



CETESB

NORMA TÉCNICA

L5.306

3ª Edição
Fev/2014
14 páginas

Determinação de Clorofila *a* e Feofitina *a*: método espectrofotométrico

Title in English:

Determination of chlorophyll-*a* and pheophytin-*a*: spectrophotometric method

Resumo:

A clorofila *a* é um pigmento encontrado em todos os grupos de vegetais e outros organismos autótrofos sendo frequentemente, utilizada como indicadora da biomassa fitoplanctônica em ambientes aquáticos. A determinação da concentração de clorofila *a* e feofitina *a* é uma ferramenta útil em estudos de produtividade primária, na interpretação de resultados de análises físicas e químicas, como indicadora do estado fisiológico do fitoplâncton e na avaliação do grau de eutrofização de um ambiente aquático. Esta Norma descreve os procedimentos para a determinação da concentração de clorofila *a* e feofitina *a* pelo método espectrofotométrico monocromático.

Palavras chave

Clorofila *a*, feofitina *a*, método espectrofotométrico, eutrofização.

Key words

*Chlorophyll-*a*, Pheophytin-*a*, spectrophotometric method, eutrophication.*

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax: (11) 3133 3402
<http://www.cetesb.sp.gov.br>

© CETESB 2014

Primeira Edição

Com o título de: Determinação de pigmentos fotossintetizantes - clorofila-A, B e C e feofitina-A: método de ensaio.

Dezembro/1978, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. 002/77/DDPET, de 02/01/1978.

Segunda Edição

Com o título de: Determinação de pigmentos fotossintetizantes - clorofila-A, B e C e feofitina-A: Método de ensaio.

Dezembro/1990, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. 067/1991/P/N, de 20/05/1991.

Terceira Edição

Com o título de: Determinação de Clorofila *a*, e Feofitina *a*: método espectrofotométrico:

Fevereiro/2014, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. 093/2014/E, de 08/04/2014. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.124 (71) de 15/04/14, Poder Executivo, Seção I, p. 53 a 55.

© CETESB 2014

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

Sumário**página**

1 Introdução	2
2 Objetivo	4
3 Documentos complementares	4
4 Definições	4
5 Materiais, equipamentos, reagentes e soluções	4
6 Execução do ensaio	7
7 Resultados	9
8 Registro de dados e apresentação dos resultados	10
9 Referências	10
Anexo A - Modelo de envelope	12
Anexo B -Exemplo de formulário de registro dos resultados da análise	13
Anexo C - Exemplo de boletim da análise de clorofila <i>a</i> e feofitina <i>a</i>	.14

1 Introdução

A clorofila (*a*, *b*, *c* e *d*) é um dos grupos de pigmentos, além dos carotenóides (carotenos e xantofilas) e ficobilinas, responsáveis pelo processo fotossintético (pigmentos fotossintetizantes). A clorofila *a* é encontrada em todos os grupos de algas e cianobactérias, já as clorofilas *b*, *c* e *d*, em alguns grupos específicos, sendo que a última é encontrada apenas nas rodofíceas marinhas (**Tabela 1**).

A clorofila *a* é frequentemente utilizada como indicadora da biomassa fitoplanctônica, ou seja, um indicador do crescimento de algas e cianobactérias devido ao enriquecimento por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, fenômeno este denominado eutrofização.

A clorofila *a* pode corresponder, dependendo das espécies presentes, de 1 a 2% do peso seco das algas planctônicas (APHA, 2014). Assim, a clorofila *a* pode ser considerada uma importante variável indicadora do estado trófico de ambientes aquáticos e uma ferramenta útil na avaliação de impacto de contaminantes orgânicos e inorgânicos e outros distúrbios.

A Resolução CONAMA 357/2005 estabeleceu padrões de qualidade para clorofila *a* para águas doces, classes especial, 1, 2 e 3, existindo, assim limites legais para a sua concentração nesses ambientes aquáticos (BRASIL, 2005).

Tabela 1 – Distribuição dos pigmentos que intervêm na fotossíntese nos diversos grupos de algas e cianobactérias

GRUPOS	Cianobactérias	Rodofíceas	Criptofíceas	Dinoflagelados	Crisofíceas	Diatomáceas	Feofíceas	Euglenales	Clorofíceas
Clorofila <i>a</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Clorofila <i>b</i>	-	-	-	-	-	-	-	x	x
Clorofila <i>c</i>	-	-	x	x	x	x	x	-	-
Clorofila <i>d</i>	-	x	-	-	-	-	-	-	-

X presença
- ausência

Fonte: APUD CETESB (2014), modificado.

O método espectrofotométrico de Richards e Thompson (1952), modificado por Creitz e Richards (1955), para estimar os pigmentos do fitoplâncton, ainda é utilizado. Esse método envolve a medida da absorbância em três comprimentos de onda, para estimar as clorofilas *a*, *b* e *c*, e é conhecido como método tricromático. Como a clorofila *a* é o pigmento predominante e está presente em todos os grupos vegetais, sendo a indicadora ideal da biomassa fitoplanctônica, atualmente o método espectrofotométrico monocromático é o mais frequentemente utilizado.

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 feopigmentos. A feofitina *a*, produto da degradação da clorofila *a*, pode interferir grandemente nas medidas deste pigmento, por absorver luz na mesma região do espectro que a clorofila *a*.

Em 1967, Lorenzen propôs um método eficiente para estimar as concentrações de clorofila *a* e feofitina *a*, por meio de leituras espectrofotométricas antes e após acidificação da amostra; e um estudo detalhado das metodologias foi apresentado pela UNESCO (1966). Por esse método, o resultado de clorofila *a* pode ser corrigido excluindo, portanto a concentração de feofitina *a* encontrada na amostra.

A determinação da concentração de clorofila *a* e feofitina *a* pode ser utilizada:

- a) em programas de monitoramento para a avaliação da qualidade das águas em relação à eutrofização e para subsidiar ações de controle;
- b) em estudos de produtividade primária;
- c) em estudos de poluição orgânica ou industrial;
- d) para auxiliar na interpretação de resultados de análises físicas e químicas;
- e) como indicador do estado fisiológico do fitoplâncton, por meio da relação clorofila *a* / feofitina *a*;
- f) para demonstrar o potencial orgânico local em termos de biomassa fitoplanctônica e o grau de eutrofização de um ambiente aquático;

Nesta Norma, é apresentado apenas o método espectrofotométrico monocromático para a determinação de clorofila *a* e feofitina *a*.

2 Objetivo

Esta Norma descreve os procedimentos para a determinação da concentração de clorofila *a* e feofitina *a*, pelo método espectrofotométrico monocromático.

3 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas e publicações citadas.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater:** online. Washington, DC, c2006. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: fev. 2014

BRANDÃO, C. J. et al. (Org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras:** água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

325 p. Disponível em:

<<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>.

Acesso em: fev. 2014.

4 Definições

Para os efeitos desta Norma são adotadas as seguintes definições:

a) **Ecossistema:** conjunto integrado de fatores físicos, ecológicos e bióticos que caracterizam uma determinada área, estendendo-se por um espaço de dimensões variáveis. É uma totalidade integrada e sistêmica que envolve fatores abióticos (energia e materiais) e bióticos em sua funcionalidade e processos metabólicos.

b) **Fotossíntese:** processo em que um organismo transforma energia luminosa em energia de ligação química, utilizando água e gás carbônico e produzindo carboidrato, em geral glicose e oxigênio. As clorofilas são os principais pigmentos capazes de absorver a energia luminosa.

c) **Biomassa:** É a quantidade de material vivo, existente em um tempo e espaço determinados, que pode ser expresso em peso, úmido ou seco, por unidade de área ou volume.

d) **Eutrofização:** Refere-se à adição natural ou artificial de elementos nutritivos (geralmente nitrogênio e/ou fósforo) a um corpo d'água, tendo como consequência o aumento da produtividade primária do ambiente aquático.

e) **Oligotrófico:** Corpos de água com baixa concentração de nutrientes, baixa produtividade primária, nos quais, em geral, não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água.

f) **Eutrófico:** Corpos de água com alta produtividade primária em relação às condições naturais, de baixa transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, em que ocorrem alterações indesejáveis na qualidade da água e interferências nos seus múltiplos usos.

5 Materiais, equipamentos, reagentes e soluções

A determinação da concentração de clorofila *a* e feofitina *a* inclui as etapas de coleta da amostra, filtragem da amostra, extração dos pigmentos de interesse, leitura em espectrofotômetro e cálculo das concentrações.

Para a execução deste método são listados abaixo os materiais, equipamentos, reagentes e soluções necessárias.

5.1 Materiais para a amostragem

Para o planejamento amostral e detalhamento dos equipamentos e materiais, consultar o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (BRANDÃO et al., 2011), considerando sempre os objetivos do estudo e o tipo de análise que será realizada.

5.2 Materiais para a filtragem de amostras

- a) porta filtro para filtração sob pressão;
- b) sistema de bomba a vácuo;
- c) frasco Kitassato com capacidade para 2 L ou mais;
- d) tubos de látex de 1 cm de diâmetro e 2 m de comprimento (para a filtração, ligando a bomba de vácuo ao frasco Kitassato);
- e) membranas filtrantes ou filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro, com porosidade entre 0,45 e 1,0 μm ;
- f) pinça de ponta chata, de aço inoxidável;
- g) água destilada;
- h) pissetes (para água destilada);
- i) provetas graduadas;
- j) bequeres de vidro;
- k) envelope de papel kraft pardo (**Anexo A**);
- l) frasco plástico escuro ou envolvido com papel alumínio contendo sílica-gel;
- m) freezer (-20°C a -30°C);
- n) formulário para o registro de entrada da amostra.

5.3 Materiais para a extração

- a) tubos de vidro âmbar para 15 mL com fundo redondo e tampa rosqueável;
- b) suporte para tubos;
- c) acetona 90%;
- d) dispensadores ou micropipetas (de 5 mL);
- e) macerador ou homogeneizador de tecido com alcance de velocidade de aproximadamente 2500rpm;
- f) pissete com acetona 70% para lavagem do pistilo do macerador;
- g) refrigerador.

5.4 Materiais e equipamentos para a leitura em espectrofotômetro

- a) balança de equilíbrio;
- b) centrífuga clínica de mesa com suporte para tubos de 15 mL;
- c) cubetas espectrofotométricas de quartzo de 1 cm de caminho óptico;
- d) micropipetas 0,1 mL;
- e) bastão de vidro com ponta fina;
- f) padrão de referência - Padrão de Clorofila *a* substancialmente livre de clorofila *b*;
- g) formulário para o registro de resultados analíticos;
- h) espectrofotômetro com largura de banda espectral de 0,5 a 2 nm;

5.5 Reagentes e soluções

- a) solução de carbonato de magnésio ($MgCO_3$) 1%;
Preparo da solução: dissolver 1 g de carbonato de magnésio finamente pulverizado em 100 mL de água destilada.
- b) acetona P.A (para solução acetona 90% - para extração e acetona 70% - para lavagem);
Preparo da acetona 90%: Elevar a 1 litro, com água destilada, 900 mL de acetona P.A.
Preparo da acetona 70%: Elevar a 1 litro, com água destilada, 700 mL de acetona P.A.
- c) hidróxido de amônio 25%;
Utilizado para elevar, quando necessário, o pH da acetona 90% (pH= 8 a 9).
- d) ácido clorídrico (HCl) 0,1M;
Preparo da solução: Adicionar 8,35 mL de ácido clorídrico p.a. (37% de pureza) em 1 litro de água destilada para obtenção de ácido clorídrico 0,1 M.
- e) padrão de clorofila *a*;

Materiais:

- 1 ampola de 1 mg do padrão de clorofila *a* (espinafre),
- 1 balão de 100 mL com tampa esmerilhada (calibrado),
- 1 erlenmeyer 250 mL,
- 1 pipeta 10 mL,
- 1 funil pequeno,
- acetona 90%,
- frascos de vidro âmbar com tampa rosqueável (vial),
- película de vedação.

Preparo da solução: quebrar a ampola, com a pipeta lavar com pequena quantidade de acetona 90% para diluir o padrão transferindo com o funil para o balão. Continuar o procedimento "lavando" bem a ampola até não observar nenhuma coloração (lavar também a ponta da ampola). Completar o volume para 100 mL com acetona 90%. Homogeneizar e verificar o volume, caso seja necessário acertar o volume. Distribuir cerca de 3,0 mL da solução padrão em frascos de vidro âmbar (vial), fechar imediatamente com tampa rosqueável, numerar cada frasco. Cobrir a tampa dos frascos com película de vedação. Manter os frascos em freezer em temperatura igual ou inferior a -20 °C e superior a -30 °C.

6 Execução do ensaio

São descritos abaixo os procedimentos relacionados a cada etapa na determinação da clorofila *a* e feofitina *a*.

6.1 Princípio do método

As concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* são determinadas espectrofotometricamente, por meio das leituras nas densidades ópticas obtidas em três comprimentos de onda definidos (664, 665 e 750 nm). O método fornece resultados em termos de peso dos referidos pigmentos por unidade de volume ($\mu\text{g/L}$).

6.2 Amostragem

Para o planejamento amostral e detalhamento dos procedimentos de coleta, consultar o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (BRANDÃO et al., 2011), considerando sempre os objetivos do estudo e o tipo de análise que será realizada.

6.3 Filtragem da amostra

Este procedimento deve ser realizado minimizando-se a luminosidade incidida sobre a amostra.

- a) preparar envelope de papel pardo, contendo informações como: n° da amostra, local, pH, data da coleta e de filtragem,
- b) homogeneizar cuidadosamente a amostra, medir o volume a ser filtrado em proveta graduada e proceder à filtração. Filtrar o máximo de volume possível (o tempo de filtração não deve exceder 10 minutos). Lavar a proveta com água destilada e dispensar no porta-filtro. Anotar o volume filtrado no envelope de papel pardo. O volume de água a ser filtrado geralmente varia de 0,5 a 5 litros, dependendo do ambiente (em ambientes eutróficos, a quantidade é menor, enquanto que em ambientes oligotróficos, deve ser maior);
- c) Terminada a filtração da amostra, lavar o porta-filtro com água destilada contida em pissete, deixar secar o filtro por alguns segundos, e retirá-lo cuidadosamente com uma pinça, evitando o contato com as mãos. Dobrar o filtro ao meio, de modo que o material filtrado fique para o lado interno da dobra, ainda com a pinça, guardar o filtro no envelope de papel pardo previamente identificado,

Observação: Não escrever no envelope com o filtro no seu interior;

- d) devido ao fato de que as moléculas de clorofila degradarem muito rapidamente, à temperatura ambiente e sob a ação da luz, os envelopes contendo as amostras devem ser colocados imediatamente em frascos escuros, com sílica-gel, e congelados. Quando as amostras forem filtradas em campo, o frasco contendo as amostras filtradas pode ser guardado em caixa térmica com gelo até a chegada ao laboratório;
- e) se a amostra não puder ser filtrada em campo, deve ser filtrada o mais rapidamente possível após a sua chegada ao laboratório. A realização da filtração não deve exceder o prazo de 48 horas após a coleta;
- f) o frasco contendo os envelopes com os filtros utilizados deve ser mantido no freezer em temperatura igual ou inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e superior a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no máximo 28 dias;
- g) após a filtragem, devem ser registrados (formulários em papel ou sistema eletrônico) o volume filtrado e informações relevantes da amostra como n° da amostra, data e local de coleta, pH e data da filtragem (mesmas informações do envelope).

6.4 Extração

Este procedimento deve ser realizado minimizando-se a luminosidade. Montar um lote de amostras a serem analisadas, selecionando pela data de coleta, ou seja, as amostras filtradas mais antigas, bem como as de pH menor que 7.

- a) montar em um suporte os tubos de vidro âmbar identificados.
- b) retirar o filtro do envelope, com a pinça de inox, e colocá-lo dentro do tubo, conforme identificação correspondente, e acrescentar a cada tubo 5 ml de acetona 90%;
- c) macerar o filtro cuidadosamente com o macerador ou homogeneizador de tecidos, adicionar mais 5 ml de acetona 90% e fechar o tubo;
- d) lavar cuidadosamente o pistilo do macerador com acetona 70% antes de processar a amostra seguinte, descartando a acetona utilizada para lavagem;
- e) colocar os tubos em suporte apropriado e mantê-los refrigerados (em torno de 4 °C) durante a extração (no mínimo 2 horas e no máximo 24 horas).

6.5 Centrifugação e Leitura espectrofotométrica

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

- a) após período de extração, retirar os tubos do refrigerador e centrifugar durante 20 minutos a aproximadamente 3.000 rpm;
- b) retirar cuidadosamente os tubos da centrífuga tendo-se o cuidado para não ressuspender o material sólido sedimentado. Colocar aproximadamente 3 mL do sobrenadante em cubeta espectrofotométrica de 1 cm de caminho óptico e ler contra um branco de acetona 90% (em comprimento de onda de 664, 665 e 750 nm). Esta outra cubeta, contendo um branco do reagente, serve como controle negativo da análise. A acetona 90% usada no branco deve ser do mesmo lote da utilizada para a extração de todas as amostras;
- c) realizar a primeira leitura nos comprimentos de 664 e 750 nm, anotando os resultados no caderno de registro de análise;
- d) a correção para feofitina *a* é feita acidificando-se a solução contida nas cubetas, após a 1ª leitura (664 e 750 nm), pela adição de 20 a 100 µL de ácido clorídrico 0,1 M;
- e) após 90 segundos, determinar as densidades ópticas após acidificação em 750 e 665 nm (665 nm - pico máximo de absorção da feofitina *a*);
- f) anotar os resultados em formulário de registro de análise (**Anexo B**).
- g) terminadas as leituras, desprezar as soluções das cubetas e lavá-las com acetona 70% antes de proceder à próxima leitura.

Observações:

- i. Para águas límpidas, oligotróficas, cubetas de 5 cm de caminho óptico podem ser usadas para aumentar a sensibilidade de leitura.
- ii. É importante que a leitura após a acidificação seja feita em pelo menos um minuto, mas não mais que dois minutos, após a adição do ácido.
- iii. O espectrofotômetro deve ser verificado antes do uso utilizando-se uma solução padrão, cuja concentração de clorofila *a* é conhecida. Coloca-se esta solução na cubeta e realizam-se as leituras

conforme procedimento para as amostras, ou seja, leitura antes e após a acidificação. Os resultados devem ser registrados, evidenciando a verificação do equipamento.

7 Resultados

As leituras a 750 nm, antes e depois da acidificação, medem apenas a turbidez da amostra. Estas leituras devem ser subtraídas das densidades ópticas lidas a 664 nm antes da acidificação, e 665 nm depois da acidificação, obtendo-se assim as leituras corrigidas.

Cálculo para a correção da Turbidez:

D664c= Densidade óptica a 664 nm, corrigida - obtida antes da acidificação.
Correção: **D664 corrigida = D664 – D750**

D665c= Densidade óptica a 665 nm, corrigida - obtida depois da acidificação.
Correção: **D665 corrigida = D665 – D750**

As concentrações de clorofila a e feofitina a podem ser obtidas a partir das seguintes equações monocromáticas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times (\text{D664c} - \text{D665c}) \times \left(\frac{v}{(V \times L)} \right) \quad (1)$$

$$\text{Feofitina a } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [(1,7 \times \text{D665c}) - \text{D664c}] \times \left(\frac{v}{(V \times L)} \right) \quad (2)$$

Onde:

V= Volume, em litros, da amostra filtrada

v= Volume, em mL, de acetona 90% usada para extração

L= Caminho óptico, em cm, da cubeta espectrofotométrica usada

D664c= Densidade óptica a 664nm, corrigida

D665c= Densidade óptica a 665nm, corrigida

Exemplo

Foram filtrados 700 mL de água para extração dos pigmentos.

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

Foram utilizados 10 mL de acetona 90% na extração.

As leituras em absorbância obtidas antes da acidificação foram:

$$D_{750b} = 0,002$$

$$D_{664} = 0,106$$

As leituras obtidas após a acidificação foram:

$$D_{750a} = 0,003$$

$$D_{665} = 0,078$$

Cálculo com as leituras antes e depois da acidificação.

Correção da turbidez:

$$D_{664} - D_{750} = \text{D}_{664} \text{ corrigido} = 0,106 - 0,002 = \mathbf{0,104 \text{ (antes da acidificação)}}$$

$$D_{665} - D_{750} = \text{D}_{665} \text{ corrigido} = 0,078 - 0,003 = \mathbf{0,075 \text{ (depois da acidificação)}}$$

Substituição dos referidos valores nas equações (1):

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times (\text{D664c} - \text{D665c}) \times \left(\frac{v}{(V \times L)} \right) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times (0,104 - 0,075) \times \left(\frac{10}{(0,7 \times 1)} \right) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times 0,029 \times 14,29 \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } a = 11,08 \mu\text{g/L}$$

Substituição dos referidos valores nas equações (2):

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [(1,7 \times \text{D665c}) - \text{D664c}] \times \left(\frac{v}{(V \times L)} \right) \quad (2)$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [(1,7 \times 0,075) - 0,104] \times \left(\frac{10}{(0,7 \times 1)} \right) \quad (2)$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times [0,1275 - 0,104] \times 14,29 \quad (2)$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = 26,73 \times 0,0235 \times 14,29 \quad (2)$$

$$\text{Feofitina } a = 8,98 \mu\text{g/L}$$

8 Registro de dados e apresentação dos resultados

O laboratório deve manter um sistema informatizado, protegido de alterações e rastreável, com possibilidade de “backup”, para fazer o registro e armazenamento dos dados analisados. O sistema deve permitir que os resultados sejam apresentados na forma de Boletim de Análise impresso ou eletrônico (**Anexo C**).

9 Referências

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2006. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: fev. 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Com alterações posteriores. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: fev. 2014.

BRANDÃO, C. J. et al. (Org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 325 p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: fev. 2014.

CETESB. **Análise de Clorofila a como Ferramenta no Monitoramento da qualidade das Águas.** Cadernos da Gestão do Conhecimento. São Paulo, 2014. 83p.

CREITZ, G. I.; RICHARDS, F. A. 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.**, New Haven, CT, v. 14, n. 3, p. 211-216, 1955.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, Texas, US, v. 12, n. 2, p. 343-346, 1967. Disponível em: <http://www.aslo.org/lo/toc/vol_12/issue_2/0343.pdf>. Acesso em: fev. 2014.

RICHARDS, F. A.; THOMPSON, T. G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis: II a spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. **J. Mar. Res.** New Haven, CT, v. 11, n. 2, p. 156-172, 1952.

UNESCO. Determination of photosynthetic pigments. In: _____. **Determination of photosynthetic pigments in sea-water.** Paris, 1966. Part I, p. 9-18. (Monographs on oceanographic methodology, 1). Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0007/000716/071612eo.pdf>>. Acesso em: fev. 2014.

.../Anexo A

Anexo A - Envelope de papel kraft pardo (6,5 x 8,5 cm) para o acondicionamento do filtro.

Amostra.....

Ponto.....

Volume.....

pH.....

Data de Coleta.....

Data de Filtragem.....

Obs.:.....

Fonte: Adaptado de CETESB (2010).
Nota: Exemplo meramente ilustrativo, sujeito a alteração.

.../Anexo B

Anexo B – Exemplo de formulário para registro dos resultados da análise de Clorofila a e Feofitina a

Acetona 90% pH:	Lote:	Transcrição:	Verificação:
-----------------	-------	--------------	--------------

Data da Análise:							AA		DA		RESULTADOS	
N° Amostra	N° OS	Data Coleta	Manancial	Descrição	TUBO	VOL.	664	750	665	750	Clorofila a	Feofitina a

Legenda: AA= antes da acidificação; DA= depois da acidificação.

Fonte: Adaptado de formulário interno da CETESB (2013).
 Nota: Exemplo meramente ilustrativo, os formulários internos estão sujeitos a alterações.

.../Anexo C

Anexo C – Exemplo de Boletim de análise de Clorofila a e Feofitina a.

**NOME DA EMPRESA
DEPARTAMENTO/SETOR**

Pág: 1/1

BOLETIM DE ANÁLISES

N.º XXXXX/2009**DADOS GERAIS**

Amostra: 12222333
Emissão do Boletim: 31/01/2009

DADOS DA COLETA

Ponto: AAAAAA123
Local: XXX
Coletor(es): José
Data da coleta: 01/01/2009 Hora da coleta: 10:00
Tipo: água bruta

DADOS DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA NO LABORATÓRIO

Condições da amostra: Conforme
Data/hora do recebimento: 01/01/2009 17:22

RESULTADOS ANALÍTICOS

Volume filtrado: 600 mL

	Resultado Unidade	Data do ensaio
Clorofila-a	62,82 µg/L	10/01/2009
Feofitina-a	7,66 µg/L	10/01/2009

MÉTODO

Determinação pelo método espectrofotométrico conforme o procedimento XXX, baseado em:
(MÉTODO/NORMA – BASE edição mais recente disponível)

Profissional responsável.....
Registro no Conselho

Endereço da empresa, e-mail e telefone para contato, dados cadastrais,

Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.
Os resultados desta análise referem-se tão somente à amostra encaminhada.

Fonte: Adaptado do Boletim da CETESB (2014).

Nota: Exemplo meramente ilustrativo, os formulários internos estão sujeitos a alterações.