

PERFIL DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES TOTAIS DE *Poincinella pyramidalis* (TUL.) L.P. QUEIROZ E *Capparis flexuosa* L. EM FUNÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO

Lisandra Oliveira Rafael¹; Anne Caroline Almeida Gonçalves²; Allinny Luzia Alves Cavalcante³; Jessica Nayara Costa e Silva⁴; Francisco Fábio Mesquita Oliveira⁵

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, lisandraoliveira21@gmail.com¹; annegoncalves.c.a@gmail.com²; cavalcanteallinny@gmail.com³; ffabiomesquita@gmail.com⁵; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, jessica_nayara20@hotmail.com⁴.

Introdução

No Brasil o domínio do semiárido ocupa uma área de quase um milhão de km² se concentrando principalmente na região Nordeste, onde o Bioma Caatinga predomina (LEITE; SOUSA, 2012), abrigando uma imensa variedade de vida e um acentuado grau de endemismo. A vegetação desse bioma é extremamente diversificada, incluindo, além dos diferentes tipos de Caatinga, vários ambientes associados (enclaves). São reconhecidos 12 tipos diferentes de Caatinga, que chamam atenção especialmente pelos fascinantes exemplos de adaptações aos hábitos semiáridos (ALVES, 2007). Tal situação pode explicar, parcialmente, a grande diversidade de espécies vegetais, muitas das quais endêmicas ao bioma. Dentre as espécies vegetais endêmicas, podemos destacar a *Poincinella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) e a *Capparis flexuosa* L. (Capparaceae).

P. pyramidalis, espécie caducifólia, apresenta um enorme potencial na recuperação de áreas degradadas e reflorestamento, principalmente pela aplicação em multiusos, como forrageira, na construção, energia, recurso alimentar de insetos e aves (SIQUEIRA FILHO et al., 2009) e propriedades medicinais já comprovadas (SANTOS, C. et al., 2011; SARAIVA et al., 2012). Da mesma forma, *C. flexuosa* merece destaque como espécie de usos múltiplos, em função das densas populações que se formam mesmo em condições climáticas adversas (ALMEIDA NETO et al. 2009), bem como em decorrência das vantagens que a mesma apresenta em relação a outras espécies de ocorrência na Caatinga, permanecendo sempre verde durante todo o ano, produzindo folhas novas, principalmente na época da seca (PEREIRA et al., 2007).

Em função da importância da *P. pyramidalis* e *C. flexuosa*, faz-se necessário pesquisas sobre a performance destas espécies, principalmente a sua eficiência fotossintética e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptação dessas espécies ao ambiente semiárido.

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), onde as clorofilas *a* (Chl_a), *b* (Chl_b) e os carotenoides (*x* + *c*), são os mais importantes destes pigmentos, e são, portanto, essenciais para a conversão oxigênica da energia luminosa em energia química armazenada que, em última instância, alimenta a biosfera (RICHARDSON et al., 2002).

A partir de uma perspectiva ecofisiológica, a concentração de pigmentos foliares é extremamente variável, entre e dentro das espécies, em função de fatores internos e ambientais, sendo, portanto, um parâmetro de interesse bastante significativo. As razões para isso, inicialmente, é que a quantidade de radiação solar absorvida pelo tecido foliar é em grande parte uma função das concentrações dos pigmentos fotossintéticos, e, portanto, baixas concentrações de clorofilas podem limitar diretamente o potencial fotossintético e, conseqüentemente, a produção primária líquida (FILELLA et al., 1995). Adicionalmente, o teor de clorofilas nas folhas dar uma medida indireta do estado nutricional das plantas, uma vez que a biossíntese desses pigmentos requer uma grande quantidade de nitrogênio (GROSS, 1991). Finalmente, a concentração de pigmentos foliares está

diretamente relacionada com senescência e fatores abióticos como luminosidade, onde a proporção de clorofila *a* e clorofila *b* em plantas terrestres têm sido utilizadas como um indicador da resposta à luminosidade (VICAŞ et al., 2010). Dessa forma, quantificar os pigmentos fotossintéticos podem fornecer informações importantes sobre as relações entre as plantas e seu ambiente.

Historicamente, vários métodos têm sido desenvolvidos para a avaliação do teor de pigmentos das folhas, geralmente envolvendo a extração dos pigmentos seguida por sua determinação espectroscópica (ARNON, 1949; LICHTENTHALER, 1987). Isso é possível, graças às propriedades de absorção dos pigmentos, facilitando a análise qualitativa e quantitativa dos mesmos, embora haja um *trade-off* entre a escolha do melhor solvente para uma extração quantitativa e o uso de um solvente mais adequado para o ensaio espectrofotométrico. Com base nisso e em função da variedade de procedimentos experimentais disponíveis, assim como da falta de informações mais detalhadas sobre a utilização destes nas espécies *P. pyramidalis* e *C. flexuosa*, realizou-se um estudo visando quantificar os pigmentos fotossintéticos das espécies em questão, mediante o uso de diferentes soluções extratoras, comparando sua eficiência.

Metodologia

As amostras de folhas de *P. pyramidalis* e *C. flexuosa* foram coletadas no município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, cujo clima característico dessa região é semiárido de Köppen-Geiger, tipo *BSWh'*, registrando-se temperaturas médias em torno dos 27 °C, com mínimas de 18 e máximas chegando aos 39 °C. A precipitação pluviométrica é bastante irregular, no espaço e no tempo, sendo a média pluviométrica anual de 667,4 mm.ano⁻¹, com ocorrência de precipitação mínima registrada de 145,2 mm/ano, variando até uma máxima de 2.065,7 mm.ano⁻¹ (JALES, 2009).

As amostras de tecido fresco foram armazenadas em sacos de papel, acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas até o laboratório. Em seguida, obtiveram-se discos foliares de 1,1 cm de diâmetro, sendo os mesmos pesados e macerados em almofariz com pistilo, utilizando-se como soluções extratoras acetona gelada a 80% (v/v) ou metanol P.A. gelado. Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio e centrifugados a 2500 rpm, durante 5 minutos. Finalmente, efetuaram-se as leituras de absorbância (A) das amostras em espectrofotômetro UV-visível, resolução de 1 nm (Modelo S2000, Bell Photonics do Brasil Ltda, Piracicaba, Brasil) nos comprimentos de onda de 645, 653, 663 e 666 nm para as clorofilas e 470 nm para os carotenoides. A partir dos dados de absorbâncias e fatores de diluição (FD) realizou-se a quantificação dos teores de clorofila *a* (C_a), *b* (C_b), clorofila total ($C_a + C_b$), carotenoides totais (xantofilas + carotenos; $x + c$) (LICHTENTHALER, 1987) e a razão clorofila *a:b*, sendo os resultados expressos em micrograma por grama de massa fresca de tecido foliar ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF). De acordo com a solução extratora, utilizou-se as seguintes equações para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos:

Para a obtenção das concentrações dos pigmentos fotossintéticos extraídos com acetona a 80% (v/v), utilizou-se as seguintes equações:

$$C_a (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = [12,21A_{663 \text{ nm}} - 2,81A_{646 \text{ nm}}] \times \text{FD}$$

$$C_b (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = [20,13A_{646 \text{ nm}} - 5,03A_{663 \text{ nm}}] \times \text{FD}$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = \frac{1000A_{470 \text{ nm}} - 3,27C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) - 104C_b (\mu\text{g mL}^{-1})}{198} \times \text{FD}$$

Por outro lado, para a consecução dos teores das clorofilas e carotenoides, extraídos com metanol P.A., as equações usadas foram:

$$C_a (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = [15,65A_{666 \text{ nm}} - 7,34A_{653 \text{ nm}}] \times \text{FD}$$

$$C_b (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = [27,05A_{653 \text{ nm}} - 5,03A_{666 \text{ nm}}] \times \text{FD}$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g g}^{-1} \text{MF}) = \frac{1000A_{470 \text{ nm}} - 2,86C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) - 129,2C_b (\mu\text{g mL}^{-1})}{221} \times \text{FD}$$

Os dados foram analisados com base em um delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, em esquema fatorial 2 x 2, envolvendo dois fatores qualitativos (espécie *versus* solução de extração). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) e a análise de variância (*two way* ANOVA), para todas as variáveis, seguida pelo teste de Tukey (HSD), realizadas para detectar diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada através do *software* ASSISTAT[®], versão 7.6 beta (SILVA, 2015).

Resultados e discussões

Os valores médios (média \pm desvio padrão) do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, clorofila total e razão clorofilas *a:b* das espécies *P. pyramidalis* e *C. flexuosa*, obtidos mediante duas soluções extratoras distintas, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Teores¹ ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) de clorofilas *a*, *b*, clorofila total, carotenoides (*x + c*) e razão clorofila *a:b* em folhas de *P. pyramidalis* e *C. flexuosa* em função de diferentes soluções de extração. Médias seguidas pelas letras minúsculas (espécie) e maiúsculas (solução de extração) não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Espécie	Método de Extração		Médias
	Acetona a 80% (v/v)	Metanol P.A.	
Clorofila a			
<i>P. pyramidalis</i>	1775,483 \pm 434,332	1519,152 \pm 508,402	1647,317 a
<i>C. flexuosa</i>	1326,858 \pm 237,371	1033,035 \pm 210,279	1179,946 b
Média	1551,170 a	1276,093 b	
Clorofila b			
<i>P. pyramidalis</i>	515,407 \pm 103,542	610,485 \pm 135,453	562,946 a
<i>C. flexuosa</i>	487,957 \pm 116,481	458,559 \pm 142,858	473,258 b
Média	501,682 a	534,522 a	
Carotenoides (x + c)			
<i>P. pyramidalis</i>	139588,900 \pm 290 aA	366,800 \pm 147,711 aB	69977,850
<i>C. flexuosa</i>	109826,800 \pm 16793,245 bA	241,100 \pm 92,196 aB	55033,950
Média	124707,850	303,950	
Clorofila Total			
<i>P. pyramidalis</i>	2290,890 \pm 463,853	2129,637 \pm 538,357	2210,263 a
<i>C. flexuosa</i>	1814,815 \pm 283,762	1491,594 \pm 266,957	1653,204 b
Média	2052,852 a	1810,615 a	
Razão clorofilas a:b			
<i>P. pyramidalis</i>	3,529 \pm 0,969	2,585 \pm 1,127	3,65 a
<i>C. flexuosa</i>	2,844 \pm 0,812	2,433 \pm 0,741	4,80 a
Média	4,08 a	5,53 b	

¹Médias \pm desvio padrão (n = 10)

A análise de variância, para a variável clorofila *a*, revelou significância dos fatores espécie ($F_{3,36} = 15,9535$; $p < 0,8735$) e método de extração ($F_{3,36} = 5,5264$; $p < 0,0243$), embora a interação

espécie versus solução de extração não tenha sido significativo ($F_{3,36} = 0,057$; $p < 0,0003$) (Tabela 1). Da mesma forma, o conteúdo de clorofila *b* em plantas de *P. pyramidalis* e *C. flexuosa* foi significativamente afetada para o fator espécie ($F_{3,36} = 5,1036$; $p < 0,0300$), enquanto que o fator solução de extração ($F_{3,36} = 0,6843$; $p < 0,4134$) bem como interação espécie versus solução de extração ($F_{3,36} = 2,4577$; $p < 0,1255$) (Tabela 1) não mostraram significância. Por outro lado, a análise de variância aponta ainda que os fatores espécie ($F_{3,36} = 7,9539$; $p < 0,0077$) e solução de extração ($F_{3,36} = 551,2197$; $p < 0,0001$), assim como a interação entre ambos ($F_{3,36} = 7,8208$; $p < 0,0082$) foi estatisticamente significativa para a variável conteúdo de carotenoides (Tabela 1). Em relação ao conteúdo de clorofila total somente o fator espécie mostrou significância ($F_{3,36} = 18,8993$; $p < 0,0001$), indicando comportamento similar das duas espécies em relação à solução de extração empregada, enquanto o fator solução de extração ($F_{3,36} = 3,5737$; $p > 0,0666$), assim como a interação de ambos os fatores ($F_{3,36} = 0,3994$; $p > 0,5312$) não mostraram significância (Tabela 1). Para a razão clorofilas *a:b*, a análise de variância mostrou significância somente do fator solução de extração ($F_{3,36} = 5,3621$; $p < 0,0264$), enquanto o fator espécie ($F_{3,36} = 2,0517$; $p > 0,1605$) e a interação entre os dois fatores citados ($F_{3,36} = 0,8317$; $p > 0,3377$) não foi significativo (Tabela 1).

O presente estudo mostrou que a espécie *P. pyramidalis* apresenta um maior conteúdo de clorofilas *a*, *b* e clorofila total, quando comparada com a *C. flexuosa*, independentemente do solvente de extração utilizado. Em relação à solução de extração, a clorofila *a* é mais eficientemente extraída pela acetona a 80% (v/v), explicando o fato de que, esse meio extrator, constitui-se um dos métodos mais utilizados para a quantificação de clorofilas e carotenoides (SANTOS et al., 2007). No entanto, Scopel et al. (2011) ao avaliarem a extração de pigmentos foliares em plantas de *Brassica napus* L., utilizando a acetona a 80% (v/v), como meio extrator, encontraram uma baixa correlação para o conteúdo de clorofila *a*. A clorofila *b* e a clorofila total não sofre influência significativa dos dois solventes de extração utilizados.

O conteúdo de carotenoides, nas espécies *P. pyramidalis* e *C. flexuosa*, apresentaram os melhores resultados nas condições de ensaio utilizando-se, como meio extrator, a acetona a 80% (v/v). Em relação à espécie, independentemente do meio extrator, a *C. pyramidalis* apresentou um maior conteúdo de carotenoides, sendo que as diferenças significativas em relação a *C. flexuosa*, no entanto, somente foram observadas na acetona a 80% (v/v). Quando comparados entre si, a concentração de carotenoides nas duas espécies é bastante superior as clorofilas *a* e *b*, sendo que isso possivelmente esteja relacionado a adaptações das duas espécies a alta luminosidade, uma vez que os carotenoides atuam como pigmentos fotoprotetores a radiação ultravioleta (SALAMA et al., 2011). Adicionalmente o elevado teor de carotenoides, pode estar relacionado com deficiências nutricionais (limitação de nitrogênio), o que limita a eficiência fotoquímica, devido à redução nos teores de clorofilas (*Chl*) e um aumento concomitante no conteúdo de pigmentos não fotossinteticamente ativos, como os carotenoides (GEIDER et al., 1993).

Conclusão

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, e clorofila total, independente da solução extratora utilizada foram significativamente superiores na *P. pyramidalis*, quando comparada com a *C. flexuosa*, enquanto o conteúdo de carotenoides totais e a razão clorofila *a:b* não diferiram nas duas espécies.

Referências bibliográficas

ALMEIDA NETO, J. X.; ANDRADE, A. P.; LACERDA, A. V.; FELIX, L. P. & BRUNO, R. L. A. Composição florística, estrutura e análise populacional do feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) no semiárido paraibano, Brasil. **Revista Caatinga**. v. 22, n. 4, p.187-194. 2009.

- ALVES, J. J. A. ARAÚJO, M. A. NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma Investigação Ecogeográfica. **Caatinga**. v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 24, p. 1–15, 1949.
- FILELLA, I.; SERRANO, L.; SERRA, J.; PEÑUELAS, J. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. **Crop Science**. v. 35, p. 1400–1405, 1995.
- GEIDER, R.; LA ROCHE, J.; GREENE, R.; OLAIZOLA, M. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. **Journal of Phycology**. v. 29, p. 755 – 766, 1993.
- GROSS, J. **Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold. 1991. 278p.
- JALES, A. G. de O. **Cultivo da alface em sistemas hidropônicos utilizando rejeito da dessalinização da água**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2009.
- JAMES, A.O.; AKARANTA, O. Inhibition of Zinc in Hydrochloric acid solution by Red Onion Skin Acetone extract. **Research Journal of Chemical Sciences**, 1(1), 31–37 (2011).
- LEITE, J. C. F.; SOUZA, K. L. **New Profile of the Brazilian Northeast in Census 2010**. Fortaleza: Brazilian Northeast Bank. 2012. 106 p.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148: 349–382, 1987.
- PEREIRA, N. T.; DANTAS, J. P.; SILVA, C. C.; SILVA, J. D. S.; FARIAS, A. F. F.; SILVA, R. M.; MENDES, N. R. Análise Nutricional da espécie forrageira feijão-bravo (*Capparis flexuosa*). In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE QUÍMICA, 1., 2007, Natal. **Resumos...** Natal: Associação Norte-Nordeste de Química, 2007.
- PORRA, R. J. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae. In: SCHEER, H. (ed) Chlorophylls. p. 31–57, 1991.
- RICHARDSON, A. D.; DUGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**. v. 153, p. 185 – 194, 2002.
- SALAMA, H. M. H.; WATBAN, A. A.; FUGHOM, A. T. Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 18, p. 79 – 86, 2011.

SANTOS, J.C.; LEAL, I.R.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FERNANDES, G.W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**. v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SANTOS, R. P.; ANA CLÁUDIA FERREIRA DA CRUZ, A. C. F. DA.; LAREMA, L.; FERNANDES, K. R. G.; KUKI, K. N.; E WAGNER CAMPOS OTONI, W. C. Avaliação da Eficiência do Dimetilsulfóxido na Extração de Pigmentos Foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* Propagadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, supl. 2, p. 888-890, 2007.

SARAIVA, A.M.; SARAIVA, M.G.; GONÇALVES, A.M.; SENA FILHO, J.G.; XAVIER, H.S.; PISCIOTTANO, M.N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. (Fabaceae). **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 2, p. 52-60, 2012.

SCOPEL, W.; BARBOSA, J. Z.; VIEIRA, M. L. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. **Unoesc & Ciência – ACET**. v. 2, n. 1, p. 87-94, 2011.

SHAIKH, S. D.; DONGARE, M. Analysis of photosynthesis pigments in *Adiantum lunulatum* Burm. At different localities of Sindhudurg District (Maharashtra). **Indian Fern Journal**. v. 25, p. 83 – 86, 2008.

SILVA, F. A. S. ASSISTAT version 7.6 beta. Campina Grande-PB: Assistance Statistics. 2015. Department of Agricultural Engineering CTRN - Federal University of Campina Grande, Campina Grande. <<http://www.assistat.com/index.html>>. Acesso em 20 set 2015.

SIQUEIRA FILHO, J.A.; SANTOS, A.P.B.; NASCIMENTO, M.F.S.; SANTOS, F.S.E. (2009). **Guia de Campo de árvores da Caatinga**. Petrolina: Franciscana, 2009, 64p.

TRIPATHI, A. K.; GAUTAM, M. Biochemical parameters of plants as indicators of air Pollution. **Journal Environmental Biology**, 28, 127–132, 2007.

VICAS, S. I.; LASLO, V.; PANTEA, S.; BANDICT, G. E. Chlorophyll and carotenoids pigments from Mistletoe (*Viscum album*) leaves using different solvents. **Fascicula Biologie**. v. 2, p. 213 – 218, 2010.