

## Botânica Marinha, 2º semestre 2019

### Protocolo para determinação do conteúdo pigmentar no fitoplâncton, por espectrofotometria

Vanda Brotas

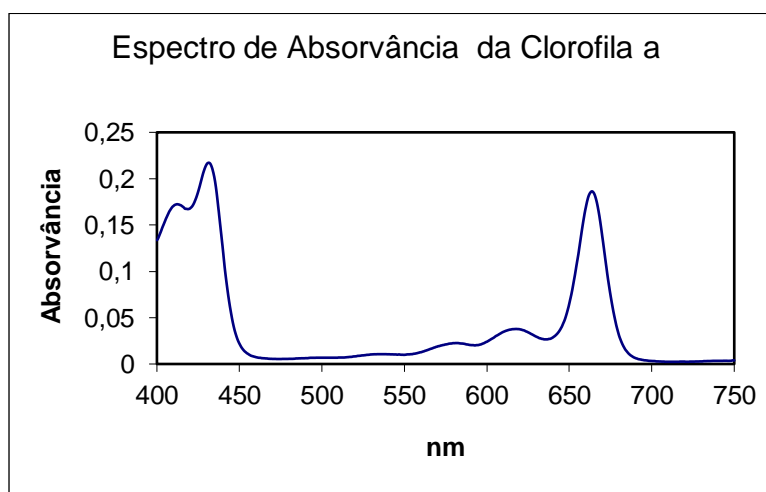
#### Introdução teórica

A clorofila *a*, pigmento universalmente presente em todos os grupos taxonómicos de algas, é utilizada como índice de biomassa, tanto para microalgas em cultura, como para fitoplâncton.

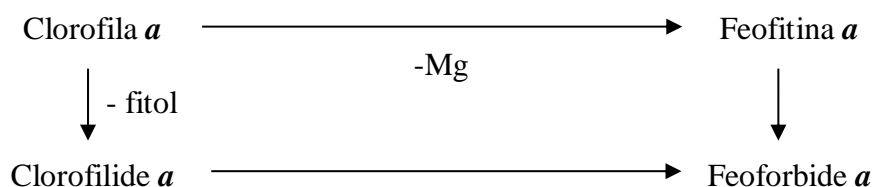
A relação entre a clorofila *a* e os outros pigmentos fotossintéticos indica-nos, para o fitoplâncton, o tipo de populações dominante, e para as culturas, o estado fisiológico das células. Por exemplo, a proporção entre clorofila *a* e restantes pigmentos é superior para células jovens, e geralmente,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

O método espectrofotométrico para detecção dos pigmentos, foi desenvolvido por Richard e Thompson, 1952, e normalizado pela SCOR-UNESCO (Unesco,1966). Este método tem sofrido algumas modificações, nomeadamente no que se refere aos valores dos coeficientes de absorção específica dos pigmentos (ou seja, quantidade de luz absorvida por unidade de peso).

Embora a acetona a 90% seja o solvente mais utilizado para o fitoplâncton, podem-se utilizar outros, tais como metanol, exano, dietiléter.



A estrutura química da clorofila *a* é alterada por diversos processos biológicos e físico-químicos que conduzem a derivados fotossinteticamente inactivos, mas que absorvem luz no mesmo c.d.o. que a molécula-mãe, de acordo com o esquema seguinte:



Todos estes compostos apresentam um espectro de absorção muito semelhante (em acetona a 90%, os picos da clorofila *a* são 664 e 430 nm e a feofitina *a* e feoforbide *a* a 667 e 410 nm); no entanto, a clorofila *a* tem um coeficiente específico de absorção superior ou seja, absorve maior quantidade de luz por unidade de peso. Baseando-se nesta característica, Lorenzen (1967) desenvolveu um método simples de distinguir, por espectrofotometria, a clorofila *a* dos seus derivados. Adicionando ácido diluído a uma solução contendo clorofila *a*, esta perde o átomo de Mg e transforma-se em feofitina *a*. A solução sofre uma redução na absorvância, que é proporcional à relação “clorofila *a* / feofitina *a* “ pré-existente; a redução tem o valor máximo de 0.56, ausência de feofitina *a*, e mínimo de 1, ausência de clorofila.

Note-se que com este método se podem distinguir os compostos com Mg, clorofila *a* e clorofilide *a*, dos compostos sem Mg, feofitina *a* e feoforbide *a*, os quais se designam globalmente por feopigmentos. Não existe nenhum método que, por espectrofotometria, isole a clorofilide *a* (Lorenzen & Jeffrey, 1980). O único método para separar todos estes compostos é por cromatografia. Note-se também que a designação feoforbide *a* engloba vários compostos (distinguíveis apenas por cromatografia), que se vão transformando uns nos outros, até finalizarem num composto incolor.

Apesar desta desvantagem, Lorenzen & Jeffrey (1980) aconselham este método para amostras em que a percentagem de formas degradadas da clorofila *a* seja elevada, nomeadamente para águas estuarinas.

O objectivo deste protocolo é aprender a medir a clorofila *a* por espectrofotometria, estimando a sua concentração por duas formas diferentes de cálculo. Uma que tem em conta os feopigmentos (Lorenzen 1967) e outra que tem em conta os outros dois tipos de clorofila, Chl *b* e Chl *c*, que nos dão indicação sobre o tipo de comunidades presentes.

## **Descrição do Método de Extração e Leitura no Espectrofotómetro**

A extração dos pigmentos é realizada em acetona aquosa a 90%, a frio (-20°C), no escuro, durante 18 a 24 horas. Para a determinação da clorofila *a* por este método, a absorvância do extracto é lida a 664 nm (pico da clorofila *a*) e a 750 nm (representa o valor da turbidez), antes e depois da adição de 12 µl de HCl a 0.5M por ml de solvente. O volume de amostra e o volume de acetona devem ser de modo a permitir que a absorvância do extracto a 664 nm se situe entre os limites de absorvância 0.05 e 0.8.

Para obter informação acerca do tipo de comunidades presentes, podem-se determinar as concentrações em clorofila *b* e clorofila *c*, registando-se para este efeito a absorvância a 647 e 630nm. Note-se que a determinação dos três tipos de clorofila por espectrofotometria é pouco precisa, sendo aconselhável, para este objectivo, a análise dos pigmentos por cromatografia.

## **MATERIAL**

- Dispositivo de filtração: rampa de filtração.
- Filtros tipo Whatman GF/F, de 0,7µm de poro, aproximadamente, e diâmetro 47 mm.
- Pinça.
- Tubos de centrífuga de 10 ou 15 ml.
- Vareta de vidro para macerar os filtros.
- Papel de alumínio.
- Centrífugadora de bancada
- Espectrofotómetro UV/VIS
- “cuvettes” de vidro.
- Kleenex.
- Esguicho de água destilada.
- Acetona 90% v/v.

## **PROTOCOLO**

- Filtração da amostra de água a analisar. O volume a filtrar depende da concentração da amostra. Para amostras de águas costeiras, deve ser de 1L a 1,5L.
- Filtros são dobrados com a pinça (evitar tocar com os dedos) e introduzidos nos tubos de centrífuga. Os tubos são rollados, envoltos em papel de alumínio e, se a extração não se efectua de imediato, guardados no congelador (podem ficar até 6 meses sem alteração da amostra).

-Processo de extracção: introduzir 3ml de acetona a 90% no tubo. Macerar cuidadosamente o filtro com a vareta de vidro, até que este se desfaça completamente. Adicionar o volume restante de acetona de modo a perfazer o total de 6ml. Este processo deve ser feito com o tubo envolto em papel de alumínio, dado que os pigmentos são fotolábeis. Os tubos são colocados no congelador (-20°C) durante 24h. Caso a leitura não seja feita nas 24h seguintes, as amostras podem manter-se no congelador durante alguns dias/semanas.

- Imediatamente antes da leitura no espectrofotómetro, os tubos são agitados vigorosamente e em seguida centrifugados a 3000rpm, durante 10min, numa centrifugadora de bancada.

- Leitura no espectofotómetro: acertar o zero do aparelho com acetona a 90%, ler cada amostra nos seguintes c.d.o.:

- Ler a absorvância a 750 nm. Esta leitura poderia ser suprimida, acertando-se o zero a 664 nm; no entanto, a leitura a 750 nm serve de teste em relação à existência de poeiras em suspensão: se o valor obtido é superior a 0.015-0.020, deve fazer-se nova pipetagem ou centrifugar de novo o extracto.

- Ler a absorvância a 664, 647 e 630 nm.

- Adicionar 12 µl de HCL a 0.5 M por ml de extracto, agitando em seguida.

- Ler de novo a absorvância a 664, 647 e 630 nm.

- Entre cada amostra lavar as “cuvettes” com acetona, água destilada e algumas gotas da amostra seguinte.

## CÁLCULOS

### Cálculo da concentração em clorofila e feopigmentos

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

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

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

Em que:

$A_{664}$  = absorvância da amostra a 664 nm.

$A_{664ac}$  = absorvância da amostra com ácido a 664 nm.

$v$  = volume de acetona usado para a extracção (ml)

$V$  = volume de água filtrado (l)

**L** = passo óptico da “cuvette” (1 cm)

**A** = 11.4 ( $L^{-1}$  mg cm), o que corresponde ao inverso de E (sendo E o coeficiente de extinção para a clorofila *a* em acetona a 90%, a 664 nm,  $87.67 L g^{-1} cm^{-1}$ )

**R** = valor máximo da razão  $664/664_{ac}$ , na ausência de feopigmentos, 1.8. (Note-se que este valor varia ligeiramente segundo os autores, devendo ser determinado experimentalmente, com clorofila *a* pura)

**K** = factor destinado a restabelecer a concentração inicial em clorofila *a* a partir da redução da absorvância,  $= R / (R-1)$ , ou seja, 2.25.

### **Cálculo das concentrações em Clorofila a, b e c.**

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):

Para calcular a concentração do pigmento na água  $\mu g L^{-1}$  (ou  $mg m^{-3}$ ), o resultado de cada equação anterior é ponderado pelo volume do solvente de extracção, pelo passo da cuvette e pelo volume filtrado. Nota, na equação, aos cdo 664, 647 e 630nm, diminui-se o valor da turbidez a 750nm. :

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

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

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

### **Notas sobre as unidades**

A constante 11,4 da fórmula de Lorenzen 1967 ou a constante 11,85 de Jeffrey & Humphrey 1975 anexa à absorvência da clorofila *a* correspondem ao inverso de  $\alpha$ , o coeficiente de extinção para a clorofila *a*.

De notar que estas constantes têm como unidade ( $L^{-1} \text{ mg cm}$ ), o que corresponde ao inverso de E (sendo E o coeficiente de extinção para a clorofila *a* em acetona a 90%, a 664 nm,  $87.67 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

O valor de  $\alpha$  pode ser procurado na bibliografia, varia ligeiramente consoante os autores. Na fórmula de Lorenzen, é usado o coeficiente de extinção para a clorofila *a* em acetona a 90%, a 664 nm,  $87.67 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , para a fórmula de Jeffrey é usado 83.822, ou seja,  $1 \cdot 1000 / 11.93 = 83.822$ .

Logo, as unidades de 11.85 são:  $L^{-1} \text{ mg cm}$  (reparem que o no numerador aparece o factor 1000 para passar de g a mg)

A absorvância não tem unidades.

Assim,

$$\text{Clorofila } a = \frac{[11,85 (L^{-1} \text{ mg cm}) \cdot A_{664}] \cdot \text{vol acetona (ml)}}{\text{Vol filtrado (L)} \cdot L \text{ (cm)}}$$

$$\text{Em relação às unidades} = \frac{\cancel{L}^{-1} \text{ mg } \cancel{\text{cm}} \cdot 10^{-3} \cancel{L}}{L \cdot \cancel{\text{cm}}} = \frac{\text{mg} \cdot 10^{-3}}{L} = \mu\text{g } L^{-1}$$

## BIBLIOGRAFIA

Jeffrey, S.W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls  $a$ ,  $b$ ,  $c_1$ , and  $c_2$  in higher plants, algae and Natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen, 167, p. 191-194.

Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura & S.W. Wright. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology. Unesco publishing. –

Lorenzen, C. J. & Jeffrey, S.W. 1980. Determination of chlorophyll in seawater. Report of intercalibration tests. Unesco Technical papers in marine science. 35, 21p.

Unesco, 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Report of the SCOR-UNESCO working group 17. Monographs on Oceanographic Methodology, 69p.

