

INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

DETERMINAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Disciplina: IOB - 715 PRODUÇÃO PRIMÁRIA MARINHA

Prof. Resp. Dr. Clovis Teixeira.

O método mais amplamente usado para a determinação dos pigmentos fotossintéticos na água do mar é o da análise espectrofotométrica descrito por Richards e Thompson (1952) e modificado por Creitz e Richards (1955). Um esboço crítico da metodologia foi apresentado posteriormente por Parsons e Strickland (1963) e Scorunescu (1966).

O roteiro técnico descrito abaixo segue basicamente as instruções de Strickland (1968).

A - Reagentes usados.

1 - Acetona a 90%

2 - $MgCO_3$ finamente pulverizado, em suspensão em água destilada a 1%.

B - Procedimento.

- 1 - Coleta - A coleta de amostras das profundidades selecionadas, deve ser feita com garrafas apropriadas tipo "Van Dorn" ou Pettersen" por exemplo.
- 2 - Filtração - volume de 0,5 a 5,0l são filtrados através de um filtro de membrana "Millipore" ou de fibra de vidro "Gelman" ou Watman com 47mm de diâmetro e ou prefiltro 0,45 ou de poro. A filtração deve ser feita o mais rapidamente possível, após a coleta. Caso isto não possa ser realizado, as amostras devem ser conservadas ao abrigo da luz. Adicionar 1 ml da suspensão de $MgCO_3$ por litro de amostra utilizado, preferencialmente nos últimos 100 ml filtrados. Este tratamento previne a acidificação do filtrado. Se a extração dos pigmentos não puder ser feita de imediato, com filtros devidamente marcados e secos, devem ser guardados dentro de envelopes também marcados e acondicionados num frasco com sílica gel, protegido da luz, em temperaturas abaixo de 0°C. Nestas condições o material não sofre alterações por semanas.
- 3 - Extração - Recorta-se primeiramente a parte periférica do filtrado não usada como área útil de filtração. Coloca-se o material em um tubo de centrífuga com tampa, numerado, com a capacidade de aproximadamente 15ml. Adiciona-se 10 ml de acetona a 90%. Se o filtro usado de fibra de vidro, este deverá ser cuidadosamente na cerado com um bastão de vidro. Os filtros de membrana são solúveis em acetona. Para uma completa extração dos pigmentos, recomenda-se deixar os tubos, em um "freezer", ao abrigo da luz, por 18 a 24 horas.
- 4 - Centrifugação - Após o período de extração as amostras são centrí fugadas durante 10 a 15 minutos sob 3.000 a 4.000 rpm.

5 - Leitura espectrofotométrica do extrato.

- a) Para maior precisão de medida, a transmissão da luz pelas cubas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, deve ser verificada. Para isto, coloca-se em cada uma delas acetona a 90% e lê-se contra uma cuba tomada como referência, a absorbância em cada um dos comprimentos de onda que serão utilizados. Os valores obtidos nesta aferição, serão considerados em relação aos valores de absorbância obtidos na leitura das amostras em cada cuba.
- b) As leituras da absorbância de cada amostra são efetuadas nos seguintes comprimentos de onda para clorofilas a, b, e c; 665, 645 e 630 mμ e ainda em 510 e 480 mμ para Carotenóides. Uma leitura em 750 mμ deve ser obrigatoriamente feita para a correção de turbidez da amostra.

6 - Cálculos das Clorofilas

Para o cálculo da concentração das clorofilas a, b, e c, após dos contados os valores da aferição, usamos as equações de Parsons e Strickland:

$$C \text{ (clorofila - a)} = 11,6 D_{665} - (1,31 D_{645} + D_{750} + 0,14 D_{630})$$

$$C \text{ (clorofila - b)} = 20,7 D_{645} - (4,34 D_{665} + 4,42 D_{630} + D_{750})$$

$$C \text{ (clorofila - c)} = 55 D_{630} - (4,64 D_{665} + 16,3 D_{645} + D_{750}).$$

Estas equações dão as concentrações das clorofilas em ug/nl.

Se os valores forem multiplicados pelo volume do extrato em mililitros (v) e divididos pelo volume da amostra filtrada, em litros (v), e caminho óptico da cuba usada, em centímetros (l), a concentração das clorofilas é obtida em ug/l^o

$$\text{Clorofila (a, b ou c) ng/ml} = \frac{C \text{ (a, b ou c)} \cdot v}{V \cdot l}$$

7 - Cálculo de Carotenóides - As concentrações dos carotenóides são calculadas das absorbâncias de 510 e 480 mμ, conforme Richards e Thompson (1952) Nas leituras destes dois comprimentos de onda há certa contribuição proveniente das clorofilas. Este erro é eliminado pelas equações abaixo.

$$Dr_{510} = D_{510} - 0,0026 Ca - 0,0035 Cb - 0,0021 Cc$$

$$Dr_{480} = D_{480} - 0,0019 Ca - 0,0136 Cb - 0,0054 Cc$$

Onde: Dr_{510} e Dr_{480} = densidade óptica real devida somente aos carotenóides, nestes comprimentos de onda.

D510 e D480 = densidade ópticas nestes comprimentos de onda pela leitura no espectrofotómetro.

Ca, Cb, Cc = valores para as clorofilas a, b e c respectivamente, obtidas pelas equações anteriores, em ug/ml.

$$\text{Carotenóides, MSPU/n}^3 = \frac{7,6 (\text{Dr480} - 1,49\text{Dr510})}{V.l} \cdot v$$

SPU (Specificfield Pigment Unit) - Unidade de pigmento introduzida por Richards e Thompson (1952) e que corresponde a aproximadamente uma grama de carotenóides.

MSPU é aproximadamente uma miligrana.

BIBLIOGRAFIA

Creitz, G. I e F.A. Richards.

1955 - 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: 211-215.

Richards, F.A. e T.G. Thompson

1952 - The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis, II - A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments.

J. Mar. Res, 11: 156-172.

Parsons, T.R. e J.D.H. Strickland

1963 - Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res, 21, 155-163.

SCOR-UNESCO Working group

1964 - Determination of photosynthetic pigments seawater Monographs on oceanographic methodology, 69p.

Strickland, J.D.H. e T.R. Person

1968 - A practical handbook of sea-water analysis. Fish. Res. Board. Can. 167, 311p.

Strickland, J. D. H.

1965 - Production of Organic Matter in the primary stages of the marine food chain. In "Chemical Oceanography", ed J. P. Riley, e G. Skirrow, ' vol. 1, 477-610.