

ISÓTOPOS ESTÁVEIS APLICADOS À MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO PRIMÁRIA EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Matheus C. Carvalho

Centre for Coastal Biogeochemistry, Southern Cross University, PO box 157, Lismore, NSW, 2480, Australia. E-mail: matheus@samerica.com

RESUMO

Estudos sobre a produção primária em ecossistemas aquáticos têm sido realizados desde há quase 100 anos, e a produção primária vem sendo o processo biológico medido com maior frequência, tanto por meio da quantificação da mudança na concentração do oxigênio (O_2) dissolvido na água, como do acúmulo de isótopo radioativo de carbono (^{14}C) nas células de algas. No entanto, ambas as abordagens têm limitações. A mudança na concentração de O_2 na água deve ser medida no claro (produção primária líquida) e no escuro (respiração do fitoplâncton), em duas incubações diferentes (ou em sistemas abertos em ciclos de 24h), o que é problemático porque a taxa de respiração no escuro é diferente daquela no claro. Além disso, a respiração medida no escuro é aquela da comunidade, e não do fitoplâncton, o que também dificulta a quantificação da produção primária bruta. No método do ^{14}C , por sua vez, o que se mede depende da duração da incubação: o consumo de ^{14}C em incubações curtas de poucas horas é provavelmente equivalente à produção primária bruta, mas o consumo em incubações longas, na ordem de 24h, aproxima-se da produção primária líquida. Uma maneira de se evitarem esses problemas é através da medição simultânea das mudanças na concentração e na composição isotópica do carbono ou oxigênio em incubações em sistemas fechados. Outra é através da medição dos isótopos estáveis de oxigênio, incluindo o mais raro ^{17}O , sem necessidade de incubações em sistemas fechados, mas com baixa resolução temporal. A aplicação das técnicas baseadas em isótopos estáveis tem revelado diversos aspectos desconhecidos do metabolismo de sistemas aquáticos, indicando que as informações obtidas com as técnicas clássicas não são suficientes para o correto entendimento dos processos estudados.

Palavras-chave: produtividade primária; fotossíntese; respiração; carbono; oxigênio.

ABSTRACT

STABLE ISOTOPES APPLIED TO THE MEASUREMENT OF PRIMARY PRODUCTION IN AQUATIC ECOSYSTEMS. Studies about the primary production in aquatic ecosystems have been conducted since about 100 years ago, and to date primary production remains the biological process most commonly measured, either by quantifying the change in the concentration of dissolved O_2 in water, or the accumulation of ^{14}C in algal cells. However, both techniques have limitations. The change in dissolved O_2 concentration needs to be measured both in the light and in the dark (or in open systems in 24h cycles), and there is no warranty that rates in the dark are the same that in the light. In addition, there is the problem that the respiration measured in the dark is the community respiration, and not the phytoplankton respiration. This is problematic for quantifying gross primary production. With the ^{14}C method, the measured parameter depends on the duration of the incubation: ^{14}C consumption in short incubations of a few hours is probably equivalent to gross primary production, but the consumption in long incubations around 24h duration is probably equivalent to net primary production. A way to avoid these problems is the simultaneous measurement of the changes in concentration and stable isotope composition of oxygen or carbon in incubations done in closed systems. Another is the measurement of oxygen isotopes, including the rare ^{17}O , in open systems, but with low temporal resolution. The application of techniques based on stable isotopes has revealed several aspects of aquatic system metabolism that were unknown with the sole application of the classic techniques, indicating that the information obtained with the classical methods are not enough for correctly understanding the studied processes.

Keywords: Primary productivity; photosynthesis; respiration; carbon; oxygen; stable isotopes.

INTRODUÇÃO

A fotossíntese é o processo de conversão da energia luminosa do sol em matéria orgânica, e é a base de praticamente todas as cadeias alimentares (principal exceção provavelmente sendo as cadeias alimentares dependentes de carbono assimilado por quimioautótrofos como, por exemplo, em torno de fontes hidrotermais no fundo do oceano). Portanto, seu estudo tem importância indiscutível para o entendimento do ciclo do carbono. Em estudos enfocando o ecossistema, a fotossíntese é comumente denominada produção primária bruta (Falkowski & Raven 2007).

Devido a essa importância, medições da produção primária bruta em ecossistemas aquáticos têm sido feitas desde o início das investigações sobre estes ecossistemas, cerca de 100 anos atrás, e continuam atualmente (Ryther 1956, Barber & Hilting 2002, Staehr *et al.* 2012). A maioria absoluta desses estudos têm empregado três métodos, aqui definidos como clássicos: 1) incubações em sistemas fechados no claro e no escuro, em que a medição da produção e consumo do oxigênio dissolvido, respectivamente, permite estimar a produção primária; 2) incubações em sistemas fechados somente no claro, em que o acúmulo de ^{14}C adicionado à água nas células fotossintetizantes serve como estimativa da produção primária; 3) medições em sistemas abertos, em que mudanças nas concentrações de oxigênio ou carbono inorgânico dissolvidos são medidas sucessivamente ao longo de ciclos de 24h (Staehr *et al.* 2010). No entanto, esses métodos clássicos não permitem a quantificação da produção primária com exatidão (Geider & Osborne 1992, Marra 2009).

Uma consequência das deficiências na medição direta da produção primária bruta é que estimativas globais da produção primária bruta são feitas assumindo-se que a produção primária líquida equivale à metade da bruta (Beer *et al.* 2010, Chavez *et al.* 2011). Essas estimativas apontam para algo em torno de 100 bilhões de toneladas de carbono por ano para ecossistemas aquáticos marinhos (Chavez *et al.* 2011), e 120 bilhões de toneladas de carbono por ano para os terrestres (Beer *et al.* 2010). É possível que estas estimativas estejam erradas, uma vez que os métodos usados para obtê-las contêm falhas.

Outra consequência é a incerteza sobre o estado trófico do oceano oligotrófico. Hoje em dia, não se sabe se o oceano oligotrófico é autotrófico ou

heterotrófico (Duarte *et al.* 2013, Ducklow & Doney 2013, Williams *et al.* 2013). Este é um debate que vem se estendendo por décadas (Del Giorgio *et al.* 1997, Duarte & Agustí 1998, Williams 1998, Duarte *et al.* 1999, Williams & Bowers 1999, Del Giorgio & Duarte 2002, Robinson *et al.* 2009), e parte da falta de consenso se deve à carência de métodos adequados para a medição da produção primária bruta.

Métodos baseados na medição de isótopos estáveis para a quantificação da produção primária bruta permitem que esta medição seja feita com menos erros do que com os métodos tradicionais, como será demonstrado ao longo do texto. Há duas categorias de métodos baseados em isótopos estáveis para a medição da produção primária bruta em sistemas aquáticos: 1) incubações em sistemas fechados e 2) medições em sistemas abertos. Apesar das primeiras aplicações desses métodos terem sido demonstradas ainda na década de 1950 (Brown & Weis 1959, Grande *et al.* 1989), devido a dificuldades técnicas, eles permaneceram inutilizados por várias décadas. A partir da década de 1990, a introdução de equipamentos que facilitaram as medições de isótopos estáveis (Groot 2004) permitiu a retomada desses estudos. O presente trabalho apresenta uma breve introdução aos métodos baseados em isótopos estáveis para a medição da produção primária bruta em ecossistemas aquáticos, e também expõe o que se tem descoberto com a aplicação desses métodos.

INCUBAÇÕES EM SISTEMAS FECHADOS

A maneira mais comum de se medir a produção primária bruta aquática é quantificando-se as trocas gasosas de dióxido de carbono ou oxigênio entre os compartimentos orgânicos e inorgânicos do corpo d'água durante o dia. Essas trocas são o resultado da atividade conjunta da fotossíntese e da respiração. No entanto, a quantificação dessas trocas só permite a medição direta da produção primária líquida, ou seja, a diferença entre produção primária bruta e respiração. A seguinte fórmula sumariza o procedimento:

$$PPB = PPL + R \quad (1)$$

Em que *PPB* é a produção primária bruta, equivalente à soma da quantidade de oxigênio produzida com a que foi consumida pelo fitoplâncton (idealmente; na verdade, esse consumo é impossível

de ser quantificado em sistemas naturais), *PPL* é produção primária líquida, que é a quantidade de oxigênio produzida no claro, e *R* é respiração, quantidade de oxigênio consumida no escuro. Note-se que não há garantia de que a taxa de respiração no escuro seja a mesma que no claro, e este é o principal problema desta técnica. Além disso, o fato de não ser possível a quantificação da respiração fitoplanctônica separada daquela da comunidade como um todo gera uma incerteza adicional na estimativa da produção primária bruta.

Em incubações utilizando-se ^{14}C , mede-se o acúmulo de ^{14}C (previamente adicionado à água) na biomassa de algas na luz e, dependendo da duração das incubações, assume-se como sendo PPB, ou PPL (Marra 2009). Se a incubação dura poucas horas, assume-se que está se medindo a PPB, porque a quantidade de ^{14}C que retorna para a água por meio da respiração é provavelmente insignificante. Em contraste, se a incubação dura, digamos, 24 horas, não é seguro ignorar o retorno de ^{14}C devido à respiração, e então se assume que o que se mede é a PPL. Note-se que não há como decidir a partir de quantas horas se está medindo a PPB ou a PPL – este é um parâmetro quase subjetivo. Além disso, se o ^{14}C respirado volta para a água e é então usado novamente como matéria-prima para a produção primária, a medição do acúmulo de ^{14}C na matéria orgânica não estará correspondendo à PPB. É interessante que estas falhas no método do ^{14}C foram reconhecidas ainda na primeira descrição do método pelo seu autor. Mesmo assim, o método continuou sendo amplamente usado, tendo se tornado a principal fonte de dados sobre a PPB nos oceanos (Sondergaard 2002), servindo também como base de calibração para a principal fonte de dados hoje sobre produção primária nos oceanos, que são as imagens de satélite (Behrenfeld *et al.* 2002).

Há variações menos comuns dessas duas técnicas clássicas, com o uso, por exemplo, de ^{13}C em vez de ^{14}C , ou a medição da concentração do carbono inorgânico dissolvido na água ao invés do O_2 (Geider & Osborne 1992). No entanto, todos estes métodos têm em comum que as medições se baseiam na mudança de um único parâmetro de cada vez, o que torna impossível a quantificação simultânea de dois processos (no caso, fotossíntese e respiração).

Para a medição simultânea da fotossíntese e da respiração em um sistema fechado, a saída é medir variações em duas quantidades que sejam alteradas

pelos dois processos. A fotossíntese e a respiração alteram não apenas a quantidade de carbono inorgânico e oxigênio dissolvido na água, elas mudam também a proporção dos isótopos estáveis desses elementos. A mudança na proporção dos isótopos se deve ao fracionamento isotópico durante a fotossíntese (no caso do carbono, ^{12}C é absorvido mais rapidamente que ^{13}C ; ver Apêndice A para mais detalhes), e à liberação de CO_2 durante a respiração com uma proporção de ^{13}C e ^{12}C similar àquela das algas e não da água. O resultado é que no final de uma incubação sob incidência luminosa, tanto a concentração de carbono inorgânico e a proporção dos isótopos de carbono são alteradas. O seguinte sistema de equações descreve esses processos:

$$c_{\text{final}} = c_{\text{inicial}} - c_{\text{foto}} + c_{\text{resp}} \quad (2)$$

$$\frac{F_{\text{resp}} + F_{\text{final}} \left(\frac{c_{\text{foto}}}{c_{\text{resp}}} - 1 - \frac{c_{\text{foto}}}{\beta c_{\text{resp}}} \right)}{F_{\text{resp}} + F_{\text{inicial}} \left(\frac{c_{\text{foto}}}{c_{\text{resp}}} - 1 - \frac{c_{\text{foto}}}{\beta c_{\text{resp}}} \right)} = \left(\frac{c_{\text{final}}}{c_{\text{inicial}}} \right) \frac{\frac{c_{\text{foto}}}{c_{\text{resp}}} - 1 - \frac{c_{\text{foto}}}{\beta c_{\text{resp}}}}{1 - \frac{c_{\text{foto}}}{c_{\text{resp}}}} \quad (3)$$

Em que c é a concentração de carbono inorgânico dissolvido, F a proporção $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})$, β o fracionamento isotópico durante a fotossíntese, *inicial* o valor inicial na água, *final* o valor final na água, *foto* refere-se à fotossíntese e *resp* à respiração. F e c *inicial* e *final* são medidos diretamente na água, enquanto F_{resp} é estimado baseado no valor medido na matéria orgânica presente na incubação, e β tem um valor entre 1,01 e 1,04. Portanto, apenas c_{foto} e c_{resp} sobram como desconhecidos, e podem ser encontrados resolvendo-se o sistema. É importante salientar que é necessário adicionar de 1 a 5% de ^{13}C extra ao carbono dissolvido, de forma que F_{final} e F_{inicial} fiquem bem diferentes de F_{resp} , para que a precisão da medição seja aceitável. Explicações detalhadas sobre o método estão disponíveis na literatura (Carvalho *et al.* 2009, Carvalho & Eyre 2012).

É possível aplicar procedimento análogo para o oxigênio, envolvendo a variação da concentração de oxigênio dissolvido na água e sua composição isotópica. Neste procedimento, adiciona-se ^{18}O à água (aproximadamente 1mL de 95% H_2^{18}O a 600mL de água). Explicações específicas sobre este método também podem ser encontradas na literatura (Bender *et al.* 1987, Grande *et al.* 1989, Ostrom *et al.* 2005).

Interessantemente, devido a peculiaridades próprias dos isótopos de oxigênio, é possível usar uma aproximação matemática para o cálculo da produção primária bruta que prescinde da medição na mudança da concentração de oxigênio dissolvido, bastando-se apenas medir a concentração inicial e a mudança na composição isotópica com a seguinte fórmula (Kiddon *et al.* 1995):

$$Po = [O_2]_{inicial}(Fo_{final} - Fo_{inicial}) / (Fo_{agua} - Fo_{final}) \quad (4)$$

Em que Po é a produção primária bruta em unidades de oxigênio, $[O_2]$ é a concentração de oxigênio dissolvido na água, Fo é a proporção $^{18}O/^{16}O+^{18}O$ no O_2 dissolvido no início e no fim da incubação, e do oxigênio na molécula da água antes da incubação.

MEDIÇÕES EM SISTEMAS ABERTOS

Medições em sistemas fechados não representam fielmente os processos que ocorrem em sistemas abertos (como nos ecossistemas naturais) por causa do 'efeito garrafa' (Geider & Osborne 1992, Falkowski & Raven 2007). Portanto, se for possível medir a produção primária sem o uso de um sistema fechado, provavelmente a medição será mais realista e significativa. No entanto, trabalhar com sistemas abertos é complexo, já que se torna necessário definir as fronteiras do sistema.

Um sistema de interesse para a medição da produção primária é a camada superficial de lagos ou do oceano. Essa camada superficial tem como fronteiras verticais a interface ar-água e a termoclina. As fronteiras horizontais não precisam ser definidas quando se pretende apenas determinar a produção primária no centro de um lago, ou no meio do oceano. Pode-se argumentar que a posição da termoclina varia durante o dia, e durante estações de um ano, e também para um certo período apenas. Portanto, as medições feitas com essa abordagem são necessariamente para condições médias (Luz & Barkan 2000). Poderia ser argumentado também que, ao invés da termoclina, a profundidade máxima da penetração da luz definiria a fronteira do sistema. No entanto, a termoclina atua como uma barreira física para a transferência de gases e outras substâncias dissolvidas (Sarmiento & Gruber 2006), enquanto que a profundidade de máxima penetração da luz não tem correlação direta com essa transferência. Portanto, para propósitos de definir a

fronteira do sistema em que a medição da produção e consumo de oxigênio será feita, a termoclina - e não a profundidade de máxima penetração da luz - é o parâmetro mais adequado. Em casos em que o corpo d'água apresenta circulação desde a superfície até o fundo, como, por exemplo, lagos artificiais muito rasos sujeitos à aeração artificial (comumente usados para aquicultura), pode-se assumir que não existe termoclina e, neste caso, a fronteira do sistema seria o próprio fundo do lago.

Definidas as fronteiras do sistema, é necessário então definir como o sistema interage com o exterior, através dessas fronteiras. No caso da produção primária medida com o oxigênio na camada superficial de um corpo d'água, é necessário conhecer as taxas de transferência de oxigênio entre a água e o ar, entre a camada de água superficial e a camada imediatamente abaixo, através da termoclina. A transferência de oxigênio entre o ar e a água é significativa, pelo fato de haver muito mais oxigênio no ar e pela turbulência ocasionada pelo vento, que provoca dissolução de oxigênio na água. Em contraste, a transferência entre a camada superficial e aquela abaixo da termoclina é insignificante para processos na escala de semanas, por ser muito lenta (Luz & Barkan 2000). Portanto, o sistema fica simplificado considerando-se que ele tem apenas uma fronteira relevante. Desta forma, três processos afetando o oxigênio na camada superficial são considerados: fotossíntese, respiração e trocas na interface ar-água.

Há um método que pode ser considerado clássico para sistemas abertos (Odum 1956), o qual consiste na medição sucessiva (por exemplo, de hora em hora) da concentração do oxigênio dissolvido ao longo de ciclos de 24 horas. No entanto, a produção primária bruta não é medida diretamente por este método, já que as taxas de respiração no claro não são conhecidas. Detalhes e recomendações minuciosas para o emprego desta técnica foram recentemente resumidos em uma revisão (Staehr *et al.* 2010), e alguns aspectos matemáticos avançados podem ser obtidos em (Chapra 1997).

Da mesma forma que para sistemas fechados, com o uso de isótopos é possível medir a produção primária bruta em sistemas abertos. Até hoje, apenas métodos baseados nos isótopos de oxigênio foram apresentados, não havendo alternativas para o carbono.

Para se entender a medição da produção primária em sistemas abertos usando isótopos de

oxigênio é necessário um aprofundamento na biogeoquímica deste elemento, o qual será apresentado a seguir. Este aprofundamento é construído sobre conhecimentos em isótopos estáveis, principalmente fracionamento isotópico. Portanto, para os leitores que não estão familiarizados com isótopos estáveis, recomenda-se primeiramente a leitura do Apêndice A, no final deste texto.

A composição isotópica tríplice (^{16}O , ^{17}O e ^{18}O) do oxigênio atmosférico é diferente daquela do oxigênio dissolvido na água. Esta diferença não existiria se não houvesse atividade biológica (fotossíntese e respiração) na água, pois a atmosfera e a água estariam em equilíbrio (Luz & Barkan 2000). A fotossíntese e a respiração afetam a composição tríplice do oxigênio na água por meio de fracionamentos isotópicos dependentes de massa. Estes fracionamentos são, *grossa modo*, o dobro para o ^{18}O comparado ao ^{17}O (Luz & Barkan 2000). Na verdade, há várias reações, cada uma com um efeito ligeiramente diferente, e o que se sabe hoje é que, levando-se todos os fatores em consideração, a razão $^{18}\text{O}/^{17}\text{O}$ do oxigênio derivado desses processos é 0,518 (Luz & Barkan 2009). Em contraste, na atmosfera, a reação mais importante é aquela do ozônio com o CO_2 na estratosfera, que gera um fracionamento independente de massa que causa depleção igual para ^{17}O e ^{18}O no oxigênio atmosférico (Luz & Barkan 2000). O efeito resultante é que há proporcionalmente mais ^{17}O no oxigênio dissolvido na água do que no ar. Este excesso é simbolizado por $\Delta^{17}\text{O}$, calculado a partir da medição do $\delta^{17}\text{O}$ e do $\delta^{18}\text{O}$ na água com a seguinte fórmula:

$$\Delta^{17}\text{O} = 10^6 \left[\ln \left(\frac{\delta^{17}\text{O}}{10^3} + 1 \right) - \lambda \ln \left(\frac{\delta^{18}\text{O}}{10^3} + 1 \right) \right] \quad (5)$$

O parâmetro λ corresponde ao fracionamento isotópico dependente de massa entre ^{17}O e ^{18}O , com o valor de 0,518.

A próxima etapa é usar os valores de $\Delta^{17}\text{O}$ em um balanço molecular, assumindo que o sistema está em equilíbrio e em steady state (Luz & Barkan 2000). Desta forma, é possível estabelecer que:

$$F + I = R + E \quad (6)$$

Em que F corresponde ao acréscimo de oxigênio dissolvido devido à fotossíntese, I ao acréscimo devido à importação de ar proveniente da atmosfera, R ao

decréscimo devido à respiração e E ao decréscimo devido à exportação de oxigênio da água para o ar. Igualmente, para $\Delta^{17}\text{O}$, pode-se estabelecer que:

$$F\Delta_f + I\Delta_{ar} = R\Delta_r + E\Delta_{\text{água}} \quad (7)$$

Em que Δ abrevia $\Delta^{17}\text{O}$ com os seguintes sufixos: f para fotossíntese, ar para ar, água para água e r para respiração. Muito importante para a resolução desse sistema (equações 6 e 7) é que $\Delta_r = \Delta_{\text{água}}$ (Luz & Barkan 2009). Usando-se esta informação, e após algumas operações algébricas (ver Apêndice B), acha-se:

$$F = I(\Delta_{\text{água}} - \Delta_{ar}) / (\Delta_f - \Delta_{\text{água}}) \quad (8)$$

I é definido como o produto do coeficiente de trocas gasosas entre água e ar pela concentração de oxigênio dissolvido na água quando o sistema está em equilíbrio. Ambas as quantidades podem ser obtidas indiretamente por meio de medições como velocidade do vento, temperatura e pressão atmosférica. $\Delta_{\text{água}}$ é medido diretamente durante a investigação. $\Delta_{ar} = 16$, e $\Delta_f = 249$ (Luz & Barkan 2000). Portanto, substituindo-se estes valores na equação 12 acha-se F . Note-se que não é possível achar R combinando-se as equações 6 e 7, mesmo se sabendo F .

É importante salientar que o raciocínio apresentado acima vem sendo aplicado desde a apresentação do método em 2000 (Luz & Barkan 2000), mas que recentemente se descobriu que a formulação matemática contém pequenos erros (Kaiser 2011, Prokopenko *et al.* 2011). Felizmente, esses erros não comprometem a validade dos resultados obtidos até então (Luz & Barkan 2011). Para uma descrição detalhada dos procedimentos matemáticos corretos para a obtenção da produção primária pelo método dos três isótopos o leitor deve consultar estas referências recentes.

Além do método dos três isótopos, um modelo matemático usando apenas ^{18}O e ^{16}O foi apresentado (Quiñones-Rivera *et al.* 2007, Quiñones-Rivera *et al.* 2009). Este modelo, no entanto, não pode ser caracterizado como uma medição propriamente dita da produção primária ou da respiração; na verdade, faz-se uma estimativa das taxas de fotossíntese / respiração a qual é dependente de medições independentes de taxas de respiração realizadas anteriormente em sistemas fechados. Este modelo é assumidamente simplista e suscetível a muitas incertezas (Quiñones-Rivera *et al.* 2007, Quiñones-Rivera *et al.* 2009).

IMPACTOS NO CONHECIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO PRIMÁRIA BRUTA

Os métodos baseados em isótopos estáveis para a medição da produção primária bruta vêm sendo aplicados com sucesso em diversos estudos limnológicos e oceanográficos (Ostrom *et al.* 2005, Quay *et al.* 2010, Luz & Barkan 2011, Juranek & Quay 2013). Desde então, eles vêm desvendando uma realidade diferente daquela que os métodos clássicos vinham sugerindo (ver referências a seguir).

Estudos empregando isótopos de oxigênio em sistemas fechados têm normalmente revelado que as taxas de respiração na luz, e consequentemente as taxas de produção primária bruta, são bem (até 10 vezes) maiores no claro que no escuro. Isto tem sido observado em experimentos em laboratório (Bender *et al.* 1987, Grande *et al.* 1989), em lagos (Luz *et al.* 2002), e principalmente no oceano (Bender *et al.* 1999, Bender *et al.* 2000, Hitchcock *et al.* 2000, Juranek & Quay 2005, Robinson *et al.* 2009, Quay *et al.* 2010). De fato, é esperado que as taxas sejam mais altas na luz, tanto devido à maior necessidade de energia por parte das células fitoplanctônicas durante a fotossíntese (Falkowski *et al.* 1985, Weger *et al.* 1989, Xue *et al.* 1996), como também a um maior consumo de matéria orgânica dissolvida por bactérias na luz (Pringault *et al.* 2007, Pringault *et al.* 2009, Sadro *et al.* 2011). Um número menor de estudos (em lagos) apresenta tendência oposta de menores taxas de respiração na luz que no escuro, e também menores PPB, medidas com o método dos isótopos de oxigênio comparadas àquelas medidas pelos métodos clássicos (Ostrom *et al.* 2005, Yacobi *et al.* 2007). É difícil explicar fisiologicamente estes resultados e, portanto, estas exceções podem ser devidas a limitações no método como, por exemplo, à adsorção de ^{18}O em substâncias orgânicas extracelulares, e não realmente à menor produção primária bruta na luz que no escuro (Yacobi *et al.* 2007). Mais investigações são necessárias para se entender realmente o que ocorre nesses casos.

Medições em sistemas abertos com isótopos de oxigênio sempre resultam em taxas maiores de respiração na luz do que no escuro (Juranek & Quay 2005, Sarma *et al.* 2005, Reuer *et al.* 2007, Luz & Barkan 2009, Quay *et al.* 2010), e também em taxas maiores de produção primária bruta em sistemas abertos do que em sistemas fechados (Juranek &

Quay 2005, Quay *et al.* 2010). A diferença com relação aos métodos tradicionais é explicada similarmente àquela observada para o método em sistema fechado: maiores taxas metabólicas do fitoplâncton e das bactérias no claro do que no escuro. Já o fato das maiores taxas terem sido observadas em sistemas abertos se comparadas a sistemas fechados se deve provavelmente ao fato de que as incubações em sistemas fechados não capturam eventos relativamente raros de alta produtividade (Quay *et al.* 2010). Como o método em sistemas abertos abrange semanas (enquanto o de sistemas fechados apenas horas), o método em sistemas abertos tem maior probabilidade de capturar esses eventos de alta produtividade.

O método dos isótopos de carbono em sistemas fechados só foi empregado de forma preliminar (Carvalho & Eyre 2012) e é, portanto, prematuro partir-se para conclusões abrangentes. No entanto, os poucos resultados disponíveis apontam para a existência de casos em que os processos envolvendo carbono e oxigênio são completamente independentes entre si, o que levaria à necessidade de medição de taxas baseadas em unidades de carbono, e não oxigênio, se o objetivo for entender o ciclo do carbono. Por exemplo, foi observado que a liberação de CO_2 através da respiração no claro chegou a ser 15 vezes menor que o consumo de oxigênio no escuro, enquanto a PPB foi quase 1,5 vezes maior em termos de consumo de carbono inorgânico comparado à produção de oxigênio (Carvalho & Eyre 2012). Essas discrepâncias entre oxigênio e carbono são provavelmente influenciadas por diferenças na fisiologia do fitoplâncton em relação ao metabolismo do oxigênio e do carbono. Vários estudos têm demonstrado que a liberação de carbono pela respiração do fitoplâncton, assim como aquela de macroalgas e de plantas terrestres, é bastante inibida na luz (Xue *et al.* 1996, Zou *et al.* 2007, Tcherkez *et al.* 2008). Em contraste, as taxas de consumo de oxigênio são mais altas na luz do que no escuro (Falkowski *et al.* 1985, Weger *et al.* 1989, Xue *et al.* 1996). Diferenças nas fisiologias do carbono e do oxigênio em algas talvez expliquem parcialmente o caso no qual, apesar de medições feitas com cautela, os resultados obtidos com o método clássico das garrafas clara e escura para o oxigênio foram considerados inadequados para descrever a produção primária bruta de carbono em uma região do oceano (Williams *et al.* 2004).

CONCLUSÃO

Os métodos baseados em isótopos estáveis permitem medições reais da produção primária bruta em ecossistemas aquáticos, em comparação aos métodos clássicos, que não permitem tais medições. Portanto, para o conhecimento correto da produção primária bruta, os métodos utilizando isótopos estáveis são claramente superiores. O fato de vários estudos recentes empregarem estes métodos (Robinson *et al.* 2009, Eisenstadt *et al.* 2010, Quay *et al.* 2010, Sarma *et al.* 2010, Barkan & Luz 2011, Juraneck & Quay 2013) demonstra que há grande interesse em sua aplicação. Para muitos pesquisadores, no entanto, é questionável a vantagem de se aplicarem métodos baseados em isótopos estáveis em detrimento dos métodos clássicos.

A decisão depende de uma análise de custo-benefício. Hoje em dia, as análises de isótopos estáveis na água, que são a base dos métodos apresentados aqui, são relativamente custosas, assim como os equipamentos usados para essas medições. Além disso, tais equipamentos exigem longo treino e experiência para as medições serem feitas de forma correta. Dessa forma, no presente momento, os métodos baseados em isótopos estáveis são bem menos acessíveis que os métodos clássicos, em particular para o oxigênio dissolvido, em que as medições são feitas por titulação (método de Winkler) ou com eletrodos, ambos com custo irrisório no caso de medições numerosas.

Portanto, no momento atual, os métodos baseados em isótopos estáveis têm predominantemente o papel de testar o conhecimento corrente e de desbravar novas informações. Se as medições da produção primária bruta em um determinado estudo servem apenas como suporte para a investigação de outros processos, como não é raro em muitos estudos, é provável que a maioria dos pesquisadores opte por utilizar os métodos consagrados e de baixo custo.

Espera-se que o interesse nos métodos baseados em isótopos estáveis para a quantificação da produção primária bruta aumente em direta proporção ao desenvolvimento da tecnologia da medição de isótopos estáveis, o que deve tornar essas medições mais baratas e simples.

REFERÊNCIAS

BARBER, R.T. & HILTING, A.K. 2002. History of the study of plankton productivity. Pp. 16 - 43. *In*: P.J.L.B. Williams, D.N. Thomas & C.S. Reynolds (eds.). *Phytoplankton productivity -*

Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems. Blackwell Science, Oxford, Inglaterra, 381p.

BARKAN, E. & LUZ, B. 2011. The relationships among the three stable isotopes of oxygen in air, seawater and marine photosynthesis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 2367-2369. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.5125>.

BEER, C.; REICHSTEIN, M.; TOMELLERI, E.; CIAIS, P.; JUNG, M.; CARVALHAIS, N.; RÖDENBECK, C.; ALTAFF, M.A.; BALDOCHI, D.; BONAN, G.B.; BONDEAU, A.; CESCATTI, A.; LASSLOP, G.; LINDROTH, A.; LOMAS, M.; LUYSSAERT, S.; MARGOLIS, H.; OLESON, K.W.; ROUPSARD, O.; VEENENDAAL, E.; VIOVY, N.; WILLIAMS, C.; WOODWARD, F.I. & PAPAIE, D. 2010. Terrestrial gross carbon dioxide uptake: Global distribution and covariation with climate. *Science*, 329: 834-838. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1184984>.

BEHRENFELD, M.J.; ESAIAS, W.E. & TURPIE, K.R. 2002. Assessment of primary production at the global scale. Pp. 156 - 186. *In*: P.J.L.B. Williams, D.N. Thomas & C.S. Reynolds (eds.). *Phytoplankton productivity - Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems.* Blackwell Science, Oxford, Inglaterra, 381p.

BENDER, M.; GRANDE, K.; JOHNSON, K.; MARRA, J.; WILLIAMS, P.J.L.B.; SIEBURTH, J.; PILSON, M.; LANGDON, C.; HITCHCOCK, G.; ORCHADO, J.; ILUNT, C.; DONAGHAY, P. & HEINEMANN, K. 1987. A comparison of four methods for determining planktonic community production. *Limnology and Oceanography*, 32: 1085-1098.

BENDER, M.; ORCHADO, J.; DICKSON, M.-L.; BARBER, R. & LINDLEY, S. 1999. In vitro O₂ fluxes compared with ¹⁴C production and other rate terms during the JGOFS Equatorial Pacific experiment. *Deep Sea Research*, 46: 637-654.

BENDER, M.L.; DICKSON, M.L. & ORCHADO, J. 2000. Net and gross production in the Ross Sea as determined by incubation experiments and dissolved O₂ studies. *Deep Sea Research*, 47: 3141-3158.

BROWN, A.H. & WEIS, D. 1959. Relation between respiration and photosynthesis in the green alga, *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Physiology*, 34: 224-234.

CARVALHO, M.C. & EYRE, B.D. 2012. Measurement of planktonic CO₂ respiration in the light. *Limnology and Oceanography: Methods*, 10: 167-178. <http://dx.doi.org/10.4319/lom.2012.10.167>.

CARVALHO, M.C.; HAYASHIZAKI, K. & OGAWA, H. 2009. Short-term measurement of carbon stable isotope discrimination in photosynthesis and respiration by aquatic macrophytes, with marine macroalgal examples. *Journal of Phycology*, 45: 761-770. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00685>.

CHAPRA, S.C. 1997. *Surface water-quality modeling.* McGraw-Hill, New York, NY. 844p.

CHAVEZ, F.P.; MESSIÉ, M. & PENNINGTON, J.T. 2011. Marine primary production in relation to climate variability and

- change. *Annual Review of Marine Science*, 3: 227-260. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163917>.
- DEL GIORGIO, P.A.; COLE, J.J. & CIMBLERIS, A. 1997. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature*, 385: 148-151. <http://dx.doi.org/10.1038/385148a0>.
- DEL GIORGIO, P.A. & DUARTE, C.M. 2002. Respiration in the open ocean. *Nature*, 420: 379-384. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01165>.
- DUARTE, C.M.; REGAUDIE-DE-GIOUX, A.; ARRIETA, J. M.; DELGADO-HUERTAS, A. & AGUSTI, S. 2013. The oligotrophic Ocean is heterotrophic. *Annual Review of Marine Science*, 5: 551-569. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172337>.
- DUARTE, C.M. & AGUSTÍ, S. 1998. The CO₂ balance of unproductive aquatic ecosystems. *Science*, 281: 234-236. <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5374.234>.
- DUARTE, C.M.; AGUSTÍ, S.; DEL GIORGIO, P.A. & COLE, J.J. 1999. Response to: Regional carbon imbalances in the oceans. *Science*, 284: 1735b. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5421.1735b>.
- DUCKLOW, H.W. & DONEY, S.C. 2013. What is the metabolic state of the oligotrophic ocean? A debate. *Annual Review of Marine Science*, 5: 525-533. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172331>.
- EISENSTADT, D.; BARKAN, E.; LUZ, B. & KAPLAN, A. 2010. Enrichment of oxygen heavy isotopes during photosynthesis in phytoplankton. *Photosynthesis Research*, 103: 97-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-009-9518-z>.
- FALKOWSKI, P.G.; DUBINSKY, Z. & SANTOSTEFANO, G. 1985. Light-enhanced dark respiration in phytoplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol*, 22: 2830-2833.
- FALKOWSKI, P.G. & RAVEN, J.A. 2007. *Aquatic photosynthesis*. 2nd edition, Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 484p.
- GEIDER, R.J. & OSBORNE, B.A. 1992. *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall, New York, NY. 255 p.
- GRANDE, K.D.; MARRA, J.; LANGDON, C.; HEINEMANN, K. & BENDER, M.L. 1989. Rates of respiration in the light measured in marine phytoplankton using a ¹⁸O isotope-labelling technique. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129: 95-120.
- GROOT, P.A. 2004. *Handbook of stable isotope analytical techniques*. Elsevier, Amsterdam, Holanda, 224p.
- HITCHCOCK, G.L.; VARGO, G.A. & DICKSON, M.L. 2000. Plankton community composition, production, and respiration in relation to dissolved inorganic carbon on the West Florida Shelf April 1996. *Journal of Geophysical Research*, 105: 6579-6589.
- JURANEK, L.W. & QUAY, P.D. 2005. In vitro and in situ gross primary and net community production in the North Pacific Subtropical Gyre using labeled and natural abundance isotopes of dissolved O₂. *Global Biogeochemical Cycles*, 19: GB3009. <http://dx.doi.org/10.1029/2004GB002384>.
- JURANEK, L.W. & QUAY, P.D. 2013. Using triple isotopes of dissolved oxygen to evaluate global marine productivity. *Annual Review of Marine Science*, 5: 503-524. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172430>.
- KAISER, J. 2011. Technical note: Consistent calculation of aquatic gross production from oxygen triple isotope measurements. *Biogeosciences*, 8: 1793-1811. <http://dx.doi.org/10.5194/bg-8-1793-2011>.
- KIDDON, J.; BENDER, M.L. & MARRA, J. 1995. Production and respiration in the 1989 North Atlantic spring bloom: an analysis of irradiance-dependent changes. *Deep Sea Research*, 42: 553-576.
- LUZ, B. & BARKAN, E. 2000. Assessment of oceanic productivity with the triple-isotope composition of dissolved oxygen. *Science*, 288: 2028-2031. <http://dx.doi.org/10.1126/science.288.5473.2028>.
- LUZ, B. & BARKAN, E. 2009. Net and gross oxygen production from O₂/Ar, ¹⁷O/¹⁶O and ¹⁸O/¹⁶O ratios. *Aquatic Microbial Ecology*, 56: 133-145. <http://dx.doi.org/10.3354/ame01296>.
- LUZ, B. & BARKAN, E. 2011. Proper estimation of marine gross O₂ production with ¹⁷O/¹⁶O and ¹⁸O/¹⁶O ratios of dissolved O₂. *Geophysical Research Letters*, 38: L19606. <http://dx.doi.org/10.1029/2011GL049138>.
- LUZ, B.; BARKAN, E.; SAGI, Y. & YACOBI, Y.Z. 2002. Evaluation of community respiratory mechanisms with oxygen isotopes: A case study in Lake Kinneret. *Limnology and Oceanography*, 47: 33-42.
- MARRA, J. 2009. Net and gross productivity: weighing in with ¹⁴C. *Aquatic Microbial Ecology*, 56: 123-131. <http://dx.doi.org/10.3354/ame01306>.
- ODUM, H.T. 1956. Primary production in flowing waters. *Limnology and Oceanography*, 1: 102-117.
- OSTROM, N.E.; CARRICK, H.J.; TWISS, M.R. & PIWINSKI, L. 2005. Evaluation of primary production in Lake Erie by multiple proxies. *Oecologia*, 144: 115-124. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-005-0032-5>.
- PRINGAULT, O.; TASSAS, V. & ROCHELLE-NEWALL, E. 2007. Consequences of respiration in the light on the determination of production in pelagic systems. *Biogeosciences*, 4: 105-114.
- PRINGAULT, O.; TESSON, S. & ROCHELLE-NEWALL, E. 2009. Respiration in the light and bacterio-phytoplankton coupling in a coastal environment. *Microbial Ecology*, 57: 321-334. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9422-7>.
- PROKOPENKO, M.G.; PAULUIS, O.M.; GRANGER, J. & YEUNG, L.Y. 2011. Exact evaluation of gross photosynthetic production from the oxygen triple-isotope composition of O₂:

- Implications for the net-to-gross primary production ratios. *Geophysical Research Letters*, 38: L14603. <http://dx.doi.org/10.1029/2011GL047652>.
- QUAY, P.D.; PEACOCK, C.; BJÖRKMAN, K. & KARL, D.M. 2010. Measuring primary production rates in the ocean: Enigmatic results between incubation and non-incubation methods at Station ALOHA. *Global Biogeochemical Cycles*, 24: GB3014. <http://dx.doi.org/10.1029/2009GB003665>.
- QUIÑONES-RIVERA, Z.J.; WISSEL, B. & JUSTIC, D. 2009. Development of productivity models for the northern Gulf of Mexico based on oxygen concentrations and stable isotopes. *Estuaries and Coasts*, 32: 436-446. <http://dx.doi.org/10.1007/s12237-009-9144-1>.
- QUIÑONES-RIVERA, Z.J.; WISSEL, B.; JUSTIC, D. & FRY, B. 2007. Partitioning oxygen sources and sinks in a stratified, eutrophic coastal ecosystem using stable oxygen isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, 342: 69-83.
- REUER, M.K.; BARNETT, B.A.; BENDER, M.L.; FALKOWSKI, P.G. & HENDRICKS, M.B. 2007. New estimates of Southern Ocean biological production rates from O₂/Ar ratios and the triple isotope composition of O₂. *Deep Sea Research*, 54: 951-974. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2007.02.007>.
- ROBINSON, C.; TILSTONE, G.H.; REES, A.P.; SMYTH, T.J.; FISHWICK, J.R.; TARRAN, G.A.; LUZ, B.; BARKAN, E. & DAVID, E. 2009. Comparison of *in vitro* and *in situ* plankton production determinations. *Aquatic Microbial Ecology*, 54: 13-34. DOI: 10.3354/ame01250.
- RYTHER, J.H. 1956. The measurement of primary production. *Limnology & Oceanography*, 1: 72-84.
- SADRO, S.; NELSON, C.E. & MELACK, J.M. 2011. Linking diel patterns in community respiration to bacterioplankton in an oligotrophic high-elevation lake. *Limnology & Oceanography*, 56: 540-550. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.2011.56.2.0540>.
- SARMA, V.V.S.S.; ABE, O.; HASHIMOTO, S.; HINUMA, A. & SAINO, T. 2005. Seasonal variations in triple oxygen isotopes and gross oxygen production in the Sagami Bay, central Japan. *Limnology and Oceanography*, 50: 544-552.
- SARMA, V.V.S.S.; ABE, O.; HONDA, M. & SAINO, T. 2010. Estimating of gas transfer velocity using triple isotopes of dissolved oxygen. *Journal of Oceanography*, 66: 505-512.
- SARMIENTO, J.L. & GRUBER, N. 2006. *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 503p.
- SONDERGAARD, M. 2002. A biography of Einer Steemann Nielsen: the Man and his Science. Pp. 1 - 15. In: P.J.L.B. Williams, D.N. Thomas & C.S. Reynolds (eds.). *Phytoplankton productivity - Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Blackwell Science, Oxford, Inglaterra, 381 p.
- STAEHR, P.A.; BADE, D.; VAN DE BOGERT, M.C.; KOCH, G.R.; WILLIAMSON, C.; HANSON, P.; COLE, J.J. & KRATZ, T. 2010. Lake metabolism and the diel oxygen technique: State of the science. *Limnology and Oceanography: Methods*, 8: 628-644. <http://dx.doi.org/10.4319/lom.2010.8.628>.
- STAEHR, P.A.; TESTA, J.M.; KEMP, W.M.; COLE, J.J.; SAND-JENSEN, K. & SMITH, S.V. 2012. The metabolism of aquatic ecosystems: history, applications, and future challenges. *Aquatic Sciences*, 74: 15-29. <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-011-0199-2>.
- TCHERKEZ, G.; BLIGNY, R.; GOUT, E.; MAHE, A.; HODGES, M. & CORNIC, G. 2008. Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO₂ and O₂ conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 797-802. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708947105>.
- WEGER, H.G.; HERZIG, R.; FALKOWSKI, P.G. & TURPIN, D.H. 1989. Respiratory losses in the light in a marine diatom: measurements by short-term mass spectrometry. *Limnology and Oceanography*, 34: 1153-1161.
- WILLIAMS, P.J.L.B. 1998. The balance of plankton respiration and photosynthesis in the open oceans. *Nature*, 394: 55-57. <http://dx.doi.org/10.1038/27878>.
- WILLIAMS, P.J.L.B.; QUAY, P. D.; WETS, T. K. & BEHRENFELD, M. J. 2013. The oligotrophic ocean is autotrophic. *Annual Review of Marine Science*, 5: 535-549. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172335>.
- WILLIAMS, P.J.L.B. & BOWERS, D. 1999. Regional carbon imbalances in the oceans. *Science*, 284: 1735b. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5421.1735b>.
- WILLIAMS, P.J.L.B.; MORRIS, P.J. & KARL, D.M. 2004. Net community production and metabolic balance at the oligotrophic ocean site, station ALOHA. *Deep Sea Research*, 51: 1563-1578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2004.07.001>.
- XUE, X.; GAUTHIER, D.A.; TURPIN, D.H. & WEGER, H.G. 1996. Interactions between photosynthesis and respiration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 112: 1005-1014.
- YACOBI, Y.Z.; PEREL, N.; BARKAN, E. & LUZ, B. 2007. Unexpected underestimation of primary productivity by ¹⁸O and ¹⁴C methods in a lake: Implications for slow diffusion of isotope tracers in and out of cells. *Limnology and Oceanography*, 52: 329-337.
- ZOU, D.; GAO, K.; XIA, J.; XU, Z.; ZHANG, X. & LIU, S. 2007. Responses of dark respiration in the light to desiccation and temperature in the intertidal macroalga, *Ulva lactuca* (Chlorophyta) during emersion. *Phycologia*, 46: 363-370.

APÊNDICE A – CONCEITOS RELEVANTES SOBRE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Os elementos químicos em geral têm mais de um isótopo, que podem ser estáveis ou radioativos. Os isótopos estáveis de carbono são ^{12}C e ^{13}C , e os do oxigênio ^{16}O , ^{17}O e ^{18}O . Em média, 98,9% do carbono nas substâncias no planeta Terra é ^{12}C , e praticamente todo o restante é ^{13}C (há uma parcela ínfima de ^{14}C). No caso do oxigênio, 99,76% é ^{16}O , 0,20% ^{18}O e 0,04% ^{17}O . Há variações nessas proporções médias, mas são muito pequenas. Quando se estudam essas variações, é conveniente haver uma notação que facilite a visualização das pequenas diferenças em cada caso, analogamente ao que se faz, por exemplo, com o pH. A notação normalmente aplicada para indicar a proporção de isótopos estáveis numa substância é a notação delta, definida assim:

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{material}} : R_{\text{referência}}) \times 1000\text{‰} \quad (1)$$

Em que R é a proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no material estudado (material) e numa substância de referência, que no caso do carbono é o belemnite de *Pee Dee*, cujo $R = 0,0112372$ (Fry 2003). Para o oxigênio, o símbolo é $\delta^{18}\text{O}$ ou $\delta^{17}\text{O}$, ambos em relação ao ^{16}O , dependendo do isótopo pesado (^{18}O ou ^{17}O). A substância de referência para o oxigênio é SMOW (*Standard Mean Ocean Water*; Água Oceânica Média Padrão), com $R = 0,045004$ (Fry 2003).

Uma propriedade importante dos isótopos estáveis é o fracionamento isotópico. Existem três tipos de fracionamento: o fracionamento de equilíbrio, o fracionamento cinético e o fracionamento independente de massa (Luz & Barkan 2000, Zeebe & Wolf-Gladrow 2001). O fracionamento de equilíbrio consiste na distribuição desigual dos isótopos estáveis nos reagentes e produtos de uma reação quando ela atinge o equilíbrio químico. O fracionamento cinético consiste em taxas diferentes de reação para os diferentes isótopos de um mesmo elemento numa mesma reação química. O fracionamento independente de massa é anômalo e não segue as regras dos outros dois tipos. Em incubações em sistemas fechados com o propósito da medição da produção primária, que duram algumas horas, apenas o fracionamento cinético é importante. Em medições em sistemas abertos, que cobrem escalas temporais medidas em semanas, os fracionamentos de equilíbrio e independente de massa são mais importantes.

APÊNDICE B – OBTENDO EQ. 8 A PARTIR DAS EQS. 6 E 7

$$F + I = R + E \quad (6)$$

$$F\Delta_f + I\Delta_{ar} = R\Delta_r + E\Delta_{\text{água}} \quad (7)$$

$$\Delta_r = \Delta_{\text{água}} \quad (\text{Ver texto para justificativa})$$

Eliminando-se r da equação 7:

$$F\Delta_f + I\Delta_{ar} = R\Delta_r + E\Delta_r = \Delta_r(R + E)$$

Eliminando-se E e R , usando Eq. 6:

$$F\Delta_f + I\Delta_{ar} = \Delta_r(F + I)$$

Redistribuindo-se os termos:

$$F(\Delta_f - \Delta_r) = I(\Delta_r - \Delta_{\text{água}})$$

Finalmente, colocando-se tudo como função de F , tem-se a equação 8:

$$F = I(\Delta_{\text{água}} - \Delta_{ar}) / (\Delta_r - \Delta_{\text{água}}) \quad (8)$$

Submetido em 21/04/2012

Aceito em 17/12/2012