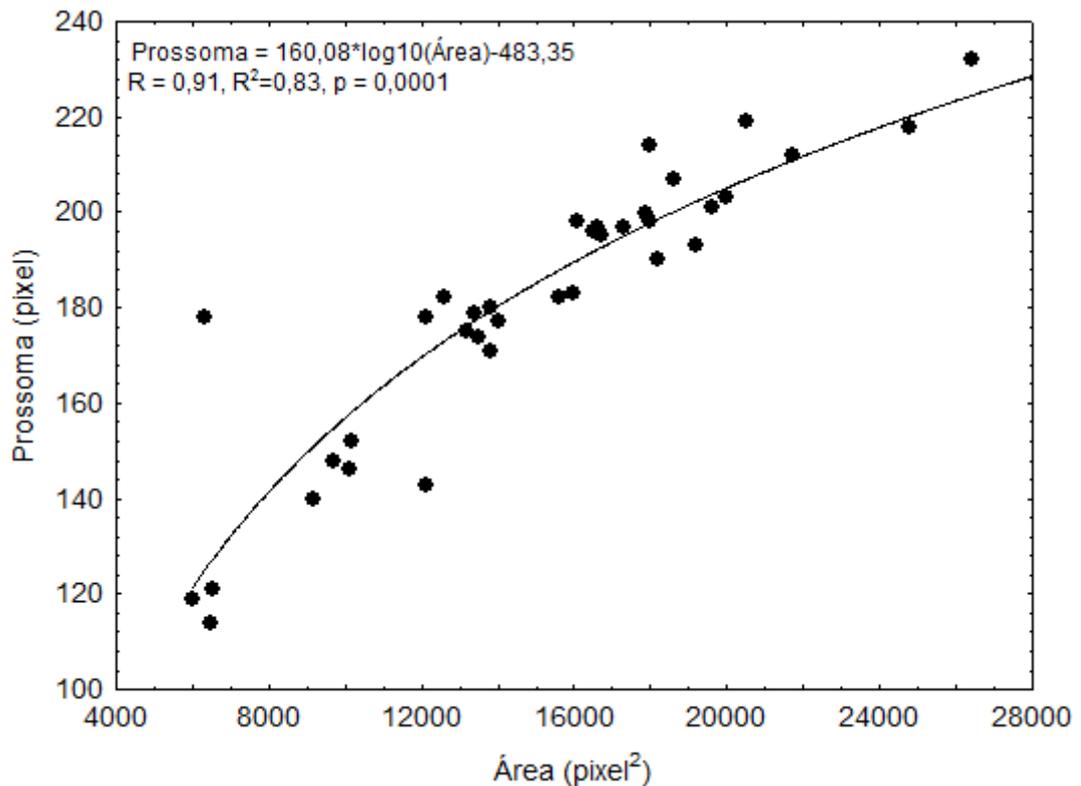
(Tabela 1.1, Figura 1.3). Essa relação entre área e comprimento foi expressa pela seguinte equação:

Comprimento do Prossoma ( $\mu\text{m}$ ) =  $((160 * \log_{10}[\text{Área em pixel}^2]) - 483) * 2,97$ , onde 2,97 = fator de calibração da FlowCAM.

Tabela 1.1: Coeficiente de Correlação Produto-Momento de Pearson R ( $R^2$ ) para os parâmetros estimados automaticamente (área, eixo maior da elipse, eixo menor da elipse e diâmetro Feret) e o prossoma dos copépodes em vista lateral e/ou dorsal.

	Área	Eixo Maior	Eixo Menor	Diâmetro Feret
<b>Prossoma</b>	0,91 (0,83)	0,81 (0,66)	0,85 (0,73)	0,86 (0,74)

Figura 1.3: Correlação entre a área ( $\text{pixel}^2$ ) e o comprimento do prossoma ( $\text{pixel}$ ) dos copépodes.



Ao todo, foram medidas 76.671 imagens de copépodes por ambos os sistemas: ImageJ e FlowCAM. Os resultados revelaram correlação positiva ( $R^2=0,95$ , linear) significativa ( $p<0,01$ ) entre o diâmetro ESD mensurado pelo software VSP (FlowCAM) e o comprimento do prossoma calculado por meio de um algoritmo no software ImageJ (Figura 1.4), com tendência a superestimar o tamanho do organismo pelo diâmetro ESD (Figura 1.5 e Tabela 1.3)

quando em relação linear ( $y=ax+b$ ). Todavia, essa tendência de superestimar o comprimento do prossoma foi reduzida em relação logarítmica ( $y=\log_a(x)$ ), cuja soma dos desvios da função (Soma dos Quadrados dos Desvios) reduz-se de  $7,2 \times 10^7$  para  $3,5 \times 10^7$  e o Coeficiente de Correlação Produto-Momento aumenta de 0,95 para 0,97 (Tabela 1.2).

Figura 1.4: Correlação entre o diâmetro ESD (VSP) e o comprimento do prossoma dos copépodes (Algoritmo no ImageJ). N=76.671 imagens.

Esquerda) Relação linear: comprimento do prossoma= a (diâmetro ESD);

Direita) Relação logarítmica: comprimento do prossoma=  $f(x)=\log_a(\text{diâmetro ESD})$ .

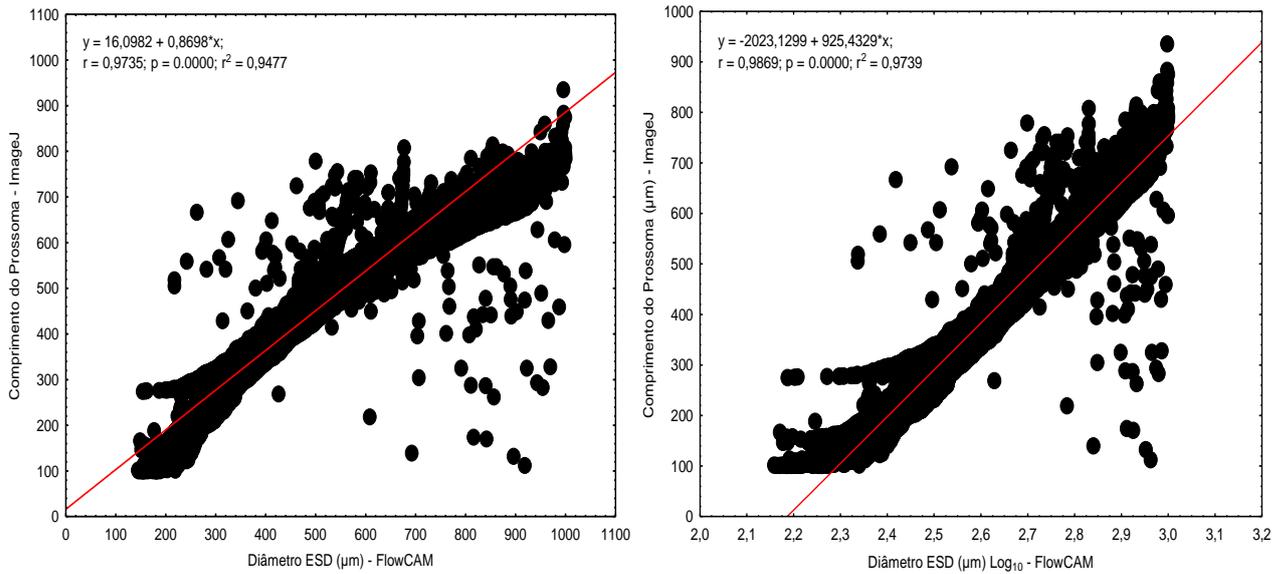


Tabela 1.2: Estimativa do erro residual (Soma e média dos quadrados dos desvios) das funções linear ( $y=ax$ ) e logarítmica ( $y=\log_{10}(x)$ ), e Coeficiente de Correlação Linear (R) da estimativa do comprimento do prossoma (variável dependente Y) a partir do diâmetro ESD (variável independente X).

Fator	Função	Soma dos quadrados dos desvios	R
Diâmetro ESD ( $\mu\text{m}$ ) X Comprimento do prossoma ( $\mu\text{m}$ )	Linear	$7,2 \times 10^7$	0,97
	Logarítmica (Base 10)	$3,5 \times 10^7$	0,99

Figura 1.5: Imagens de copépodes segmentadas com superposição da circunferência (círculos azuis superpostos) utilizada pelo software próprio da FlowCAM (VSP) para estimativa do Diâmetro Esférico Equivalente (ESD, linha laranja). Note as discrepâncias em relação ao Comprimento do Prossoma (linha branca) na maioria das imagens selecionadas.

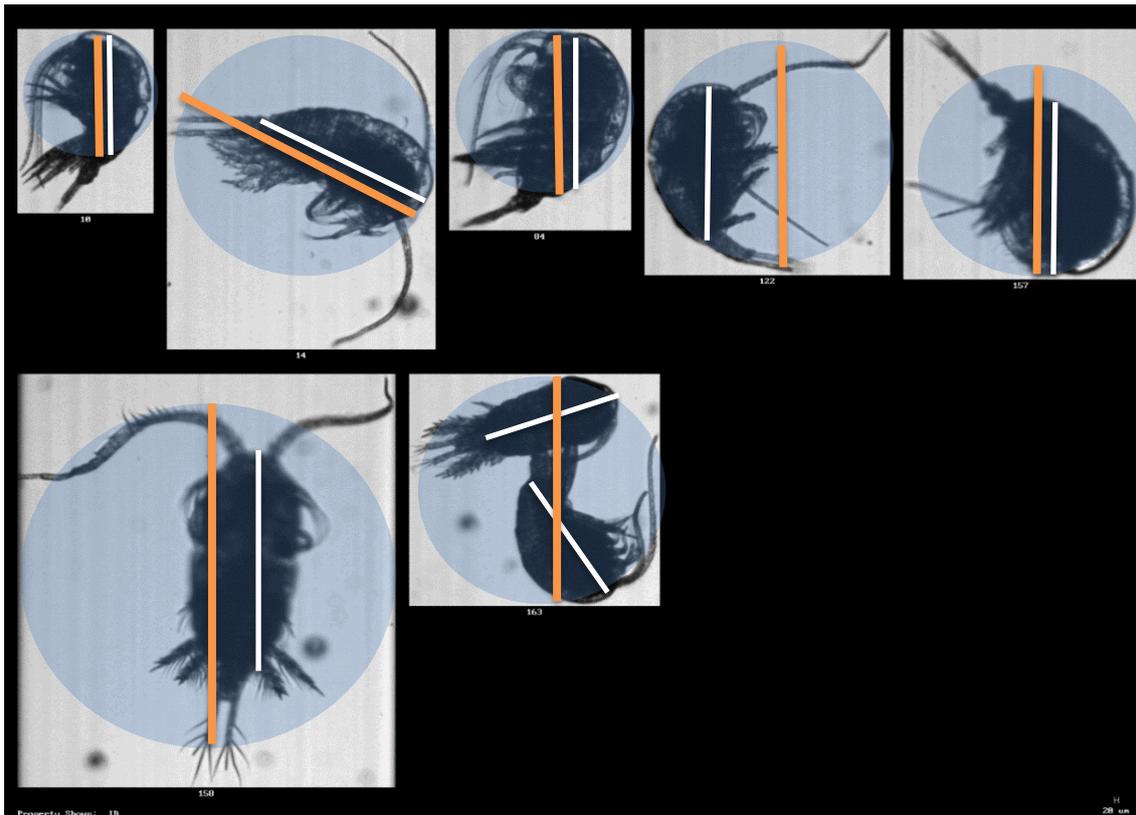
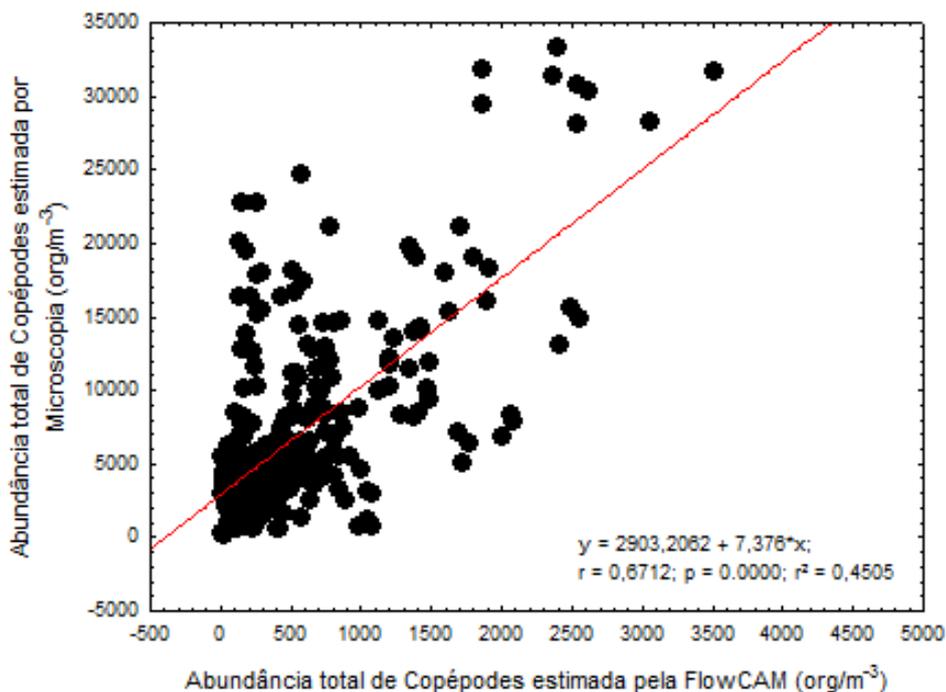


Tabela 1.3: Exemplos de medições realizadas para uma mesma partícula pela FlowCAM e pelo algoritmo criado no ImageJ.

Número da Partícula	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) ESD (VSP)	Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) do Prossoma (ImageJ)	Diferença Percentual
10	716	737	3%
14	1308	910	30%
84	884	910	3%
122	1134	890	22%
157	1099	1002	9%
158	1842	1231	33%
163 (duplo)	1088	731/751	33%/31%

Os resultados da análise da densidade de copépodes revelaram correlação positiva ( $R^2=0,45$ ) significativa ( $p<0,01$ ) entre a abundância estimada pela microscopia óptica convencional e pela FlowCAM (Figura 1.6). Todavia, as densidades estimadas pela FlowCAM se situaram abaixo daquelas esperadas, de acordo com a Microscopia, em cerca de uma ordem de grandeza.

Figura 1.6: Correlação entre a estimativa da abundância total de copépodes mensurada por duas técnicas distintas: FlowCAM e microscopia óptica convencional.



Investigações foram feitas a fim de identificar os fatores responsáveis pela subestimativa da abundância feita pela FlowCAM. Portanto, procurou-se correlacionar a estimativa da abundância total de copépodes obtidas pela FlowCAM com a estimativa da abundância obtidas pela microscopia convencional, em relação aos estádios de desenvolvimento e espécies dominantes nas amostras (Tabela 1.4).

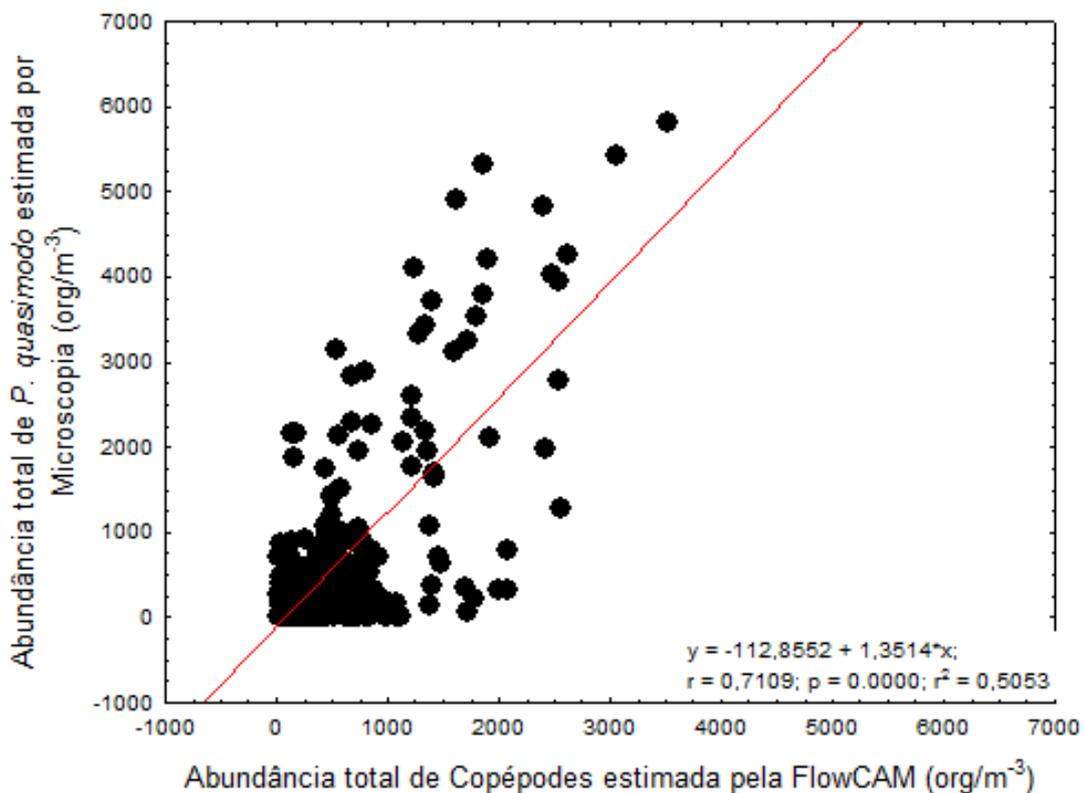
Tabela 1.4: Correlação Linear entre as distintas estimativas da abundância dos estádios e/ou espécies em Copepoda mais frequentes durante a série temporal.

Espécie / Estádio	P	R	R <sup>2</sup>
Total de copépodes	<0,01	0,67	0,45

<b>Total de Copepodito</b>	<0,01	0,61	0,37
<b><i>Paracalanus quasimodo</i></b>	<0,01	0,71	0,50
<b><i>Calanoides carinatus</i></b>	0,66	0,07	0,005
<b><i>Temora turbinata</i></b>	0,24	-0,06	0,004

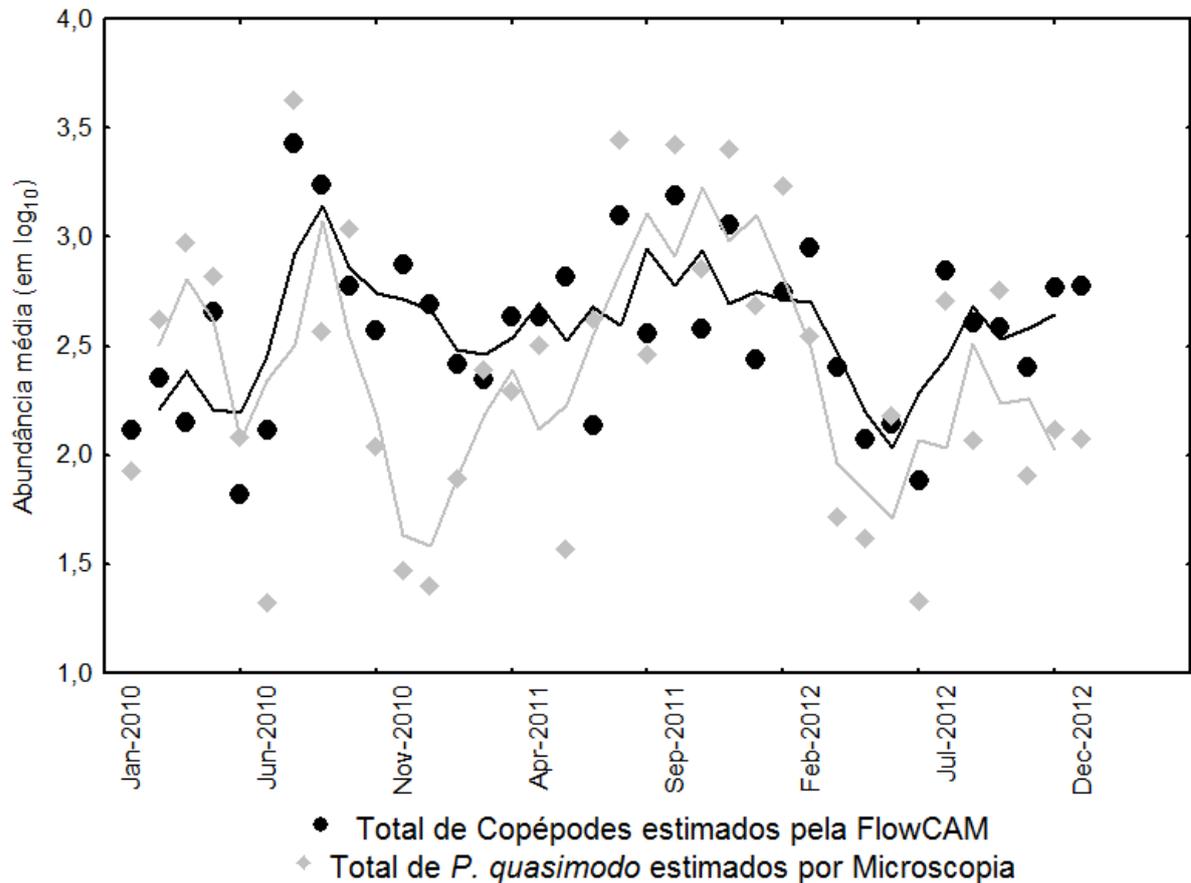
Os resultados indicam que a espécie *Paracalanus quasimodo* apresentou correlação positiva ( $R=0,71$ ) significativa ( $p<0,01$ ) com a abundância total de copépodes estimada pela FlowCAM (Figura 1.7). Por outro lado, a abundância de *Calanoides carinatus* e *Temora turbinata* não foi correlacionada à densidade total de copépodes estimada pela FlowCAM. A espécie *P. quasimodo* foi dominante durante toda a série temporal, além de ser a espécie que mais se assemelha às características morfométricas encontradas nos copépodes.

Figura 1.7: Correlação entre a estimativa da abundância total de copépodes e da abundância de copépodes da espécie *Paracalanus quasimodo*.



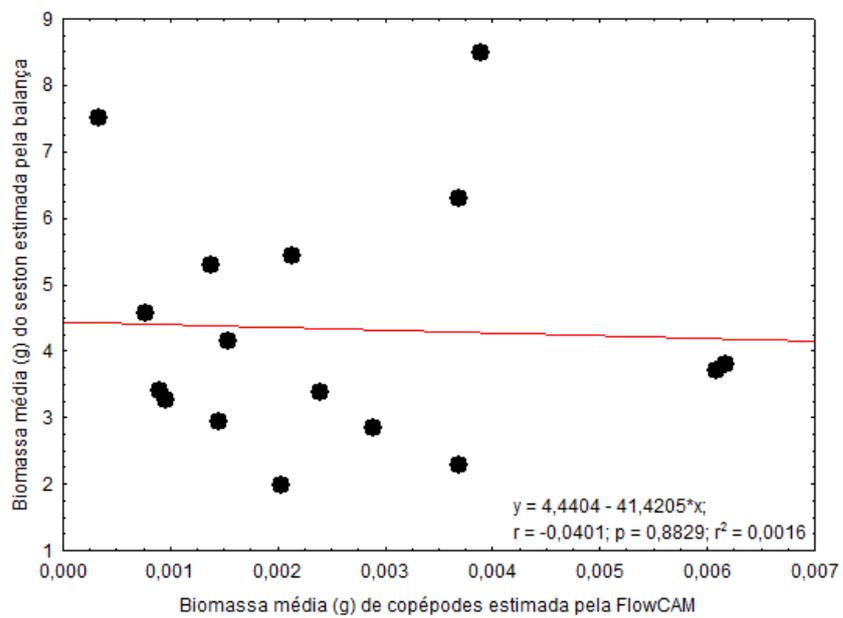
Apesar da subestimativa do valor real da abundância total de copépodes feito pela FlowCAM, ao analisar a distribuição temporal da abundância estimada pelas duas técnicas, observa-se o mesmo padrão de alternância na abundância total dos copépodes e de *P. quasimodo* durante a maior parte da série temporal (Figura 1.8).

Figura 1.8: Dispersão temporal da abundância total de copépodes (linha preta contínua) e da abundância total de *Paracalanus quasimodo* (linha cinza contínua) estimadas pela FlowCAM e pela microscopia óptica convencional.



Os resultados da estimativa da biomassa revelaram não haver correlação ( $R^2 = 0,001$ ) entre a biomassa do séston (peso úmido,  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) estimada pela balança e a biomassa dos copépodes estimada pela FlowCAM (Figura 1.9).

Figura 1.9: Correlação entre a estimativa da biomassa mensurada pela FlowCAM e pela balança (peso úmido).



## 2.4 DISCUSSÃO

A presente pesquisa realizada na Ilha do Cabo Frio foi facilitada pelo uso do sistema de imageamento semi-automático FlowCAM combinado ao desenvolvimento de um algoritmo específico para copépodes em ImageJ. Atualmente, a análise semi-automática de imagens tem sido considerada uma potencial alternativa à tradicional metodologia manual de análise das amostras de plâncton devido à otimização do processamento de grande volume de amostras em curto espaço de tempo (CULVERHOUSE et al., 2006; SIERACKI et al., 2009; JAKOBSEN; CARSTENSEN, 2011; ÁLVAREZ et al., 2014; STANISLAWCZYK et al., 2017).

O presente estudo parte da premissa de que copépodes podem ser representados como elipses em softwares que mensuram o tamanho de partículas (HERMAN, 1992). Após a conversão das partículas em elipses, a área, o eixo maior e o eixo menor passam a representar com certo grau de confiança parâmetros morfométricos relevantes dos organismos (GORSKY et al., 2010). Dentre os parâmetros mencionados anteriormente, a escolha da medida da área para mensuração do tamanho real das partículas foi feita com base na influência potencial da posição das partículas.

Os resultados revelam que a posição da partícula quando processada apenas no sistema de imageamento semi-automático FlowCAM e segundo Jakobsen; Carstensen (2011) tem efeito sobre a mensuração do seu tamanho em uma medida linear. É importante salientar que essa posição não pode ser modificada *a posteriori*, pois trata-se de uma fotografia (WONG et al., 2017). Todavia, esse efeito pode ser reduzido ao se estimar simultaneamente mais de uma medida do animal (SCHULZE et al., 2013; CAMOYING; YNIGUEZ, 2016). No presente estudo, a área da elipse, que é uma medida bidimensional (eixo menor e eixo maior), revelou melhores correlações por sofrer menos interferência da posição da partícula (FOREST et al., 2012; GORSKY et al., 2010). Por outro lado, dependendo da posição da partícula, o cálculo do diâmetro ESD, que em última análise é bidimensional, superestima o comprimento do prossoma do copépode por incluir apêndices cefálicos e urossoma.

As vantagens do uso da elipse (ImageJ) frente ao uso da esfera (diâmetro ESD - VSP) estão relacionadas à inclusão de apêndices como fonte de erro da medida (ALCARAZ et al., 2003). Essa inclusão não ocorre quando o organismo está em vista lateral, e o eixo maior se torna o melhor parâmetro para ser usado na medição do comprimento do prossoma. Por outro lado, quando o organismo não está bem posicionado, deslocando-se para uma vista frontal, por exemplo, o eixo menor ganha importância e a área passa a ser o melhor parâmetro para ser

usado na estimativa do comprimento do prossoma (SCHULTES; LOPES, 2009). Estudos realizados por Gorsky et al. (2010) utilizaram o software ImageJ para classificar e medir organismos zooplancônicos através do ZooScan. Os autores também concluíram que o formato elipse é o melhor para mensurar o comprimento do prossoma dos copépodes.

Além da posição do organismo na imagem, também afeta a medição a falta de alguma parte do corpo. No presente estudo, algumas partículas não foram fotografadas por completo e parte do seu corpo foi cortada na imagem. A FlowCAM mensurou o tamanho destas partículas mesmo estando incompletas, gerando uma medição incorreta do seu real tamanho (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012; DETMER et al., 2019); . Porém, ao processar as mesmas partículas no software ImageJ, o algoritmo complementa a partícula recortada criando uma elipse ao redor da mesma, que funciona como uma espécie de correção ao tamanho real da partícula.

Apesar dos problemas de posição (vista não-lateral ou dorsal) do copépode ao ser processado, a presença de mais de um organismo na imagem e/ou a ausência de parte do corpo durante a classificação e medição dos grupos taxonômicos, o software proprietário da FlowCAM (VSP) foi considerado eficaz nas análises morfométrica e de abundância de copépodes (inferiores a 1000  $\mu\text{m}$ ) pois apresentou um alto percentual de correlação em comparação com a mensuração feita pelo software ImageJ e pela microscopia. Resultados semelhantes foram encontrados por Sieracki; Sieracki; Yentsch (1998), ao comparar o tamanho de organismos fitoplanctônicos mensurados manualmente e pela FlowCAM, por Zarauz; Irigoien; Fernandes (2008) ao mensurar o nano e microplâncton marinho de modo manual e através da FlowCAM, e por Reynolds et al. (2010) ao comparar a variação no tamanho de partículas em águas costeiras pelo modo manual e através da FlowCAM. Além disso, um estudo realizado por Culverhouse et al. (2003) demonstrou que análises fitoplanctônicas feitas por especialistas através de microscopia óptica convencional atingiram 84-95% de acurácia, não alcançando 100% da mesma. Portanto, pode-se dizer que o sistema FlowCAM pode ser utilizado para mensurar as classes de tamanho de copépodes (inferiores a 1000  $\mu\text{m}$ ) visto que apresentou alta correlação com a mensuração manual, corroborando o que tem sido descrito na literatura.

No presente estudo, a estimativa da abundância total de copépodes feita a partir da identificação e contagem pelo VSP subestimou a densidade em cerca de uma ordem de grandeza. Resultados diferentes foram observados por Álvarez et al. (2011) ao comparar o tamanho estrutural da comunidade planctônica de amostras fixadas estimadas pela microscopia

óptica convencional e pela FlowCAM e por Le Bourg et al. (2015) ao comparar a densidade da comunidade metazooplanctônica (com variação de tamanho entre 80-1000  $\mu\text{m}$ ) estimada pela microscopia óptica convencional e pela FlowCAM. A partir da investigação dos fatores responsáveis por essa subestimativa, encontrou-se dois fatores: o primeiro foi relativo à exclusão de imagens com organismos duplicados ou triplicados; o segundo foi relativo ao tamanho das partículas, visto que a configuração da FlowCAM que permite o processamento de organismos menores que 1000 $\mu\text{m}$  (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; LE BOURG et al., 2015).

As espécies *Paracalanus quasimodo* e *Temora turbinata* foram consideradas frequentes e ocasionalmente abundantes na região do Cabo Frio, diferente do observado em relação a espécie *Calanoides carinatus* (BRANDINI et al., 1997). As espécies *Paracalanus quasimodo* e *Temora turbinata* são encontradas praticamente durante o ano todo na região do estudo (ROSA; MONTEIRO-RIBAS; FERNANDES, 2016). Entretanto, a espécie *Calanoides carinatus* é encontrada em poucos meses, usualmente em alta densidade e associada a presença de águas ressurgidas (VALENTIN; MONTEIRO-RIBAS; MUREB, 1987). Dentre as espécies citadas, *Paracalanus quasimodo* apresentou o melhor coeficiente de correlação linear quando comparado a abundância total de copépodes estimada pelo VSP. *Paracalanus quasimodo* é um copépode considerado de pequeno porte e, devido às suas características morfométricas, se adequa a configuração de processamento e análise pela FlowCAM. Portanto, pode-se inferir que o tamanho dos copépodes foi o principal fator limitante na estimativa da abundância dos copépodes pela FlowCAM. De forma similar, Ide et al. (2008), Álvarez et al. (2011) e Le Bourg et al. (2015) encontraram altas correlações entre a abundância de organismos planctônicos estimada através da microscopia óptica convencional e da FlowCAM.

O uso do sistema de imageamento semi-automático FlowCAM permitiu que cinco anos de coletas fossem processados e analisados em um curto intervalo de tempo e de forma completa, quando comparado ao tempo que seria utilizado para identificar, contar e medir copépodes pelos métodos tradicionais. Além das imagens ficarem disponíveis no computador do laboratório de plâncton do IEAPM.

## 2.5 CONCLUSÃO

- a) O sistema de imageamento semi-automático FlowCAM se mostrou uma ferramenta eficaz no monitoramento ecológico das variações nas populações de copépodes inferiores a 1000  $\mu\text{m}$ .
- b) Os copépodes foram classificados até o nível taxonômico de classe devido ao refinamento taxonômico limitado.
- c) Portanto, a partir do presente estudo a FlowCAM será utilizada na análise rotineira do monitoramento das amostras de plâncton coletadas durante a vigência do PELD-RECA.

## **3 CAPÍTULO II: “DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA ASSEMBLEIA DE COPEPODA FRENTE A EVENTOS DE RESSURGÊNCIA E SUBSIDÊNCIA”**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

O zooplâncton é tradicionalmente descrito como o elo trófico entre os produtores primários e os consumidores secundários de níveis tróficos superiores (RICHARDSON, 2008; FERNANDES et al., 2012; FILHO, 2013). Ele é composto por pequenos animais e protistas heterotróficos que são transportados pelas correntes marinhas (BOLTOVSKOY, 1981). Devido a sua alta abundância, os organismos zooplanctônicos ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos, apresentando grande diversidade fisiológica e morfológica. Além do mais por ser um elo trófico entre produtores e consumidores, eles apresentam um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos e na produção pesqueira regional e global (MIYASHITA; JÚNIOR; LOPES, 2009; AGUILAR, 2013).

Atualmente o conhecimento a respeito do papel biológico do zooplâncton no ambiente marinho já está consolidado. Devido ao grande número de espécies zooplanctônicas, encontram-se representantes em diversos nichos ecológicos e o desempenho de diversas funções ecossistêmicas (RICHARDSON, 2008). Pode-se dizer que a função ecossistêmica mais importante do zooplâncton é atuar na transferência de energia até os níveis tróficos superiores (FILHO, 2013; FERNANDES; NETTO; COUTINHO, 2017). Ademais, a comunidade zooplanctônica tem se mostrado sensível às mudanças ambientais que tem sido relatadas nas últimas décadas (MACKAS; BEAUGRAND, 2010).

No ambiente marinho, Copepoda é a subclasse de zooplâncton mais abundante (RICHARDSON, 2008). Os copépodes são definidos como os microcrustáceos mais importantes em termos de diversidade, abundância e biomassa do mesozooplâncton (DIAS; ARAÚJO, 2006; CAMPOS, 2014). Eles são consumidos por diversas espécies de peixes, sendo considerados os principais responsáveis pela produção secundária nos oceanos (FERNANDES; NETTO; COUTINHO, 2017).

Um dos parâmetros mais importantes que determinam as características ecológicas e fisiológicas de um organismo é o seu tamanho (PETERS, 1983). O tamanho de um organismo pode ser estimado indiretamente pelo seu peso ou pelo seu comprimento. As medidas de peso mais comuns são peso úmido, peso seco e peso de carbono. O comprimento é tipicamente

medido como a maior dimensão linear ou o diâmetro esférico equivalente (ANDERSEN et al., 2016).

O tamanho corporal de um organismo varia ao longo do seu ciclo de vida e afeta atividades vitais como alimentação, metabolismo e a reprodução dos mesmos (GLAZIER, 2005; ARENDT, 2011; KIØRBOE, 2011). Ele também reflete o papel daquele organismo dentro do ecossistema, indicando o nicho no qual ele está inserindo e as relações de predações que sustentam a cadeia trófica (BONECKER; AZEVEDO; SIMÕES, 2011). Ademais, as condições ambientais também podem afetar a variação do tamanho corporal, seja pela dependência da temperatura nos processos fisiológicos ou por mudanças na disponibilidade de alimentos no ecossistema marinho.

De acordo com Deevey e Brooks (1971, 1977), o tamanho dos copépodes varia de acordo com a profundidade e a temperatura ao qual são encontrados. Sendo assim, copépodes de pequeno porte são dominantes em águas superficiais e quentes, ao contrário dos copépodes de grande porte que dominam águas profundas e frias. Portanto, a presença de fenômenos oceanográficos, como ressurgências costeiras, responsáveis pela mistura das massas de água podem modificar totalmente a estrutura populacional da comunidade de copépodes (VALENTIN; MONTEIRO-RIBAS; MUREB, 1987).

A ressurgência costeira é um fenômeno oceanográfico que ocorre de forma mais proeminente e contínua na costa leste do Peru, Equador, Califórnia e Oregon, no Oceano Pacífico, e no noroeste da África e no sul de Benguela, no Oceano Atlântico. Essas regiões são altamente produtivas, sendo responsáveis por 20% do estoque pesqueiro mundial apesar de cobrirem menos de 2% da superfície oceânica. Além disso, elas regulam as variações climáticas e a dinâmica dos ecossistemas marinhos, modificando a cadeia trófica local (GUENTHER et al., 2008; ELIAS, 2009; KÄMPF; WANG et al., 2015; CHAPMAN, 2016).

O fenômeno da ressurgência consiste no movimento ascendente de águas profundas, frias e ricas em nutrientes para a superfície do oceano (ODA, 2009). Devido a sua localização na zona afótica e a sedimentação dos detritos, as águas afloradas são consideradas ricas em nutrientes (GONZALEZ-RODRIGUEZ et al., 1992). Quando essas águas atingem a zona eufótica, pode-se observar um aumento na produção primária, refletido em uma potencialização da transferência de energia ao longo da cadeia trófica (FERNANDES; NETTO; COUTINHO, 2017).

Segundo Gonzalez-Rodriguez et al (1992), o fenômeno da ressurgência é caracterizado por três fases sequenciais: a primeira fase é a fase da ressurgência propriamente dita, ao qual

ocorre o afloramento das águas frias e ricas em nutrientes. A segunda fase é a fase produtiva, ao qual há um aumento da biomassa e da produção primária e sua subsequente diminuição da concentração de nutrientes. A terceira fase é a fase da subsidência, ao qual ocorre a diminuição da biomassa do fitoplâncton devido à dispersão e depleção de nutrientes, levando a uma situação oligotrófica. A dinâmica do funcionamento dessas três fases é fortemente influenciada pelos ventos locais.

No Brasil, apesar de não haver áreas costeiras com presença contínua de ressurgência e nem tão proeminente como na costa oeste da América do Sul, esse fenômeno pode ser observado sazonalmente na região do Cabo Frio, que está localizada na região oeste do Oceano Atlântico (CARBONEL; VALENTIN, 1999).

Na região do Cabo Frio ocorre uma mudança na direção da costa brasileira do sentido Norte-Sul para o sentido Leste-Oeste e a plataforma continental é mais estreita. Além disso, a presença de diversos processos oceanográficos potencializa a ressurgência conforme a incidência de ventos e a condição geográfica local. Portanto, essa região se torna o núcleo da ressurgência da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (GUENTHER et al., 2008; COELHO-SOUZA et al., 2012). A parte externa da enseada de Arraial do Cabo é mais afetada pelo afloramento da ACAS, onde a temperatura da superfície do mar chega a 15°C. A parte interna da enseada, onde se localiza a Ilha do Cabo Frio, também é influenciada pelo fenômeno da ressurgência, o qual modifica a estrutura físico-química e a dinâmica biológica desse sistema (COELHO-SOUZA et al., 2012; ALBERTO, 2016).

Ademais, observa-se a combinação de três diferentes massas de água - Água Tropical (AT; temperatura[T]>20°C, salinidade[S]>36), Água Costeira (AC; T>20°C, S<35), Água Central do Atlântico Sul (ACAS; T<20°C, S=34,5 a 36) – que são influenciadas de modo complexo pela corrente de contorno oeste na região: Corrente do Brasil (CALADO, 2006; GUENTHER et al., 2008).

Durante os meses de primavera e verão o predomínio dos ventos do quadrante norte e nordeste afastam a Corrente do Brasil (CB) da costa, empurrando-a em direção ao oceano. Ao mesmo tempo, o afloramento da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) traz águas frias e ricas em nutrientes para a superfície (VALENTIN, 1980, 1984; CARBONEL; GONZALEZ-RODRIGUEZ et al., 1992; VALENTIN, 1999; COELHO-SOUZA et al., 2012). A ressurgência tem um curto período de duração e ela ocorre depois de três a quatro dias de fortes ventos do quadrante norte e nordeste (VALENTIN; COUTINHO, 1990). Contudo, observa-se uma ressurgência de intensidade moderada nessa região. O fenômeno da ressurgência é interrompido

pelos ventos do quadrante sul e sudoeste. Esses ventos são resultantes de passagem de frente fria que empurra a CB em direção à costa, resultando na ocorrência da subsidência. A subsidência é caracterizada por águas oligotróficas e alta temperatura da superfície do mar (TSM) (GONZALEZ-RODRIGUEZ et al., 1992). Portanto, pode-se dizer que a ação dos ventos é a principal forçante física responsável tanto pelo fenômeno da ressurgência como pelo fenômeno da subsidência.

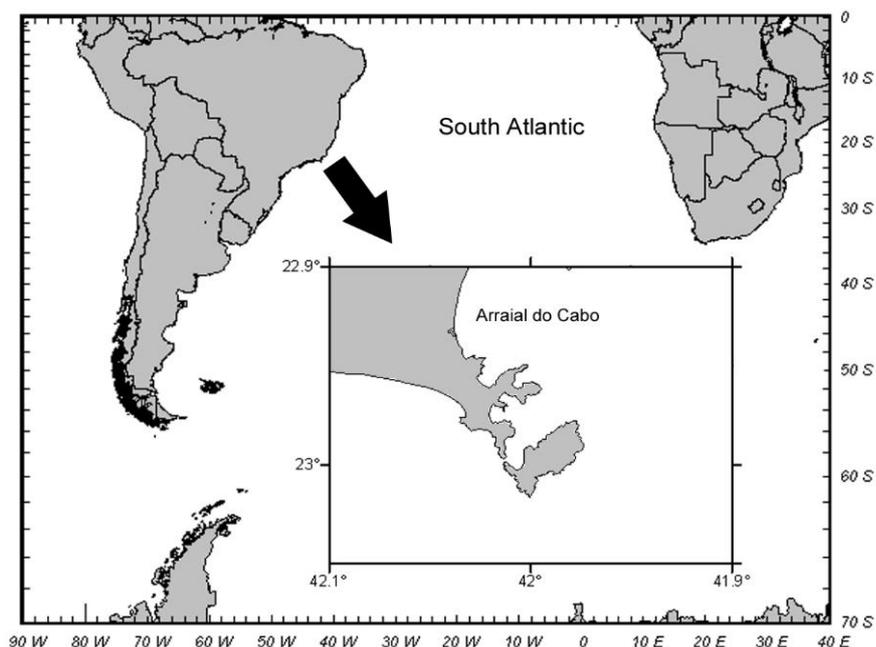
Inserido nesse contexto e considerando a importância do fenômeno da ressurgência em relação ao enriquecimento de nutrientes na zona eufótica, os objetivos do presente estudo foram: I - Caracterizar a distribuição temporal de Copepoda. II - Avaliar a variação sazonal e interanual na estrutura das classes de tamanho de copéodes frente às oscilações na temperatura da superfície do mar e concentração de clorofila-a.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado no município de Arraial do Cabo, localizado na costa leste do Estado do Rio de Janeiro ( $-22,90^{\circ}\text{S}$ ,  $-42,02^{\circ}\text{W}$ ), que ocupa uma área de  $152,3 \text{ km}^2$ . (Figura 2.1). Nesse município há uma ilha denominada Ilha do Cabo Frio ( $-23^{\circ} \text{ S } -42.01^{\circ} \text{ W}$ ) que está localizada em uma área para realização de testes e experimentos para as pesquisas do IEAPM. Há mais de duas décadas pesquisadores do IEAPM monitoram os parâmetros físico-químicos desta localidade. Nesta área há uma estação fixa para coleta de material biológico e dados abióticos, onde foram realizadas coletas semanais de dados abióticos e coletas mensais de dados biológicos no período compreendido entre janeiro de 2010 a dezembro de 2014. Esse estudo foi realizado com amostras coletadas no projeto PELD-RECA coordenado pelo IEAPM.

Figura 2.1: Mapa de localização do município de Arraial do Cabo, RJ



Fonte: Lohengrin Fernandes, 2018.

### 3.2.2 Procedimento de coleta

#### 3.2.2.1 Parâmetros ambientais

A coleta de água para análise dos parâmetros ambientais foi realizada semanalmente na estação fixa localizada na Ilha de Cabo Frio. A TSM foi mensurada através de uma sonda multiparâmetros Horiba (Modelo U-5000; HGS No. 7JETA790) a ~1 metro de profundidade. A TSM foi usada como *proxy* da ressurgência quando a mesma se apresentou menor que 20°C (VALENTIN, 1984).

A água coletada a ~1 metro de profundidade pela garrafa de Van Dorn foi mantida refrigerada até ser levada ao laboratório. Em laboratório, a concentração de clorofila-a foi extraída de acordo com Lalli & Parsons (1997). Ao todo foram coletadas 260 amostras para medição dos dados abióticos, que foram mensurados pelo Laboratório de Química do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM).

#### 3.2.2.2 Dados biológicos

No presente estudo, um subconjunto de 180 amostras foi analisado em distintas perspectivas, considerando aquelas coletadas entre janeiro de 2010 e dezembro de 2014. As coletas foram feitas através de arrastos horizontais subsuperficiais (~1 metro de profundidade), com duração de cerca de 3 minutos, com rede cilíndrico-cônica de abertura de 40 cm de boca, malha de 100µm e fluxômetro (Modelo 2030R Mechanical Flowmeter, General Oceanics Inc., Miami, FL) acoplado à boca da rede para estimativa do deslocamento e, por consequência, do volume filtrado. Em cada coleta foram obtidas três amostras sequenciais, destinadas às análises quali- e quantitativas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em solução aquosa de formaldeído 4% neutralizado com tetraborato de sódio.

Em laboratório, as amostras coletadas foram divididas em duas partes com o fracionador do tipo FOLSOM (BOLTOVSKOY, 1981). Uma parte foi guardada para posterior análise pela microscopia óptica convencional e a outra parte da amostra foi destinada ao processamento e análise através da FlowCAM.

A fim de evitar o entupimento da célula de fluxo (2000µm), uma alíquota foi retirada do material com uma pipeta Stempel de 1 ml. Esta alíquota foi filtrada previamente em uma malha de Nylon (Nytex) de 1000µm e lavada com água destilada até um volume final, que

variou entre 50 e 100 ml, para que todos os organismos maiores que 1000 $\mu$ m fossem removidos. Somente as partículas maiores que 100 $\mu$ m e menores que 1000 $\mu$ m foram fotografadas, medidas e classificadas. As análises foram feitas no Visual Spreadsheet Software® (VSP), versão 3.4.5 (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012).

Para processamento da amostra, foi utilizado o modelo Benchtop B3 FlowCAM configurado no modo de autoimagem com objetiva de 2x, célula de fluxo de 2000 $\mu$ m de largura e 200 $\mu$ m de profundidade. As imagens foram capturadas em resolução de 2400 dpi (pixels por polegada), com tamanho de 1024 x 768 pixels. Um agitador magnético foi utilizado para manter as partículas em suspensão e a concentração da subamostra homogênea durante a análise.

### 3.2.2.3 Análise quantitativa

A classificação e separação dos copépodes foi feita no VSP a partir da montagem de uma biblioteca de treinamento do software. Cerca de 100 imagens de copépodes foram selecionadas para a criação de um filtro digital com base nas características morfométricas. A classificação das partículas em copépodes foi checada individualmente para todas as amostras a fim de eliminar os erros de classificação. Em seguida, foram criados filtros de classificação em Copepoda. A estimativa da abundância de copépodes (organismo.m<sup>-3</sup>) foi feita com base nas contagens de organismos obtidos nos filtros de classificação. Para tal levou-se em consideração o volume imageado, o volume inicial da amostra, o volume da subamostra e o volume filtrado pela rede em cada arrasto, expressos pela equação:

$$Ab = \{(N*VI)/VS\}*(V0/VR), \text{ onde}$$

Ab = abundância de copépodes (organismos.m<sup>-3</sup>)

N = número de copépodes contados (organismos)

VI = volume imageado (mL)

VS = volume da subamostra (mL)

V0 = volume inicial de diluição (mL)

VR = volume filtrado pela rede (m<sup>3</sup>)

Para avaliar a variação na estrutura de classes de tamanhos dos copépodes ao longo do tempo, os organismos foram medidos em distintos parâmetros. Para as estimativas de

comprimento do organismo, foi utilizado o comprimento do prossoma. Essa estimativa foi baseada na razão entre os eixos maior e menor da elipse circunscrita (Aspect Ratio), que levam em consideração também a posição do copépode na imagem.

Para medição do comprimento do prossoma dos copépedes, foi desenvolvido um algoritmo específico em ImageJ para aplicação às imagens obtidas na FlowCAM. A partir da correlação das medidas obtidas pelo software ImageJ às medidas obtidas pelo software VSP foi definido o melhor parâmetro para estimativa do comprimento do prossoma. A curva de regressão logarítmica foi escolhida por respeitar a tendência natural de crescimento dos organismos vivos (MAGNUSSON; MOURÃO, 2002). Originalmente, todos os valores das medidas foram gerados em pixels, sendo posteriormente convertidos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) na razão de  $2,97 \text{ pixels} = 1,0 \mu\text{m}$  (FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC, 2012).

Para as estimativas de biomassa de copépedes, foi utilizado o volume esférico equivalente. As medidas de volume esférico equivalente foram baseadas no diâmetro esférico equivalente (Equivalent Spherical Diameter) estimado pela FlowCAM, que é considerada uma estimativa eficaz do volume do organismo, e comparada posteriormente à medida do comprimento do prossoma feita pelo ImageJ (ÁLVAREZ et al., 2011; ÁLVAREZ; LÓPEZ-URRUTIA; NOGUEIRA, 2012). É esperada correlação positiva significativa entre o diâmetro equivalente e o comprimento do prossoma, o que foi utilizado como um validador do método. A estimativa da biomassa ( $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}$ ) foi feita com base no volume ESD calculado após o processamento das amostras e classificação dos copépedes. Esta variável foi gerada através da fórmula do volume de uma esfera em  $\mu\text{m}^3$ . Para converter os valores obtidos de volume em  $\mu\text{m}^3$  para massa em mg, assumiu-se que  $1\text{mm}^3$  equivale a 1mg de peso úmido (HERMAN; HARVEY, 2006; SCHULTES; LOPES, 2009). A validação foi realizada pela comparação com a biomassa do seston para a amostra analisada. A biomassa do seston foi obtida previamente em balança de precisão Shimadzu 82D ( $e=0,0001\text{g}$ ) pelo método do Peso Úmido (OMORI, IKEDA, 1984). Copépedes são usualmente os organismos mais abundantes no plâncton e espera-se que haja uma correlação positiva significativa entre a biomassa do seston e a biomassa de copépedes. O valor da biomassa de copépedes foi calculado como a somatória do volume ESD de cada organismo processado, levando em consideração o volume imageado, o volume inicial da amostra, o volume da subamostra e o volume filtrado pela rede em cada arrasto, expressos pela equação:

$$B_{\text{cop}} = \{(\sum V_{\text{ESD}} * V_{\text{I}}) / V_{\text{S}}\} * (V_0 / V_{\text{R}}), \text{ onde}$$

Bcop = Biomassa de copépodes ( $\text{mg C.m}^{-3}$ )

$V_{\text{ESD}}$  = volume estimado equivalente ( $\text{mm}^3$ )

VI = volume imageado (mL)

VS = volume da subamostra (mL)

V0 = volume inicial de diluição (mL)

VR = volume filtrado pela rede ( $\text{m}^3$ )

#### 3.2.2.4 Tratamento numérico e estatístico

Para análise dos dados foram construídas duas planilhas no excel: uma planilha foi composta pela data da coleta (mês e ano), a estimativa da abundância ( $\text{organismos.m}^{-3}$ ) e biomassa ( $\text{mgC.m}^{-3}$ ), e os dados abióticos de temperatura da superfície do mar ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ). A segunda planilha foi composta pela data da coleta (mês e ano), o diâmetro esférico equivalente - ESD ( $\mu\text{m}$ ), o volume ESD ( $\mu\text{m}^3$ ), os dados abióticos de temperatura da superfície do mar ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ). As equações anteriormente descritas que originaram a estimativa da abundância ( $\text{org.m}^{-3}$ ) e biomassa ( $\text{mg C m}^{-3}$ ) da assembleia de Copepoda foram feitos no programa Excel.

As variáveis ambientais e os dados bióticos de abundância, biomassa e tamanho dos copépodes foram analisadas utilizando métodos descritivos (valores de máximo, mínimo, média e desvio padrão).

Para uma melhor compreensão da dinâmica temporal de Copepoda em termos de tamanho, foram definidas duas classes de tamanho: I (100-500  $\mu\text{m}$ ) e II (501-1000  $\mu\text{m}$ ), após análise do histograma de frequência dos comprimentos dos prossomas. Os dados relativos às classes de tamanho foram obtidos com base no Equivalent Spherical Diameter - ESD ( $\mu\text{m}$ ).

Para verificar a distribuição temporal de Copepoda ao longo da série foi utilizada uma matriz de dispersão entre os dados bióticos e os meses amostrados durante a série temporal.

Para verificar possíveis diferenças na distribuição temporal de Copepoda frente a eventos de ressurgência e subsidência foi aplicado o teste paramétrico ANOVA (“two-way”), para o nível de 5% de significância. Para esta análise, os dados foram transformados em  $\log_{10}$  para alcançar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. A normalidade dos dados foi testada através do Teste de Kolmogorov-Smirnov, apresentando distribuição normal ( $p>0,05$ ). A homocedasticidade dos dados foi testada através do Teste de Levene, apresentando homogeneidade das variâncias ( $p>0,05$ ).

Para análise dos efeitos das variáveis ambientais sobre a distribuição temporal de Copepoda, a TSM e a concentração de clorofila-a foram utilizadas como variáveis preditoras na construção de modelos de regressão linear múltipla.

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa Statistica 8.0 (Statsoft, 2007).

### 3.3 RESULTADOS

No total foram analisadas 260 medições semanais de TSM e concentração de clorofila-a e 180 amostras de zooplâncton obtidas mensalmente em cinco anos (2010-2014). Todas as amostras de plâncton oriundas das coletas foram processadas na FlowCAM e posteriormente utilizadas na classificação semi-automática das partículas, com auxílio do software VSP.

#### 3.3.1 Parâmetros ambientais

##### 3.3.1.1 Temperatura da superfície do mar

A variação na estrutura térmica indica que durante a série temporal analisada houve 19% de eventos de ressurgência (um total de 50 semanas) e 81% de eventos de subsidência (um total de 210 semanas). A TSM apresentou média de  $21,6^{\circ}\text{C} \pm 2,1$ , com mínima de  $15,2^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $26,8^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.2). O ano de 2010 foi o ano que apresentou a maior média anual de temperatura ( $22,9^{\circ}\text{C}$ ) e 2014 foi o ano que apresentou média anual de temperatura mais baixa ( $20,6^{\circ}\text{C}$ ) (Tabela 2.1). Em geral, os meses que apresentaram baixa TSM foram fevereiro, setembro, outubro e novembro, e o mês de abril apresentou alta TSM (Figura 2.3).

Tabela 2.1: Estatística descritiva calculada para os parâmetros ambientais (temperatura da superfície do mar e concentração de clorofila-a), medidas nos anos de 2010 a 2014 na Ilha do Cabo Frio.

Ano	TSM ( $^{\circ}\text{C}$ )			Concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ )		
	Média anual	Mínimo	Máximo	Média anual	Mínimo	Máximo
2010	22,9	18,5	26,8	0,67	0	2,38
2011	21,9	17,7	26,0	1,13	0	6,52
2012	21,3	15,7	25,4	0,98	0,05	3,54
2013	21,2	15,3	24,6	0,97	0	5,94
2014	20,6	15,2	23,9	0,71	0,09	4,47

Figura 2.2: Variação interanual da TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante a série temporal.

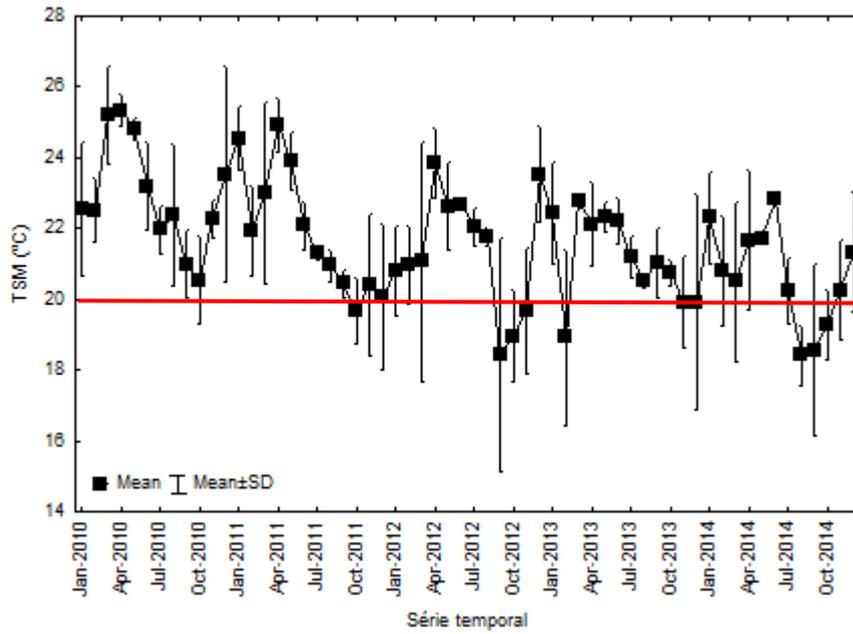
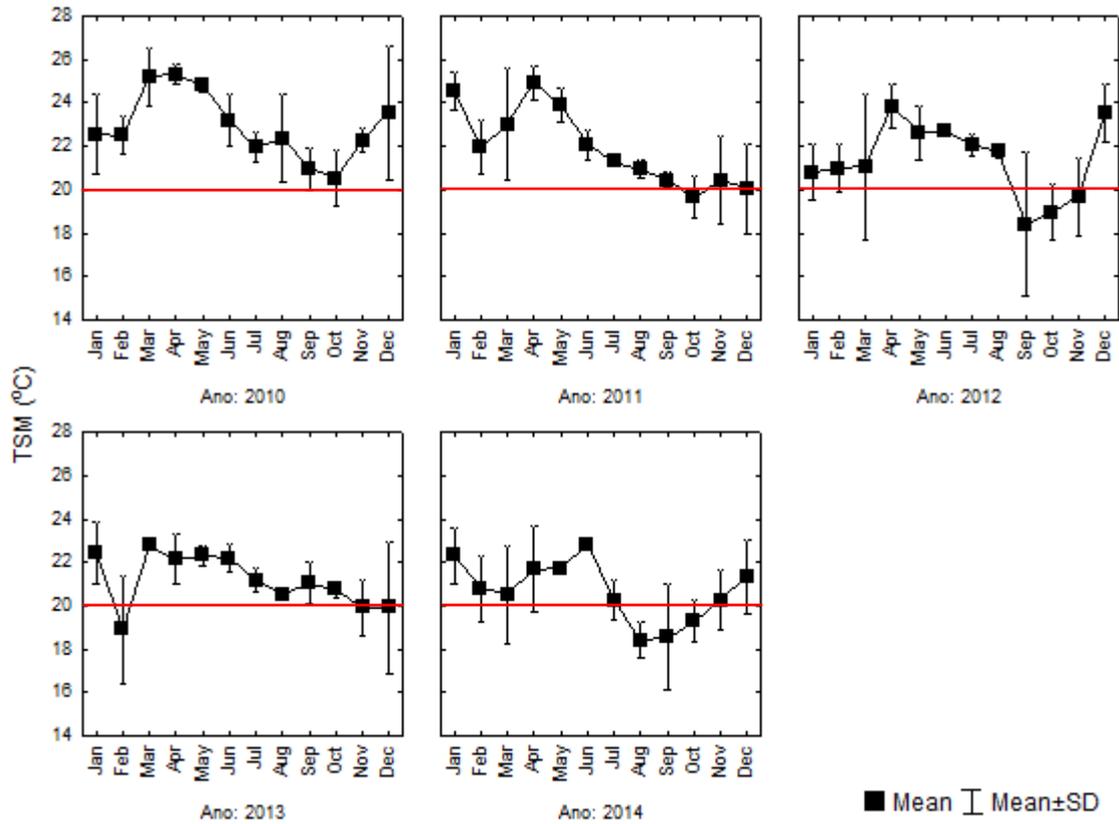


Figura 2.3: Variação sazonal da TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante a série temporal.



### 3.3.1.2 Clorofila-a

No decorrer dos cinco anos da série temporal analisada, a concentração de clorofila-a apresentou média de  $0,89 \text{ mg.m}^{-3} \pm 0,91$ , com mínima de  $0 \text{ mg.m}^{-3}$  e máxima de  $6,52 \text{ mg.m}^{-3}$  (Figura 2.4). O ano de 2011 apresentou a maior média de concentração de clorofila-a ( $1,13 \text{ mg.m}^{-3}$ ) e o ano de 2010 apresentou a menor média de concentração de clorofila-a ( $0,67 \text{ mg.m}^{-3}$ ) (Tabela 2.1). A variação sazonal da clorofila-a apresentou um aumento na concentração nos meses de setembro e outubro, se mantendo na média entre janeiro e abril e apresentando uma diminuição no mês de maio (Figura 2.5).

Figura 2.4: Variação interanual da concentração de clorofila-a ( $\text{mg.m}^{-3}$ ) durante a série temporal.

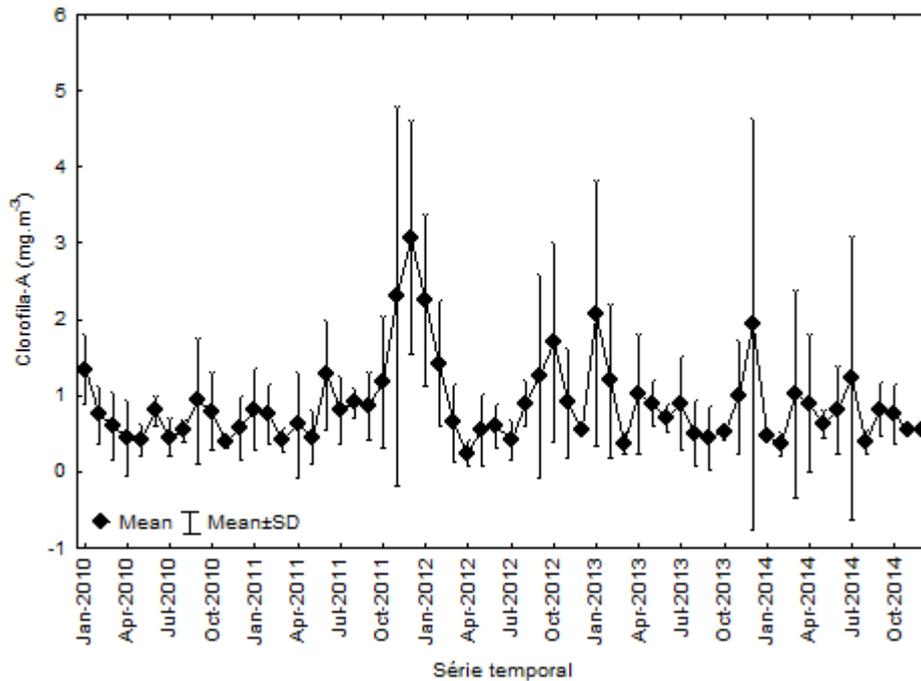
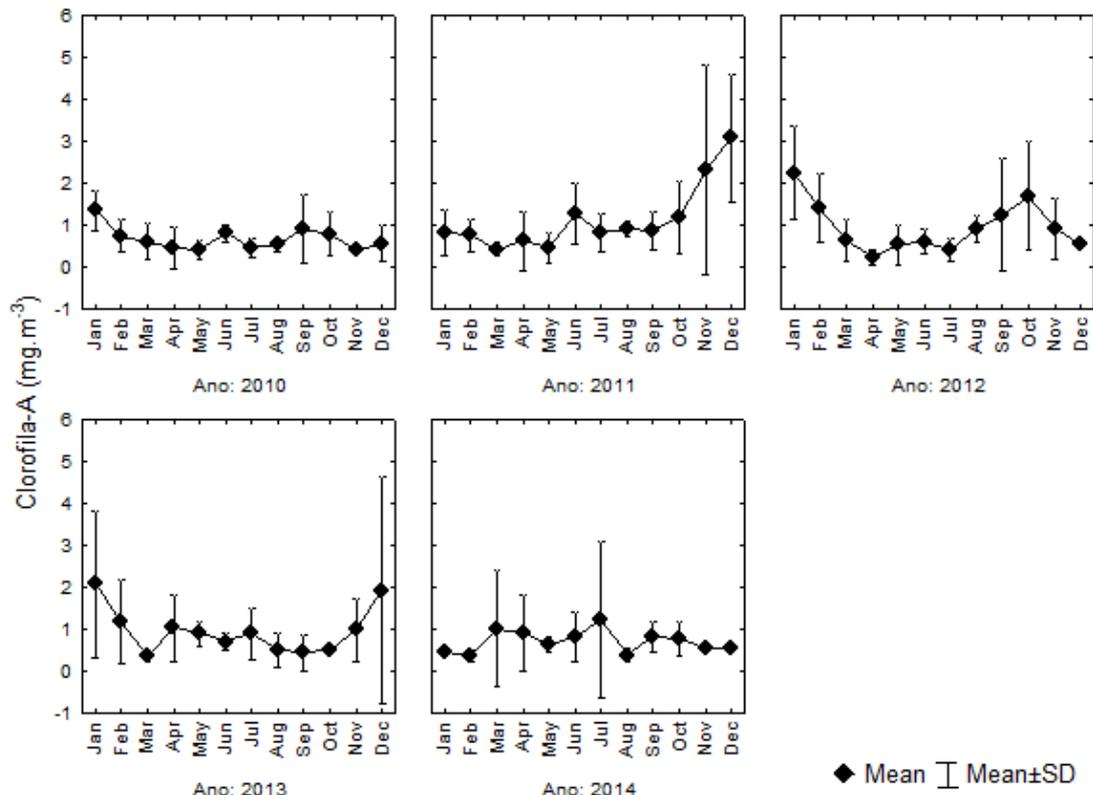


Figura 2.5: Variação sazonal da concentração de clorofila-a ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) durante a série temporal



A TSM foi correlacionada com a concentração de clorofila-a e apresentou uma correlação negativa ( $R = -0,29$ ) significativa ( $p < 0,01$ ) (Figura 2.6). Pode-se notar um padrão sazonal entre as variáveis ambientais, as quais são representadas pela diminuição da TSM com o conseqüente aumento da concentração de clorofila-a, e o aumento da TSM com a conseqüente diminuição da concentração de clorofila-a (Figura 2.7). Porém, as menores temperaturas são correlacionadas às concentrações médias de clorofila-a.

Figura 2.6: Correlação entre TSM e concentração de clorofila-a durante a série temporal.

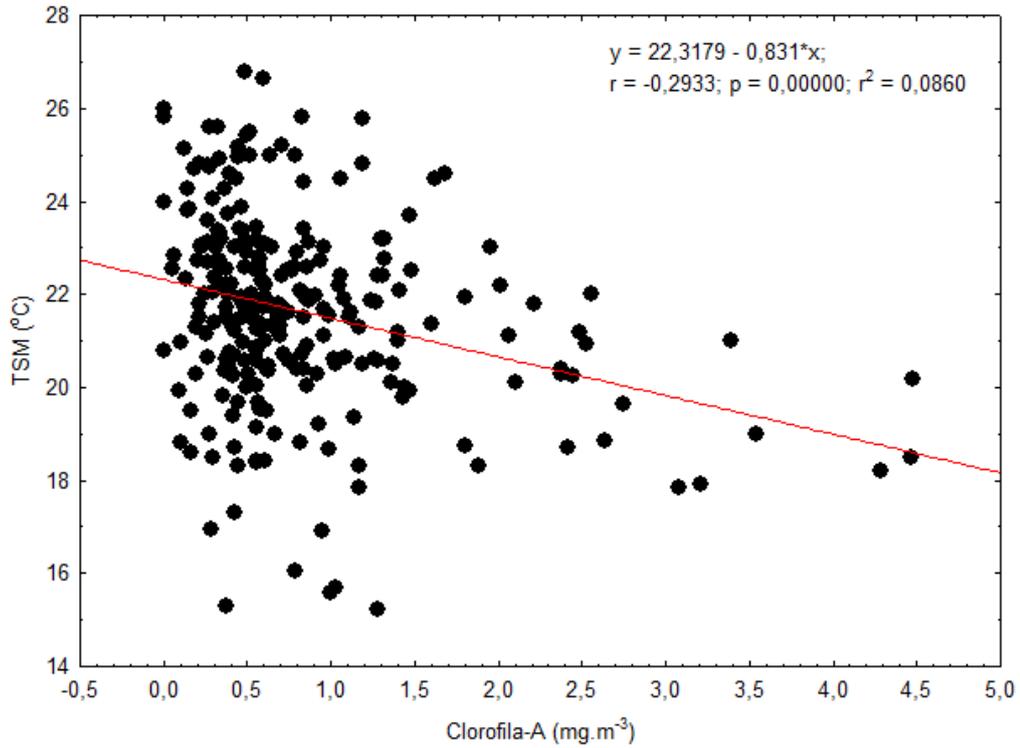
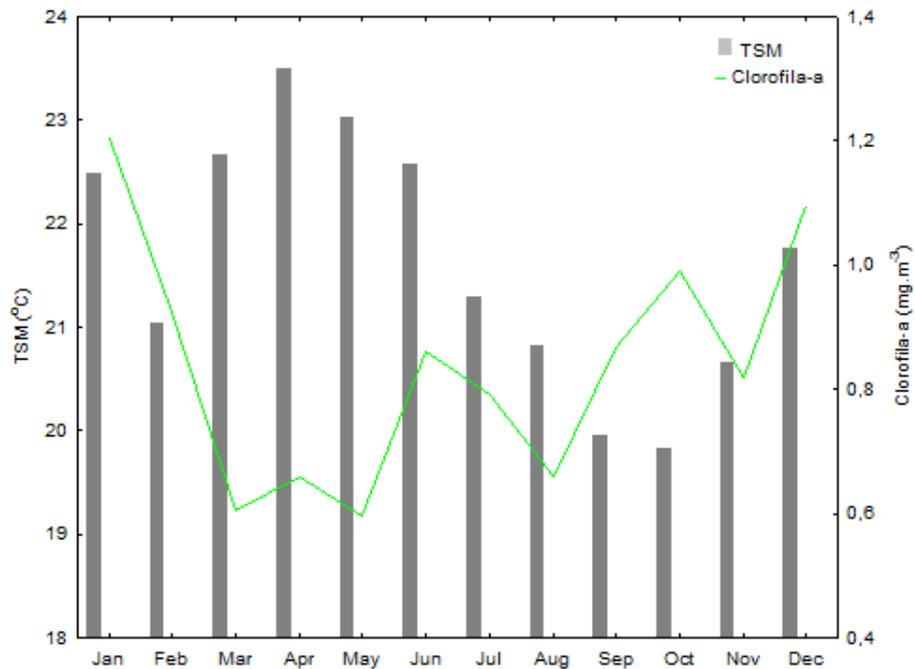


Figura 2.7: Média mensal da TSM (°C) e da concentração de clorofila-a (mg.m<sup>-3</sup>), durante a série temporal.



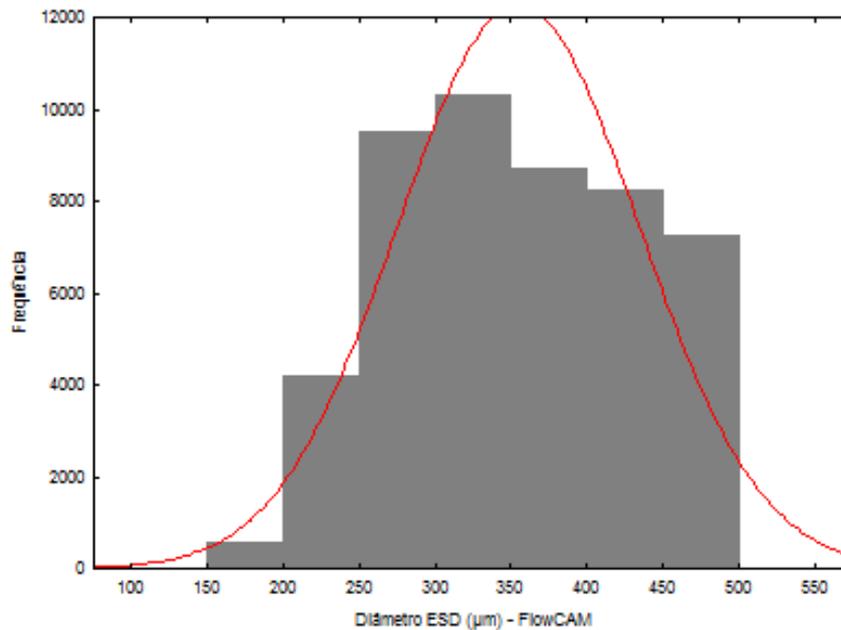
### 3.3.2 Estrutura da assembleia de copépodes

#### 3.3.2.1 Distribuição de Copepoda por classe de tamanho

##### Grupo I (100 - 500 $\mu\text{m}$ )

A classe de tamanho denominada como grupo I foi composta de copépodes com tamanho variando entre 100 a 500  $\mu\text{m}$  (Figura 2.8). Esta classe de tamanho foi a que obteve o maior número de observações. A média anual do tamanho de copépodes incluídos nesse grupo foi de 353  $\mu\text{m}$ , apresentando média anual mínima de 139  $\mu\text{m}$  e máxima de 449  $\mu\text{m}$ .

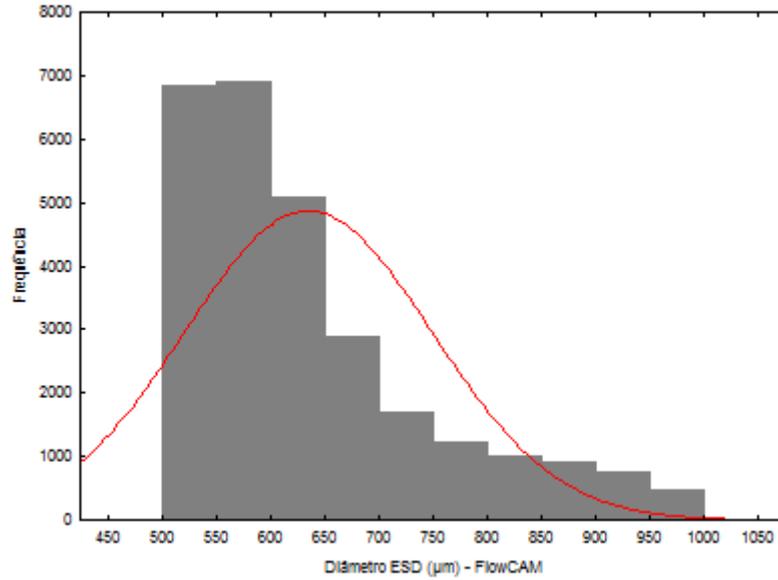
Figura 2.8: Histograma do grupo I (100 – 500 $\mu\text{m}$ ).



##### Grupo II (501 – 1000 $\mu\text{m}$ )

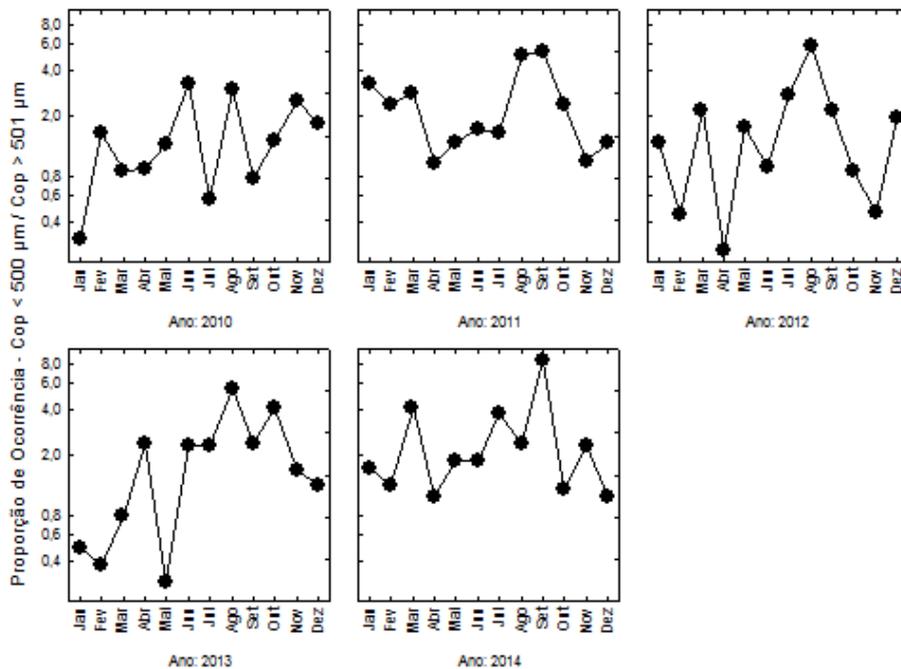
A classe de tamanho denominada como grupo II foi composta de copépodes com tamanho variando entre 501 a 1000  $\mu\text{m}$  (Figura 2.9). A média anual do tamanho de copépodes incluídos nesse grupo foi de 633  $\mu\text{m}$ , apresentando média anual mínima de 501  $\mu\text{m}$  e máxima de 999  $\mu\text{m}$ .

Figura 2.9: Histograma do grupo II (501 – 1000 $\mu\text{m}$ )



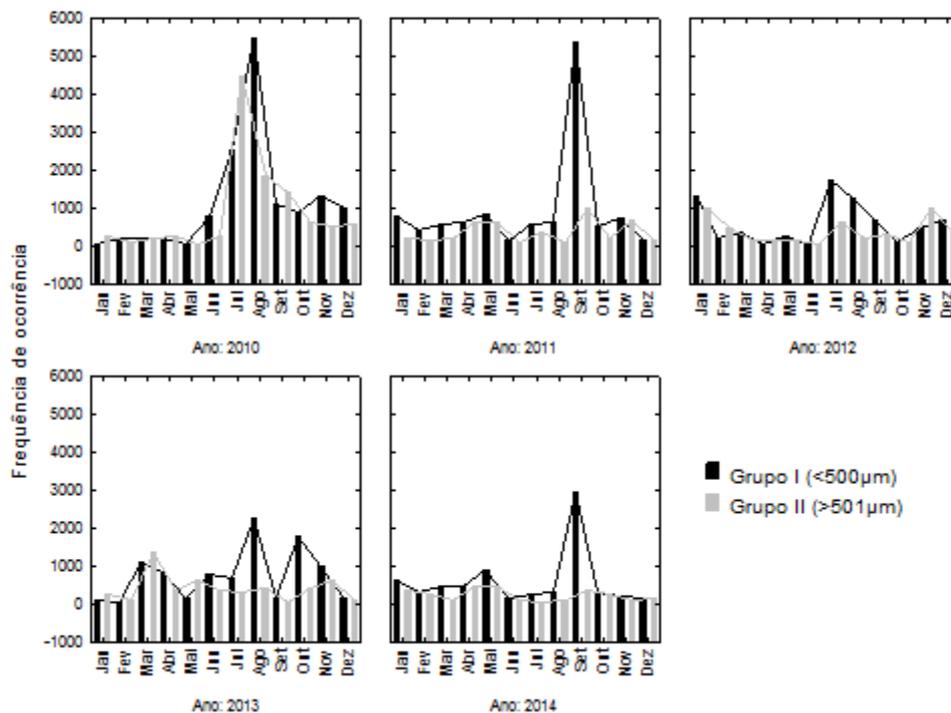
Em algumas épocas do ano, tais como final do inverno e durante a primavera, observa-se uma variação na proporção de copépodes encontrados na região. Há um aumento de copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu\text{m}$ ) se comparados aos copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu\text{m}$ ) (Figura 2.10).

Figura 2.10: Proporção de ocorrência da razão entre copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu\text{m}$ ) e copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu\text{m}$ ).



Também se observa uma variação sazonal em relação ao tamanho da assembleia de copépodes durante a série temporal analisada (Figura 2.11). No final do inverno e começo da primavera há um aumento na concentração de copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu$ m) que nem sempre sucedeu um aumento na concentração de copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu$ m).

Figura 2.11: Frequência de ocorrência de copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu$ m; coluna preta) e copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu$ m; coluna cinza) durante a série temporal.



Na tabela 2.2 pode-se observar a porcentagem de ocorrência de copépodes da classe de tamanho I (<500 $\mu$ m) e copépodes da classe de tamanho II (>501 $\mu$ m) frente aos eventos de ressurgência e subsidência. Os copépodes incluídos no grupo I (copépodes de pequeno porte) foram abundantes durante quaisquer condições oceanográficas. Em contrapartida, quando houve uma condição de ressurgência associada à concentração normal ou alta de clorofila-a, os copépodes incluídos no grupo II (copépodes de grande porte) foram mais frequentes. Portanto, pode-se dizer que a TSM é a variável ambiental que tem maior significância no tamanho dos copépodes.

Tabela 2.2: Porcentagem (%) de ocorrência de copépodes da classe de tamanho I (<500µm) e copépodes da classe de tamanho II (>501µm) frente aos eventos de ressurgência e subsidência.

	<b>Porcentagem de ocorrência de Copépodes &lt; 500 µm</b>	<b>Porcentagem de ocorrência de Copépodes &gt; 501 µm</b>	<b>Frequência de eventos</b>
<b>TSM = UP Clo-a = Alta</b>	56,76	43,23	6
<b>TSM = UP Clo-a = Normal</b>	55,93	44,06	6
<b>TSM = DOWN Clo-a = Alta</b>	61,91	38,08	12
<b>TSM = DOWN Clo-a = Normal</b>	60,67	39,32	36

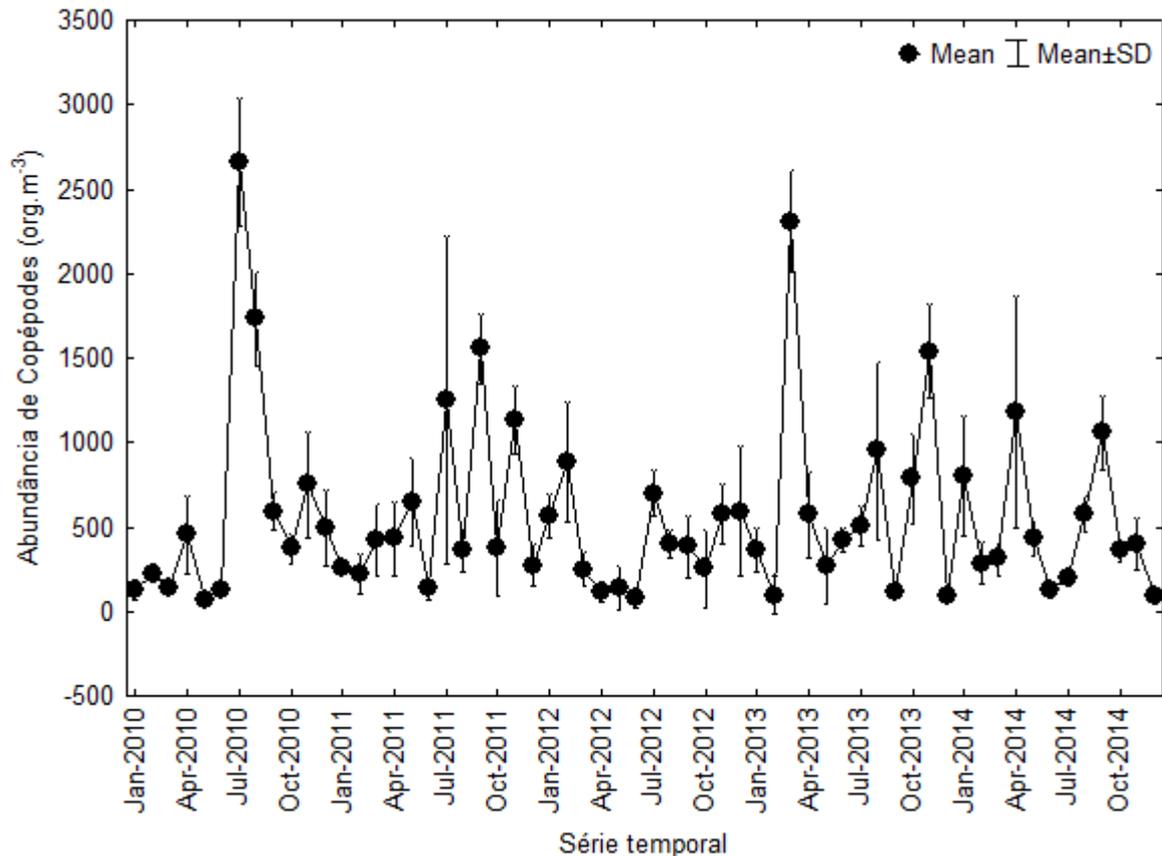
### 3.3.2.2 Distribuição temporal da abundância de Copepoda

A assembleia de copépodes apresentou uma abundância média anual de 563 org.m<sup>-3</sup>. Os valores médios de abundância apresentaram uma alta variabilidade interanual, havendo uma alta abundância de copépodes no ano de 2010 e uma baixa abundância de copépodes no ano de 2012 (Tabela 2.3) (Figura 2.12).

Tabela 2.3: Estatística descritiva calculada para a abundância de copépodes, nos anos de 2010 a 2014.

Abundância de copépodes (org.m <sup>-3</sup> )				
Ano	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv. Padrão</b>
2010	651	42	3.519	782
2011	599	16	2.549	553
2012	412	12	1.483	308
2013	671	0	2.871	678
2014	484	53	2.232	419

Figura 2.12: Distribuição interanual da abundância de copépodes durante a série temporal.



Os valores médios de abundância também indicaram uma alta variabilidade sazonal que resultou em uma falta de padrão entre os anos amostrados. Porém pode-se observar tendências de baixa abundância de copépodes em meses típicos de TSM quente (acima de 20°C) e alta abundância de copépodes em meses típicos de TSM fria (abaixo de 20°C) (Figura 2.13).

O ano de 2010 apresentou os maiores valores de abundância de copépodes nos meses de julho e agosto, sendo que o mês de julho apresentou o maior pico de abundância. Os meses de maio e junho apresentaram baixas abundâncias de copépodes.

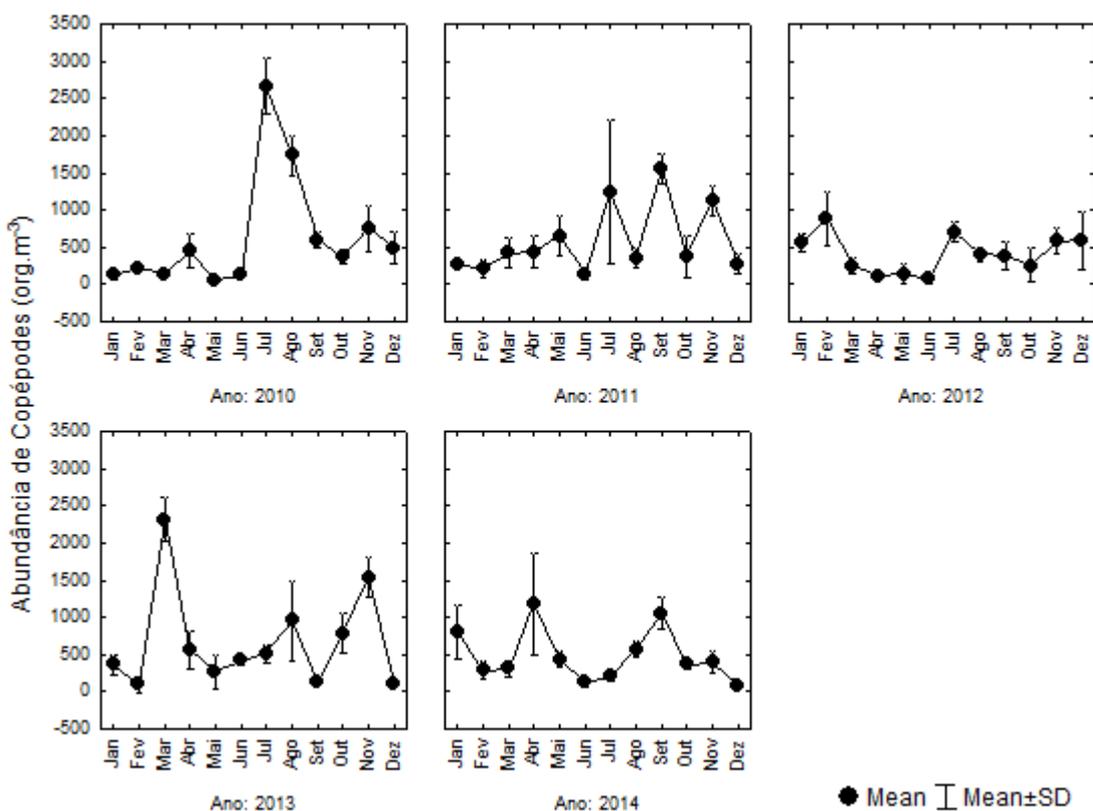
O ano de 2011 apresentou os maiores valores de abundância de copépodes nos meses de julho, setembro e novembro, sendo que o mês de setembro apresentou o maior pico de abundância. O mês de junho apresentou baixa abundância de copépodes.

O ano de 2012 apresentou os maiores valores de abundância de copépodes nos meses de fevereiro e julho, sendo que o mês de fevereiro apresentou o maior pico de abundância. O mês de junho apresentou baixa abundância de copépodes.

O ano de 2013 apresentou os maiores valores de abundância de copépodes nos meses de março, agosto e novembro, sendo que o mês de março apresentou o maior pico de abundância. O mês de dezembro apresentou baixa abundância de copépodes.

O ano de 2014 apresentou os maiores valores de abundância de copépodes nos meses de abril e setembro, sendo que o mês de abril apresentou o maior pico de abundância. O mês de dezembro apresentou baixa abundância de copépodes.

Figura 2.13: Distribuição sazonal da abundância de copépodes durante a série temporal.



Na análise de variância (ANOVA) não houve uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na abundância de copépodes durante o período de ressurgência e subsidência e também não foi possível observar uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à abundância de copépodes em períodos de alta concentração de clorofila-a, quando comparado à períodos de concentração média de clorofila-a.

Ao realizar um modelo de regressão linear múltipla, não foi possível observar uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na comparação entre a abundância de copépodes com as variáveis preditoras de TSM e concentração de clorofila-a (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Modelo de regressão linear múltipla para a TSM e concentração de clorofila-a como variáveis preditoras.

<b>Variáveis preditoras</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>t</b>
<b>TSM</b>	0,6478	0,4242	-0,8048
<b>Concentração de clorofila-a</b>	1,0867	0,3015	-1,0424

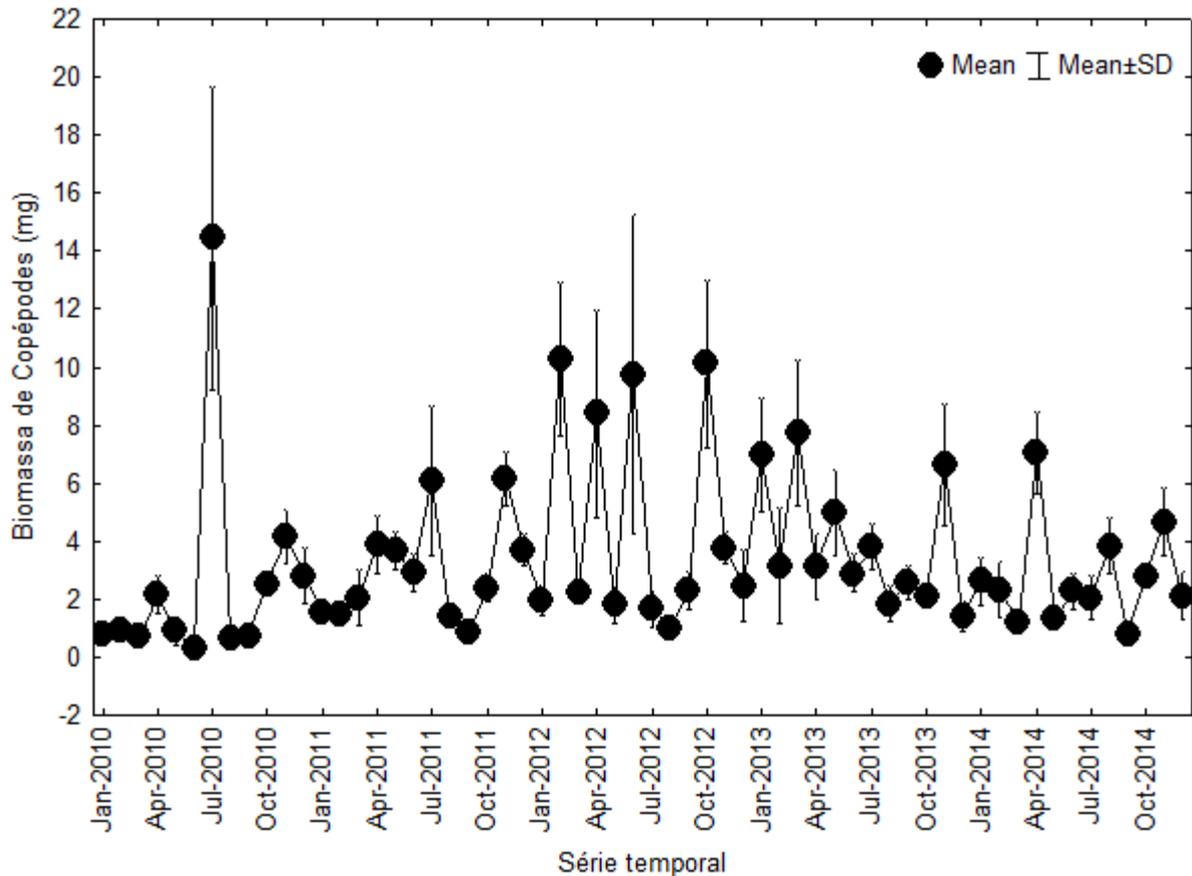
### 3.3.2.3 Distribuição temporal da biomassa de Copepoda

A assembleia de copépodes apresentou uma média anual de biomassa de  $3,4 \text{ mg C m}^{-3}$ . Os valores médios de biomassa apresentaram uma alta variabilidade interanual, havendo uma alta biomassa de copépodes no ano de 2012 e uma baixa biomassa de copépodes no ano de 2010 (Tabela 2.5) (Figura 2.14).

Tabela 2.5: Estatística descritiva calculada para a biomassa de copépodes, nos anos de 2010 a 2014.

<b>Biomassa de copépodes (<math>\text{mg C m}^{-3}</math>)</b>				
<b>Ano</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv. Padrão</b>
2010	2,59	0,23	24,42	4,1
2011	3,06	0,66	8,47	1,93
2012	4,64	0,54	18,98	4,21
2013	3,93	0	10,62	2,45
2014	2,72	0,54	9,94	1,83

Figura 2.14: Distribuição interanual da biomassa de copépodes durante a série temporal.



Os valores médios de biomassa também mostraram uma alta variabilidade sazonal (Figura 2.15). O ano de 2010 apresentou os maiores valores de biomassa de copépodes nos meses de julho e novembro, sendo que o mês de julho apresentou o maior pico de biomassa. O mês de junho apresentou baixa biomassa de copépodes.

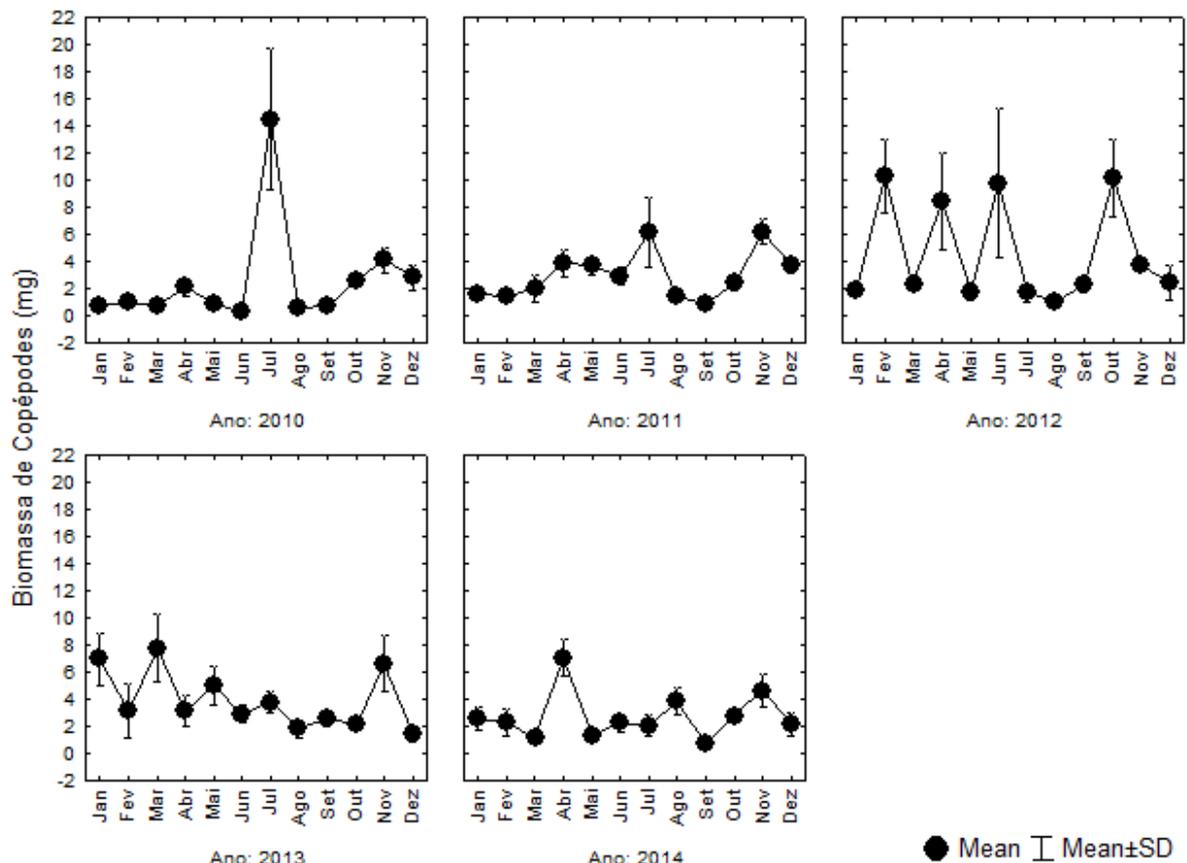
O ano de 2011 apresentou os maiores valores de biomassa de copépodes nos meses de julho e novembro, sendo que o mês de novembro apresentou o maior pico de biomassa. O mês de setembro apresentou baixa biomassa de copépodes.

O ano de 2012 apresentou os maiores valores de biomassa de copépodes nos meses de fevereiro, junho e outubro, sendo que o mês de fevereiro apresentou o maior pico de biomassa. O mês de agosto apresentou baixa biomassa de copépodes.

O ano de 2013 apresentou os maiores valores de biomassa de copépodes nos meses de janeiro e março, sendo que o mês de março apresentou o maior pico de biomassa. O mês de dezembro apresentou baixa biomassa de copépodes.

O ano de 2014 apresentou os maiores valores de biomassa de copépodes nos meses de abril e novembro, sendo que o mês de abril apresentou o maior pico de biomassa. O mês de setembro apresentou baixa biomassa de copépodes.

Figura 2.15: Distribuição sazonal da biomassa de copépodes durante a série temporal.



Na análise de variância (ANOVA) não houve uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na biomassa de copépodes durante o período de ressurgência e subsidência e também não foi possível observar uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na biomassa de copépodes em períodos de alta concentração de clorofila-a, quando comparado à períodos de concentração normal de clorofila-a.

Ao realizar um modelo de regressão linear múltipla, não foi possível observar uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a biomassa de copépodes com as variáveis predictoras de TSM e concentração de clorofila-a (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Modelo de regressão linear múltipla para a biomassa de copépodes tendo a TSM e a concentração de clorofila-a como variáveis preditoras.

<b>Variáveis preditoras</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>t</b>
<b>TSM</b>	0,0043	0,9476	0,0659
<b>Concentração de clorofila-a</b>	0,5146	0,4760	0,7173

## 3.4 DISCUSSÃO

### 3.4.1 *Parâmetros ambientais*

A região do Cabo Frio é a área costeira brasileira mais afetada pela intrusão da Água Central do Atlântico Sul (ACAS). Devido às características batimétricas e aos fenômenos meteorológicos que induzem a ressurgência na região, os processos que afetam a distribuição temporal do mesozoplâncton são intensificados (SILVA; VALENTIN; BASTOS, 1988).

Durante o presente estudo, diferenças temporais significativas nas condições oceanográficas na enseada da Ilha do Cabo Frio foram observadas, apresentando uma tendência de sazonalidade. Devido a ascensão da ACAS, durante os meses de primavera e verão foi observado uma diminuição da temperatura da superfície do mar (TSM) e um aumento da concentração de clorofila-a, que resultaram em aumento na produção primária e secundária na região estudada (CARVALHO; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004; COELHO-SOUZA et al., 2012).

A ocorrência da ACAS obedeceu a uma tendência sazonal durante toda a série temporal, com maior intensidade entre os meses de setembro a novembro em quase todos os anos, exceto em 2010, quando a média da temperatura da superfície do mar estava alta. Nos anos de 2013 e 2014 a ACAS se apresentou muito marcante, sendo costumeiramente presente na estação fixa dentro da enseada.

Nessa dissertação pode-se observar que as diferenças sazonais de temperatura têm diminuído ao longo dos anos, de 15,3°C na primavera até 26,64°C no outono. Diferente do que foi observado em um estudo realizado por Fernandes et al (2017) o qual analisou os parâmetros físico-químicos da água de uma série temporal compreendida entre janeiro de 1995 e dezembro de 2009. Esse estudo relatou que as diferenças sazonais de temperatura entre inverno e verão aumentaram ao longo dos anos, de 15,9°C na primavera até 29,4°C no outono. A temperatura é considerada a variável mais importante na estrutura física dos ecossistemas marinhos. Portanto, o aquecimento e o resfriamento dos oceanos pode causar impactos diretos na composição, abundância e eficiência trófica nas comunidades planctônicas (RICHARDSON, 2008).

A concentração de clorofila-a se manteve baixa durante o estudo, exceto em alguns eventos de chegada da ACAS com afloramento de baixas temperatura à superfície. Todavia, há

indícios de que o aumento da abundância de copépodes na superfície rapidamente consumia a concentração de clorofila-a disponível no meio, o que pode ter ocasionado as baixas concentrações de clorofila-a observada. Duas importantes pesquisas foram realizadas na região e tiveram como objetivo o conhecimento das respostas biológicas frente aos eventos de ressurgência e subsidência. Estudos realizados por Gonzalez-Rodriguez et al. (1992) e Pereira; Evsukoff; Ebecken (2009) encontraram uma variação na concentração de clorofila-a entre 0.5-6.0 mg.m<sup>-3</sup>. O estudo realizado por Moser & Giancesella-Galvão (1997) encontrou a concentração de clorofila-a atingindo valores máximos de 25.55 mg.m<sup>-3</sup> (em dezembro/1991) e 1.3 mg.m<sup>-3</sup> (em junho/1992). Portanto, pode-se dizer que na série temporal estudada a concentração de clorofila-a está abaixo do que tem sido descrito na literatura.

#### *3.4.2 Estrutura da assembleia de copépodes*

A análise dos padrões sazonais indicou que eventos de ressurgência apresentaram maior efeito no tamanho dos copépodes do que eventos de subsidência, mesmo com a baixa frequência de ocorrência de eventos de ressurgência na região. Esse efeito foi devido a diminuição da TSM e ao aumento na concentração de clorofila-a (DONOSO et al., 2017). Esses dois fatores caracterizam a presença de águas oriundas da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) na região (SILVA; DOURADO; CANDELLA, 2009).

Nesse estudo foi possível observar o predomínio de copépodes de grande porte (>501µm) quando há TSM fria e um aumento na concentração de clorofila-a, caracterizando eventos de ressurgência, como já descrito em trabalhos anteriores (CAMPANER, 1985; CAMPANER; HONDA, 1987; VALENTIN; MONTEIRO-RIBAS; MUREB, 1987). Em contrapartida, copépodes de pequeno porte (<500 µm) foram frequentes durante o ano todo e abundantes durante eventos de subsidência, similar ao que foi observado em estudos realizados por Rosa; Monteiro-Ribas; Fernandes (2016).

Estudos realizados por Horne et al. (2016) também encontraram um padrão para ambientes sazonais nos quais quase 90% das espécies de copépodes são espécies de pequeno porte que estão localizadas em condições de temperatura mais quentes. Eles também sugerem que em copépodes adultos, a temperatura é o fator mais significativo na resposta do tamanho corporal do que a concentração de clorofila-a. Enquanto que em copépodes juvenis a

concentração de clorofila-a é o fator mais significativo na resposta do tamanho corporal. O que também foi descrito por Hirst; Bunker (2003).

A proporção de ocorrência de copépodes infere mudanças sazonais da assembleia de copépodes em relação às classes de tamanho. No presente trabalho, foi observado uma diminuição na abundância de copépodes de pequeno porte em resposta ao aumento na abundância de copépodes de grande porte. Esse caráter sazonal também foi observado em um estudo realizado por Turner (2004) ao concluir que a maioria dos copépodes de pequeno porte são onívoros que se alimentam de organismos autotróficos e heterotróficos. Diferente dos copépodes de grande porte que são considerados carnívoros pois se alimentam de copépodes de pequeno porte.

A abundância de copépodes apresentou uma grande variação sazonal. Observou-se um aumento significativo da abundância de copépodes com a chegada da ACAS na região, semelhante ao que foi observado por Melo Júnior et al. (2016). Todavia, estudos realizados por Muxagata (1999) registraram abundância média de  $1900 \text{ org.m}^{-3}$  na assembleia de copépodes durante o inverno de 1995 nas proximidades de Cabo Frio, diferente do que foi observado no presente estudo, no qual as maiores abundâncias de copépodes foram observadas nos meses de primavera e verão. Há necessidade de mais estudos relativos as espécies mais abundantes e frequentes durante eventos de ressurgência e subsidência.

Em geral, a variação na biomassa da assembleia de copépodes refletiu a variação na abundância dos mesmos. A biomassa da assembleia de copépodes apresentou uma fraca relação com o fenômeno da ressurgência. Como observou-se uma forte variância entre os anos amostrados, em 2011, 2013 e 2014 os valores máximos de biomassa foram observados durante a primavera, quando a TSM estava abaixo de  $20^{\circ}\text{C}$ . Diferente do que foi observado em um estudo de Eskinazi-Sant'anna; Bjornberg (2006) o qual encontrou um padrão diferente para biomassa de copépodes no canal de São Sebastião, em SP, a qual apresentou valores máximos durante meses de outono e inverno. Ademais, um estudo feito por Valentin, Moreira (1978) constatou que entre os meses de junho a outubro observa-se valores mínimos de biomassa zooplânctônica. E, entre os meses de outubro a abril observa-se os valores máximos de biomassa zooplânctônica. Como até 70% do zooplâncton é composto por copépodes (BRANDINI et al., 1997), pode-se dizer que a biomassa de copépodes segue a mesma distribuição, apresentando valores mínimos entre os meses de junho a outubro e valores máximos entre os meses de outubro a abril. Esses resultados corroboram o que foi observado

no presente estudo, tendo o mês de novembro como o mês com o maior valor de biomassa da assembleia de copépodes e o mês de agosto apresentando os mínimos valores.

Outro aspecto interessante a ser levado em consideração é a diferença observada na abundância e biomassa da assembleia de copépodes frente a eventos de ressurgência e subsidência. Como já descrito, observou-se um aumento significativo na abundância e biomassa de copépodes em eventos de ressurgência, e também foi observado um aumento (em menor significância) em eventos de subsidência. Porém, devido às limitações taxonômicas da FlowCAM, não se pode afirmar em qual nível taxonômico essa diferença foi observada e nem quais espécies são mais frequentes na presença de eventos de ressurgência ou em eventos de subsidência.

### 3.5 CONCLUSÃO

- a) As massas de água têm uma importância fundamental para a variação sazonal das variáveis ambientais e da assembleia de Copepoda na Ilha do Cabo Frio, RJ.
- b) Os resultados obtidos indicaram que a TSM foi a principal variável ambiental que influenciou a estrutura da assembleia de Copepoda, seguida pela concentração da clorofila-a.
- c) A TSM apresentou variação sazonal e interanual durante a série temporal. Durante os meses característicos da presença do fenômeno da ressurgência (primavera e verão) a TSM estava mais fria (abaixo de 20°C) do que nos meses característicos da presença do fenômeno da subsidência (outono e inverno).
- d) A concentração de clorofila-a apresentou variação sazonal de acordo com a ocorrência do fenômeno da ressurgência, com altos valores coincidentes à ressurgência como esperado. Porém, cabe ressaltar que algumas vezes em que foi observada a presença do fenômeno da ressurgência não houve um aumento significativo na concentração de clorofila-a. Há necessidade de mais estudos sobre o porquê dessa diferença.
- e) Observou-se que copépodes de grande porte (>501µm) são mais frequentes durante eventos de ressurgência. Enquanto copépodes de pequeno porte (<500µm) são abundantes durante o ano todo.
- f) Abundância e biomassa de copépodes apresentaram diferenças frente à eventos de ressurgência.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, T. I. M. **Distribuição espacial e sazonal de grupos do microzooplâncton na Bacia de Campos em cinco massas de água, da superfície ao batipelagial**. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALBERTO, M. D. **Relação entre a Acidificação e Biomassa Fitoplânctonica: Uma Análise de 20 anos de Dados Coletados na Zona Costeira da região de Ressurgência de Arraial do Cabo e Simulações Experimentais em Microcosmos**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Dinâmica dos Oceanos e da Terra) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

ALCARAZ, M. et al. Estimating zooplankton biomass through image analysis. **Marine Biology**, v. 143, n. 2, p. 307–315, 2003.

ÁLVAREZ, E. et al. How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using FlowCAM. **Journal of Plankton Research**, v. 33, n. 7, p. 1119–1133, 2011.

ÁLVAREZ, E. et al. Routine determination of plankton community composition and size structure: A comparison between FlowCAM and light microscopy. **Journal of Plankton Research**, v. 36, n. 1, p. 170–184, 2014.

ÁLVAREZ, E.; LÓPEZ-URRUTIA, Á.; NOGUEIRA, E. Improvement of plankton biovolume estimates derived from image-based automatic sampling devices: application to FlowCAM. **Journal of Plankton Research**, v. 34, n. 6, p. 454–469, 2012.

ANDERSEN, K. H. et al. Characteristic Sizes of Life in the Oceans, from Bacteria to Whales. **Annual Review of Marine Science**, v. 8, p. 217–241, 2016.

ARENDRT, J. D. Size-fecundity relationships, growth trajectories, and the temperature-size rule for ectotherms. **Evolution**, v. 65, n. 1, p. 43–51, 2011.

BENFIELD, M. C. et al. Video Plankton Recorder estimates of copepod, pteropod and larvacean distributions from a stratified region of Georges Bank with comparative

measurements from a MOCNESS sampler. **Deep-Sea Research Part II**, v. 43, n. 7–8, p. 1925–1945, 1996.

BENFIELD, M. C. et al. RAPID: Research on Automated Plankton Identification. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 172–187, 2007.

BI, H. et al. A semi-automated image analysis procedure for in Situ plankton imaging systems. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.

BOLTOVSKOY, D. **Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino**. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, 1981.

BONECKER, C. C.; AZEVEDO, F. DE; SIMÕES, N. R. Zooplankton body-size structure and biomass in tropical floodplain lakes : relationship with planktivorous fishes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 3, p. 217–228, 2011.

BONECKER, S. L. C. et al. Estrutura espacial e temporal da comunidade zooplancônica. In: **Ambiente Pelágico: Caracterização ambiental regional da Bacia de Campos, Atlântico Sudoeste**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. p. 171–206.

BRANDINI, F. P. et al. **Planctologia na Plataforma Continental do Brasil. Diagnose e revisão bibliográfica**. Brasília: 196 p. Pontal do Sul: CEMAR/ MMA/ CIBM/ FEMAR, 1997.

CALADO, L. **Dinâmica da interação da atividade de meso-escala da Corrente do Brasil com o fenômeno da ressurgência costeira ao largo de Cabo Frio e Cabo de São Tomé**. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAMOYING, M. G.; YNIGUEZ, A. T. FlowCAM optimization: Attaining good quality images for higher taxonomic classification resolution of natural phytoplankton samples. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 14, p. 305–314, 2016.

CAMPANER, A. F. Occurrence and distribution of copepods (Crustacea) in the epipelagial off southern Brazil. **Boletim do Instituto oceanográfico, São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 5–27, 1985.

CAMPANER, A. F.; HONDA, S. Distribution and co-occurrence of Calanoides carinatus and larvae of Sardinella brasiliensis and Engraulis anchoita over the Southern brazilian continental shelf. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 35, n. 1, p. 7–16, 1987.

CAMPOS, C. C. **Assembleia de copépodes (Copepoda: Crustacea) na plataforma continental nordeste do Brasil**. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CARBONEL, H. C. A. A.; VALENTIN, J. L. Numerical modelling of phytoplankton bloom in the upwelling ecosystem of Cabo Frio (Brazil) AN - prod.academic\_MSTAR\_17287780; 4509424. **Ecological Modelling**, v. 116, n. 2–3, p. 135–148, 1999.

CARVALHO, W. F. DE; GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. Development of primary and bacterial productivity in upwelling waters of Arraial do Cabo region, RJ (Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 1, p. 35–45, 2004.

COELHO-SOUZA, S. A. et al. Biophysical interactions in the Cabo Frio upwelling systems Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 3, p. 353–365, 2012.

COWEN, R. K.; GUIGAND, C. M. In situ ichthyoplankton imaging system (ISIIS): System design and preliminary results. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6, n. 2, p. 126–132, 2008.

CULVERHOUSE, P. F. et al. Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 247, n. May 2014, p. 17–25, 2003.

CULVERHOUSE, P. F. et al. Automatic image analysis of plankton: Future perspectives. **Marine Ecology Progress Series**, v. 312, p. 297–309, 2006.

DANOVARO, R. et al. Marine viruses and global climate change. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 993–1034, 2011.

DEEVEY, G. B.; BROOKS, A. L. The Annual Cycle in Quantity and Composition of the Zooplankton of the Sargasso Sea Off Bermuda. **Limnology and Oceanography**, v. 16, n. 6, p. 17, 1971.

DEEVEY, G. B.; BROOKS, A. L. Copepods of the Sargasso sea of Bermuda: Species composition, and vertical and seasonal distribution between the surface and 2000m. **Bulletin of Marine Science**, v. 27, n. 2, p. 256–291, 1977.

DETMER, T. M. et al. Comparison of microscopy to a semi-automated method (FlowCAM®) for characterization of individual-, population-, and community-level measurements of zooplankton. **Hydrobiologia**, v. 1, p. 12, 2019.

DIAS, C. DE O.; ARAÚJO, A. V. DE. Copepoda. In: BONECKER, S. L. C. (Ed.). . **Atlas de zooplâncton da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. p. 234.

DONOSO, K. et al. Zooplankton community response to the winter 2013 deep convection process in the NW Mediterranean Sea. **Journal of Geophysical Research**, v. 122, n. 3, p. 2319–2338, 2017.

ELIAS, L. M. C. **Variabilidade interanual da Ressurgência de Cabo Frio - RJ**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Oceânica)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; BJORNBERG, T. K. S. Seasonal dynamics of mesozooplankton in Brazilian coastal waters. **Hydrobiologia**, v. 563, p. 253–268, 2006.

EUZEN, A. et al. **The Ocean Revealed**. Paris: CNRS Éditions, 2017.

FERNANDES, L. D. DE A. et al. Seasonal and interannual coupling between sea surface

temperature, phytoplankton and meroplankton in the subtropical south-western Atlantic Ocean. **Journal of Plankton Research**, v. 34, n. 3, p. 236–244, 2012.

FERNANDES, L. D. DE A.; NETTO, E. B. F.; COUTINHO, R. Inter-annual cascade effect on marine food web: A benthic pathway lagging nutrient supply to pelagic fish stock. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–11, 2017.

FILHO, J. E. M. **Variação temporal e crescimento do zooplâncton no litoral norte de São Paulo, com ênfase em estágios imaturos de copépodes**. 261 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FLUID IMAGING TECHNOLOGIES INC. **FlowCAM® Manual Version 3.2**. 3. ed. Maine.

FOREST, A. et al. Size distribution of particles and zooplankton across the shelf-basin system in southeast Beaufort Sea: combined results from an Underwater Vision Profiler and vertical net tows. **Biogeosciences**, v. 9, p. 1301–1320, 2012.

GLAZIER, D. S. Beyond the “3/4-power law”: Variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 80, n. 4, p. 611–662, 2005.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Upwelling and downwelling at Cabo Frio (Brazil): Comparison of biomass and primary production responses. **Journal of Plankton Research**, v. 14, n. 2, p. 289–306, 1992.

GORSKY, G. et al. Large particulate matter in the Western Mediterranean I. **Journal of Marine Systems**, v. 33–34, p. 289–311, 2002.

GORSKY, G. et al. Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. **Journal of Plankton Research**, v. 32, n. 3, p. 285–303, 2010.

GROSJEAN, P. et al. Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. **ICES Journal of Marine Science**, v.

61, p. 518–525, 2004.

GUENTHER, M. et al. Plankton trophic structure and particulate organic carbon production during a coastal downwelling-upwelling cycle. **Marine Ecology Progress Series**, v. 363, n. July, p. 109–119, 2008.

HART, R. C.; BYCHEK, E. A. Body size in freshwater planktonic crustaceans: An overview of extrinsic determinants and modifying influences of biotic interactions. **Hydrobiologia**, v. 668, n. 1, p. 61–108, 2011.

HERMAN, A. W. Design and calibration of a new optical plankton counter capable of sizing small zooplankton. **Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers**, v. 39, n. 3–4, p. 395–415, 1992.

HERMAN, A. W.; HARVEY, M. Application of normalized biomass size spectra to laser optical plankton counter net intercomparisons of zooplankton distributions. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 111, n. 5, p. 1–9, 2006.

HIRST, A. G.; BUNKER, A. J. Growth of marine planktonic copepods: global rates and patterns in relation to chlorophyll a, temperature, and body weight. **Limnology and Oceanography**, v. 48, n. 5, p. 1988–2010, 2003.

HORNE, C. R. et al. A global synthesis of seasonal temperature–size responses in copepods. **Global Ecology and Biogeography**, v. 25, n. 8, p. 988–999, 2016.

IDE, K. et al. A rapid analysis of copepod feeding using FlowCAM. **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 3, p. 275–281, 2008.

JAKOBSEN, H.; CARSTENSEN, J. FlowCAM: Sizing cells and understanding the impact of size distributions on biovolume of -planktonic community structure. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 75–87, 2011.

JI, R. et al. Marine plankton phenology and life history in a changing climate: Current research

and future directions. **Journal of Plankton Research**, v. 32, n. 10, p. 1355–1368, 2010.

JÚNIOR, M. M. et al. Temporal changes in pelagic copepod assemblages off Ubatuba, Brazil. **Marine Ecology**, v. 37, n. 4, p. 877–890, 2016.

KÄMPF, J.; CHAPMAN, P. The functioning of Coastal Upwelling Systems. In: **Upwelling Systems of the World: A Scientific Journey to the Most Productive Marine Ecosystems**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 35.

KARNAN, C. et al. On the accuracy of assessing copepod size and biovolume using FlowCAM and traditional microscopy. **Indian Journal of Geo Marine Science**, v. 46, n. 7, p. 1261–1264, 2017.

KIØRBOE, T. How zooplankton feed: Mechanisms, traits and trade-offs. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 311–339, 2011.

LALLI, C. M.; PARSONS, T. R. **Biological Oceanography: An Introduction**. 2. ed. Oxford: Elsevier's Science & Technology, 1997.

LE BOURG, B. et al. SHORT COMMUNICATION: FlowCAM as a tool for studying small (80-1000  $\mu\text{m}$ ) metazooplankton communities. **Journal of Plankton Research**, v. 37, n. 4, p. 666–670, 2015.

LUO, T. et al. Recognizing plankton images from the shadow image particle profiling evaluation recorder. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics**, v. 34, n. 4, p. 1753–1762, 2004.

MACKAS, D. L.; BEAUGRAND, G. Comparisons of zooplankton time series. **Journal of Marine Systems**, v. 79, n. 3–4, p. 286–304, 2010.

MAGNUSSON, W. E.; MOURÃO, G. **Base estatística para estudos ecológicos: A ligação entre as questões e as análises**. Londrina: Editora Planta, 2002.

MIYASHITA, L. K.; JÚNIOR, M. M.; LOPES, R. M. Estuarine and Oceanic Influences on Copepod Abundance and Production of a Subtropical Coastal Area. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 8, p. 815–826, 2009.

MOSER, G. A. O.; GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F. Biological and oceanographic upwelling indicators at Cabo Frio (RJ). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 45, n. 1–2, p. 11–23, 1997.

MUXAGATA, E. **Avaliação da biomassa e distribuição zooplânctonica na plataforma continental sudeste brasileira durante o inverno de 1995**. 188 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 1999.

ODA, T. O. Análise da variabilidade interanual da ressurgência costeira de Cabo Frio através de ondeletas cruzadas (cross wavelets). **XVI Seminário Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. 5, set. 2010.

OMORI, M.; IKEDA, T. **Methods in marine zooplankton ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1984.

PEREIRA, G. C.; EVSUKOFF, A.; EBECKEN, N. F. F. Fuzzy modelling of chlorophyll production in a Brazilian upwelling system. **Ecological Modelling**, v. 220, n. 12, p. 1506–1512, 2009.

PETERS, R. H. **The Ecological Consequences of Body Size**. New York: Cambridge University Press, 1983.

REYNOLDS, R. A. et al. Measurements and characterization of particle size distributions in coastal waters. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 115, n. 8, p. 20, 2010.

RICHARDSON, A. J. In hot water: zooplankton and climate change. **Ices Journal of Marine Science**, v. 65, p. 279–295, 2008.

ROSA, J. DA C. L. DA; MONTEIRO-RIBAS, W. M.; FERNANDES, L. D. DE A.

Herbivorous copepods with emphasis on dynamic *Paracalanus quasimodo* in an upwelling region. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, n. 1, p. 67–74, 2016.

SCHMID, M. S. et al. The LOKI underwater imaging system and an automatic identification model for the detection of zooplankton taxa in the Arctic Ocean. **Methods in Oceanography**, v. 15–16, p. 129–160, 2016.

SCHULTES, S.; LOPES, R. M. Laser Optical Plankton Counter and Zooscan intercomparison in tropical and subtropical marine ecosystems. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 7, p. 771–784, 2009.

SCHULZ, J. et al. Lightframe On-sight Key species Investigation (LOKI). **IEEE Oceans 09**, p. 1–5, 2009.

SCHULZE, K. et al. PlanktoVision – an automated analysis system for the identification of phytoplankton. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 10, 2013.

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

SIERACKI, M. E. et al. Optical plankton imaging and analysis systems for ocean observation. p. 7, 2009.

SILVA, G. L. DA; DOURADO, M. S.; CANDELLA, R. N. **Estudo preliminar da climatologia da ressurgência na região de Arraial do Cabo**. Disponível em: <[http://www.enapet.ufsc.br/anais/ESTUDO\\_PRELIMINAR\\_DA\\_CLIMATOLOGIA\\_DA\\_R ESSURGENCIA\\_NA\\_REGIAO\\_DE\\_ARRAIAL\\_DO\\_CABO\\_RJ.pdf](http://www.enapet.ufsc.br/anais/ESTUDO_PRELIMINAR_DA_CLIMATOLOGIA_DA_R ESSURGENCIA_NA_REGIAO_DE_ARRAIAL_DO_CABO_RJ.pdf)>.

SILVA, N. M. L.; VALENTIN, J. L.; BASTOS, C. T. B. O microfitoplâncton das águas costeiras do litoral Fluminense (estado do Rio de Janeiro): lista de espécies e aspectos ecológicos. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 36, n. 1–2, p. 1–16, 1988.

SOSIK, H. M.; OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow-cytometry. **Limnology And Oceanography: Methods**, v. 5, p. 204–216, 2007.

STANISLAWCZYK, K. et al. Microscopy versus automated imaging flow cytometry for detecting and identifying rare zooplankton. **Hydrobiologia**, p. 13, 2017.

TANG, X. et al. Automatic Plankton Image Recognition. **Artificial Intelligence Review**, v. 12, p. 177–199, 1998.

TREVORROW, M. V.; MACKAS, D. L.; BENFIELD, M. C. Comparison of multifrequency acoustic and in situ measurements of zooplankton abundances in Knight Inlet, British Columbia. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 117, n. 6, p. 3574–3588, 2005.

TURNER, J. T. The Importance of Small Pelagic Planktonic Copepods and Their Role in Pelagic Marine Food Webs. **Zoological Studies**, v. 43, n. 2, p. 255–266, 2004.

VALENTIN, J. L. L'écossystème d'upwelling à Cabo Frio (Brésil). Analyse en composantes principales du plancton à une station fixe. **Oceanol.Acta**, v. 3, n. 1, p. 43–50, 1980.

VALENTIN, J. L. Spatial structure of the zooplankton community in the Cabo Frio region (Brazil) influenced by coastal upwelling. **Hydrobiologia**, v. 113, n. 1, p. 183–199, 1984.

VALENTIN, J. L.; COUTINHO, R. Modelling maximum chlorophyll in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: a preliminary approach. **Ecological Modelling**, v. 52, n. C, p. 103–113, 1990.

VALENTIN, J. L.; MONTEIRO-RIBAS, W. M.; MUREB, M. A. O zooplâncton das águas superficiais costeiras do litoral fluminense : análise multivariada. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 3, p. 265–271, 1987.

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

WITTY, L. M. **Practical Guide to Identifying Freshwater Crustacean Zooplankton**. 2. ed. Ontario: Cooperative Freshwater Ecology Unit, 2004.

WONG, E. et al. Modified FlowCAM procedure for quantifying size distribution of zooplankton with sample recycling capacity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–12, 2017.

ZARAUZ, L.; IRIGOIEN, X.; FERNANDES, J. A. Modelling the influence of abiotic and biotic factors on plankton distribution in the Bay of Biscay, during three consecutive years (2004-06). **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 8, p. 857–872, 2008.

ZARAUZ, L.; IRIGOIEN, X.; FERNANDES, J. A. Changes in plankton size structure and composition, during the generation of a phytoplankton bloom, in the central Cantabrian sea. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 2, p. 193–207, 2009.