

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA EM FOLHAS DE *Raphanus* sp.

LANGARO, Ana Claudia<sup>1</sup>; DUARTE, Thiago Vieira<sup>1</sup>; NOHATTO, Marcos André<sup>2</sup>; MANICA-BERTO, Roberta<sup>3</sup>; AGOSTINETTO, Dirceu<sup>4</sup>

AGOSTINETTO, Dirceu  
Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPeI)

*Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel*

<sup>1</sup>*Acadêmico do Curso de Agronomia (FAEM/UFPeI)*

<sup>2</sup>*Eng. Agrº. Doutorando PPG Fitossanidade (FAEM/UFPeI)*

<sup>3</sup>*Eng. Agrº. Pós-Doutoranda do PPG Fitossanidade (FAEM/UFPeI)*

<sup>4</sup>*Eng. Agrº. Dr. Professor Adjunto Depto. Fitossanidade (FAEM/UFPeI)*

*Endereço para correspondência: namelia.langaro@gmail.com*

### 1 INTRODUÇÃO

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes nas plantas, comuns em todas as células fotossintéticas (STREIT et al., 2005). Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenóides e as ficobilinas. A clorofila *a* é o pigmento utilizado na fase fotoquímica, enquanto os demais constituem os chamados pigmentos acessórios (KLUGE, 2005).

A determinação da concentração de clorofila é utilizada para prever o nível nutricional de nitrogênio (N) em plantas, devido ao fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N na planta (BOOIJ et al., 2000), o que auxilia na identificação da capacidade competitiva das plantas (FLECK et al., 2003). Além disso, é importante na avaliação da resposta das plantas ao estresse ocasionado pela aplicação de herbicidas (FERREIRA et al., 2010).

Existem inúmeros métodos para quantificação de clorofila *a*, *b* e total. A extração do conteúdo de pigmentos foliares pode ser de caráter destrutivo ou não, baseando-se na absorvância e reflectância destes (LICHTENTHALER, 1987). Além disso, os métodos podem estar sujeitos a influência de fontes de variação associadas à extração dos pigmentos clorofilianos, como a natureza, polaridade e grau de pureza do solvente (RITCHIE, 2008), a temperatura e o tempo de incubação (TAIT & HIK, 2003), e as equações utilizadas para calcular as concentrações das clorofilas (PORRA, 2002).

Além disso, tem sido observado que a abundância dessas moléculas clorofilas varia de acordo com a espécie vegetal, o que demanda ajustes metodológicos para que a extração e conservação desses pigmentos ocorram com a máxima eficiência (CRUZ et al., 2007). Diante disso, objetivou-se selecionar o melhor protocolo para quantificação de clorofila em nabo, considerando o tempo de extração, o solvente utilizado e as equações características para a determinação espectrométrica.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de abril de 2010, em casa de vegetação do departamento de Fitossanidade e laboratório do departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPeI), no Município de Capão do Leão/RS.

As sementes de nabo (*Raphanus* spp.) foram semeadas em bandejas preenchidas com substrato comercial PlantiMax<sup>®</sup>. Quando as plantas apresentavam duas folhas, foi efetuado o transplante para os saquinhos plásticos, mantendo-se uma planta por saquinho. As coletas foram realizadas quando as plantas apresentavam seis folhas.

O material coletado (0,1 g) foi transferido para tubos de falcon graduados de 50 mL, previamente revestidos com papel alumínio para excluir a luminosidade e macerado com 5 mL dos respectivos extratores. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a uma rotação de 7000 rpm imediatamente ou até quatro horas após a maceração dependendo do tempo de incubação. Em seguida, o material foi filtrado e o volume completado para 20 mL com o respectivo solvente. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro (modelo Ultrospec 2000), variáveis entre 645 – 665 nm, dependendo do método utilizado. Os resultados para clorofila *a*, *b* e total (*a+b*) foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de matéria fresca – MF.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial. O fator A comparou cinco protocolos de extração e quantificação: acetona 80% (ARNON, 1949; PORRA et al., 1989); dimetilsulfóxido (DMSO) (BARNES et al., 1992) sob temperatura ambiente (CRUZ et al., 2007); etanol absoluto (WINTERMANS & DE MOTTS, 1965); e N,N-dimetilformamida (DMF) (MORAN, 1982); e o fator B testou diferentes tempos de extração (0, 1, 2, 3 e 4 horas).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e, posteriormente, foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em sendo significativo, compararam-se as médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). (SAS Institute, 1999).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação entre os fatores método e tempo de incubação para as variáveis. Houve efeito apenas do fator método para as variáveis de clorofila *a* e *b* (Tabela 1).

O maior teor de clorofila *a* para o nabo foi obtido com DMSO, seguido pelo DMF, não havendo, entretanto, diferença significativa entre eles. A menor recuperação de clorofila *a* em relação ao DMSO correspondeu ao método de etanol (WINTERMANS & DE MOTTS, 1965), seguido pelo de Porra et al. (1989), com acetona 80%. Resultados similares foram obtidos por Barbieri Junior et al. (2010), utilizando as mesmos métodos e equações, porém a extração e quantificação dos teores de clorofilas foi realizado em folhas do capim-Tifton 85. Da mesma forma, Cruz et al. (2007) verificou que o resultado da extração tanto de clorofila *a* quanto de clorofila *b*, pelos métodos de DMSO, foram superiores aos apresentados pelo método da acetona 80%, nos híbridos estudados de *Bixa orellana* L.

Para a clorofila *b*, os resultados favoreceram o etanol absoluto, utilizando as equações propostas por Wintermans & De Mots (1965), esse resultado corrobora com o exposto por Ritchie (2008). Enquanto que a menor recuperação correspondeu à extração com DMSO, o que evidencia ineficiência do solvente para a extração completa desse pigmento, conforme dados obtidos por outros autores (BARNES et al., 1992; SHINANO et al., 1996). Isso confirma que as equações associadas a cada um dos métodos representam um fator importante na escolha do protocolo de extração.

Tabela 1 – Teores de clorofila *a* e *b* ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) extraídas de folhas de nabo, em função de cinco métodos operacionais. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2010.

Método	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)
Etanol Absoluto <sup>(1)</sup>	963,32 b <sup>1/</sup>	435,87 a
DMF <sup>(2)</sup>	1118,66 ab	386,14 ab
DMSO <sup>(3)</sup>	1188,31 a	289,59 c
Acetona 80% <sup>(4)</sup>	965,49 b	309,02 bc
Acetona 80% <sup>(5)</sup>	1069,37 ab	369,97 abc
CV (%)	23	25

<sup>(1)</sup> WINTERMANS & DE MOTS (1965); <sup>(2)</sup> N,N-dimetilformamida (DMF) - MORAN, 1982; <sup>(3)</sup> dimetilsulfóxido (DMSO) - BARNES et al., 1992; <sup>(4)</sup> PORRA et al., 1989; <sup>(5)</sup> ARNON, 1949. <sup>1/</sup> Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4 CONCLUSÃO

O DMSO se mostrou como um eficiente solvente a ser utilizado na quantificação de clorofila *a* e o etanol absoluto na clorofila *b*, em folhas de nabo.

#### 5 REFERÊNCIAS

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n.1, p.1-15, 1949.

BARBIERI JUNIOR, É.; ROSSIELLO, R.O.P.; MORENZ, M.J.F.; RIBEIRO, R.C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 40, n.3, 2010.

BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.32, p.85-100, 1992.

BOOIJ, R.; VALENZUELA, J.L.; AGUILERA, C. Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods. In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). Management of nitrogen and water in potato production. **The Netherlands, Wageningen Pers**, p.72-82, 2000.

CRUZ, A.C.F.; SANTOS, R.P.; IAREMA, L.; FERNANDES, K.R.G.; KUKI, K.N.; ARAÚJO, R.F.; OTONI, W.C. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, Supl.2, p.777-779, 2007.

FERREIRA, R.R.; OLIVEIRA, F.T.R. DE; DELITE, F. DE S.; AZEVEDO, R.A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P. DE; CHRISTOFFOLETI, P.J.; FIGUEIRA, A.V. DE O. Tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas. **Bragantia**, Campinas, v.69, n.2, p.395-404, 2010.

FLECK, N.G.; BALBINOT JR., A.A.; AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R.A. Características de plantas de cultivares de arroz irrigado relacionadas à habilidade competitiva com plantas concorrentes. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.1, p.97-104, 2003.

KLUGE, R.A.; LCB – 311. 2005. [Online] Fisiologia Vegetal: apontamentos de aulas teóricas de fotossíntese. ESALQ / USP. Homepage: <http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grade01/06fotoquimicadafotossintese/fotos>

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds.) *Methods in Enzymology*, V. 148. San Diego: Academic Press. p.350-382, 1987.

MORAN, R. Formulae for determination of pigments extracted with N,N-dimethylformamide. **Physiology**, v.69, n.6, p.1376-1381, 1982.

PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.975 n.3, p.384-394, 1989.

PORRA, R.J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**, v.73, n.1-3, p.149-156, 2002.

RITCHIE, R.J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica**, v.46, n.1, p.115-126, 2008.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 8.02. Cary: SAS, 1999. 3 CD-ROM.

SHINANO, T.; LEI, T.T.; KAWAMUKAI, T.; INOUE, M.T.; KOIKE, T.; TADANO, T. Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls *a* and *b* from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. **Photosynthetica**, v.32, p. 409-415, 1996.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TAIT, M.A.; HIK, D.S. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? **Photosynthesis Research**, v.78, n.1, p.87-91, 2003.

WINTERMANS, J.F.G.M.; DE MOTS, A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.109, n.2, p.448-453, 1965.