

**NORMALIZAÇÃO TÉCNICA**



**L5.306**

---

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - SÃO PAULO - BRASIL

---

**Determinação de Pigmentos Fotossintetizantes  
Clorofila - A, B e C e Feofitina - A**

PRIMEIRA EDIÇÃO - 10.01.78

---

CDU - 577.472

REF - CETESB - L5.306

**PALAVRAS-CHAVE:** Águas • Pigmentos fotossintetizantes • Clorofila  
• Feofitina

*À CETESB, como órgão de tecnologia na área do saneamento ambiental, cabe a tarefa de atuar na normalização técnica do País. Nesse sentido seu trabalho constitui, a qualquer tempo, uma contribuição às Normas Brasileiras correspondentes.*

## SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO .....	1
1 OBJETIVO .....	2
2 REFERÊNCIAS .....	3
3 DEFINIÇÕES .....	3
4 APARELHAGEM .....	3
5 EXECUÇÃO DO ENSAIO .....	5
6 RESULTADOS .....	7
ANEXO A .....	11
ANEXO B .....	13
ANEXO C .....	15
ANEXO D .....	19

## INTRODUÇÃO

A natureza do universo físico define uma gama de interações possíveis entre a energia na forma de radiações eletromagnéticas e a matéria. A radiação que consideramos como luz (entre 360 a 760  $m\mu$ ), permite aos sistemas vivos captar este tipo de energia para ser utilizada em reações químicas.

Praticamente, toda energia eletromagnética que flue através dos ecossistemas entra na forma de fótons, segundo comprimentos de onda definidos, que além de promover uma série de reações fotoquímicas e calor, são captadas por moléculas de pigmentos de tipos diversos que formam parte dos cloroplastos encontrados nas células vegetais: as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas.

Há muito tempo conhece-se os espectros de ação de cada um dos diversos pigmentos. As clorofilas são derivadas da porfirina, de peso molecular ao redor de 900, contendo um átomo de magnésio e com dois máximos de absorção da luz, a 430  $m\mu$  e a 663  $m\mu$ . Os carotenóides consistem de cadeias alifáticas, com peso molecular ao redor de 600, e com absorção máxima na faixa de 400  $m\mu$  a 500  $m\mu$ . As ficobilinas (ficoeritrinas e ficocianinas) são proteínas solúveis em água, com um grupo prostético tetrapirrólico, não em anel como as clorofilas, mas em cadeia aberta, e com absorção máxima na região de 500  $m\mu$  a 600  $m\mu$ .

Cada um desses tipos de moléculas captam, pois, seletivamente, fótons de comprimentos de onda definidos — cujo espectro de absorção pode ser visto na Fig. 1 — e utilizam essa energia para desencadear o processo fotossintético.

Nos ambientes aquáticos em geral, este processo ocorre somente no interior da zona eufótica, sendo efetuado pelas algas microscópicas que integram as comunidades fitoplânctônicas, e pelas macrófitas submersas. Esta vegetação aquática engloba uma variedade muito grande de diferentes grupos.

Cada grupo vegetal apresenta pigmentos típicos (Tabela 1), sendo as moléculas de clorofila-a comuns a todos eles, com exceção das bactérias.

Tais pigmentos absorvem as radiações que chamamos luminosas e as convertem em energia química, mediante a redução de compostos de carbono (fotossíntese).

Devido à sua importância na fotossíntese, as medidas de pigmentos fotossintetizantes têm recebido atenções especiais nos últimos tempos. Além dos carotenóides e ficobilinas, destaca-se como pigmento fotossintetizante a clorofila. Na verdade, existem vários tipos de clorofila, porém as mais conhecidas são a *a*, *b* e *c*, e delas, a clorofila-*a* é a mais comum (Figura 2).

Todos esses três tipos de clorofilas são comumente encontrados em algas planctônicas; porém, a clorofila-*a* consiste aproximadamente de 1 a 2% do peso seco do material orgânico em todas as algas planctônicas e é, por isso, um indicador preferido para estimar a biomassa algal.

Entretanto, as moléculas de clorofila não são estáveis; dependendo das condições do meio, tais como mudanças do pH, temperatura, ou luminosidade excessiva, elas podem sofrer degradação, originando produtos conhecidos como feo-pigmentos. A feofitina-*a* é um produto da degradação da clorofila-*a*, que pode interferir grandemente nas medidas deste pigmento, por absorver luz na mesma região do espectro que a clorofila-*a*. A relação entre clorofila-*a* e feofitina-*a* serve também como um bom indicador do estado fisiológico do fitoplâncton.

Dois métodos desejáveis para a determinação de pigmentos são conhecidos: o método espectrofotométrico e o método fluorimétrico. O método fluorimétrico é mais sensível, requerendo menor volume de água, e tem sido adaptado para medidas "in vivo". O método espectrofotométrico de Richards & Thompson (1952), modificado por Creitz & Richards (1955), para estimar os pigmentos do plâncton, tem sido amplamente usado; este método envolve a medida da absorvância em três comprimentos de onda, para estimar a clorofila-*a*, *b* e *c*, e é conhecido como método *tricomático*.

Strickland & Parsons (1963) propuseram modificações das equações usadas para estimar a quantidade de pigmentos com bases nos coeficientes de absorção específica. As equações dadas dependem, para a sua validade, da ausência ou presença de feo-pigmentos.

Lorenzen (1967) propôs um método eficiente para estimar as concentrações de feofitina-*a* e clorofila-*a*, através de leituras espectrofotométricas antes e após acidificação da amostra; e um estudo detalhado das metodologias foi apresentado pela UNESCO (1966).

Muitos autores têm demonstrado que os produtos de degradação da clorofila-*a* podem às vezes constituir uma fração significativa dos pigmentos verdes totais, presentes na água. Essas formas degradadas, ou clorofilas inativas, absorvem luz na parte vermelha do espectro; e se presentes em concentrações relativamente significativas à clorofila-*a*, um sério erro pode ser introduzido nos dados de clorofila usando as presentes técnicas espectrofotométricas, porque a absorção da luz pelas formas degradadas não é distinguida daquela absorvida pela clorofila ativa. Desta forma, há necessidade de se efetuar uma correção, como está explicada no conteúdo.

Nesta Norma, apresentamos apenas o método espectrofotométrico para a determinação de clorofila-*a*, *b* e *c* e feofitina-*a*.

## 1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método espectrofotométrico para a determinação de pigmentos fotossintetizantes (clorofila-*a*, *b*, *c* e feofitina-*a*).

1.2 A medida de tais pigmentos:

- a) aplica-se a programas de monitoramento e levantamento ecológico, permitindo demonstrar o potencial orgânico local, em termos de "standing-stock" por clorofila-*a*, e o grau de eutrofização de um ambiente aquático.
- b) é de grande importância nos estudos de produtividade primária.
- c) é de grande importância em estudos de poluição orgânica ou industrial.
- d) é utilizada na interpretação de várias análises físico-químicas, e vice-versa.
- e) serve como indicador do estado fisiológico do fitoplâncton através da relação clorofila-*a*/feofitina-*a*.

- f) finalmente, por envolver uma metodologia relativamente simples e eficiente, as determinações espectrofotométricas de pigmentos têm sido amplamente usadas, especialmente no caso de clorofila-a, que por representar cerca de 1 a 2% do peso seco do material orgânico das algas planctônicas, tem sido um indicador para estimar a biomassa algal.

## 2 REFERÊNCIAS

- a) Norma CETESB – L5.302 – Fitoplâncton Marinho.

## 3 DEFINIÇÕES

**3.1 Ecossistema:** Entende-se por ecossistema ou sistema ecológico, qualquer unidade que inclua todos os organismos em uma determinada área interagindo com o ambiente físico, de tal forma que um fluxo de energia leva a uma estrutura trófica definida, diversidade biótica e reciclagem de material (troca de material entre componentes vivos e não vivos).

**3.2 Fotossíntese:** É o processo de conversão de dióxido de carbono para carbono orgânico (carboidratos) que ocorre ao nível dos cloroplastos pela ação da energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (especialmente clorofila).

**3.3 Biomassa:** É a quantidade de material vivo que pode ser expressa em peso, volume, área ou número.

**3.3.1 "Standing-stock" por clorofila-a,** refere-se à quantidade desse pigmento em peso, por unidade de volume.

**3.4 Eutroficação ou eutrofização:** refere-se à edição natural ou artificial de elementos nutritivos a um corpo d'água, que pode promover o crescimento algal.

**3.5 Eutrófico:** Ambiente de alta produtividade primária, devido ao elevado teor de nutrientes, possuindo elevadas densidades de fitoplâncton.

**3.6 Oligotrófico:** Ambiente de baixa produtividade primária, devido à pequena quantidade de nutrientes, que são insuficientes para produzir altas densidades de fitoplâncton.

## 4 APARELHAGEM

### 4.1 Aparelhos para amostragem

**4.1.1 Garrafas:** As amostras de água destinadas às análises de pigmentos fotossintetizantes devem ser coletadas com garrafas apropriadas, tipo Van Dorn ou tipo Nansen, por exemplo (detalhes sobre o seu funcionamento na Norma CETESB L5.302-Fitoplâncton Marinho). Tais garrafas permitem que se determine estratificações ao longo da coluna d'água, pois podem ser lançadas a quaisquer profundidades, presas a um cabo, e fecham automaticamente através de um dispositivo (mensageiro) enviado através do cabo, coletando assim água da profundidade desejada.

**4.1.2 Provetas de 1000 ml.**

**4.1.3 Frascos plásticos, escuros, com capacidade para 5 litros.**

**4.1.4 Frasco escuro de boca larga, com sílica-gel no interior.**

faz-se a leitura da absorvância em todos os comprimentos de onda, verificando-se em que comprimento de onda se dá o pico de maior absorvância; se, por exemplo, obtivermos esse pico em 655  $m\mu$ , significa que as leituras deverão ser feitas 8  $m\mu$  abaixo dos valores constantes das fórmulas, ou seja, em 742  $m\mu$  em vez de 750  $m\mu$ ; em 655  $m\mu$  em vez de 663  $m\mu$ ; em 637  $m\mu$  em vez de 645  $m\mu$ ; e em 662  $m\mu$  em vez de 630  $m\mu$ .

#### 4.4 Reagentes

4.4.1 Solução de carbonato de magnésio ( $MgCO_3$ ) a 1%.

4.4.1.1 Preparo da solução 4.4.1: Dissolver 1 g de carbonato de magnésio finamente pulverizado em 100 ml de água destilada.

4.4.2 Acetona 90%.

4.4.2.1 Preparo da solução 4.4.2: Elevar a 1 litro, com água destilada, 900 ml de acetona p.a.

4.4.3 Ácido clorídrico 1 N.

4.4.3.1 Preparo da solução 4.4.3: Adicionar 32,8 ml de ácido clorídrico p.a. em 1 litro de água destilada.

### 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

#### 5.1 Princípio do método

5.1.1 As concentrações de clorofila-a, b e c e feofitina-a são determinadas espectrofotometricamente, através das leituras das densidades ópticas obtidas em três comprimentos de onda definidos.

5.1.2 O método fornece resultados em termos de peso dos referidos pigmentos por unidade de volume.

#### 5.2 Amostragem

5.2.1 As amostras destinadas às determinações espectrofotométricas dos pigmentos são coletadas com garrafas apropriadas (4.1.1).

5.2.2 O método consiste em se descer a garrafa aberta à profundidade desejada, após o que um mensageiro é enviado pelo cabo, promovendo o fechamento da garrafa, que é trazida então à superfície, contendo no seu interior água da profundidade de coleta.

5.2.3 A amostra trazida à superfície deve ser filtrada imediatamente após a coleta, em filtros especiais (4.1.7) devidamente colocados em porta-filtros acoplado a um kitasato de 2 litros (4.1.12). Nesse procedimento, utiliza-se uma bomba de vácuo, tendo-se o cuidado de sempre manusear os filtros com uma pinça adequada.

5.2.4 Adicionar, preferencialmente nos últimos 100 ml filtrados, 1 ml de carbonato de magnésio a 1% por litro de

amostra. Este tratamento é importantíssimo, pois previne alterações do pH do meio (acidificação do filtrado), que poderia acelerar o processo de degradação das moléculas de clorofila-a.

5.2.5 Caso a filtração de imediato não seja possível, armazenar a amostra em frascos de plástico, ao abrigo da luz e no gelo, tendo-se o cuidado de adicionar 1 ml de carbonato de magnésio a 1% por litro da amostra, e filtrar imediatamente, assim que houver condições.

5.2.6 O volume de água a ser filtrado para tais análises geralmente varia de 0,5 a 5 litros, dependendo do ambiente (em ambientes eutróficos, a quantidade é menor, enquanto que em ambiente oligotróficos, deve ser maior).

5.2.7 Terminada a filtração da amostra, lavar o porta-filtros com água destilada contida em pissetes, deixar secar o filtro por alguns segundos e retirá-lo cuidadosamente com uma pinça, guardando-o em envelopes, devidamente fechados, e contendo indicações como: nº da amostra, local de coleta, hora da coleta, volume filtrado, profundidade da coleta, data.

5.2.8 Devido ao fato de que à temperatura ambiente e sob a ação da luz as moléculas de clorofila degradam muito rapidamente, os envelopes contendo a amostra devem ser colocados imediatamente em frascos escuros, com sílica-gel, guardado numa caixa de isopor com gelo.

5.2.9 Preencher a ficha de coleta adequadamente (Anexo A), com dados como: data, local de coleta, hora, profundidade de coleta, nº da amostra (ou nº do envelope), volume filtrado, transparência da água, temperatura do ar e da água, etc.

5.2.10 Se a amostra não puder ser preparada para ensaio, imediatamente após a chegada ao laboratório, o frasco contendo os envelopes com os filtros deve ser transferido a um "freezer" a 10°C. Nessas condições, o material não sofre alterações por vários dias. (PRAZO - 15 DIAS)

### 5.3 Procedimento

#### 5.3.1 Preparação da amostra para ensaio

5.3.1.1 Este procedimento deve ser realizado o mais rápido possível, evitando exposição prolongada à luz, bem como elevação da temperatura.

5.3.1.2 Retirar a amostra do envelope, e recortar a parte periférica do filtro não usada como área útil de filtração.

5.3.1.3 Colocar a amostra em tubos de centrífuga de 15 ml e adicionar 10 ml de acetona 90%, macerando cuidadosamente com um bastão de vidro para filtros de fibra de vidro: quando se usa filtros de membrana, despreza-se esta etapa, pelo fato desses filtros serem solúveis em acetona.

5.3.1.4 Marcar o nº da amostra correspondente no tubo, envolvê-lo integralmente com folha de alumínio para garantir que nenhuma luz esteja atingindo a amostra, e deixá-lo no congelador de um refrigerador durante 24 horas, para completar a extração.

#### 5.3.2 Procedimento do ensaio

5.3.2.1 Terminado o tempo de extração, retirar os tubos do refrigerador, colocá-los numa centrífuga e centrifugar durante 10 minutos a 2600 - 3000 rpm.

5.3.2.2 Colocar o sobrenadante em cubetas espectrofotométricas de 1 cm de caminho óptico e ler contra um branco de acetona 90%.  
1,8cm

*Nota:* Para águas límpidas, não produtivas, cubetas de 5 ou 10 cm de caminho óptico podem ser usadas para aumentar a sensibilidade de leitura.

5.3.2.3 Determinar a densidade óptica (DO) da solução a 750, 663, 645 e 630 m $\mu$  e anotá-las numa ficha de leitura (Anexo B).

5.3.2.4 A correção para feofitina-a é feita acidificando-se a solução contida nas cubetas, após a 1ª leitura, pela adição de 2 gotas de ácido clorídrico 1N (4.4.3); determinar as densidades ópticas após acidificação, a 750 e 663 m $\mu$  (pico máximo de absorção da feofitina-a) e anotar os dados numa ficha de leitura (Anexo B).

*Nota:* É importante que a leitura após acidificação seja feita pelo menos um minuto, mas não mais que dois minutos após a adição do ácido.

5.3.2.5 Terminadas as leituras, desprezar as soluções das cubetas e lavá-las com acetona 90%. Guardá-las secas e eficientemente limpas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 As leituras a 750 m $\mu$  medem apenas a turbidez da amostra. Esta leitura deve ser subtraída das densidades ópticas lidas a 663, 645, 630 m $\mu$  antes e depois da acidificação, obtendo-se assim as leituras corrigidas.

6.1.2 As concentrações de clorofila-a, b e c podem ser obtidas a partir das seguintes equações tricromáticas:

$$\text{clorofila-a (b, c) } (\mu\text{g/l}) = \text{Ca, b, c} \cdot \left( \frac{V}{V \cdot L} \right) \quad (1)$$

onde:

V = volume, em litros, da água filtrada para extração

v = volume, em ml, da acetona 90% usada

L = caminho óptico, em cm da cubeta usada

e:

$$\text{Ca} = 11,64 \cdot D_{663} - 2,16 \cdot D_{645} + 0,10 \cdot D_{630} \quad (2)$$

$$\text{Cb} = 20,97 \cdot D_{645} - 3,94 \cdot D_{663} - 3,66 \cdot D_{630} \quad (3)$$

$$\text{Cc} = 54,22 \cdot D_{630} - 14,81 \cdot D_{645} - 5,53 \cdot D_{663} \quad (4)$$

onde:

D<sub>663</sub>, D<sub>645</sub> e D<sub>630</sub> correspondem às densidades ópticas corrigidas (6.1.1).

6.1.3 Para calcular a concentração da clorofila-a e feofitina-a, contidas na amostra por unidade de volume, podemos usar as seguintes equações monocromáticas:

SO ESTE  $\rightarrow$

$$\text{Clorofila-a } (\mu\text{g/l}) = 26,73 (D_{663b} - D_{663a}) \cdot \left( \frac{V}{V \cdot L} \right) \quad (5)$$

$$\text{Feofitina-a } (\mu\text{g/l}) = 26,73 (1,7 \cdot D_{663a} - D_{663b}) \cdot \left( \frac{V}{V \cdot L} \right) \quad (6)$$

onde:

V = volume, em litros, da água filtrada para extração.

$v$  = volume, em ml, da acetona 90% usada.

$L$  = caminho óptico, em cm, da cubeta espectrofotométrica usada.

e:

$D_{663b}$  = densidade óptica a 663  $m\mu$ , corrigida (6.1.1), obtida antes da acidificação.

$D_{663a}$  = densidade óptica a 663  $m\mu$ , corrigida, obtida após a acidificação.

## 6.2 Exemplos

6.2.1 Foram filtrados 700 ml de água para extração dos pigmentos.

6.2.2 Foi utilizada uma cubeta espectrofotométrica de 1 cm de caminho óptico.

6.2.3 As leituras obtidas antes da acidificação foram:

$$D_{750b} = 0,002 \quad - 99/T$$

$$D_{663b} = 0,146 \quad - 71/T$$

$$D_{645b} = 0,037$$

$$D_{630b} = 0,038$$

6.2.4 As leituras obtidas após acidificação foram:

$$D_{750a} = 0,003 \quad - 99/T$$

$$D_{663a} = 0,091 \quad - 81/T$$

6.2.5 Cálculos com as leituras obtidas antes da acidificação.

6.2.5.1 Correção da turbidez:

$$D_{663b} - D_{750b} = D_{663b} \text{ corrigido} = 0,144$$

$$D_{645b} - D_{750b} = D_{645b} \text{ corrigido} = 0,035$$

$$D_{630b} - D_{750b} = D_{630b} \text{ corrigido} = 0,036$$

6.2.5.2 Substituição dos referidos valores nas equações (2), (3) e (4):

Equação (2)

$$C_a = 11,64 \cdot 0,144 - 2,16 \cdot 0,035 + 0,10 \cdot 0,036$$

$$C_a = 1,604$$

Equação (3)

$$C_b = 20,97 \cdot 0,035 - 3,94 \cdot 0,144 - 3,66 \cdot 0,036$$

$$C_b = 0,035$$

Equação (4)

$$C_c = 54,22 \cdot 0,036 - 14,8 \cdot 0,035 - 5,53 \cdot 0,144$$

$$C_c = 0,637$$

6.2.5.3 Substituindo-se os valores obtidos no item 6.2.5.2, na equação (1), obtemos:

$$C_a = 1,604 \cdot \frac{10}{0,7 \cdot 1} = 22,91 \mu\text{g/l de clorofila-a}$$

$$C_b = 0,035 \cdot \frac{10}{0,7 \cdot 1} = 0,50 \mu\text{g/l de clorofila-b}$$

$$C_c = 0,637 \cdot \frac{10}{0,7 \cdot 1} = 9,10 \mu\text{g/l de clorofila-c}$$

## 6.2.6 Cálculos com as leituras obtidas após a acidificação.

### 6.2.6.1 Correção da turbidez.

$$D_{663a} - D_{750a} = D_{663a} \text{ corrigido: } 0,091 - 0,003 = 0,088$$

### 6.2.6.2 Substituição dos valores obtidos nos itens 6.2.5.1 e 6.2.6.1, nas equações (5) e (6):

Equação (5)

$$C_a = 26,73 \cdot (0,144 - 0,088) = 1,496 \text{ (X)}$$

Equação (6)

$$F_a = 26,73 \cdot (1,7 \cdot 0,088 - 0,144) = 0,133$$

### 6.2.6.3 Substituindo-se os valores obtidos no item 6.2.6.2 na equação (1), obtemos:

$$C_a = 1,496 \cdot \frac{10}{0,7 \cdot 1} = 21,37 \mu\text{g/l de clorofila-a}$$

$$F_a = 0,133 \cdot \frac{10}{0,7 \cdot 1} = 1,90 \mu\text{g/l de feofitina-a}$$



**ANEXO B – FICHA DE LEITURA: CLOROFILA**

Nº DA AMOSTRA	PROCEDÊNCIA OU PROGRAMA	VOLUME FILTRADO	TRATAMENTO	LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS (λ)			
				750 mμ	663 mμ	645 mμ	630 mμ
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				
			Sa				
			Ca				

(\*) Sa = leituras antes da acidificação.  
Ca = leituras após a acidificação.

ANEXO C

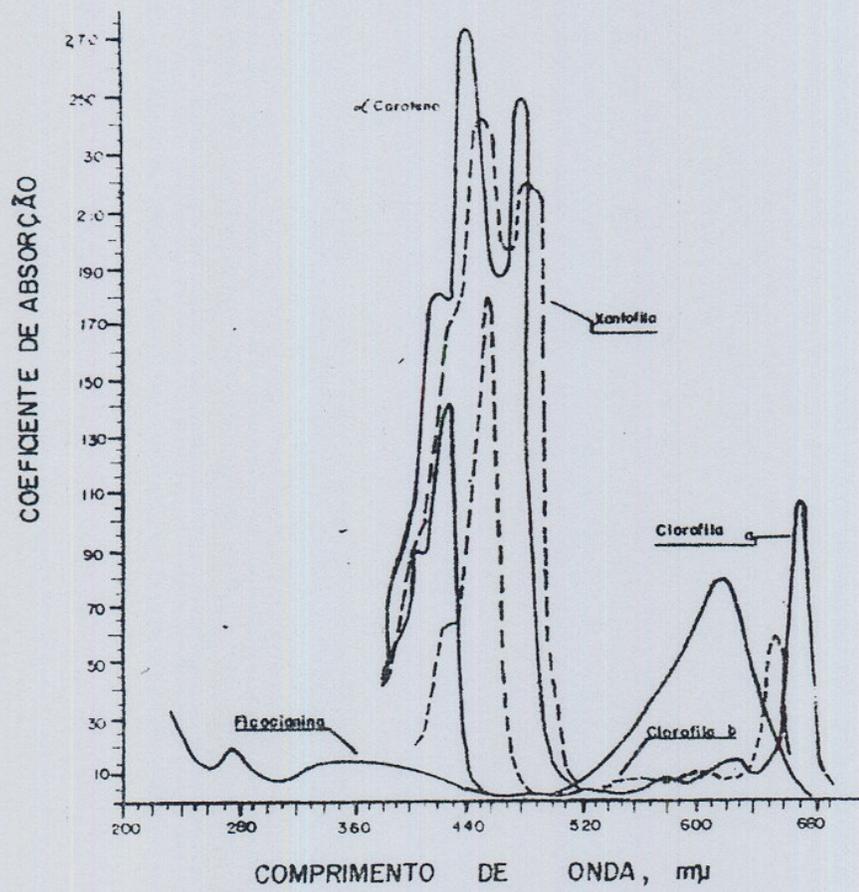


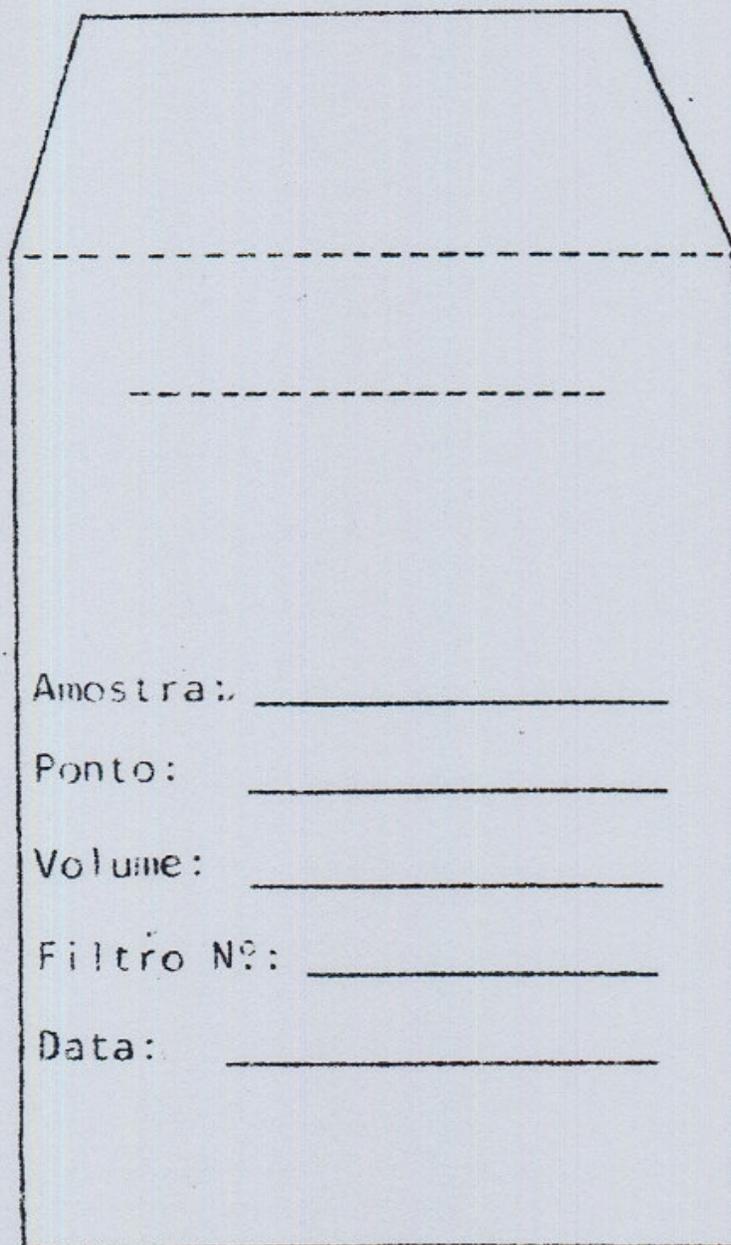
FIGURA 1 – Espectros de absorção de alguns pigmentos fotossintetizantes.



TABELA 1 – Distribuição dos pigmentos que intervêm na fotossíntese nos diversos grupos de algas. X, presente; –, ausente.

	Cianofíceas	Rodofíceas	Criptofíceas	Dinoflagelados	Crisofíceas	Diatomáceas	Feofíceas	Heterocontas	Euglenales	Clorofíceas
Clorofila a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Clorofila b	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X
Clorofila c	–	–	X	X	X	X	X	–	–	–
Clorofila d	–	X	–	–	–	–	–	–	–	–
Clorofila e	–	–	–	–	–	–	–	X	–	–
<b>CAROTENÓIDES</b>										
a) Carotenos:										
α – Caroteno	–	X	X	–	–	–	–	–	–	X
β – Caroteno	X	X	–	X	X	X	X	X	X	X
γ – Caroteno	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X
δ – Caroteno	X	–	–	–	–	X	–	–	–	X
Flavaceno	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
b) Xantofilas										
Equinenona	X	–	–	–	–	–	–	–	X	–
Luteína	X	X	–	–	–	–	–	–	–	X
Zeaxantina	X	X	X	–	–	–	–	–	X	–
Violaxantina	–	–	–	–	–	–	X	X	–	X
Neoxantina	–	–	–	–	–	–	–	X	X	X
Anteraxantina	–	–	–	–	–	–	–	–	X	–
Fucoxantina	–	–	–	–	X	X	X	–	–	–
Diatoxantina	–	–	X	–	X	X	–	–	–	–
Diadinoxantina	–	–	–	X	X	X	–	–	–	–
Dinoxantina	–	–	–	X	–	–	–	–	–	–
Peridinina (peridina)	–	–	–	X	–	–	–	–	–	–
Mixoxantofila	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sifonoxantina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X
Astaxantina	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X
Oscilaxantina	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ficobilinas</i>										
Ficoeritrinas	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
Ficocianinas	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–

**MODELO DE ENVELOPE PARA ARMAZENAR  
FILTRO COM AMOSTRA DE CLOROFILA.**



Amostra: \_\_\_\_\_

Ponto: \_\_\_\_\_

Volume: \_\_\_\_\_

Filtro Nº: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## ANEXO D – BIBLIOGRAFIA

- D-1** CREITZ, G.I. & F.A. RICHARDS – The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. III. A note on the use of “Millipore” membrane filters in the estimation of plankton pigments. *J. mar. Res.* 14:211 – 216 (1955).
- D-2** LORENZEN, C.J. – Determination of chlorophyll and pheo-pigments: espectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12:343 – 346 (1967).
- D-3** MARGALEF, R. – Luz y temperatura. Em: Castellví, J. et al, “Ecología Marina” – Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Caracas. Monografía N° 14:100–129 (1967).
- D-4** MARGALEF, R. – El ecosistema. Em: Castellví, J. et al., “Ecología Marina” – Fundación la Salle de Ciencias Naturales, Caracas, Monografía N° 14:377–453 (1967).
- D-5** MARGALEF, R. – Ecología. Ediciones Omega, Barcelona, 951 pp (1975).
- D-6** RICHARDS, F.A. e T.G. THOMPSON – The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A espectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. mar. Res.* 11:156–172 (1952).
- D-7** STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER – 14th ed., APHA, Washington, D.C (1975).
- D-8** STRICKLAND, J.D.H. & T.R. PARSONS – Discussion of spectrophotometric determinations of marine plant pigments, with revised equations of ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. mar. Res.* 21:155–163 (1963).
- D-9** UNESCO – Monographs on oceanographic methodology. 1. Determinations of photosynthetic pigments. 9–18 (1966).
- D-10** VOLLENWEIDER, R.A. – A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook no. 12, 2nd ed., 225 pp (1974).