



AGRONOMIA

EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM TOMATEIRO: AJUSTE DE
METODOLOGIA

RAPHAEL ALVES FERREIRA

MORRINHOS, GO

2018

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS MORRINHOS

BACHARELADO EM AGRONOMIA

EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM TOMATEIRO: AJUSTE DE METODOLOGIA

RAPHAEL ALVES FERREIRA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos GO, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof. Dr^a Clarice Aparecida Megguer

Morrinhos – GO

Agosto, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos

F383e Ferreira, Raphael Alves.

Extração de pigmentos cloroplastídicos em tomateiro: ajuste de metodologia. / Raphael Alves Ferreira. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2018. 19 f. : il. color.

Orientadora: Dra. Clarice Aparecida Megguer.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Bacharelado em Agronomia, 2018.

1. *Solanum lycopersicum* L. 2. Índice de feofitinação.
3. Dimetilsulfóxido. I. Megguer, Clarice Aparecida. II. Instituto Federal Goiano. III. Título.

CDU 635.64

RAPHAEL ALVES FERREIRA

EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM TOMATEIRO: AJUSTE DE
METODOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso DEFENDIDO e APROVADO em 06 de agosto de 2018 pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Rhayf Eduardo Rodrigues
Membro
IF Goiano – Campus Morrinhos



Ana Carolina de Lima Ribeiro
Membro
IF Goiano – Campus Morrinhos



Prof. Drª Clarice Aparecida Megguer
Orientadora
IF Goiano – Campus Morrinhos

Morrinhos – GO

Agosto, 2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre me deu forças e graça para continuar na jornada acadêmica, também aos meus pais Renato e Marizete que sempre estiveram presentes em minha vida me mostrando o melhor caminho, e sempre ensinando a nunca desistir dos meus sonhos, e por todo sacrifício feito durante esses anos para que enfim esse dia chegasse. A minha companheira Lara que ao longo de todos esses anos sempre me apoiou e me deu forças desde o começo da caminhada acadêmica. Aos meus amigos pelo companheirismo e incentivos. E finalmente ao Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, GO, e aos professores que me proporcionaram e passaram todo o conhecimento que adquiri até aqui.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ajudar a completar mais uma jornada, a minha família e amigos que ajudaram na realização desse trabalho, a todos os professores que durante essa caminhada nos passaram os seus conhecimentos, em especial a professora Clarice Megguer pelo incentivo e orientação deste trabalho.

A minha companheira Lara Luiza que esteve do meu lado nos momentos difíceis e também felizes, ao Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos GO que sempre proporcionou diversos momentos de aprendizado e conhecimento.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>i</i>
ABSTRACT.....	<i>ii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	9
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1- Local do experimento.....	10
2.2- Material vegetal.....	10
2.3- Delineamento experimental.....	11
2.4- Processo de extração de pigmentos.....	11
2.5- Determinação de pigmentos cloroplastídicos	11
2.6- Análise estatística.....	11
2.7- Esquema metodológico.....	12
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4- CONCLUSÃO.....	14
5- ANEXOS.....	15
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pigmentos cloroplastídicos em folhas de tomateiro em resposta a temperatura de extração em função da área de discos foliares. a) Clorofila *a*; b) Clorofila *b*; c) Clorofila total; d) Razão clorofila *a*/clorofila *b*; e) Índice de feofitinização; f) Carotenoides. A temperatura de extração de 30 e 65°C estão representadas pelas duas colunas, respectivamente. Morrinhos, Goiás, 2018.....15

Figura 2. a) Clorofila *a*; b) Carotenoides; c) Clorofila total; d) Razão clorofila *a*/*b*; e) Índice de feofitinização; f) Carotenoides; em folhas de tomateiro em função do tempo de extração dos pigmentos cloroplastídicos. Morrinhos, Goiás, 2018.....16

RESUMO

FERREIRA, Raphael Alves. **Extração de pigmentos cloroplastídicos em tomateiro: Ajuste de metodologia.** 2018. 18 p. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Bacharelado em Agronomia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos, Morrinhos – GO, 2018.

A produção das culturas de interesse agrícola depende em parte do adequado funcionamento da maquinaria fotossintética. A extração desses pigmentos cloroplastídicos foliares pode ser utilizada como indicativo de estresse nas plantas, além de mostrar sua capacidade fotossintética. A metodologia clássica para mensuração dos pigmentos fotossintetizantes é resultante da coleta destrutiva das folhas do vegetal. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um extrator de clorofila e carotenoides que pode ser utilizado ao invés da acetona, com a vantagem de não requerer maceração e centrifugação o que simplifica a metodologia clássica, mostrando uma melhor eficiência em situação de campo. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho ajustar a temperatura e tempo de incubação para extração de pigmentos cloroplastídicos em folhas de tomateiro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando 7 repetições em cada tratamento. Os discos foliares foram coletados e em seguida colocados em frascos contendo 5mL de DMSO saturado com carbonato de cálcio 5% e submetidos a condições de temperatura de 30 e 65°C em períodos de 12, 24, 36 e 48 horas. Após o tempo de incubação em cada temperatura, as amostras foram lidas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 665 nm para a determinação o teor de clorofila *a*, 649 nm para clorofila *b*, 480 nm para valores de carotenoides, e 415 nm e 435 nm para calcular o índice de feofitinação (IF). Após as análises, verificou-se que as folhas de tomateiro devem ser incubadas durante 15 horas, independentemente da temperatura 30 e 65°C.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., clorofila, dimetilsulfóxido, índice de feofitinação, carotenoides.

ABSTRACT

FERREIRA, Raphael Alves. Extraction of chloroplastinic pigments in tomato: Methodology adjustment. 2018. 18 p. Completion course work (Bachelor's Degree in Agronomy). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos, Morrinhos - GO, 2018.

The production of crops of agricultural interest depends in part on the proper functioning of the photosynthetic machinery. The extraction of these chloroplast foliar pigments can be used as indicative of stress in the plants, besides showing their photosynthetic capacity. The classical methodology for measuring the photosynthetic pigments is the result of the destructive collect of plant leaves. Dimethylsulfoxide (DMSO) is an extractor of chlorophyll and carotenoids that can be used instead of acetone, with the advantage of not requiring maceration and centrifugation, which simplifies the classical methodology, showing a better efficiency in the field. Therefore, the objective of this work was to adjust the temperature and incubation time for chloroplastinic pigment extraction in tomato leaves. The experiment was carried out in a completely randomized design (DIC), using 7 replicates in each treatment. Leaf discs were collected and then placed in test tubes containing 5mL of DMSO saturated with calcium carbonate 5% and subjected to temperature conditions of 30 and 65 °C in periods of 12, 24, 36 and 48 hours. After the incubation time at each temperature, the samples were read in a spectrophotometer at absorbances of 665 nm to determine the chlorophyll a content, 649 nm for chlorophyll b, 480 nm for carotenoid values, and 415 nm and 435 nm to calculate the pheophytination index (FI). After the analyzes, it was found that tomato leaves should be incubated for 15 hours, regardless of temperature 30 and 65 °C.

Key words: *Solanum lycopersicum* L., chlorophyll, dimethylsulfoxide, pheophytinization index, carotenoids.

1- INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem grande importância no Brasil como uma das principais hortaliças consumidas na forma *in natura* ou processada, devido a sua representatividade em área plantada e quantidade produzida. O tomateiro vem se destacando como o mais importante cultivo olerícola do país, com aproximadamente 4,4 milhões de toneladas produzidas no ano de 2017 (FAO, 2017; IBGE, 2017). E essa produção pode ser em parte atrelada a fotossíntese, um dos principais processos fisiológicos, que depende do teor de pigmentos cloroplastídicos.

A extração de pigmentos foliares pode ser utilizada como indicativo de estresse nas plantas, como o cultivo em solos com acidez elevada, que pode prejudicar a planta dependendo da espécie, cultivar e tempo de exposição, a absorver os nutrientes que fazem parte da molécula de clorofila, além da formação de outros pigmentos fotossintéticos e, por fim o processo de fotossíntese (Codognotto *et al.*, 2002).

As quantidades de clorofila e carotenoides nas folhas podem ser utilizadas para avaliar o potencial fotossintético das plantas, pois as clorofilas participam ativamente no processo de fotossíntese, onde são encarregadas de realizar a conversão da radiação luminosa em energia, sobre a forma de ATP e NADPH. E a redução desses teores pode estar relacionada ao efeito negativo da deficiência de nitrogênio e magnésio sobre a taxa fotossintética da planta (Cruz *et al.*, 2007; Rego & Possami, 2006; Taiz *et al.*, 2017).

A metodologia clássica para mensuração dos pigmentos de clorofila é resultante da coleta destrutiva das folhas do vegetal. Entre os métodos destrutivos que utilizam solventes orgânicos, a acetona, o éter, o dimetilsulfóxido e o metanol são mais comuns para extração em plantas *in vivo*. A determinação da quantidade de cada pigmento extraído é padrão, baseando-se na absorvância de luz pelos pigmentos (Cruz *et al.*, 2007; Lichtenthaler, 1987).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um extrator de clorofila e carotenoides que pode ser utilizado como alternativa a acetona, com a vantagem de não requerer maceração e centrifugação o que simplifica a metodologia clássica, já que o DMSO requer apenas imersão do material foliar em um recipiente com o volume conhecido do solvente, mostrando uma melhor eficiência em situação de campo. Além disso, os extratos de DMSO podem ser

armazenados a frio por até 7 dias sem perda significativa de clorofilas *a* ou *b*, ou mudanças na relação *a/b*. Porém o solvente possui algumas limitações na extração dependendo do grau de cutinização, espessura da folha, além da temperatura de incubação (Pompelli *et al.*, 2013; Hiscox & Israelstam, 1979; Barnes *et al.*, 1992).

A ausência de cor das folhas em altas temperaturas de armazenamento é principalmente atribuída ao processo de feofitinação, isso ocorre devido ao magnésio localizado no centro da molécula de clorofila ser substituído pelo hidrogênio. Sendo considerado o mecanismo mais importante de destruição de clorofila (Martins & Silva, 2002).

A definição do teor de pigmentos foliares extraídos mostra-se como um importante método de avaliação em estudos de fisiologia vegetal, tanto para a determinação do material quanto para a separação entre os tratamentos ou relação entre as plantas e os fatores ambientais (Lambers *et al.*, 2008).

Objetivou-se com esse trabalho realizar um ajuste de metodologia otimizando a extração de pigmentos cloroplastídicos de clorofila *a*, *b* e carotenoides, sem que ocorra a feofitinação da molécula de clorofila para uma melhor extração dos pigmentos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos.

Material vegetal

As folhas do tomateiro Heinz-9553 (*Solanum lycopersicum* L.) foram coletadas em área experimental localizada ao lado do setor de fruticultura do Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos, no dia 29 de junho de 2018. Os discos foram retirados de folhas totalmente expandidas, localizadas no terço médio da planta, sem nenhum sinal de doença.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando 7 repetições em cada tratamento, totalizando 56 amostras, com cada repetição correspondendo a um frasco contendo três discos foliares imersos em solução de DMSO.

Processo de extração de pigmentos

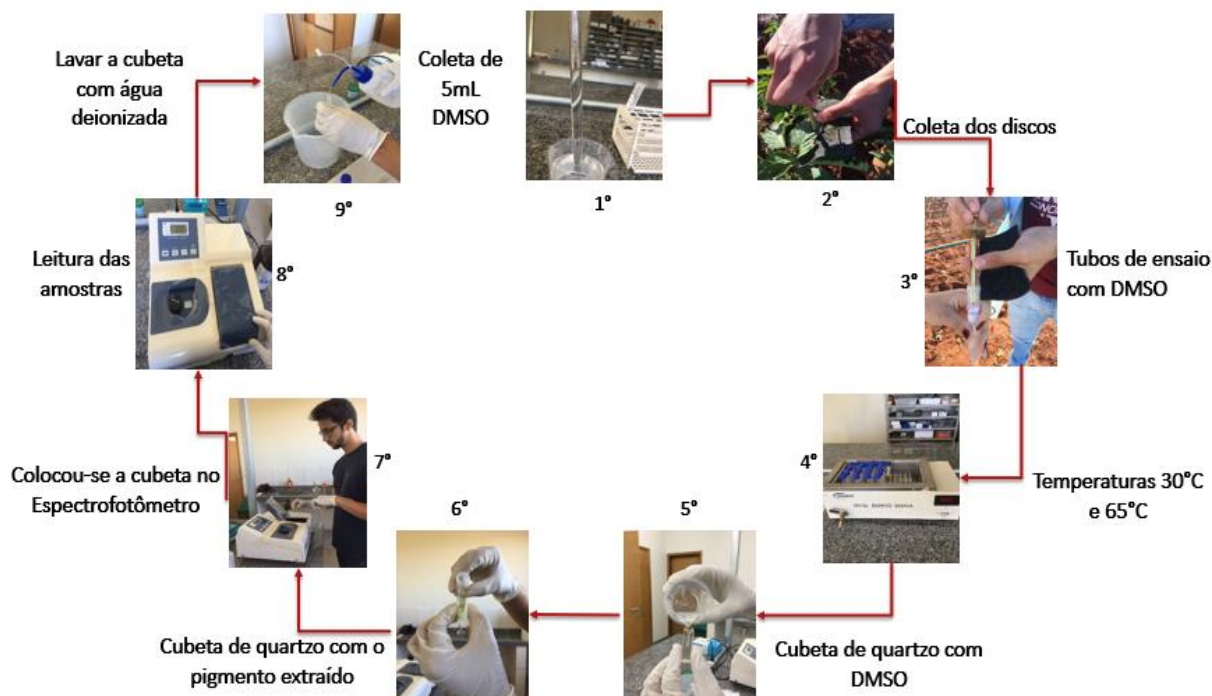
Os discos foliares, com 5 mm de diâmetro, foram retirados das folhas de tomateiro, com o auxílio do furador de rolha e imediatamente imersos em 5 mL de dimetilsufóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (5%) para que se tenha um menor índice de degradação dos pigmentos. Posteriormente as amostras foram submetidas às temperaturas de 30 e 65 °C em banho maria, por períodos de 12, 24, 36 e 48 horas (Quadro 1). Para se chegar ao DMSO saturado foi necessário colocar 50 gramas de carbonato de cálcio em 1 litro do solvente, deixando em processo de agitação por 6 horas e em seguida filtrado até atingir o aspecto translúcido.

Determinação de pigmentos cloroplastídicos

Após o período de incubação em cada temperatura, as amostras foram lidas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 665 nm para a determinação o teor de clorofila *a*, 649 nm para clorofila *b*, 480 nm para valores de carotenoides, 415 nm e 435 nm para calcular o índice de feofitinização (IF). A clorofila total foi obtida pela soma das clorofilas *a* e *b*. A divisão entre os valores de clorofila *a* e *b* foi utilizada para obter a razão clorofila *a/b*. O índice de feofitinização foi obtido pela equação: $IF = \frac{\text{Absorvância } 415\text{nm}}{\text{Absorvância } 435\text{ nm}}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hitachi U- 2000 Japão), utilizando cubeta de quartzo.

Análise estatística

Os dados encontrados foram submetidos à análise de variância e quando necessários ajustados modelos de regressão para as variáveis tempo. Os dados de temperatura foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2016).



Quadro 1. Esquema dos procedimentos realizados para a determinação dos pigmentos cloroplásticos.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de incubação interferiu na extração dos pigmentos clorofila *b* e na razão clorofila *a/b*, as demais variáveis analisadas não diferiram significativamente entre as temperaturas de 30 e 65°C (Figura 1). Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, índice de feofitinização e carotenoides foram significativamente diferentes em relação ao tempo de incubação (Figura 2).

Para os valores de clorofila *a* (Figura 1A) não houve diferença significativa na extração em relação a temperatura de incubação. A degradação da molécula de clorofila sob altas temperaturas é influenciada pela composição de ácidos graxos, e a não observância de diferenças entre as temperaturas de 30 e 65°C se deve provavelmente a baixa composição lipídica em folhas de tomateiro. No entanto, o tempo máximo para ter uma melhor extração desse pigmento é de até 14,77 horas de incubação, a partir desse período observa-se uma degradação da clorofila *a* extraída (Figura 2A).

Na extração de pigmentos de clorofila *b* (Figura 1B) verificou-se um menor valor na temperatura de 65°C. Shinano *et al.*, (1996) ao avaliar a extração de clorofila *a* e *b* em folhas de feijão, trigo, arroz, bambu anão e carvalho, apontou a ineficiência do DMSO para a extração total da clorofila *b*, em plantas *in vivo*.

Para os valores de clorofila *b* em relação ao tempo (Figura 2B), mostrou-se que a incubação por um período acima de 17 horas tem uma menor eficiência na extração do pigmento. Com isso observa-se que a clorofila *a* possui um menor período de incubação em relação a clorofila *b* em folhas de tomateiro.

Na figura 1C pode-se verificar que não existe diferença significativa entre as condições de temperaturas submetidas para a extração de clorofila total, desse modo as amostras podem ser colocadas em ambas as situações de 30 ou 65°C. Em relação ao tempo de incubação, houve diferença na extração dos pigmentos em comparação aos horários que as amostras foram submetidas (Figura 2C) no qual a melhor extração de clorofila total foi observada até no máximo 15,58 horas de incubação, e a partir desse período começa ocorrer a degradação do material. Estes resultados diferem, parcialmente, dos resultados obtidos por outros autores que apontam o tempo de extração de 48 horas em temperatura ambiente variando entre 23 e 26°C, como o melhor para a extração da clorofila total (Junior *et al.*, 2010)

A razão clorofila *a/b* (Figura 1D) foi maior na temperatura de 65°C, em comparação a condição de 30°C, onde os tempos de incubação não diferiram entre si. Divergindo de outro resultado realizado com urucum, no qual não houve diferença na extração de clorofila *a/b* em relação a temperatura exposta de 65 e 25°C. E os períodos de incubação também não influenciaram na extração (Cruz, 2007).

O índice de feofitinação (Figura 1E) não diferiu significativamente entre as condições de temperaturas em que as amostras foram expostas, desse modo a degradação das clorofilas é a mesma nas duas situações de 30 e 65°C. Porém para o tempo de incubação (Figura 2E) os menores índices de feofitinação foram verificados naqueles discos incubados por 29,32 horas.

A temperatura de incubação para extração de carotenoides (Figura 1F) não diferiu entre as temperaturas de 30 e 65°C. Opondo-se ao resultado de outros autores que afirmam a temperatura de 65°C como a mais eficiente na determinação de clorofila *b* e carotenoides em

Clusia hilariana, o uso de acetona somente foi superior quando comparado ao DMSO na temperatura ambiente (25°C) para a extração de carotenoides (Pompelli *et al.*,2013).

Em relação ao tempo (Figura 2F), verificou-se que a máxima extração do pigmento ocorreu para os discos incubados por 10,38 horas, independentemente da temperatura.

4- CONCLUSÃO

Considerando as variáveis clorofila *a*, clorofila total e índice de feofitinização, os pigmentos cloroplastídicos em folhas de tomateiro devem ser incubados durante 15 horas independentemente da temperatura de incubação, seja ela 30 ou 65°C.

5- ANEXOS

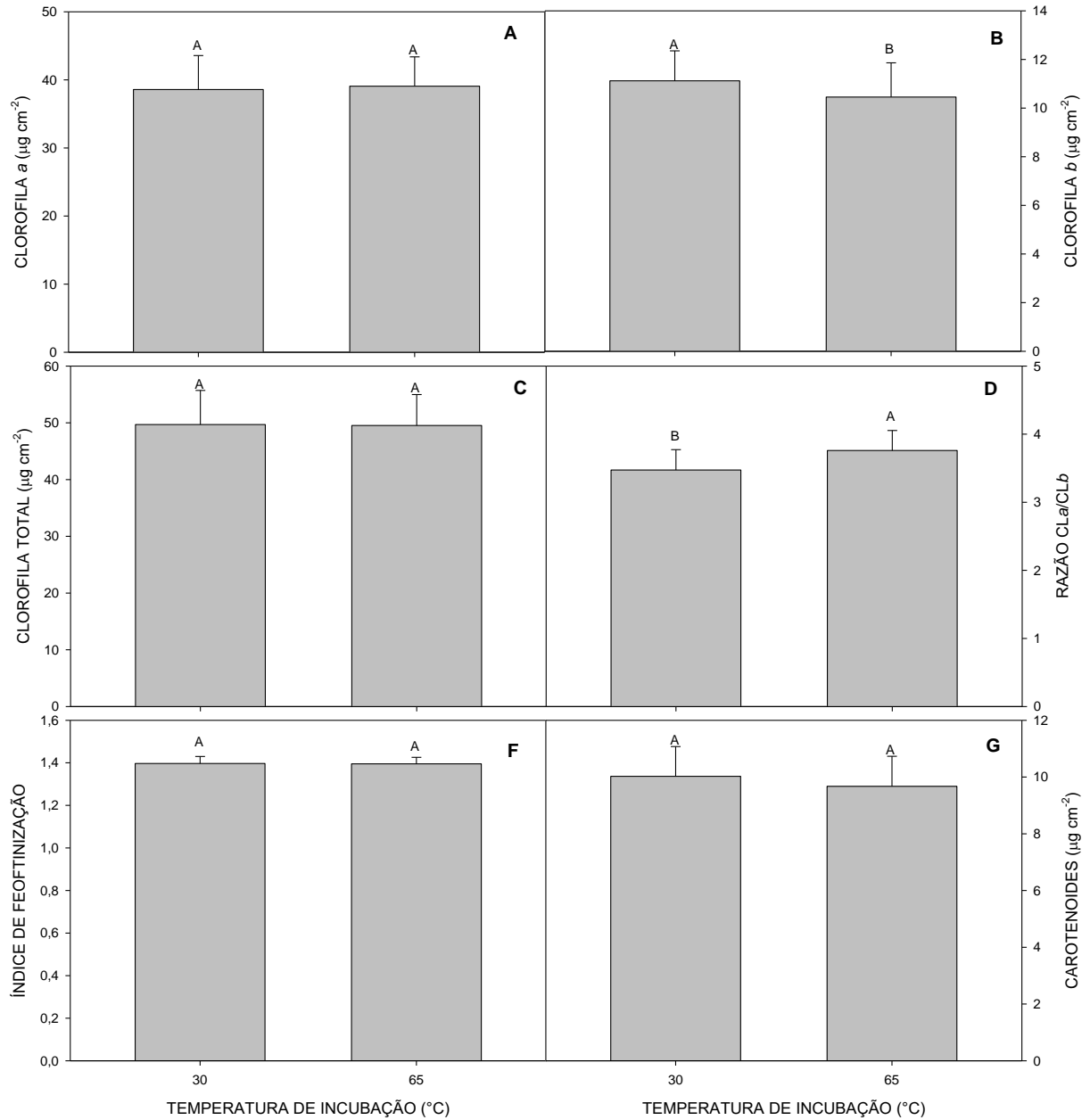


Figura 1. Pigmentos cloroplastídicos em folhas de tomateiro em resposta a temperatura de extração em função da área de discos foliares. a) Clorofila *a*; b) Clorofila *b*; c) Clorofila total; d) Razão clorofila *a*/clorofila *b*; e) Índice de feofitinação; f) Carotenoides. A temperatura de extração de 30 e 65°C estão representadas pelas duas colunas, respectivamente. Morrinhos, Goiás, 2017. (Chloroplastidic pigments in tomato leaves in response to extraction temperature as a function of the leaf disc area. a) Chlorophyll *a*; b) Chlorophyll *b*; c) Total chlorophyll; d)

Chlorophyll a / chlorophyll b ratio; e) Feofing index; f) Carotenoids. The extraction temperature of 30 and 65 ° C are represented by the two columns, respectively). Morrinhos, Goiás, 2017.

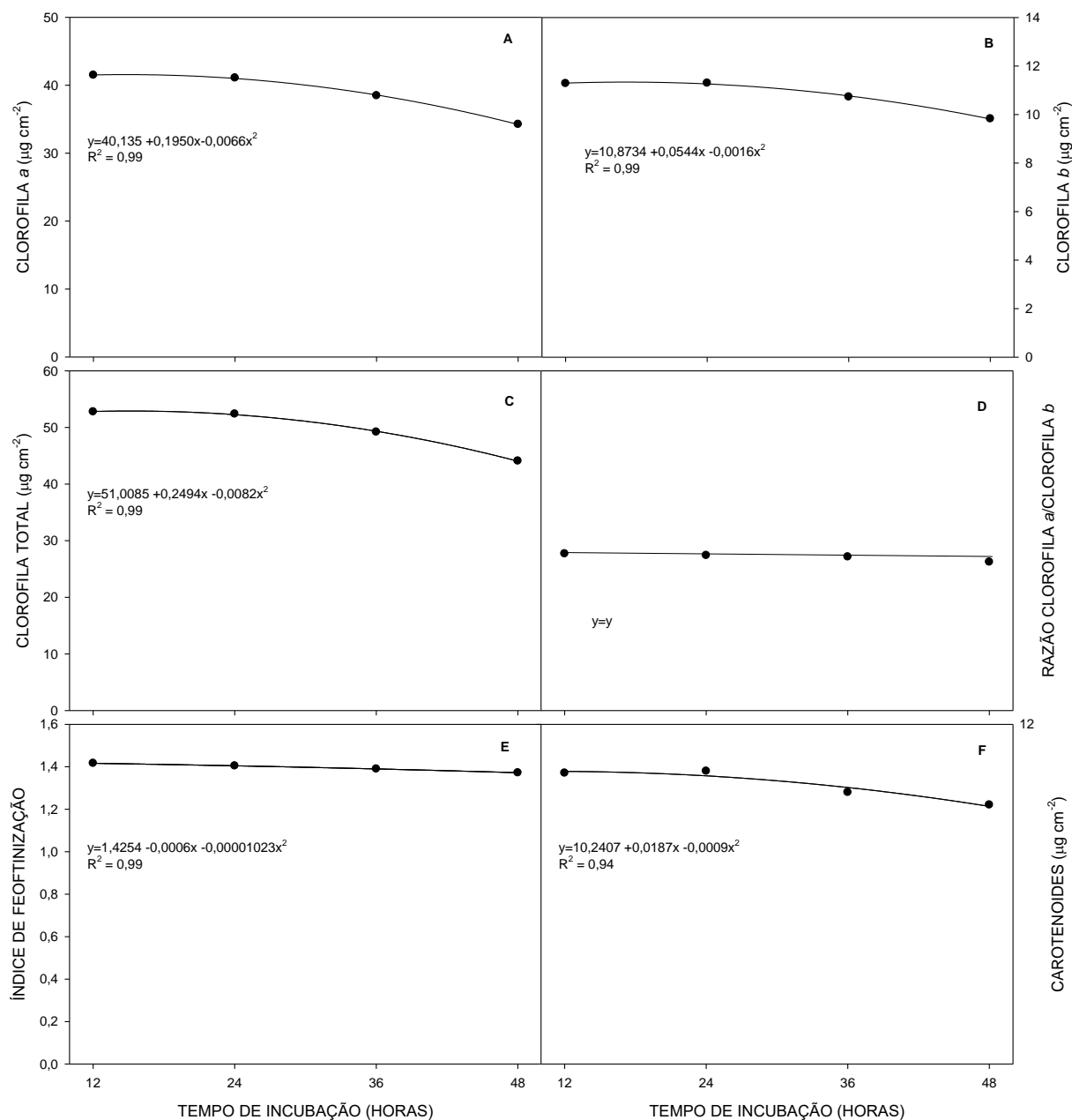


Figura 2. a) Clorofila a; b) Clorofila b; c) Clorofila total; d) Razão clorofila a/b; e) Índice de feofitinação; f) Carotenoides; em folhas de tomateiro em função do tempo de extração dos pigmentos cloroplastídicos. Morrinhos, Goiás, 2017. (a) Chlorophyll a; b) Chlorophyll b; c) Total chlorophyll; d) Chlorophyll a / b ratio; e) Feofing index; f) Carotenoids; in tomato leaves as a function of the time of extraction of the chloroplastidic pigments). Morrinhos, Goiás, 2017

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

BARNES, JD; BALAGUER, L; MANRIQUE, E; ELVIRA, S; DAVISON, AW. 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.

CODOGNOTTO, LM; SANTOS, DMM; LEITE, IC; MARIN, A; MADALENO, LL; KOBORI, NN; BANZATTO, DA. 2002. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. *Revista Ecosistema*, 27:2.

CRUZ, ACF; SANTOS RP; IAREMA L; FERNANDES, KRG; KUKI, KN; ARAUJO RF; OTONI, WC. 2007. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5:777-779.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. *Statistics: Food balance sheets*. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/fbs/en/>>. Acesso em: 06 Jul. 2018.

HISCOX, JD; ISRAELSTAM, GF. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57, 1332-1334.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA*. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?edicao=20807&t=resultados>>. Acesso em: 06 Jul. 2018

JUNIOR, EB; ROSSIELO, ROP; MORENZ, MJF; RIBEIRO, CR. 2010. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. *Ciência Rural*, 40: 633-636.

LAMBERS, H; CHAPIN III, FS; PONS, TL. 2008. Plant Physiological Ecology. Springer, New York. 540p.

LICHTENTHALER HK. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.

MARTINS, RC; SILVA, CLM. 2002. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *International Journal of Refrigeration*, 25: 966-974.

POMPELLI, MF; FRANÇA SC; TIGRE, RC; OLIVEIRA, RC; SACILOT, M; PEREIRA EC. 2013. Eficiência do dimetilsulfóxido e acetona na extração de clorofilas e carotenóides em uma espécie CAM. Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro. Viçosa: p. 45 - 46.

REGO, GM; POSSAMI, E. 2006. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. *Boletim de Pesquisa Florestal, Embrapa Florestas* 53:179

SHINANO, T, Lei TT, KAWAMUKAI T, INOUE MT, 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

TAIZ L. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora. 709p.