

Procedimentos para extração de pigmentos fotossintetizantes em espécies frutíferas

BARBOSA, Julierme Zimmer;* SCOPEL, Wanessa;** VIEIRA, Márcio Luis***

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de extração de pigmentos fotossintetizantes contidos em discos foliares das espécies *D. kaki*, *F. carica* e *P. persica* com os seguintes procedimentos: 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos sob aquecimento em banho-maria, nas temperaturas de 60 e 65 °C, com solução à base de álcool e incubação por 24 e 48 horas em refrigerador com solução à base de acetona e à base de álcool. O trabalho foi realizado na Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc), no município de São José do Cedro. Foram coletadas folhas de plantas jovens de caqui (*Diospyros kaki*), figo (*Ficus carica*) e pêsego (*Prunus persica*), cultivadas no pomar do Curso de Agronomia. A partir das folhas (*in natura*) foram obtidos discos foliares de 1 cm de diâmetro para proceder à extração de pigmentos, para tanto, dois ensaios foram realizados. No primeiro foi avaliada a extração com solução de álcool 80% em diferentes períodos, sob aquecimento em banho-maria a 60 e a 65 °C. No segundo a extração foi realizada com as soluções de álcool e acetona a 80%, após 24 e 48 horas de incubação em refrigerador. Em ambos os ensaios a determinação dos pigmentos clorofila *a*, *b*, total e carotenoides foi realizada mensurando-se a absorbância dos extratos pelo método espectrofotométrico. Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e ao teste de Tukey. A solução de acetona, sobretudo após a incubação dos discos foliares por 48 horas, apresentou alta eficiência de extração.

Palavras-chave: Extração. Pigmentos fotossintetizantes. Frutíferas.

Procedures for extraction photosynthetic pigments in fruit species*Abstract*

*The aim of this study was to evaluate different procedures for extraction of photosynthetic pigments in leaves of fruit species. The study was conducted at the University of West of Santa Catarina - Unoesc city of Sao José do Cedro. Were collected fully expanded leaves the face exposed to the sun of seedlings of persimmon (*Diospyros kaki*), fig (*Ficus carica*) and peach (*Prunus persica*) orchard cultured in the course of Agronomy. With these, we obtained leaf discs of 1 cm in diameter to make the extraction of leaf pigments, for both, two tests were performed. At first we evaluated the extraction with 80 % alcohol solution at different times under heating in a water bath at 60 and 65 °C. In the second, extraction was performed with solutions of alcohol and acetone to 80 % after 24 and 48 hours of incubation in the refrigerator. In both trials the determination of the pigments chlorophyll *a*, *b*, and total carotenoids was performed by measuring the absorbance of the extracts from different extraction procedures, by the spectrophotometric method. Data were subjected to analysis of variance, regression analysis and Tukey test ($p < 0.05$). The alcoholic solution in the different procedures that was used was characterized by low efficiency of extraction of photosynthetic pigments. The acetone solution, especially after the incubation of leaf discs for 48 hours showed high extraction efficiency. In general, the pigments present in leaves of fruit species extracted by the most efficient method, showed significant linear correlations.*

Keywords: Extraction. Photosynthetic pigments. Fruit species.

* Universidade do Oeste de Santa Catarina; juliermezimmer@hotmail.com

** Universidade do Oeste de Santa Catarina; wanessa_scopel@hotmail.com

*** Instituto Federal do Rio Grande Sul; marcio.vieira@sertao.ifrs.edu.br

1 INTRODUÇÃO

O setor de fruticultura tem se expandido continuamente e atinge novas fronteiras com o objetivo de atender às demandas de produção por meio de uma diversidade de frutas tanto para suprir as necessidades internas de consumo quanto para a exportação, permitindo que a atividade esteja presente em praticamente todos os países (VIEIRA, 2004, p. 34).

No caso de Santa Catarina, as condições climáticas favorecem a fruticultura para a produção de frutíferas subtropicais e temperadas. Assim, embora o Estado seja destaque na produção de maçã, outras frutíferas também vêm ganhando mercado, como é o caso do caqui, figo e pêssego. Segundo o IBGE (2009, p. 1), a quantidade produzida dessas espécies na safra 2008 foi de 4.330, 503 e 26.078 toneladas, resultando em um rendimento médio de 10.458, 12.268 e 14.195 kg ha⁻¹ respectivamente.

A figueira (*Ficus carica*) é uma espécie frutífera da família Moraceae, originária da região arábica mediterrânea. Seu desenvolvimento é favorecido nas regiões subtropicais temperadas, porém, é de comportamento cosmopolita, com grande capacidade de adaptação climática. Apresenta porte arbustivo e hábito caducifólio (queda das folhas no outono); os seus frutos são destinados ao consumo *in natura* ou à industrialização, em forma de doces em calda, cristalizados e secos (PIO et al., 2007, p. 1).

O caquizeiro (*Diospyros kaki*), pertencente à família das Ebenáceas, é nativo do continente asiático, onde é cultivado há séculos, principalmente na China e no Japão e, atualmente, seu cultivo é realizado em quase todas as regiões de clima temperado e subtropical do mundo (GOMES, 2007, p. 153). Embora seja uma espécie caducifólia, sua área de cultivo costuma se estender pelas mesmas regiões de cultivo das plantas cítricas (não caducifólias), adaptando-se às condições climáticas catarinenses, caracterizadas por invernos frios, que induzem às plantas entrar em dormência, e, ao mesmo tempo, permitem a quebra natural da dormência dos cultivares. Além disso, é uma planta ideal para ser explorada nas pequenas propriedades rurais predominantes no Estado (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007, p. 43). O caqui é utilizado como fruta de mesa, porém, pode ser processado e destinado à produção de caqui cristalizado e vinagre (GUIMARÃES, 2007, p. 1).

O pessegueiro (*Prunus persica*), originário da China, é uma rosácea de porte reduzido e considerado frutífera típica de clima temperado. O pêssego é uma fruta muito apreciada no mundo pelo sabor, aparência e por seu valor econômico (CHAGAS et al., 2006, p. 1).

A manifestação de estresses nutricionais nas plantas é resultado da ação de um ou mais fatores, como: pragas, doenças, características físico-químicas do solo e temperatura e umidade inadequada. Segundo Tisot (2009, p. 33), os bioindicadores do estado nutricional, por serem críticos à ação fotossintética ou por serem produtos desta, podem dar indícios do estado de sanidade ou de estresse da cultura.

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais (STREIT et al., 2005, p. 748). Além disso, são

responsáveis pela captura de luz usada no processo de fotossíntese; dessa forma, são essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química. Assim, as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, com seu crescimento e adaptabilidade aos diferentes ambientes (JESUS; MARENCO, 2008, p. 816).

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* (Cl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, sendo também o pigmento utilizado para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético, enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo chamados de pigmentos acessórios, cujos principais englobam Cl *b*, Cl *c*, Cl *d* e carotenoides (TAIZ; ZEIGER, 2002, p. 257). De acordo com Salisbury e Ross (1992, p. 212), outra classe de pigmentos acessórios são os carotenoides, que podem ter estrutura pura em hidrocarbonetos (beta-caroteno) ou contendo oxigênio (luteína), mesmo contribuindo para a fotossíntese, incrementando o espectro de absorção de luz, sua principal função é proteger as clorofilas de danos 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).

Os métodos tradicionais para determinação de conteúdo de clorofila são destrutivos, ou seja, incluem a coleta de amostras de folhas, destruição do limbo foliar, extração dos pigmentos com solventes e leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro. Esses valores, obtidos em três comprimentos de onda distintos, são utilizados em equações empíricas para que o conteúdo de clorofila seja calculado. Entre os solventes utilizados podem-se citar o álcool e a acetona (TISOT, 2009, p. 35).

Conforme Streit et al. (2005, p. 749), as ligações entre as moléculas de clorofilas são muito frágeis, rompendo-se com facilidade ao macerar o tecido em solventes orgânicos. O caráter hidrofílico de uma substância influi diretamente na escolha do melhor solvente para a sua extração; os solventes polares, como a acetona, o metanol, o etanol, o acetato de etila, a piridina e a dimetilformamida são os mais eficazes para a extração completa das clorofilas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de extração de pigmentos fotossintetizantes contidos em discos foliares das espécies *D. kaki*, *F. carica* e *P. persica* com os seguintes procedimentos: 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos sob aquecimento em banho-maria nas temperaturas de 60 e 65 °C com solução à base de álcool e incubação por 24 e 48 horas em refrigerador com solução à base de acetona e à base de álcool.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc), no município de São José do Cedro. O clima dessa região, segundo a classificação de Köeppen, é do tipo Mesotérmico úmido, com verão quente e temperatura média de 17,6 °C, com altitude de 823 m acima do nível do mar.

No mês de janeiro de 2010 (estação de verão) foram coletadas folhas totalmente expandidas da face exposta ao sol de plantas jovens de caqui (*Diospyros kaki*), figo (*Ficus carica*) e pêssego (*Prunus persica*), cultivadas no pomar do Curso de Agronomia.

As folhas foram acondicionadas em saco plástico, no interior de caixa de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. Quantificou-se a área foliar específica (AFE), por intermédio da razão entre área foliar real (AFr) e matéria seca da folha (MSF). Para a determinação da área foliar mediu-se o comprimento e a largura da folha, obtendo-se a área foliar estimada (AFE), enquanto que para obter a AFr a área da folha foi medida em papel milimetrado. Com esses valores obteve-se um fator de correção (FC) pela razão entre AFr e AFe. Já a MSF foi obtida pela secagem de folhas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C por 48 horas. O diâmetro do caule (DC) a 10 cm da superfície do solo e a estatura de planta (EP) também foram mensurados.

Folhas intactas foram lavadas em água corrente e em água destilada, sendo colocadas sobre papel toalha para a perda de umidade residual do processo de lavagem (alguns minutos no ambiente do laboratório). Posteriormente, obtiveram-se discos foliares de 1 cm de diâmetro para proceder à extração de pigmentos foliares; para tanto, dois ensaios foram realizados.

2.1.1 Ensaio 1

Aproximadamente 0,1 g de tecido foliar de ambas as espécies frutíferas foram colocado em tubo de ensaio contendo 10 mL de álcool 80%, sendo o tubo fechado com tampa e mantido em banho-maria por 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, sob as temperaturas de 60 e 65 °C. Transcorridos esses períodos, os tubos permaneceram por 30 minutos em refrigerador a 4 °C na ausência de luminosidade.

O delineamento experimental usado nesse ensaio foi completamente casualizado, em esquema trifatorial 3 x 5 x 2 (espécies frutíferas x tempos sob aquecimento x temperatura) com cinco repetições.

2.1.2 Ensaio 2

Nesse ensaio utilizaram-se duas soluções extratoras individualmente, álcool 80% e acetona 80%. Aproximadamente 0,1 g de tecido foliar foi colocado em tubo de ensaio (com tampa) contendo 10 mL de solução extratora, esses permaneceram incubados por 24 e 48 horas em refrigerador a 4 °C no escuro.

Como delineamento experimental utilizou-se o completamente casualizado, em esquema bifatorial 3 x 4 (espécies frutíferas x procedimentos de extração) com cinco repetições.

2.1.3 Determinação de pigmentos fotossintetizantes

Os pigmentos fotossintetizantes em ambos os ensaios foram determinados pela absorvância dos extratos (ao final dos tratamentos de extração) em diferentes comprimentos de onda, em espectrofotômetro UV-VIS. Com esses valores foram calculados os teores de clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*) e total (Cl total) (WHITAM; BLAYDES; DEVLIN, 1971, p. 57) e dos carotenoides (Car) (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983, p. 592), conforme as equações:

$$Cl\ a = [(12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}) * V] / 1000 * W \quad (1)$$

$$Cl\ b = [(22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}) * V] / 1000 * W \quad (2)$$

$$Cl\ total = [(A_{652} * 1000) * (V / 1000 * W)] / 34,5 \quad (3)$$

$$Car = [(1000 * A_{470} - 3,27 * Cl\ a - 104 * Cl\ b) / 229] / 1000 * W \quad (4)$$

Onde:

A = absorvância no comprimento de onda indicado

V = volume final (mL) do extrato (pigmentos + solução extratora)

W = matéria fresca (g) do material vegetal utilizado

Observação: Teor expresso em mg de pigmento por g de tecido fresco (mg g⁻¹).

2.1.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) por meio do teste F, quando este foi significativo; os dados foram analisados por regressão e pelo teste de Tukey. Os dados obtidos para as três espécies no procedimento mais eficiente do ensaio 2, foram usados para correlacionar os pigmentos fotossintetizantes entre si. Em todas as análises a probabilidade de erro foi menor do que 5 %, para tanto, utilizou-se o programa estatístico Sisvar.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características foliares e de plantas das espécies frutíferas *D. kaki*, *F. carica* e *P. persica* podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características foliares e de planta das espécies frutíferas *D. kaki*, *F. carica* e *P. persica*

	AFe	AFr	FC	MSF	AFE	DC	EP
	-----cm ² -----			g/folha	cm ² g	----- cm -----	
<i>D. kaki</i>	55,33	44,10	0,79	0,505	87,32	4,98	226
<i>F. carica</i>	644,81	255,90	0,39	4,321	59,23	6,71	217
<i>P. persica</i>	44,46	32,26	0,72	0,223	144,66	8,32	255

Os valores de AFe, AFr, FC e MSF foram semelhantes entre as espécies *D. kaki* e *P. persica*; ambos inferiores (exceto o FC) aos observados na espécie *F. carica*. O FC pode ser utilizado em determinações posteriores da AFr, especificamente para as espécies em estudo, simplesmente multiplicando esse fator pelo valor de AFe, assim fica facilitada a obtenção da área foliar correta. A AFE mostrou-se distinta entre as espécies; *F. carica* foi a que apresentou a menor área de folha por unidade de MSF, isso significa que essa espécie apresenta folhas com maior espessura. Entre as características de planta o DC foi mais variável entre espécies do que a EP.

2.2.1 Ensaio 1

Os teores de pigmentos extraídos variaram de acordo com a interação entre os três fatores avaliados. A temperatura de 65 °C proporcionou maior extração de pigmentos para todas as situações (Gráfico 1). Os modelos de regressão com maior correlação entre os dados observados e os estimados ajustaram-se de forma linear para a temperatura de 60 °C, indicando uma extração deficiente (Gráfico 1a, c, g, e).

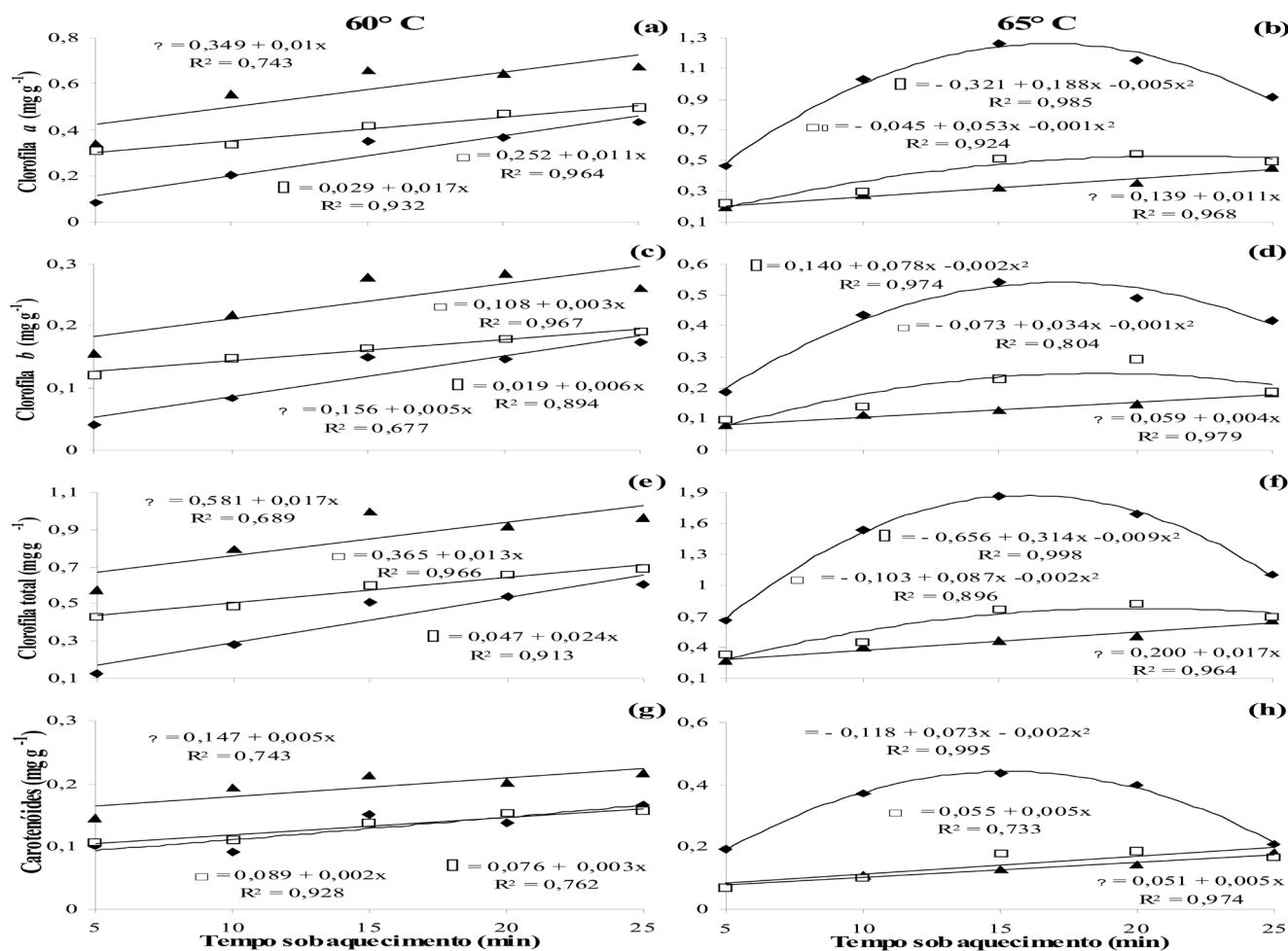


Gráfico 1: Correlação entre o tempo sob aquecimento a 60 e a 65 °C e os teores de clorofila a (a; b), clorofila b (c; d), clorofila total (e; f) e carotenoides (g; h), respectivamente, extraídos de discos foliares de *D. kaki*(▲), *F. carica* (●) e *P. persica* (□) com solução à base de álcool.

Já para a temperatura de 65 °C, os teores de Cl a, Cl b e Cl total nas espécies *D. kaki* e *P. persica* o ajuste dos dados foi maior para o modelo de regressão quadrática. Nessa situação, pode-se estimar o tempo sob aquecimento que proporciona a máxima extração de pigmentos, por meio da primeira derivada da equação do modelo, contudo, isso somente é válido para o intervalo de tempo de 5 a 25 minutos. A espécie *D. kaki* foi a que apresentou os maiores teores de pigmentos fotossintetizantes quando a temperatura do banho-maria era 60 °C, no entanto, a 65 °C foi a espécie *F. carica*. Em geral, a elevação na temperatura de 5 °C foi efetiva em aumentar a extração com solução alcoólica, concordando com Constantino, Silva e Donate (2004, p. 130), os quais afirmam que as reações químicas são aceleradas à medida que a temperatura aumenta. Apesar de ser menos oneroso e mais rápido, o que é importante quando se tem um grande número de amostras para analisar, a extração com álcool sob diferentes temperaturas e períodos sob aquecimento, apresentou alta variação entre as espécies, tornando-se pouco abrangente.

Em teste preliminar (dados não mostrados), foi constatado que a solução de acetona 80 % mantida por mais de 5 minutos sob aquecimento a 60 °C condiciona elevada pressão nos tubos de ensaio, levando em alguns casos ao rompimento destes. Cruz et al. (2007, p. 779) observaram bons resultados de extração de Cl *a* em folhas de três híbridos de urucum (*Bixa orellana*), utilizando como extrator a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) com aquecimento externo a 65 °C. Entretanto, este apresenta severas limitações quanto à capacidade de extração de Cl *b*, quando comparado à extração com álcool puro e acetona 80% (BARBIERI JÚNIOR et al., 2010, p. 634). Dessa forma, mais testes devem ser realizados com outras temperaturas, concentrações e volumes de solução de acetona, uma vez que alterando esses fatores se possa utilizar aquecimento, acelerando, assim, o processo de extração.

2.2.2 Ensaio 2

Os maiores teores de pigmentos foram obtidos quando se incubaram os discos foliares com acetona por 48 horas (AC 48), independentemente da espécie. Para a Cl *a* os procedimentos álcool por 24 horas (AL 24) e 48 horas (AL 48) e acetona por 24 horas (AC 24) apresentaram resultados em média 39, 25,78 e 13,20% inferiores àqueles observados com o AC 48 (Tabela 2). Na média dos procedimentos de extração, *F. carica* foi a espécie com mais Cl *a*. Entretanto, analisando a interação entre os fatores, especificamente no procedimento mais eficiente, não se constatou diferença significativa entre as espécies. Provavelmente, as variações nas características foliares de cada espécie promovam maior ou menor restrição para uma extração máxima; assim, se o procedimento adotado for de baixa eficiência, tem-se o risco de que os dados sejam distantes da realidade.

Tabela 2: Teores (mg g⁻¹) de pigmentos fotossintetizantes extraídos de discos foliares de espécies frutífera (continua)

Procedimento	<i>D. kaki</i>	<i>F. carica</i>	<i>P. persica</i>	Média
Clorofila a				
AL 24	B 0,87 c	A 1,21 c	B 0,83 c	0,97 d
AL 48	AB 1,16 b	A 1,30 bc	B 1,08 b	1,18 c
AC 24	AB 1,41 a	A 1,49 ab	B 1,24 b	1,38 b
AC 48	A 1,55 a	A 1,61 a	A 1,60 a	1,59 a
Média	B 1,25	A 1,40	B 1,19	
CV (%)	10,30			
Clorofila b				
AL 24	AB 0,43 c	A 0,48 c	B 0,31 c	0,41 c
AL 48	A 0,50 bc	A 0,55 bc	A 0,44 bc	0,49 b
AC 24	AB 0,57 b	A 0,63 ab	B 0,50 b	0,57 b
AC 48	A 0,88 a	AB 0,76 a	B 0,74 a	0,79 a
Média	A 0,60	A 0,60	B 0,50	
CV (%)	14,78			
Clorofila total				
AL 24	B 1,33 c	A 1,74 c	B 1,18 c	1,41 d
AL 48	A 1,74 b	A 1,91 bc	A 1,57 b	1,74 c
AC 24	A 2,09 b	A 2,23 ab	B 1,73 b	2,02 b
AC 48	A 2,69 a	A 2,53 a	A 2,51 a	2,58 a
Média	A 1,96	A 2,10	B 1,74	
CV (%)	11,84			
Carotenoides				
AL 24	AB 0,32 b	A 0,36 b	B 0,26 c	0,31 c

Tabela 2: Teores (mg g⁻¹) de pigmentos fotossintetizantes extraídos de discos foliares de espécies frutíferas (conclusão)

Procedimento	<i>D. kaki</i>	<i>F. carica</i>	<i>P. persica</i>	Média
AL 48	A 0,40 a	AB 0,39 b	B 0,34 b	0,38 b
AC 24	AB 0,41 a	A 0,47 a	B 0,37 b	0,41 b
AC 48	A 0,47 a	A 0,50 a	A 0,48 a	0,48 a
Média	B 0,40	A 0,43	C 0,36	
CV (%)	9,69			

Legenda: AL 24 = álcool por 24 horas; AL = álcool por 48 horas; AC 24 = acetona por 24 horas; AC 48 = acetona por 48 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As espécies *D. kaki* e *F. carica* não apresentaram diferença quanto ao teor de Cl *b*, porém foram 0,10 mg g⁻¹ superiores à *P. persica*. Entre os procedimentos de extração o único que ficou acima da média foi o AC 48, com contrastes entre as espécies, ou seja, o contrário do que se observou para da Cl *a*. Bhardwaj e Singh (1988, p. 111), avaliando cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum*), observaram que os níveis mais altos de Cl *b* estavam correlacionados com as folhas mais espessas. Conforme a Tabela 1, as folhas das espécies *D. kaki* e *F. Carica* apresentam menores valores de AFE, ou seja, têm maior espessura em relação à *P. Persica*, isso explica os dados obtidos para a Cl *b* nas espécies frutíferas.

A Cl total é a soma da Cl *a* com Cl *b*; dessa forma, seus valores seguiram a tendência da primeira, que é a mais numerosa. Isso porque a Cl *b* atua como pigmento de importância secundária no processo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2002, p. 113). Com uma variação de 11,84% nos dados, as espécies mostram-se com o mesmo teor de Cl total quando o procedimento de extração foi a incubação em acetona por 48 h.

De maneira geral, o teor de Car é o mais baixo em relação aos demais pigmentos fotossintetizantes, com valor mínimo de 0,26 mg g⁻¹ e máximo de 0,5 mg g⁻¹, com um coeficiente de variação (CV) de 9,69 %, que indica pouca variação entre os dados (Tabela 2). Na média dos métodos, a espécie *F. carica* foi superior, seguida de *D. kaki* e *P. persica*. Esse caso exemplifica claramente que a média pode ser errônea e necessita ser criteriosamente avaliada, uma vez que essa aparente diferença entre as espécies ocorre em razão do acúmulo de erros inerentes aos procedimentos com menor poder de extração de pigmentos. Dessa forma, com o procedimento AC 48 as diferenças simplesmente não são mais verificadas.

Barbieri Júnior et al. (2010, p. 635) analisando em folhas da gramínea forrageira capim-Tifton 85 a extração de Cl *a*, Cl *b* e Cl total com acetona 80% em períodos de 12 a 96 horas, concluíram que o pico de extração ocorre após 48 horas, corroborando, assim, com os dados encontrados nesse experimento para espécies frutíferas. Os mesmos autores evidenciaram que transcorridas 48 até 96 horas de incubação dos discos foliares com acetona, os teores de pigmentos mantiveram-se estáveis, não se degradando depois de terem sido extraídos.

2.2.3 Correlações lineares entre pigmentos fotossintetizantes extraídos com o procedimento AC 48

Os pigmentos fotossintetizantes extraídos pelo procedimento AC 48 apresentam correlações lineares significativas ($p < 0,05$), uma vez que o aumento de um dado pigmento no complexo fotossintético foi acompanhado em maior ou menor intensidade pelos demais (Gráfico 2). Com as Cl *a* e *b*, como esperado, obtiveram-se modelos altamente significativos na correlação com a Cl total, apresentando coeficiente de determinação (R^2) de 0,862 para o primeiro tipo de clorofila e 0,845 para o segundo tipo (Gráfico 2a, b).

A Cl *a* obteve R^2 superior a Cl *b*, quando ambas foram correlacionadas com Car, sendo esse de 0,816 e 0,424, respectivamente (Gráfico 2c, d). Com isso, pode-se dizer que situações bastante específicas que venham a alterar o teor de Car têm grande chance de impactar também sobre a Cl *a*. Já com a Cl *b*, o mesmo pode não ser verdadeiro, uma vez que o modelo obtido a partir dos dados obser

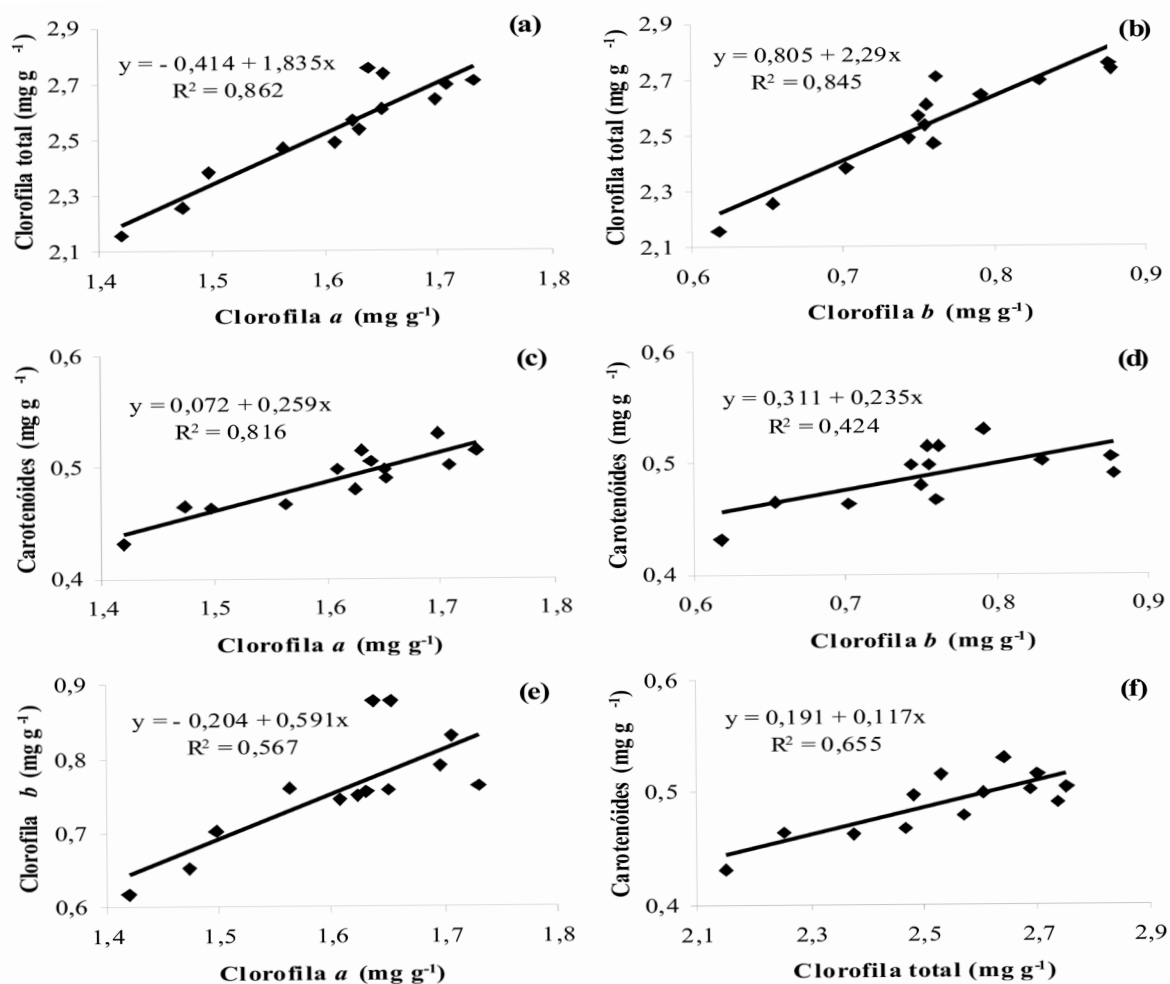


Gráfico 2: Correlações lineares entre os teores de clorofila *a* e clorofila total (a), clorofila *b* e clorofila total (b), clorofila *a* e carotenóides (c), clorofila *b* e carotenóides (d), clorofila *a* e clorofila *b* (e) e clorofila total e carotenóides (f) após 48 horas de incubação com acetona 80%. Valores incluem as três espécies frutíferas

No tecido foliar das espécies frutíferas avaliadas, pode-se observar (Gráfico 2e) que o teor das duas formas de clorofila apresentou proporcionalidade direta. Assim, por intermédio coeficiente angular da equação desse modelo, constata-se que com o aumento de 1 mg g⁻¹ de Cl *a*, ter-se-á incremento de 0,591 mg g⁻¹ no teor de Cl *b*; dessa forma, a relação observada entre esses pigmentos foi de 1,7:1. Lamas Júnior (2008, p. 87) analisando o teor de clorofila em folhas de videiras (*Vitis vinifera* L.) cultivadas com e sem cobertura plástica no estágio de mudança da cor dos frutos, encontrou relação entre Cl *a* e *b* de 3,87 no cultivo coberto e 5,95 no descoberto. Neste estudo, destaca-se, além da alta relação entre os dois tipos de clorofila, a redução desta sob cultivo protegido, ou seja, incremento no teor de Cl *b*. Isso foi em razão da menor radiação solar incidente sobre as folhas, levando as plantas a se adaptarem com mais pigmentos fotossintetizantes, sobretudo a Cl *b* para absorção dos comprimentos de onda (entre 300 e 580 nanômetros) mais comprometidos pela cobertura plástica.

Diferentes áreas da ciência agrônômica têm interesse na determinação do teor de pigmentos foliares, por se tratar de análise em nível molecular, torna-se importante, por exemplo, para a avaliação nutricional das plantas. Se um determinado nutriente apresentar concentração no solo abaixo do nível ideal para a planta ou na prevalência de algum fator que restrinja a sua disponibilidade, antes de ser possível observar sintomas, a sincronia molecular foliar obterá desordens manifestadas (MALAVOLTA, 2006, p. 557) passível de diagnose por intermédio da concentração de pigmentos foliares. O teor de pigmentos fotossintetizantes é frequentemente utilizado por pesquisadores para estimar a eficiência do processo fotossintético e, conseqüentemente, seu reflexo sobre o crescimento e adaptabilidade das plantas em diversos ambientes (CARVALHO, 1996, p. 100).

O R² do modelo estimado de correlação linear entre Cl total e Car foi de 0,655, com incremento de 0,117 mg g⁻¹ no teor dos pigmentos Car em resposta à elevação de 1 mg g⁻¹ de Cl total (Gráfico 2 f). Carvalho et al. (2007, p. 23) demonstraram para espécies arbustivo-arbóreas caducifólias do cerrado brasileiro, que diferentes resultados podem ser encontrados para os teores de pigmentos fotossintetizantes, de acordo com o período do ano em que as folhas são analisadas. Os autores observaram variação na relação Cl total/Car de 4 até 7 durante cinco meses de avaliação, com as menores relações coincidindo com a estação de seca e proximidade com a queda das folhas. As espécies *D. kaki*, *F. carica* e *P. persica* perdem completamente as folhas durante o outono, quando entram em estado de dormência. Entretanto, neste estudo, ressalta-se que a análise de pigmentos foi realizada no verão, portanto, os dados indicam o estado do aparato fotossintético oposto àquele que seria próximo da senescência foliar (outono-inverno), com acúmulo de Car.

3 CONCLUSÃO

A solução alcoólica nos distintos procedimentos em que foi empregada caracterizou-se pela baixa eficiência de extração de pigmentos fotossintetizantes, por não contemplar satisfatoriamente a amplitude interespecífica de características foliares, além dos baixos teores extraídos. A solução de

acetona foi a mais eficiente, sobretudo após a incubação dos discos foliares por 48 horas em refrigerador. De maneira geral, os pigmentos presentes nas folhas das espécies frutíferas extraídos pelo método mais eficiente, apresentaram correlações lineares significativas.

REFERÊNCIAS

BARBIERI JÚNIOR, Élio et al. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação de teores de clorofilas em folhas de capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 633-636, mar. 2010.

BHARDWAJ, Satindra Nath; SINGH, Kushal Pal. Relation between specific leaf weight, leaf conductance, carbon exchange rate and chlorophyll contents in genotypes of upland cotton *Gossypium hirsutum* (Linn.). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 112-110. 1988.

CARVALHO, Ana Paula et al. Variações sazonais nas concentrações de pigmentos e nutrientes em folhas de espécies de cerrado com diferentes estratégias fenológicas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 19-27, 2007.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Influência da intensidade luminosa e do substrato no crescimento, no conteúdo de clorofila e na fotossíntese de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. *Calophyllum brasiliense* Camb. e *Centrolobium robustum* (Vell.) Mart. ex Benth., na fase juvenil**. 1996. 157 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CHAGAS, Edvan Alves et al. **Aspectos técnicos do cultivo do pessegueiro**. 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/pessego/index.htm>. Acesso em: 23 maio 2010.

CONSTANTINO, Mauricio Gomes; SILVA, Gil Valdo; DONATE, Paulo Marcos. **Fundamentos de química experimental**. São Paulo: Ed. da USP, 2004.

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, p. 777-779, jul. 2007.

FIORAVANÇO, João Caetano; PAIVA, Marília Caleffi. Cultura do caquizeiro no Brasil e no Rio Grande do Sul: situação, potencialidade e entraves para o seu desenvolvimento. **Informações Econômicas**, v. 37, n. 4, p. 43-51, 2007.

GOMES, Pimentel. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 2007.

Evidência, Joaçaba v. 8 n. 1-2, p. 29-42, janeiro/dezembro 2008

GUIMARÃES, Tadeu Gracioli. **A cultura do caqui**. Fortaleza: Embrapa, 2007. Disponível em: <www.seagri.ba.gov.br/not_caqui.pdf>. Acesso em: 18 maio 2010.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 18 maio 2010.

JESUS, Simone Verdes; MARENCO, Ricardo Antonio. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 815-818, 2008.

LAMAS JÚNIOR, Geraldo Luiz Chavarria. **Ecofisiologia e fitotecnia do cultivo protegido de videiras cv. Moscato Giallo (Vitis vinifera L.)**. 2008. 136 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)– Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

MALAVOLTA, Eurípedes. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.

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

PIO, Rafael et al. **Aspectos técnicos do cultivo da figueira**. 2007. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/figueira/index.htm>. Acesso em: 18 maio 2010.

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

STREIT, Nivia Maria et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.748-755, maio/jun. 2005.

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

TISOT, Daniela Arnold. **Modelos de transferência radiativa no estudo da concentração de clorofila em cana-de-açúcar utilizando dados hiperespectrais**. 2009. 112 p. Tese (Doutorado em Sensoriamento Remoto)–Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2009.

VIEIRA, Luiz Marcelino. Fruticultura: boa opção. **Informe Conjuntural**. 2004. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/Infconj/textos04/IEditor/IEditor1808.htm>>. Acesso em: 18 maio 2010.

WHITHAM, Francis; BLAYDES, David; DEVLIN, Robert. **Experiments in Plant Physiology**. New York, D. Van Nostrand Company, 1971.

Recebido em 2 de agosto de 2010

Aceito em 10 de setembro de 2010