

CURSO DE PRODUÇÃO PRIMÁRIA MARINHA

Determinação de clorofilas, carotenóides totais e feopigmentos

Método espectrofotométrico

1 - Introdução

A determinação quantitativa global da fração particulada viva no meio aquático é importante para o estudo e compreensão dos fenômenos ecológicos. Para tanto, uma estimativa da biomassa fitoplanctônica por via química, pela extração e determinação dos pigmentos fotossintéticos, tem se mostrado satisfatória, mais simples e mais rápida que os métodos baseados, por exemplo, nas contagens de células.

O primeiro método espectrofotométrico para pigmentos algais na água do mar foi descrito por Richards & Thompton (J. Mar. Res., 11 : 156, 1952).

Este método permitia a determinação das concentrações de clorofilas a, b e c a partir de medidas da absorbância realizadas em comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção destas três clorofilas (663, 645 e 630 respectivamente, em acetona 90%) (método tricromático). Algumas modificações a este método foram sugeridas por Parsons & Strickland (J. Mar. Res., 21:155, 1963) e novas equações espectrofotométricas foram fornecidas por Jeffrey & Humphrey (Biochem. Physiol. Pflanzen., 167:191, 1975).

Lorenzen (Limnol. Oceanogr. 12, 343, 1967) estabeleceu o método monocromático, que permite determinar apenas a clorofila-a mas que tem a vantagem de fornecer a concentração de feopigmentos após a acidificação da amostra.

2 - Resumo do método

Um volume conhecido de água do mar é filtrado num filtro sintético (p.ex. Millipore AA) ou sobre filtro de fibra de vidro; os pigmentos são extraídos do filtro com acetona 90% e suas concentrações estimadas espectrofotometricamente.

3 - Equipamento

Conjunto de filtração para filtros de 47 mm

Tubos de centrífuga de 12 ou 15 ml de capacidade, com tampa.

Centrífuga para tubos de 15 ml.

Espectrofotômetro e cubas de 5 ou 10 cm de caminho ótico para 10 ml de extrato.

4 - Amostragem e Estocagem

Filtrar entre 0,5 - 10 l de água do mar em filtros de membrana ou fibra de vidro (porosidade $\approx 0,5 \mu\text{m}$ sob vácuo de 0,5 atm, secar o filtro sob vácuo, dobrá-lo com o material sobre a face interna e estocá-lo em dessecador a -20°C se a análise não puder ser imediata.

5 - Regentes

Acetona 90°
HCl 0,3 mol.l⁻¹ (1 gota em cuba de 5 cm)

6 - Procedimento experimental

Introduzir o filtro num tubo de centrífuga com auxílio de uma pinça e adicionar 10ml de solvente. Manter o tubo ao abrigo da luz.

Caso o filtro não seja solúvel, deve ser triturado com o auxílio de um bastão de vidro.

Deixar a extração se proceder por 20-24h no refrigerador

Centrifugar os tubos 10min a 2500 rpm

Decantar o sobrenadante nas cubas de 5 ou 10cm de caminho ótico e medir a extinção nos seguintes comprimentos de onda: 750,665, 664,647,630,510,480 μm. (Se o interesse for apenas clorofila, 510e 480 μm não são necessários).

Acidificar a amostra com 1 gota de HCl 0,3 mol.l⁻¹

Ler as absorvâncias a 750 e 665 μm.

Corrigir cada extinção para a turbidez subtraindo a absorvância a 750 μm daquelas de 665,664,647 e 630; a absorvância a 510 μm é corrigida subtraindo-se 2 x a absorvância a 750 μm e a 480 μ, subtraindo-se 3 x a absorvância a 750 μm.

Lavar as cubetas com acetona 90% após cada determinação.

7 - Cálculos

Volume da amostra (750ml) · V.

A quantidade de pigmento na amostra de água original é obtida utilizando-se as equações abaixo:

7.1 - Para clorofilas e carotenóides (segundo Jeffrey & Humphrey):

Ca - clorofila a = 11,85 × E 664 - 1,54 × E 647 - 0,08 × E 630

Cb - clorofila b = 21,03 × E 647 - 5,43 × E 664 - 2,66 × E 630

Cc - clorofila c = 24,52 × E 630 - 1,67 × E 664 - 7,60 × E 647

Cc - Representa a somatória das clorofilas c₁ e c₂

onde E = absorvância nos diferentes comprimentos de onda após a correção para turbidez e Ca, Cb, Cc as quantidades de clorofila (em μg/l se uma cuba de 1 cm de caminho ótico foi utilizada) então:

$$\text{mg clorofila/m}^3 = \frac{C \times v}{V \times l}$$

onde v = volume de acetona em ml *12 ml*

V = volume de água do mar filtrada, em litros *750 ml*

l = caminho ótico da cubeta (cm) *5 cm*

C = quantidade de clorofila

(observ: μg/l = mg/m³)

Para carotenóides:

Cp = Carotenoides vegetais = 7,6 (E 480^{-1,49} E 510)

Cp é substituído em C na mesma equação de clorofila.

7.2 - Para clorofila-a e feopigmentos (segundo Lorenzen):

Subtrair as leituras de 750 μm das leituras correspondentes de 665 μm (antes e após acidificação).

$$\text{clorofila-a (mg/m}^3\text{)} = \frac{26,7 (665_0 - 665_a) \times v}{V \times l}$$

$$\text{feopigmentos (mg/m}^3\text{)} = \frac{26,7 \quad 1,7 (665_a) - 665_0 \quad \times v}{V \times l}$$

onde 665₀ é a extinção antes da acidificação e
665_a é a extinção após a acidificação.

v = volume de acetona no extrato (ml)

V = volume de água filtrada (litros)

l = caminho ótico (cm)

Apostila elaborada por Sônia Galvão com base em:

Parsons, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli (1984)

"A Manual of Chemical and Biological
Methods for Seawater Analysis". Pergamon Press,
Oxford, 173 p.

Aminot, A., M. Chaussepied (1983)

"Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin".
CNEXO, Brest, 395 p.