

Métodos Comparativos na Extração de Pigmentos Foliares de Três Híbridos de *Bixa orellana* L.

Ana Claudia Ferreira da Cruz¹, Roniscley Pereira Santos², Lourdes Iarema^{3, 1},
 Katryne Rates Goulart Fernandes⁴, Kacilda Naomi Kuki⁵,
 Roberta Finamore Araújo⁶ e Wagner Campos Otoni⁷

Introdução

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes nas plantas, comuns em todas as células fotossintéticas [1]. 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 [2].

Atualmente, os pigmentos clorofílicos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados tanto como pigmentos quanto como antioxidantes [1]. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como os carotenóides, os quais sempre acompanham as clorofilas [3]. Os carotenóides possuem ligações duplas conjugadas em suas estruturas, atuam como antioxidantes [4,5].

A extração do conteúdo de pigmentos foliares pode ser de caráter destrutivo ou não, baseando-se na absorvância e reflectância destes. O método destrutivo é o mais comum, utilizando solventes orgânicos, como a acetona 80% e o éter [6].

Hiscox & Israelstam [7] sugeriram que o DMSO é um método superior ao da acetona na extração de clorofila *a* e *b* em algas verdes e para extração de pigmentos de plantas superiores. O método da acetona é moroso, pois requer maceração e centrifugação, o que limita sua aplicação em situação de campo. Enquanto, o solvente DMSO requer apenas imersão do material foliar em um conhecido volume deste solvente, eliminando-se as etapas subseqüentes [8].

O DMSO possui elevada capacidade de difusão através de membranas semipermeáveis, pois é altamente higroscópico e miscível em água em todas as proporções, sendo reconhecido também por sua eficácia como carreador de proteínas [9], o que proporciona agilidade no processo.

A presença e abundância dos pigmentos fotossintéticos variam de acordo com a espécie [10], sendo que cada espécie analisada requer ajuste no tempo e na temperatura de incubação a fim de ocorrer a extração e conservação máximas dos pigmentos foliares. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo

determinar a eficiência do DMSO como extrator do pigmentos foliares em três híbridos de *Bixa orellana* L. O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma espécie lenhosa nativa da América Tropical, com distribuição das Guianas à Bahia, sendo bastante cultivada em todos os estados brasileiros, assim como em outros países, como, Índia, Sri Lanka, Java e algumas partes do México. Pertence à família de uma só espécie (Bixaceae), sendo amplamente empregada como ornamental devido à beleza de suas flores [11] e, em virtude de constituir um arbusto de forma esbelta, é utilizada para cercas vivas. Ultimamente vem despertando grande interesse na indústria devido à particularidade de armazenar em suas sementes um corante natural composto essencialmente dos carotenóides bixina e norbixina.

Material e métodos

Foram analisados pigmentos foliares de três híbridos, sendo estes resultantes de cruzamentos entre *Bixa orellana* tipos: “Fruto Verde Piloso” X “Fruto Vermelho Liso”. Os híbridos apresentam frutos de coloração distintos, tornando as matrizes específicas. Por esta razão, foram estudadas três matrizes localizadas em condições de campo na Unidade de Crescimento de Plantas do Campus da Universidade Federal de Viçosa, as quais apresentam frutos avermelhados, frutos totalmente verdes e frutos amarelados.

Três discos, com 5 mm de diâmetro, foram retirados da 5ª folha das referidas plantas e incubados em 7 mL de DMSO, às temperaturas de 25 e 65° C, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após cada período de incubação, determinou-se a absorvância das amostras, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hutachi U-2000). Os comprimentos de onda e as equações para o cálculo das concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenóides foram baseados no trabalho de Wellburn [12]. Paralelamente, efetuou-se a extração de pigmentos em acetona 80% de acordo com o Lichtenthaler [6], para posterior comparação dos resultados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 2 x 3) + 1 (genótipo x temperatura x tempo) + (acetona como

1. Mestranda em Botânica/DBV, Bolsista CAPES, Universidade Federal de Viçosa – MG. Av. Bernardes Filho, 452. Bairro de Lourdes, 36.570-000. Viçosa-MG. E-mail: aclaudia5@hotmail.com

2. Mestrando em Fisiologia Vegetal, Bolsista CAPES/DBV, Universidade Federal de Viçosa –MG

3. Doutoranda em Botânica/DBV, Bolsista CAPES, DBV, Universidade Federal de Viçosa –MG

4. Mestranda em Fisiologia Vegetal/DBV, Bolsista FAPEMIG, Universidade Federal de Viçosa –MG

5. Doutoranda em Botânica/DBV, Bolsista FAPEMIG, DBV, Universidade Federal de Viçosa –MG

6. Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa- MG

7. Professor Adjunto, DBV/BIOAGRO/UFV, Av. P.H. Rolfs s/n, Campus Universitário da UFV, 36.570-000 Viçosa, MG.

Apoio financeiro: CAPES e FAPEMIG.

testemunha), tendo cinco repetições cada tratamento.

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, considerando-se o tratamento adicional. O teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias dos tratamentos e o teste de Dunnett para comparação entre o tratamento adicional e os demais. Todas as análises foram realizadas com 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico GENES [13].

Resultados e Discussão

A análise foi realizada utilizando a média de todos os híbridos em função da temperatura e tempo (Fig. 1).

Os métodos de extração de pigmentos, pelo solvente DMSO, entre os três híbridos não apresentaram interação significativa, indicando que estes não apresentam genótipo especificidade, podendo ser aplicados na cultura do urucum. Entretanto, quando analisado o método de extração da acetona 80% para a clorofila *b*, a análise demonstrou significância ($p < 0,05$) entre os genótipos, diferindo dos resultados obtidos por Ortíz [14], a qual apontou não haver interação significativa entre os genótipos.

Os resultados 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 *B. orellana* (Fig. 1). Estes resultados diferem, parcialmente, dos resultados obtidos por outros autores [8,15], que apontam para a ineficiência do DMSO na extração total da clorofila *b* em plantas *in vivo*. Em urucum, foi obtida uma maior razão entre clorofila *a/b* pelo método de extração da acetona 80% (Fig. 1) demonstrando, assim, a eficiência do DMSO como extrator de clorofila *b* para os híbridos em questão na condição de campo.

Na extração dos carotenóides, a maior eficiência também foi obtida pelo método do DMSO (Fig. 1). No entanto, quando os discos foliares foram submetidos à 65°C por um período de 48 horas foi observado o ponto máximo na extração. Em temperatura ambiente, ocorreu um decréscimo na concentração de carotenóides proporcional ao aumento no período de incubação, o que provavelmente possa ser consequência da degradação desse pigmento. Estes resultados geram maior credibilidade à utilização do DMSO como extrator, uma vez que, se os níveis de clorofila *b* tivessem sido superestimados, os valores resultantes de carotenóides totais poderiam ser também baixos e vice-versa [6], o que não foi observado.

Os melhores resultados obtidos na extração das clorofilas *a* e *b* foram observados em temperatura ambiente pelo método do DMSO, em ambos os períodos de incubação. No entanto, quando foi utilizado o tratamento com incubação de 48 horas, os valores obtidos foram, em sua maioria, superiores, indicando que o referido método possui maior eficiência na extração de pigmentos. Entretanto, a utilização dos tratamentos com incubação de 24 e 72 horas, também sugerem resultados satisfatórios na extração de pigmentos, com a respectiva redução de valores, decorrentes, principalmente, do aumento no período de incubação.

Nas condições do presente experimento, quando os discos foliares foram submetidos por 48 horas de incubação em temperatura ambiente ao método do DMSO, obteve-se os melhores resultados na extração. Porém, apesar dos valores serem relativamente inferiores quando da utilização do tratamento com incubação de 24 horas em temperatura ambiente, o método do DMSO, apresentou resultados também satisfatórios, favoravelmente a este tratamento há maior rapidez na obtenção dos resultados.

Agradecimentos

CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. 2005. As clorofilas. Santa Maria: *Ciência Rural*, 35 (3):748-755.
- [2] 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/fotossinteseKluge>.
- [3] VON ELBE, J.H. 2000. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. *Química de los alimentos*. 2ª ed. Zaragoza: Wisconsin – Madison. Cap.10, p.782-799.
- [4] FILHO, A. B. C.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. 2000. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, 30 (1): 171-175.
- [5] FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. 2000. Carotenóides. *Biocombustíveis Ciência e Desenvolvimento*, 13: 40-45.
- [6] LICHTENTHALER, H.K. 1987. 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.
- [7] HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57, 1332-1334.
- [8] BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. 1992. 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*, 32: 85-100.
- [9] RONEN, R.; GALUN, M. 1984. Pigment extraction from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*. 24: 239 - 245.
- [10] TAIZ, L.; ZIEGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 693 p.
- [11] CASTRO, C.B.; MARTINS, C.S.; FALESI, I.C.; NAZARÉ, R.F.R.; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; VENTURIERI, M.N. 1994. *A cultura do urucum*. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Brasília: EMBRAPA- SPI, 61 p.
- [12] WELLBURN, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 144:307-313.
- [13] CRUZ, C.D. 2001. *Programa GENES*. Versão windows. Editora UFV, Minas Gerais. 642p, (utilizada versão 2006.4.1).
- [14] ORTÍZ, C.E.R. Avaliação fisiológica de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.). 2004. 89 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- [15] SHINANO, T.; LEI, T.T.; KAWAMUKAI, T.; INOUE, M.T.; KOIKE, T.; TADANO, T. 1996. Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. *Photosynthetica*, 32: 409-415.

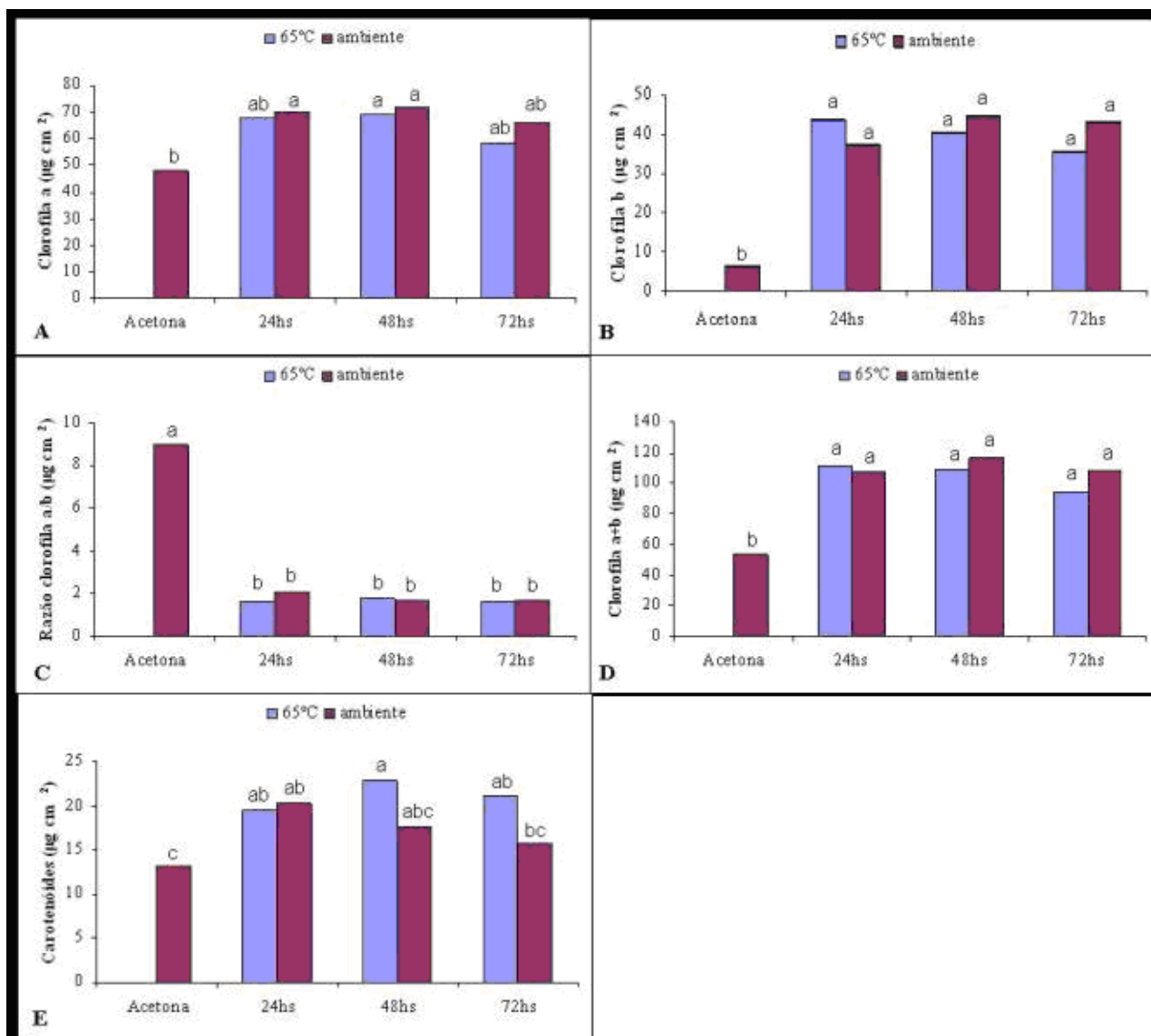


Figura 1. Teores de pigmentos foliares de híbridos de *B.orellana* utilizando-se diferentes métodos de extrações, utilizando a média de todos os híbridos em função da temperatura e tempo. 1A. Teores de Clorofila a; 1B. Teores de Clorofila b; 1C. Razão Clorofila a / Clorofila b; 1D. Somatório das Clorofilas a e b; 1E. Teores de Carotenóides