

Botânica Marinha PL

Análise Clorofilas no espectrofotómetro. Metodologia

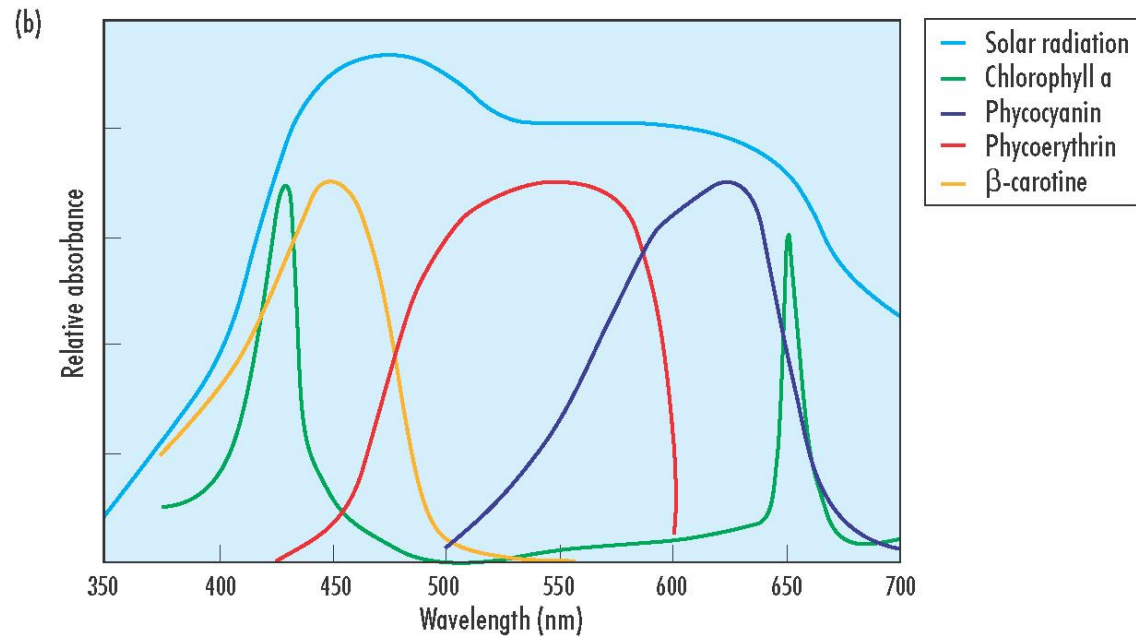
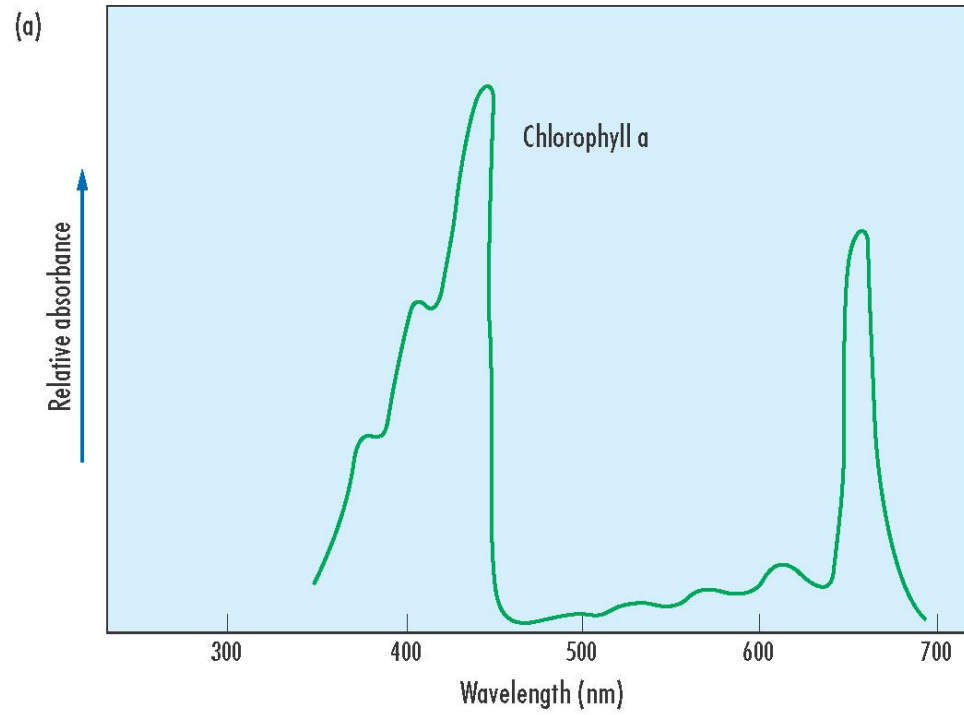
Equações a utilizar

2 e 23 de março 2020

Método de determinação da clorofila *a*

O método mais usado em Oceanografia – e mais discutido

Espectros dos vários pigmentos



Tipos de Pigmentos

Clorofilinos
Carotenóides
Ficobilinas

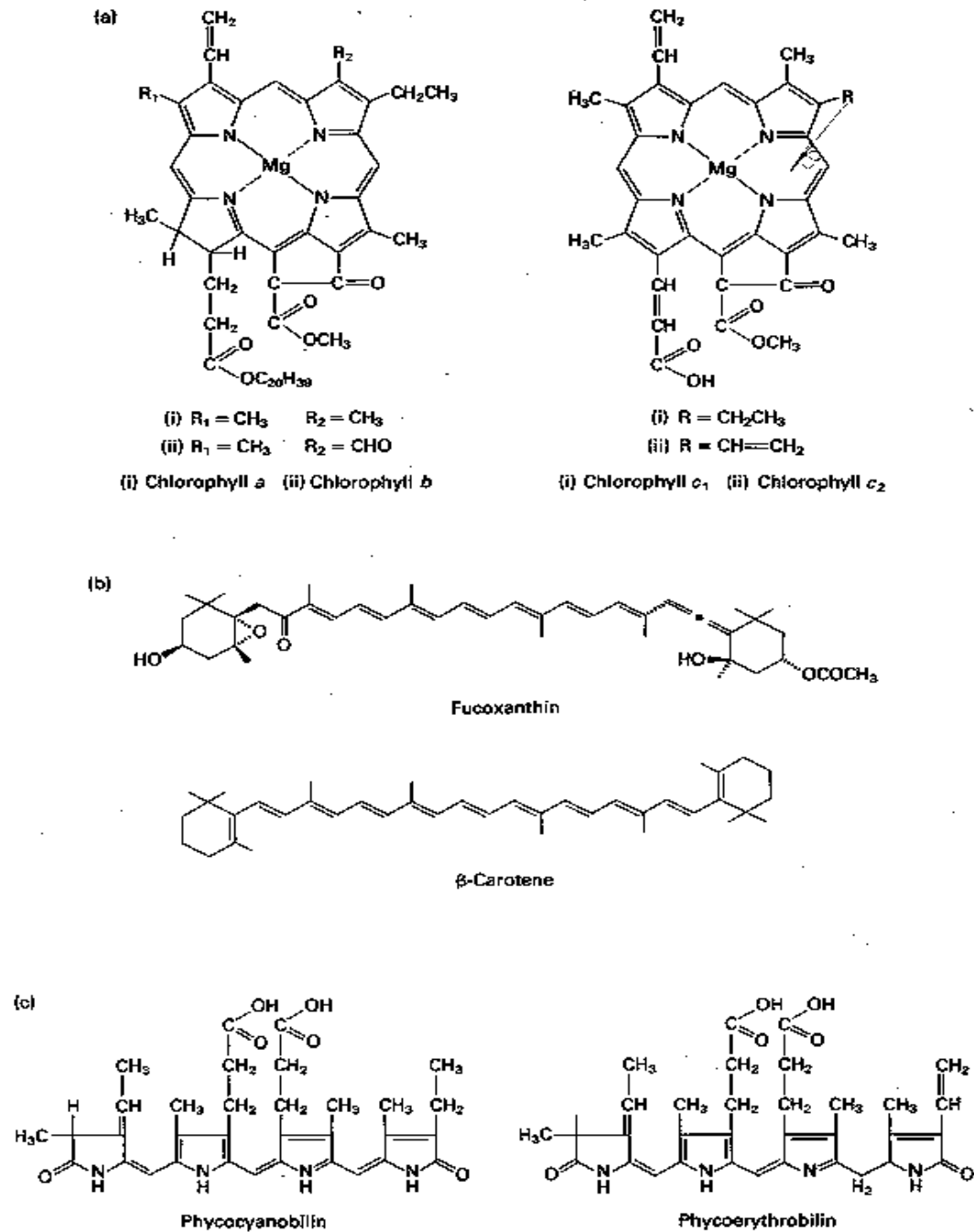


Fig. 6.1 Chemical structure of three main groups of photosynthetic pigments. (After Ragan, 1981.)

Preparação das amostras antes da análise no espectrofotómetro

- Ver o protocolo (fénix)
- Filtração 2L no próprio dia
- Cada filtro colocado num tubo de centrífuga
- Acetona a 90% (5mL) adicionada aos filtros. Filtros macerados com vareta de vidro
- Filtros guardados a -20°C .
- Tubos centrifugados
- Análise do sobrenadante no espectrofotómetro

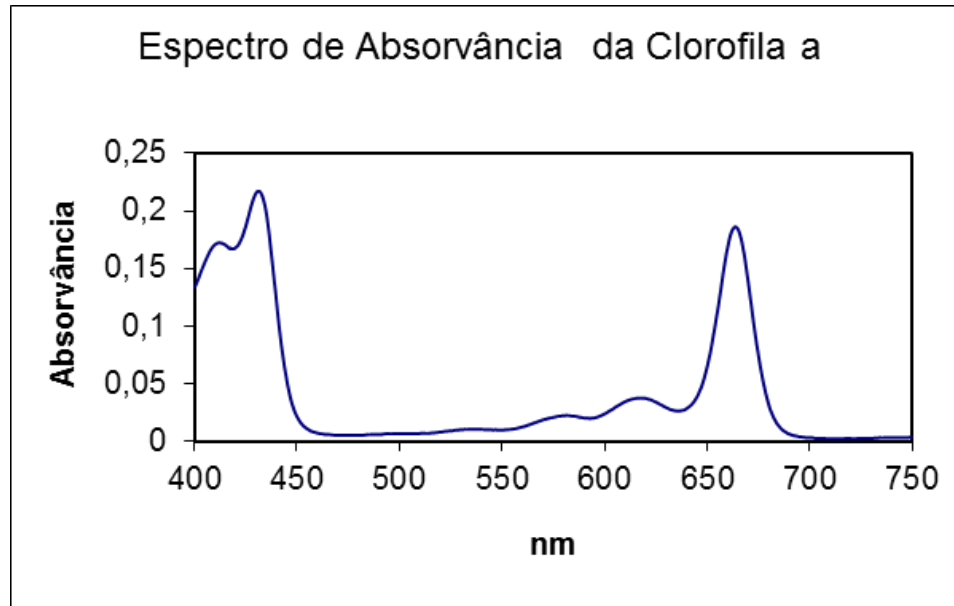
Determinação das clorofilas

- Seguir o protocolo
- Centrifugar os tubos de centrífugadora
- Ler no espectrofotómetro antes e depois de adicionar HCL.
- Fazer os cálculos em casa.

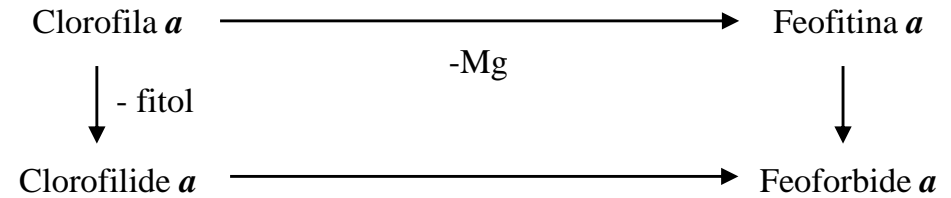
2 métodos complementares para estimar a concentração em Clorofila a

- Método tricromático de Jeffrey & Humphrey, 1975
- Método de Lorenzen 1967

Método de Lorenzen 1967



As concentrações de clorofila a e feofitina a são determinadas com base nas seguintes fórmulas (Lorenzen, 1967):

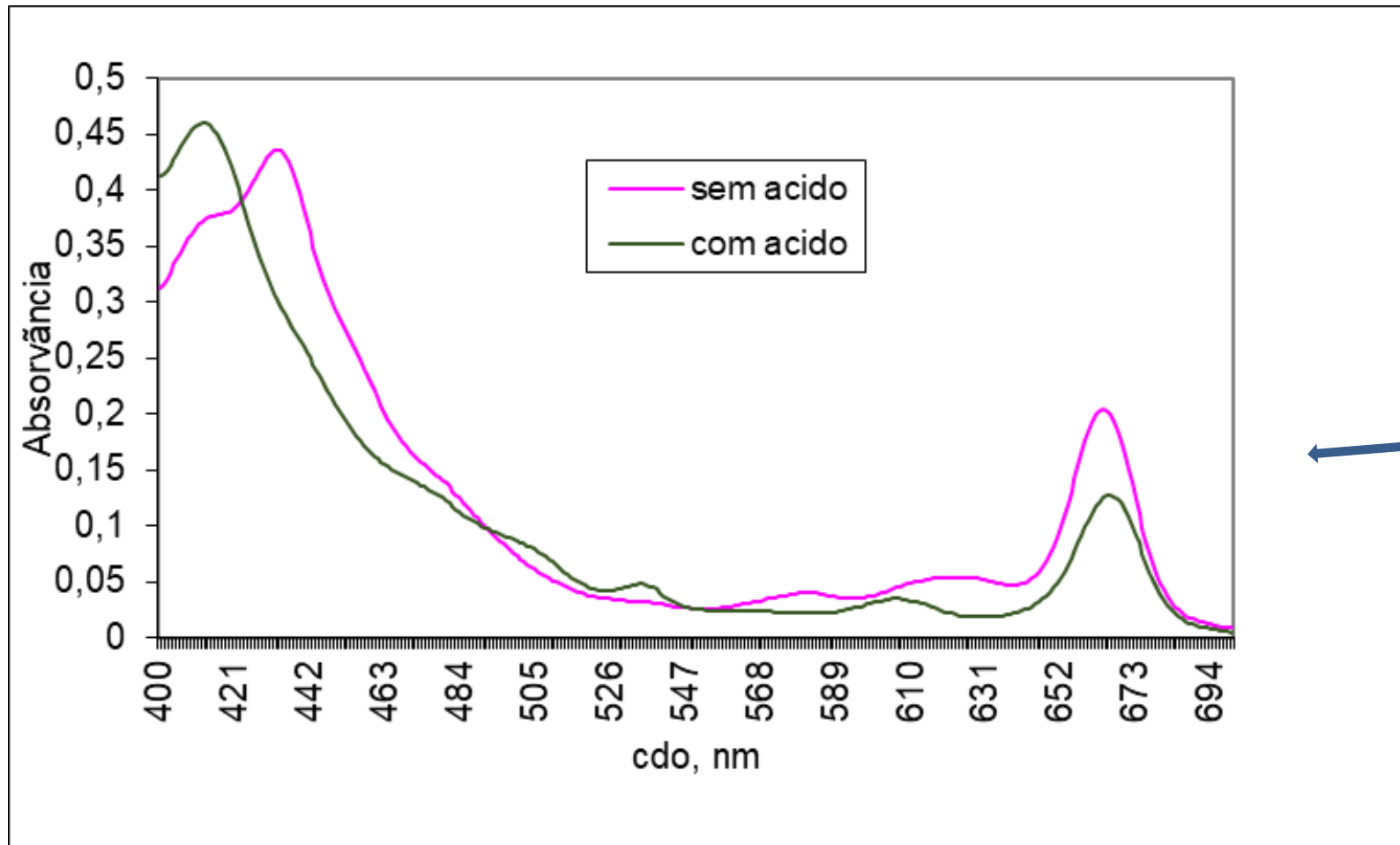


$$Clh a(\mu gL^{-1}) = \frac{A \times K \times [(A_{664} - A_{750}) - (A_{664 \text{ ácido}} - A_{750 \text{ ácido}})] \times v}{V \times L}$$

$$Feogmentos (\mu gL^{-1}) = \frac{A \times K \times [(A_{664 \text{ ácido}} - A_{750 \text{ ácido}}) - (A_{664} - A_{750})] \times v}{V \times L}$$

Espectro de absorvancia amostra Marina Cascais, Abril 2006

- Método Lorenzen, 1967, para calcular Clorofila a e Feopigments



Redução de absorvância a 664nm
SE a amostra continha Chla pura,
A redução é de 1.8 – coeficiente R
na equação

SE a amostra continha apenas
Feofitina a, o valor de absorvância
A 664nm mantém-se. Não há redução

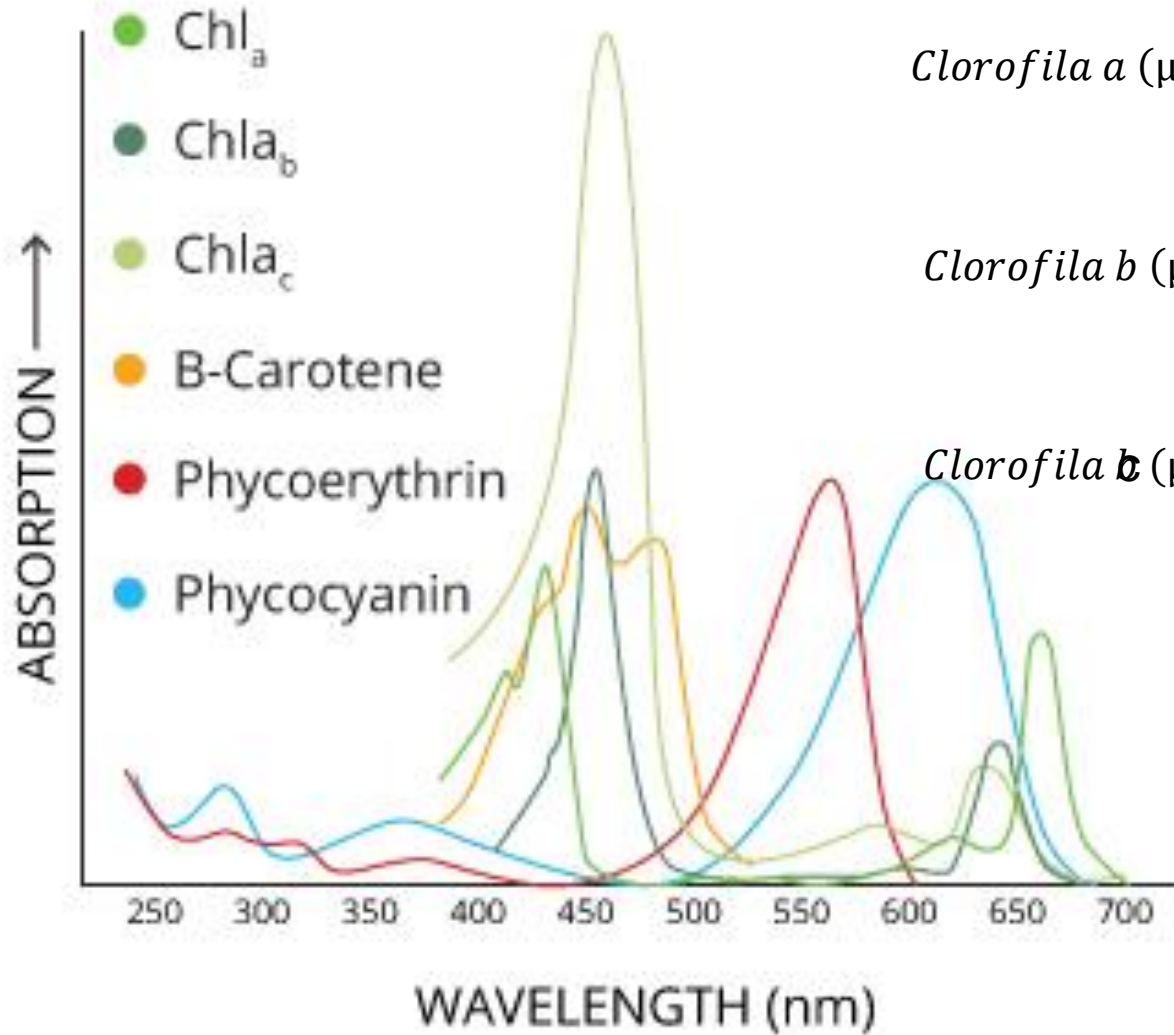
Assim a razão 664/664a varia
entre 1 e 1.8

Equações de Lorenzen, 1967

$$\text{Chl } a(\mu\text{gL}^{-1}) = \frac{A \times K \times [(A_{664} - A_{750}) - (A_{664 \text{ ácido}} - A_{750 \text{ ácido}})] \times v}{V \times L}$$

$$\text{Feopigment.}(\mu\text{gL}^{-1}) = \frac{A \times K \times [R(A_{664 \text{ ácido}} - A_{750 \text{ ácido}}) - (A_{664} - A_{750})] \times v}{V \times L}$$

Se, em alternativa, o objectivo for conhecer a concentração das três clorofilas principais, a, b, e c, utilizam-se as seguintes equações (Jeffrey & Humphrey, 1975):



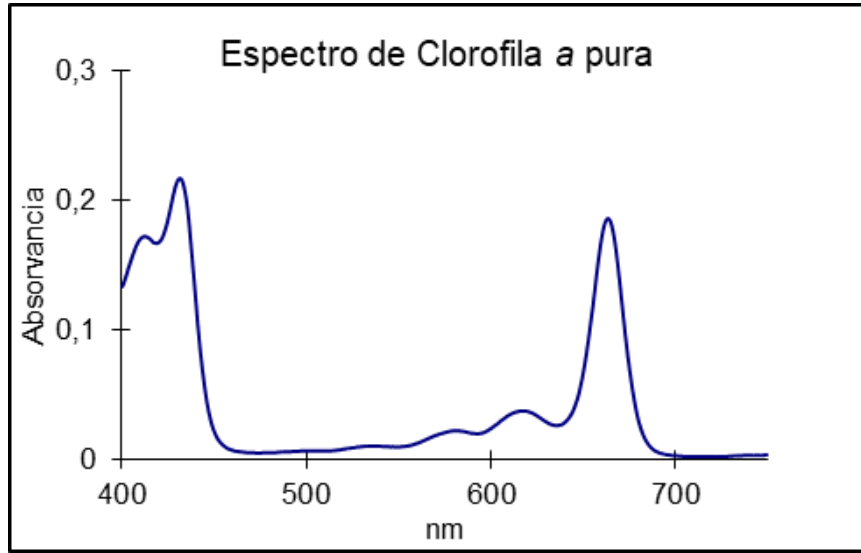
$$\text{Clorofila } a \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(11,85 \cdot A_{664} - 1,54 \cdot A_{647} - 0,086 \cdot A_{630}) \cdot v}{V \cdot L}$$

$$\text{Clorofila } b \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(21,03 \cdot A_{647} - 5,43 \cdot A_{664} - 2,66 \cdot A_{630}) \cdot v}{V \cdot L}$$

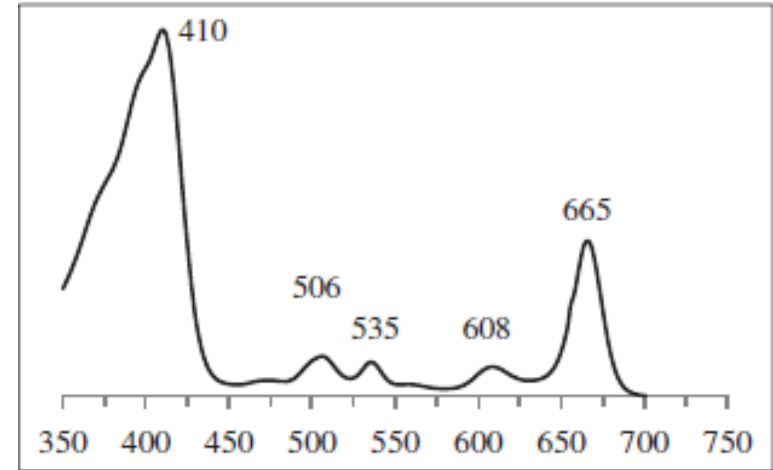
$$\text{Clorofila } c \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(24,52 \cdot A_{630} - 1,67 \cdot A_{664} - 7,60 \cdot A_{647}) \cdot v}{V \cdot L}$$

Espectro de absorvancia dos pigmentos puros

Feofitina a

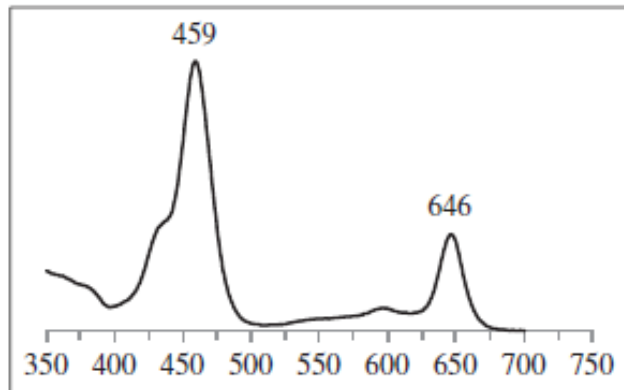


In HPLC solvent system 2



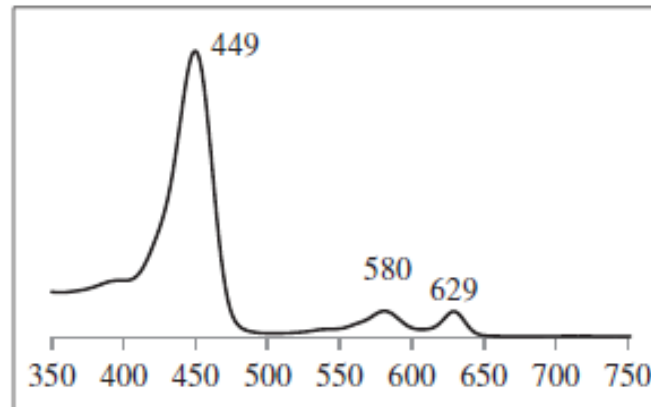
Clorofila b

In 90% acetone



Clorofila c2

In acetone



Equações para calcular a concentração das clorofilas a, b e c

$$\begin{aligned} & \text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g } L^{-1}) \\ & = \frac{((11,85 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 0,086 \cdot (A_{630} - A_{750}))) \cdot v}{V \cdot L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g } L^{-1}) \\ & = \frac{((21,03 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 5,43 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 2,66 \cdot (A_{630} - A_{750}))) \cdot v}{V \cdot L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Clorofila } c \text{ } (\mu\text{g } L^{-1}) \\ & = \frac{((24,52 \cdot (A_{630} - A_{750}) - 1,67 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 7,60 \cdot (A_{647} - A_{750}))) \cdot v}{V \cdot L} \end{aligned}$$

Bibliografia

- Brotas, V., 2019. Protocolo para determinação do conteúdo pigmentar no fitoplâncton, por espectrofotometria.
- Lorenzen, C. J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology & Oceanography* 12(2) 343-346.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. 1975 New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.