

Extração de pigmentos foliares em plantas de canola

Wanessa Scopel*
Julierme Zimmer Barbosa**
Márcio Luis Vieira***

Resumo

A análise do teor de clorofila na planta é utilizada para avaliar o efeito das condições nutricionais do solo e como indicativo de estresse dela. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma simplificação da etapa de extração de pigmentos foliares em plantas de canola. O experimento foi conduzido em ambiente protegido e avaliado no Laboratório Multiuso do Curso de Agronomia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, no município de São José do Cedro. Após a coleta e tamisamento de um Nitossolo eutrófico de textura argilosa, acondicionou-se em vasos em que foi semeada a canola. Na floração, coletou-se a quarta ou quinta folha abaixo da inflorescência principal, para a análise de pigmentos foliares. Depois de transportadas até o laboratório e lavadas com água destilada, obtiveram-se discos foliares, sendo ou não macerados com pistilo em almofariz. Estes foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução extratora, nos quais permaneceram por 24 horas em câmara fria, protegidos da luz. Filtraram-se os extratos, e com a solução resultante, determinou-se a absorvância das amostras. Com as leituras, foram calculados os teores de clorofila *a*, *b*, *a + b*, total e a relação clorofila total/carotenoides. Nas condições do presente experimento, o método de extração sem maceração do tecido vegetal demonstrou-se simples e rápido, requer pouca manipulação e apresenta boa eficácia.

Palavras-chave: Extração. Pigmentos foliares. Canola.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de canola (*Brassica napus* L. var oleífera) se encaixa bem nos sistemas de produção de grãos, apresentando-se como uma excelente opção de cultivo de inverno na região Sul, por reduzir problemas fitossanitários de leguminosas, como a soja e o feijão, e das gramíneas, como o milho e o trigo. Dessa forma, pode contribuir para a estabilidade e a qualidade da produção de grãos (TOMM, 2007, p. 4). É destinada para a alimentação humana, fabricação de óleo para uso industrial, adubo verde e forragem, além de apresentar potencial melífero, sendo importante também para a indústria de sabão e tinta, componente de produtos de borracha e rotação de culturas (CORDEIRO; REIS; ALVARENGA, 1999, p. 5).

Assim como qualquer outra planta, a canola cresce e se desenvolve graças ao aproveitamento da energia radiante da luz solar, convertendo moléculas simples (CO_2 e H_2O) em moléculas orgânicas complexas, que são utilizadas no metabolismo vegetal (RAVEN, 2001, p. 125). O mesófilo foliar é o tecido com maior atividade fotossintética nas plantas. Em suas células, os cloroplastos são abundantes e contêm pigmentos especializados na absorção de luz, as clorofilas. Estas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina (com quatro átomos de nitrogênio), tendo como átomo central o magnésio (SALISBURY; ROSS, 1992, p. 2).

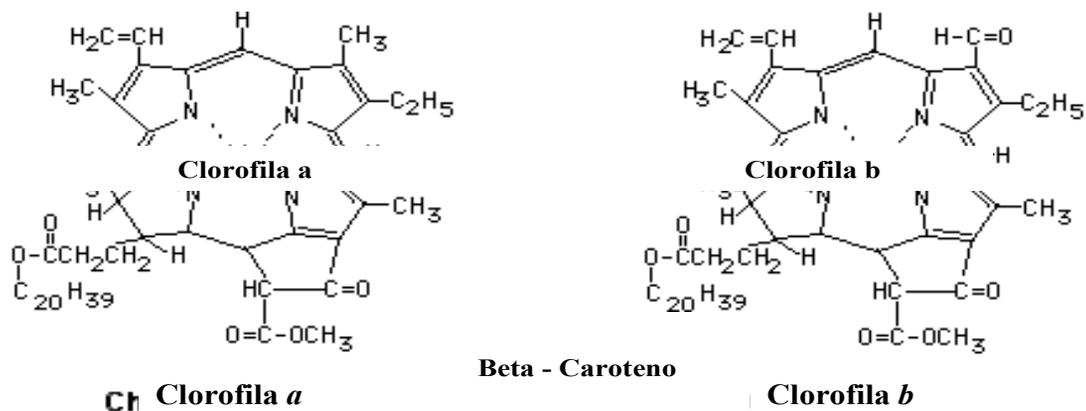
De acordo com Taiz e Zeiger (2002, p. 113), a clorofila "a" está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica e é considerada como o pigmento principal, sendo os demais

* wanessa_scopel@yahoo.com.br

** juliermezimmer@hotmail.com

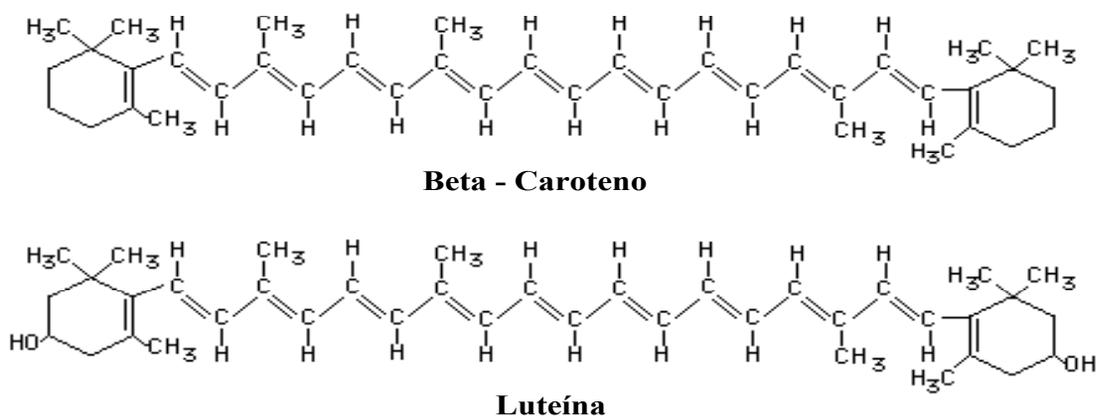
*** mluisv@unoescsmo.edu.br

pigmentos acessórios. A clorofila "b" é encontrada em plantas, algas verdes e algumas bactérias; a clorofila "c", em feófitas e diatomáceas; e a clorofila "d", em algas vermelhas. As clorofilas "a" e "b" se encontram na natureza, em uma proporção de 3:1, diferindo nos substituintes de carbono. Na clorofila "a", o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) e a clorofila "b" contém um grupo aldeído (-CHO) (Desenho 1).



Desenho 1: Composição química da clorofila "a" e clorofila "b"
 Fonte: Salisbury e Ross (1992, p. 210).

Conforme Salisbury e Ross (1992, p. 212), outra classe de pigmentos acessórios são os carotenoides, que podem ter estrutura pura em hidrocarbonetos (betacaroteno) ou contendo oxigênio (luteína) (Desenho 2). Apesar de contribuírem com a fotossíntese e aumentarem o espectro de absorção de luz, sua principal função é proteger as clorofilas de danos ocasionados por excesso de energia radiante. Em estudos com plantas mutantes, sem a biossíntese de carotenoides, constatou-se efeito letal em condições naturais de luminosidade (MIMURO; KATOH, 1991, p. 2).



Desenho 2: Composição química dos carotenoides betacaroteno e luteína
 Fonte: Salisbury e Ross (1992, p. 210).

A análise do teor de clorofila é utilizada para avaliar o efeito das condições nutricionais do solo, encontrada correlação positiva entre teor de nutrientes e aumento da concentração dos pigmentos

(SOFIATTI et al., 2009, p. 852). A redução na quantidade de clorofila pode estar relacionada ao efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a taxa fotossintética (CRUZ et al., 2007, p. 6).

Os teores de clorofila e carotenoides nas folhas são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta à absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e adaptação a diversos ambientes (REGO; POSSAMAI, 2006, p. 191).

Os pigmentos foliares podem ser utilizados como parâmetros indicativos de estresse nas plantas, entre os quais, o cultivo em condições de elevada acidez provocada pelo alumínio que prejudica, dependendo da espécie, cultivar, tempo de exposição e concentração desse elemento na solução, a absorção de outros nutrientes constituintes da molécula de clorofila, a formação de outros pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, o processo de fotossíntese (CODOGNOTTO et al., 2002, p. 29). Já em plantas submetidas ao estresse salino, os decréscimos na concentração de clorofila podem ser atribuídos ao aumento da atividade da enzima clorofilase que degrada a clorofila (SHARMA et al., 1991 apud CAVALCANTE et al., 2009, p. 2).

Os métodos para quantificação dos pigmentos foliares se dividem em duas etapas, a extração e em seguida a determinação. Para a primeira, são utilizados vários solventes orgânicos, como a acetona, o éter, o dimetilsulfóxido e o metanol (CRUZ et al., 2007, p. 777); já a determinação é padrão, baseando-se na absorbância de luz pelos pigmentos (ARNON, 1949, p. 3). Contudo, esses métodos requerem a destruição das amostras de tecido foliar, ocorrendo significativas perdas de pigmentos e causando alta variância dos resultados (NETTO et al., 2002, p. 203). Além disso, com um grande número de amostras, como normalmente acontece em pesquisas, pode-se tornar tarefa extremamente laboriosa.

Diante do exposto, apresentar uma simplificação da etapa de extração de pigmentos foliares em plantas de canola foi o objetivo deste trabalho.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

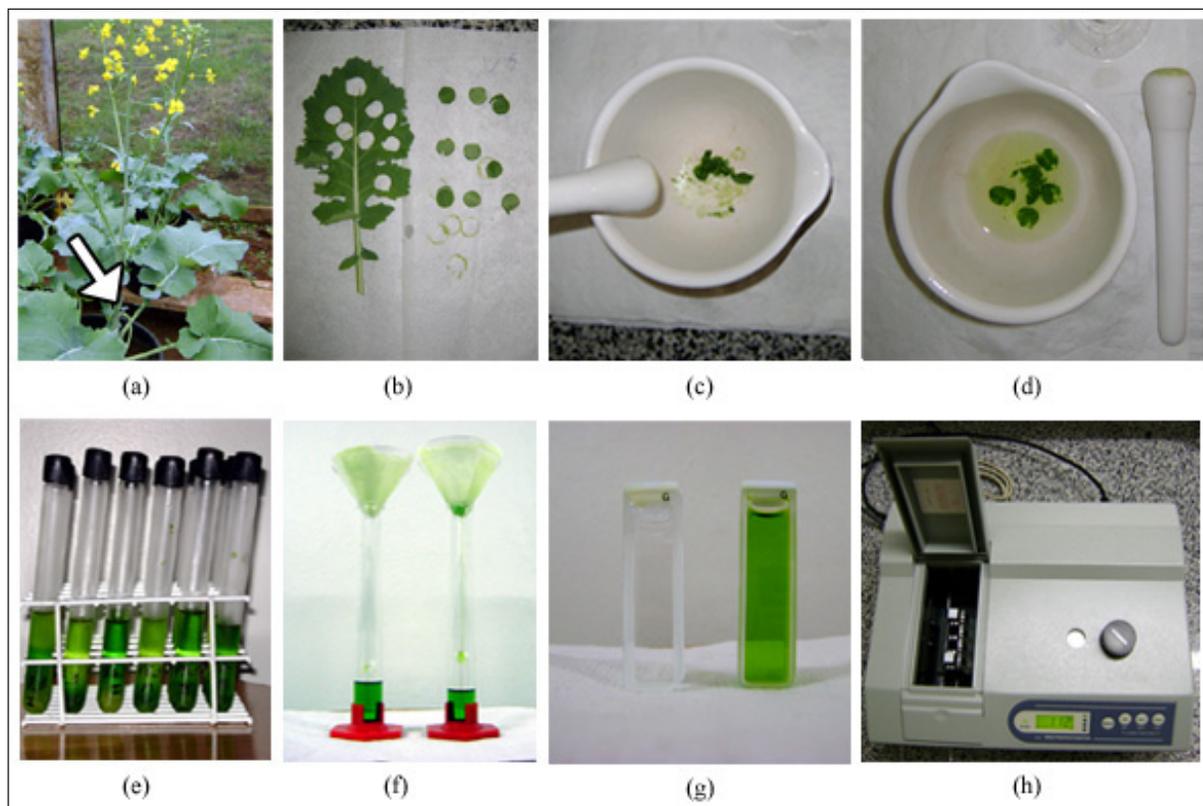
O trabalho foi conduzido em ambiente protegido e avaliado no Laboratório Multiuso, ambos no Curso de Agronomia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, no município de São José do Cedro, com altitude média de 823 m acima do nível do mar, clima segundo a classificação de Köppen, clima do tipo mesotérmico úmido, com verão quente e temperatura média de 17,6 °C.

Coletou-se um Nitossolo eutrófico de textura argilosa, submetido ao processo de tamisamento (em malha com abertura de 4 mm). Depois de seco, foi acondicionado em 69 vasos com capacidade de 10 l, em que foram semeadas sete sementes de canola, remanescendo duas após o desbaste. A adubação de semeadura constou na aplicação de 15, 60 e 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente.

Transcorridos 34 dias da emergência, quando as plantas apresentavam quatro folhas desenvolvidas, foram aplicados na adubação nitrogenada de cobertura o equivalente a 60 kg ha⁻¹ de N (na forma de sulfato de amônio, ureia, super N ou nitrato de amônio) os fertilizantes; dispostos na superfície do solo sempre entre as plantas, sendo em seguida realizada uma irrigação com 500 ml de água/vaso.

Na floração, que ocorreu em média aos 73 dias após a emergência, foi coletada a quarta ou quinta folha abaixo da inflorescência principal (Fotografia 1a), para a análise de pigmentos foliares. As amostras de tecido fresco foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor com gelo, transportadas até o laboratório e lavadas com água destilada. Em seguida, obtiveram-se discos foliares de 1 cm de diâmetro (Fotografia 1b), sendo ou não macerados (Fotografia 1c, 1d) com pistilo em almofariz. Esses discos foram transferidos para tubos de ensaio

com tampa (Fotografia 1e), contendo 10 ml de acetona, 80% (v/v), em que permaneceram por 24 horas em câmara fria, protegidos da luz. Ao fim desse período, filtraram-se os extratos (Fotografia 1f), a solução resultante foi colocada em uma das cubetas, enquanto na outra foi mantida uma amostra branca (acetona e água destilada) (Fotografia 1g), e efetuaram-se as leituras de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Fotografia 1h) nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm para as clorofilas e 470 nm para os carotenoides. Com as leituras, calcularam-se os teores de clorofila a, b, a + b e total (WITHAM; BLAYDES; DEVLIN, 1971); os carotenoides (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983, p. 592) e a relação clorofila total/carotenoides, sendo os resultados expressos em mg por grama de peso fresco de tecido foliar (mg g^{-1}).



Fotografia 1: Extração e determinação dos pigmentos foliares em canola
Fonte: os autores.

A análise de variância foi realizada aplicando-se o teste F. Quando este foi significativo, a comparação entre os tratamentos com e sem maceração efetuou-se por meio de análise de regressão, correlacionando os dois métodos. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o *software* Sisvar (FERREIRA, 2000).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A correlação entre os métodos de extração adequou-se a modelos lineares, sendo a representatividade destes, variável de acordo com o pigmento em questão. Constatou-se que os níveis de clorofila a, a + b, total e carotenoides obtidos sem maceração do tecido vegetal em folhas de plantas de canola na floração, foram superiores aos resultantes com o processo de maceração do material (Gráficos 1a, 1c, 1d, 1e). Além disso, o método sem maceração é mais rápido; o tempo transcorrido entre a obtenção dos discos foliares e a incubação com a solução extratora foi de 4,38 e 2,13 segundos, respectivamente, para os métodos com e sem maceração da amostra.

O coeficiente de determinação (R^2) resultante da relação entre os valores de clorofila "a" provenientes dos métodos com e sem maceração, mesmo não sendo altamente significativo, foi de

apenas 0,3678, indicando grande dispersão dos dados. Assim, quando se considera uma quantidade de clorofila "a", determinada com maceração do tecido vegetal, de 0,7 mg g⁻¹, observam-se valores obtidos sem maceração variando de 0,7 a 1,2 mg g⁻¹ (Gráfico 1a).

Os métodos de extração não apresentaram diferença significativa para a quantidade de clorofila "b". Evidencia-se esse fato pelo maior coeficiente de determinação, que foi de 0,6122, em que os valores não mostraram grande dispersão e seguiram a tendência da linha que representa a relação 1:1 (Gráfico 1b).

A quantidade de clorofila total com incubação do tecido sem maceração foi superior quando comparado às amostras maceradas, conforme o Gráfico 1c. Nota-se a maior eficácia desse método de extração pela maior quantidade de pontos localizados abaixo da linha de relação 1:1, com o coeficiente de determinação de 0,4635.

Ainda que os valores de clorofila a + b e carotenoides tenham ficado dispersos e com um coeficiente de determinação de 0,4451 e 0,2499, respectivamente, apresentaram-se superiores quando extraídos pelo método sem maceração dos discos foliares. Assim, se a quantidade de clorofila a + b obtida com maceração for de 1,1 mg g⁻¹, aquela resultante do processo sem macerar o material vegetal varia de 1,1 a 1,7 mg g⁻¹ (Gráfico 1d, 1e).

A relação entre clorofila total/carotenoides apresentou acentuado aumento quando os valores foram resultantes do processo de incubação da amostra com maceração (Gráfico 1f), em que as médias obtidas com e sem maceração foram de 4,96 e 4,49 mg g⁻¹, respectivamente, conforme a Tabela 1. Como os valores de clorofila total e carotenoides são mais baixos no método com maceração do tecido, a relação entre eles fica maior, ou seja, é superestimada pelo erro analítico inerente aos valores de cada variável isolada, para o mesmo método, o que não ocorre quando o tecido é incubado sem maceração, contudo, conclusões precipitadas podem ser geradas.

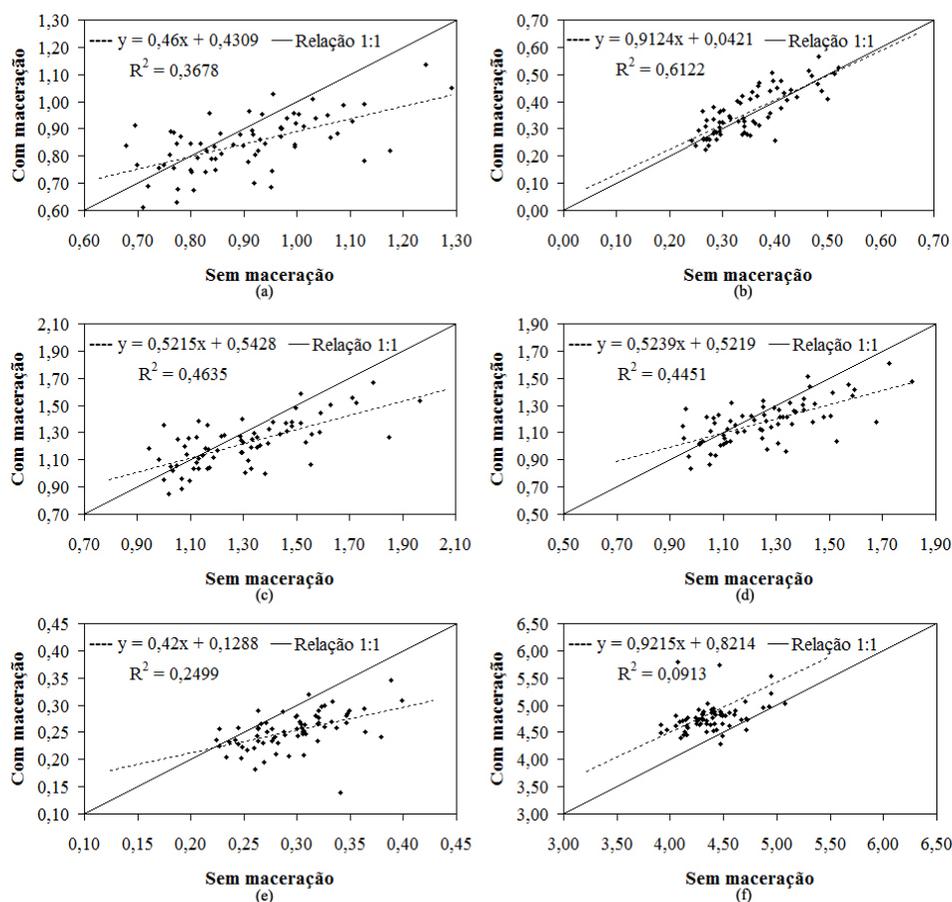


Gráfico 1: Relação entre os métodos com e sem maceração do tecido vegetal na determinação de pigmentos foliares: (a) clorofila "a", (b) clorofila "b", (c) clorofila total, (d) clorofila a + b, (e) carotenoides, (f) clorofila total/carotenoides

Fonte: os autores.

Analisando a Tabela 1, observa-se a predominância quantitativa de clorofila "a" em relação à clorofila "b", sendo em média 0,6 mg g⁻¹ superior no método sem maceração, e 0,48 mg g⁻¹ no método com maceração. Já os pigmentos auxiliares carotenoides estão presentes em teores inferiores às clorofilas. O coeficiente de variação (CV) das variáveis avaliadas indica boa precisão experimental, a relação clorofila total/carotenoides com baixa e as demais variáveis com variação média, segundo a classificação proposta por Pimentel Gomes (2000, p. 156).

Tabela 1: Valores mínimos, médios, máximos e coeficiente de variação (CV) de quantidades de pigmentos foliares (mg g⁻¹) extraídos com e sem maceração dos discos foliares

Pigmentos foliares	Sem maceração			Com maceração			CV (%)
	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	
	----- mg g ⁻¹ -----						
Clorofila "a"	0,67	0,98	1,29	0,61	0,87	1,13	13,49
Clorofila "b"	0,24	0,38	0,51	0,22	0,39	0,56	19,62
Clorofila a + b	0,94	1,37	1,81	0,83	1,22	1,60	14,68

Pigmentos foliares	Sem maceração			Com maceração			CV (%)
	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	
Clorofila total	0,94	1,45	1,96	0,84	1,25	1,66	16,01
Carotenoides	0,22	0,31	0,39	0,13	0,24	0,34	13,01
Clorofila total/ carotenoides	3,91	4,49	5,07	4,4	4,96	5,53	5,78

Fonte: os autores.

Durante as análises, foi constatada visualmente a perda de pigmentos (coloração verde remanescente no almofariz após a maceração dos discos foliares), mesmo que extremamente baixa. Além disso, podem ter ocorrido alterações químicas durante o procedimento (oxidação e degradação), em que esses fatores, associados ou não, provavelmente contribuíram para os menores teores de clorofila a, a + b, total e carotenoides, no método com maceração.

3 CONCLUSÃO

Nas condições do presente experimento, o método de extração de pigmentos foliares baseado na incubação do tecido vegetal sem maceração demonstrou-se simples, rápido, requer pouca manipulação e apresenta boa eficácia.

Abstract

The analysis of chlorophyll content in the plant is used to evaluate the effect of nutritional conditions of soil and as an indicator of stress in plants. The objective of this study was to present a simplification of the extraction step of pigments in leaves of canola plants. Conducted the experiment in a greenhouse and evaluated in the Multipurpose Laboratory, both in the course of Agronomy, Universidade do Oeste de Santa Catarina, in the municipality of São José do Cedro. After collection and screening of a eutrophic Nitossolo clayey, condition in which blood vessels seeded to canola. At flowering, collected the fourth or fifth leaf below the inflorescence main, for the analysis of photosynthetic pigments. After transport to the laboratory and washed with distilled water, we obtained leaf discs, whether or not macerated in a mortar with pestle. These were transferred to test tubes containing the extraction solution where they

remained for 24 hours in a cold, protected from light. Filtered to the extracts and the resulting solution, we determined the absorbance of the samples. With the readings were calculated chlorophyll a, b, a + b, total chlorophyll and the ratio total/carotenoids, with the results expressed in mg per gram fresh weight of leaf tissue. Under the conditions of this experiment, the extraction method without maceration of plant tissue proved to be simple, fast, requires little manipulation and has good efficacy.

Keywords: Extraction. Leaf pigments. Canola.

REFERÊNCIAS

ARNON, Daniel Israel. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxydase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, p. 1-15, 1949.

BANZATTO, David Arioaldo; KRONKA, Sergio do Nascimento. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

CAVALCANTE, Polyana Geysa da Silva et al. Teor de clorofila e carotenoides em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) sob estresse salino. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2009, Pernambuco. **Resumos...** Pernambuco, out. 2009.

CODOGNOTTO, Lucas Mateus et al. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosystema**, v. 27, n. 12, jan./dez. 2002.

CORDEIRO, Luiz Adriano Maia; REIS, Múcio Silva; ALVARENGA, Eveline Mantovani. **A cultura da canola**. Viçosa: UFV, 1999. 50 p. (Cadernos didáticos, 60).

CRUZ, Ana Claudia Ferreira et al. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 777-779, jul. 2007.

CRUZ, Jailson Lopes et al. Níveis de nitrogênio e a taxa fotossintética do mamoeiro "golden". **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 64-71, 2007.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, UFSCar, 45., 2000, São Carlos, **Anais...** São Carlos, jul. 2000.

LICHTENTHALER, Hartmut; WELLBURN, Alan. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, n. 603, p. 591-592, 1983.

MIMURO, Mamoru; KATOH, Tetzuya. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. **Pure & Appl. Chern.**, v. 63, n. 1, p. 123-130, 1991.

NETTO, Alena Torres et al. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. Braz. **J. Plant Physiology**, v. 14, n. 3, p. 203-210, 2002.

PIMENTEL GOMES, Frederico. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477 p.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 728 p.

REGO, Gizelda Maia; POSSAMAI, Edilberto. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Embrapa Florestas, n. 53, p. 179-194, 2006.

SALISBURY, Frank B.; ROSS, Cleon W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992.

SOFIATTI, Valdinei et al. Determinação da concentração de pigmentos da fotossíntese em folhas de algodoeiro por meio do clorofilômetro portátil clorofilog-10301. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados: **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 852-858.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates Publishers. 2002. p. 591-600.

TOMM, Gilberto Omar. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 32 p. (Sistemas de produção, n. 3).

WITHAM, Francis H.; BLAYDES, David F.; DEVLIN, Robert M. **Experiments in Plant Physiology**. New York: D. Van Nostrand Company, 1971. p. 55-58.