

## ACESSO LIVRE

## EDITADO POR

Julietta Hermes,  
Sul Africano Ambiental  
Rede de Observação (SAEON), Sul  
África

## REVISADOS PELA

Isabel Menor,  
Universidade de Minnesota Duluth,  
Estados Unidos  
Morimaru Kida,  
Universidade de Kobe, Japão

## \*CORRESPONDÊNCIA

Elisa Halewood  
wallner@ucsb.edu  
Craig A. Carlson  
craig\_carlson@ucsb.edu

Este artigo foi submetido a  
Ocean Observation,  
uma seção da revista  
Fronteiras em Ciências Marinhas

## SEÇÃO DE ESPECIALIDADE

RECEBIDO 04 de outubro de 2022

ACEITO 23 de novembro de 2022

PUBLICADO 12 de dezembro de 2022

## CITAÇÃO

Halewood E, Opalk K, Custals L, Carey M, Hansell DA  
e Carlson CA (2022) Determinação de carbono orgânico  
dissolvido e nitrogênio total dissolvido em água do mar  
usando Frente de Análise de Combustão de Alta  
Temperatura. *Mar. Sci.* 9:1061646. doi: 10.3389/  
fmars.2022.1061646

## DIREITO AUTORAL

© 2022 Halewood, Opalk, Custals,  
Carey, Hansell e Carlson. Este é um artigo  
de acesso aberto distribuído sob os termos  
da [Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](#). O uso, distribuição ou reprodução  
em outros fóruns é permitido, desde que  
o(s) autor(es) original(is) e o(s)  
detentor(es) dos direitos autorais sejam  
creditados e que a publicação original  
nesta revista seja citada, de acordo com  
a prática acadêmica aceita. Nenhum uso,  
distribuição ou reprodução é  
permitido que não esteja de acordo  
com  
estes termos.

# Determinação de carbono orgânico dissolvido e nitrogênio total dissolvido na água do mar usando alta temperatura

Análise de Combustão

Elisa Halewood<sup>1</sup> \*, Keri Opalk<sup>1</sup> , Lillian Custals Maverick<sup>2</sup> ,  
Carey<sup>1</sup> , Dennis A. Hansell<sup>2</sup> e Craig A. Carlson<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Marinhas, Departamento de Ecologia, Evolução e Biologia Marinha, Universidade de  
Califórnia Santa Bárbara, Santa Bárbara, CA, Estados Unidos, <sup>2</sup>Departamento de Ciências Oceânicas,  
Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science, University of Miami, Miami, FL, Estados Unidos

Este documento descreve as melhores práticas para análise de matéria orgânica dissolvida (carbono orgânico dissolvido e nitrogênio total dissolvido) em amostras de água do mar. Estão incluídos SOPs para coleta e armazenamento de amostras, detalhes para análise de laboratório usando análise de combustão de alta temperatura em analisadores Shimadzu TOC e sugestões para melhores práticas em controle de qualidade e garantia de qualidade. Embora escrito especificamente para as práticas oceanográficas da comunidade GO-SHIP, muitos aspectos da coleta e processamento de amostras são relevantes para a determinação de DOM em regimes oceânicos e este documento visa fornecer uma metodologia atualizada para a comunidade marinha em geral.

## PALAVRAS-CHAVE

carbono orgânico dissolvido (DOC), nitrogênio total dissolvido (TDN), matéria orgânica dissolvida, análise de combustão em alta temperatura, GO-SHIP, melhores práticas, metodologia

## 1. Introdução

A matéria orgânica dissolvida (DOM), operacionalmente definida como matéria orgânica que passa por um filtro submicrométrico, é uma mistura complexa de moléculas orgânicas composta de carbono, hidrogênio e oxigênio, bem como nitrogênio, fósforo e enxofre. Resolver a dinâmica de cada fração DOM ajuda a elucidar as maiores questões do ciclo biogeoquímico DOM. A  $\sim 662 \pm 32$  Pg (1015 g) C, o carbono orgânico dissolvido oceânico (DOC) é um dos maiores reservatórios biorreativos de carbono no oceano (Williams e Druffel, 1987; Hansell e Carlson, 1998; Hansell et al., 2009), e é comparável à massa de C inorgânico na atmosfera (MacKenzie, 1981; Eppley et al., 1987; Fasham et al., 2001).

Perturbações nas fontes ou sumidouros do pool de DOC oceânico impactam o equilíbrio entre o CO<sub>2</sub> oceânico e atmosférico, talvez tornando-o climaticamente significativo (Ridgwell e Arndt, 2014). Além disso, a maior parte do estoque permanente de nitrogênio fixo na superfície do oceano (<200 m) está na forma de nitrogênio orgânico dissolvido (DON) (Bronk, 2002; Aluwihare e Meador, 2008; Letscher et al., 2013). Como tal, é importante compreender os processos que controlam a distribuição, inventários e fluxos de DOC e DON no oceano global.

Antes dos anos 2000, havia falta de dados de alta qualidade para descrever e quantificar adequadamente a DOM no oceano. Na década de 1980, a controvérsia sobre os métodos de análise de DOC e nitrogênio total dissolvido (TDN) na água do mar (Williams e Druffel, 1988) resultou em esforços da comunidade de geoquímica marinha para melhorar a precisão da medição e estabelecer a intercomparabilidade dos conjuntos de dados (Sharp, 1993; Sharp et al., 1995; Sharp et al., 2002a; Sharp et al., 2002b), procedimentos em branco adequados (Benner e Strom, 1993) e métodos que usam materiais de referência (Hansell, 2005). O método de Combustão de Alta Temperatura (HTC) usando instrumentos comerciais, como o Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC) Shimadzu, agora é comum para medir DOC e TDN na água do mar. Os avanços na habilidade analítica e o aumento da frequência de amostragem global do oceano (através de sites de séries temporais e em conjunto com programas de escala de bacia, como o Programa de Investigação Hidrográfica Baseado em Navios Oceânicos Globais dos EUA (US GO-SHIP)) melhoraram muito a resolução temporal e espacial da variabilidade DOC (Hansell et al., 2009; Carlson et al., 2010; Hansell et al., 2021). Além disso, as contribuições do DOM para a ecologia e biogeoquímica da coluna de água do oceano foram iluminadas (Baetge et al., 2021; Liu et al., 2022).

Este artigo descreve procedimentos para coleta e medição de DOC e NDT (o último usado em conjunto com medições de nitrato, nitrito e amônia para derivar a concentração de DON) em amostras discretas de água do mar. É adequado para o ensaio de níveis oceânicos de DOC (tipicamente <80  $\mu\text{mol C kg}^{-1}$ ) e nitrogênio total dissolvido (<40  $\mu\text{mol N kg}^{-1}$ ). Ele apresenta as melhores práticas para alcançar uma determinação aprimorada usando o método HTC seguindo a abordagem de Carlson et al. (2010), que tem sido usado em cruzeiros US GO-SHIP desde 2003. A abordagem básica permanece a mesma, mas os analisadores foram otimizados ao longo dos anos. Os instrumentos discutidos e os procedimentos descritos são os específicos dos métodos empregados no Laboratório Hansell da Escola Rosenstiel de Ciências Marinhas e Atmosféricas da Universidade de Miami e do Laboratório Carlson da Universidade da Califórnia em Santa Bárbara. Este documento baseia-se nas diretrizes existentes para análise de DOC na água do mar (Tappin e Nimmo, 2019) e procura fornecer atualizações detalhadas e protocolos passo a passo sobre coleta e armazenamento de amostras, otimizando os sistemas Shimadzu TOC para alto rendimento de amostras de água do mar e qualidade práticas de avaliação/controle de qualidade (QA/QC) usando calibração e materiais de referência. Além disso, apresentamos

procedimentos metodológicos para análise NDT acoplada usando sistemas Shimadzu TOC. Optamos por destacar os Instrumentos Científicos Shimadzu pela facilidade de uso de seus instrumentos de TOC disponíveis no mercado e seu excelente limite de detecção, mas instrumentos de outros fabricantes com capacidades de detecção equivalentes ou máquinas personalizadas também podem ser apropriados. Uma versão anterior deste manuscrito (Halewood et al., 2022) foi publicada como parte da coleção GO-SHIP Repeat Hydrography Practices. Esta versão é aplicável a um público marinho mais amplo.

## 2 Coleta e armazenamento de amostras

Técnicas de amostragem e manuseio adequados são essenciais para fornecer dados de alta qualidade. As águas oceânicas abertas contêm concentrações relativamente baixas de DOC (~35-80  $\mu\text{mol C kg}^{-1}$ , Hansell et al., 2009) em comparação com o carbono inorgânico dissolvido (DIC) (~1900-2200  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e são facilmente contaminadas por manuseio inadequado, aparelhos limpos inadequadamente, exposição atmosférica inadvertida a contaminantes voláteis ou condições inadequadas de armazenamento. Os métodos aqui descritos visam minimizar esses fontes de erro.

### 2.1 Garrafas de amostra

Recomenda-se que as amostras sejam filtradas diretamente do frasco de coleta (isto é, frasco Niskin) através de um filtro em linha (veja abaixo) e em um frasco de amostra pré-limpo. Para minimizar o manuseio, recomendamos frascos de vidro de 40 mL pré-combustíveis que se encaixem no amostrador automático Shimadzu TOC. Esses frascos são feitos de vidro borossilicato Tipo I quimicamente inerte. Embora possam ser adquiridos certificados como limpos (atendendo aos requisitos da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) para o teste de contaminantes ambientais potencialmente nocivos em amostras de água ou solo e análise de TOC), descobrimos que não são suficientemente limpos para medições de DOC oceânicas de baixa concentração. Preparamos os frascos internamente, conforme abaixo, para que estejam limpos e livres de substâncias que possam influenciar a análise. Se o vidro for logisticamente desafiador, as amostras também podem ser coletadas em frascos de polietileno de alta densidade (HDPE) ou policarbonato (PC) lavados com ácido. Testes mostraram que a concentração de DOC medida em frascos de vidro, PC e HDPE são comparáveis na resolução  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Apêndice Suplementar A). Os recipientes de amostra de vidro e plástico são reutilizáveis após a limpeza adequada. Antes do primeiro uso, ou entre os usos, os frascos de HDPE ou PC devem ser embebidos em ácido clorídrico 1 M (HCl Certified ACS Plus grade, consulte o Apêndice B), enxaguados com água de baixo TOC (UV-Nanopure™ ou UV-MilliQ® gerado e doravante referido como "água ultrapura/UW") e secar completamente ao ar antes de tampar. Os frascos de vidro são mais fáceis de preparar e garantir que estejam limpos. Estes são esvaziados, enxaguados 3x com UW, secos e aquecidos a 450°C por 1

4 horas para remover os orgânicos (a temperatura máxima de trabalho recomendada pelo fabricante para este tipo de vidro borossilicato é de 500°C.) Recomenda-se o uso de septos ou tampas de silicone revestidos com Politetrafluoretileno (PTFE) para os frascos de vidro e recomenda-se que sejam embebidos em HCl 1 M, enxaguado com água ultrapura e seco entre os usos. Consulte o [material suplementar](#) para obter os procedimentos de limpeza detalhados (SOP1) e os equipamentos sugeridos ([Apêndice B](#)).

## 2.2 Filtros

DOM é definido operacionalmente como a fração de matéria orgânica total que passa por um filtro submicrométrico (ou seja, 0,22 - 0,7 mm). Em Na prática, os oceanógrafos geralmente usam filtros Whatman® GF/F (tamanho nominal de poro 0,7 mm) como o limite entre as frações de matéria orgânica dissolvida e particulada ([Knap et al., 1996](#)). Esses filtros de fibra de vidro de borossilicato são mais comumente usados para medições em massa de DOC e TDN ([Carlson et al., 1998](#)), pois podem ser facilmente preparados por pré-combustão e a taxa de fluxo através dos filtros é ideal para amostragem rápida em linha. Filtros GF-75 (tamanho nominal de poro de 0,3 mm, Advantec MFS, EUA) também são apropriados, pois podem ser queimados e podem ser preferidos ao medir simultaneamente subfrações de DOM (como aminoácidos) onde a exclusão máxima de partículas do pool dissolvido é desejado.

Para concentrações de matéria orgânica dissolvida a granel, não resolvemos diferenças entre o uso de GF-75 e GF/F. O GF-75

e/ou filtros GF/F são preparados por combustão a 450°C por 4 horas em embalagens de alumínio. Não ultrapassamos 450°C porque a matriz do filtro pode ficar alterada em temperaturas mais altas. Depois que os pacotes de filtro são resfriados, o pacote de folha contendo os filtros é selado em sacos plásticos secundários até o uso. É aconselhável embalar apenas os filtros necessários para um único molde em cada pacote de alumínio para evitar a longa exposição de filtros queimados a contaminantes orgânicos voláteis transportados pelo ar. Em preparação para a amostragem, um filtro é colocado em um cartucho de filtro de policarbonato de 47 mm pré-limpo. A filtração por gravidade é sempre recomendada para evitar a ruptura das células e o rasgo dos filtros. Consulte o [SOP1](#) e [SOP2 suplementares](#) para obter detalhes sobre a preparação do filtro e a limpeza do cartucho em linha e o [Apêndice B](#) para obter informações relevantes sobre o produto.

## 2.3 Procedimento de amostragem de Niskin

É importante selecionar um espaço de trabalho DOM-limpo no laboratório de bordo (ou seja, bem ventilado e livre de compostos orgânicos voláteis, fixadores orgânicos, tinta fresca, marcadores permanentes, fumaça, etc.) e manter esta área limpa para armazenamento, limpando e preparando equipamentos de amostragem diariamente.

Cubra a bancada com forro absorvente e substitua com frequência. O equipamento de amostragem (por exemplo, porta-filtros, tubos de silicone) deve ser limpo em uma solução ácida diluída (1 M HCl) antes de cada uso ([SOP1 Suplementar](#)). Recomenda-se que pré

etiquetas impressas sejam usadas; alternativamente, a rotulagem com marcadores só deve ser feita quando os frascos estiverem hermeticamente fechados, pois os marcadores permanentes contêm solventes que podem contaminar as amostras.

Luvas devem ser usadas durante a coleta e manuseio de DOM para minimizar a contaminação. Luvas de nitrilo sem pó, polietileno e vinil sem látex são opções seguras, pois apresentam baixa lixiviação orgânica quando expostas à água do mar. Como as amostras DOM podem ser facilmente contaminadas, recomenda-se que a coleta da roseta CTD ocorra o mais rápido possível após a amostragem de gás. Também é recomendado que qualquer amostra da roseta antes da coleta de amostras de DOM use luvas.

Se isso não for possível, todo esforço deve ser feito para não tocar na torneira do frasco de Niskin (ou seja, o caminho do jato de água, do Niskin ao frasco de amostra, deve ser mantido bem limpo). Mais importante ainda, qualquer amostragem anterior ao DOM deve evitar o uso de graxa ou tubulação Tygon®, pois estes são conhecidos por contaminar o DOM no nível  $\gamma$ molar. Se Tygon® for inevitável para outros amostradores, fornecer uma pequena seção de tubo de silicone como adaptador entre o Niskin e o Tygon® é recomendado. A graxa mecânica das operações do navio (por exemplo, lubrificante de fio CTD) nunca deve entrar em contato com a torneira ou válvula de amostragem da garrafa Niskin.

Se uma amostra é ou não filtrada antes da análise depende do objetivo da medição. Se DOC e TDN forem as variáveis de interesse, todas as amostras devem ser filtradas.

No entanto, o manuseio de filtros e aparelhos pode aumentar o potencial de contaminação, portanto, em alguns casos, a filtragem pode ser ignorada ([Mopper e Qian, 2006](#)). Na maioria das águas oligotróficas ou profundidades > 250 m das margens oceânicas, o DOC é o componente dominante do TOC, excedendo o estoque de carbono das partículas orgânicas em várias ordens de magnitude (Cauwet 1978; [Hansell et al., 2012](#)). Em áreas de alta produtividade, uma porção substancial de carbono orgânico na zona eufótica pode estar presente na forma particulada, e muitas dessas partículas podem ser grandes e distribuídas de forma heterogênea em uma amostra, de modo que esses tipos de amostra devem ser filtrados.

O [Apêndice A suplementar \(Figura A2\)](#) apresenta perfis verticais de TOC e DOC em regiões contrastantes como exemplo. Como componentes importantes dos ciclos globais de carbono, a medição precisa de cada fração é crítica para restringir o balanço de massa de carbono em modelos oceânicos. Para consistência ao amostrar em ambientes oligotróficos e eutróficos, a filtragem é recomendada, no mínimo, para todas as amostras  $\gamma$  250 m. Em ambientes oligotróficos, um filtro pode ser reutilizado para várias amostras consecutivas ao redor da roseta para conservar recursos. Recomenda-se filtrar as amostras da maior profundidade para a mais rasa; as concentrações de partículas normalmente aumentarão mais perto da superfície do oceano, o que pode causar o entupimento do filtro ou a ruptura das partículas, exigindo o uso de mais filtros para uma estação. Estudos têm mostrado que DOC

pode servir para locais ativos em filtros GF/F, o que levanta a questão de saber se a filtração através de GF/F remove a matéria orgânica do filtrado DOC ([Turnewitsch et al., 2007](#); [Novak et al., 2018](#)).

Aproximadamente 60 mL de amostra são passados por um novo filtro durante o procedimento de lavagem e enxágue do frasco. Os testes após a etapa de enxágue do filtro e da garrafa mostram que nenhuma remoção adicional de carbono orgânico do filtrado DOC pode ser resolvida no nível de  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  (Figura complementar A3). Esses resultados sugerem que a sorção de matéria orgânica dissolvida para filtros GF/F queimados satura os locais ativos em um filtro queimado rapidamente (dentro de ~ 60 mL) e não é uma preocupação de remoção de DOC ao filtrar amostras para análise de DOM em massa.

As amostras devem ser filtradas por gravidade na roseta por meio de um cartucho de filtro em linha que abriga um filtro GF/F queimado e conectado diretamente à torneira Niskin por meio de um tubo de silicone platinizado de limpeza ácida (Cole-Parmer, Apêndice Suplementar B). Este tipo de tubo de silicone curado com platina oferece durabilidade e minimiza lixiviação orgânica em comparação com Tygon®. Enxágue o recipiente de amostra e tampe-o três vezes com água de amostra antes de enchê-lo até três quartos (consulte o SOP2 suplementar para obter instruções passo a passo). É importante coletar volume suficiente para análise e minimizar a área de superfície em relação ao volume do recipiente (mínimo de 15 mL em um frasco de vidro ou 30 mL em um frasco de HDPE para cada analito desejado, DOC ou NDT), além de tomar cuidado para não encher demais o recipiente de amostra. Vale a pena repetir que cuidados devem ser tomados durante a amostragem para evitar quaisquer contaminantes óbvios, como fumaça de cigarro, fumaça de tinta, fumaça excessiva de motor na área de amostragem ou solventes orgânicos nos laboratórios, etc. Equipamento de amostragem (filtros queimados e vidraria em particular) devem ser mantidos cuidadosamente selados até o momento da amostragem para evitar a absorção de contaminantes transportados pelo ar em superfícies limpas. Sempre registre eventos incomuns em relação às amostras; adicione notas que podem ser úteis para explicar os resultados.

### 2.3.1 Exemplo de plano de coleta Para as seções

US GO-SHIP, 24-36 garrafas Niskin (24-36 profundidades em toda a coluna d'água) são amostradas em estações alternadas (ou seja, a amostragem da estação para DOM ocorre em intervalos de aproximadamente 60 milhas náuticas). Para outras campanhas, as decisões de amostragem em relação à resolução horizontal ou vertical dependerão dos objetivos científicos do projeto. Para avaliar o erro de manuseio da amostra, recomenda-se que as amostras replicadas sejam coletadas aleatoriamente de um subconjunto de profundidades ao longo de um perfil hidrográfico. Para as seções US GO-SHIP atuais, a prática padrão é replicar 2 frascos Niskin por 36 frascos fundidos (~6% de replicação no conjunto de amostras).

## 2.4 Preservação e armazenamento de amostras

Muitos instrumentos analíticos DOM não são estáveis o suficiente para realizar análises no mar; portanto, o armazenamento seguro das amostras é essencial. Após a coleta na roseta, as amostras podem ser preservadas e armazenadas para análise posterior em um laboratório em terra usando vários métodos.

### 2.4.1 Armazenamento congelado

As amostras de água do mar coletadas em vidro não devem ser armazenadas em temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$ , pois temperaturas mais frias (por exemplo,  $-40^{\circ}\text{C}$ ) podem resultar na quebra do vidro durante o descongelamento. Se o armazenamento em temperaturas  $< -20^{\circ}\text{C}$  for a única opção disponível, o uso de recipientes de amostragem de plástico (HDPE ou PC) é uma alternativa segura para análises de DOC/TDN em massa. Amostras congeladas que foram acidificadas devem ser armazenadas apenas em vidro, pois o plástico lixiviaria após exposição prolongada ao ácido. Para amostras coletadas em plástico e não acidificadas, é importante congelar o mais rápido possível após a coleta para evitar alterações na matéria orgânica devido à atividade biológica. Ao armazenar amostras congeladas, é imperativo que essas amostras não sejam enchidas demais, pois a água se expandirá com o congelamento. Testes mostraram que um gradiente de salinidade é estabelecido durante o congelamento com salmoura alta/água com alto DOC sendo potencialmente deslocada pelas roscas da tampa se a garrafa estiver cheia demais (Apêndice Suplementar, Figura A4). Essa extrusão resulta em uma concentração de DOM diluída, comprometendo a amostra. Deve-se tomar cuidado para congelar as amostras na posição vertical e verificar se as tampas estão bem fechadas antes do congelamento e armazenamento e novamente antes do envio. Separe as amostras congeladas de qualquer outro material orgânico volátil armazenado para evitar contaminação orgânica volátil no ar.

As amostras congeladas podem ser armazenadas com segurança por períodos de anos (consulte os testes de armazenamento de amostras, Apêndice A suplementar). Antes da análise, as amostras congeladas devem ser completamente descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas. O uso de um dispositivo mecânico, como um misturador de vórtice, é ideal. O misturador deve ser ajustado para uma velocidade alta o suficiente para que um vórtice seja visível e se estenda da superfície da amostra até o fundo do recipiente.

### 2.4.2 Armazenamento de líquidos e acidificados O

transporte de amostras congeladas é caro e muitas vezes não confiável; assim, uma alternativa ao armazenamento congelado é a coleta em frascos de vidro, acidificação e armazenamento na forma líquida. As amostras devem ser acidificadas logo após a coleta, adicionando 2  $\mu\text{l}$  de ácido clorídrico 4 M (ACS ou traço de metal) por 1 mL de amostra. Esta proporção de ácido/amostra deve trazer a amostra para pH 2-3. Verifique periodicamente as amostras para garantir que esse pH baixo seja alcançado. Isso pode ser feito extraindo alguns mL de amostra (usando uma ponteira não estéril e uma pipeta limpa DOC) e usando esse volume para molhar uma tira de pH. Nunca mergulhe uma tira de pH diretamente em uma amostra, pois isso resultará em contaminação. Em pH 2-3, a atividade biológica é interrompida, garantindo um armazenamento seguro, e as espécies inorgânicas de carbono são convertidas em  $\text{CO}_2$  e posteriormente degaseificadas da solução da amostra com aspersão no sistema TOC no momento da análise (a aspersão no momento da coleta da amostra não é recomendado, pois menos manuseio é melhor para prevenir a contaminação). Uma pipeta repetidora com uma ponta limpa com ácido é recomendada para adição de ácido (consulte o SOP2 suplementar para obter detalhes). Recomenda-se preparar um lote de 100 – 500 mL de 4 M HCl usando alta pureza

ácido (certificado ACS Plus, [Apêndice Suplementar B](#)) diluído com água ultrapura e, em seguida, alíquete e sele o HCl 4 M em ampolas de vidro pré-combustível de 1-2 mL. Aconselha-se que uma nova ampola seja empregada para cada nova estação de amostragem e os restos não utilizados descartados para evitar contaminação.

O momento da acidificação dependerá da atividade biológica do sistema ambiental, mas as amostras de oceano aberto permanecem estáveis se acidificadas dentro de uma hora após a coleta. É aconselhável

que as amostras sejam armazenadas em um espaço de laboratório escuro e livre de compostos orgânicos voláteis à temperatura ambiente ou em uma geladeira (4°C) ou câmara ambiental (< 20°C). Nunca use tampas com septos perfurados ao coletar amostras, pois pode ocorrer contaminação da amostra durante o transporte e armazenamento; se forem usados septos, certifique-se sempre de que o revestimento de PTFE esteja voltado para a amostra. Com essas precauções, testes mostram que amostras acidificadas também podem ser armazenadas na ordem de anos. Consulte o [Apêndice Suplementar A, \(Figuras A5-A7\)](#) para obter detalhes. Shimadzu.

O envio de amostras acidificadas em frascos de vidro é uma opção viável, desde que o contêiner de transporte seja bem acolchoado para evitar quebras durante o transporte. Inserções de espuma em caixas de campo de plástico corrugado ou caixas de papelão com divisores de amostras colocadas em um recipiente rígido ou refrigerador funcionam bem. Consulte as informações suplementares (SOP2 e [Apêndice B](#)) para obter as peças. Mais importante ainda, as amostras em plástico ou vidro devem ser bem tampadas e permanecer na vertical para minimizar a contaminação durante o transporte.

### 3 Instrumentação

Existem vários sistemas HTC personalizados e comerciais que foram descritos anteriormente ([Peltzer e Brewer, 1993](#); [Benner e Strom, 1993](#); [Hansell, 1993](#); [Carlson et al., 1994](#); [Sharp et al., 2002a](#); [Hansell e Carlson, 1998](#)); no entanto, descobrimos que o Shimadzu TOC-VCSH e a série TOC-LCSH mais recente são instrumentos HTC de alto rendimento que fornecem faixas, confiabilidade e sensibilidade apropriadas para medições de água do mar.

Assim, enquanto outros instrumentos também podem ser apropriados para análises HTC de água do mar, limitamos nossa discussão aos sistemas Shimadzu TOC-V e TOC-L neste guia de melhores práticas. Esses modelos são acoplados com amostradores automáticos Shimadzu ASI-V/ASI-L, que acomodam frascos de vidro de 40 mL para maior eficiência de processamento. Uma unidade Shimadzu TNM-1/TNM-L Analyzer pode ser acoplada ao instrumento para fornecer análise de TDN. As unidades TNM compartilham o tubo de combustão e o catalisador com a unidade TOC para que a manutenção seja minimizada para a operação adicional. Nesta configuração do sistema, é possível executar análises DOC ou TDN independentes ou análises acopladas (DOC e TDN), pois cada detector funciona de forma independente.

#### 3.1 Análise DOC

O teor de DOC da água do mar é definido como a concentração de carbono remanescente em uma amostra de água do mar após o particulado e

carbono inorgânico foi removido. As concentrações de DOC são determinadas por um método HTC realizado em um Shimadzu TOC modificado, conforme descrito anteriormente por [Carlson et al. \(2010\)](#).

Uma amostra pré-acidificada (filtrada no momento da coleta para remover o POC) é colocada em uma seringa de injeção de 5 mL e aspergida (100 mL/min) por no mínimo 1,5 minutos com gás livre de CO<sub>2</sub>, produzindo uma amostra contendo apenas gás não carbono orgânico purgável. Réplicas (100 µL) da amostra pulverizada resultante são injetadas em um tubo de combustão de quartzo aquecido a 680 – 720°C, onde o carbono orgânico é queimado/oxidado a CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> resultante e o gás de arraste (taxa de fluxo de 168 mL/min) passam pelo desidratador eletrônico interno Shimadzu, um coletor de perclorato de magnésio (quando a análise de nitrogênio não está sendo conduzida), um coletor de haleta de malha de cobre, um filtro de partículas de 0,45 µm, e depois no analisador de gás infravermelho não dispersivo Shimadzu (NDIR). O sinal de CO<sub>2</sub> resulta em um pico de amostra no qual a área do pico é integrada ao software cromatográfico

#### 3.2 Análise de NDT

O teor de NDT da água do mar é definido de forma semelhante como a concentração de nitrogênio combinado remanescente em uma amostra de água do mar após a remoção do nitrogênio particulado. TDN é determinado independentemente através do método de combustão de alta temperatura ([Walsh, 1989](#)) em um Shimadzu TOC modificado com analisador Shimadzu TNM conectado. O gás de arraste é fornecido a uma taxa de fluxo de 168 mL/min e o ozônio (O<sub>3</sub>) é gerado pela unidade TNM a uma taxa de fluxo de 0,5 L/min. Réplicas (100 µL) da amostra filtrada são injetadas no tubo de combustão aquecido a 720°C, onde o TN na amostra é convertido em óxido nítrico (NO). A corrente de gás resultante é então passada através do desidratador eletrônico interno Shimadzu, uma armadilha de haleta de malha de cobre, um filtro de 0,45 µm e para o analisador de quimioluminescência, onde o gás NO seco reage com O<sub>3</sub> para produzir um óxido nitroso excitado. O sinal de fluorescência resultante é detectado pelo detector de quimioluminescência Shimadzu TNM.

A área de pico resultante é integrada ao software cromatográfico Shimadzu. Observe a ausência de um coletor de perclorato de magnésio nesta configuração, pois este coletor remove NO (veja abaixo, Seção 3.1).

#### 3.3 Análise DOC/TDN acoplada

Um método duplo é possível usando o software Shimadzu para fornecer análise DOC e TDN em uma amostra simultaneamente. Uma amostra filtrada é analisada para cada analito conforme detalhado acima, com o forno TOC ajustado para 720°C, a omissão do coletor de água de perclorato de magnésio em linha e cada detector relatando separadamente. As análises acopladas podem afetar a qualidade do pico NDIR; assim, recomenda-se que os analistas

monitore de perto a qualidade da forma de pico da saída NDIR (DOC) no modo de operação de análise dupla.

### 3.3.1 Sistema Shimadzu HTC modificado para otimização de sinal Os usuários devem

primeiro consultar o instrumento do fabricante

manuais para as especificações de inicialização, operação e manutenção.

Para otimizar as amostras de água do mar, as condições operacionais dos analisadores Shimadzu TOC são ligeiramente modificadas do sistema modelo do fabricante.

A serpentina de resfriamento é removida e o headspace do purgador de água pura é reduzido para minimizar o espaço morto do sistema. O purgador de água pura é um reservatório de vidro que acumula vapor de água que se condensa ao sair do tubo de combustão. Este reservatório pode ser usado para determinar o branco do instrumento - se mantido adequadamente, isso pode resultar em brancos equivalentes à análise de injeções de água ultrapura em laboratório. No entanto, não recomendamos esta opção, pois descobrimos que o acúmulo de sedimentos nesta armadilha pode danificar a seringa. Além disso, a amostragem frequente do condensado desse purgador pode alterar o espaço "morto" dentro do sistema, o que pode afetar o formato do pico e a consistência dos resultados ao longo de uma execução analítica. Descobrimos que manter um headspace reduzido no purgador de água pura e remover a bobina de resfriamento resulta em melhor formato de pico. Consulte o [Apêndice Suplementar C](#) para obter detalhes.

A água do mar contém em média ~ 2,3 mmol kg<sup>-1</sup> de carbono inorgânico dissolvido (DIC) na forma de CO<sub>2</sub>, bicarbonato e carbonato. DIC é removido da amostra antes de injetar a água na coluna de combustão acidificando a um pH de 2-3 (4 M HCl, grau ACS) e pulverizando com gás de arraste livre de CO<sub>2</sub> por vários minutos (ou seja, 3 mL de amostra aspergido por 1,5 minutos a uma vazão de 100 mL min<sup>-1</sup>). Após a aspersão, uma alíquota de amostra (50 - 200 µL dependendo da concentração de DOC) é injetada na coluna de combustão. O carbono orgânico é queimado em CO<sub>2</sub> e o gás carreador move o vapor de água resultante, haletos e CO<sub>2</sub> para fora da coluna através de uma série de armadilhas e filtros para purificar o sinal de CO<sub>2</sub>.

O vapor d'água interfere na detecção NDIR e deve ser removido. Depois de passar pela coluna de combustão, o gás de arraste é passado para o desumidificador eletrônico Shimadzu, um resfriador Peltier refrigerado ajustado para 1°C, onde uma fração significativa do vapor de água condensa e é removida do fluxo de gás. Descobrimos que a adição de um coletor de água em linha contendo perclorato de magnésio Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ([Apêndice Suplementar B](#)) ajuda a remover ainda mais o vapor de água, aguça a forma do pico e minimiza os picos de cauda do traço NDIR; assim, melhorando a reprodutibilidade das injeções. Para análises DOC, o coletor de Mg (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> deve ser substituído no mínimo a cada dois dias ou assim que o dessecante parecer saturado (consulte o [Apêndice Suplementar D](#) para obter instruções detalhadas). Observe que a armadilha Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> não deve ser incluída se TDN for

sendo medido simultaneamente como Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> úmido remove NO e, portanto, interfere na análise de NDT.

Os halogênios liberados com a combustão da água do mar também podem interferir na detecção NDIR de CO<sub>2</sub>; portanto, é imperativo remover os halogênios do fluxo de gás pós-combustão. A armadilha de halogênio proprietária da Shimadzu (Nº de peça 630-00992) ou borbulhar o gás através da solução AgCl são meios eficazes de remover halogênios. Uma alternativa econômica é embalar uma armadilha de haleto com lã de Cu ([Apêndice Suplementar B](#)) e conectar em linha logo após a armadilha de Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. A lã Cu mostrará sinais de descoloração após exposição a halogênios; ele deve ser trocado quando a descoloração atingir 2 cm da saída do sifão. Recomenda-se que os coletores de Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e haletos sejam colocados verticalmente para que o fluxo de gás suba pela parte inferior dos coletores. Antes de entrar no NDIR, o gás passa por um filtro de membrana (0,45 µm, [Apêndice Suplementar B](#)) para remover as partículas do gás de arraste. Usando um medidor de fluxo digital, deve-se tomar cuidado para monitorar a taxa de fluxo do gás de arraste antes e depois do coletor de partículas para garantir que não haja redução na taxa de fluxo. Se houver uma queda na vazão de mais de 3 mL min<sup>-1</sup> a partir da entrada na coluna, o filtro deve ser substituído. Recomenda-se que toda vez que a coluna for substituída, a vazão seja verificada nos pontos que vão para a porta de injeção, na base da coluna, antes e depois dos coletores de Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e halogênio e antes e depois do filtro de partículas. Detalhes podem ser encontrados no [Apêndice Suplementar C](#).

### 3.3.2 Gás de arraste

Existem várias opções em relação ao gás de arraste sem CO<sub>2</sub> necessário para operar o sistema HTC, mas é necessária alta qualidade para obter baixos níveis de ruído de fundo no detector. Podem ser usados gases comprimidos como oxigênio ou nitrogênio de pureza ultra alta (UHP 99,995%). Se ar comprimido estiver disponível, um custo Uma opção eficaz é integrar um gerador de gás Parker Balston® TOC no encanamento de gás do sistema HTC. Este sistema utiliza oxidação catalítica e tecnologias de absorção de oscilação de pressão para remover hidrocarbonetos e gerar gás livre de CO<sub>2</sub>. A longo prazo, a opção do gerador de gás é uma alternativa estável e de baixo custo aos cilindros de gás comprimido. O gás livre de CO<sub>2</sub> é usado como gás de arraste e gás de aspersão e deve ser fornecido a uma pressão de 200-300 kPa.

### 3.3.3 Coluna de combustão

A Shimadzu oferece dois tamanhos de colunas, uma coluna de diâmetro pequeno (18 mm ID x 20 mm OD, compatível com TOC-V e TOC-L) e uma coluna de grande diâmetro (27 mm ID x 30 mm OD, TOC-L somente com adaptador especial kit) que pode acomodar mais carga de sal antes de trocar ou recondicionar a coluna. Na nossa

experiência, um sistema analítico devidamente condicionado pode processar aproximadamente 30 – 36 amostras de água do mar por dia analítico (não incluindo brancos, padrões e referências de água do mar) com o diâmetro pequeno e 42-48 amostras de água do mar por dia analítico com a coluna de diâmetro grande. Comparações diretas mostram que qualquer configuração é aceitável para amostras de água do mar ([Apêndices Suplementares, Figura C1](#)). Após 4-5 dias (~ 400-900 injeções de água salgada), com qualquer tipo de coluna, normalmente observamos o acúmulo de sal na coluna, resultando em contrapressão do sistema que se manifesta como uma forma de pico ruim do traço de infravermelho não dispersivo (NDIR) e subsequente má injeção e replicação de referência. Portanto, é recomendável que, no processamento de alto rendimento de amostras de água do mar, o tubo de combustão, o material de embalagem e vários coletores sejam trocados ou limpos semanalmente, conforme descrito abaixo. Em suma, uma coluna individual normalmente pode ser recondicionada 4 vezes, o que equivale a aproximadamente 720 amostras por coluna no total. Consulte o [Apêndice Suplementar D](#) para obter um exemplo de cronograma de manutenção preventiva.

Os tubos de combustão são compostos de vidro de quartzo que podem ser adquiridos diretamente da Shimadzu ou alternativamente, se o pesquisador tiver acesso a uma loja de sopro de vidro ou a um fornecedor preferencial, o quartzo pode ser fabricado usando as dimensões nas informações complementares fornecidas ([Figura C2](#), e [Apêndice B](#) para números de peça associados).

A embalagem da coluna de combustão também foi ligeiramente modificada a partir da orientação do fornecedor, e os detalhes podem ser encontrados no [Apêndice Complementar B](#) e [Figura C2](#):

### 3.4 Configuração de coluna pequena

A coluna pequena é compactada da seguinte forma: Uma camada única de malha de platina (Pt) de 13 x 13 mm é colocada na base da coluna para suportar o leito de grânulos catalisadores de Pt-alumina. Contas de alumina Pt de 2 mm de diâmetro são adicionadas a 120 mm do topo da coluna. Uma camada adicional de gaze de Pt, enrolada frouxamente em esferas de 5 mm, é colocada em uma única camada no topo das esferas de alumina platinizadas. Essas esferas de Pt servem a três propósitos: 1) fornecem uma massa térmica sólida que permite a combustão rápida da amostra; 2) a superfície sólida protege a integridade dos grânulos de alumina subjacentes; assim, preservando a geometria da matriz e evitando a pulverização e os “buracos de minhoca” que se desenvolvem se a amostra for injetada diretamente nos grânulos de alumina Pt; e, 3) as esferas de Pt maiores permitem que o sal penetre mais profundamente no material da matriz da coluna, retardando assim o desenvolvimento de tampões de sal enquanto mantém um bom fluxo de gás por um período de tempo mais longo. Nossa experiência é que a adição de travesseiros de Pt melhora a forma do pico do traço NDIR e a replicação das injeções, além de prolongar a vida útil da coluna ao analisar a água do mar. Nota: não recomendamos o uso de lã de quartzo para

separar as camadas de material de embalagem à medida que se desvitrifica à medida que o sal é carregado na coluna, criando espaços vazios; assim, alterando a geometria do material de enchimento da coluna ao longo de sua vida útil.

### 3.5 Configuração de coluna grande

A coluna grande é empacotada da seguinte forma: Um disco de malha de cerâmica é colocado na base da coluna grande para suportar o leito de grânulos de catalisador de alumina Pt. Os grânulos de Pta-alumina de 5 mm de diâmetro são adicionados a 200 mm do topo da coluna, e os grânulos de alumina platinizada de 2 mm de diâmetro são adicionados no topo dos grânulos de catalisador maiores a um nível de 120 mm do topo da coluna. O catalisador menor é então coberto com esferas de 6-10 Pt conforme descrito acima.

As colunas devem ser removidas e recondicionadas semanalmente ou a qualquer momento em que surgirem dados de baixa qualidade. A coluna se desvitrificará à medida que o sal se infundir na matriz de quartzo, tornando-se “calcária” e frágil após vários ciclos de aquecimento e resfriamento; portanto, deve-se tomar cuidado para inspecionar as colunas em busca de sinais de fraqueza ou rachaduras durante o recondicionamento. O recondicionamento das colunas inclui a remoção das esferas de Pt, catalisador e malha da coluna, lavagem da coluna de quartzo e todo o conteúdo de Pt com água ultrapura para remover o sal, depois a combustão da coluna de quartzo e do conteúdo de Pt a 450°C para secar e, em seguida, reembalar com conteúdo lavado. A malha e as esferas de Pt podem ser reutilizadas por 4 a 6 semanas se forem limpas adequadamente; ou seja, mergulhe em água e agite para remover o acúmulo de sal. O catalisador Pt alumina deve durar aproximadamente 12-16 dias de análise. Sempre deixe a coluna e seu conteúdo esfriar antes de recondicionar ou reembalar as colunas. O [Apêndice D suplementar](#) fornece uma descrição passo a passo do recondicionamento da coluna.

#### 3.5.1 Detectores

De acordo com o manual do usuário Shimadzu, a célula NDIR nas séries TOC-V e L atinge um limite de detecção de 4 mgCL-1 (0,3  $\mu$ mol C L-1), o nível mais alto para o método de oxidação catalítica de combustão. O sistema Shimadzu TNM usa um detector de quimioluminescência para medir o sinal excitado de NO<sub>2</sub> criado pela combinação de gás NO, gerado através do HTC a 720°C, com O<sub>3</sub> dentro do detector. De acordo com o fabricante, o limite de detecção de quimioluminescência para TN é  $\approx$  0,05 mg L-1 (3,57  $\mu$ mol N L-1).

#### 3.5.2 Software O

analisador de TOC inclui software cromatográfico Shimadzu projetado para permitir o controle de todo o sistema por PC; inclui a programação do amostrador automático, geração de curvas de calibração, aquisição e exibição de saída em tempo real, integração de área de pico e sinalizadores de controle de qualidade para dados brutos. área bruta

as integrações podem ser exportadas como um arquivo de texto delimitado por tabulação para processamento adicional e cálculo da concentração de carbono e/ou nitrogênio.

## 4 Procedimentos operacionais

Os procedimentos descritos abaixo são recomendações baseadas no método HTC realizado com um sistema Shimadzu TOC- VCSH ou TOC-LCSH . As operações em outros instrumentos comerciais ou caseiros variam.

Operação e procedimentos diários:

- 1) Preparação e manutenção dos instrumentos; espaços em branco do sistema
- 2) Preparação da curva padrão
- 3) Materiais de referência
- 4) Amostras desconhecidas
- 5) Exportar dados brutos/calcular a concentração da amostra

### 4.1 Preparação do instrumento e manutenção diária; espaços em branco do sistema

A prontidão do sistema é avaliada todos os dias antes da execução das amostras. A linha de base do instrumento deve ficar em 0 mV antes de iniciar, indicando que o ruído elétrico é mínimo e nenhum problema imediato com o NDIR ou gerador de gás é evidente.

O software Shimadzu fornece um "monitor de fundo" geral para indicar a prontidão do instrumento (posição e estabilidade da linha de base, temperaturas do forno e do desumidificador). Se a posição ou as flutuações da linha de base excederem as predefinições, o instrumento indicará automaticamente um estado não pronto.

O branco do sistema é avaliado injetando um volume de água com baixo teor de carbono (LCW) idêntico ao volume usado durante a análise da amostra (100 µL) e medindo a área do pico. Este branco representa o sinal de fundo de CO<sub>2</sub> do sistema (catalisador e tubo de combustão) e deve ser subtraído de cada amostra analisada. Água em branco verdadeira deve ter DOC abaixo do limite de detecção. A Shimadzu recomenda que os espaços em branco sejam

amostrados do coletor interno de água pura para conseguir isso, mas, em nossa experiência, essa operação altera o "volume do espaço morto" dentro do sistema analítico, alterando a forma do pico e afetando o branco da máquina ao longo da execução. Recomenda-se que a água em branco seja gerada usando um sistema comercial de água ultrapura acoplado com kit de oxidação UV (ou seja, sistemas Nanopure™ de resistência de 18,2 MW com cartucho de orgânicos ultra baixos, esterilização UV e filtro de 0,2 µm ou sistemas MilliQ®) . O Laboratório Hansell da Universidade de Miami fornece LCW (0-1 µmol C L<sup>-1</sup>) como parte de seu programa de material de referência de consenso (CRM), e as concentrações internas de LCW podem ser comparadas com isso. A interceptação Y da curva padrão (feita no mesmo LCW) fornece uma

avaliação do teor de C ou NDT no branco da água mais o "branco da máquina".

A água em branco oxidada por UV é gerada diariamente e colocada em garrafas Pyrex® pré-combustadas (500 - 1000 mL). Nos sistemas Shimadzu TOC-V e L, canalizar um tubo de Teflon™ do reservatório em branco para a porta nº 1 na válvula de 8 portas do conjunto seringa/injetor permitirá coletas ilimitadas de amostras do reservatório, o que é necessário para o condicionamento da coluna e numerosas análises em branco ao longo de qualquer execução. Para retirar a amostra do reservatório em branco, atribua uma amostra ao frasco zero na tabela de amostras Shimadzu; esta garrafa pode ser amostrada várias vezes ao longo de uma corrida analítica. Os valores em branco do sistema variam entre os sistemas TOC devido às configurações internas e ao uso da coluna. O [Apêndice C suplementar](#) fornece um exemplo de valores em branco típicos gerados em vários sistemas TOC. Se o condicionamento de uma nova coluna for suficiente, os picos em branco diminuirão e as áreas de pico de água do mar se estabilizarão e serão altamente repetíveis ([Figuras C6 e C7](#)). Normalmente, passamos a maior parte do dia de trabalho diagnosticando a prontidão do sistema. Depois que as tarefas de manutenção diária são concluídas, uma série de 15 espaços em branco é executada a partir da porta nº 1, seguida por outras 15 amostras em que os espaços em branco são alternados com água do mar (encha vários frascos com a mesma água do mar e coloque no amostrador automático, extraia várias vezes de cada frasco). Depois que os brancos e as amostras de água do mar atendem a esses critérios, a coluna e o sistema estão prontos para serem executados e um conjunto de amostras junto com padrões, brancos e águas de referência são preparados para uma execução analítica durante a noite.

### 4.2 Curva padrão

DOC - Os sistemas são padronizados diariamente com uma curva de calibração de quatro pontos de glicose ou hidrogenoftalato de potássio (KHP) feita em LCW. As concentrações padrão de trabalho são distribuídas uniformemente para abranger a faixa dinâmica das concentrações oceânicas de DOC (normalmente 25, 50, 75, 100 µM C).

TDN – Uma curva de calibração de cinco pontos de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) dissolvido em LCW é usada (normalmente 3, 8, 16, 24 e 48 µM N) para delimitar as faixas de concentração oceânica.

Os padrões são analisados no início da execução de cada dia, antes das amostras, para monitorar a resposta do sistema. Os padrões de trabalho são preparados gravimetricamente a cada semana. São diluições independentes preparadas a partir de um estoque primário concentrado, que é feito mensalmente em LCW. A curva padrão resultante é usada para calcular as concentrações de DOC e TDN nas etapas de pós-processamento. Esse fator de resposta diário deve ser rastreado para cada sistema em uso e raramente muda durante a vida útil de uma coluna. As alterações no fluxo através das colunas e no NDIR também são monitoradas, pois alteram o fator de resposta. Consulte a Seção 5 para obter diretrizes detalhadas de preparação padrão.

### 4.3 Material de referência

Um componente crítico para manter a precisão e a intercomparabilidade entre laboratórios e dentro dos laboratórios ao longo do tempo é o uso rotineiro de referências de água do mar. Todas as amostras devem ser sistematicamente comparadas a um conjunto de referências que incluem ou foram calibradas em relação ao material de referência de consenso (CRM), como o fornecido pelo programa de CRM da Universidade de Miami (Hansell, 2005). Esses CRMs incluem água do mar profunda, média e superficial, bem como referências LCW que são calibradas por analistas internacionais independentes de DOM. Para fins práticos, recomenda-se que laboratórios individuais gerem um conjunto de materiais de referência "internos" em grandes volumes que sejam calibrados em relação aos CRMs. Um exemplo de preparação de referência "interna" pode incluir a coleta de 10 - 20 L de cada filtrado (GF/F) de um gradiente vertical de DOM, ou seja, superfície, água do mar mesopelágica e batipelágica, acidificação para pH 2-3 e partição em várias centenas de frascos de vidro (35 mL) para cada profundidade. Alternativamente, se não for possível acessar grandes volumes de água do mar, um lote de água do mar artificial pode ser preparado, composto de carbono orgânico adicionado e acidificado, que pode servir como uma referência "interna". Qualquer água de referência "interna" deve ser calibrada contra CRMs regularmente para garantir que a concentração de carbono permaneça estável (dentro de  $\pm 3$  s do valor calibrado). Armazenadas adequadamente, essas referências permanecem estáveis por pelo menos um ano. Recomenda-se que o conjunto de referências "internas", que abrangem a faixa dinâmica do conjunto de amostras, seja analisado várias vezes ao longo de uma determinada execução analítica (ou seja, a cada 8 - 10 amostras) como um diagnóstico da estabilidade e qualidade do sistema garantia dos dados. Essa prática de usar referências "internas" calibradas por longos períodos de tempo é especialmente útil para garantir a comparabilidade entre as execuções.

### 4.4 Executando amostras (método NPOC)

A água do mar coletada em frascos de vidro de 40 mL, acidificada no momento da coleta e armazenada na forma líquida, pode ser carregada diretamente no amostrador automático. É costume em nossos laboratórios trocar apenas os septos antes da análise, trocando os septos não perfurados usados na coleta por septos perfurados que são usados (limpos e reutilizados) apenas durante a análise no instrumento TOC. Quando a execução do TOC é concluída, os septos não perfurados são devolvidos aos mesmos frascos para colocar as amostras de volta no armazenamento. Essa sequência permite que os septos não perfurados sejam conservados para coletas repetidas após a limpeza. Alguns laboratórios também optam por usar septos de uso único ou folhas de alumínio abafadas como septos para eliminar a possibilidade de contaminação. Amostras congeladas devem ser: primeiro totalmente descongeladas à temperatura ambiente (nenhum gelo deve permanecer antes de prosseguir), bem misturadas por meio de vórtice e transferidas para um frasco de vidro, se necessário. Se for necessária a transferência da amostra, recomenda-se que alíquotas de 1-2 mL de água de amostra sejam usadas para enxaguar um frasco queimado 3 vezes antes de enchê-lo até um mínimo de 15 mL por frasco. A

volume de amostra de 15 mL permite várias execuções em uma amostra, se necessário.

Amostras de água do mar "desconhecidas" devem ser analisadas usando o método de carbono orgânico não purgável (NPOC) no sistema Shimadzu TOC. Consulte o manual do usuário Shimadzu TOC para "Princípios da análise NPOC" e "Informações técnicas relacionadas à análise" (área e forma do pico). Os usuários podem definir configurações para estabelecer seu próprio método; consulte o manual do usuário Shimadzu TOC para obter detalhes passo a passo sobre a configuração do método de software. Para amostras de água do mar, a opção "melhor 3 de 5" no software é comumente usada. Para este método, 3 mL de amostra pré-acidificada são colocados na seringa de injeção de 5 mL e aspergidos por 1,5 minutos a uma taxa de fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup> com gás livre de CO<sub>2</sub> (o tempo de aspersão deve ser testado empiricamente). Alíquotas de 100 mL de amostra são injetadas no tubo de combustão até que pelo menos três injeções replicadas atendam ao desvio padrão de área de pico (SD) especificado por Shimadzu de 0,1 ou um coeficiente de variação (CV)  $\leq 2\%$ , ou até que cinco injeções sejam alcançadas (replicação critérios são aplicados separadamente para DOC e TDN). A área de pico DOC ou TDN resultante é integrada ao software cromatográfico Shimadzu. Recomenda-se que uma corrida analítica seja organizada de modo que cada 8-10 amostras desconhecidas sejam agrupadas por um conjunto de referências "internas" (ou CRMs) e espaços em branco, e que o número total de incógnitas seja limitado a um máximo de 30-36 por execução (42-48 para colunas grandes) para evitar o entupimento da coluna de quartzo durante a execução. Essa configuração também permite amplo espaço para padrões, referências e espaços em branco no amostrador automático de 68 posições. O [Apêndice E suplementar](#) fornece um exemplo de folha de registro de execução.

### 4.5 Exportação e processamento de dados

Um exemplo de pós-processamento: correções e cálculo de concentrações

É uma boa prática revisar os picos em branco, de referência e de amostra após cada execução para procurar anomalias. Se a execução analítica prosseguir sem interrupção ou erros, os dados de pico brutos são exportados para processamento final e QA/QC. Se for observado um erro ou interrupção, a execução é interrompida e as amostras são reanalisadas.

Os arquivos são salvos como texto delimitado por tabulações e exportados do software Shimadzu para posterior processamento offline. Dados brutos de pico (área) são classificados por ID de amostra e todas as injeções são agrupadas e calculadas as médias para amostras em branco, padrão, referência e "desconhecidas". As injeções sinalizadas pelo software Shimadzu como discrepantes são excluídas das médias de área, mantendo 3 injeções para qualquer amostra. Um branco médio da máquina é determinado para todos os brancos durante a execução analítica de um dia (normalmente, é uma média de pelo menos 10-20 brancos) e é subtraído de todas as amostras, padrões e referências. Uma análise de regressão linear é realizada nos padrões de calibração corrigidos em branco (glicose de 4 pontos ou KHP para DOC ou padrões KNO<sub>3</sub> de 5 pontos para NDT). As curvas de calibração não são forçadas a zero e devem ter um coeficiente de correlação  $\geq 0,995$ . A inclinação é usada para

calcular as concentrações de amostra de áreas de pico como abaixo:

$$\frac{\text{mmol C ou N}}{\text{eu}} = \frac{\text{área de amostra média} \times \text{inclinação média da área em branco}}{\text{da máquina da curva padrão}} \quad (1)$$

Recomenda-se que os espaços em branco sejam analisados com frequência ao longo de uma execução como um diagnóstico do desempenho do sistema (consulte o [Apêndice E suplementar](#) para espaçamento de 10 a 20 espaços em branco em uma execução típica). Os brancos para cada sistema devem ser avaliados diariamente e os valores devem permanecer dentro de ( $\pm 3s$ ) ao longo de uma execução. O desvio sistemático ou uma mudança rápida nos valores do branco fora dessa faixa em uma determinada execução ou entre execuções ao longo da vida útil do tubo de combustão são indicativos de um problema no tubo de combustão, seu material de embalagem, as armadilhas ou uma obstrução no fluxo de gás. Se desvios ou mudanças nos valores em branco forem detectados em uma execução, a execução deve ser sinalizada como questionável e executada novamente conforme necessário. A taxa de fluxo deve ser verificada para determinar se houve entupimento ou contrapressão no sistema. Se o problema persistir, o tubo de combustão, o material de embalagem e os sífões devem ser substituídos.

Referências de CRM e/ou "in house" também são usadas para avaliar o desempenho do sistema analítico. Recomenda-se que um conjunto de referências "internas", calibradas em relação aos CRMs, seja executado 3 a 5 vezes ao longo de uma execução analítica e calculada a média. Se as referências não atenderem aos valores calibrados ou especificações de estabilidade (dentro de  $\pm 3s$  do valor calibrado, e o CV diário para cada referência deve ser  $\sim 2\%$ ), então uma verificação de manutenção deve ser realizada no sistema analítico, tubo de combustão e purgadores trocados/recondicionados conforme necessário, e a execução repetida. Todas as referências devem permanecer estáveis ao longo do tempo e entre os sistemas. Recomenda-se que as referências "internas" sejam calibradas em relação ao CRM aproximadamente a cada 6 semanas. Também é recomendado que vários conjuntos de referências "internas" sejam preparados e armazenados para manter conjuntos sobrepostos de material calibrado

As pipetas usadas para qualquer preparação padrão devem ser DOC limpas (o uso deve ser restrito apenas a DOC – nunca use uma pipeta que tenha sido usada com fixadores ou voláteis). Além disso, sugere-se o uso de pontas de pipetas não autoclavadas, pois o processo de esterilização pode resultar na lixiviação de orgânicos do material plástico. Todas as pontas de pipetas devem ser enxaguadas com HCl 4 M antes da preparação padrão.

## 5.2 Padrões primários

### 5.2.1 DOC

Hydrogenoftalato de potássio (KHP) ou glicose de alto grau ( $\geq 99,8\%$  de pureza) ou glicose são os compostos normalmente usados como padrão de carbono. Um estoque primário de 10 mmol L<sup>-1</sup> C é preparado em água ultrapura.

### 5.2.2 NDT

O nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) de alto grau ( $\geq 99,8\%$  de pureza) é recomendado como padrão de nitrogênio. Um estoque primário de 10 mmol L<sup>-1</sup> N é preparado em água ultrapura.

## 5.3 Padrões de trabalho

Os padrões de trabalho são preparados diluindo o estoque primário nas concentrações desejadas usando LCW à temperatura ambiente. Pelo menos quatro concentrações diferentes de padrões de trabalho são apropriadas (intervalo de concentração de amostra esperada) e devem ser analisadas diariamente no início de cada execução de amostra.

Consulte os Procedimentos Operacionais Padrão Suplementares (SOP3 e SOP4) para obter um guia passo a passo para preparar soluções padrão usando glicose e nitrato de potássio como exemplos.

## 5 Padrões

### 5.1 Suprimentos

É fundamental ter concentrações precisas de padrão soluções, e para DOC e NDT também devem ser tomados cuidados para evitar a contaminação durante a preparação dos estoques. Por esta razão, garrafas de vidro (aquecidas a 450°C por  $\geq 4$  h) são usadas para preparar a solução estoque primária. Observe que vidraria volumétrica não deve ser usada para preparar padrões, pois a alta temperatura afetará a precisão da graduação volumétrica. Compostos padrão secos devem ser mantidos em um dessecador sob vácuo para garantir a qualidade. As soluções são preparadas gravimetricamente à temperatura ambiente utilizando balanças analíticas com resolução de 0,0001 g. Estoques de trabalho de maior volume podem ser preparados diluindo o estoque primário em garrafas de vidro queimadas usando água ultrapura.

## 6 Controle de qualidade

Para fornecer à comunidade medidas padrão para a qualidade analítica do método DOC e TDN HTC em água do mar, apresentamos aqui diretrizes para Controle de Qualidade (QC). Isso consiste em (1) uma demonstração inicial da capacidade do laboratório (validação do método) e (2) diretrizes para avaliar o desempenho do laboratório pela análise contínua de instrumentos em branco, padrões de calibração e material de referência analisados como amostras.

### 6.1 Validação do método

Todos os parâmetros são definidos e calculados de acordo com as recomendações da União Internacional de Puros e Aplicados

Chemistry (IUPAC) ao estabelecer uma abordagem uniforme para as características de desempenho do processo de medição química (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1995).

### 6.1.1 Valor crítico (Lc)

Determinado usando espaços em branco (para este método, os espaços em branco são água ultrapura proveniente de sistemas Nanopure™ com cartucho de baixo TOC, luz UV e filtro final de 0,2 μm) de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (1995):

$$Lc = t1\gamma a, vso \quad (2)$$

onde t representa o teste t de Student, a indica a probabilidade do erro tipo I, v indica graus de liberdade e, portanto, indica o desvio padrão. Os brancos foram analisados em replicação em datas separadas (um mínimo de 30 brancos por dia em 7 execuções para DOC e > 20 brancos por dia em 4 execuções para TDN).

### 6.1.2 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção do método é estabelecido usando uma amostra de água enriquecida em baixa concentração como na União Internacional de Química Pura e Aplicada (1995):

$$LD = 2t1\gamma a, vso \quad (3)$$

onde t representa o teste t de Student, a indica a probabilidade do erro tipo I, v indica graus de liberdade e, portanto, indica o desvio padrão. Para este método 25 μmol C L

<sup>1</sup> amostras para DOC e 3 μmol N L-1 para TDN foram preparadas e analisadas em datas separadas (5 lotes individuais em 7 execuções para DOC e 4 lotes em 4 execuções para TDN). O limite de detecção deve ser determinado anualmente ou sempre que houver uma mudança significativa na configuração ou resposta do instrumento.

### 6.1.3 Limite de quantificação (LQ)

Expresso usando o desvio padrão relativo padrão da IUPAC (RSD) de 10% e usando o padrão de calibração mais baixo (União Internacional de Química Pura e Aplicada, 1995):

$$LQ = 10s_o \quad (4)$$

Onde s<sub>o</sub> indica o desvio padrão. Para este método calculado usando os padrões de calibração mais baixos (25 μmol C L-1 para DOC e 3 μmol N L-1 para TDN).

Os resultados da validação do método para análise de DOC e TDN na água do mar usando o método HTC estão resumidos na Tabela 1. Consulte o Apêndice Suplementar F para obter detalhes adicionais.

## 6.2 Limites de qualidade analítica

### 6.2.1 Precisão Avaliada

pelo uso de material de referência consensual como controle (não há padrão nacional ou internacional para DOC de água do mar). A comunidade aceitou o CRM distribuído pela Hansell

TABELA 1 Resultados da validação do método para análise de DOC e NDT em água do mar usando o método HTC.

Característica	DOC (μmol C L-1)	NDT (μmol N L-1)
Valor Crítico (Lc)	2.5	0,5
Limite de Detecção (LD)	4.3	0,9
Limite de Quantificação (LQ)	11.6	2.0
Gama de amostras típicas de água do mar	32 – 86	3 – 50

as faixas típicas de concentração de DOC e TDN em água do mar estão bem acima de Lc, LD e LQ, indicando que o método HTC é apropriado para análises de DOC e TDN em concentrações típicas de água do mar.

Laboratório, Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science (RSMAS), University of Miami. As concentrações devem permanecer dentro da faixa de valores de consenso (conforme relatado pelo Hansell Lab: <https://hansell-lab.rsmas.miami.edu/consensus-reference-material/index.html>) dentro de ± 2% (para DOC) e ± 2-6% para NDT (dependendo da faixa de concentração).

### 6.2.2 Precisão – repetibilidade e reprodutibilidade

#### 6.2.2.1 Repetibilidade

A melhor precisão interna alcançável pode ser avaliada por meio de observações repetidas de frascos de amostras replicadas durante um curto período de tempo. Condições como tipo de instrumento e operador devem permanecer constantes.

#### 6.2.2.2 Reprodutibilidade O

complemento externo à repetibilidade, avaliado pela análise de lotes idênticos de amostras com o mesmo método entre diferentes laboratórios para avaliar a reprodutibilidade dos resultados. Este método utilizou intercomparações realizadas em lotes de águas de referência entre o Carlson e o Hansell

Laboratórios DOM de 2018-2019.

Um resumo dos limites de qualidade analítica para análise de DOC e TDN na água do mar usando o método HTC pode ser encontrado na Tabela 2. Consulte o Apêndice Suplementar G para obter detalhes adicionais.

## 6.3 Avaliação do desempenho do laboratório

Conforme descrito nas Seções 4 e 5, o uso de espaços em branco, padrões de calibração e materiais de referência fornecem verificações contínuas do desempenho do instrumento. Uma vez que os exercícios de validação tenham sido conduzidos e o método estabelecido em um laboratório, a avaliação contínua da qualidade dos dados deve ocorrer com frequência, a fim de manter um controle de qualidade rígido. A Tabela 3 apresenta um resumo das recomendações para avaliar as execuções de dados DOC e TDN usando o método HTC conforme apresentado aqui.

## 6.4 Garantia de qualidade

Se uma execução passar pelas especificações de controle de qualidade descritas acima para desempenho analítico, os dados serão aceitos e examinados posteriormente no contexto de coleta e metadados adicionais disponível. Se a execução não atendeu a esses requisitos iniciais, o sistema é verificado e toda a execução é repetida.

## 6.5 Compilação e avaliação de dados GO-SHIP

Para GO-SHIP, os dados DOM são compilados usando registros de bordo e mesclados com arquivos de dados de garrafas contendo quaisquer outros dados químicos e físicos disponíveis e, em seguida, plotados no Ocean Data View (Schlitzer, R., *Ocean Data View*, <https://odv.awi.de>, 2021). As plotagens iniciais de perfis verticais e/ou plotagens de contorno são úteis para identificar potenciais outliers. Quaisquer amostras fora de uma faixa razoável para valores de DOC/TDN oceânicos são sinalizadas como potencialmente contaminadas ou suspeitas de erro de manuseio (valores < 30 ou > 90  $\mu\text{mol C kg}^{-1}$ , < 3 ou > 50  $\mu\text{mol N kg}^{-1}$ ).

As amostras sinalizadas são comparadas com réplicas ou reanalisadas para confirmar. Se houver suspeita de erros analíticos, perfis inteiros ou subconjuntos de amostras (incluindo valores problemáticos e amostras adjacentes) são reanalisados. Após a reanálise da amostra, se as especificações analíticas forem atendidas e os dados permanecerem anormalmente altos ou baixos, os dados serão relatados, mas sinalizados como questionáveis ou ruins de acordo com os códigos de sinalização de qualidade do World Ocean Circulation Experiment (WOCE) (consulte a Tabela 4).

TABELA 2 Resumo dos limites de qualidade analítica para análise de DOC e TDN em água do mar usando o método HTC.

	DOC	TDN
Precisão [alcance]	$\pm 2\%$ [40-75 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ ]	$\pm 2\%$ [8-32 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ ] $\pm 6\%$ [4-6 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ ] $\pm 0,7 \mu\text{mol}$
Precisão - repetibilidade	$\pm 0,6 \mu\text{mol C L}^{-1} \pm$	N L-1 $\pm 0,2 \mu\text{mol N}$
Precisão - reprodutibilidade [gama baixa/média/alta]	0,6 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ @[39 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ ] $\pm 0,6 \mu\text{mol C L}^{-1}$ @[62 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ ] $\pm 1,6 \mu\text{mol C L}^{-1}$ @[72 $\mu\text{mol C L}^{-1}$ ]	L-1 @[5-10 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ ] $\pm 0,3 \mu\text{mol N L}^{-1}$ @[20-30 $\mu\text{mol N L}^{-1}$ ] $\pm 1,6 \mu\text{mol N L}^{-1}$ @[40 $\mu\text{mol NL}^{-1}$ ]

TABELA 3 Sugestão de critérios e diretrizes de controle de qualidade.

Indicador de CQ	Aceitação/Ação Limites	Ação	Frequência (por corrida)
Material de referência de consenso (CRM)	O valor deve estar dentro do intervalo de consenso relatado	Se o CRM estiver fora do intervalo relatado, executar novamente	5 ampolas ou frascos de CRM por corrida de calibração de referência. Deve se sobrepôr a novos lotes de material de referência interno.
Material de referência interno (calibrado em relação ao CRM)	Dentro de $\pm 3\text{s}$ do valor calibrado	Se fora de $\pm 3\text{s}$ , execute novamente	Mínimo de 2 frascos de cada referência de profundidade e superfície por corrida, com 2-3 observações por frasco.
Curva de calibração - Correlação Coeficiente (R)	0,995	Se <0,995, execute novamente	Curva de 4-5 pontos em toda a faixa analítica ( $\sim 25\text{-}100 \mu\text{mol C L}^{-1}$ para DOC e $\sim 3\text{-}50 \mu\text{mol N L}^{-1}$ para TDN), analisado no início de cada dia de execução antes das amostras

## 6.6 Comparações de dados interlaboratoriais

Recomenda-se que as amostras e referências sejam compartilhadas periodicamente entre os grupos analíticos para garantir a comparabilidade interlaboratorial. A Figura 1 é um exemplo de intercomparações entre os laboratórios de DOM da Universidade de Miami e da UCSB.

## 7 Documentação

### 7.1 Relatórios de análise de DOM

Veja a seguir exemplos de metadados que podem ser incluídos nos relatórios de cruzeiro DOM:

- Designação do cruzeiro e investigador(es) principal(is) • Nomes e afiliações dos técnicos que coletaram amostras DOM no mar
- Número de estações ocupadas e amostras coletadas (frequência de amostragem) • Procedimentos de amostragem e armazenamento • Nomes e afiliações dos técnicos que analisaram Amostras DOM on-shore • Número de amostras analisadas • Métodos de análise (equipamento e metodologia) • Procedimentos de processamento de dados e Controle de Qualidade (cálculos, exatidão, precisão e limites de detecção, Informações do CRM)
- Quaisquer detalhes de problemas ou solução de problemas que ocorreram com amostragem ou análise
- Referências científicas

TABELA 4 Woce Hydrographic Program (WHP) códigos de qualidade de dados de parâmetro de garrafa ([https://www.nodc.noaa.gov/woce/woce\\_v3/wocedata\\_1/whp/exchange/exchange\\_format\\_desc.htm](https://www.nodc.noaa.gov/woce/woce_v3/wocedata_1/whp/exchange/exchange_format_desc.htm)).

Códigos de qualidade de dados de parâmetros de garrafas WHP	Descrição
1	A amostra para esta medição foi retirada de uma garrafa de água, mas a análise não foi recebida. Observe que, se a água for retirada de uma garrafa de água para qualquer medição, o sinalizador de qualidade para esse parâmetro deve ser definido como 1 inicialmente para garantir que todas as amostras de água sejam contabilizadas.
2	Medição aceitável.
3	Medição questionável.
4	Medição ruim.
5	Não reportado.
9	Amostra não retirada para esta medição desta garrafa.

## 7.2 Arquivos de dados da garrafa

Os dados da análise DOM (DOC e TDN) são mesclados com arquivos de troca de garrafas CLIVAR e Carbon Hydrographic Data Office (CCHDO) com base em identificadores de amostra (estação/fundição/profundidade/ID da garrafa).

Depois que os dados são mesclados com outros parâmetros químicos no arquivo do frasco, o nitrogênio orgânico dissolvido (DON) é calculado como a diferença entre TDN e  $\text{DIN } \frac{1}{2}\text{NH}_4 + + \text{NO}_3 + \text{NO}_2$ . Como DON é uma variável derivada, ela não é relatada (isto é, não incluída no arquivo da garrafa).

Os resultados finais são relatados em unidades de  $\text{mmol kg}^{-1}$ . Sempre que possível, medições diretas da salinidade da amostra e da temperatura analítica são usadas para calcular a densidade média da água do mar. Na prática, descobrimos que a aplicação de uma densidade média da água do mar

de  $1,027 \text{ kg m}^{-3}$  para amostras de DOM da coluna de água do oceano aberto, em comparação com a medição direta da densidade da amostra resulta em uma diferença inferior a  $0,01 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$  (ou seja, menor que a resolução analítica). No entanto, quando a salinidade e uma temperatura analítica média de laboratório estão disponíveis ou em regiões onde a salinidade varia fortemente, uma correção de densidade mais precisa é determinada e aplicada para cada amostra. Cada parâmetro inclui um campo para sinalizadores de controle de qualidade.

## 8 Conclusão

A metodologia aqui apresentada visa fornecer à comunidade científica marinha os detalhes necessários para produzir consistentemente dados de alta qualidade para análise de matéria orgânica dissolvida.

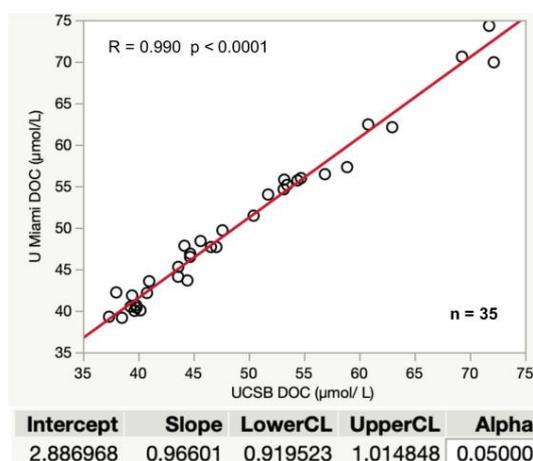


FIGURA 1

Resultados de comparações interlaboratoriais realizadas entre a UCSB e a Universidade de Miami entre 2017 e 2018. As amostras incluem comparações de CRMs, referências internas e perfis de campo coletados em vários locais nos oceanos Pacífico e Atlântico. As amostras foram divididas igualmente entre os grupos para análise. O coeficiente de correlação mostra uma forte relação entre os dados UCSB e UMIAMI ( $R = 0,990$ ,  $p < 0,001$ ). A regressão ortogonal (variâncias univariadas, prin comp) usando o software JMP (JMP®, versão <15>. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021) fornece um intervalo de confiança de 0,919-1,015 para a inclinação, que inclui 1,0 e mostra forte concordância entre os valores relatados por cada laboratório em uma ampla faixa dinâmica, fornecendo confiança em resultados exatos e precisos para dados GO-SHIP coletados e analisados conforme descrito neste guia de melhores práticas.

carbono e nitrogênio total dissolvido em amostras de água do mar. Essas melhores práticas foram escritas para a Coleção de Práticas de Hidrografia Repetidas GO-SHIP (Halewood et al., 2022), mas são aplicáveis a uma ampla variedade de programas, desde locais de estudo focados e séries temporais até redes globais de observação e levantamentos hidrográficos baseados em navios.

## Declaração de disponibilidade de dados

Os dados brutos que sustentam as conclusões deste artigo serão ser disponibilizados pelos autores, sem reservas indevidas.

## Contribuições do autor

EH coordenou e realizou a revisão final e conclusão do manuscrito. Todos os autores contribuíram para a redação do manuscrito inicial e EH, KO, LC, DH e CC forneceram revisões e contribuições para as versões revisadas e compartilham a primeira autoria. Todos os autores contribuíram com o artigo e aprovaram a versão submetida.

## Financiamento

Apoio para este trabalho foi fornecido pela US National Science Foundation (NSF OCE 1436748 para DAH, OCE 2023500 para CAC) e Simons Foundation International BIOS-SCOPE programa para CAC. NASA EXPORTS Award 80NSSC18K0437 para CAC.

## Agradecimentos

Este manual foi escrito por equipes técnicas da University of California Santa Barbara (Craig Carlson Microbial

## Referências

- Aluwihare, LI e Meador, T. (2008). "Composição química do nitrogênio orgânico marinho dissolvido," em Nitrogênio no ambiente marinho. Ed. DG Capone, DA Bronk, MR Mulholland e EJ Carpenter (Burlington, MA: Academic Press), 95–140.
- Baetge, N., Behrenfeld, MJ, Fox, J., Halsey, KH, Mojica, KDA, Novoa, A., et al. (2021). O fluxo sazonal e o destino do carbono orgânico dissolvido através do bacterioplâncton no Atlântico Norte Ocidental. *Frente. Microbiol.* 12, 669883. doi: 10.3389/fmicb.2021.669883
- Benner, R. e Strom, M. (1993). Uma avaliação crítica do branco analítico associado a medições de DOC por oxidação catalítica em alta temperatura. *março Chem.* 41, 153–160. doi: 10.1016/0304-4203(93)90113-3
- Bronk, DA (2002). "Dynamics of DON," em Biogeochemistry of marine dissolved organic matter, 1st ed. Ed. DA Hansell e CA Carlson (San Diego, CA: Academic Press), 153–247.

Oceanography Lab) e Universidade de Miami (Dennis Hansell Organic Biogeochemistry Lab). Os autores agradecem à equipe técnica, alunos e equipes de campo nos laboratórios Carlson e Hansell ao longo dos anos que contribuíram para o desenvolvimento desses métodos. Obrigado também a Juliet Hermes do Sistema Global de Observação do Oceano (Líder da Equipe de Trabalho GOOS sobre as Melhores Práticas) e do Sistema de Melhores Práticas do Oceano (OBPS) pela orientação sobre o desenvolvimento e compartilhamento das melhores práticas para a comunidade oceânica. Os autores também gostariam de reconhecer e agradecer aos seguintes colegas científicos pela extensa revisão do manuscrito e comentários construtivos e sugestões de melhoria: Boris Koch, Rik Wanninkhof, Youhei Yamashita

## Conflito de interesses

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira que possa ser interpretada como um potencial conflito de interesses.

## Nota do editor

Todas as reivindicações expressas neste artigo são exclusivamente dos autores e não representam necessariamente as de suas organizações afiliadas, ou as do editor, dos editores e dos revisores. Qualquer produto que possa ser avaliado neste artigo, ou reclamação que possa ser feita por seu fabricante, não é garantido ou endossado pelo editor.

## Material suplementar

O material suplementar para este artigo pode ser encontrado online em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.1061646/full#supplementary-material>

- Carlson, CA, Ducklow, HW, Hansell, DA e Smith, WO (1998). Partição de carbono orgânico durante a floração de fitoplâncton na primavera na polínia do Mar de Ross e no Mar dos Sargaços. *Limnol. Oceanogr.* 43, 375–386. doi: 10.4319/lo.1998.43.3.0375
- Carlson, CA, Ducklow, HW e Michaels, AF (1994). Fluxo anual de carbono orgânico dissolvido da zona eufótica no noroeste do Mar dos Sargaços. *Natureza* 371, 405–408. doi: 10.1038/371405a0
- Carlson, CA, Hansell, DA, Nelson, NB, Siegel, DA, Smethie, WM, Khattiwala, S., et al. (2010). Exportação de carbono orgânico dissolvido e subsequente remineralização nos reinos mesopelágicos e batipelágicos da bacia do Atlântico Norte. *Mar Profundo. Res. II.* 57, 1433–1445. doi: 10.1016/j.dsr2.2010.02.013
- Cauwet, G. (1978). Química orgânica de particulados de água do mar. conceitos e desenvolvimentos. *Oceanol. Acta* 1 (1), 99–105.

Eppley, RW, Stewart, E., Abbott, MR e Owen, RW (1987). Estimando a produção oceânica a partir de clorofila derivada de satélite: insights do conjunto de dados eastropac. *Oceanol. Acta SP*, 109–113.

Fasham, MJR, Balino, BM, Bowles, MC, Anderson, R., Archer, D., Bathmann, U., et al. (2001). Uma nova visão da biogeoquímica oceânica após uma década do estudo conjunto do fluxo oceânico global (JGOFS). *Ambio* 30 (SPEC. ISS. 10), 4–31.

Halewood, E., Opalk, K., Custals, L., Carey, M., Hansell, DA e Carlson, CA (2022) Hidrografia de repetição GO-SHIP: Determinação de carbono orgânico dissolvido (DOC) e nitrogênio total dissolvido (TDN) em água do mar usando análise de combustão de alta temperatura. Disponível em: <https://repository.oceanbestpractices.org/handle/11329/1921>.

Hansell, DA (1993). Resultados e observações da medição de DOC e DON usando técnicas de combustão catalítica de alta temperatura. *Mar. Chem.* 41, 195–202. doi: 10.1016/0304-4203(93)90119-9

Hansell, DA (2005). Programa de material de referência de carbono orgânico dissolvido. *Eos. Transações. Sou. Geophys. União.* 86 (35), 318. doi: 10.1029/2005EO350003

Hansell, DA, e Carlson, CA (1998). Gradientes oceânicos profundos dissolvidos concentrações de carbono orgânico. *Natureza* 395, 263–266. doi: 10.1038/26200

Hansell, DA, Carlson, CA, Amon, RMW, Alvarez-Salgado, XA, Yamashita, Y., Romera-Castillo, C., et al. (2021). Compilação de dados de matéria orgânica dissolvida (DOM) obtidos das pesquisas oceânicas globais de 1994 a 2020 (acesso NCEI 0227166) (NOAA National Centers for Environmental Information) (MD, EUA: Silver Spring). doi: 10.25921/s4f4-ye35

Hansell, DA, Carlson, CA, Repeta, DJ e Schlitzer, R. (2009). Matéria orgânica dissolvida no oceano: uma polêmica estimula novos insights. *Oceanografia* 22, 202-211. doi: 10.5670/oceanog.2009.109 Hansell, DA, Carlson, CA e

Schlitzer, R. (2012). Remoção líquida das principais frações marinhas de carbono orgânico dissolvido no oceano subterrâneo. *Biogeoquímica Global. Ciclos.* 26 (1), [GB1016]. doi: 10.1029/2011GB004069

União Internacional de Química Pura e Aplicada (1995). Nomenclatura na avaliação de métodos analíticos, incluindo capacidades de detecção e quantificação (recomendações IUPAC 1995). *Puro. Appl. Chem.* 67 (10), 1699–1723. doi: 10.1351/pac199567101699

Knap, A., Michaels, A., Close, A., Ducklow, H. e Dickson, A. (1996). "Protocolos para as medições de núcleo do estudo global conjunto do fluxo oceânico (JGOFS)", em JGOFS, reimpressão dos manuais e guias do IOC no. 29 (UNESCO) (Paris, França).

Letscher, RT, Hansell, DA, Carlson, CA, Lumpkin, R. e Knapp, A. N. (2013). Nitrogênio orgânico dissolvido na superfície oceânica global: distribuição e destino. *Biogeoquímica Global. Ciclos.* 27, 141–153. doi: 10.1029/2012GB004449

Liu, S., Longnecker, K., Kujawinski, EB, Vergin, K., Bolaños, LM, Giovanonni, SJ, et al. (2022). Ligações entre exportação de matéria orgânica dissolvida, metabólitos dissolvidos e resposta da estrutura da comunidade microbiana associada no noroeste do Mar dos Sargaços em escala sazonal. *Frente. Microbiol.* 13, 833252. doi: 10.3389/fmicb.2022.833252

MacKenzie, FT (1981). "Ciclo global do carbono: alguns sumidouros menores de CO<sub>2</sub>." no Fluxo de carbono orgânico dos rios para o oceano. Ed. GE Likens, FT MacKenzie, J.

E. Richey, JR Sedell e KK Turekian (Washington, DC: Departamento de Energia dos EUA), 360–384.

Mopper, K. e Qian, J. (2006). "Análise de água: determinações de carbono orgânico", na Enciclopédia de química analítica, online © 2006 (John Wiley & Sons, Ltd) (Hoboken, NJ).

Novak, MG, Cetiniy, I., Chaves, JE, e Mannino, A. (2018). A adsorção de carbono orgânico dissolvido em filtros de fibra de vidro e seu efeito na medição de carbono orgânico particulado: um exercício de laboratório e modelagem. *Limnol. Oceanogr.: Métodos* 16, 356–366. doi: 10.1002/lom3.10248

Peltzer, ET e Brewer, PG (1993). Alguns aspectos práticos da medição de DOC – artefactos de amostragem e problemas analíticos com amostras marinhas. *março Chem.* 41 (1-3), 243–252. doi: 10.1016/0304-4203(93)90126-9

Ridgwell, A. e Arndt, S. (2014). "Por que matéria orgânica dissolvida: DOC em oceanos antigos e mudanças climáticas passadas", em *Biogeochemistry of Marine Dissolve Organic Matter*, 1ª ed. Ed. DA Hansell e CA Carlson (San Diego, CA: Academic Press), 1–19.

Schlitzer, R. (2021) Ocean data view. Disponível em: <https://odv.awi.de>.

Sharp, JH (1993). A controvérsia do carbono orgânico dissolvido: uma atualização. *Oceanografia* 6, 45–50. doi: 10.5670/oceanog.1993.13

Sharp, JH, Benner, R., Bennett, L., Carlson, CA, Fitzwater, SE, Peltzer, E. T., e outros. (1995). Análises de carbono orgânico dissolvido na água do mar: a comparação dos métodos JGOFS EqPac. *Mar. Chem.* 48, 91–108. doi: 10.1016/0304-4203(94)00040-K

Sharp, JH, Carlson, CA, Peltzer, ET, Castle-Ward, DM, Savidge, KB e Rinker, KR (2002a). Intercalibração final da ampla comunidade de carbono orgânico dissolvido e uso preliminar de materiais de referência DOC. *Mar. Chem.* 77 (4), 239–253. doi: 10.1016/S0304-4203(02)00002-6

Sharp, JH, Rinker, KR, Savidge, KB, Abell, J., Benaim, JY, Bronk, D., et al. (2002b). Uma comparação preliminar de métodos para medição de nitrogênio orgânico dissolvido na água do mar. *Mar. Chem.* 78 (4), 171–184. doi: 10.1016/S0304-4203(02)00020-8

Tappin, AD e Nimmo, M. (2019). "Análise de água | água do mar: Dissolvido P. Worsfold, .. Carbono orgânico." na Enciclopédia de ciência analítica, 3ª ed. Ed. .. C. Poole, .. A. Townshend e .. M. Miró, 345–352. (Cambridge, MA: Elsevier)

Turnewitsch, R., Springer, BM, Kiriakoulakis, K., Vilas, JC, Aristegui, J., Wolff, G., et al. (2007). Determinação de carbono orgânico particulado (POC) em água do mar: A importância metodológica relativa de ganhos e perdas artificiais em duas técnicas baseadas em filtros de fibra de vidro. *Mar. Chem.* 105, 208–228. doi: 10.1016/j.marchem.2007.01.017 Walsh, TW (1989). Nitrogênio total

dissolvido na água do mar: um novo método de combustão em alta temperatura e uma comparação com a foto-oxidação. *março Chem.* 26, 295–311. doi: 10.1016/0304-4203(89)90036-4

Williams, PM, e Druffel, ERM (1987). Radiocarbono em matéria orgânica dissolvida no Oceano Pacífico Norte Central. *Natureza* 330, 246–248. doi: 10.1038/330246a0

Williams, PM, e Druffel, ERM (1988). Matéria orgânica dissolvida no oceano: comentários sobre uma polêmica. *Oceanografia* 1 (1), 14–17. doi: 10.5670/oceanog.1988.33