

Introdução Algologia Aplicada

Trabalhos práticos

Ana Amorim

Departamento de Biologia Vegetal

Índice

| | página |
|---|--------|
| 1. Preparação do meio de Cultura - Meio S (Spirulina) modificado | 3 |
| 1.1. Preparação das soluções stock de macronutrientes | 3 |
| 1.2. Preparação final do meio (para 1L de meio) | 4 |
| 2. Avaliação do crescimento em culturas de microalgas | 6 |
| 2.1. Introdução | 6 |
| 2.2. Avaliação do crescimento por densidade ótica | 9 |
| 2.2.1. Procedimento | 9 |
| 2.3. Avaliação do crescimento por peso seco | 10 |
| 2.3.1. Procedimento | 10 |
| 3. Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria: Clorofila <i>a</i> | 12 |
| 3.1. Introdução | 12 |
| 3.2. Procedimento | 12 |
| 3.2.1. Colheita de células por filtração | 13 |
| 3.2.2. Colheita de células por centrifugação | 13 |
| 3.2.3. Extração dos pigmentos | 14 |
| 3.2.4. Análise por espectrofotometria – determinação Clorofila <i>a</i> | 14 |
| 3.2.5. Cálculos | 14 |
| 4. Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria: Ficocianina | 16 |
| 4.1. Introdução | 16 |
| 4.2. Procedimento | 16 |
| 4.2.1. Preparação do tampão de extração (Para um volume final de 1L) | 17 |
| 4.2.2. Preparação da amostra | 17 |
| 4.2.3. Leitura no espectrofotómetro | 18 |
| 4.2.4. Cálculos | 18 |

Cultura de microalgas - Ensaio de produção de *Arthrospira maxima* (Cianobactéria)

Introdução

Na componente laboratorial de IAA pretende-se introduzir os alunos aos métodos básicos de produção de microalgas à escala laboratorial.

Para atingir este objetivo, os alunos irão desenvolver um projeto prático de produção de uma cianobactéria, *Arthrospira maxima*, sujeita a duas condições distintas de luz (luz branca e luz vermelha). No fim do ensaio, será avaliado o efeito da qualidade da luz na produção de pigmentos fotossintéticos, nomeadamente clorofila *a* e ficocianina os dois pigmentos mais abundantes em *A. maxima*, e na produção de biomassa.

Serão calculados, para a cultura inóculo e para a colheita final, o peso seco, a concentração de pigmentos e a razão entre eles. Será ainda calculada a taxa de crescimento da cultura para as duas condições.

1. Preparação do meio de Cultura - Meio S (Spirulina) modificado

O Meio S é um meio de água doce para cultivo de *Arthrospira maxima* (syn. *Spirulina maxima*). Todas as soluções stock e o meio são preparados com água destilada (dH₂O).

1.1. Preparação das soluções stock de macronutrientes (preparação na aula)

| Soluções Stock | |
|---|-------|
| | 100mL |
| | |
| NaHCO ₃ | n.a |
| K ₂ HPO ₄ | 5g |
| | |
| | |
| NaCl | 10g |
| NaNO ₃ | 25g |
| K ₂ SO ₄ | 10g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 2g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.4g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.1g |
| Na ₂ EDTA .2H ₂ O | 0.8g |

Notas:

O bicarbonato de sódio (NaHCO₃) não permite a preparação de uma solução stock devido à sua elevada concentração.

Na preparação de cada solução deve utilizar balões volumétricos para maior precisão. Deve começar por dissolver cada produto em cerca de $\frac{3}{4}$ do volume final de dH₂O. Só depois deverá perfazer o volume final.

O stock de K₂SO₄ deve ser ligeiramente aquecido (aprox. 80°C) durante a dissolução.

1.2. Preparação final do meio (para 1L de meio)

O meio é preparado em 2 soluções separadas, soluções 1 e 2 na tabela abaixo.

Na preparação das soluções deverá adicionar os diferentes nutrientes seguindo a ordem indicada na tabela. Deverá adicionar os nutrientes a cerca de $\frac{3}{4}$ do volume final de água, agitando bem entre cada adição, para evitar a formação de precipitados. Os volumes na tabela abaixo referem-se às soluções stock anteriormente preparadas.

O bicarbonato de sódio na solução 1 deverá ser dissolvido em cerca de 400mL de dH₂O antes da adição do fosfato de potássio.

As soluções 1 e 2 devem ser esterilizadas no autoclave separadamente e combinadas depois de frias, em volumes iguais, para evitar a formação de precipitados.

Depois das soluções autoclavadas o trabalho deve decorrer em condições de esterilidade.

| | | |
|----------------------|---|-------|
| Solução 1 (500ml) | NaHCO ₃ | 16.8g |
| | K ₂ HPO ₄ | 10 ml |
| Solução 2 (500ml) | NaCl | 10 ml |
| | CaCl ₂ .2H ₂ O | 10 ml |
| | NaNO ₃ | 10 ml |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | 10 ml |
| | Na ₂ EDTA .2H ₂ O | 10 ml |
| | K ₂ SO ₄ | 10 ml |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 10 ml |
| | Micronutrientes A* | 1ml |
| | Micronutrientes B* | 1ml |
| | | |

*As soluções de micronutrientes (A e B) são entregues já preparadas.

Composição das soluções stock de micronutrientes A e B

| Micronutrientes A | g.L ⁻¹ | Micronutrientes B | mg.L ⁻¹ |
|---|-------------------|---|--------------------|
| H ₃ BO ₃ | 0,286 | CoCl ₂ .6H ₂ O | 36,00 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 1,810 | NH ₄ VO ₃ | 23,00 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,222 | K ₈ Cr ₂ O ₇ | 28,00 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,074 | Ni(NO ₃) ₂ | 31,20 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,025 | Ti(SO ₄) ₃ | 8,00 |
| | | W ₂ SO ₄ .2H ₂ O | 17,94 |

Material:

- Água destilada
- Balões volumétricos 100ml ou 200ml (depende volume final de meio)
- Balões volumétricos de 1L e 2L
- Pipetas graduadas 5ml, 10ml, 20ml
- Pipetas pasteur plástico (acertar volumes)
- Copos de 250ml (para fazer a diluição dos reagentes)
- Copos (volume variável) para ter água para acerto dos volumes
- Funis
- Folha de alumínio para pesagens
- Colheres de pesagem
- Balanças
- Placas de aquecimento com agitação
- Agitadores magnéticos
- Canetas de acetato
- Reagentes
- Frascos para guardar soluções stock
- Frascos Schott (autoclavar soluções)
- Fita indicadora de autoclave

Bibliografia:

Vonshak, A. Appendix III – Growth Media and Conditions for Spirulina. In: Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis Ltd. (1997)

2. Avaliação do crescimento em culturas de microalgas

2.1 Introdução

Para avaliar o comportamento de uma cultura de microalgas e calcular a taxa de crescimento exponencial é necessário registrar ao longo do tempo parâmetros que sejam indicadores de crescimento. As metodologias mais usadas, dependendo das espécies, são a contagem celular e a determinação da densidade ótica no espectrofotómetro. Podem também ser usados alguns constituintes celulares como indicadores de biomassa, é o caso da clorofila *a*. A medição da densidade ótica é um método prático, não destrutivo, que permite rapidamente avaliar o crescimento num número elevado de amostras.

Para qualquer medição de avaliação de crescimento um passo decisivo é a correta colheita das sub-amostras. É fundamental que a cultura esteja bem homogeneizada para que a amostra seja representativa.

Depois de obtidos os dados estes devem ser representados num gráfico em função do tempo (dias, para microalgas). Para estas curvas poderá então calcular alguns parâmetros importantes na avaliação do crescimento: taxa de crescimento (r), determinada na fase exponencial, o tempo de duplicação ou de geração (T_2) e o número de duplicações por unidade de tempo k .

A curva de crescimento de uma cultura em *batch*, ou seja, em volume constante sem que haja adição de nutrientes, normalmente apresenta um comportamento em “J”. No início o crescimento não é visível, e esta fase é designada por “fase lag”. A duração da fase lag está dependente da concentração inicial do inóculo e da adaptação prévia do mesmo às condições de cultivo. Quanto mais concentrado for o inóculo inicial menor será a fase lag.

Segue-se uma fase de crescimento rápido correspondente à fase de crescimento exponencial. Esta fase corresponde a um período de crescimento em que a taxa de crescimento é constante e proporcional ao número de células.

Por fim, a curva irá atingir uma fase estacionária durante a qual não se observa crescimento. Esta fase corresponde a um período em que se atingiram condições limitantes para o desenvolvimento da cultura, por exemplo, esgotamento de nutrientes ou limitação pela luz devido a densidade celular muito elevada. Caso a cultura não seja transferida para novas condições entrará numa fase de declínio onde os processos de morte celular predominam.

A taxa de crescimento da fase exponencial é uma característica muito importante que permite comparar e avaliar as condições que melhor estimulam o crescimento de uma determinada estirpe/espécie. A taxa de crescimento na fase exponencial pode ser calculada a partir da equação diferencial (1):

$$(1) \quad \frac{dN}{dt} = rN$$

onde r representa a taxa de crescimento líquida e N representa a concentração celular ou biomassa.

A taxa líquida de crescimento r é resultado dos processos de reprodução e de morte podendo ser descrita como:

$$(2) \quad r = \mu - m$$

onde μ é a taxa bruta de crescimento e m a taxa de mortalidade ou de perda da população. A taxa líquida de crescimento pode ser positiva ou negativa consoante o processo de reprodução ou de morte seja o dominante. De salientar que também é possível determinada população ter uma elevada taxa bruta de crescimento, mas a taxa líquida de crescimento ser nula. Isto observa-se quando a taxa de mortalidade se aproxima da taxa bruta de crescimento.

A solução da equação diferencial (1) pode ser expressa de acordo com a seguinte equação (3):

$$(3) \quad N_t = N_0 e^{rt}$$

onde,

N_0 , dimensão da população no início do intervalo de tempo

N_t , dimensão da população no fim do intervalo de tempo

r , taxa líquida de crescimento

t , tempo

Resolvendo a equação em ordem a r obtêm-se a equação de uma reta cujo declive é a taxa líquida de crescimento r (4):

$$(4) \quad \ln N_t = rt + \ln N_0$$

A taxa de crescimento r pode ser calculada pela equação (5):

$$(5) \quad r(\text{dia}^{-1}) = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_t - t_0}$$

Onde, N_0 é a dimensão da população no início do intervalo de tempo (t_0) e

N_t a dimensão da população no tempo t_t .

N pode ser expresso em número de células, peso seco ou densidade ótica, entre outros parâmetros utilizados na avaliação do crescimento de uma população.

Outro parâmetro utilizado na caracterização do comportamento de uma cultura é o tempo de duplicação, isto é, o intervalo de tempo para que $N_t = 2N_0$.

Resolvendo a equação (5) acima:

$$(6) \quad \Delta t = T_2 \text{ (dia)} = \frac{\ln 2N_0 - \ln N_0}{r} = \frac{\ln 2}{r} = \frac{0,6931}{r}$$

Onde T_2 é o tempo de duplicação da população em dias.

Por sua vez o inverso de T_2 , corresponde ao número de duplicações por dia e é normalmente designado por k :

(3):

$$k \text{ (divisão dia}^{-1}\text{)} = \frac{r}{0,6931}$$

Em culturas produzidas em *batch*, durante a fase exponencial de crescimento assume-se que a mortalidade é zero, sendo $r=\mu$. Assim, é frequente utilizar o símbolo μ para designar a taxa de crescimento na fase exponencial.

Para melhor esclarecer os conceitos acima, apresenta-se o seguinte exemplo: Uma cultura a crescer com uma taxa k de uma divisão por dia, tem um tempo de duplicação T_2 de 1 dia e uma taxa de crescimento exponencial r de $0,69 \text{ d}^{-1}$.

Bibliografia

Graham L. E. & Wilcox, L. W., 2000. Algae. Prentice Hall, 640 pp

Wood, A. M., Everroad, R.C., Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen RA (ed) Algal Culturing Techniques Elsevier Academic Press 269-285.

2.2. Avaliação do crescimento por densidade ótica

No caso de *Arthrospira*, uma cianobactéria filamentosa, a contagem de células/filamentos é morosa e o método de avaliação de crescimento que será utilizado nas aulas será a leitura da densidade ótica (DO) a 540nm. Este parâmetro deverá ser avaliado pelo menos 1 vez por semana, idealmente 2 vezes.

Para ser possível utilizar a densidade ótica a 540nm como estimador do crescimento é necessário verificar que o incremento na DO corresponde efetivamente a um incremento na densidade populacional. Há vários fatores que podem afetar essa correspondência nomeadamente as características técnicas do equipamento, o comprimento de onda utilizado e a concentração da suspensão celular.

Uma técnica simples de avaliar o grau de correspondência consiste em diluir repetidamente para metade, com meio de cultura, uma suspensão celular densa e em seguida ler a densidade ótica das suspensões resultantes. A cada diluição da cultura, bem homogeneizada, corresponde uma redução para metade da concentração celular que deverá ser acompanhada por correspondente redução na DO.

2.2.1. Procedimento:

Material

- Microscópio
- ocular micrométrica
- lâminas e lamelas
- cultura densa de microalga (*Arthrospira maxima*.)
- tubos de centrifuga (15ml)
- suportes tubos
- cuvettes espectrofotómetro
- espectrofotómetro
- água destilada
- pipetas automáticas e pontas (5ml)
- papel "kleenex"
- recipiente para descartar amostras
- canetas marcadores
- lápiz
- folha de registo

- a. Antes de iniciar o trabalho deverá familiarizar-se com o organismo a estudar. Observe ao microscópio ótico uma gota de cultura de *A. maxima*. Observe e registre a morfologia dos filamentos. Procure identificar as células no filamento. Com a ocular micrométrica, meça o comprimento e largura de um filamento. Os filamentos são todos de igual comprimento? Que dimensão têm os mais pequenos?

Curva de diluição:

1. Coloque num tubo de centrifuga (15ml) cerca de 10ml da cultura fornecida.
2. Com a ajuda de uma pipeta automática, prepare 4 tubos de centrifuga com 4,5ml de água destilada. Coloque por ordem no suporte de tubos e registe $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$
3. Depois de bem homogeneizada a cultura mãe, retire 4,5ml que adiciona ao tubo $\frac{1}{2}$. Agite esta nova solução, retire 4,5ml e adicione ao tubo seguinte. Repita esta operação até à concentração mais baixa.
4. Leia a densidade ótica de cada suspensão no espectrofotómetro a 540nm. Certifique-se que a suspensão está bem homogeneizada antes de fazer a leitura. Os filamentos de *A. maxima* flutuam e tendem a alterar a sua distribuição na solução. É conveniente fazer as leituras com alguma rapidez. Utilize as cuvettes de plástico certificando-se que coloca a face de leitura na posição correta. Comece sempre da suspensão menos concentrada para a mais concentrada. Entre duas amostras lave a cuvette com umas gotas da amostra seguinte.
5. Faça um gráfico com os resultados e calcule a reta de regressão com os respetivos coeficientes.

2.3. Avaliação do crescimento por Peso Seco

A produção efetiva de matéria orgânica só pode ser avaliada através da determinação do peso seco (ou nalguns casos peso fresco) por unidade de volume de cultura. Para a determinação do peso seco é necessário colher uma amostra de volume conhecido da suspensão de microalgas, recolher as células por centrifugação ou filtração, e secá-las até ser atingido peso constante. Os resultados são depois expressos em g peso seco por unidade de volume de cultura.

2.3.1. Procedimento

Material

- sistema de filtração
- bomba de vácuo
- filtros fibra de vidro GF/C ou equivalente
- caixas de Petri de vidro
- balança
- estufa de secagem
- exsicador
- recipiente para guardar filtros pré-tarados
- lápiz

1. Preparar filtros pré-tarados: numerar com lápis de carvão junto ao bordo exterior filtros de fibra de vidro de 47mm (e.g. Whatman GF/C) e colocar numa

caixa de petri durante 24h numa estufa de secagem a 80°C. No fim desse período, transferir para um exsiccador e aguardar até atingir a temperatura ambiente (ca. 20m). Pesar e registar o peso seco do filtro numa tabela, tendo o cuidado de registar o respetivo número.

2. Utilizando um dos filtros do ponto anterior, filtre uma amostra da cultura de volume conhecido (25-50ml). Registar o volume. A pressão de vácuo não deve ultrapassar 310 milibar para evitar a rutura das células.
3. Lavar suavemente a amostra com água destilada para retirar sais que possam estar retidos.
4. Colocar o filtro numa caixa de Petri de vidro e levar à estufa a 60° C, 24h. No fim desse período, transferir para um exsiccador e aguardar até atingir a temperatura ambiente (ca. 20m). Pesar e registar o peso seco.
5. Calcule o peso seco de microalgas subtraindo o valor do peso do filtro tarado. Exprima os resultados por unidade de volume (gL^{-1}).

Os fatores que podem influenciar avaliação correta do peso seco são sobretudo a má agitação da cultura antes da subamostragem e a perda de células no processo de centrifugação ou filtração.

Bibliografia

Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. *In* Stein, J.R. (Ed.) Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press.

3. Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria: Clorofila a

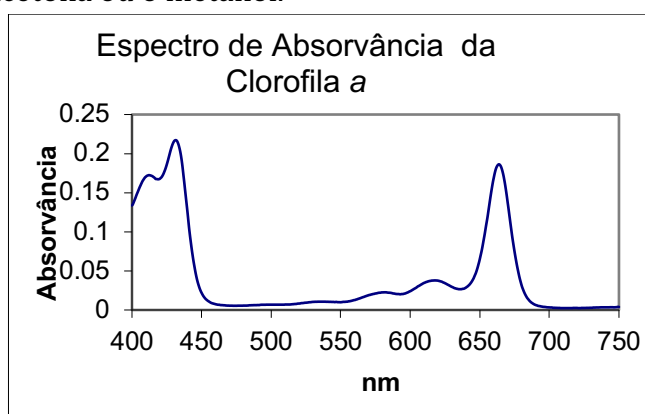
3.1. Introdução

A clorofila *a*, pigmento universalmente presente em todos os grupos taxonômicos de algas, pode ser utilizado como índice de biomassa, tanto para microalgas em cultura, como para fitoplâncton.

A relação entre a clorofila *a* e os outros pigmentos fotossintéticos indica-nos, para o fitoplancton, o tipo de populações dominante, e para as culturas, o estado fisiológico das células. Por exemplo, a proporção entre clorofila *a* e restantes pigmentos é superior para células jovens, e geralmente, tanto maior quanto menor for a intensidade luminosa a que a cultura estiver sujeita.

Desde a segunda metade do século passado que têm sido publicados trabalhos onde são propostas equações para a determinação da clorofila *a* em extratos de plantas e de fitoplâncton onde estão presentes simultaneamente outras clorofilas, nomeadamente clorofila *b*, clorofila *c*₁ e clorofila *c*₂. A precisão do método está dependente de vários fatores entre os quais a precisão dos coeficientes de extinção utilizados no desenvolvimento das equações, o solvente utilizado, a interferência da água presente nas células, a concentração das diferentes clorofilas no extrato e a proporção relativa em que ocorrem. Em 1997, Jeffrey e Welshmeyer publicaram uma revisão dos diferentes métodos onde comparam a precisão de cada um e fazem recomendações sobre qual o método mais adequado a cada tipo de amostra.

Para a determinação da concentração de clorofila *a* no ensaio laboratorial com a cianobactéria *Arthrospira maxima*, será utilizado o método de Yéprémian et al. (2016) conforme se descreve abaixo. Neste método o solvente utilizado na extração dos pigmentos é o etanol o que tem a vantagem de apresentar baixa toxicidade quando comparado com a acetona ou o metanol.



3.2. Procedimento

Todos os trabalhos que envolvam o estudo de pigmentos devem ser feitos longe de uma fonte de luz direta, preferencialmente na penumbra, para evitar a degradação pela luz dos pigmentos.

Material

- Dispositivo de filtração
- bomba de vácuo
- Filtros tipo Whatman GF/F ou GF/C de fibra de vidro com 0,7 e 1,2 μ m de poro respectivamente.
- Pinça.
- Tubos de centrífuga de 15 ml, com tampa de rosca.
- banho de temperatura regulável
- vortex
- Centrífuga (4000rpm=3220g)
- Banho de ultrasons.
- Kleenex.
- Papel de alumínio.
- Esguicho de água destilada.
- Etanol 100%.
- Espectrofotómetro.
- Cuvettes de vidro ou descartáveis de 3ml ou 1,5ml consoante o volume de extracto disponível.
- Pipetas automáticas e pontas: 1ml e P20 μ l, P200 μ l

3.2.1. Colheita de células por filtração

1. Filtrar 10 a 50ml de cultura. O volume a filtrar depende da concentração da cultura. Para evitar rebentar as células a pressão de vácuo não deverá exceder 310 milibar (pressão residual: 700 milibar).
2. Depois de filtrar, caso seja visível no filtro a retenção de água, secar ligeiramente pousando em cima de papel absorvente.
3. Dobrar os filtros com a pinça (evitar tocar com os dedos) e colocar nos tubos de centrífuga. Rolhar os tubos e envolver em papel de alumínio (as tampas devem ser de rosca para evitar que saltem durante a extração a quente). Caso a extração não se efetue de imediato, guardar no congelador a -20°C (podem ficar até 6 meses sem alteração da amostra). O método de preservação ideal consiste na congelação em azoto líquido imediatamente após a colheita das células.

3.2.2. Colheita de células por centrifugação

A colheita de células para extração dos pigmentos pode também ser feita por centrifugação, evitando em volumes de extração pequenos a interferência do volume do filtro. A força de centrifugação e o tempo variam com as células a serem estudadas.

1. Colocar um volume conhecido de cultura (10 ml) num tubo de centrífuga.

2. Depois de calibrar os tubos, centrifugar durante 5 min a 4000 rpm. É muito importante que os tubos estejam devidamente calibrados para evitar acidentes.
3. Retirar o sobrenadante.
4. Adicionar uns grãos de areia de quartzo e em seguida proceder à extração dos pigmentos.

3.2.3. Extração de pigmentos

1. Congele e descongele a amostra para rebentar as células. Nota: No ensaio laboratorial as amostras irão ficar guardadas no congelador até ao dia da extração sendo suficiente para rebentar as células.
2. Adicione 10ml de etanol a 100% e leve ao vortex agitando alternadamente a base e o topo do tubo para desfazer o filtro.
3. Coloque o tubo em banho maria durante 10 min a 75°C para extração da clorofila.
4. Leve a um banho de ultrassons cheio com água da torneira e gelo para evitar o sobreaquecimento do banho, durante 10 min. Este passo permite reduzir a turbidez do extrato.
5. Para amostras difíceis de extrair o processo de extração pode ser prolongado por 16h a 4°C. Caso não seja possível realizar as leituras no mesmo dia da extração, as amostras ficarão guardadas a -20°C até ao dia da leitura.
6. Centrifugar a amostra imediatamente antes da leitura durante 10 min, a 4000 rpm e 10°C. Certifique-se que não há resíduos do filtro em suspensão.

3.2.4. Análise por espectrofotometria – determinação clorofila *a*

1. Comece por fazer o branco do aparelho para os vários comprimentos de onda (c.d.o) necessários ao cálculo da concentração do pigmento de interesse usando o solvente de extração (neste caso 750 nm, 665 nm.).
2. Leia a absorvância do extrato a 750 nm, 665 nm. Comece sempre da solução menos concentrada para a mais concentrada. Entre duas amostras lave a cuvette com umas gotas da amostra seguinte.
3. Os valores a 750 nm são indicadores da turbidez não específica do extrato e deverão ser subtraídos aos valores de 665 nm quando forem realizados os cálculos. O valor a 750 nm não deverá exceder 0,010. A leitura a 665 nm, depois de corrigida, deverá situar-se entre 0,03 e 1,00.

3.2.5. Cálculos

Calcule a a concentração de clorofila *a* no **extrato** de acordo com a seguinte equação:

$$Chl\ a\ (\mu g\ ml^{-1}) = 11,90 \times (Abs_{665} - Abs_{750})$$

Calcule a concentração de clorofila *a* na **cultura** considerando o volume de solvente utilizado (*V*_e) e o volume de cultura filtrado (*V*_a) de acordo com a seguinte equação:

$$Chl a (\mu g ml^{-1}) = \frac{11,90 \times (Abs\ 665 - Abs\ 750) \times Ve \times Fd}{Va \times L}$$

onde:

Ve= volume de etanol (ml)

Va = Volume da amostra (ml)

L= trajeto ótico da cuvete (1cm)

Fd= Fator de diluição

Caso tenha realizado diluições do extrato deverá multiplicar o Ve pelo fator de diluição (Fd).

Registe os valores numa tabela. Depois de determinar a biomassa (gL^{-1}) da amostra equivalente à utilizada na determinação dos pigmentos, calcule a quantidade de clorofila *a* e faça os cálculos para mg pigmento/g peso seco de alga.

Bibliografia:

Jeffrey, S.W. e N.A. Welschmeyer, 1997. Appendix F: Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. *In: Phytoplankton pigments in oceanography, Monographs on oceanographic methodology*, Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura & S.W. Wright (Eds), pp 597-615. UNESCO publishing.

Yéprémian, C., Catherine, A., Bernard, C., Congestri, R., Elersek, T. and Pilkaityte, R. (2016) Chlorophyll a Extraction and Determination, in Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G. A. Codd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
doi: 10.1002/9781119068761.ch34

4. Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria: Ficocianina

4.1. Introdução

As cianobactérias possuem pigmentos fotossintéticos específicos, as ficobilinas (ficoeritrobilina e ficocianobilina), partilhados apenas com alguns grupos de algas, em particular as algas vermelhas. Estes pigmentos são responsáveis por captar luz em zonas do espectro luminoso onde a clorofila *a* não absorve e transferir essa energia para a clorofila. As ficobilinas estão ligadas covalentemente a proteínas específicas e são por isso designadas por ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas são classificadas de acordo com o seu espectro de absorção em ficocianina (pigmento azul), ficoeritrina (pigmento vermelho) e aloficocianina (pigmento azul claro). As ficobilinas encontram-se dispostas nas membranas fotossintéticas organizadas em complexos supramoleculares designados por ficobilissomas.

As ficobiliproteínas caracterizam-se por serem compostos hidrofílicos o que exige que os métodos de extração sejam distintos daqueles utilizados para os pigmentos lipofílicos (clorofilas e carotenoides) e conseqüentemente que os dois grupos de pigmentos não possam ser determinados num mesmo ensaio.

Tal como as clorofilas e os carotenoides a concentração das ficobiliproteínas pode ser estimada por espectrofotometria. Em *Arthrospira* a ficocianina é a ficobiliproteína dominante podendo chegar a representar até 20% do seu peso seco.

No ensaio de produção de *Arthrospira maxima* será avaliada a produção de ficocianina em culturas sujeitas a diferentes condições ambientais.

4.2. Procedimento

Lista de material

- Tampão de extração:
- Cloreto de Sódio (NaCl)
- Cloreto de Potássio (KCl)
- Fosfato de Sódio anidro dibásico (Na_2HPO_4)
- Fosfato de Potássio anidro monobásico (KH_2PO_4)
- Sais EDTA – disódio ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)
- 1L água MiliQ

Outros:

- Filtros GF/C fibra de vidro
- Tubos centrifuga 15ml com tampa
- Centrifuga (4000rpm=3220g)
- Banho ultra-sons
- Espectrofotómetro
- Cuvettes vidro ou descartáveis

4.2.1. Preparação do tampão de extração (Para um volume final de 1L)

1. Dissolva sequencialmente, 8,77 g de NaCl (concentração final 0,15 M), 2,01 g de KCl (concentração final 27 mM), 11,36 g de Na₂HPO₄ (concentração final 80 mM), 2,72 g de KH₂PO₄ (concentração final 20 mM) e 3,72 g de Na₂-EDTA (concentração final 10 mM).
2. Ajuste o pH para 7,45-7,50 com 3-4 ml de NaOH, 5 M (o aumento do pH facilita a dissolução do Na₂-EDTA).
3. Guarde a solução a 4°C até um máximo de 6 meses.

4.2.2. Preparação da amostra

Os passos que se seguem devem ser feitos com luz reduzida para evitar a degradação da ficocianina.

1. Filtrar a amostra num filtro de fibra de vidro GF/C. O volume final depende da concentração da amostra. Em amostras naturais varia entre 0,1L e 0,5L. Em amostras de culturas filtrar entre 5 ml e 50 ml. Para evitar rebentar as células a pressão de vácuo não deverá exceder 310 milibar (pressão residual: 700 milibar)
2. Depois de filtrar, caso seja visível no filtro a retenção de água, seque-o ligeiramente pousando em cima de papel absorvente e coloque dentro de um tubo de centrifuga de 15 ml. Tape o tubo com papel de alumínio para evitar a degradação dos pigmentos pela luz.
3. Congele e descongele a amostra para rebentar as células (os filtros podem ficar guardados a -20° C). Nota: As amostras irão ficar guardadas no congelador até ao dia da extração.
4. Adicione 10ml de tampão de extração e agite num vortex, alternadamente o topo e a base. A maceração com vareta não deve ser feita uma vez que os fragmentos do filtro são menos densos que o tampão e não será possível a obtenção de um extrato límpido.
5. Caso não seja possível a leitura imediata da amostra, coloque o tubo no frigorífico a 4° C durante 16 h (poderá deixar até uma semana nestas condições). Nota: As amostras não deverão ser colocadas a -20°C pois pode ocorrer a precipitação do tampão.
6. Se possível, para reduzir a turbidez do extrato, introduza o tubo num banho de ultra-sons durante 10 min. Deverá colocar gelo no banho para evitar a subida da temperatura.
7. Centrifugue a amostra a 3000 g, durante 20 min, a 4 °C. Certifique-se que não há restos do filtro em suspensão.

4.2.3. Leitura no espectrofotômetro

1. Comece por fazer o branco usando o tampão de extração (750nm, 650nm e 620nm).
2. Comece sempre a leitura das amostras da solução menos concentrada para a mais concentrada. Entre duas amostras lave a cuvette com umas gotas da amostra seguinte.
3. Leia a absorvância do extrato nos seguintes comprimentos de onda (c.d.o): 750 nm, 650 nm e 620 nm. Os valores a 750 nm são indicadores da turbidez não específica do extrato e deverão ser subtraídos aos valores de 650 nm e 620 nm. O valor a 750 nm não deverá exceder 0,010. As leituras nos outros dois c.d.o, depois de corrigidos, deverão situar-se entre 0,03 e 1,5.

4.2.4. Cálculos

1. Calcule a concentração de ficocianina no **extrato** de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Ficocianina (mg. ml}^{-1}\text{)} = \frac{((A_{620\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - 0,7x(A_{650\text{nm}} - A_{750\text{nm}}))}{7,38}$$

2. Calcule a concentração de ficocianina na **cultura**, considerando o volume de tampão utilizado e o volume de cultura filtrado, com base na seguinte equação:

$$\text{Ficocianina (mg. ml}^{-1}\text{)} = \frac{((A_{620\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - 0,7x(A_{650\text{nm}} - A_{750\text{nm}}))x V_e x F_d}{7,38 x V_a x L}$$

V_e = volume tampão extração (ml)

V_a = volume amostra (ml)

L = passo cuvette (no caso 1 cm)

F_d = fator de diluição

- a. Depois de determinar a biomassa (g L^{-1}) da amostra equivalente à utilizada na determinação dos pigmentos, calcule a quantidade de ficocianina por peso seco. Exprima os resultados em mg ficocianina/g peso seco alga.
- b. Faça uma tabela resumo dos resultados indicando, para cada amostra, os valores da quantificação de clorofila *a*, ficocianina e a razão ficocianina/clorofila *a*.

Bibliografia:

Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. *In Handbook of microalgae culture biotechnology and applied phycology* (Ed. A. Richmond), Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Yéprémian, C., Catherine, A., Bernard, C., Congestri, R., Elersek, T. and Pilkaityte, R. (2016) Phycocyanin Extraction and Determination. *In Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G. A. Codd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.