

## Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85

### Comparison of direct methods of extraction and chlorophyll contents quantification in leaves of Tifton 85 bermudagrass

Élio Barbieri Junior<sup>I\*</sup> Roberto Oscar Pereyra Rossiello<sup>I</sup> Mirton José Frota Morenz<sup>I</sup>  
Roberta Cristiane Ribeiro<sup>II</sup>

#### - NOTA -

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar qual é o melhor protocolo para extração das clorofilas *a*, *b* e total (*a* + *b*) a ser aplicado em estudos com a gramínea forrageira Tifton 85 (*Cynodon* spp.). Os resultados revelaram que os melhores extratores, tomando-se como base os teores de clorofila total (*a* + *b*), foram o *N,N*-dimetilformamida, o dimetilsulfóxido e a acetona 80% (com as equações propostas por ARNON, 1949). A variação temporal dos teores das clorofilas *a*, *b* e total ajustaram-se a um modelo hiperbólico comum a todos os solventes, sendo o período de 48 horas considerado suficiente para uma adequada extração.

**Palavras-chave:** *Cynodon* spp., acetona, *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfóxido.

#### ABSTRACT

This study aimed to assess which is the most appropriate protocol for extraction of chlorophylls *a*, *b* and total (*a* + *b*) to be applied in studies with Tifton 85 (*Cynodon* spp.) forage grass. Results revealed that, based on total (*a* + *b*) chlorophyll contents, the best extractors were *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide and acetone 80% (using the equations proposed by ARNON, 1949). Temporal changes in the concentrations of chlorophyll *a*, *b* and total were well described by a hyperbolic model common to all solvents, being the period of 48 hours considered sufficient for an appropriate extraction.

**Key words:** *Cynodon* spp., acetone, *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide.

As clorofilas exercem um controle dominante sobre a quantidade de radiação solar absorvida pelas plantas e por essa via as suas concentrações foliares guardam uma estreita relação com as taxas fotossintéticas e a produtividade primária (STREIT et al., 2005; BLACKBURN, 2007).

De forma geral, as principais fontes de variação associadas à extração dos pigmentos clorofilianos incluem 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 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). Em função da variedade de procedimentos experimentais disponíveis e da falta de informações mais detalhadas sobre a utilização destes em gramíneas forrageiras do gênero *Cynodon*, foi realizado um estudo visando a seleção do melhor protocolo, considerando diversos solventes, tempos de extração e equações características para a determinação espectrométrica das clorofilas *a*, *b* e total em folhas do capim-Tifton 85.

As amostras de folhas foram coletadas em parcelas experimentais oriundas de um estudo de aspectos nutricionais e produtivos do capim-Tifton 85

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro (UFRRJ), 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: eliobarbieri@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Programa de Pós-graduação em Química, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

no *Campus* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em junho de 2008. Todas as folhas amostradas foram provenientes de dosséis que tinham recebido, no curso do ano anterior, 450kg<sup>-1</sup>ha<sup>-1</sup>ano de N, na forma de ureia, além de quantidades apropriadas de P, K, Ca e Mg, de acordo com a análise de solo. A determinação dos teores de clorofilas foi realizada na primeira folha expandida, a partir do ápice, apresentando aurícula visível (*dewlap*) dos perfilhos expostos ao sol no momento da amostragem. Procedeu-se à extração de discos de 6,0mm de diâmetro, com auxílio de um furador manual, em 10 lâminas escolhidas ao acaso (1 disco/folha). O material coletado foi rapidamente transferido para frascos de vidro, previamente revestidos com papel alumínio para excluir luminosidade, contendo 20ml dos respectivos extratores. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e lacrados com filme de parafina (Parafilm<sup>®</sup>). Foram comparados cinco protocolos de extração e quantificação: acetona 80%, segundo ARNON (1949), modificado pela supressão das etapas de trituração e centrifugação dos discos, ou segundo 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). No laboratório, os frascos foram mantidos no escuro, enquanto analisados repetidamente, com intervalos de 12 horas, totalizando oito avaliações sequenciais realizadas às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas. As absorvâncias dos extratos, variáveis entre 645-665nm (dependendo de método e classe de clorofila), foram analisadas em Espectrofotômetro da marca Biospectro e modelo SP 220. Durante o período de extração, a temperatura ambiente oscilou entre 23-26°C, e a umidade relativa oscilou entre 40-75%. Todas as equações utilizadas fornecem os teores das clorofilas em unidades de µg ml<sup>-1</sup>. Considerando-se o volume do extrator, a área foliar extraída (282,74mm<sup>2</sup> de tecido verde) e a massa molar das clorofilas a e b, os teores

foram recalculados e expressos em µmol m<sup>-2</sup> da lâmina foliar. Os resultados foram analisados dentro de um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, envolvendo um fator qualitativo (método de extração) e outro quantitativo (tempo de extração). O fator qualitativo foi analisado por meio de análise de variância convencional, enquanto o quantitativo foi abordado por meio de regressão não linear, segundo os modelos disponíveis no *software GraphPad Prism v. 5.0* (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004).

Os resultados da comparação, expressos como valores médios dentro do período 12-96 horas, são apresentados na tabela 1. O maior teor de clorofila a foi obtido com DMSO, seguido pelo DMF, não havendo, entretanto, diferença significativa entre eles (teste Scott-Knott, P<0,05). A menor recuperação de clorofila a em relação ao DMSO (-23%, P<0,05) correspondeu ao método de PORRA et al. (1989). Para a clorofila b, os resultados favoreceram a acetona 80%, utilizando as equações propostas por ARNON (1949), enquanto a menor recuperação correspondeu à extração com DMSO, o que evidencia ineficiência do solvente para a extração completa desse pigmento. Para clorofila total (a+b), as melhores extrações quantitativas corresponderam aos métodos DMF (MORAN, 1982), DMSO (BARNES et al., 1992) e Acetona 80% (ARNON, 1949), os quais não diferiram significativamente entre si (Tabela 1). Do mesmo modo que o verificado para a clorofila a, a equação de PORRA et al. (1989), para a clorofila total, resultou no menor teor absoluto entre os métodos testados. Isso confirma que as equações associadas a cada um dos métodos representam um fator importante na escolha do protocolo de extração. Ressalte-se também o baixo desempenho do álcool absoluto (WINTERMANS & DE MOTTS, 1965) como extrator em folhas de Tifton 85. Esse resultado, contrário à experiência de outros autores (RITCHIE, 2008), ratifica o caráter altamente específico dos métodos de quantificação de clorofilas.

Tabela 1 - Teores médios (± desvio padrão) das clorofilas a, b e total (a+b) extraídas de lâminas foliares de *Cynodon* spp., cultivar 'Tifton 85', em função de cinco protocolos operacionais.

Método	Clorofila a (µmol m <sup>-2</sup> )	Clorofila b (µmol m <sup>-2</sup> )	Clorofila (a+b) (µmol m <sup>-2</sup> )
Dimetilsulfóxido <sup>(1)</sup>	316 ± 2,93A <sup>(6)</sup>	66 ± 1,41 C	383 ± 3,70 A
N,N Dimetilformamida <sup>(2)</sup>	297 ± 3,58 A	85 ± 2,03 B	383 ± 5,13 A
Acetona 80% <sup>(3)</sup>	250 ± 2,65 B	111 ± 1,50A	361 ± 4,05 A
Álcool absoluto <sup>(4)</sup>	259 ± 2,84 B	84 ± 2,25 B	343 ± 3,86 B
Acetona 80% <sup>(5)</sup>	242 ± 2,55 B	81 ± 1,18 B	324 ± 3,62 B

<sup>(1)</sup> BARNES et al. (1992); <sup>(2)</sup> MORAN (1982); <sup>(3)</sup> ARNON (1949) modificado; <sup>(4)</sup> WINTERMANS & DE MOTTS (1965); e <sup>(5)</sup> PORRA et al. (1989). <sup>(6)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). Seropédica, RJ, junho de 2008.

Em relação ao tempo de extração, outro importante ponto nos protocolos analíticos (TAIT & HIK, 2003), observou-se que o padrão de variação temporal para as três classes de clorofilas ajustou-se a um mesmo modelo, independentemente do método de extração (Figuras 1A a 1E). O modelo corresponde a uma hipérbole retangular, a qual se inicia em  $y=0$  para  $x=0$ , sendo utilizado para descrever a cinética de

saturação de um ligante ao seu substrato (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004). No presente caso, os ajustes foram altamente eficientes, como evidenciam a maioria dos valores de  $R^2$  acima de 0,95, salvo exceções, todas relacionadas à clorofila *b* (Figuras 1A, 1C e 1E). Também é interessante observar, em todos os casos, a estabilidade dos valores acima de 48 horas, o que sugere uma efetiva “saturação” do processo de

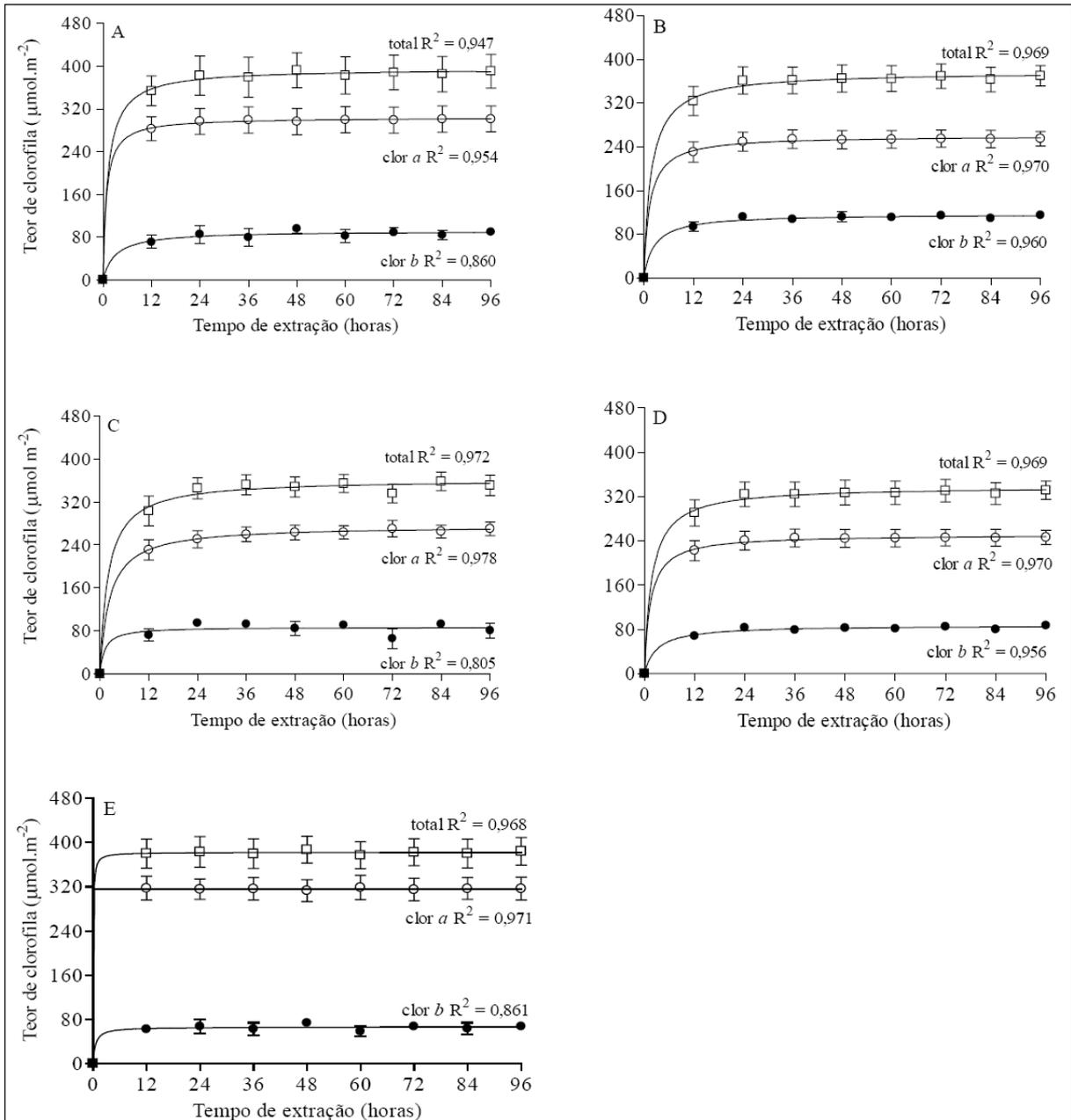


Figura 1- Teores das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*) extraídas de discos foliares de folhas de Tifton 85, por cinco protocolos diferentes, em função do tempo de extração. A: N,N-dimetilformamida (MORAN, 1982); B: acetona 80% (ARNON, 1949); C: álcool absoluto (WINTERMANS & DE MOTS, 1965); D: acetona 80% (PORRA et al., 1989); e E: dimetilsulfóxido (BARNES et al., 1992).

extração, independentemente de solvente. Assim, dentro das condições operacionais do presente trabalho, esse tempo de extração (48 horas) foi considerado o mais prudente e seguro. É possível que, com procedimentos adicionais, tais como aquecimento das amostras (BARNES et al., 1992) ou centrifugação (TAIT & HIK, 2003), os tempos de incubação possam ser diminuídos ou a eficiência de extração possa ser aumentada. Tais protocolos deveriam ser preferidos em estudos mais aprofundados, envolvendo aspectos bioquímicos ou fisiológicos, específicos a cada classe de clorofila. Entretanto, quando se trata da definição de protocolos operacionais sob condições de campo, envolvendo a comparação de elevado número de tratamentos e repetições, é admissível perder certa parcela de precisão, sem comprometer, todavia, o rigor das comparações.

Sendo assim, tomando-se como base a clorofila total ( $a+b$ ) em lâminas foliares da gramínea forrageira Tifton 85, os melhores extratores foram a N,N-dimetilformamida, o dimetilsulfóxido e a acetona 80%, com 48 horas de incubação.

## REFERÊNCIAS

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n.1, p.1-15, 1949.
- BLACKBURN, G.A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.4, p.855-867, 2007. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/58/4/855>>. Acesso em: 16 dez. 2009. doi:10.1093/jxb/er1123.
- BARNES, J.D. et al. 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, n.2, p.85-100, 1992.
- CRUZ, A.C.F. et al. 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.
- MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. **Plant Physiology**, v.69, n.6, p.1376-1381, 1982.
- MOTULSKY H.J.; CHRISTOPOULOS A. **Fitting models to biological data using linear and non-linear regression. A practical guide to curve fitting**. In Oxford University Press 2004 Oxford, UK:Oxford University, 2004. 351p.
- PORRA, R.J. et al. 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. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/8163013p214176x3/>>. Acesso em: 16 dez. 2009. doi: 10.1007/s11099-008-0019-7.
- STREIT, M.N. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000300043&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000300043&script=sci_arttext)>. Acesso em: 16 dez. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782005000300043.
- 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. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/mp46875712518092/>>. Acesso em: 16 dez. 2009. doi: 10.1023/A:1026045624155.
- WINTERMANS, J.F.G.M.; DE MOTTS, A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.109, n.2, p.448-453, 1965.