



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

IAN VIANNA DA ROCHA

MANUTENÇÃO DO CORAL DE ÁGUAS PROFUNDAS *Lophelia pertusa*
(LINNAEUS, 1758) EM LABORATÓRIO E EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO
COM BARITA USANDO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA

ARRAIAL DO CABO / RJ

2020

IAN VIANNA DA ROCHA

**MANUTENÇÃO DO CORAL DE ÁGUAS PROFUNDAS *Lophelia pertusa*
(LINNAEUS, 1758) EM LABORATÓRIO E EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO
COM BARITA USANDO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Coutinho

ARRAIAL DO CABO / RJ

2020

IAN VIANNA DA ROCHA

**MANUTENÇÃO DO CORAL DE ÁGUAS PROFUNDAS *Lophelia pertusa*
(LINNAEUS, 1758) EM LABORATÓRIO E EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO
COM BARITA USANDO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA**

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

COMISSÃO JULGADORA:

Dra. Sônia Melo

**Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de
Mello – Cenpes/Petrobras**

Prof. Dr. Lohengrin Dias de Almeida Fernandes

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

Prof. Dr. Ricardo Coutinho

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

Professor Orientador – Presidente da Banca Examinadora

Arraial do Cabo, 31 de Março de 2020.

FICHA CATALOGRÁFICA
(Elaborada pela Biblioteca do IEAPM)

À minha família e amigos, pelo apoio e amor incondicionais, que me permitiram realizar esse sonho.

Agradecimentos

Aos meus pais por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, e me darem suporte em todos os momentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do IEAPM, em particular, ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Coutinho.

À Petrobras, pelo financiamento e apoio das atividades de pesquisa as quais o meu projeto de mestrado esteve vinculado.

À Priscila Reis e Guarani de Hollanda pela oportunidade e incentivo na realização deste trabalho.

Às diretoras do LABTOX Maria Cristina da S. Maurat, Leila Aparecida da S. Kraus e Marcia V. Reynier pela oportunidade e incentivo para a participação nesta pesquisa.

À todos os colegas do LABTOX que sempre estiveram prontos para auxiliar nas atividades deste projeto.

À Rafaela Costa e Adriano Machado por auxiliarem nas atividades deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao Pedro e Humberto pelas distrações e conversas sempre bem-vindas durante o expediente de trabalho.

À Estéfane Cardinot que pacientemente revisou este trabalho, e me incentivou a continuar a melhorar.

Aos amigos de longa data Gabriel, Fábio, Pippin e Nathan, por sempre garantirem momentos de desconexão com as rotinas sempre puxadas.

À minha amiga e companheira Mariana Lopes, por me apoiar e dar forças durante todo esse trabalho.

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.”
Charles Darwin

RESUMO

A manutenção de corais e em especial de águas profundas sob condições artificiais e experimentação implicam em alto custo e complexidade, porém é necessária para estudos de impactos das atividades offshore de petróleo e gás. Os resíduos dessas atividades contêm barita como agente de peso (>50%), composto por partículas finas que podem afetar fisicamente esses organismos. No presente estudo, o primeiro objetivo foi manter *Lophelia pertusa* em sistemas de aquários de recirculação de água do mar natural ou artificial, comparando seu sucesso e, em segundo, avaliar os efeitos do sufocamento por barita neste coral através de um experimento realizado em aquários com sistema de recirculação de água. Os corais foram coletados por ROV na Bacia de Santos, a 206-247m de profundidade, durante o Projeto SENSIMAR-PETROBRAS. As colônias foram aclimatadas por 80 dias antes dos experimentos em sistemas de aquários de água do mar sintética filtrada (0,5µm) de 700L e 300L, com salinidade (35±1) e temperatura (12±1°C) controladas, e no escuro. O experimento foi conduzido em aquários de 23L em forma de cone, adaptados a um sistema de recirculação de água individual (12L.h⁻¹), utilizando água do mar sintética. Cada exposição a partículas de barita em suspensão (50 e 100mg.L⁻¹) mais um grupo controle foram mantidos em triplicata. Três fragmentos com 3-8 pólipos foram acomodados verticalmente nos aquários e aclimatados por 7 dias antes do início dos experimentos. Eles foram alimentados três vezes por semana com 300 náuplios recém eclodidos (<24h) de *Artemia* sp. por litro. O delineamento experimental simulou dois ciclos de descarga, seguidos de um ciclo de recuperação de 7 dias cada, totalizando 35 dias. A barita foi adicionada continuamente com uma bomba peristáltica (0,18 L.h⁻¹). A sobrevivência foi verificada após o experimento. Três pólipos em cada fragmento (9 por tratamento) foram monitorados duas vezes por dia em relação aos níveis de comportamento (1 = pólipos total ou parcialmente estendidos; 0 = totalmente retraídos). Em relação ao uso de água do mar sintética no sistema de manutenção, apresentou resultados promissores para *L. pertusa*. Após 35 dias, a sobrevivência total do pólipo no controle foi de 100% (n = 47), enquanto em 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹ foram de 94,2% (n = 52) e 93,6% (n = 47), respectivamente, sem diferença significativa entre os tratamentos (Kruskal-Wallis qui-quadrado = 1,1667; p = 0,558). A atividade do pólipo foi diferente entre os tratamentos (Kruskal-Wallis qui-quadrado = 142,83; p < 2,2e⁻¹⁶), com ambos os aquários expostos exibindo maior atividade que o controle, o que provavelmente está relacionado ao comportamento natural de limpeza de *L. pertusa*. A produção de muco foi observada após o primeiro ciclo de descarga em ambos os tratamentos, e nenhum no controle, o que também está possivelmente relacionado ao comportamento de limpeza do coral. *L. pertusa* mostrou tolerância à sedimentação de barita. O sistema de recirculação projetado para este experimento foi adequado para a exposição à barita.

Palavras-chave: Corais de águas profundas; *Lophelia pertusa*; Sistema de manutenção; Barita.

ABSTRACT

The maintenance of corals, especially deep-sea species, under artificial conditions and experimentation imply in high cost and complexity, but it is necessary for conducting studies of offshore oil and gas activities impacts. Waste material from these activities contains barite as a weighting agent (>50%), which is composed by fine particles that can physically affect these organisms. In the present study, the first goal was to maintain *Lophelia pertusa* in aquaria systems with recirculating natural or artificial seawater, comparing their success, and secondly, to assess the effects of barite smothering on this coral in an aquaria-based experiment with water recirculation system. Corals were collected by ROV from Santos Basin, at 206-247 m depth, during SENSIMAR Project-PETROBRAS. Colonies were acclimated for 80 days prior to the experiments in 700 L and 300 L natural filtered (0.5 μ m) and 300L synthetic seawater aquaria systems, with controlled salinity (35 \pm 1) and temperature (12 \pm 1 $^{\circ}$ C) in darkness. The experiment was conducted in 23L cone-shaped aquaria, adapted with an individual water recirculation system (12L.h $^{-1}$), using synthetic seawater. Each exposure to suspended barite particles (50 and 100mg.L $^{-1}$) plus a control group were maintained in triplicate. Three nubbins with 3-8 polyps were accommodated vertically in the aquaria and acclimated for 7 days before experiments start. They were fed three times a week with 300 *Artemia* sp. nauplii.L $^{-1}$ (<24 h). The experimental design simulated two cycles of discharge, followed by a recovery cycle of 7 days each, totalizing 35 days. The barite was added continuously with a peristaltic pump (0.18L.h $^{-1}$). Survival was checked after the experiment. Three polyps in each nubbin (9 per treatment) were monitored twice a day regarding behavior levels (1 = fully or partially extended polyps; 0 = fully retracted). In relation to the use of synthetic seawater in the maintenance system, it showed promising results for *L. pertusa*. After 35 days, total polyp survival in control was 100% (n = 47), while in 50mg.L $^{-1}$ and 100mg.L $^{-1}$ were 94.2% (n = 52) and 93.6% (n = 47), respectively, with no significant difference between treatments (Kruskal-Wallis chi-squared = 1.1667, p = 0.558). Polyp activity was different between treatments (Kruskal-Wallis chi-squared = 142.83, p<2.2e $^{-16}$), with both exposed aquaria displaying higher activity than control. It is probably related to the natural cleaning behavior of *L. pertusa*. Mucus production was observed after the first cycle of discharge in both treatments, and none in control, which is also possibly related to cleaning behavior. *L. pertusa* showed tolerance to sedimentation of barite. The recirculated system designed for this experiment was adequate for barite exposure.

Key-words: Deep-water corals; *Lophelia pertusa*; Recirculated system; Barite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global de <i>Lophelia pertusa</i>	18
Figura 2 – Distribuição de <i>Lophelia pertusa</i> na costa brasileira.	19
Figura 3 – Área de coleta de fragmentos de <i>L. pertusa</i> na Bacia de Santos, campo Uruguá/Mexilhão.	26
Figura 4 – (A) ROV Installer. (B) Coleta de fragmentos de <i>Lophelia pertusa</i> , cujos fragmentos são acomodados em uma cesta para transporte.....	26
Figura 5 – (A) Sistema de manutenção temporário a bordo do RSV Isabella. (B) Sistema de refrigeração de água do mar para trocas de água.....	27
Figura 6 – Fragmentos de <i>Lophelia pertusa</i> com tags, para identificação quanto ao banco de origem.....	28
Figura 7 – Sistema de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> . (A) Esquema do sistema com todos os compartimentos. (B) Sistema 2 com total de 300 litros.	29
Figura 8 – Sump com Skimmer de proteína, bag na saída de água dos aquários e mídias de porcelana para filtro biológico.	30
Figura 9 – Série temporal da salinidade nos três sistemas de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> ao longo de três meses. Quedas bruscas representam ajuste na salinidade.	36
Figura 10 – Box-plot dos dados de salinidade para os três sistemas de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> . Menor variação observada no Sistema 1. ...	37
Figura 11 – Série temporal da temperatura para os sistemas. Variação para dados de três meses.	38
Figura 12 – Box-plot para dados de temperatura. Sistema 1 com menor variação, porém com mais outliers.	39
Figura 13 – Série temporal para variação de pH ao longo dos três meses analisados para os sistemas. Variação evidente no Sistema 2 ao fim do mês de Maio.	40
Figura 14 – Box-plot dos dados de pH. Sistema 1 com menor variação, e Sistema 2 com maior variação entre os dados.	41
Figura 15 – Série temporal para oxigênio dissolvido (OD) para os sistemas 2 e 3. Sistema 2 com variações mais evidentes.....	42

Figura 16 – Box-plot para os dados de oxigênio dissolvido (OD) para os sistemas 2 e 3. Ambos os sistemas apresentaram dados próximos entre si.	43
Figura 17 – Box-plot para dados de amônia para os três sistemas de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> . Variações pequenas nos três sistemas, com a menor variação observada no Sistema 1. Maior concentração observada no Sistema 3.	44
Figura 18 – Box-plot para dados de nitrito dos sistemas de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> . Sistema 2 com maior variação em relação aos outros sistemas.	45
Figura 19 – Box-plot para dados de nitrato para os sistemas de manutenção de <i>Lophelia pertusa</i> . Variações elevadas no Sistema 2 quando comparado aos outros sistemas.	46
Figura 20 – Unidade experimental utilizada para o ensaio de exposição a barita com <i>Lophelia pertusa</i>	57
Figura 21 – Cronograma com as principais atividades realizadas durante os 35 dias de experimento com <i>Lophelia pertusa</i> de 15 de junho a 20 de julho de 2017.	59
Figura 22 – Curva de transformação de turbidez (NTU) para mg.L-1 de barita.	61
Figura 23 – Referências para a observação direta da atividade de <i>Lophelia pertusa</i> . (A) Pólipo fechado = 0. (B) Pólipo aberto = 1.	62
Figura 24 – Modelo do sistema de recirculação da solução barita/água do mar para os experimentos com <i>Lophelia pertusa</i> no pré-teste realizado em 2016.	65
Figura 25 – Segundo modelo de sistema de recirculação da solução barita/água do mar para o experimento com <i>Lophelia pertusa</i> . Sistema com refrigeração e fluxo realizado por bomba de aquário.	66
Figura 26 – Variação da concentração de barita no 1º modelo de unidade experimental.	67
Figura 27 – Modelo do sistema de recirculação da solução barita/água do mar para o experimento com <i>Lophelia pertusa</i> com bomba auxiliar.	68
Figura 28 – Variação da concentração de barita nos aquários de manutenção durante o pré-teste realizado com o segundo modelo.	68
Figura 29 – Terceiro modelo, com fluxo contínuo em conjunto com sistema de recirculação. Funcionamento intermitente da bomba peristáltica.	70

Figura 30 – Variação de concentração de barita observada para o terceiro modelo da unidade experimental.	71
Figura 31 – Quarto modelo, igual ao terceiro, mas com funcionamento contínuo da bomba peristáltica.	72
Figura 32 – Variação da concentração de barita no aquário de exposição com 100 mg.L ⁻¹ . Quarto modelo de unidade experimental utilizado.	73
Figura 33 – Variação da concentração de barita no aquário em 15 horas. Concentração testada de 50 mg.L ⁻¹	74
Figura 34 – Variação da concentração de barita ao longo dos eventos de exposição.	76
Figura 35 – Fragmentos de <i>Lophelia pertusa</i> expostas a concentração de 50 (A) e 100 (B) mg.L ⁻¹ de barita. A seta indica a presença de muco no coral durante o experimento.....	81
Figura 36 – Taxa de sobrevivência dos pólipos de <i>Lophelia pertusa</i> para cada tratamento. Sobrevivência de mais de 90 % observada em todos os tratamentos.	82
Figura 37 – Box-plot para proporção de pólipos abertos ao longo do ensaio para os tratamentos.....	83
Figura 38 – Box-plot da proporção de pólipos abertos para os períodos de recuperação para os tratamentos de 50 mg.L ⁻¹ e 100 mg.L ⁻¹	84
Figura 39 – Série temporal da proporção de pólipos abertos de <i>Lophelia pertusa</i> para as réplicas do controle ao longo do tempo de ensaio (35 dias).	85
Figura 41 – Série temporal da proporção de pólipos abertos de <i>Lophelia pertusa</i> (linha contínua) e variação da concentração de barita (linha tracejada) no tratamento de 100 mg.L ⁻¹	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatística descritiva para temperatura, salinidade, pH e OD para os sistemas. DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação.	35
Tabela 2 – Estatística descritiva dos produtos nitrogenados para os sistemas de manutenção. DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação.....	43
Tabela 3 – Número de pólipos de <i>Lophelia pertusa</i> por sistema e taxa de sobrevivência para o período de aclimatação. Taxa de sobrevivência similar entre os sistemas.	46
Tabela 4 – Teste de normalidade para a taxa de sobrevivência, com e sem transformação arco-seno. Tanto os dados brutos, quanto os transformados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$).....	63
Tabela 5 – Teste de normalidade para os dados de atividade, com e sem transformação arco-seno, para cada teste. Tanto os dados brutos, quanto os transformados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$).	64
Tabela 6 – Concentrações mínimas, máximas e médias de barita nos aquários de exposição de <i>Lophelia pertusa</i> nas diferentes réplicas (R1 - R3), durante o 1º e 2º ciclos de exposição nos tratamentos de 50 e 100 mg.L-1. CV = coeficiente de variação; DP = desvio padrão.	75
Tabela 7 – Dados descritivos para níveis de amônia para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	77
Tabela 8 – Dados descritivos para níveis de nitrito para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	78
Tabela 9 – Dados descritivos para níveis de nitrato para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	78
Tabela 10 – Dados descritivos para temperatura (°C) para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	79
Tabela 11 – Dados descritivos para pH para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	79
Tabela 12 – Dados descritivos para salinidade para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	79
Tabela 13 – Dados descritivos para oxigênio dissolvido (OD) para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.	80

Tabela 14 – Sobrevivência dos pólipos de <i>Lophelia pertusa</i> de cada réplica para os tratamentos.....	82
Tabela 15 – Análise post hoc para o teste de Kruskal-Wallis, com comparação entre cada tratamento. Diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos.	83
Tabela 16 – Teste de Wilcoxon para entre os períodos de recuperação para cada tratamento exposto com barita. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) tanto entre as recuperações em 50 mg.L-1 quanto em 100 mg.L-1.....	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. HIPÓTESES	21
4. CAPÍTULO 1 – SISTEMA DE MANUTENÇÃO DE <i>Lophelia pertusa</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO	22
4.1. Introdução	22
4.2. Material e Métodos	25
4.3. Resultados	34
4.4. Discussão	47
4.5. Conclusões	52
5. CAPÍTULO 2 – SISTEMA DE EXPOSIÇÃO DE <i>Lophelia pertusa</i> A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BARITA	54
5.1. Introdução	54
5.2. Material e Métodos	55
5.3. Resultados	74
5.4. Discussão	88
5.5. Conclusões	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os corais são conhecidos pela exuberância de cores que caracteriza grandes recifes de águas rasas. Os recifes são considerados ecossistemas complexos e heterogêneos, de grande importância ecológica (Freiwald et al., 2004). Porém, das aproximadamente 5.000 espécies conhecidas, metade habita ambientes profundos e de águas frias (Roberts et al., 2009). Os corais de águas profundas são subdivididos nas classes Anthozoa, com representantes nas subclasses Hexacorallia (Scleractinia e Antipatharia) e Octocorallia, e classe Hydrozoa, com representantes da família Stylasteridae (Roberts et al., 2006). Ao contrário dos corais de águas rasas, corais de águas profundas não apresentam zooxantelas, que são microalgas fotossintetizantes que liberam compostos orgânicos nutritivos para os corais (Gass, 2006; Roberts et al., 2006; Hovland, 2008), por isso dependem de fonte externa de matéria orgânica. Nos últimos anos, o conhecimento em relação aos corais de águas profundas cresceu exponencialmente devido à necessidade de exploração por recursos nessas áreas, como a produção de óleo e gás. Foi facilitada pelo desenvolvimento de novas tecnologias não invasivas e de alta resolução, como submersíveis não-tripulados (ROV), sistemas de câmeras e vídeos, técnicas de acústica e sistema global de posicionamento (GPS) (Freiwald et al., 2004; Roberts et al., 2006).

Corais de águas frias ocorrem em todos os oceanos, com ampla distribuição batimétrica, com registros rasos de cerca de 40 metros (*Lophelia pertusa*) (Fosså et al., 2002) a profundidades de 8.600 metros (Antipatharia) (Roberts et al., 2009). No litoral brasileiro, esses corais ocorrem desde profundidades de 46 metros (*Solenosmilia variabilis*) a profundidades superiores a 2000 metros (*Stephanocyathus diadema*) (Pires, 2007). Os corais formam estruturas tridimensionais, que servem de habitats para diversos organismos, tais como esponjas, poliquetas, crustáceos, equinodermos, briozoários, moluscos e peixes (Freiwald et al., 2004; Lessard-Pilon, et al. 2010; Roberts & Cairns, 2014), e podem abrigar espécies economicamente relevantes (Ross & Quattrini, 2007). A riqueza de espécies registrada para recifes de águas profundas é comparável à encontrada para recifes de ambientes rasos (Rogers, 1999; Roberts et al., 2006).

Dos grupos presentes em ambientes profundos, os corais da ordem Scleractinia são os principais formadores de recifes. Porém, a maioria das espécies conhecidas é solitária, sem formação de estruturas complexas (Cairns, 2001). Em ambientes profundos, as seguintes espécies são consideradas as principais formadoras de recifes no Atlântico Norte: *Lophelia pertusa*, *Madrepora oculata*, *Enallopsammia profunda*, *Goniocorella dumosa*, *Solenosmilia variabilis* e *Oculina varicosa* (Freiwald et al., 2004). Para o Atlântico Sul, na costa brasileira, as espécies formadoras de recife são *L. pertusa*, *S. variabilis*, *M. oculata*, *Enallopsammia rostrata* e *Dendrophyllia alternata* (Castro et al., 2006; Pires et al., 2014). Dessas espécies, *L. pertusa* é a mais abundante e estudada (Roberts, 2002; Brooke & Järnegren, 2012). Com isso, existe uma base de conhecimentos em relação a aspectos ecológicos (Davies et al., 2010; Brooke et al., 2013), biológicos (Provan et al., 2016; Osterloff et al., 2019), impactos (Hennige et al., 2014; Cordes et al., 2016; Järnegren et al., 2017; Gómez et al., 2018), entre outros. Por este motivo, essa espécie foi selecionada como foco para este estudo.

Lophelia pertusa (Linnaeus, 1758) é uma espécie de coral colonial, principal formadora de recifes e habitats em ambiente profundos (Freiwald et al., 2004). É caracterizada por formar colônias arbustivas com vários metros e com milhares de pólipos. Em geral, é conhecida pela coloração branca, porém, espécimes podem apresentar coloração amarela, laranja ou rosada (Freiwald et al., 2004). Podem formar recifes extensos, com até 13 km de extensão (Rogers, 1999).

Classificação taxonômica

Filo: Cnidaria

Classe: Anthozoa

Subclasse: Hexacorallia

Ordem: Scleractinia

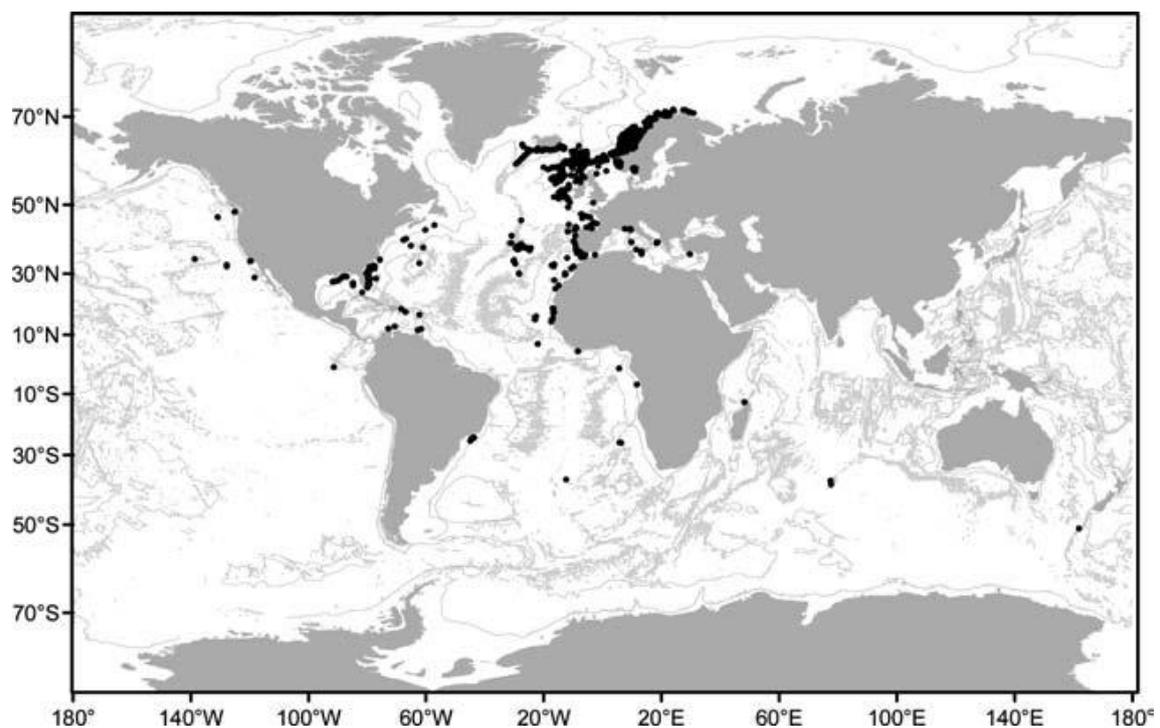
Família: Caryophyllidae

Gênero: *Lophelia*

Espécie: *Lophelia pertusa*

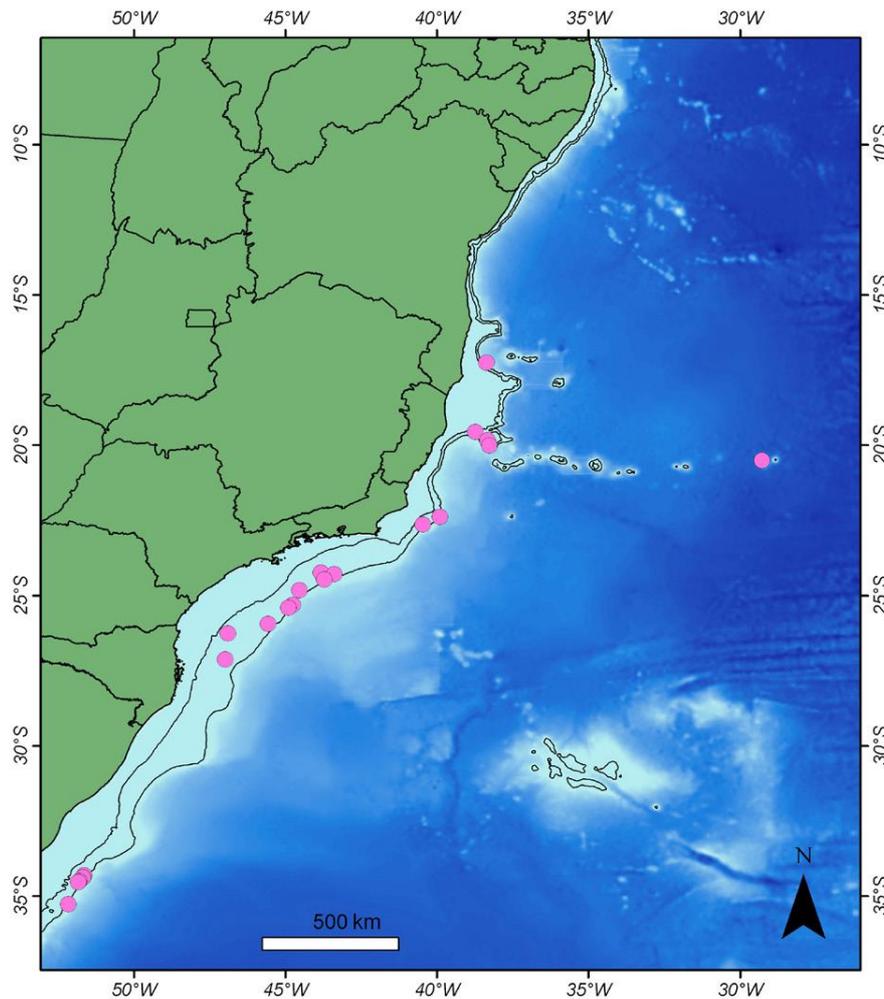
Lophelia pertusa é cosmopolita, com ocorrências para o Atlântico, Pacífico, Índico e Mediterrâneo (Figura 1). O maior número de registros está no Atlântico Norte por conta do maior esforço de pesquisa nessa região ao longo das últimas décadas. Ocorrem em profundidades que variam de 40 metros, na costa da Noruega (Fosså et al., 2002) a 3.000 metros no Atlântico Norte, próximo à América do Norte (Squires, 1959). Sua distribuição ocorre principalmente na faixa de temperatura entre 4 a 13,9 °C (Rogers, 1999; Freiwald et al., 2002; Freiwald et al., 2009). No Brasil, ocorre entre as latitudes 17°25'S a 34°50'S (Pires, 2007) (Figura 2), com distribuição batimétrica de 170 a 1.152 metros (Kitahara, 2006; Pires, 2007).

Figura 1 – Distribuição global de *Lophelia pertusa*.



Fonte: Roberts et al. (2009).

Figura 2 – Distribuição de *Lophelia pertusa* na costa brasileira.



Fonte: Pires et al. (2015)

Impactos antropogênicos

O escalonamento de atividades exploratórias em ambientes profundos coloca em risco os recifes presentes nesses locais. As pescas de arrasto de fundo, o aumento das atividades *offshore* de exploração de óleo e gás e, mais recentemente, a acidificação dos oceanos, representam ameaças para os corais de águas profundas (Rogers, 1999; Roberts et al., 2006; Lunden et al., 2014; Gómez et al., 2018). Em vista disso, recifes de corais, principalmente de *L. pertusa*, são ecossistemas recomendados para proteção urgente (Hall-Spencer & Stehfest, 2009).

Apesar do avanço do conhecimento para esses ambientes, poucos trabalhos descrevem os efeitos de atividades da indústria *offshore* de óleo e gás em experimentos de laboratório. Dentre esses efeitos, destacam-se aqueles oriundos dos descartes da perfuração (Gass & Roberts, 2006; Larsson & Purser, 2011; Baussant et al., 2018) e instalação de estruturas submarinas (Ulfnes et al., 2013; Cordes et al., 2016).

Para melhor avaliar os impactos das atividades de óleo e gás sobre os recifes brasileiros de corais de águas profundas, foi criado em 2016 o “Projeto de Monitoramento de Ambiente Marinhos Sensíveis” (SENSIMAR) pela Petrobras/CENPES. Inserido neste projeto, está o subprojeto “Desenvolvimento de Sistemas de Cultivo e Ensaio com Corais de Águas Profundas e Fauna Associada para Avaliação de Efeitos das Atividades de E&P *Offshore*”, desenvolvido em parceria com o Labtox – Laboratório de Análises Ambientais Ltda. Este trabalho faz parte do escopo desse projeto, que contemplou a avaliação de possíveis impactos da indústria de óleo e gás. Para isso, foram desenvolvidos, nas instalações do Labtox, sistemas de manutenção de corais de águas profundas. Estes sistemas mantiveram fragmentos de *L. pertusa* por 36 meses.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os impactos físicos das atividades *offshore* de óleo e gás no coral escleractíneo *Lophelia pertusa*, através de ensaios realizados em laboratório simulando a exposição à barita.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos incluem:

(1) aprimorar os sistemas de manutenção e procedimentos adotados, além de avaliar o funcionamento dos diferentes sistemas através do monitoramento dos parâmetros físico-químicos;

(2) e desenvolver sistemas de ensaio, aptos a simular diferentes concentrações de descarte de barita, avaliando os efeitos físicos da sedimentação de barita em fragmentos de *L. pertusa* através da observação do comportamento dos pólipos, quantificação de sobrevivência/mortalidade e produção de muco.

Cada objetivo específico foi abordado em um capítulo: o Capítulo 1 para a descrição dos sistemas de manutenção e monitoramento dos parâmetros físico-químicos, e o Capítulo 2, com o foco no desenvolvimento do sistema de exposição e nas respostas dos fragmentos à sedimentação por diferentes concentrações de barita.

3. HIPÓTESES

Em relação aos ensaios de exposição de *L. pertusa* a diferentes concentrações de barita, as hipóteses testadas incluem:

(1) Concentrações mais elevadas de barita implicarão em maior efeito na atividade dos pólipos expostos de *L. pertusa*;

(2) Concentrações mais elevadas de barita afetarão a sobrevivência dos pólipos expostos de *L. pertusa*;

(3) Concentrações mais elevadas de barita apresentarão maior efeito na produção de muco por parte dos pólipos expostos de *L. pertusa*.

4. CAPÍTULO 1 – SISTEMA DE MANUTENÇÃO DE *Lophelia pertusa* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

4.1. Introdução

A utilização de animais aquáticos em experimentos laboratoriais requer a adoção de normas padronizadas de cultivo de forma a disponibilizar indivíduos saudáveis para os experimentos e garantir a confiabilidade dos resultados. Diferentemente dos organismos de águas rasas, a manutenção das espécies de profundidade requer adaptações inerentes a esses ecossistemas. De forma geral, a manutenção desses organismos apresenta limitações quanto à temperatura e pressão (Lunden et al., 2014). A pressão é particularmente crítica para organismos encontrados abaixo de 1.000 metros de profundidade, devido às adaptações presentes para a sobrevivência nesses ambientes (Yancey et al., 2014), uma vez que a sua variação pode afetar diversos processos biológicos (Somero, 1992; Pradillon et al., 2004). Porém, as principais espécies de corais formadoras de recifes de águas profundas, incluindo *Lophelia pertusa*, apresentam distribuição batimétrica ampla (Roberts et al., 2006), o que indica resistência às variações de pressão. Por este motivo, a manutenção e experimentos com esses organismos são realizados sem o controle da pressão (Maier et al., 2009; Hennige et al., 2014). Contudo, a temperatura permanece como fator físico limitante. A temperatura é crítica para a manutenção de corais em aquários, tanto de água rasa, quanto de profunda. Variações bruscas podem comprometer a sobrevivência dos mesmos e, por isso, é imprescindível o seu controle (Delbeek & Sprung, 1994).

Outro parâmetro a se considerar nos sistemas de manutenção com corais de profundidade é o tipo de circulação da água do mar. Os laboratórios estrangeiros que realizam pesquisas com corais de águas profundas geralmente utilizam sistemas de fluxo contínuo para manutenção (Mortensen, 2001; Purser et al., 2010; Naumann et al., 2011; Provan et al., 2016). A água do mar que alimenta esses sistemas é coletada diretamente, de forma constante, e passa através de uma série de filtros para remoção de partículas (Allers et al., 2013; Mueller et al., 2014; Baussant et al., 2017). A troca constante de água no fluxo contínuo garante a manutenção da qualidade necessária à sobrevivência dos

corais e pode fornecer alimentos naturais. Porém, esses sistemas limitam a localização dos laboratórios a regiões costeiras e requerem uma estrutura para captação de água de boa qualidade (Lunden et al., 2014). Contudo, mesmo em laboratórios que atendam a essas restrições, há sempre o risco de contaminações próximas dos pontos de coleta da água do mar, como o ocorrido em fazendas de ostras no México, que foram contaminadas por metais pesados (Osuna-Martinez et al., 2011).

Aquários para manutenção de corais de profundidade montados por Olariaga et al. (2009) no Instituto de Ciencias del Mar (CSIC), em Barcelona, apresentam sistemas híbridos de fluxo, com capacidade de operar tanto em fluxo contínuo, quanto em regime de recirculação, onde o modo de recirculação é utilizado principalmente durante a alimentação dos corais, mas também pode ser acionado quando detectada alguma alteração na qualidade da água do mar.

Sistemas com recirculação normalmente são utilizados durante experimentos com o coral *L. pertusa*. Roberts & Anderson (2002) utilizaram aquários com recirculação em um estudo para adaptar o método de avaliação de atividade de pólipos de *L. pertusa*. Brooke et al. (2009) realizaram ensaios em aquários de 19 litros para avaliar os efeitos da sedimentação sobre *L. pertusa*. Orejas et al. (2016) realizaram experimentos com *L. pertusa* para avaliar a captura de diferentes alimentos sob diferentes intensidades de fluxo de água, utilizando aquários de 5 litros. Mais recentemente Chapron et al. (2018) utilizaram sistemas com recirculação, com 58 litros cada, para avaliar os efeitos de microplásticos sobre crescimento e atividade de *L. pertusa*.

De forma geral, os sistemas experimentais com recirculação de água foram utilizados para manutenção dos corais por curtos períodos de tempo, sem a necessidade de um sistema complexo de filtração para manter a qualidade da água. Sistemas com recirculação da água para manutenção de corais de profundidade por longos períodos de tempo necessitam de maior controle para manter os parâmetros físico-químicos dentro dos limites desejáveis para a espécie em questão. Entre esses parâmetros estão: temperatura, salinidade, concentrações de amônia, nitrito e nitrato, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, entre outros.

Gass (2006) utilizou fluxo de água fechado para manter fragmentos de *L. pertusa*. O sistema para a manutenção da qualidade da água foi montado com *skimmer* de proteínas, luz ultravioleta e filtros biológicos, porém, o autor não detalhou o tempo total de manutenção.

Lunden et al. (2014) propuseram utilizar a recirculação como alternativa ao sistema de fluxo contínuo. Nesse trabalho, foi desenvolvido um sistema de aquários com recirculação para manutenção de longo prazo de *L. pertusa* (de Julho/2009-Agosto/2013 em aquários de manutenção e de Março/2011 a Outubro/2012 em aquários de experimentação). Como apontado pelos autores, um aquário com fluxo fechado requer um sistema extremamente eficiente de filtração para prevenir o acúmulo de excretas e de outros detritos. Foram utilizados filtros biológicos, químicos e mecânicos para manter a água em condições ideais. Os filtros biológicos foram compostos por bactérias nitrificantes (aeróbicas) e denitrificantes (anaeróbicas), responsáveis pela retirada dos produtos nitrogenados. Para a formação desse filtro, foram necessários substratos com grande superfície de contato, como areia e cascalho. Filtros químicos são responsáveis pela remoção de material orgânico, e normalmente, são utilizados carvão ativado, mídias sintéticas e *skimmer* de proteína. Desses, o *skimmer* é o único que remove a maioria do material orgânico fisicamente, antes deste começar a degradar (Delbeek & Sprung, 1994). Os filtros mecânicos são necessários para a remoção do material particulado presente no aquário. Uma luz ultravioleta também foi utilizada para esterilizar a água de patógenos prejudiciais aos corais.

Todas as informações dessas experiências prévias advindas da literatura foram utilizadas para a montagem de sistemas de manutenção de *L. pertusa* sob condições artificiais de laboratório nas dependências do Labtox. Desde 2014, o Labtox mantém fragmentos de *L. pertusa* em sistemas de recirculação. Como citado na Introdução Geral, o esforço para o desenvolvimento de sistemas para acomodar os corais surgiu da necessidade de se estudar os efeitos das atividades *offshore* de óleo e gás em laboratório. A escolha por utilizar sistema fechado foi tornar viável a manutenção de *L. pertusa* dentro das condições do Labtox. Como já observado, sistemas com recirculação de água independem da localização do laboratório e da disponibilidade de água limpa nas proximidades.

Dentro dos sistemas presentes no Labtox, colônias foram capazes de sobreviver por mais de três anos, juntamente com a sua fauna associada.

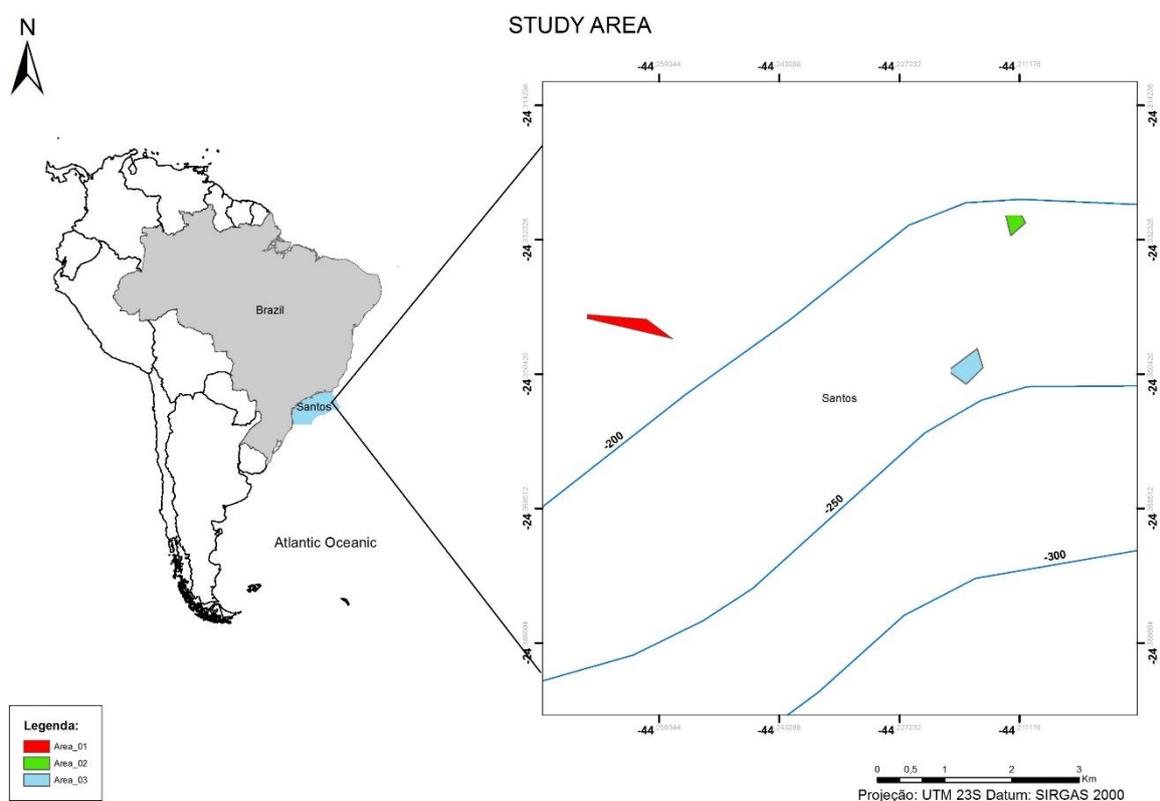
Dessa forma, o presente trabalho tem seu foco na descrição dos aprimoramentos do sistema de manutenção de *L. pertusa* com recirculação da água do mar, bem como dos procedimentos necessários para o seu funcionamento por longo período de tempo. São igualmente apresentados os dados de monitoramento dos parâmetros físico-químicos dos sistemas para a manutenção dos fragmentos de coral dentro dos limites desejáveis (mais próximos possíveis das condições *in situ*) para a espécie.

4.2. Material e Métodos

Coleta de *Lophelia pertusa*

A coleta de corais de águas profundas foi realizada nos dias 21 e 22 de março de 2017, a bordo do navio CBO RSV Isabella, na Bacia de Santos, campo Uruguá/Mexilhão, em três áreas distintas (Figura 3). Os fragmentos foram coletados com auxílio de ROV (*Remote Operated Vehicle*) (Figura 4A) e transportados para bordo através de uma cesta acoplada ao ROV (Figura 4B). Foram visitados 11 bancos distintos, em três faixas de profundidade (206,5 m; 233,0 m; 244,0 m), dos quais foram coletados 191 fragmentos de *L. pertusa* (Figura 4B). Os dados de salinidade e temperatura para esta campanha, obtidos por CTD, se mantiveram próximos de 36 e 14 °C, respectivamente.

Figura 3 – Área de coleta de fragmentos de *L. pertusa* na Bacia de Santos, campo Uruguá/Mexilhão.



Fonte: Petrobras.

Figura 4 – (A) ROV Installer. (B) Coleta de fragmentos de *Lophelia pertusa*, cujos fragmentos são acomodados em uma cesta para transporte.



Fonte: Petrobras.

Foi montado a bordo, em uma sala refrigerada a 17 °C, um sistema temporário de manutenção de circulação fechada (Figura 5A). Esse sistema foi constituído por três contêineres de plástico, conectados entre si, uma bomba de aquário Sarlo Better SB1000 (vazão de 1000 L.h⁻¹) e uma unidade de refrigeração (*Chiller*) da marca Gelaqua, de potência de 1/3 de HP, com temperatura ajustada para a mesma dos pontos de coleta (~12,5 °C). O volume total do sistema foi de 180 litros, e foi utilizada água do mar coletada na superfície. Após a coleta, a água foi filtrada em malha de 45 µm e esterilizada com luz ultravioleta. Um segundo sistema, constituído de um contêiner de 60 L e um *Chiller* Gelaqua de 1/3 de HP, foi montado para a manutenção de água refrigerada para uma eventual troca de água do sistema principal (Figura 5B).

Figura 5 – (A) Sistema de manutenção temporário a bordo do RSV Isabella. (B) Sistema de refrigeração de água do mar para trocas de água.



Fonte: Autor.

Ao serem trazidos a bordo, os fragmentos foram transferidos da cesta para baldes com água previamente resfriada para a temperatura do local de coleta. Os baldes foram transportados ao local onde o sistema de manutenção estava situado, os fragmentos foram identificados com *tags*, e acomodados dentro do sistema (Figura 6). A qualidade da água e a integridade dos fragmentos foram constantemente monitorados para garantir a sobrevivência dos mesmos. Os fragmentos foram transportados do porto, na Ilha da Conceição, Niterói, para o Labtox, situado no Pólo de Biotecnologia da UFRJ, na Ilha do Fundão. Os fragmentos foram transportados para o laboratório em sacos

plásticos acomodados em caixas térmicas, com aeradores a pilha e gelo reutilizável (Gelox) para a manutenção da temperatura da água.

Figura 6 – Fragmentos de *Lophelia pertusa* com tags, para identificação quanto ao banco de origem.



Fonte: Autor.

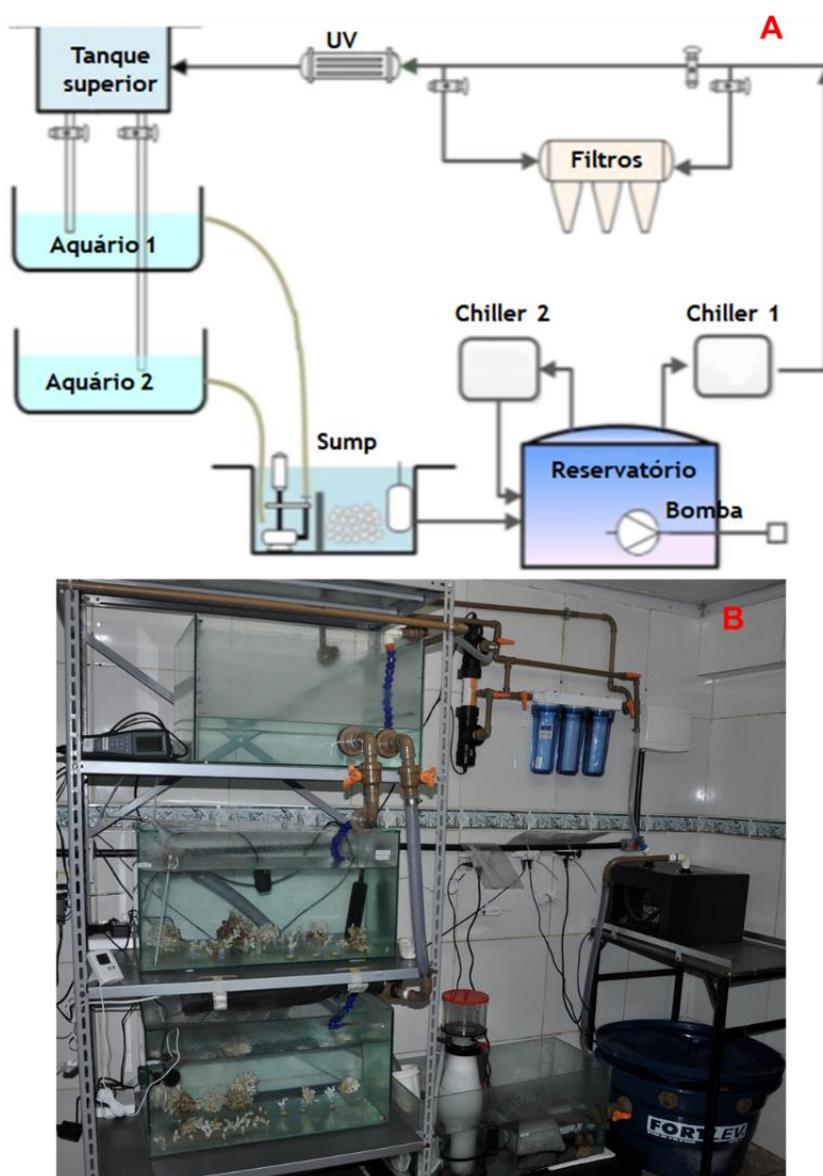
Antes da chegada dos fragmentos nas dependências do Labtox, a temperatura dos sistemas de manutenção nas câmaras frias do laboratório foi ajustada para a temperatura do local de coleta. No laboratório, os fragmentos foram aclimatados antes de serem inseridos nos sistemas. Pequenas quantidades (250 mL) de água provenientes dos sistemas foram adicionadas às caixas térmicas em intervalos de 30 minutos, durante 4 horas (Lunden et al., 2014). Após esse procedimento, os fragmentos foram transferidos para os sistemas, e organizados em bases de acrílico.

Sistema de manutenção

O laboratório dispõe de três sistemas construídos para a manutenção dos corais (Figura 7). Esses sistemas foram denominados de: Sistema 1, com volume total de 700 L, utilizando água do mar natural; Sistema 2, com volume de 300 L, também com água natural; e Sistema 3, com 300 L, porém utilizando água

do mar sintética, produzida no laboratório. Os sistemas ficaram dispostos em duas câmaras frias escuras, com temperatura ajustada para 10 °C. Foram colocadas cortinas tipo *blackout* em frente dos sistemas para reduzir ao máximo o contato com a luz, principalmente durante a rotina de manutenção. A água dos sistemas foi mantida à temperatura de 12 ± 1 °C e salinidade de 35 ± 1 , de acordo com os dados dos pontos de coleta.

Figura 7 – Sistema de manutenção de *Lophelia pertusa*. (A) Esquema do sistema com todos os compartimentos. (B) Sistema 2 com total de 300 litros.



Fonte: Autor.

Os sistemas foram constituídos por dois aquários de manutenção, onde ficaram os fragmentos de *L. pertusa*. Esses aquários possuem bombas Vortech (Marca Ecotech) para simular corrente para os fragmentos. Saídas situadas nos aquários escoam a água para um filtro em forma de saco, denominado *bag* (Figura 8), com malha de 100 μm , situado em um terceiro aquário, denominado *Sump*. No *Sump* é realizada a filtração química e biológica da água do sistema. Nele está situado o *skimmer* de proteínas (marca Reef Octopus[®]), mídias de porcelana, para a formação de filtro biológico, e mídias sintéticas (Figura 7). O *skimmer* produz microbolhas que auxiliam na remoção do material orgânico intacto. O filtro biológico é feito com a adição de cepas de bactérias nitrificantes e desnitrificantes (BioDigest, marca Prodigio), que atuam na remoção de produtos nitrogenados, como Amônia (amônia), Nitrito (nitrito) e Nitrato (nitrito). As mídias sintéticas auxiliam o filtro biológico. Essas mídias são o Purigem[™] e o Phosguard[™], ambas da marca Seachem[®], responsáveis pela remoção de amônia e Fosfato (PO_4^{-3}), respectivamente. Carvão ativado (Matrix Carbon[™], Seachem[®]) também foi adicionado ao *Sump* para auxiliar na remoção de material orgânico.

Figura 8 – *Sump* com *Skimmer* de proteína, *bag* na saída de água dos aquários e mídias de porcelana para filtro biológico.



Fonte: Autor.

O *Sump* se conecta a um reservatório, onde está situada a bomba (SICCE Multi) responsável pela circulação principal do sistema. Para a manutenção da temperatura dos sistemas, é utilizado um *Chiller* (Gelaqua ou Radical), por onde o fluxo principal da água passa. Para o Sistema 1, de maior volume, é utilizado um *Chiller* de 1 HP de potência, enquanto os Sistemas 2 e 3 utilizam de 1/3 de HP. Após o fluxo principal passar pelo *Chiller*, a água passa por três cartuchos de filtros com tamanhos de 25, 10 e 5 µm. Esses filtros removem a maior parte do material em suspensão antes da água retornar aos aquários de manutenção. O fluxo então passa por um filtro de luz ultravioleta (UV), responsável pela esterilização da água, e é direcionado a um aquário na parte superior. O aquário superior apresenta duas saídas que realizam a distribuição da água entre os dois aquários em que estão os fragmentos.

Procedimentos de manutenção

Água natural

A água do mar utilizada foi coletada em Arraial do Cabo, RJ. Antes da coleta, foi realizada uma verificação visual por manchas de óleo e outros sinais que possam indicar contaminação. Ao chegar ao laboratório, o lote de água passou por teste de viabilidade, com realização de um teste agudo (96 horas) com *Mysidopsis juniae* (Crustacea: Mysida). Após a liberação para uso, a água do mar foi filtrada em um sistema com quatro cartuchos de filtros com malhas de 25, 10, 5 e 1 µm. Antes de ser adicionada aos sistemas, a água é refrigerada dentro da câmara fria, ajustada a salinidade para 35 e esterilizada com filtro UV.

Água artificial

A água do mar artificial é produzida a partir da mistura de sal marinho adquirido comercialmente com água deionizada. A água deionizada é obtida com o equipamento OS10LXE da marca Gehaka. À água, é adicionado o sal Tropic Marin® Pro Reef, na proporção de 40,3 g por litro, para a produção de água com salinidade 35. A mistura é realizada com uma bomba de aquário de vazão alta (2500-4000 L/h) e aeração forte, e permanece assim até a água estar completamente transparente. A salinidade é verificada com refratômetro digital

ATAGO®. Caso haja divergência na salinidade mensurada com a desejada, ajustes são realizados. A água artificial, por ser produzida no laboratório, não passa por teste de viabilidade. O sal apresenta níveis elevados de cálcio e magnésio, para promover um maior crescimento dos corais.

Alimentação

A alimentação dos sistemas é realizada três vezes na semana. Durante a alimentação, o fluxo principal é interrompido, e os equipamentos como o *Chiller* e o filtro UV são desligados. A circulação interna dos aquários é conservada para manter o alimento em suspensão. Os sistemas permanecem desligados durante duas horas.

Para o alimento, foram utilizados náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos (~24h) (Brooke et al., 2013; Baussant et al., 2017), e uma mistura para corais na proporção de 1:1 de zoo e fitoplâncton (Zooplankton e Phytoplankton da marca Seachem®). A quantidade de *Artemia* sp. adicionada aos sistemas foi na proporção de 100 náuplios/pólipo. A ração, por sua vez, era adicionada conforme as recomendações do fabricante (5mL/100L de água).

Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros dos sistemas foram monitorados periodicamente entre Março e Junho de 2017. Esses parâmetros são: amônia, nitrito e nitrato, com análises semanais; temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (OD) e pH, com acompanhamento contínuo. Para o controle de amônia, nitrito e nitrato, foram utilizados como referência os níveis descritos em Lunden et al. (2014). Para temperatura e salinidade, foram utilizadas as medições por CTD dos pontos de coleta para a campanha de 2016 como referência para os sistemas. Como referência de pH, foi realizada coleta de água com garrafa Van Dorn próximo aos bancos de *L. pertusa*, e realizadas medições a bordo com YSI Professional Plus, com o valor encontrado próximo de 8,1. Este valor foi utilizado como referência para os sistemas de manutenção.

As leituras de nitrito e nitrato foram realizadas através de análises colorimétricas (colorímetro LaMotte Smart 3), enquanto amônia era quantificada com o eletrodo Thermo Orion 4 Star.

Para medições contínuas, foram utilizados os multiparâmetros YSI® Professional Plus, um em cada sistema. Os multiparâmetros foram configurados para coletar dados de temperatura (°C), OD (mg/L), salinidade e pH a cada hora. Os dados foram importados para o PC através do *software* YSI Pro Series Data Manager v. 1.1.8, para análises posteriores.

Outros parâmetros foram acompanhados, como alcalinidade (dKH), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), com a finalidade de controle e manutenção desses nutrientes. Para tanto, foi utilizado o Multitest Kit Marine Care de análises para aquários da marca Red Sea®.

Durante o período de manutenção, foram coletados, com o YSI, para cada parâmetro, 1.715 dados para o Sistema 1, 1.671 para o Sistema 2 e 1.742 dados para o Sistema 3. Para os parâmetros mensurados semanalmente, foram registradas 14 medições para cada um, em cada sistema.

Manutenção dos sistemas

Apesar dos sistemas apresentarem filtros e equipamentos que auxiliam na manutenção da qualidade da água, outros cuidados são necessários para garantir essa qualidade. A limpeza dos aquários era realizada semanalmente, para reduzir a carga de material orgânico presente, principalmente após a alimentação. A troca dos *bags* era feita também após a alimentação. O *skimmer* acumula o material orgânico em forma de espuma em um recipiente superior removível. Esse recipiente era limpo diariamente. Os filtros nos cartuchos eram substituídos de dois em dois meses, a fim de garantir a eficiência dos sistemas.

Além dos procedimentos de limpeza, trocas parciais da água (TPA) dos sistemas foram realizadas semanalmente. Essa troca auxilia na manutenção da qualidade da água, assim como a reposição de nutrientes e elementos traços (Delbeek & Sprung, 1994; Grguric et al., 2000; Lunden et al., 2014). O volume da TPA era de 10% a 15% do volume do sistema. No caso de aumento nas concentrações de amônia, nitrito e nitrato acima dos níveis aceitáveis, TPAs mais frequentes e de volume maior eram realizadas. A salinidade era controlada dentro dos níveis adotados com a adição de água deionizada. Para a manutenção do pH, era utilizado o produto Kalkwasser, da marca Two Little

Fishies. A adição do Kalkwasser era feita de forma gradual para evitar aumentos bruscos, e ocasionar a mortalidade dos corais. A adição de Kalkwasser também auxiliava a manutenção da reserva alcalina, importante para o crescimento dos corais.

Sobrevivência

A mortalidade foi contabilizada a partir da chegada dos fragmentos no laboratório até a sua retirada para o ensaio com barita. Antes de serem acomodados nos sistemas, os pólipos foram quantificados para cada fragmento. Pólipos mortos eram identificados e retirados a fim de evitar o deterioramento da qualidade da água. Ao final do período de aclimação nos sistemas, uma nova contagem foi realizada para averiguar a sobrevivência dos fragmentos em condições laboratoriais.

Análise de dados

Os dados dos parâmetros físico-químicos foram analisados usando o Microsoft Excel 2016. A partir dos dados, foram construídos gráficos de séries temporais para observar variações ao longo do tempo e gráficos do tipo Box-Plot para observar diferenças entre os sistemas. Análises estatísticas descritivas, como média, máximo, mínimo, desvio padrão (dp) e coeficiente de variação (cv), também foram geradas para cada parâmetro.

4.3. Resultados

Avaliação da qualidade da água dos sistemas de manutenção

YSI Professional Plus

A Tabela 1 apresenta os valores médios, mínimos e máximos dos parâmetros monitorados continuamente pelo equipamento YSI nos três sistemas de *L. pertusa* durante o período de manutenção.

Tabela 1 – Estatística descritiva para temperatura, salinidade, pH e OD para os sistemas. DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação.

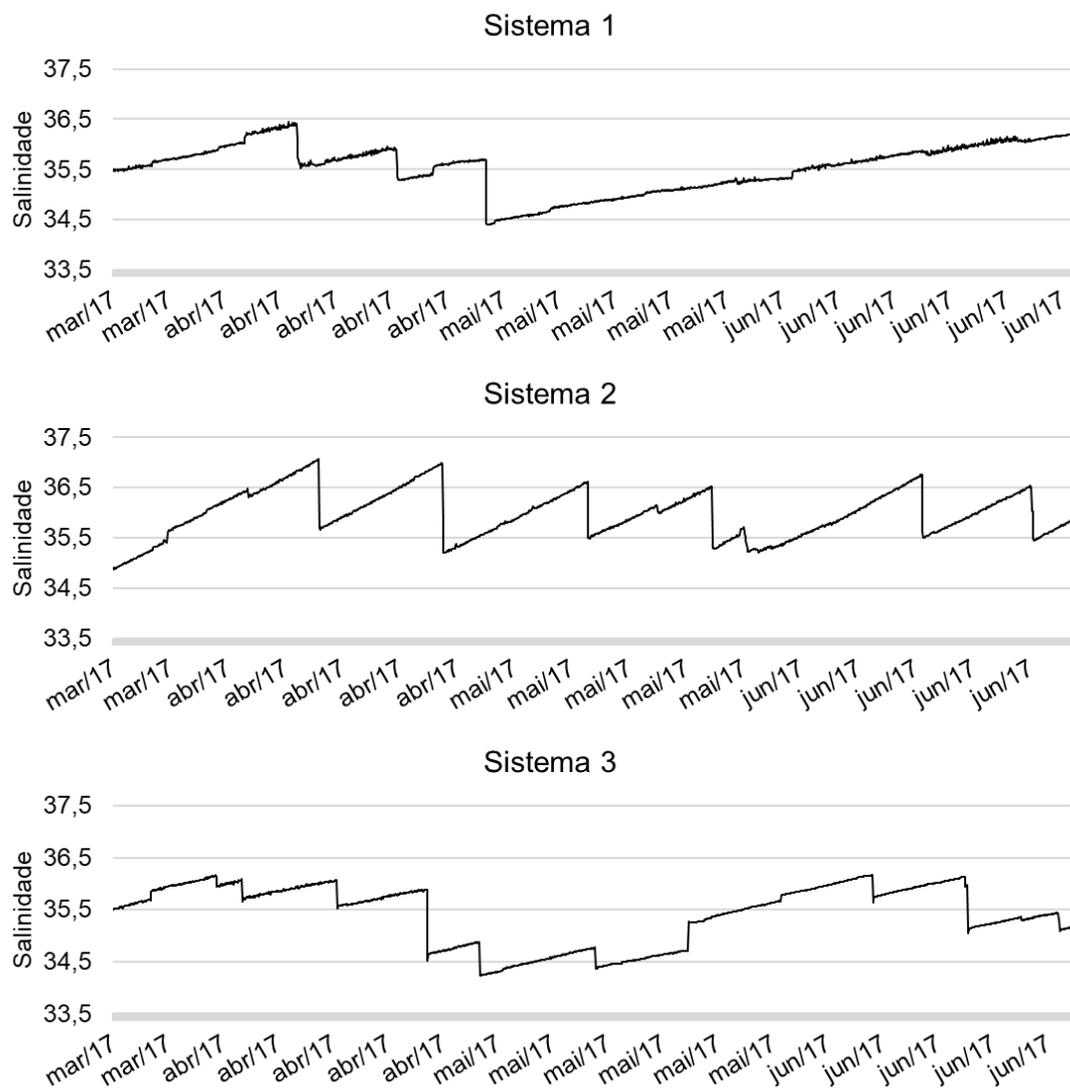
Sistema		Salinidade	OD (mg.L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)
1	Mín.	34,40	-	7,82	10,60
	Máx.	36,45	-	8,59	12,80
	Média ± DP	35,53 ± 0,47	-	8,10 ± 0,11	12,25 ± 0,27
	CV	1,32%	-	1,36%	2,20%
2	Mín.	34,87	4,45	7,53	11,30
	Máx.	37,07	8,04	8,67	12,60
	Média ± DP	35,97 ± 0,47	6,61 ± 0,062	8,25 ± 0,25	12,27 ± 0,26
	CV	1,31%	9,38%	3,03%	2,12%
3	Mín.	34,23	3,59	7,81	11,40
	Máx.	36,16	7,79	8,41	13,10
	Média ± DP	35,42 ± 0,58	6,94 ± 0,59	8,14 ± 0,15	12,20 ± 0,28
	CV	1,64%	8,50%	1,84%	2,30%

Fonte: Autor.

Salinidade

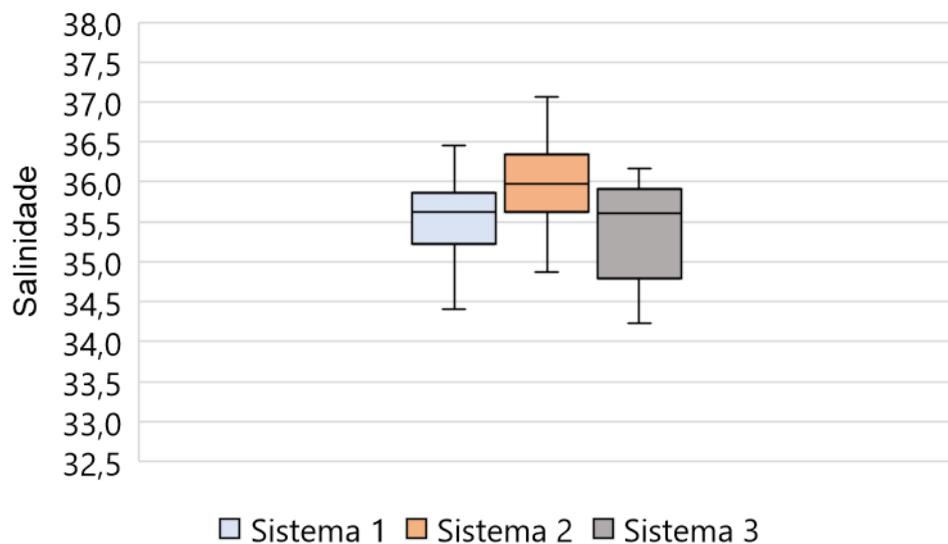
Foram observadas variações entre 34,23 a 37,07 na salinidade dos três sistemas. No Sistema 1, foi observada variação de 34,40 a 36,45 com salinidade média e desvio padrão de 35,53 ± 0,47. O Sistema 2 apresentou variação de 34,87 a 37,07, com média e desvio padrão de 35,97 ± 0,47. Já no Sistema 3, a variação foi de 34,23 a 36,16 e 35,42 ± 0,58 de média e desvio padrão. As salinidades foram consistentes entre si (Figuras 9 e 10), e próximas do valor adotado, com baixo coeficiente de variação. As quedas abruptas na salinidade estão associadas à adição de água deionizada para o seu ajuste (Figura 9).

Figura 9 – Série temporal da salinidade nos três sistemas de manutenção de *Lophelia pertusa* ao longo de três meses. Quedas bruscas representam ajuste na salinidade.



Fonte: Autor.

Figura 10 – Box-plot dos dados de salinidade para os três sistemas de manutenção de *Lophelia pertusa*. Menor variação observada no Sistema 1.

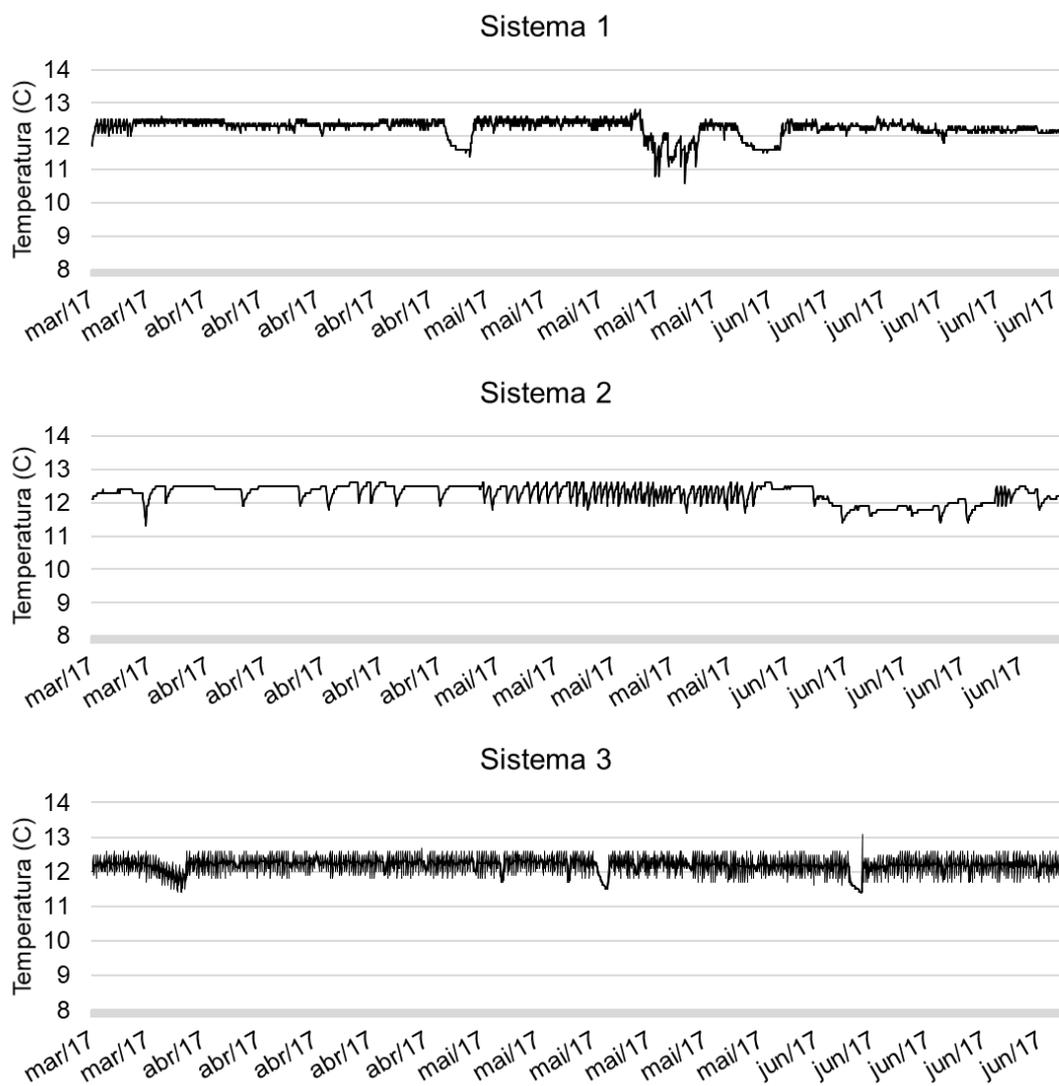


Fonte: Autor.

Temperatura

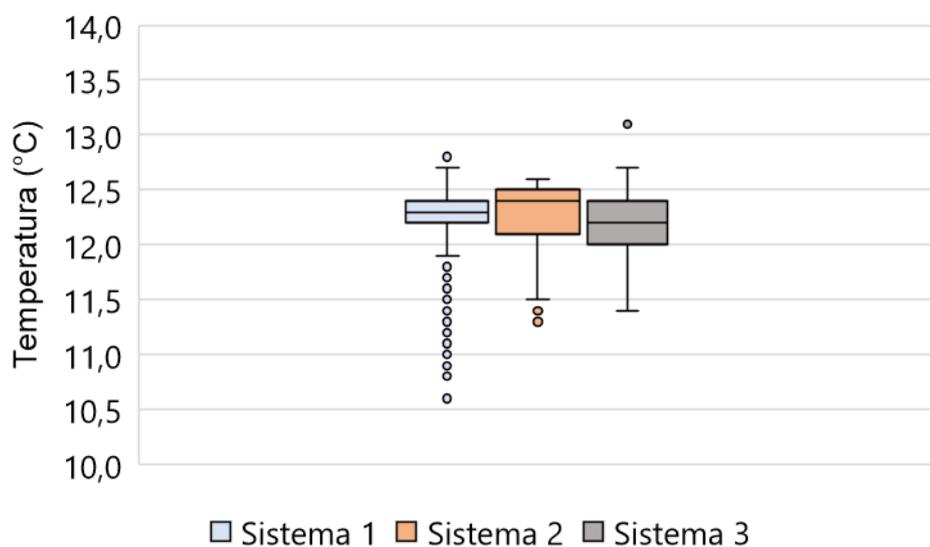
A temperatura apresentou variações de 10,6 a 13,1 °C em todos os sistemas. Para o Sistema 1, foi observada variação de 10,6 a 12,8 °C, com média ($\pm dp$) de $12,25 \pm 0,27$ °C, no Sistema 2, variação de 11,3 a 12,6 °C, e média $12,27 \pm 0,26$ °C, e para o Sistema 3, foi observada variação de 11,4 a 13,1 °C, com média $12,2 \pm 0,28$ °C. Os coeficientes de variação se mantiveram próximos para os três sistemas. Ao observar as variações diárias em quatro dias aleatórios, verificou-se uma variação de 0,2 – 0,5 °C para o Sistema 1, 0,3 – 0,5 °C para o Sistema 2 e 0,8 – 0,9 °C para o Sistema 3. O Sistema 1 e o Sistema 2 apresentaram maior estabilidade na temperatura ao longo do período analisado (Figura 11). O Box-plot apresentado na Figura 12 indica o Sistema 1 com menor variabilidade, apesar dos valores apresentados estarem próximos entre os sistemas, e o Sistema 2 apresentar a menor amplitude ao longo do período analisado.

Figura 11 – Série temporal da temperatura para os sistemas. Variação para dados de três meses.



Fonte: Autor.

Figura 12 – Box-plot para dados de temperatura. Sistema 1 com menor variação, porém com mais outliers.

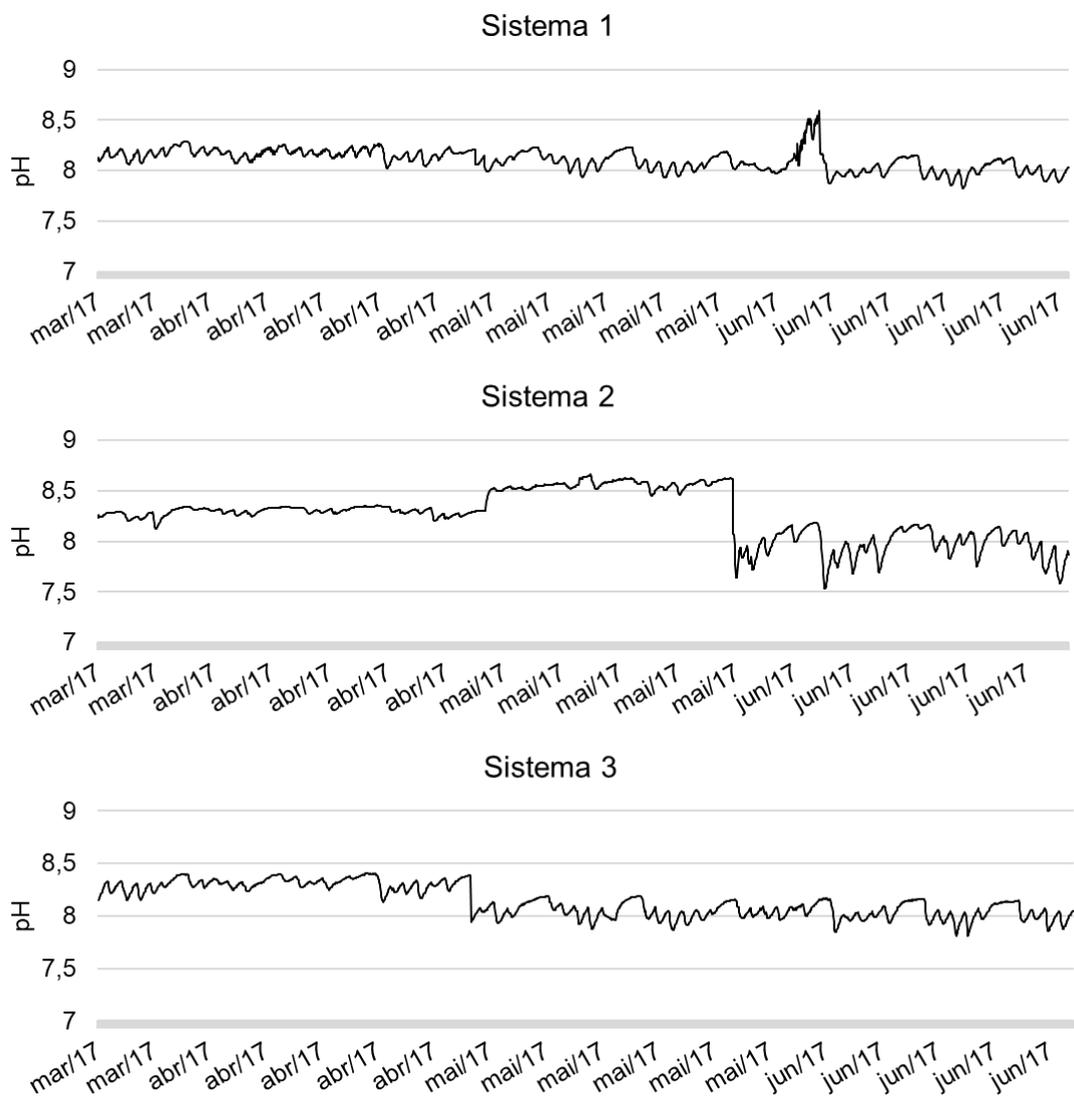


Fonte: Autor.

pH

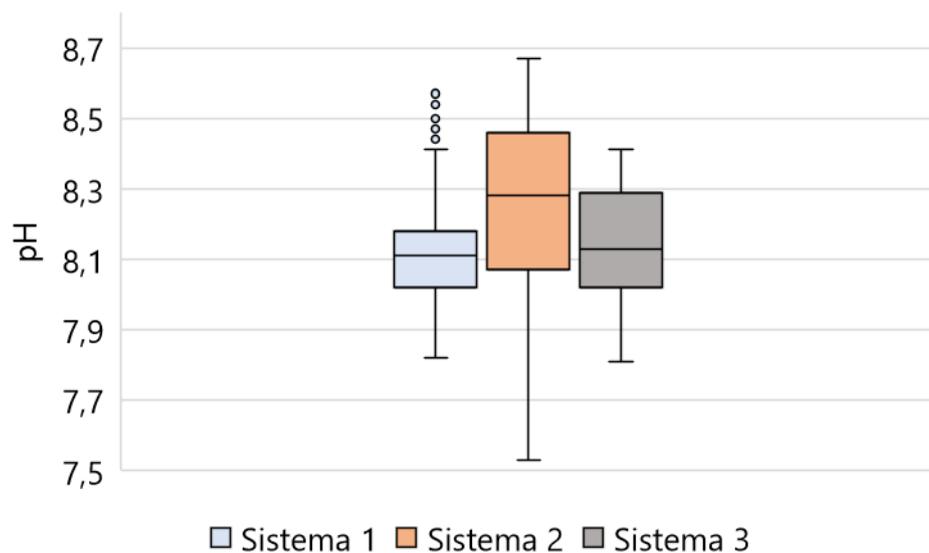
As variações de pH foram de 7,82 a 8,59 no Sistema 1, 7,53 a 8,67 no Sistema 2 e 7,81 a 8,41 no Sistema 3. As médias dos sistemas 1 e 3 ficaram próximas ao valor adotado, com coeficientes de variação baixos. O Sistema 2 apresentou uma maior variação, porém sem efeitos negativos observados. Os sistemas 1 e 3 apresentaram menor variabilidade ao longo do período analisado. Foi possível observar variações pequenas constantes do pH nos três sistemas (Figuras 13 e 14), o que pode indicar uma variação diária normal para os sistemas, sem interferência de algum evento.

Figura 13 – Série temporal para variação de pH ao longo dos três meses analisados para os sistemas. Variação evidente no Sistema 2 ao fim do mês de Maio.



Fonte: Autor.

Figura 14 – Box-plot dos dados de pH. Sistema 1 com menor variação, e Sistema 2 com maior variação entre os dados.

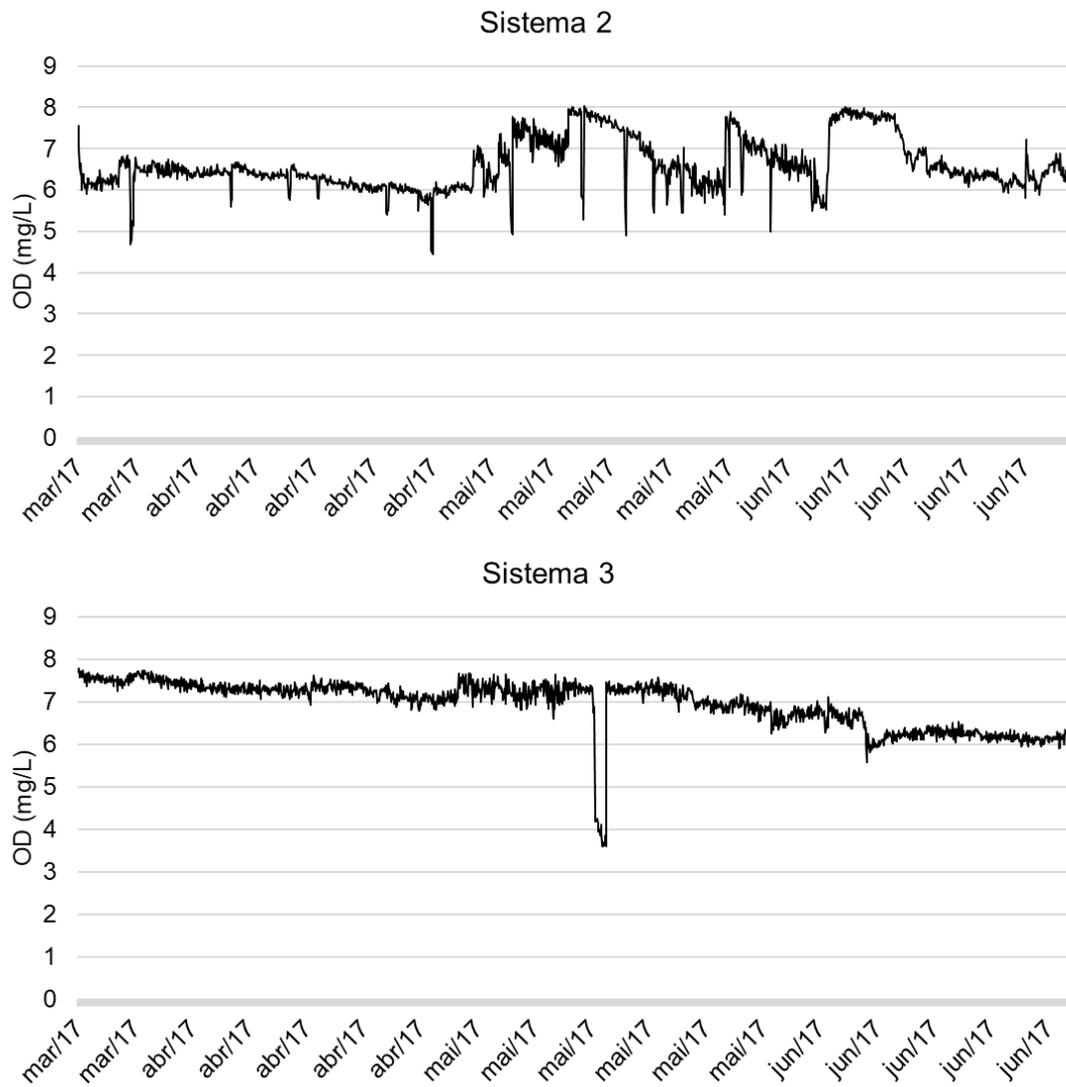


Fonte: Autor.

Oxigênio dissolvido

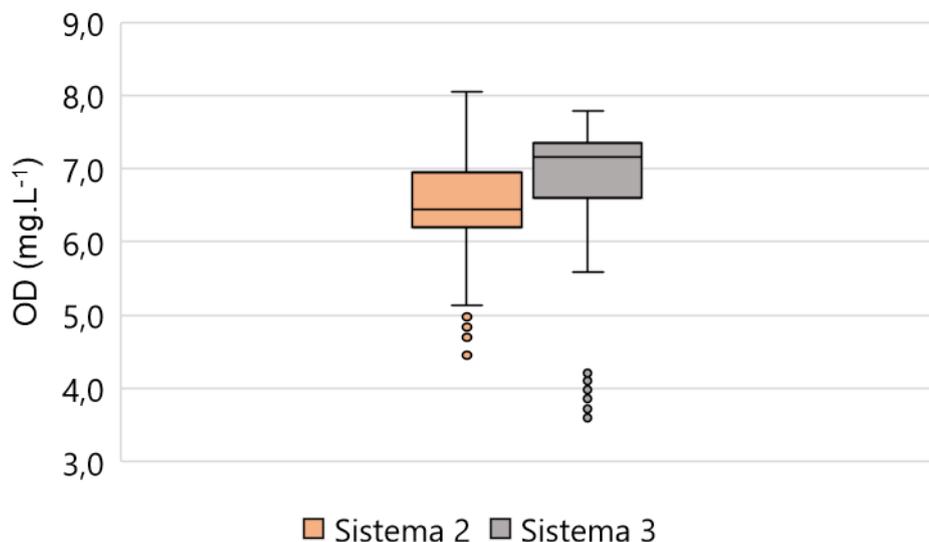
Variações no OD permaneceram entre 3,59 a 8,04 mg.L⁻¹ para os sistemas 2 e 3. A média para o Sistema 2 foi $6,61 \pm 0,62$ mg.L⁻¹ e para o Sistema 3 foi de $6,94 \pm 0,59$ mg.L⁻¹. O coeficiente de variação foi de 9,38% para o Sistema 2 e 8,50% para o Sistema 3. Essas variações foram as mais altas dentre os parâmetros mensurados. Apesar dessas variações, os níveis de OD foram consistentes ao longo do período analisado, com leituras baixas pontuais (Figura 15). O Sistema 3 apresentou menor variação quando comparado com o Sistema 2 (Figura 16).

Figura 15 – Série temporal para oxigênio dissolvido (OD) para os sistemas 2 e 3. Sistema 2 com variações mais evidentes.



Fonte: Autor.

Figura 16 – Box-plot para os dados de oxigênio dissolvido (OD) para os sistemas 2 e 3. Ambos os sistemas apresentaram dados próximos entre si.



Fonte: Autor.

Smart3 e Thermo Orion Star

Os dados de máximo, mínimo, média, desvio padrão e coeficiente de variação de amônia, nitrito e nitrato para o período de manutenção estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Estatística descritiva dos produtos nitrogenados para os sistemas de manutenção. DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação.

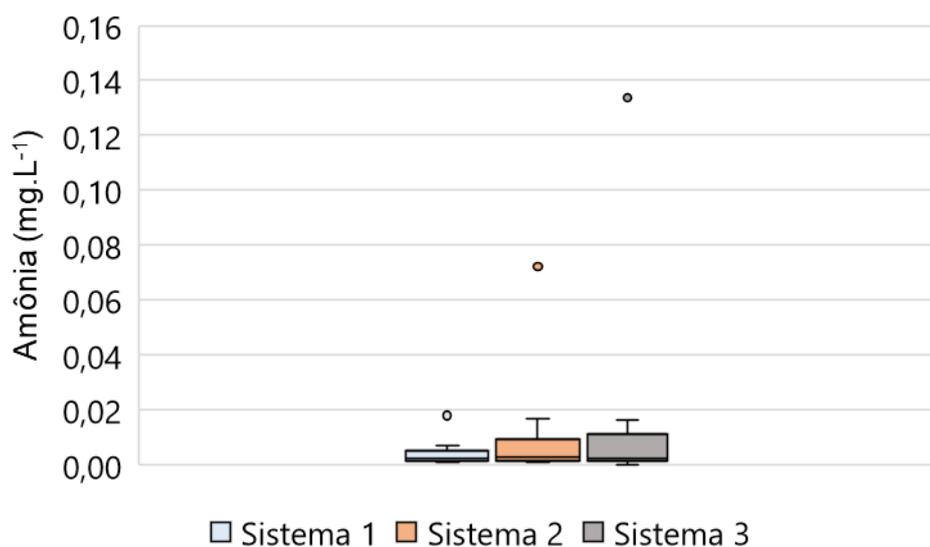
Sistema		Nitrito (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Amônia (mg.L ⁻¹)
1	Mín.	0,0000	0,2780	0,0007
	Máx.	0,0030	0,4060	0,0179
	Média ± DP	0,0004 ± 0,0009	0,3286 ± 0,0364	0,0043 ± 0,0049
2	Mín.	0,0000	0,2890	0,0010
	Máx.	0,1120	0,7090	0,0723
	Média ± DP	0,0116 ± 0,0300	0,3724 ± 0,1084	0,0105 ± 0,0200
3	Mín.	0,0000	0,2890	0,0011
	Máx.	0,0110	0,4420	0,1338
	Média ± DP	0,0014 ± 0,0033	0,3373 ± 0,0420	0,0159 ± 0,0375

Fonte: Autor.

Amônia

Os níveis de amônia variaram entre 0,0007 a 0,1338 mg.L⁻¹, com o menor valor registrado no Sistema 1, e o maior no Sistema 3. O Sistema 2 apresentou variações de 0,001 a 0,0723 mg.L⁻¹. O Sistema 1 apresentou a menor média nos níveis de amônia, com valor de 0,0043 ± 0,0049 mg.L⁻¹. Os sistemas 2 e 3 apresentaram médias próximas, porém o Sistema 3 apresentou uma maior variabilidade nos níveis quando comparado ao Sistema 2. O Sistema 1 foi o mais estável dos três, com as menores concentração (Figura 17).

Figura 17 – Box-plot para dados de amônia para os três sistemas de manutenção de *Lophelia pertusa*. Variações pequenas nos três sistemas, com a menor variação observada no Sistema 1. Maior concentração observada no Sistema 3.

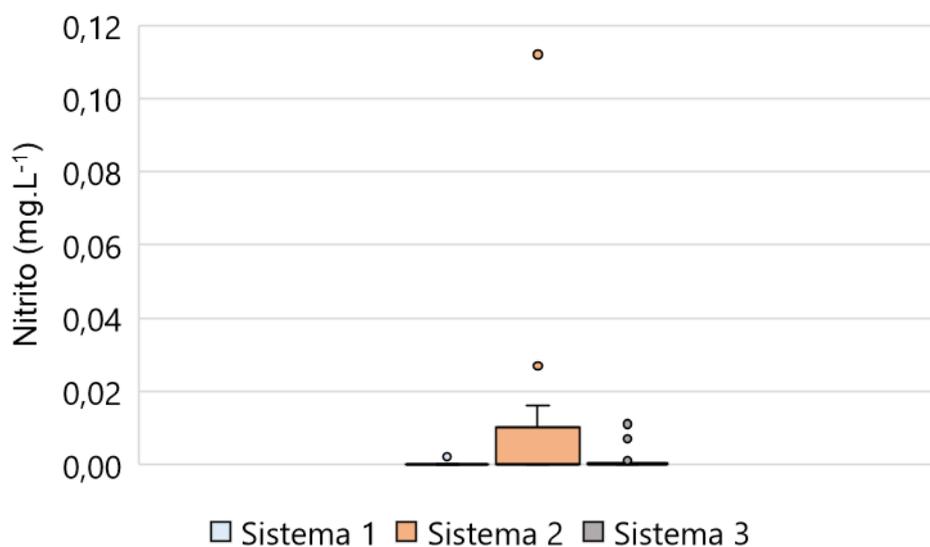


Fonte: Autor.

Nitrito

Nos Sistemas 1 e 3, os níveis de nitrito permaneceram abaixo do limite recomendado para aquário, com valores entre 0 e 0,011 mg.L⁻¹. O Sistema 2 apresentou valores elevados, com máximo de 0,112 mg.L⁻¹ e média de 0,0116 mg.L⁻¹. Os sistemas 1 e 3 apresentaram médias iguais a 0,0004 e 0,0014 mg.L⁻¹, respectivamente. Mais uma vez, o Sistema 1 apresentou maior estabilidade nos níveis de nitrito, seguido do Sistema 3 (Figura 18).

Figura 18 – Box-plot para dados de nitrito dos sistemas de manutenção de *Lophelia pertusa*. Sistema 2 com maior variação em relação aos outros sistemas.

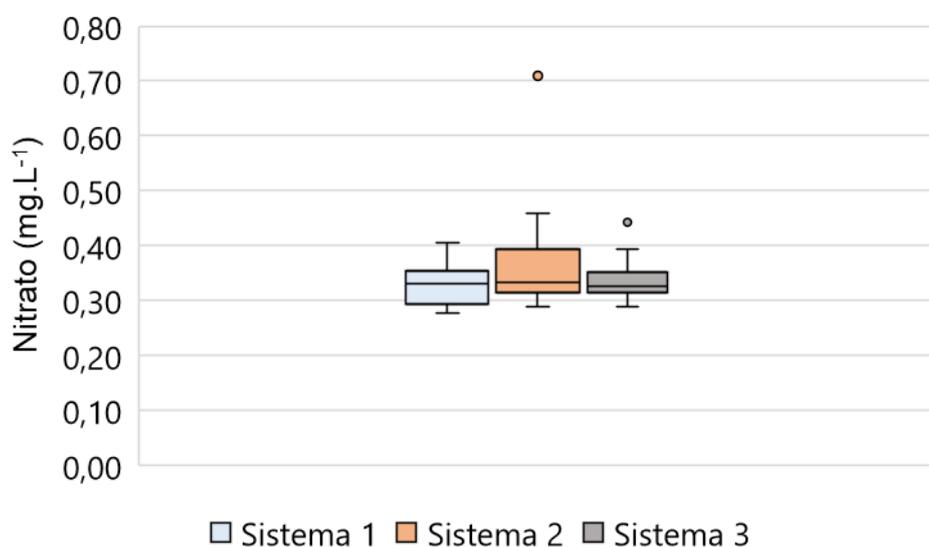


Fonte: Autor.

Nitrato

Os níveis de nitrato variaram de 0,709 mg.L⁻¹, observado no Sistema 2, a 0,278 mg.L⁻¹, no Sistema 1. As médias entre os três sistemas ficaram próximas. O Sistema 2 apresentou maior variação. Dentre os parâmetros analisados, níveis de nitrato foram mais constantes entre os sistemas (Figura 19).

Figura 19 – Box-plot para dados de nitrato para os sistemas de manutenção de *Lophelia pertusa*. Variações elevadas no Sistema 2 quando comparado aos outros sistemas.



Fonte: Autor.

Sobrevivência

Ao fim de 80 dias de aclimação, foi observada uma sobrevivência total de 86,87% dos pólipos coletados. O Sistema 2 apresentou a menor taxa de sobrevivência e o Sistema 1 a maior sobrevivência (Tabela 3). Após esse período, não foi mais observada mortalidade nos sistemas.

Tabela 3 – Número de pólipos de *Lophelia pertusa* por sistema e taxa de sobrevivência para o período de aclimação. Taxa de sobrevivência similar entre os sistemas.

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Total
Total de pólipos inseridos	970	605	504	2.079
Total de mortos	68	119	86	273
% de sobrevivência	92,99	80,33	82,94	86,87

Fonte: Autor.

4.4. Discussão

YSI Professional Plus

Salinidade

A salinidade é um parâmetro que depende da rotina de ajustes com água deionizada para manter os níveis próximos do desejado. Como observado, a adição abrupta de água ocasionou quedas bruscas de salinidade assim como a demora para adição ocasionou aumento nos níveis. Apesar das variações, os níveis mensurados estiveram dentro do intervalo de salinidade na qual *L. pertusa* ocorre ou é mantida, entre 32 e 38 (Roberts, 2002; Freidwald et al., 2009; Movilla et al., 2014). A salinidade dos sistemas apresentou menor variação quando comparado ao registrado por Lunden et al. (2014), de 32 a 38. Os dados dos autores são referentes a um período superior ao apresentado neste trabalho, de quatro anos, porém os valores obtidos estiveram coerentes aos registrados para a primeira coleta que foi mantida durante 36 meses no Labtox. A salinidade, neste caso, variou de 32,06 a 36,33. A salinidade pode ser um parâmetro crítico para a resistência dos corais a outros parâmetros como, por exemplo, a temperatura (Coles & Jokiel, 1978).

Temperatura

A maior estabilidade observada para o Sistema 1 na série temporal pode ser explicada pelo maior volume deste sistema. Por possuírem menos da metade do volume do Sistema 1, os sistemas 2 e 3 apresentaram uma maior variação ao longo do tempo. Apesar do mesmo volume, os sistemas 2 e 3 apresentaram perfis de temperatura distintos, com uma maior variação observada no Sistema 3. Esta diferença pode estar associada aos diferentes equipamentos instalados em cada sistema. No sistema 2 foi utilizado um *chiller* com sensor de temperatura interno, ou seja, mede a temperatura da água que passa diretamente por ele. Já no Sistema 3 foi utilizado um com sensor de externo, o que permite a sua colocação diretamente no aquário de manutenção. Porém esse sensor, caso não fosse bem fixado ao aquário, poderia se deslocar para fora d'água, e por consequência, induzir a uma maior ou menor refrigeração. Os sistemas 1 e 3 apresentaram pontos de temperatura abaixo do limite determinado, e essas reduções de temperatura podem estar associadas à posição do sensor de

temperatura do *chiller*, porém essas temperaturas não afetaram a atividade dos corais.

A temperatura é creditada como fator mais influente na distribuição de *Lophelia pertusa* e outras espécies de corais de ambientes profundos (Roberts et al., 2009). A ocorrência de *L. pertusa* geralmente é limitada a temperaturas entre 4 a 12 °C (Roberts et al., 2006), com distribuição em massas de águas com temperaturas dentro deste intervalo (Frederiksen et al., 1992). Porém, há registros de ocorrência em temperaturas acima deste intervalo, com medições próximas de 14 °C no Mediterrâneo (Freidwald et al., 2009). Variações de temperatura no ambiente são esperadas, como observado para o Golfo do México, com variações entre 6,55 e 14,51 °C em profundidades de 450 metros, entre os meses de Janeiro e Maio de 1979 (Brooke et al., 2013). Em duas diferentes campanhas do Projeto SENSIMAR, foram mensuradas temperaturas entre 12 a 15 °C nos pontos de coleta, para os meses de Março e Outubro, respectivamente. A profundidade dos pontos visitados é caracterizada pela Água Central do Atlântico Sul (ACAS), com temperaturas que podem variar de 6 a 20 °C (Silveira et al., 2000; Sumida et al., 2004). Nos sistemas, as variações se mantiveram dentro do intervalo medido em campo, e do esperado segundo a literatura, com variações diárias abaixo de 1 °C. Lunden et al. (2014), por exemplo, durante um período de 4 anos, observaram variações de 8 a 12 °C, com variações diárias de 7,68 a 8,88 °C no sistema de aquários. Os autores utilizaram um *chiller* similar ao empregado no Labtox em um dos aquários, e um *chiller* em forma de serpentina submersa no outro aquário. No Labtox, para coletas anteriores, durante o período de 16 meses de manutenção, variações de temperatura foram de 10,3 a 12,2 °C. Há registros de variações diárias próximas de bancos de *L. pertusa* acima de 2 °C para ambiente natural, em profundidades de 800 metros (Mienis et al., 2007). A presença de *L. pertusa* em áreas com grande variação de temperatura indica a tolerância da espécie a este parâmetro. Porém, períodos longos em determinada temperatura, principalmente elevadas, podem afetar a saúde dos corais. Segundo Brooke et al. (2013), fragmentos de *L. pertusa* sobreviveram à exposição a temperaturas elevadas (20 °C) pelo período de 24 horas. Em períodos maiores, ocorreu mortalidade total nesta temperatura, e mortalidade parcial em 15 °C em algumas semanas.

Temperaturas baixas não apresentaram efeito na sobrevivência dos corais. Os sistemas foram capazes de manter variações abaixo do observado para o ambiente, e mesmo quando ocorria aumento na temperatura, a mesma não permanecia elevada durante longos períodos.

pH

Os valores elevados de pH estão associados aos ajustes realizados pela adição de Kalkwasser® e Buffer®, que contribuem para um aumento pontual do pH antes de estabilizar. Medições abaixo do referencial podem estar associadas aos períodos de alimentação, onde o fluxo principal permanece desligado. Leituras baixas de pH podem também estar associadas ao acúmulo de biofilme em volta do eletrodo, que era limpo durante a calibração periódica. Apesar das leituras baixas, principalmente no Sistema 2, o pH era rapidamente ajustado para os níveis adotados. A manutenção do pH é importante devido à influência na construção do esqueleto (Hennige et al., 2014). Em ambientes mais ácidos, ocorre deficiência na calcificação dos corais, e por consequência, redução no crescimento do esqueleto (Venn et al., 2012). Para *L. pertusa*, pH entre 7,8 a 8,1 não afeta de forma negativa a calcificação em médio prazo (Movilla et al., 2014), porém pH baixo pode reduzir a taxa de respiração, como observado para *L. pertusa* (Hennige et al., 2014) e para *Solenosmilia variabilis* (Gammon et al., 2018). Apesar das variações, o pH permaneceu próximo ao valor medido para água de fundo (valor de 8,1) em todos os sistemas. Porém, é necessário um maior controle para evitar essas flutuações no pH.

Oxigênio dissolvido (OD)

Os valores de OD estão associados à circulação interna do aquário e à aeração. Somente os sistemas 2 e 3 apresentavam eletrodos de OD no YSI. Os valores mensurados estiveram acima de 6 mg.L⁻¹. Leituras abaixo do esperado estavam associadas a períodos de alimentação, quando o fluxo principal permanecia desligado. O Sistema 3 apresentou leituras mais estáveis quando comparado ao Sistema 2. Leituras baixas também estão associadas ao acúmulo de biofilme nas membranas dos eletrodos. Esse biofilme era retirado periodicamente, o que reestabelecia o funcionamento normal do equipamento. Apesar de *L. pertusa* possuir capacidade de reduzir a taxa de respiração em

situações de hipóxia (Dodds et al., 2007), é importante a manutenção dos níveis de OD próximos da saturação (Delbeek & Sprung, 1994). Como o Sistema 1 não possuía eletrodo de OD, as condições de aeração e corrente foram mantidas iguais as dos sistemas 2 e 3, a fim de garantir os mesmos níveis de OD.

Smart3 e Thermo Orion Star

Amônia

A amônia é extremamente tóxica para organismos aquáticos (Allan et al., 1990; Simard et al., 2015) e, por isso, o seu controle é de suma importância. Os níveis de amônia no Sistema 1 foram os mais baixos, provavelmente por consequência de possuir um volume maior que o dobro dos outros sistemas. Uma maior eficiência do filtro biológico e do *skimmer* de proteínas também podem ter influência nas menores leituras de amônia, apesar da proporcionalidade dos métodos ser próxima entre os sistemas. Apesar de leituras elevadas nos sistemas 2 e 3, estas foram exceção e a média ficou abaixo do limite adotado, e não foi detectada mortalidade após essas leituras elevadas. *Lophelia pertusa* apresentou tolerância a essas variações, como verificado em Lunden et al. (2014), onde foram observadas variações de 0 a 20 mg.L⁻¹, também com adoção de *skimmer* e esqueleto de coral triturado e areia com granulometria de 250 µm, apoiadas em um *plenum*, que consiste em um espaço vazio abaixo do sedimento, para a formação de filtro biológico. Em coletas anteriores no Labtox, foram observadas variações de 0,0003 a 0,164 mg.L⁻¹, sem mortalidade observada, o que corrobora o funcionamento adequado durante o período analisado no presente estudo.

Nitrito

Assim como a amônia, o nitrito também apresenta elevada toxicidade para organismos marinhos (Simard et al., 2015). Os sistemas 1 e 3 mantiveram níveis de nitrito bem abaixo da média observada em Lunden et al. (2014). Alguns valores elevados nesses sistemas foram detectados, porém ainda estavam bem abaixo do limite adotado. O Sistema 2 apresentou a maior leitura de nitrito, próximo do limite adotado, porém de forma pontual, sem ocasionar mortalidade

dos pólipos. Variações mais acentuadas foram observadas em Lunden et al. (2014), com variações iguais às observadas para amônia, sem promover mortalidade nos fragmentos mantidos pelos autores. Para a primeira coleta, foram observadas variações de 0 a 0,649 mg.L⁻¹, também sem afetar a saúde dos fragmentos de forma permanente.

Nitrato

Já o nitrato não apresenta a mesma toxicidade dos outros compostos nitrogenados (Scott & Crunkilton, 2000), porém está associado à proliferação de algas em aquários (Tal et al., 2003). Para manutenção de *L. pertusa*, o crescimento de algas não é considerado por conta das condições afóticas, com iluminação restrita somente durante a rotina de manutenção. Os níveis de nitrato foram próximos entre os sistemas, com o Sistema 2 apresentando a maior variação. Todas as leituras permaneceram abaixo do limite adotado, apesar de ser o nutriente com as maiores leituras. Leituras altas foram observadas anteriormente para os fragmentos da primeira coleta, com variações de 0 a 3,128 mg.L⁻¹ e média de 0,708 mg.L⁻¹, sem afetar a sobrevivência dos corais. Quando comparados à primeira coleta, as leituras para os três sistemas se mantiveram bem abaixo do registrado anteriormente. Para controlar os níveis de nitrato, Lunden et al. (2014) utilizaram macroalgas nos sistemas de aquários. Essas macroalgas permaneciam em uma área coberta do *sump*, com fotoperíodo restrito a elas. Apesar da eficiência na remoção de nitrato por parte das macroalgas, os autores encontraram leituras elevadas, com máximo de 80 mg.L⁻¹ e média de 1,82 mg.L⁻¹, também sem efeitos negativos aos corais mantidos pelos autores. Apesar da não utilização de macroalgas para o controle de nitrato, os sistemas do Labtox foram capazes de manter níveis aceitáveis, somente através do filtro biológico.

Sobrevivência

A sobrevivência total esteve acima do esperado, com mais de 80% dos pólipos vivos. O Sistema 1 apresentou a menor taxa de mortalidade quando comparado aos sistemas 2 e 3, que apresentaram taxas similares. Essa diferença pode ser explicada pela maior estabilidade dos parâmetros

acompanhados no Sistema 1. As flutuações nos níveis dos parâmetros podem ter colaborado para a mortalidade dos pólipos mais afetados durante a coleta e transporte, apesar de estarem dentro do limite aceitável. A coleta pode ocasionar estresse aos pólipos (Hennige et al., 2014), porque, além do impacto do ROV para a coleta dos fragmentos, os mesmos sofrem mudança repentina de temperatura e pressão, além de ficarem em contato com o ar durante a retirada dos fragmentos da caixa de coleta. Durante a coleta, foi verificada produção de muco nos fragmentos coletados, como uma resposta a esse estresse (Zetsche et al., 2016). Porém, *L. pertusa* apresenta resistência a essas condições, quando esporádicas (Brooke & Young, 2011). Essa resistência é observada na elevada sobrevivência após o período de aclimação. O tempo e o tipo de transporte podem também influenciar na sobrevivência dos fragmentos (Lunden et al., 2014). O tempo desde a chegada do navio ao porto até o transporte para o Labtox foi inferior a duas horas.

4.5. Conclusões

O sistema de aquários com recirculação de água foi capaz de manter fragmentos de *L. pertusa* pelo período de aclimação (80 dias) antes do ensaio, e após o ensaio (5 meses), porém sem acompanhamento. A manutenção de longo prazo de corais de águas profundas em sistemas com recirculação de água do mar é viável, como evidenciado em Lunden et al. (2014), e pela manutenção de 2014 a 2017 no Labtox. O sucesso desse tipo de circulação remove limitações antes existentes, como a proximidade a locais com disponibilidade de água do mar limpa. A utilização de água sintética elimina ainda a necessidade de coleta de água do mar para as trocas de água realizadas. A água do mar sintética é bastante empregada em aquarofilia (Delbeek & Sprung, 1994), e se mostrou adequada para *L. pertusa* (Lunden et al., 2014). Porém, comparações com água do mar natural são necessárias para atestar com maior embasamento a usabilidade da água sintética. Dentro do escopo deste trabalho, tanto água do mar natural quanto sintética foram eficientes na manutenção de *L. pertusa*.

Apesar das variações existentes dos parâmetros acompanhados, todos permaneceram dentro de limites aceitáveis. Essas variações ficaram abaixo do observado para fragmentos mantidos anteriormente no Labtox e do descrito em Lunden et al. (2014). Para assegurar uma menor variabilidade dos parâmetros essenciais aos sistemas, é necessário garantir o funcionamento adequado de equipamentos, como o *chiller* e o *skimmer* de proteína, assim como definir rotinas, com intervalos adequados de monitoramento dos parâmetros, limpeza e ajustes para manutenção.

Apesar dos resultados obtidos, ainda é preciso avaliar com mais parâmetros o estado de saúde dos fragmentos de *L. pertusa* durante o tempo de manutenção, a fim de garantir o sucesso desse tipo de sistema. Parâmetros, como atividade dos pólipos (Roberts & Anderson, 2002; Orejas et al., 2016; Baussant et al., 2018), taxa de crescimento e brotamento de pólipos novos (Orejas et al., 2007; Orejas et al., 2011; Brooke & Young, 2011; Lartaud et al., 2017) e integridade do cenossarco (Baussant et al., 2018) podem ajudar a caracterizar melhor as condições dos corais em sistemas de recirculação.

5. CAPÍTULO 2 – SISTEMA DE EXPOSIÇÃO DE *Lophelia pertusa* A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BARITA

5.1. Introdução

As atividades de perfuração podem implicar no descarte de grandes quantidades de rejeitos no ambiente marinho (Neff et al., 1987; Raimondi et al., 1997; Purser et al., 2015). O material descartado aumenta a sedimentação em locais próximos de plataformas de petróleo (Trannum et al., 2010). Durante a perfuração, fluidos são utilizados para lubrificar e refrigerar os equipamentos, assim como manter a integridade do poço e auxiliar na remoção do cascalho (Holdway, 2002).

Fluidos de perfuração podem ter base em água, em óleo ou em substância sintética (Strachan & Kingston, 2012). Fluidos a base de água são os mais comuns, devido à baixa ou ausência de toxicidade para o ambiente (Neff, 2005; Smit et al., 2008). Para fluidos com base em água, um dos principais componentes é a barita (BaSO_4) (Holdway, 2002). A barita é uma substância insolúvel, que ocorre naturalmente e apresenta alta densidade ($4,5 \text{ g.L}^{-1}$) (Raimondi et al., 1997). Por conta desta característica, a barita é utilizada como agente estabilizador do fluido (Edge et al., 2016). Ela é composta de partículas de pequenas dimensões ($\sim 60 \mu\text{m}$) (Cantelmo, 1979) e, por isso, apresenta grande capacidade de dispersão (Lepland & Mortensen, 2008; Cordes et al., 2016), e com isso, alcançar áreas ecologicamente sensíveis, como os recifes de corais.

A barita, apesar de não ser considerada tóxica, pode afetar fisicamente organismos marinhos. Danos nas brânquias e redução na taxa de filtração foram observados em bivalves (Strachan, 2010). Também foi observada alteração na viabilidade celular da esponja de água profunda *Geodia barretti* (Edge et al., 2016). Para corais de águas profundas, efeitos físicos provenientes da exposição à barita, ou outro sedimento, ainda estão sendo estudados. Efeitos negativos podem ser ocasionados por sedimentação, como redução do crescimento, dano e perda de tecido, esgotamento de energia (pelo aumento da atividade do pólipó e da produção de muco), comprometimento da respiração (sufocamento) e morte do pólipó (Erftemeijer et al., 2012). Além dos efeitos diretos, a sedimentação

pode ainda limitar a fertilização (Gilmour, 1999) e o assentamento larval (Babcock & Davies, 1991; Gilmour, 1999) e influenciar o comportamento (Dallmeyer et al., 1982). Em *L. pertusa*, a sedimentação pode ocasionar a morte de larvas (Larsson et al., 2013; Järnegren et al., 2016) e promover a perda do cenossarco (Baussant et al., 2018).

Experimentos de sedimentação com produtos provenientes da perfuração, de uma forma geral, podem ser realizados em pulsos ou em exposição contínua (Brooke et al., 2009; Strachan & Kingston, 2012; Larsson et al., 2013; Baussant et al., 2018). Para a manutenção da concentração desejada ao longo do experimento, é necessária a adição constante da substância a ser testada.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um sistema de ensaio, apto a simular diferentes concentrações de descarte de barita, avaliando os efeitos físicos da sedimentação de barita em fragmentos de *L. pertusa* através da observação do comportamento dos pólipos, quantificação de sobrevivência/mortalidade e produção de muco.

5.2. Material e Métodos

Unidade experimental

Aquário de exposição

Os aquários de exposição foram construídos com acrílico e PVC. A parede de acrílico foi selecionada para permitir a visualização e a captura de imagens. A parte superior dos aquários apresenta 21 cm de comprimento, 20 cm de largura, 47 cm de altura, e a parte inferior, em forma piramidal, 10 cm de altura. Com essas medições, o aquário apresenta capacidade total de 20 litros de volume. Cada aquário possui duas conexões para mangueiras na parte superior, e uma na parte inferior. As conexões superiores permitiram um fluxo laminar de água, enquanto a conexão inferior serviu de dreno para a retirada de detritos do aquário, e simular um fluxo vertical. O modelo desse aquário foi baseado nas unidades experimentais descritas por Brooke et al. (2009) e Baussant et al. (2013).

Modelo de sistema de exposição

A barita é um composto de natureza insolúvel e altamente denso. Por conta dessas características, ensaios de exposição contínua requerem adição constante a partir de uma solução estoque, a fim de manter a concentração desejada, conforme utilizado por alguns pesquisadores (Strachan, 2010; Baussant et al., 2013; Baussant et al., 2018). Nesses casos, as unidades experimentais utilizaram fluxo contínuo para a circulação da água do mar. No Labtox, a disponibilidade de água é um fator limitante, conforme explorado no Capítulo 1, o que impede a utilização de fluxo contínuo para o experimento. Para determinar o modelo mais adequado que atenda essa limitação, uma série de testes preliminares foi realizada com diferentes métodos visando manter a concentração desejada de barita, considerando uma variação máxima de 20% em relação à concentração desejada (Baussant et al., 2013). Esses pré-testes estão descritos abaixo, no item Testes preliminares.

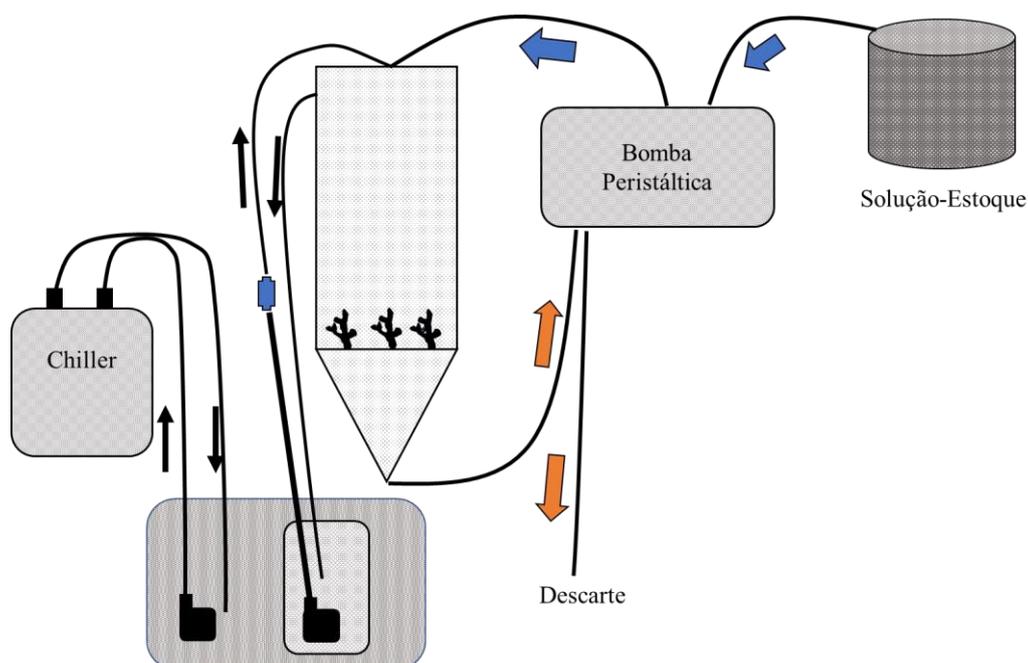
Com os resultados dos testes, optou-se por utilizar um modelo com os dois tipos de fluxo: uma circulação fechada e um fluxo contínuo. O sistema de circulação fechada desempenha a função de fluxo principal de água, similar aos sistemas de manutenção, enquanto o sistema de fluxo contínuo foi utilizado para adicionar barita à unidade (Strachan, 2010).

Unidade experimental e recirculação

Cada unidade experimental foi composta pelo aquário de exposição e um reservatório de vidro (*sump*) de 3 litros (Figura 20), com volume total de 23 litros. Para a circulação principal fechada, foi utilizada uma bomba interna (Sarlo Better SB1000) com vazão máxima de 1.000 L.h⁻¹. Essa bomba foi conectada a uma mangueira de silicone de 3/4 de polegada. A mangueira foi encaixada em um cano de PVC de mesma espessura, com registro para regular a vazão. Para esse experimento, a vazão foi ajustada para 12 L.h⁻¹, conforme descrito em Baussant et al. (2013). Desse registro, foi feita a redução para um tubo de silicone de 4 mm de diâmetro interno. O tubo foi direcionado para a parte superior, com entrada pela tampa de acrílico, a fim de manter um fluxo vertical. As conexões superiores foram utilizadas como dreno para manter o volume do aquário constante e fechar o sistema de recirculação. Uma aeração intensa foi

inserida no reservatório inferior, a fim de evitar estresse adicional aos corais inseridos no aquário, e garantir oxigenação suficiente. A utilização da bomba submersa SB1000 gerou calor durante o seu funcionamento e, ocasionou o aumento da temperatura em níveis críticos para a saúde dos corais. Para contornar esse problema, os reservatórios contendo essas bombas foram dispostos em banho maria, em dois contêineres de plástico com 60 litros interligados (Figura 20). Esses contêineres foram cheios com água de osmose e em cada um estava inserida uma bomba SB1000 conectada a um *chiller* de 1/3 de HP. A temperatura dos *chillers* foi configurada para 12,5 °C, conforme utilizados nos sistemas de manutenção.

Figura 20 – Unidade experimental utilizada para o ensaio de exposição a barita com *Lophelia pertusa*.



Fonte: Autor.

Fluxo contínuo e sistema de adição de barita

Durante os pré-testes, foi observado um decaimento na concentração de barita ao longo do tempo, com redução aproximada de 20% da concentração inicial em uma hora. Como citado acima, para manter a concentração de barita durante o ensaio, foi necessário adotar um sistema de adição contínua. Para

isto, foi adotado um sistema de fluxo contínuo, complementar ao fluxo de recirculação principal.

Para realizar o fluxo contínuo, foi utilizada uma bomba peristáltica Watson-Marlow 520s de 24 canais. O fluxo contínuo foi responsável pela reposição de barita e drenagem de água em cada unidade experimental (2 canais para cada), assim como realizar a troca de água. Foram utilizadas mangueiras de marprene da Watson-Marlow, com 1,85 mm de diâmetro e 0,8 mm de espessura de parede. Estas mangueiras foram conectadas a tubos de silicone, iguais aos utilizados para o sistema de recirculação. Foi selecionada a vazão de 0,18 L.h⁻¹. Essa vazão foi definida a partir dos pré-testes, uma vez que a mesma foi suficiente para transportar a solução de barita, com consumo de água aceitável. Essa vazão também foi próxima da utilizada por Baussant et al. (2014) de 0,12 L.h⁻¹.

A barita foi adicionada às unidades experimentais a partir de duas soluções-estoque, uma para o tratamento na concentração de 50 mg.L⁻¹ e outra para 100 mg.L⁻¹. As concentrações dos estoques foram determinadas a partir dos dados obtidos com os pré-testes do decaimento da concentração dos aquários de cada tratamento em relação a vazão adotada para o fluxo contínuo. Um estoque de água limpa também foi mantido para a troca de água do controle e das unidades expostas à barita durante o período de recuperação. A água drenada foi descartada em reservatórios de 40 L, para então serem rejeitados posteriormente de forma adequada.

Desenho experimental

O experimento foi composto por nove unidades experimentais, com três réplicas para cada tratamento: controle (somente água do mar), 50 mg.L⁻¹ (c50) e 100 mg.L⁻¹ (c100). As réplicas foram designadas como R1, R2 e R3. Para o ensaio, tanto para as unidades quanto para os estoques, foi utilizada água do mar sintética com salinidade 35 (Tropic Marin® Pro Reef). A preparação está descrita no Capítulo 1.

Para o início da exposição, a barita foi diluída em água de osmose e adicionada diretamente ao reservatório de vidro de cada unidade experimental.

Para o tratamento de 50 mg.L⁻¹, adicionou-se 1,225 gramas de barita e para o tratamento de 100 mg.L⁻¹, 2,7 gramas. Estas quantidades foram definidas durante os pré-testes.

Para reposição de água (no controle) e barita, foram utilizados três reservatórios de 40 litros cada: um para água limpa e dois para armazenar as soluções-estoque de barita para reposição (50 e 100 mg.L⁻¹). Os reservatórios das soluções-estoque foram posicionados de forma elevada em relação à bomba peristáltica, e a água limpa em uma posição inferior. As concentrações iniciais para estas soluções-estoque de reposição foram de 3,36 g.L⁻¹ e 6 g.L⁻¹, para 50 e 100 mg.L⁻¹, respectivamente.

Para manter a barita em suspensão nos estoques, bombas de alta vazão foram posicionadas no interior de cada reservatório. No reservatório da concentração de 50 mg.L⁻¹, foi utilizada uma bomba SICCE de 2.500 L.h⁻¹ e no reservatório de 100 mg.L⁻¹, uma bomba SICCE de 4.000 L.h⁻¹. Para o reservatório contendo água limpa, foi utilizada uma bomba de menor vazão, Sunsun JP-025 de 1.600 L.h⁻¹, para manter a água em movimento e oxigenada.

Os experimentos seguiram o mesmo padrão de exposição utilizado por Baussant et al. (2013), com adaptações, com cinco ciclos e duração total de 35 dias: 7 dias de aclimatação (de 15 a 22 de junho), 7 dias de exposição (de 22 a 29 de junho), 7 dias de recuperação em água do mar limpa (de 29 de junho a 06 de julho), mais 7 dias de exposição (de 06 a 13 de julho) e 7 dias de recuperação (de 13 a 20 de julho) (Figura 21).

Figura 21 – Cronograma com as principais atividades realizadas durante os 35 dias de experimento com *Lophelia pertusa* de 15 de junho a 20 de julho de 2017.

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Aclimatação																																					
Exposição																																					
Recuperação																																					
Alimentação	X				X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		

Fonte: Autor.

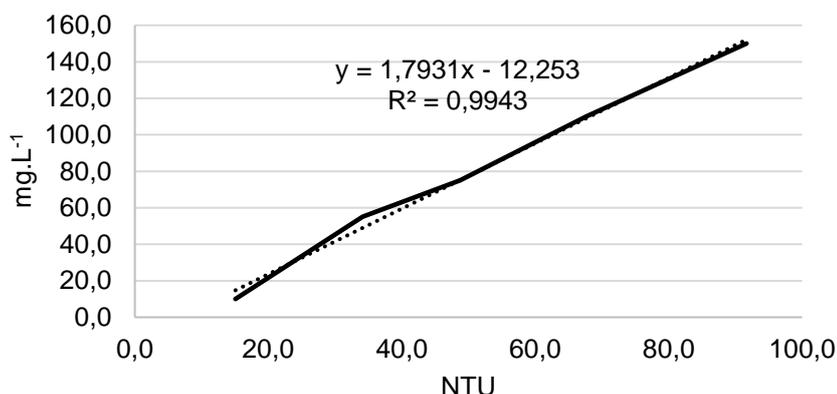
A reposição de água nos reservatórios foi feita sempre ao final do dia, para garantir um volume suficiente para a noite. Os reservatórios de descartes foram esvaziados ao final do dia para evitar risco de transbordamento. A transição entre o período de exposição e o período de recuperação foi feita pela troca das mangueiras usadas, conectadas aos aquários de exposição, por mangueiras limpas conectadas ao reservatório de água limpa. No dia seguinte, as concentrações de barita foram verificadas e, quando constatada a ausência total de barita em suspensão nos aquários de exposição, a bomba peristáltica foi desligada. Durante os períodos de recuperação, a bomba peristáltica passou a funcionar 3 horas por dia para realizar a troca parcial de água de cada unidade. Esse procedimento permitiu a renovação de 16,4 % da água em todos os aquários durante os 7 dias de recuperação. A redução no tempo de funcionamento da bomba apresentava a premissa de reduzir a utilização de água durante o ensaio.

Os parâmetros físico-químicos foram verificados ao longo de todo o experimento. A temperatura foi verificada diariamente através de um termômetro digital (Instrutherm). O pH, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade foram verificados a cada dois dias com eletrodos Thermo Scientific Orion Star A211, Thermo Scientific Orion Star A213 e um refratômetro digital Atago, respectivamente. As concentrações de amônia, nitrito e nitrato foram verificadas três vezes por semana: no início, meio e fim de cada período. A leitura da concentração de amônia foi feita com eletrodo (Thermo Orion 4 Star) e as concentrações de nitrito e nitrato foram verificadas com colorímetro (LaMotte Smart 3).

A verificação da concentração de barita das soluções-teste foi feita através da análise de turbidez. Para isso, foi utilizado o turbidímetro TD-300 (Instrutherm). Foram coletadas três amostras de água de cada aquário de exposição, sempre o mais próximo possível dos fragmentos. Os resultados dessas leituras, dadas em NTU pelo equipamento, foram transformados para mg.L^{-1} , através da curva de calibração montada a partir de cinco concentrações pré-definidas de barita (Figura 22). A partir dos três valores avaliados, foi calculada a média. Para o primeiro dia da exposição, foram feitas leituras de hora em hora para acompanhar a variação da concentração em cada unidade

experimental, para então realizar qualquer ajuste necessário. Nos dias seguintes, foram feitas leituras de 4 em 4 horas (com horário determinado em 9 h, 13 h e 17 h).

Figura 22 – Curva de transformação de turbidez (NTU) para mg.L-1 de barita.



Fonte: Autor.

Foram selecionados 27 fragmentos de *Lophelia pertusa*, com 3 a 8 pólipos, provenientes dos três sistemas de manutenção, com estrutura o mais plana possível (menos tridimensional) para facilitar a captura de imagens. Foram inseridos três fragmentos em cada aquário. Os fragmentos foram fixados em uma base gradeada com o auxílio de mangueiras de silicone. A alimentação dos corais durante o ensaio foi estabelecida em três vezes por semana, conforme cronograma, de acordo com o procedimento adotado para os sistemas de manutenção. Foi utilizada uma densidade de 300 náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos (< 24h) por litro (Baussant et al., 2013).

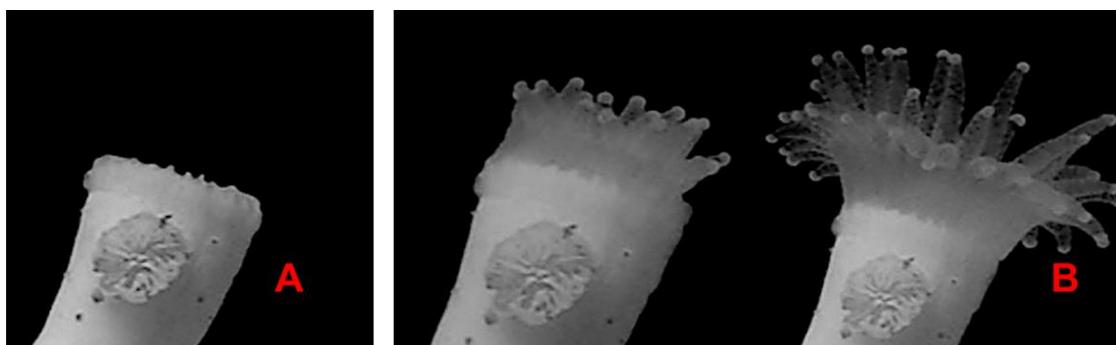
O experimento foi conduzido em câmara refrigerada com temperatura entre $11,0 \pm 0,5$ °C, no escuro. Luzes foram acesas apenas no momento da alimentação, da coleta de amostras para análises, da tomada de fotos para a observação direta e, por cerca de 15 minutos, durante cada período de captura de imagens (*time-lapse*). Após a finalização do experimento, estes fragmentos foram limpos com jatos d'água e transferidos para um sistema de manutenção, para acompanhamento posterior.

Parâmetros de resposta (*Endpoints*)

Ao longo do experimento, foram observados os seguintes parâmetros de resposta: 1) Atividade; 2) Mortalidade; e 3) Presença de muco. A atividade dos pólipos de todos os tratamentos foi avaliada pelo método de observação direta, duas vezes ao dia (manhã e tarde), durante todo o experimento. Esse método consiste em agregar valores para os diferentes níveis de atividade do pólipo (Larsson et al., 2013; Orejas et al., 2016). Foram utilizados estados binários, de 0 para pólipos fechados, e 1, para pólipos abertos ou meio abertos (Orejas et al., 2016). Para reduzir a subjetividade da categorização, foram estabelecidas referências quanto ao que considerar aberto ou fechado (Figura 23). Foram selecionados três pólipos de cada fragmento presente em cada aquário de exposição para o acompanhamento. Para auxiliar a observação das atividades dos pólipos, foram tiradas fotografias, sempre nos mesmos horários (10:00 e 15:00 horas) para manter uma padronização. Foi obtido um total de 504 fotografias.

Além da atividade do pólipo, a mortalidade também foi avaliada. Para isso, foi realizada a contagem de pólipos de cada fragmento antes de acomodá-los nos aquários. Ao final do experimento (35 dias), foi realizada uma nova contagem para determinar a taxa de sobrevivência. O muco só foi avaliado quanto a sua presença durante o ensaio.

Figura 23 – Referências para a observação direta da atividade de *Lophelia pertusa*. (A) Pólipo fechado = 0. (B) Pólipo aberto = 1.



Fonte: Autor.

Análise de dados

Para as análises estatísticas, foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel e R v. 3.5.2. Foi realizada estatística descritiva para os dados de concentração e físico-químicos. Foram definidos máxima, mínima, média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para cada parâmetro e concentração, para cada tratamento. Gráficos de série temporal foram montados para a variação da concentração de barita ao longo do tempo, para cada tratamento.

A mortalidade foi quantificada em proporção para cada tratamento. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, porém os dados não apresentaram distribuição normal. Foi realizada transformação arco-seno (Orejas et al., 2016), porém sem conferir normalidade aos dados (Tabela 4). Por conta da distribuição não-paramétrica, foi utilizada a análise Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%. Gráficos do tipo bar-plot foram gerados para a taxa de sobrevivência.

Tabela 4 – Teste de normalidade para a taxa de sobrevivência, com e sem transformação arco-seno. Tanto os dados brutos, quanto os transformados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$).

Mortalidade	Shapiro-Wilk	
	W	p
Dado não transformado	0,56918	4,16e-05
Transformação Arco-seno	0,55914	3,17e-05

Fonte: Autor.

A atividade dos pólipos foi representada em proporção de pólipos abertos para cada aquário ao longo do tempo. Foram realizadas análises comparativas entre os tratamentos durante toda a duração do ensaio e entre os períodos de recuperação para cada uma das exposições (50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para cada um dos dados, porém, assim como para mortalidade, os dados de atividade não apresentaram distribuição normal, mesmo após a transformação arco-seno (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de normalidade para os dados de atividade, com e sem transformação arco-seno, para cada teste. Tanto os dados brutos, quanto os transformados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$).

	Shapiro-Wilk			
	Dados não transformados		Transformação arco-seno	
	W	p	W	p
Total	0,85693	< 2,2e-16	0,89125	< 2,2e-16
Recuperação c50	0,85781	3,918e-07	0,83931	9,595e-08
Recuperação c100	0,93534	0,0006518	0,89657	1,103e-05

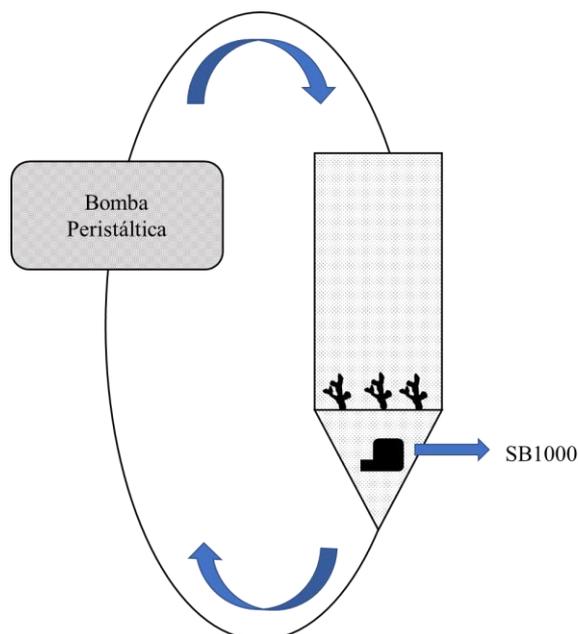
Fonte: Autor.

Para comparar os dados não-paramétricos de atividade total entre aquários, a análise de Kruskal-Wallis foi realizada, com intervalo de confiança de 95% (Orejas et al., 2016). Para diferenças significativas, análises *post hoc* de múltiplas comparações não-paramétricas, presentes no pacote “nparcomp” do R, foram utilizadas (Konietschke et al., 2015). Essas análises *post hoc* utilizaram método de Tukey, de comparações par a par, porém aplicado para dados não paramétricos. Para as análises entre as recuperações de cada tratamento, foi utilizado teste Wilcoxon para amostras dependentes. Gráficos de box-plot foram gerados para comparar a atividade entre os aquários. Foram gerados também gráficos de série temporal para cada réplica de cada tratamento. Esses gráficos foram associados aos gráficos de concentração de barita, com objetivo de identificar padrões de comportamento em função da variação de concentração.

Testes preliminares

Em 2016, foi montado um primeiro ensaio. Esse primeiro modelo de ensaio utilizou uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 520s) de 24 canais para realizar a recirculação, com vazão de $1,44 \text{ L.h}^{-1}$. A adição de barita era realizada no início do teste, de forma pontual. Para manter a concentração, foi instalada uma bomba (Sarlo Better SB1000c) no fundo dos aquários para manter a barita em suspensão (Figura 24).

Figura 24 – Modelo do sistema de recirculação da solução barita/água do mar para os experimentos com *Lophelia pertusa* no pré-teste realizado em 2016.



Fonte: Autor.

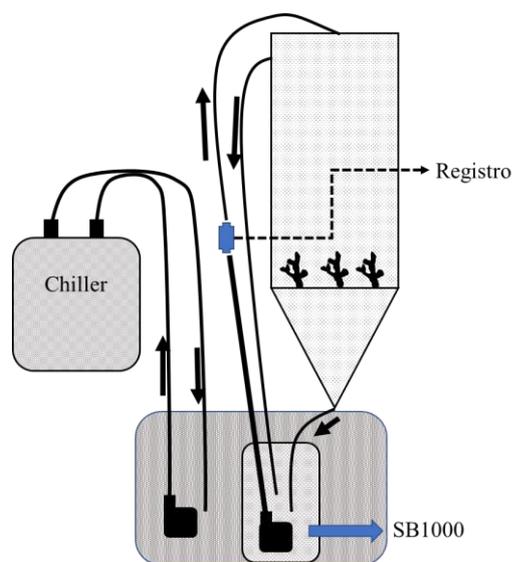
A partir deste modelo, foi montado um sistema de exposição composto por nove aquários. Foram utilizados 3 aquários para o controle, 3 para a concentração de 50 mg.L⁻¹ e 3 para a concentração de 100 mg.L⁻¹, todos com água do mar sintética. Cada aquário recebeu 3 fragmentos de coral. Durante o período de aclimação, as bombas instaladas no interior dos aquários elevaram a temperatura de 13 °C para 17 °C após 24 horas. Esse aumento de temperatura ocasionou a mortalidade dos fragmentos. Por conta deste evento, novos testes preliminares foram realizados para definir um modelo mais adequado.

1º teste - Abril/2017

Em abril de 2017, foi montado um novo modelo, no qual cada unidade experimental era composta de um aquário de 20 L e um reservatório de vidro de 3 litros. Cada recipiente possuía uma bomba SB1000c para realizar a circulação do sistema, com registro para ajuste da vazão da água. Para lidar com o calor gerado pelo funcionamento da bomba, estes recipientes ficavam em um reservatório com água de osmose, conectado a um *chiller*, para manter a

temperatura ajustada para 12 °C (Figura 25). A vazão adotada foi de 12 L.h⁻¹, conforme descrito no item Material e Métodos deste capítulo. Uma das conexões superiores e a conexão inferior foram utilizadas para drenar a água novamente para o reservatório. Optou-se por utilizar a conexão inferior em conjunto com a superior para reduzir a perda de barita. Neste teste, foram usados três aquários.

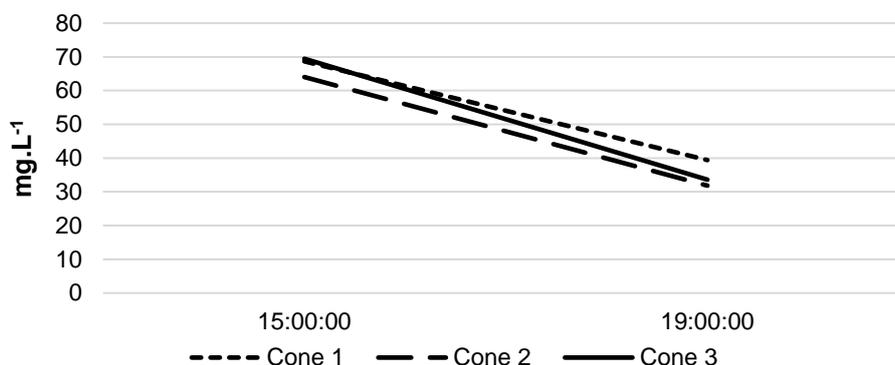
Figura 25 – Segundo modelo de sistema de recirculação da solução barita/água do mar para o experimento com *Lophelia pertusa*. Sistema com refrigeração e fluxo realizado por bomba de aquário.



Fonte: Autor.

A temperatura neste modelo se manteve em $12,24 \pm 0,35$ °C nos aquários, próxima à temperatura dos sistemas de manutenção. Foi testado o decaimento da concentração de barita ao longo do tempo. A concentração utilizada foi de 100 mg.L⁻¹. A quantidade de barita calculada para 23 litros de água do mar foi de 2,3 gramas, diluída em um pouco de água, agitada, para então ser adicionada aos recipientes. Para manter a barita em constante mistura foi adicionada uma aeração forte nos recipientes. O teste foi conduzido por 24 horas. A concentração máxima de barita alcançada foi de 69,45 mg.L⁻¹, com decaimento de 48% desta concentração em 4 horas (Figura 26).

Figura 26 – Variação da concentração de barita no 1º modelo de unidade experimental.

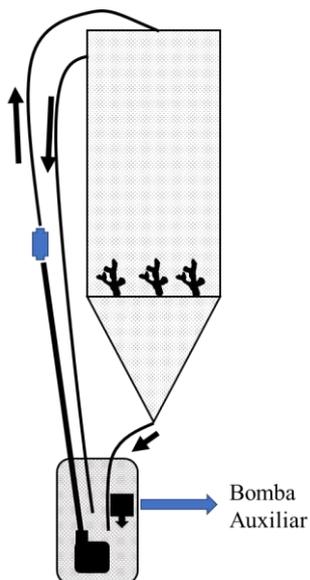


Fonte: Autor.

2º teste - Maio/2017

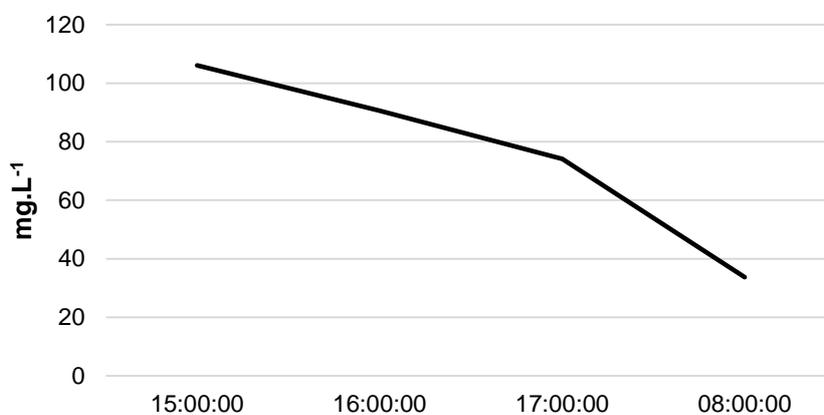
Apesar de a temperatura permanecer próxima da adotada para a manutenção, a concentração de barita não foi estável. A aeração forte no reservatório de cada unidade não foi capaz de manter a barita em suspensão durante 24 horas. Para alcançar a faixa de variação adequada da concentração de barita, uma bomba auxiliar (Atman HF-0400) foi adicionada ao reservatório de vidro (Figura 27). A quantidade de barita adicionada inicialmente foi aumentada em 20% (2,3 a 2,7 g), uma vez que a quantidade utilizada anteriormente não foi suficiente para atingir a concentração desejada. Essa adição extra permitiu o sistema atingir uma concentração inicial próxima de 100 mg.L⁻¹. A bomba no recipiente ajudou a reduzir o decaimento (15% na primeira hora), no entanto, ainda foi insuficiente para manter a concentração durante a noite (Figura 28).

Figura 27 – Modelo do sistema de recirculação da solução barita/água do mar para o experimento com *Lophelia pertusa* com bomba auxiliar.



Fonte: Autor.

Figura 28 – Variação da concentração de barita nos aquários de manutenção durante o pré-teste realizado com o segundo modelo.



Fonte: Autor.

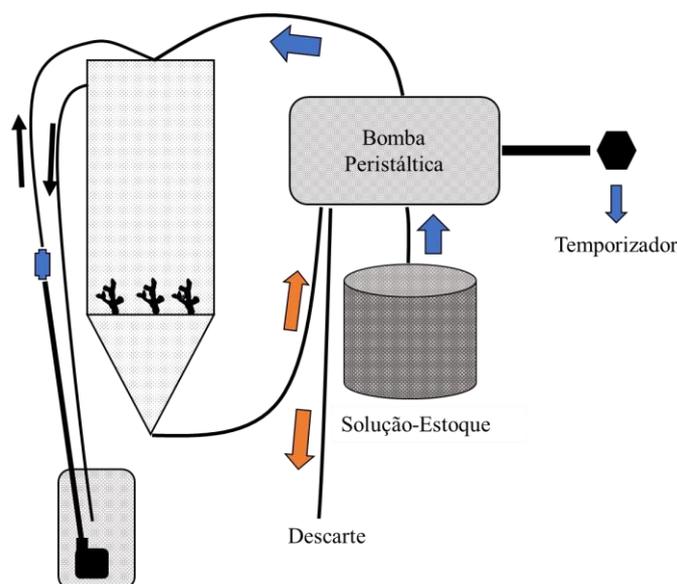
Com esse resultado (Figura 28), verificou-se a necessidade de adição contínua de barita, a fim de garantir uma concentração constante ao longo da exposição. Baussant et al. (2013) utilizaram, por exemplo, uma bomba peristáltica para adicionar o fluido de perfuração a partir de uma solução estoque,

com vazão de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($0,12 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$), porém com fluxo contínuo principal de $12 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, o que resultava em um gasto elevado de água do mar durante o experimento. Para reduzir o consumo de água para volumes aceitáveis às condições do Labtox, os pré-testes seguintes seguiram um modelo que apresentava tanto fluxo fechado principal, com vazão de $12 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, quanto fluxo contínuo, realizado pela bomba peristáltica de 24 canais. O fluxo contínuo foi utilizado para realizar a adição de barita e realizar a troca de água. Para equilibrar o volume, dois canais foram utilizados, um para adição de solução-estoque e/ou água, e outro para retirada do excesso de água. A retirada de água foi realizada pela conexão inferior.

3º teste – 12 de Maio

Para o primeiro teste com fluxo contínuo, a bomba peristáltica apresentou funcionamento intermitente, com adição contínua por 15 minutos, e um período de repouso de 1 hora e 15 minutos. Para essa configuração, a bomba foi ligada a um temporizador ajustado a esses intervalos (Figura 29). A adição de barita foi feita pela parte superior do aquário, na entrada do fluxo principal, a partir de uma solução-estoque. Para evitar a perda de água presente no aquário durante falhas de equipamento, o registro na conexão inferior foi fechado. O fluxo principal passou a retornar ao reservatório através da saída na parte superior do aquário.

Figura 29 – Terceiro modelo, com fluxo contínuo em conjunto com sistema de recirculação. Funcionamento intermitente da bomba peristáltica.



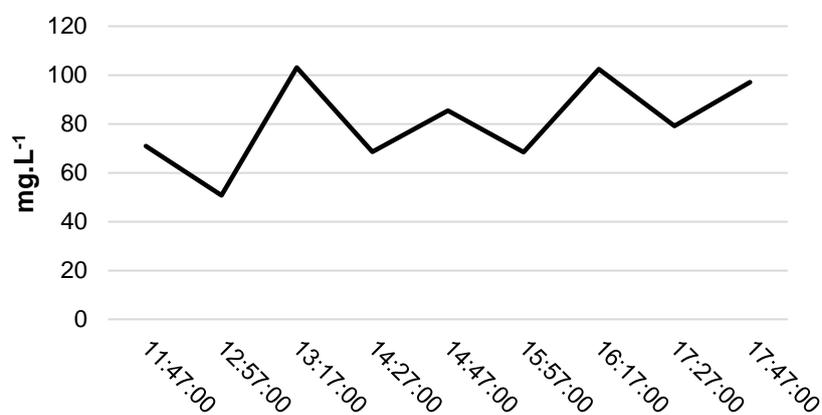
Fonte: Autor.

Foi selecionada uma vazão de $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,25 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$), sendo necessária uma solução estoque de $43,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de barita para que a concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fosse atingida. Porém, devido às características físicas da barita, a vazão selecionada não foi suficiente para transportar a quantidade necessária para atingir a concentração desejada, uma vez que grande parte ficou aderida na mangueira. A vazão foi aumentada gradativamente, até atingir uma que fosse forte o suficiente para transportar a barita, no caso, $16 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,96 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$).

A vazão de $0,96 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ foi utilizada e a quantidade inicial de barita foi adicionada integralmente ao recipiente de vidro (reservatório). Para estimar a concentração da solução-estoque para a reposição, foi utilizado o valor do decaimento por sedimentação em uma hora, e medida a concentração do descartado pela bomba peristáltica durante 15 minutos. Foi obtida uma concentração de $1,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. As medições começaram 30 minutos após a adição da barita, sempre antes e logo após a reposição. Ao longo do período acompanhado, foram observados decaimentos acima de 20% antes da reposição, com aumento abrupto após a adição (Figura 30). Foi encontrada média de $80,68 \pm 17,89 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e coeficiente de variação (CV) de 22 %. Esses

aumentos podem ser atribuídos ao funcionamento repentino da bomba, que pode carrear a barita retida nos tubos de silicone.

Figura 30 – Variação de concentração de barita observada para o terceiro modelo da unidade experimental.

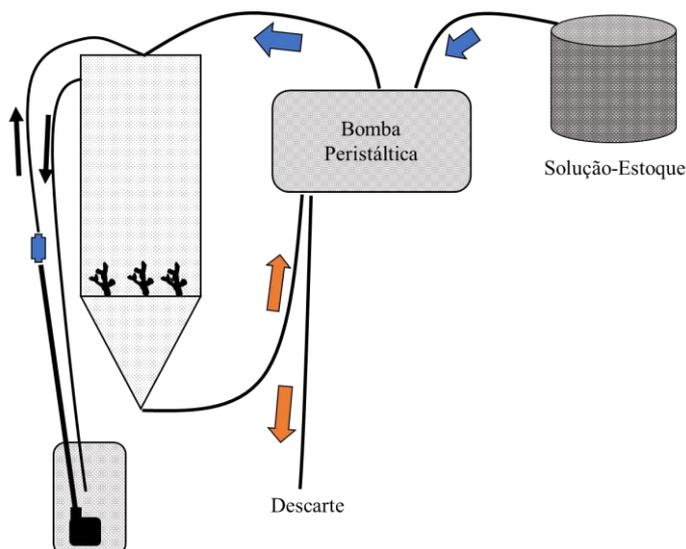


Fonte: Autor.

4º teste - 18 de maio

Com o funcionamento intermitente, a bomba demonstrou ser imprevisível quanto ao transporte de barita ao aquário. Para reduzir essa imprevisibilidade, foi adotada uma adição contínua a uma vazão menor. A vazão testada inicialmente foi de 2 ml.min^{-1} ($0,12 \text{ L.h}^{-1}$) (Baussant et al., 2013). Também foi adotada uma posição elevada para a solução-estoque, com objetivo de reduzir a perda de barita (Figura 31).

Figura 31 – Quarto modelo, igual ao terceiro, mas com funcionamento contínuo da bomba peristáltica.



Fonte: Autor.

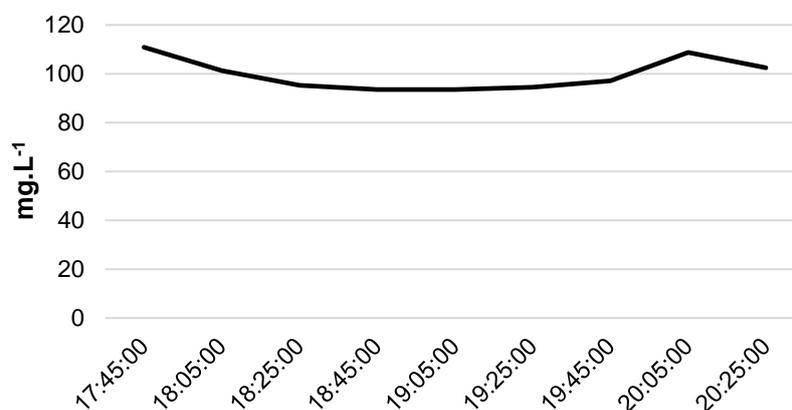
Foi realizado um teste para avaliar o decaimento da barita ao longo de uma hora, para ser estimada a perda de barita por sedimentação em um minuto. Foi também medida a quantidade de barita retirada pela bomba peristáltica, para então ser calculada a retirada em um minuto. Os dois valores foram somados e, assim, obtida a quantidade a ser adicionada por minuto. Com este valor, foi calculada a concentração de barita necessária para chegar ao final do tubo e uma solução-estoque foi preparada baseada nesta concentração. Foram analisadas as concentrações na saída do tubo e realizados ajustes na solução-estoque. No entanto, a vazão de $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ não foi suficiente para transportar a quantidade desejada de barita, independente da concentração da solução-estoque. A vazão foi elevada para $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ($0,18 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$). Essa vazão foi finalmente suficiente para o transporte adequado de barita.

5º e 6º testes – Maio e Junho/2017

Foi então montado um novo experimento, com novos cálculos baseados na nova vazão de $0,18 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. O teste foi conduzido por 3 horas, atingido a concentração máxima de $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e mínima de $94 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, com uma média

$99,71 \pm 6,59 \text{ mg.L}^{-1}$ e CV de 7 %. A concentração apresentou maior estabilidade (Figura 32).

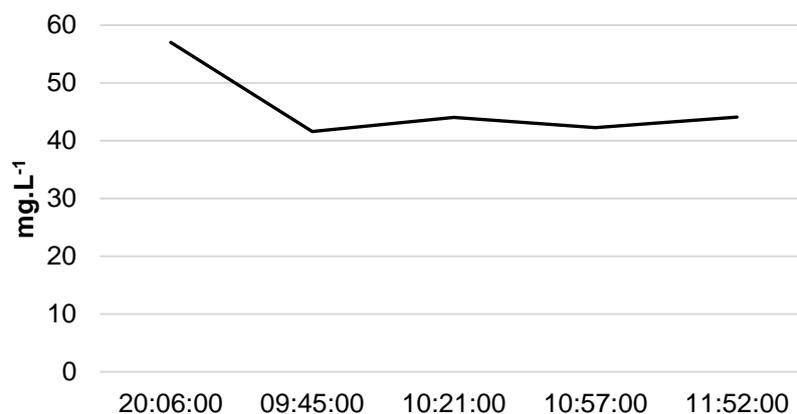
Figura 32 – Variação da concentração de barita no aquário de exposição com 100 mg.L^{-1} . Quarto modelo de unidade experimental utilizado.



Fonte: Autor.

O mesmo teste foi conduzido para a concentração de 50 mg.L^{-1} , os cálculos da perda foram realizados. Foi adicionado 1,15 gramas de barita inicialmente (quantidade necessária para 50 mg.L^{-1} em um volume de 23 litros) mas, assim como na concentração de 100 mg.L^{-1} , não foi suficiente para atingir a concentração desejada. A quantidade foi aumentada aos poucos, até alcançar 1,225 gramas de barita, suficiente para atingir a concentração próxima a 50 mg.L^{-1} . A barita foi adicionada ao reservatório, e a primeira medição realizada 30 minutos após, assim como nos outros testes. O sistema ficou em funcionamento por aproximadamente 14 horas, com o objetivo de testar a eficiência do sistema em manter a concentração ao longo da noite. A concentração máxima alcançada foi de 57 mg.L^{-1} e mínima de $41,6 \text{ mg.L}^{-1}$, com média de $45,8 \pm 6,37 \text{ mg.L}^{-1}$ e CV igual a 14%. A variação ficou abaixo de 20%, ou seja, dentro do limite aceitável (Figura 33). Estes resultados, associados aos obtidos para a concentração de 100 mg.L^{-1} , demonstraram que tal modelo de circulação atende as condições estabelecidas para a exposição de *L. pertusa* à barita.

Figura 33 – Variação da concentração de barita no aquário em 15 horas. Concentração testada de 50 mg.L⁻¹.



Fonte: Autor.

5.3. Resultados

Ensaio de Exposição

Manutenção da concentração de barita

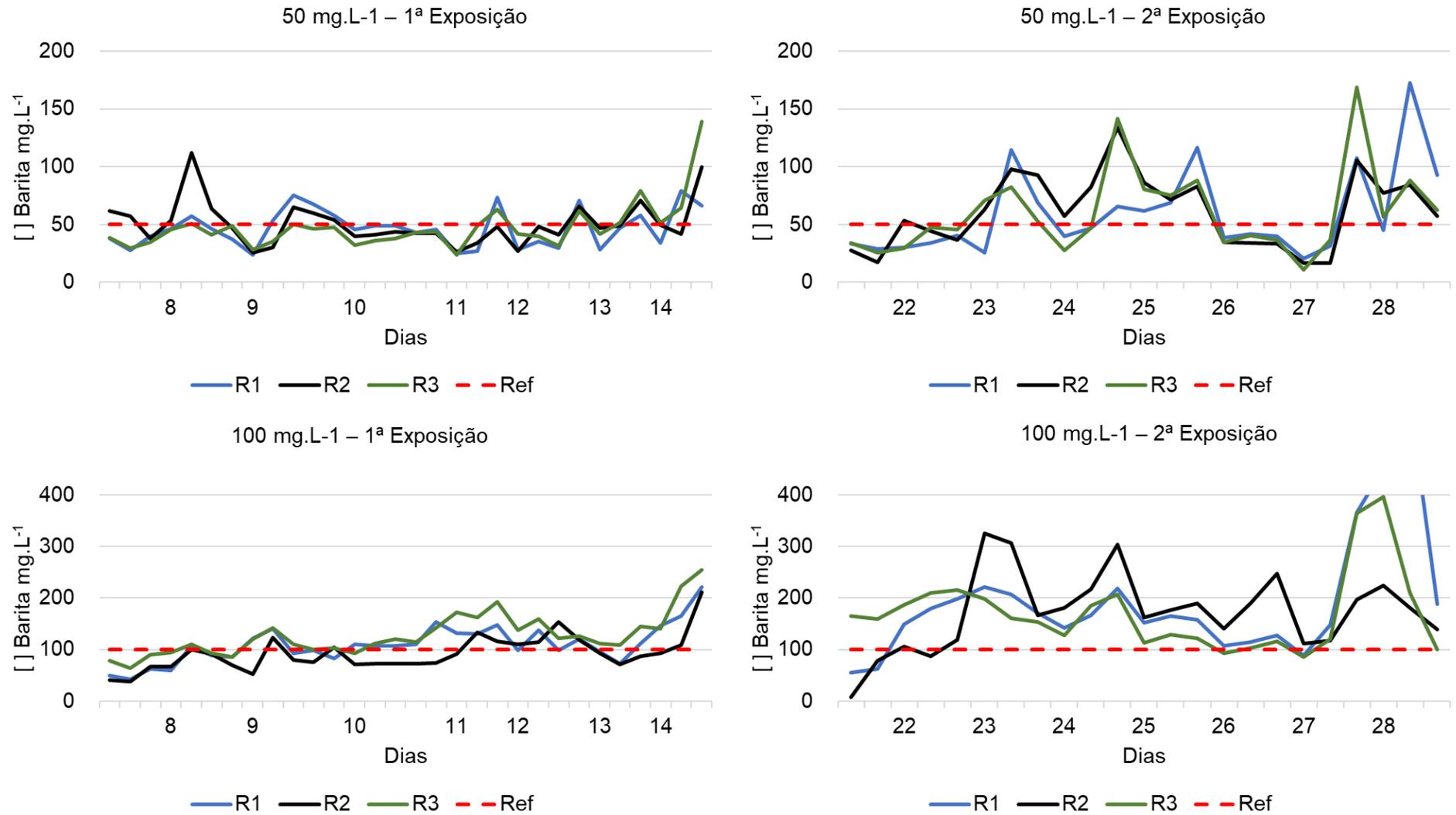
Os valores médios de barita obtidos na concentração de 50 mg.L⁻¹ variaram entre 23,56 e 138,96 mg.L⁻¹ (47% a 278% da concentração estabelecida) durante o primeiro ciclo, e entre 10,89 e 172,43 mg.L⁻¹ (22% a 345%) durante o segundo ciclo de exposição (Tabela 6). Conforme observado pelos coeficientes de variação, o segundo ciclo apresentou maior variabilidade nas concentrações (Figura 34). Nos aquários de tratamento de 100 mg.L⁻¹ de barita, os valores médios das concentrações durante o primeiro ciclo de exposição variaram entre 42,64 e 254,31 mg.L⁻¹ (43% a 254%), e entre 7,94 e 581,23 mg.L⁻¹ (8% a 581%) durante o segundo ciclo de exposição. Conforme observado na concentração de 50 mg.L⁻¹, o segundo ciclo de exposição também apresentou maior variação nas concentrações (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentrações mínimas, máximas e médias de barita nos aquários de exposição de *Lophelia pertusa* nas diferentes réplicas (R1 - R3), durante o 1º e 2º ciclos de exposição nos tratamentos de 50 e 100 mg.L⁻¹. CV = coeficiente de variação; DP = desvio padrão.

		50 mg.L ⁻¹			100 mg.L ⁻¹		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
1ª Exposição	Média ±	46,7±	50,77 ±	47,51 ±	109,98 ±	92,56 ±	127,46 ±
	DP	16,26	19,19	20,97	37,08	34,76	41,94
	Max	79,19	112,06	138,96	220,84	211,87	254,31
	Min	23,93	25,41	23,56	42,64	38,24	63,89
	CV	35%	38%	44%	34%	38%	33%
2ª Exposição	Média ±	59,3±	61,12 ±	60,07 ±	192,20 ±	172,92 ±	170,53 ±
	DP	37,78	31,85	37,11	121,58	76,88	78,26
	Max	172,43	134,18	168,84	581,23	326,03	396,55
	Min	20,71	16,45	10,89	55,92	7,94	85,17
	CV	64%	52%	62%	63%	44%	46%

Fonte: Autor.

Figura 34 – Variação da concentração de barita ao longo dos eventos de exposição.



Fonte: Autor.

Físico-química

Os produtos nitrogenados apresentaram níveis elevados quando comparados aos sistemas de manutenção, porém ainda dentro do aceitável. Os níveis de amônia do controle apresentaram média de 0,039 mg.L⁻¹, com máxima de 0,1 mg.L⁻¹ observado na réplica R1. Para o tratamento de 50 mg.L⁻¹, foi obtida média de 0,039 mg.L⁻¹, com máxima observada de 0,35 mg.L⁻¹ na réplica R1. No tratamento de 100 mg.L⁻¹, foi encontrada média de 0,025 mg.L⁻¹, com máximo observado de 0,096 mg.L⁻¹, na réplica R3 (Tabela 7). Para nitrito, foram observadas médias de 0,04 mg.L⁻¹, 0,07 mg.L⁻¹ e 0,03 mg.L⁻¹ para o controle, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, respectivamente. O máximo registrado para o controle foi de 0,1 mg.L⁻¹ na réplica R3, enquanto para os tratamentos foram registradas máximas de 0,489 mg.L⁻¹ e 0,135 mg.L⁻¹, para a réplica R3 do tratamento 50 mg.L⁻¹ e réplica R1 do 100 mg.L⁻¹, respectivamente (Tabela 8). Os níveis de nitrato foram os mais elevados, porém esses dados eram esperados, uma vez que nos sistemas de manutenção foi observada a mesma tendência. O máximo registrado foi de 1,785 mg.L⁻¹ no tratamento 50 mg.L⁻¹ na réplica R3 (Tabela 9). Apesar dessas leituras elevadas, os maiores níveis ocorreram de forma pontual.

Tabela 7 – Dados descritivos para níveis de amônia para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

	Amônia								
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA	0,046±	0,033±	0,038 ±	0,068±	0,029±	0,021±	0,027±	0,019±	0,028±
± DP	0,029	0,021	0,028	0,101	0,018	0,014	0,019	0,011	0,028
MÁX	0,100	0,067	0,080	0,350	0,066	0,049	0,058	0,037	0,096
MIN	0,007	0,004	0,003	0,011	0,012	0,002	0,003	0,001	0,001
CV	63%	63%	74%	149%	60%	68%	71%	60%	99%

Fonte: Autor.

Tabela 8 – Dados descritivos para níveis de nitrito para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

	Nitrito								
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA ±	0,038 ±	0,043 ±	0,041 ±	0,088±	0,063±	0,094±	0,035±	0,032±	0,028±
DP	0,033	0,035	0,039	0,106	0,07	0,155	0,042	0,025	0,030
MÁX	0,089	0,099	0,101	0,309	0,208	0,489	0,135	0,064	0,097
MIN	0,002	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CV	85%	83%	95%	121%	121%	166%	122%	78%	107%

Fonte: Autor.

Tabela 9 – Dados descritivos para níveis de nitrato para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

	Nitrato								
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA ±	0,418 ±	0,456 ±	0,413 ±	0,533	0,505	0,545	0,430	0,409	0,402
DP	0,123	0,113	0,126	±	±	±	±	±	±
MÁX	0,670	0,633	0,645	0,296	0,195	0,477	0,192	0,105	0,155
MIN	0,310	0,332	0,294	1,207	0,862	1,785	0,917	0,621	0,786
CV	29%	25%	31%	56%	39%	88%	45%	26%	39%

Fonte: Autor.

Os outros parâmetros acompanhados apresentaram níveis mais coerentes em relação aos mensurados para os sistemas de manutenção. A temperatura foi consistente entre os tratamentos. O controle apresentou média de 12,7 °C entre as réplicas e máxima de 13,2 °C. Para 50 mg.L⁻¹, a média encontrada entre as réplicas foi de 12,4 °C, com 13,6 °C de máxima. O tratamento de 100 mg.L⁻¹ apresentou temperatura média entre as réplicas de 12,3 °C e máxima de 12,7 °C (Tabela 10). Os níveis médios de pH de cada tratamento foram de 7,87 para o controle e 50 mg.L⁻¹, e 7,91 para 100 mg.L⁻¹. O pH mínimo observado foi de 7,48 na réplica R3 do controle (Tabela 11). A salinidade, em todos os tratamentos, ficou em 35, com máxima e mínima registradas de 36 e 34, respectivamente (Tabela 12). O OD apresentou médias nos tratamentos em torno de 6,5 mg.L⁻¹, com níveis compatíveis aos dos sistemas de manutenção (Tabela 13).

Tabela 10 – Dados descritivos para temperatura (°C) para cada réplica de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Temperatura (°C)									
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA	12,4 ±	12,7 ±	13,0 ±	12,7 ±	12,4 ±	12,1 ±	12,0±	12,2 ±	12,4 ±
± DP	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
MÁX	12,8	13,1	13,2	13,6	12,8	12,3	12,7	12,6	12,7
MIN	12,1	11,9	12,5	12,2	12	11,6	12,2	11,8	11,9
CV	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Fonte: Autor.

Tabela 11 – Dados descritivos para pH para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

pH									
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA ±	7,88±	7,86 ±	7,87 ±	7,85 ±	7,89 ±	7,84 ±	7,89 ±	7,91 ±	7,9 ±
DP	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
MÁX	8,29	8,15	8,46	8,54	8,6	8,32	8,13	8,54	8,39
MIN	7,57	7,6	7,48	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6	7,53
CV	3%	2%	3%	3%	4%	3%	2%	3%	3%

Fonte: Autor.

Tabela 12 – Dados descritivos para salinidade para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Salinidade									
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA ±	35 ±	35 ±	35 ±	35 ±	35 ±	35±	35±	35 ±	35 ±
DP	0,7	0,6	0,4	0,7	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5
MÁX	36	36	35	36	36	36	35	35	36
MIN	34	34	34	34	34	34	34	34	34
CV	2%	2%	1%	2%	1%	2%	1%	1%	1%

Fonte: Autor.

Tabela 13 – Dados descritivos para oxigênio dissolvido (OD) para cada réplica, de cada tratamento. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

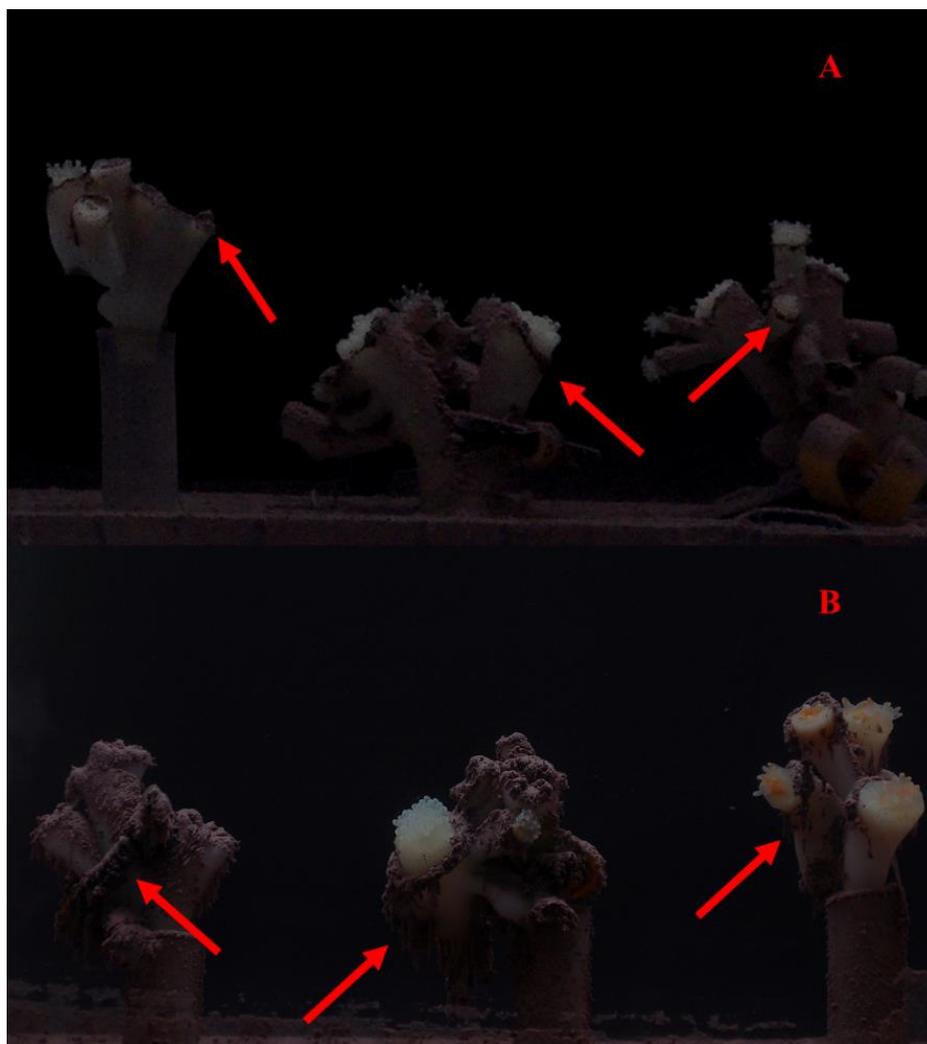
	OD mg.L ⁻¹								
	Controle R1	Controle R2	Controle R3	C50 R1	C50 R2	C50 R3	C100 R1	C100 R2	C100 R3
MÉDIA ±	6,42 ±	6,39 ±	6,65 ±	6,2 ±	6,4 ±	6,5 ±	6,6 ±	6,7 ±	6,7 ±
DP	1,1	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
MÁX	8	8	8	8,1	8,3	8,4	8,5	8,4	8,4
MIN	4,7	4,27	5,3	4,4	5	4,5	4,8	4,6	5
CV	17%	16%	13%	15%	16%	15%	15%	15%	13%

Fonte: Autor.

Produção de muco

Foi observada produção de muco nos tratamentos de 50 e 100 mg.L⁻¹, após o primeiro ciclo de exposição (Figura 35). No entanto, não foi possível determinar o momento exato da liberação de muco, devido à baixa visibilidade ocasionada pela barita em suspensão nos aquários de exposição. A visualização só foi facilitada devido à grande quantidade de barita aderida ao muco. Porém, devido a essa presença de barita, não foi possível determinar se houve ou não produção de muco durante o segundo ciclo de exposição. Não foi observada produção de muco nos aquários do controle.

Figura 35 – Fragmentos de *Lophelia pertusa* expostos a concentração de 50 (A) e 100 (B) mg.L⁻¹ de barita. A seta indica a presença de muco no coral durante o experimento.



Fonte: Autor.

Sobrevivência

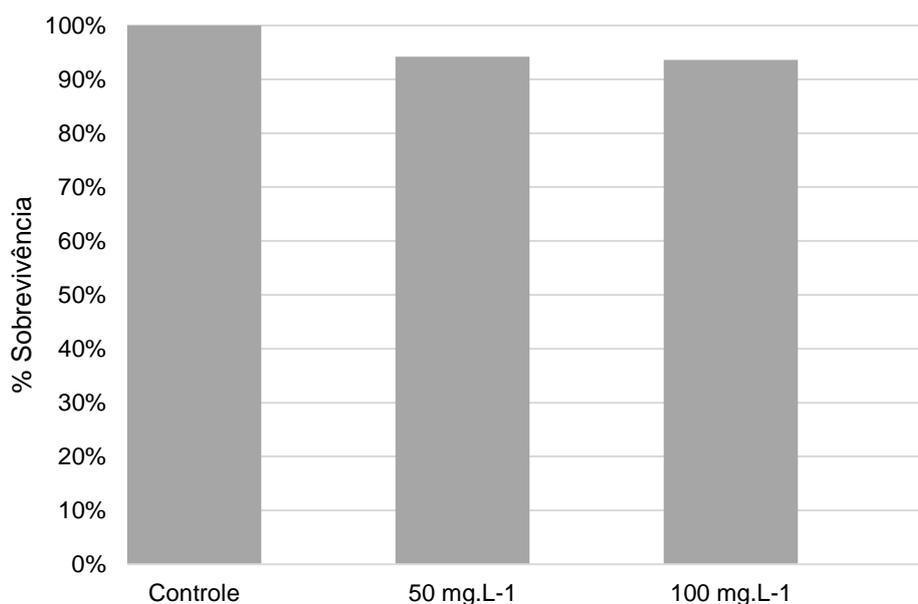
A taxa de sobrevivência dos pólipos no controle ao final dos 35 dias de experimento foi de 100 %. Nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ foi de 93,8 % e na de 100 mg.L⁻¹, de 92,31% (Figura 36). A análise não detectou diferença significativa (Kruskal-Wallis qui-quadrado = 1,1667, $p = 0,558$) entre os tratamentos. A mortalidade foi observada somente nas réplicas R1 das concentrações de 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ (Tabela 14).

Tabela 14 – Sobrevivência dos pólipos de *Lophelia pertusa* de cada réplica para os tratamentos.

		Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Total	Mortalidade	Sobrevivência (%)
Controle	R1	5	4	4	13	0	100%
	R2	3	9	4	16	0	100%
	R3	6	5	7	18	0	100%
50 mg.L⁻¹	R1	5	7	10	22	3	86%
	R2	7	7	4	18	0	100%
	R3	4	4	4	12	0	100%
100 mg.L⁻¹	R1	5	6	4	15	3	80%
	R2	4	6	4	14	0	100%
	R3	6	4	8	18	0	100%

Fonte: Autor.

Figura 36 – Taxa de sobrevivência dos pólipos de *Lophelia pertusa* para cada tratamento. Sobrevivência de mais de 90 % observada em todos os tratamentos.



Fonte: Autor.

Atividade dos pólipos

A atividade dos pólipos apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Kruskal-Wallis qui-quadrado = 142,83, $p = 0$). As análises *post hoc* indicaram diferença significativa entre todos os tratamentos (Tabela 15). Foi observada maior atividade total no tratamento de 50 mg.L⁻¹, seguido do tratamento de 100 mg.L⁻¹ (Figura 37). Não houve diferença significativa entre os

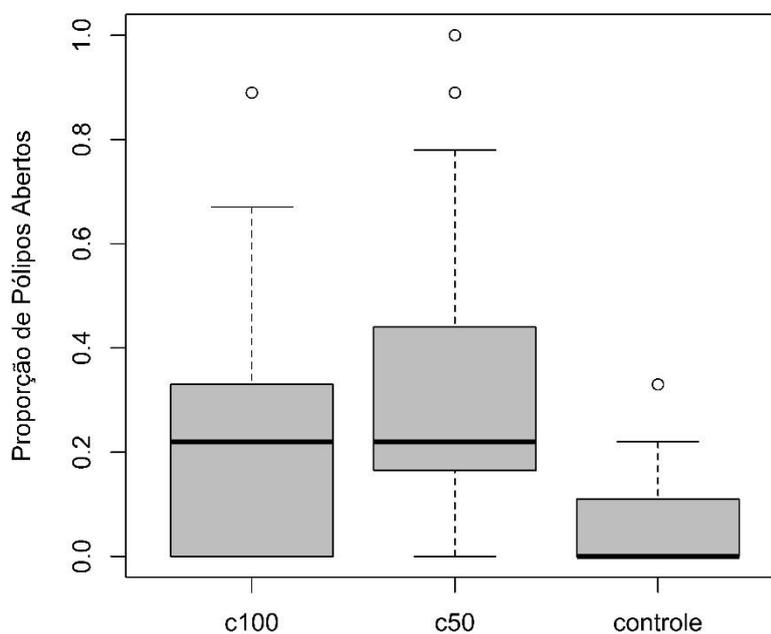
dois períodos de recuperação, tanto no tratamento de 50 mg.L⁻¹, quanto no de 100 mg.L⁻¹ (Tabela 16). Apesar da proporção de pólipos abertos não apresentar diferença entre as recuperações, foi observada maior proporção durante a primeira recuperação em ambos os tratamentos (Figura 38).

Tabela 15 – Análise post hoc para o teste de Kruskal-Wallis, com comparação entre cada tratamento. Diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos.

Múltiplas comparações não-paramétricas					
Comparações	Estimador	Inferior	Superior	Estatística	p
p(c100, c50)	0.604	0.532	0.677	3.410.761	0,002
p(c100, controle)	0.267	0.205	0.328	-8.984.116	3,33e-10
p(c50, controle)	0.129	0.085	0.173	-19.895.895	0

Fonte: Autor.

Figura 37 – Box-plot para proporção de pólipos abertos ao longo do ensaio para os tratamentos.



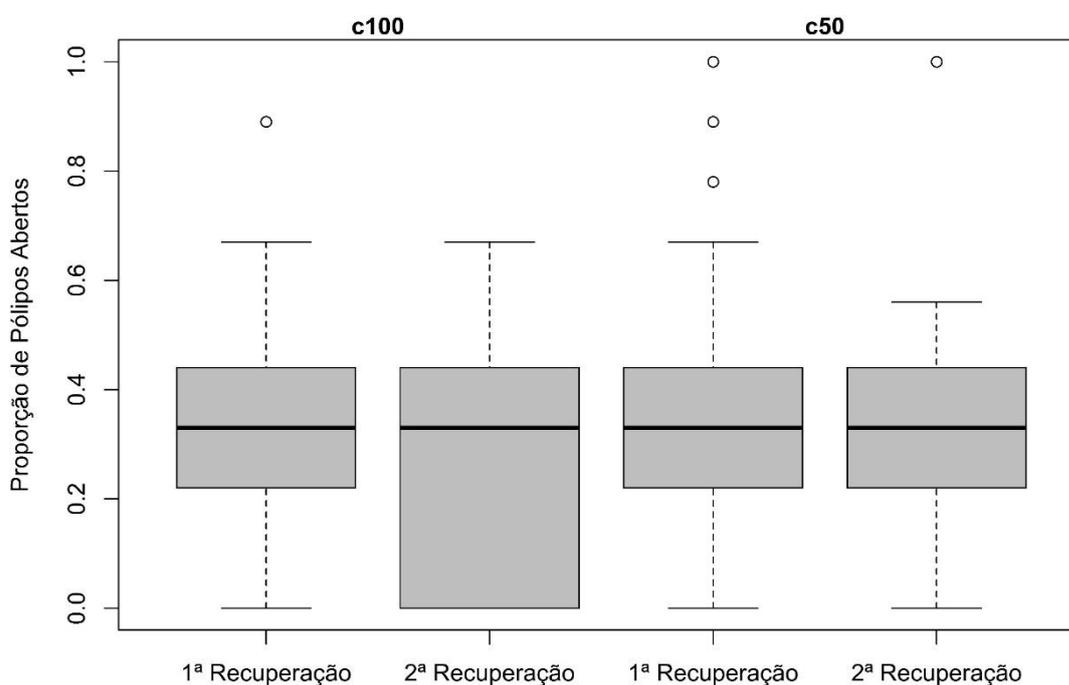
Fonte: Autor.

Tabela 16 – Teste de Wilcoxon para entre os períodos de recuperação para cada tratamento exposto com barita. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) tanto entre as recuperações em 50 mg.L⁻¹ quanto em 100 mg.L⁻¹.

Wilcoxon		
50 mg.L ⁻¹	V = 256	p = 0.2306
100 mg.L ⁻¹	V = 330	p = 0.2201

Fonte: Autor.

Figura 38 – Box-plot da proporção de pólipos abertos para os períodos de recuperação para os tratamentos de 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹

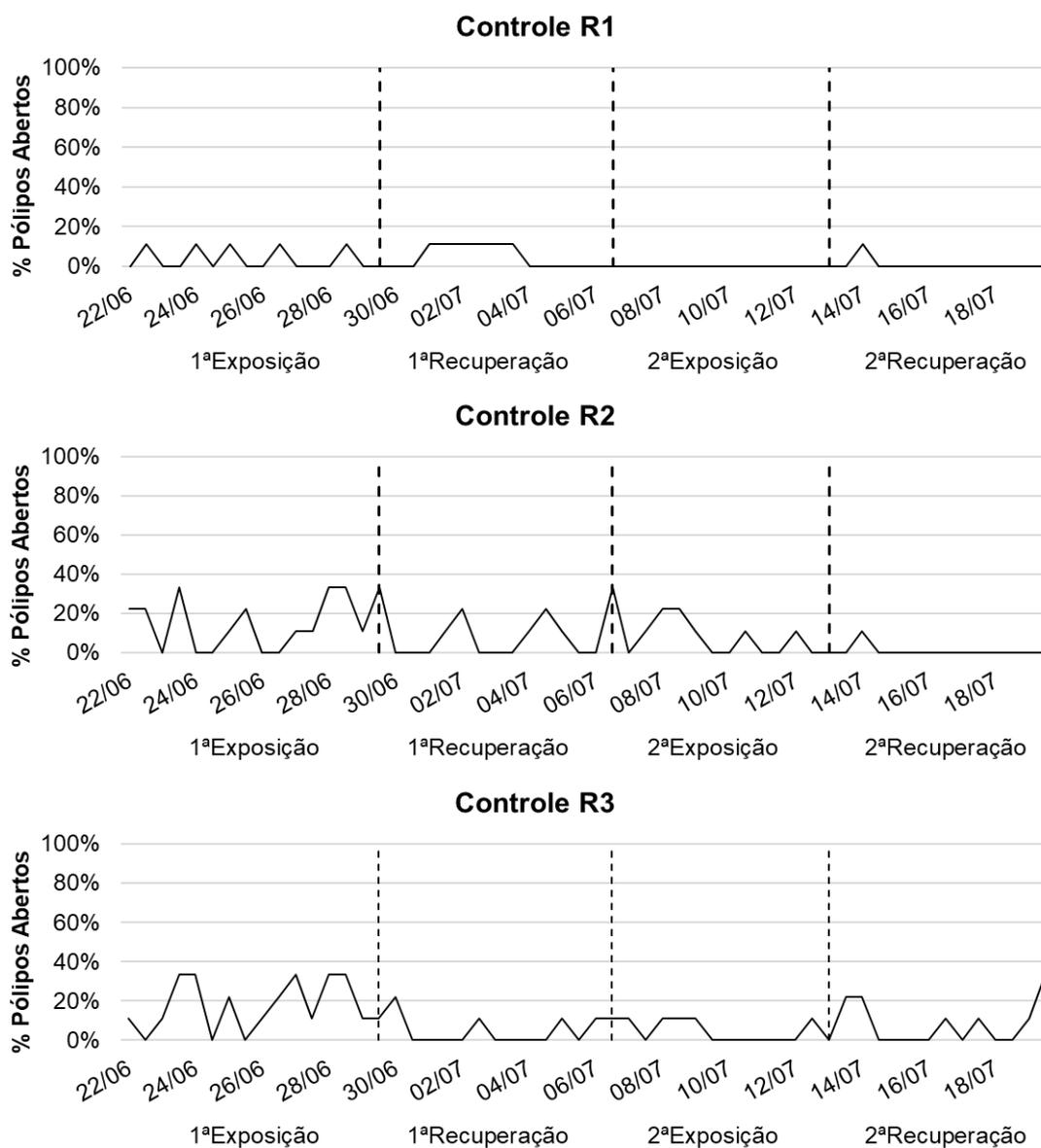


Fonte: Autor.

A série temporal de comportamento indica uma maior atividade nos tratamentos 50 e 100 mg.L⁻¹, conforme já observado anteriormente. Porém, foi evidenciada uma redução na proporção de pólipos abertos durante os períodos de exposição no tratamento de 100 mg.L⁻¹, principalmente na segunda exposição, na qual as concentrações de barita foram as mais elevadas (Figura 39). Para o tratamento de 50 mg.L⁻¹, esse padrão não foi observado, com atividade similar ao longo de todo o ensaio (Figura 40). Como indicado

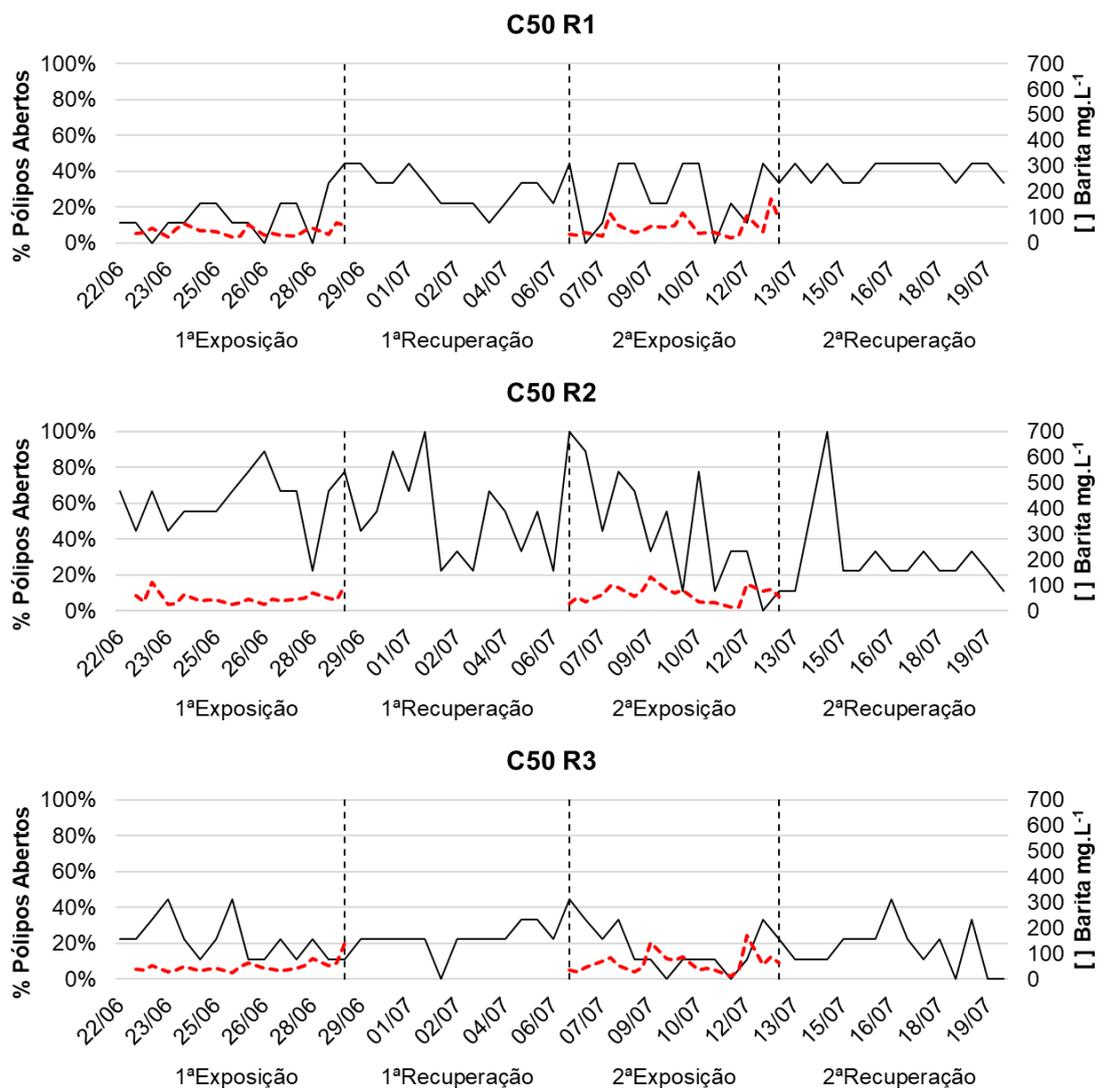
anteriormente, o controle apresentou a menor atividade durante o ensaio (Figura 41).

Figura 39 – Série temporal da proporção de pólipos abertos de *Lophelia pertusa* para as réplicas do controle ao longo do tempo de ensaio (35 dias).



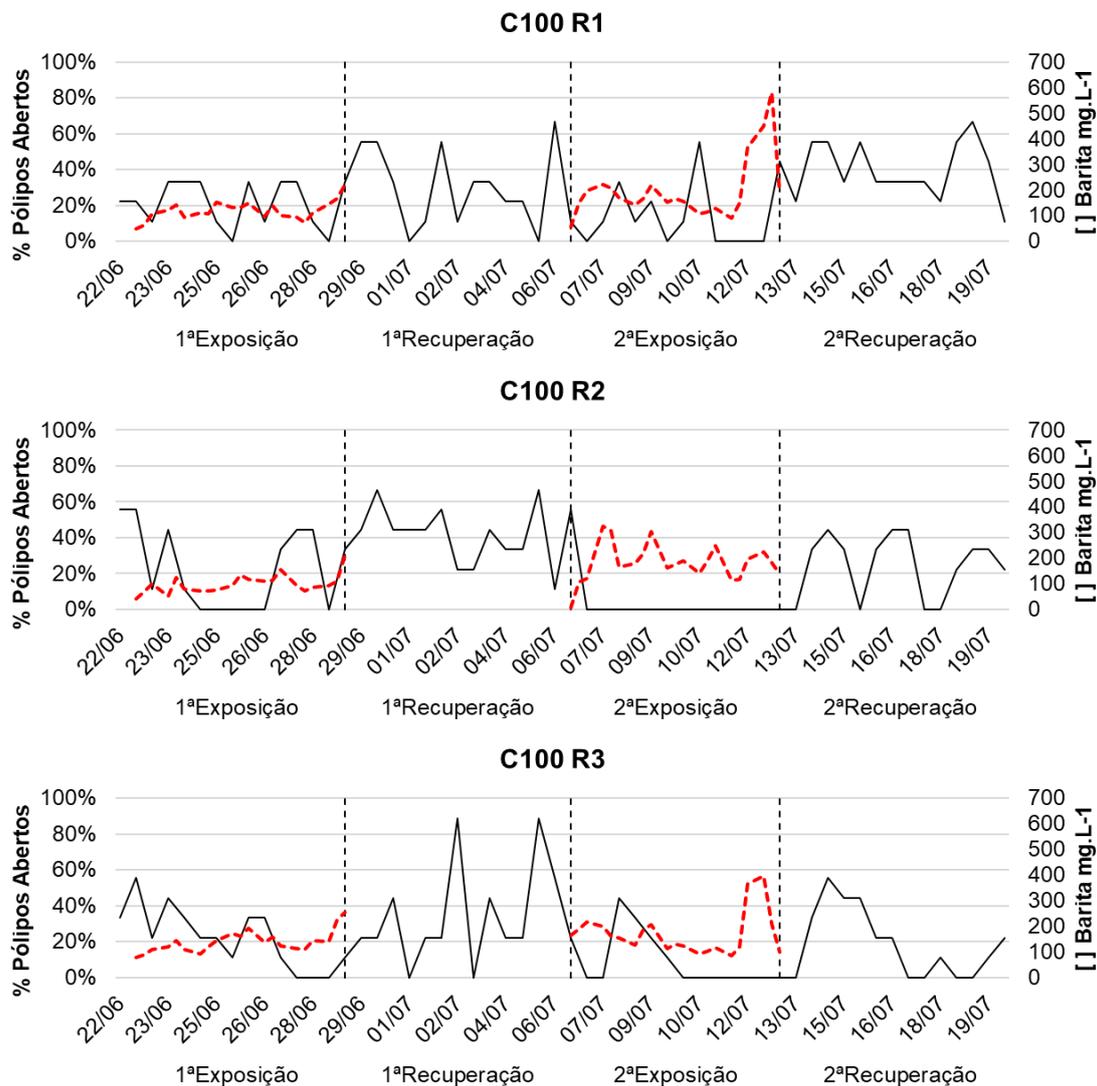
Fonte: Autor.

Figura 40 – Série temporal da proporção de pólipos abertos de *Lophelia pertusa* (linha contínua) e variação da concentração de barita (linha tracejada) no tratamento de 50 mg.L⁻¹.



Fonte: Autor.

Figura 40 – Série temporal da proporção de pólipos abertos de *Lophelia pertusa* (linha contínua) e variação da concentração de barita (linha tracejada) no tratamento de 100 mg.L⁻¹.



Fonte: Autor.

Após o ensaio, os fragmentos foram transferidos para um sistema de 60 litros para observar sua recuperação. Porém, não foi realizado um acompanhamento para observar efeitos de longo prazo. Durante este período, foi observada atividade para todos os fragmentos, mas sem quantificá-la.

5.4. Discussão

Sistema de exposição

O sistema de exposição apresentou dificuldade em manter a concentração de barita pré-determinada de cada tratamento. Variações foram bem acima dos 20% da concentração esperada. A primeira exposição apresentou a menor variação. Para a segunda exposição, a variação foi mais elevada para ambos os tratamentos. Um possível motivo para esta instabilidade é o acúmulo de barita ao longo dos tubos de silicone. Com a adição contínua, esse acúmulo nos tubos provavelmente se despreendeu e ocasionou o aumento excessivo da concentração. Apesar dessas variações, não ocorreu decaimento como observado durante os primeiros testes preliminares. Partículas de barita permaneceram presentes em suspensão ao longo dos períodos de exposição.

Os testes preliminares, apesar do funcionamento adequado, não contemplaram um período maior de adição contínua. Com isso, não se observaram possíveis acúmulos a longo prazo. Também não foram levadas em conta as diferentes distâncias entre a solução-estoque e as unidades experimentais. Essa diferença na distância pode ocasionar diferença entre as réplicas quanto à concentração ou contribuir para mais áreas nos tubos para acúmulos. Durante o primeiro ciclo de exposição, as concentrações entre as réplicas se mantiveram próximas. Porém, no segundo ciclo, foram observadas grandes variações entre as réplicas, o que pode indicar influência desses acúmulos.

Para ensaios com concentrações elevadas de sólidos, seja barita ou outro tipo de sedimento, variações são esperadas. Baussant et al. (2018) observaram maior variabilidade de cascalho de perfuração para as maiores concentrações de 27 ± 11 (CV = 41%) e 42 ± 18 (CV = 43%) mg.L⁻¹. O mesmo foi indicado por Brooke et al. (2009), com maiores variações observadas para as maiores concentrações de sedimento. Em Larsson et al. (2013), variações foram menores nas maiores concentrações, porém a unidade experimental utilizada apresentava menor volume, o que pode ter contribuído para a manutenção da concentração. As variações observadas foram próximas para cada tratamento, com coeficiente de variação total de 52% e 55% para 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, e foram coerentes com o observado em Baussant et al. (2018). A redução da

variação poderia ser evitada com a adição de uma bomba de aquário ao fundo dos aquários experimentais, conforme o modelo utilizado em 2016 e observado em Edge et al. (2016). Porém, a baixa vazão utilizada (12 L.h^{-1}), poderia não ser adequada para o resfriamento eficiente dos aquários e ocasionar mortalidade por conta da temperatura elevada. Além deste motivo, o fluxo extra poderia contribuir negativamente, uma vez que a bomba permaneceria próxima aos fragmentos.

As concentrações utilizadas neste trabalho foram acima das observadas para modelos e medições *in situ*. Concentrações de partículas proveniente de descarte de atividade de perfuração podem chegar a 25 mg.L^{-1} por mais de 2 km (Purser et al., 2015). Modelos de dispersão indicam concentrações acima de 20 mg.L^{-1} de partículas em suspensão a até 1 km dos pontos de perfuração (Frost et al., 2014), apesar desses modelos poderem superestimar essas concentrações (Rye et al., 2012). Smit et al. (2008) propõem as concentrações 3,01 e $17,9 \text{ mg.L}^{-1}$ como concentrações de barita de risco, que afetam 50% e 5% das espécies expostas, respectivamente. A adoção de concentrações próximas a estas pode auxiliar na redução da variabilidade observada, e se aproximar de simulações mais fiéis às encontradas no ambiente.

Os parâmetros físicos e químicos apresentaram variações mais elevadas quando comparadas aos sistemas de manutenção, com exceção da salinidade. A temperatura, apesar de variações maiores, permaneceu próxima dos valores adotados (ver Capítulo 1). O pH apresentou níveis baixos de forma pontual, com valores próximos aos observados para os sistemas de manutenção. A média se manteve ligeiramente abaixo, mas acima de 7,8 que, conforme já discutido, não afeta a calcificação do fragmento (Movilla et al., 2014). Os produtos nitrogenados permaneceram mais elevados quando comparados aos sistemas de manutenção, com máximas bem acima do observado para os sistemas. Estes níveis são consequência da falta de um sistema de filtração eficiente, como adotado nos sistemas de manutenção. A troca de água realizada pela bomba peristáltica, apesar de representar 130% do volume durante as exposições e 16% durante as recuperações, não foi o suficiente para manter os níveis de produtos nitrogenados próximos de zero. Isso indica uma vazão ineficiente para manter os níveis adequados e, conforme discutido no capítulo 1, grandes

variações nesses parâmetros, principalmente os produtos nitrogenados podem apresentar efeitos negativos para os fragmentos de *L. pertusa*.

Sobrevivência e Muco

Muco

A presença de muco nos tratamentos com barita era esperada. O muco é uma resposta a estímulos externos, com diferentes características para diferentes causas (Zetsche et al., 2016a). A produção de muco auxilia na remoção de partículas, juntamente com movimentos ciliares (Zetsche et al., 2016b). Apesar de ser uma importante resposta, pouco foi explorado em relação ao muco. A produção de muco como resposta a estressores, como sedimentação, ocasiona gasto energético (Maier et al., 2019). Esse gasto pode afetar negativamente em caso de exposição por longos períodos, com alta taxa de sedimentação (Liefmann et al., 2018). Um possível efeito da sedimentação é a alteração na comunidade microbológica presente no muco. Essa comunidade ajuda a disponibilizar a matéria orgânica presente no muco nos recifes de corais de águas profundas (Wild et al., 2008). Apesar de pouco explorada, a presença de muco indicou a capacidade dos pólipos em lidarem com a exposição à barita.

Sobrevivência

A sobrevivência observada para os tratamentos com barita demonstra uma grande tolerância por parte dos pólipos de *L. pertusa*. Essa tolerância foi ainda mais evidente se forem consideradas as concentrações elevadas atingidas durante o ensaio. Porém, é possível tratar-se de um período curto para observar maiores taxas de mortalidade. Brooke et al. (2009) observaram sobrevivência acima 80% para concentrações de sedimento de 54 mg.L⁻¹ ao final de um período de 14 dias de exposição contínua. Para concentrações acima desta, os autores observaram queda da taxa de sobrevivência, com um pouco menos de 60% na concentração de 103 mg.L⁻¹, 40% para 245 mg.L⁻¹ e 7% para 362 mg.L⁻¹. Com o aumento de período exposto, provavelmente seria observada uma maior mortalidade dos corais expostos à barita.

As mortalidades observadas podem estar associadas à redução do oxigênio dissolvido ao redor dos pólipos. A sedimentação causa condição de anóxia nas superfícies dos pólipos expostos (Allers et al., 2013). Essa camada de anóxia é mais evidente em testes de soterramento (Allers et al., 2013), porém, a sedimentação contínua, mesmo em pequenas concentrações, pode ocasionar mortalidade por sufocamento. A constante deposição de partículas na superfície do pólipo contribui para a formação de uma camada de anóxia (Larsson & Purser, 2011). Essa condição é mais intensificada em presença de sedimento natural, por conta da presença de matéria orgânica e, conseqüentemente, bactérias (Weber et al., 2006). A atividade dessas bactérias contribui para a redução da quantidade de oxigênio presente na superfície do pólipo, redução do pH e produção de ácido sulfídrico (H₂S) (Weber et al., 2012). Para barita, por esta não apresentar matéria orgânica, a camada de anóxia não se desenvolve tão rapidamente (Allers et al., 2013). A mortalidade também pode estar associada a danos causados ao cenossarco pela sedimentação (Larsson & Purser, 2011). Baussant et al. (2018) observaram redução na área recoberta por cenossarco nos fragmentos expostos por cascalho de perfuração, porém sem mortalidade observada.

Atividade dos pólipos

A atividade dos pólipos foi intensificada nos corais expostos à barita, resultado contrário ao esperado. A menor proporção de pólipos ativos observada para o controle possivelmente esteve associada com a qualidade da água. A presença de produtos nitrogenados pode ter afetado de forma negativa a saúde dos pólipos no controle. Em contrapartida, foi observada maior atividade nos tratamentos expostos com barita. Esse aumento na atividade pode estar, contudo, associado à limpeza dos pólipos, comportamento natural em *L. pertusa*. A expansão de tentáculos auxilia a remoção de partículas em conjunto com o movimento ciliar (Erftemeijer et al., 2012). A concentração de 50 mg.L⁻¹ apresentou maior atividade quando comparada com 100 mg.L⁻¹. Neste caso, a maior concentração apresentou redução na atividade. A diferença na atividade foi evidenciada durante os períodos de exposição. Durante o segundo ciclo de exposição, a proporção de pólipos abertos no tratamento de 100 mg.L⁻¹ reduziu

a zero, mas retornou ao estado normal. Esta ausência de atividade coincidiu com os aumentos da concentração acima do esperado. Larsson et al. (2013) observaram padrões similares, com redução na proporção de pólipos abertos nas maiores concentrações. Gass (2006) também observou redução na atividade em maiores níveis de sedimentação. Baussant et al. (2018), por outro lado, observaram aumento na atividade durante os períodos de exposição para as maiores concentrações testadas. Mortensen et al. (2015) não observaram diferença *in situ* na proporção de pólipos abertos entre áreas expostas e não expostas por dejetos de perfuração, ao contrário do observado para experimentos em laboratório. Apesar deste dado, o comportamento do pólipo ainda pode ser considerado uma resposta robusta a efeitos a estressores (Roberts & Anderson, 2002).

Apesar de não quantificado, após 40 dias do ensaio, foi observada atividade para todos os fragmentos utilizados no ensaio, principalmente durante períodos de alimentação. Essa recuperação corrobora *L. pertusa* como uma espécie resiliente quanto ao estresse provocado pela sedimentação por barita a curto prazo.

5.5. Conclusões

O sistema de exposição apresentou um funcionamento aceitável, com manutenção de barita em suspensão ao longo dos ciclos de exposição. Porém, a adição contínua não garantiu a manutenção da concentração próxima da desejada durante os períodos de exposição. O acúmulo de barita nos tubos foi o maior problema quanto ao aumento exacerbado na concentração em ambos os tratamentos com barita. Optar por uma posição superior da solução-estoque, com os tubos direcionados o mais na vertical possível, pode auxiliar a reduzir essas variações. A utilização de tubos de teflon como alternativa possa talvez evitar esse acúmulo (Baussant et al., 2013). A redução da concentração também pode ajudar a reduzir a variabilidade, e se aproximar de condições mais reais.

Os parâmetros físicos e químicos permaneceram dentro dos limites de aceitabilidade, com sobrevivência de 100% dos pólipos nos controles ao final dos 35 dias de experimento. No entanto, a qualidade da água não apresentou

níveis ideais para a saúde dos fragmentos, evidenciado pela baixa atividade observada no controle, mesmo durante estímulo de alimentação. Para futuros ensaios com este sistema, melhorias quanto ao controle da qualidade da água precisam ser aplicadas, como aumento da vazão de troca de água e utilização de algum sistema de filtro biológico para controlar os produtos nitrogenados. Um maior controle do pH também é necessário, a fim de evitar maiores variações, como as observadas. Essas melhorias permitirão eliminar estresses ocasionados pela degradação da qualidade da água.

Apesar dos resultados positivos com os parâmetros avaliados, estas respostas são imediatas. Respostas sub-letais e crônicas também devem ser consideradas para melhor avaliar os efeitos da sedimentação sobre *L. pertusa*. Nesse sentido, ainda poderiam ser considerados: perda de tecido, principalmente do cenossarco, que ocorre devido ao atrito com as partículas em suspensão (Larsson & Purser, 2011; Baussant et al., 2018); taxa de crescimento que também pode ser afetada com a sedimentação (Larsson et al., 2013). Apesar da condição de anóxia criada pela sedimentação, a taxa de respiração não representa uma resposta robusta de estresse (Pabortsava et al., 2011; Larsson et al., 2013; Baussant et al., 2018), uma vez que *L. pertusa* apresenta tolerância a condições de anoxia e hipoxia (Dodds et al., 2007).

Os fragmentos de *L. pertusa* apresentaram grande resiliência ao recobrimento por barita. A alta taxa de sobrevivência e proporção de pólipos abertos demonstra essa tolerância. Os fragmentos utilizados também apresentaram uma rápida recuperação após o ensaio, com atividade plena após 40 dias em um sistema de manutenção com água do mar sintética. Porém, é preciso avaliar mais parâmetros de respostas, por um período maior, e testar cenários mais próximos dos modelos existentes e dos observados para o ambiente, a fim de obter respostas mais confiáveis e próximas dos cenários reais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

À medida que a indústria de óleo e gás desloca as suas atividades para áreas profundas, mais expostos ficam os corais que habitam essas regiões. Normalmente são evidenciados derramamentos de óleo e a utilização de dispersantes químicos como impactos principais causados por essas atividades. Porém, durante período de perfuração, toneladas de cascalho e fluido de perfuração são descartados nos oceanos. Esses rejeitos podem se dispersar por longas distâncias e depositar nos recifes de corais de águas profundas. O componente barita já foi observado na matriz de esqueletos de *Lophelia pertusa*, de bancos a mais de 4 km de distância de áreas de exploração (Roberts et al., 2006).

Diversos estudos recentes avaliaram efeitos da sedimentação, principalmente por cascalho de perfuração, em *L. pertusa*. Esses estudos observaram impacto na atividade dos pólipos, crescimento do esqueleto, integridade do cenossarco, além de promover a mortandade em caso de soterramento. Apesar desses estudos, ainda existem poucos dados sobre esses efeitos, principalmente de forma crônica, uma vez que *L. pertusa* apresenta baixo metabolismo. O número ainda baixo de estudos se dá em grande parte pelas limitações ainda existentes para corais de águas profundas. Estudos *in situ* ainda possuem um alto custo operacional. Estudos em laboratório, além do elevado custo para a manutenção, dependem de controles mais adequados para esses organismos. Outro fator limitante é a coleta, que por ocorrer em águas profundas, limita o número de fragmentos coletados, e em caso de mortandade dos fragmentos, uma nova coleta pode demorar meses a ser realizada.

O desenvolvimento de sistemas de manutenção é importante para a avaliação desses efeitos em laboratório. O sistema apresentado neste trabalho apresentou um funcionamento adequado, e permitiu a manutenção de fragmentos de *L. pertusa* durante um período de 36 meses, apesar deste trabalho só abordar o período referente ao ano de 2017. Apesar das condições adequadas, melhorias são necessárias a fim de garantir um funcionamento próximo às condições naturais. O sucesso deste sistema abre portas para a implementação de sistemas similares em laboratórios e instituições com as mesmas características e limitações do Labtox. Este trabalho também fornece a

descrição de procedimentos necessários à manutenção de corais escleractíneos em condições artificiais.

O ensaio de exposição à barita, apesar das dificuldades encontradas, apresentou resultados satisfatórios. A atividade dos pólipos foi afetada em presença da barita, principalmente para as concentrações mais altas. Neste caso, os fragmentos expostos apresentaram maior atividade, provavelmente associada ao processo de limpeza. Porém, em concentrações altas, foi observada redução na atividade, o que pode contribuir com o recobrimento e, conseqüentemente, mortalidade. A mortalidade, apesar de não ter apresentado diferença entre os tratamentos, foi observada somente para os aquários expostos à barita. Os pólipos mortos estavam recobertos, e, no caso de ciclos de exposição mais elevados, a quantidade de pólipos mortos provavelmente seria muito maior.

Os resultados deste trabalho indicam uma grande resiliência por parte de *L. pertusa*. Essa adaptabilidade foi descrita por diversos autores. Porém, mais dados são necessários para melhor comparar esses resultados. Para isso, novos ensaios precisam ser realizados para melhor avaliar os limites de tolerância dessa espécie. Ajustes ao sistema de exposição apresentado, assim como a utilização de condições próximas dos modelos criados para a costa brasileira são necessários para este fim. A adoção de novos parâmetros, e avaliações de longo prazo são necessárias também para avaliar os efeitos e capacidade de recuperação desses organismos. Avaliações *in situ* também são importantes para comparações com resultados obtidos no laboratório, para assim definir melhores ações para mitigar impactos aos recifes de águas profundas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, Geoff L.; MAGUIRE, Greg B.; HOPKINS, Stephen J. Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. **Aquaculture**, v. 91, n. 3-4, p. 265-280, 1990.

ALLERS, Elke et al. Resistance of *Lophelia pertusa* to coverage by sediment and petroleum drill cuttings. **Marine pollution bulletin**, v. 74, n. 1, p. 132-140, 2013.

BABCOCK, Russ; DAVIES, Phil. Effects of sedimentation on settlement of *Acropora millepora*. **Coral Reefs**, v. 9, n. 4, p. 205-208, 1991.

BAUSSANT, Thierry et al. Effects of suspended drill cuttings on the coral *Lophelia pertusa* using pulsed and continuous exposure scenarios. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, n. 10, p. 361-382, 2018.

BAUSSANT, Thierry et al. Exposure study with a drilling mud from Petrobras on the deep-water coral *Lophelia pertusa*. **Report IRIS - 2014/041**, 2014.

BAUSSANT, Thierry et al. Physiological responses and lipid storage of the coral *Lophelia pertusa* at varying food density. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 5, p. 266-284, 2017.

BAUSSANT, Thierry et al. Standard operating procedures, experience and advice related to experimental laboratory work with the deep-water coral *Lophelia pertusa*. **Report IRIS - 2013/074**, 2013.

BROOKE, Sandra et al. Temperature tolerance of the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the southeastern United States. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 92, p. 240-248, 2013.

BROOKE, Sandra; JÄRNEGREN, Johanna. Reproductive periodicity of the scleractinian coral *Lophelia pertusa* from the Trondheim Fjord, Norway. **Marine biology**, v. 160, n. 1, p. 139-153, 2013.

BROOKE, Sandra; YOUNG, Craig M. In situ measurement of survival and growth of *Lophelia pertusa* in the northern Gulf of Mexico. **Marine Ecology Progress Series**, v. 397, p. 153-161, 2009.

BUHL-MORTENSEN, Pål; TENNINGEN, Eirik; TYSSELAND, Anne Britt Skar. Effects of water flow and drilling waste exposure on polyp behaviour in *Lophelia pertusa*. **Marine Biology Research**, v. 11, n. 7, p. 725-737, 2015.

CANTELMO, Frank R.; TAGATZ, M. E.; RAO, K. Ranga. Effect of barite on meiofauna in a flow-through experimental system. **Marine environmental research**, v. 2, n. 4, p. 301-309, 1979.

CASTRO, C. B. et al. Filo Cnidaria. Corais. **Biodiversidade bentônica da região central da zona econômica exclusiva brasileira**. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, p. 147-192, 2006.

CHAPRON, L. et al. Macro-and microplastics affect cold-water corals growth, feeding and behaviour. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

COLES, S. L.; JOKIEL, Paul L. Synergistic effects of temperature, salinity and light on the hermatypic coral *Montipora verrucosa*. **Marine Biology**, v. 49, n. 3, p. 187-195, 1978.

CORDES, Erik E. et al. Environmental impacts of the deep-water oil and gas industry: a review to guide management strategies. **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 58, 2016.

DA SILVEIRA, Ilson Carlos Almeida et al. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Rev. Bras. Ocean**, v. 48, n. 2, p. 171-183, 2000.

DALLMEYER, D. G.; PORTER, J. W.; SMITH, G. J. Effects of particulate peat on the behavior and physiology of the Jamaican reef-building coral *Montastrea annularis*. **Marine Biology**, v. 68, n. 3, p. 229-233, 1982.

DELBEEK, J. Charles; SPRUNG, Julian. **The reef aquarium: A comprehensive guide to the identification and care of tropical marine invertebrates**. Ricordea Pub, 1994.

DODDS, L. A. et al. Metabolic tolerance of the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) to temperature and dissolved oxygen change. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 349, n. 2, p. 205-214, 2007.

EDGE, Katelyn J. et al. Sub-lethal effects of water-based drilling muds on the deep-water sponge *Geodia barretti*. **Environmental pollution**, v. 212, p. 525-534, 2016.

ERFTEMEIJER, Paul LA et al. Environmental impacts of dredging and other sediment disturbances on corals: a review. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 9, p. 1737-1765, 2012.

FOSSÅ, Jan Helge; MORTENSEN, P. B.; FUREVIK, Dag M. The deep-water coral *Lophelia pertusa* in Norwegian waters: distribution and fishery impacts. **Hydrobiologia**, v. 471, n. 1-3, p. 1-12, 2002.

FREDERIKSEN, Rune; JENSEN, Andreas; WESTERBERG, Håkan. The distribution of the scleractinian coral *Lophelia pertusa* around the Faroe Islands and the relation to internal tidal mixing. **Sarsia**, v. 77, n. 2, p. 157-171, 1992.

FREIWALD, A. Reef-forming cold-water corals. In: **Ocean margin systems**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. p. 365-385.

FREIWALD, André et al. **Cold water coral reefs: out of sight-no longer out of mind**. UNEP-WCMC, Cambridge, UK, 2004.

FREIWALD, André et al. The white coral community in the central Mediterranean Sea revealed by ROV surveys. **Oceanography**, v. 22, n. 1, p. 58-74, 2009.

FROST, Tone K. et al. Environmental monitoring and modeling of drilling discharges at a location with vulnerable seabed fauna: Comparison between field measurements and model simulations. In: **SPE International Conference on Health, Safety, and Environment**. Society of Petroleum Engineers, 2014.

GAMMON, Malindi J. et al. The physiological response of the deep-sea coral *Solenosmilia variabilis* to ocean acidification. **PeerJ**, v. 6, p. e5236, 2018.

GASS, Susan Elizabeth. **The environmental sensitivity of cold-water corals, *Lophelia pertusa***. 2006. Tese de Doutorado. Open University.

GILMOUR, J. Experimental investigation into the effects of suspended sediment on fertilisation, larval survival and settlement in a scleractinian coral. **Marine Biology**, v. 135, n. 3, p. 451-462, 1999.

GÓMEZ, Carlos E. et al. Growth and feeding of deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the California margin under simulated ocean acidification conditions. **PeerJ**, v. 6, p. e5671, 2018.

GRGURIC, Gordan; WETMORE, Stacey S.; FOURNIER, Robert W. Biological denitrification in a closed seawater system. **Chemosphere**, v. 40, n. 5, p. 549-555, 2000.

HALL-SPENCER, J. M.; STEHFEST, K. Background Document for Lophelia pertusa reefs. **OSPAR Commission**. Marine Institute, University of Plymouth, Plymouth PL4 8AA, UK. Publication number 423, 2009.

HENNIGE, S. J. et al. Short-term metabolic and growth responses of the cold-water coral *Lophelia pertusa* to ocean acidification. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 99, p. 27-35, 2014.

HOLDWAY, Douglas A. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 3, p. 185-203, 2002.

HOVLAND, Martin. **Deep-water coral reefs: Unique biodiversity hot-spots**. Springer Science & Business Media, 2008.

JÄRNEGREN, Johanna; BROOKE, Sandra; JENSEN, Henrik. Effects of drill cuttings on larvae of the cold-water coral *Lophelia pertusa*. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 137, p. 454-462, 2017.

KITAHARA, Marcelo Visentini. Novas ocorrências de corais azooxantelados (Anthozoa, Scleractinia) na plataforma e talude continental do sul do Brasil (25-34o S). **Biotemas**, v. 19, n. 3, p. 55-63, 2006.

KONIETSCHKE, Frank et al. nparcomp: An R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. **Journal of Statistical Software** 64 (2015), Nr. 9, v. 64, n. 9, p. 1-17, 2015.

LARSSON, Ann I. et al. Tolerance to long-term exposure of suspended benthic sediments and drill cuttings in the cold-water coral *Lophelia pertusa*. **Marine pollution bulletin**, v. 70, n. 1-2, p. 176-188, 2013.

LARSSON, Ann I.; PURSER, Autun. Sedimentation on the cold-water coral *Lophelia pertusa*: cleaning efficiency from natural sediments and drill cuttings. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 6, p. 1159-1168, 2011.

LEPLAND, Aivo; MORTENSEN, Pål Buhl. Barite and barium in sediments and coral skeletons around the hydrocarbon exploration drilling site in the Traena Deep, Norwegian Sea. **Environmental Geology**, v. 56, n. 1, p. 119-129, 2008.

LESSARD-PILON, Stephanie A. et al. Megafauna community composition associated with *Lophelia pertusa* colonies in the Gulf of Mexico. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 21-23, p. 1882-1890, 2010.

LIEFMANN, Stephanie et al. Eco-physiological responses of cold-water soft corals to anthropogenic sedimentation and particle shape. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 504, p. 61-71, 2018.

LUNDEN, Jay J. et al. Design, development, and implementation of recirculating aquaria for maintenance and experimentation of deep-sea corals and associated fauna. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 12, n. 6, p. 363-372, 2014.

MAIER, C. et al. Calcification of the cold-water coral *Lophelia pertusa*, under ambient and reduced pH. **Biogeosciences**, v. 6, n. 8, p. 1671-1680, 2009.

MAIER, Sandra R. et al. Survival under conditions of variable food availability: Resource utilization and storage in the cold-water coral *Lophelia pertusa*. **Limnology and Oceanography**, 2019.

MIENIS, F. et al. Hydrodynamic controls on cold-water coral growth and carbonate-mound development at the SW and SE Rockall Trough Margin, NE Atlantic Ocean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 54, n. 9, p. 1655-1674, 2007.

MORTENSEN, Pål Buhl. Aquarium observations on the deep-water coral *Lophelia pertusa* (L., 1758) (Scleractinia) and selected associated invertebrates. **Ophelia**, v. 54, n. 2, p. 83-104, 2001.

MOVILLA, Juancho et al. Resistance of two Mediterranean cold-water coral species to low-pH conditions. **Water**, v. 6, n. 1, p. 59-67, 2014.

NAUMANN, Malik S. et al. First evidence for zooplankton feeding sustaining key physiological processes in a scleractinian cold-water coral. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 21, p. 3570-3576, 2011.

NEFF, Jerry M.; RABALAIS, Nancy N.; BOESCH, Donald F. Offshore oil and gas development activities potentially causing long-term environmental effects. **Long-term environmental effects of offshore oil and gas development. London (UK): Elsevier. p, p. 149-173, 1987.**

OLARIAGA, Alejandro et al. Development of an autonomous aquarium system for maintaining deep corals. **Oceanography, 2009, vol. 22, num. 1, p. 44-45, 2009.**

OREJAS, Covadonga et al. Long-term growth rates of four Mediterranean cold-water coral species maintained in aquaria. **Marine Ecology Progress Series, v. 429, p. 57-65, 2011.**

OREJAS, Covadonga et al. The effect of flow speed and food size on the capture efficiency and feeding behaviour of the cold-water coral *Lophelia pertusa*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 481, p. 34-40, 2016.**

OREJAS, Covadonga; GORI, Andrea; GILI, Josep Maria. Growth rates of live *Lophelia pertusa* and *Madrepora oculata* from the Mediterranean Sea maintained in aquaria. **Coral Reefs, v. 27, n. 2, p. 255-255, 2008.**

OSUNA-MARTÍNEZ, Carmen C.; PÁEZ-OSUNA, Federico; ALONSO-RODRÍGUEZ, Rosalba. Cadmium, copper, lead and zinc in cultured oysters under two contrasting climatic conditions in coastal lagoons from SE Gulf of California, Mexico. **Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 87, n. 3, p. 272, 2011.**

PABORTSAVA, Katsiaryna et al. The influence of drill cuttings on physical characteristics of phytodetritus. **Marine pollution bulletin, v. 62, n. 10, p. 2170-2180, 2011.**

PIRES, D. O. The azooxanthellate coral fauna of Brazil. **Bulletin of Marine Science, v. 81, n. 3, p. 265-272, 2007.**

PIRES, D. O.; SEABRA, N. A.; SILVA, J. C. Recifes de Coral de Profundidade: Corais Construtores e sua Distribuição no Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, v. 19, n. 3, p. 51-61, 2015.**

PIRES, D. O.; SILVA, J. C.; BASTOS, N. D. Reproduction of deep-sea reef-building corals from the southwestern Atlantic. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, v. 99, p. 51-63, 2014.**

PRADILLON, Florence et al. Pressure vessels for in vivo studies of deep-sea fauna. **High Pressure Research**, v. 24, n. 2, p. 237-246, 2004.

PROVAN, Fiona et al. An evaluation of coral lophelia pertusa mucus as an analytical matrix for environmental monitoring: A preliminary proteomic study. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 13-15, p. 647-657, 2016.

PURSER, Autun et al. The influence of flow velocity and food concentration on *Lophelia pertusa* (Scleractinia) zooplankton capture rates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 395, n. 1-2, p. 55-62, 2010.

PURSER, Autun. A time series study of *Lophelia pertusa* and reef megafauna responses to drill cuttings exposure on the Norwegian margin. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134076, 2015.

RAIMONDI, Peter T.; BARNETT, Arthur M.; KRAUSE, Paul R. The effects of drilling muds on marine invertebrate larvae and adults. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 1218-1228, 1997.

ROBERTS, J. M. The occurrence of the coral *Lophelia pertusa* and other conspicuous epifauna around an oil platform in the North Sea. **Underwater Technology**, v. 25, n. 2, p. 83-92, 2002.

ROBERTS, J. M.; ANDERSON, R. M. A new laboratory method for monitoring deep-water coral polyp behaviour. **Hydrobiologia**, v. 471, n. 1-3, p. 143-148, 2002.

ROBERTS, J. Murray et al. **Cold-water corals: the biology and geology of deep-sea coral habitats**. Cambridge University Press, 2009.

ROBERTS, J. Murray; CAIRNS, Stephen D. Cold-water corals in a changing ocean. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 7, p. 118-126, 2014.

ROBERTS, J. Murray; WHEELER, Andrew J.; FREIWALD, André. Reefs of the deep: the biology and geology of cold-water coral ecosystems. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 543-547, 2006.

ROGERS, Alex David. The Biology of *Lophelia pertusa* (Linnaeus 1758) and Other Deep-Water Reef-Forming Corals and Impacts from Human Activities. **International review of hydrobiology**, v. 84, n. 4, p. 315-406, 1999.

ROSS, Steve W.; QUATTRINI, Andrea M. The fish fauna associated with deep coral banks off the southeastern United States. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 54, n. 6, p. 975-1007, 2007.

RYE, Henrik et al. Simulation Of Concentrations And Depositions Of Particle Matter Caused By Drilling Discharges. Comparison Between Field Measurements And Simulation Results At Coral Locations. In: **International Conference on Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production**. Society of Petroleum Engineers, 2012.

SCOTT, George; CRUNKILTON, Ronald L. Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 19, n. 12, p. 2918-2922, 2000.

SIMARD, Marie-Christine et al. Autotrophic denitrification using elemental sulfur to remove nitrate from saline aquarium waters. **Journal of Environmental Engineering**, v. 141, n. 12, p. 04015037, 2015.

SOMERO, George N. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annual review of physiology**, v. 54, n. 1, p. 557-577, 1992.

STRACHAN, Maia F.; KINGSTON, Paul F. A comparative study on the effects of barite, ilmenite and bentonite on four suspension feeding bivalves. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 10, p. 2029-2038, 2012.

STRACHAN, Maia Fiona. **Studies on the impact of a water-based drilling mud weighting agent (Barite) on some benthic invertebrates**. 2010. Tese de Doutorado. Heriot-Watt University.

SUMIDA, Paulo Yukio Gomes et al. Seabed pockmarks associated with deepwater corals off SE Brazilian continental slope, Santos Basin. **Marine Geology**, v. 207, n. 1-4, p. 159-167, 2004.

TAL, Yossi; NUSSINOVITCH, A.; VAN RIJN, J. Nitrate removal in aquariums by immobilized *Pseudomonas*. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 3, p. 1019-1021, 2003.

TRANNUM, Hilde C. et al. Effects of sedimentation from water-based drill cuttings and natural sediment on benthic macrofaunal community structure and ecosystem processes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 383, n. 2, p. 111-121, 2010.

ULFSNES, A.; HAUGLAND, J. K.; WELTZIEN, R. Monitoring of drilling activities in areas with presence of cold water corals. **Det Norske Veritas AS**, v. 1691, p. 27, 2012.

VENN, Alexander A. et al. Impact of seawater acidification on pH at the tissue–skeleton interface and calcification in reef corals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. 1634-1639, 2013.

WEBER, Miriam et al. Mechanisms of damage to corals exposed to sedimentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. E1558-E1567, 2012.

WEBER, Miriam; LOTT, C.; FABRICIUS, K. E. Sedimentation stress in a scleractinian coral exposed to terrestrial and marine sediments with contrasting physical, organic and geochemical properties. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 336, n. 1, p. 18-32, 2006.

WILD, Christian et al. Organic matter release by cold water corals and its implication for fauna–microbe interaction. **Marine Ecology Progress Series**, v. 372, p. 67-75, 2008.

YANCEY, Paul H. et al. Marine fish may be biochemically constrained from inhabiting the deepest ocean depths. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 12, p. 4461-4465, 2014.

ZETSCHKE, E.-M.; BAUSSANT, T.; VAN OEVELEN, D. Ciliary removal of particles by the cold-water coral *Lophelia pertusa*. **Reef Ecounter**, v. 31, n. 1, p. 53-56, 2016b.

ZETSCHKE, Eva-Maria et al. Direct visualization of mucus production by the cold-water coral *Lophelia pertusa* with digital holographic microscopy. **PLoS one**, v. 11, n. 2, p. e0146766, 2016a.