



WESLEY NAVES TOSTES

**QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS EMPREGANDO DIFERENTES
MÉTODOS ANALÍTICOS EM *Digitalis purpurea*
SUBESPÉCIE *heywoodii* CULTIVADAS EM DOIS
AMBIENTES**

**LAVRAS – MG
2019**

WESLEY NAVES TOSTES

**QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EMPREGANDO
DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS EM *Digitalis purpurea* SUBESPÉCIE
heywoodii CULTIVADAS EM DOIS AMBIENTES**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para obtenção do título de bacharel.

Professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Doutoranda Érica Alves Marques
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

WESLEY NAVES TOSTES

**QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EMPREGANDO
DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS EM *Digitalis purpurea* SUBESPÉCIE
heywoodii CULTIVADAS EM DOIS AMBIENTES**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para obtenção do título de bacharel.

APROVADO em 28/11/2019

Dr. Alexandre Alves de Carvalho, UFLA
Doutoranda Érica Alves Marques, UFLA
Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, UFLA
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci, UFLA

Professor Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Doutoranda Érica Alves Marques
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ser minha âncora nos momentos difíceis e me dar esperanças de que todas as tribulações irão passar e por me abençoar a cada dia com a vida e o sorriso no rosto.

Aos meus pais que são parte fundamental, por serem minha base, meus exemplos de luta e dedicação, por me apoiarem durante toda a minha caminhada com todo o suporte necessário, por toda a educação oferecida, e por não permitirem que eu me perdesse pelo caminho.

À minha irmã Gabriela, por ser exemplo de esperança de que o amanhã será melhor, exemplo de amor incondicional independente da situação.

À meu companheiro e parceiro Mayron, que transformou minha vida em pouco tempo, que me fez aceitar quem realmente sou, exemplo de garra, força e dedicação, que me apoia e incentiva na minha caminhada, mostrando que sou capaz de promover a mudança necessária para atingir meus objetivos.

À professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci por todo carinho, paciência e apoio durante todos esses anos, por me receber de braços abertos e acreditar no meu potencial, sendo fundamental na minha carreira e vida acadêmica, agradeço imensamente por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. José Eduardo por ter me acolhido tão bem no momento em que adentrei na área de plantas medicinais durante o BIC Jr.

À doutoranda Érica por toda a parceria e amizade, por todo apoio e dedicação, por disponibilizar seu tempo para me acompanhar e ajudar, e por se fazer presente durante o experimento. Porque somos mais que amigos, somos friends ao som de Marília Mendonça.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica que compartilharam seu tempo comigo e me ajudaram nos momentos em que precisei.

À Universidade Federal de Lavras, por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal, além de fornecer toda a estrutura necessária para que isso fosse possível.

À CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica que me deu um suporte durante este período.

E todos aqueles que de certa forma contribuíram e torceram por mim, gratidão!

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Digitalis purpurea subespécie *heywoodii* popularmente conhecida como dedaleira, é uma planta nativa de Portugal e Espanha. Plantas do gênero *Digitalis* são amplamente empregados na obtenção de cardenólídeos para fins medicinais. A base para biossíntese de metabólitos secundários tem origem em reações do metabolismo basal, sendo a fotossíntese uma via primária de grande importância. Clorofilas e carotenoides são os pigmentos fotossintéticos diretamente envolvidos no processo de fotossíntese. Assim, o presente estudo teve como objetivo, determinar o melhor método e solvente para recuperação dos pigmentos fotossintetizantes em plantas submetidas a dois sistemas de cultivo. Folhas frescas de *D. purpurea* subespécie *heywoodii* cultivadas em campo e em casa de vegetação foram coletadas. Pela metodologia de Hiscox e Israelstam (1979), amostras de 50 mg foram pesadas e colocadas em tubos de Falcon envoltos com papel alumínio com 10 mL de solvente, sendo eles: DMSO, DMSO saturado em CaCO₃ e acetona 80%, incubados em estufa à 65°C por 24 e 48 horas. Pela metodologia de Lichtentaler (1987), 50 mg de folha fresca foram pesadas e maceradas em gral de porcelana com 2 ml de acetona 80%. Os resultados obtidos indicaram diferenças extrativas para cada situação de cultivo. Em plantas de casa de vegetação, o DMSO por 48 horas conseguiu uma maior recuperação em dois pigmentos distintos ao mesmo tempo. Em condições de campo, a maceração em acetona 80% teve uma maior recuperação das clorofilas *a* e *b*.

Palavras chave: Clorofilas. Casa de vegetação. Campo.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1.	A espécie <i>Digitalis purpurea</i> subespécie <i>heywoodii</i>	9
2.2.	Pigmentos fotossintéticos.....	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1.	Propagação da espécie	13
3.2.	Delineamento experimental e condições gerais.....	13
3.3.	Preparo dos solventes extratores.....	14
3.4.	Colheita e preparo do material vegetal	14
3.4.1.	Metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) adaptada por Barnes et al. (1992).....	14
3.4.2.	Metodologia de Lichtentaler (1987)	15
3.5.	Análise estatística	15
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.	CONCLUSÃO	19
6.	REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

As plantas pertencentes ao gênero *Digitalis* possuem importância econômica e medicinal. São a principal fonte de cardenolídeos, fármacos amplamente empregados no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) por aumentar a força das contrações sistólicas e regular o ritmo cardíaco. A utilização de cardenolídeos como digoxina e digitoxina tem apresentado resultados satisfatórios nos tratamentos contra o câncer, em destaque para o de mama e de próstata (LÓPEZ-LÁZARO et al., 2003; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; YEH et al., 2001). Segundo Bertol e colaboradores (2011), estudos tem mostrado que membros do gênero *Digitalis* apresentam atividade antiviral contra cepas do vírus da herpes.

A produção e cultivo de plantas é influenciada por alguns fatores. O crescimento vegetativo assim como o teor dos componentes é diretamente afetado por fatores climáticos e ambientais aos quais a planta está submetida. A luminosidade está relacionada à taxa biosintética e ao acúmulo de metabólitos secundários (ALVARENGA et al., 2015).

Proposta em 1818 por Pelletier e Caventou, a palavra clorofila é utilizada para designação da substância verde que se pode extrair de folhas com auxílio de álcool. Clorofilas são pigmentos naturais de coloração esverdeada comuns em todas as células fotossintéticas das plantas, ocorrendo principalmente nos cloroplastos das folhas e outros tecidos vegetais. Diferenças na coloração dos vegetais é devido a presença e distribuição variável de pigmentos acessórios, tais como os carotenoides que estão associados às clorofilas (STREIT et al., 2005).

Por estarem envolvidos diretamente na atividade fotossintética, a quantificação de clorofilas e carotenoides tem uma importância ímpar. Os métodos para extração e quantificação existentes são variáveis, assim como os solventes utilizados.

Assim, com base nas metodologias de Hiscox e Israelstam (1979) e Lichtentaler (1987) objetivou-se determinar o método mais adequado para a extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes de plantas de *D. purpurea* subespécie *heywoodii* submetidas a dois sistemas de cultivo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A espécie *Digitalis purpurea* subespécie *heywoodii*.

A palavra *Digitalis* tem origem do latim e significa “dedo de luva”, fazendo referência ao formato de suas flores. Sua corola varia de acordo com a espécie, podendo ser tubular cilíndrica ou tubo-globulosa. Apresenta dois lábios no limbo, sendo o superior mais curto que o inferior, e base contraída. Suas flores são zigomorfas e estão dispostas em racemos terminais, com brácteas que variam em tonalidade de cores, do roxo à rosa e do branco ao amarelo (CLEMENTE et al., 2011; SILVA, 2017).

Dentre as espécies de plantas medicinais utilizadas, o gênero *Digitalis* é de grande importância econômica e medicinal por ser a principal fonte de cardenólídeos, dentre os quais destacam-se a digoxina e digitoxina, esses fármacos são empregados no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) por aumentar a força das contrações sistólicas e controle do ritmo cardíaco (MÜLLER-URI; KREIS, 2010; SALES et al., 2002). Estudos têm mostrado também a eficiência da digoxina e digitoxina no tratamento contra o câncer, sendo utilizadas em sessões de quimioterapia (LÓPEZ-LÁZARO et al., 2003; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; YEH et al., 2001). Sugere-se também que o glicoevatromosídeo, substância pertencente à classe dos cardenólídeos, possui atividade antiviral contra cepas do herpes-vírus simples 1 e 2 (BERTOL et al., 2011; SILVA, 2017).

O gênero *Digitalis* está classificado na família Plantaginacea. Possui 20 espécies catalogadas, porém, devido à alta exploração pela indústria farmacêutica, apenas *D. lanata* e *D. purpurea* são economicamente importantes (CLEMENTE et al., 2011). A espécie *Digitalis purpurea* apresenta três subespécies, sendo elas a *Digitalis purpurea* L. subsp. *mariana* (Boiss.) Rivas Goday, *Digitalis purpurea* L. subsp. *purpurea* var. *purpurea* e *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva (SERRANO et al., 2014).

A *D. purpurea* subsp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva (Figura 1) é endêmica de Portugal e Espanha (VALDÉS; TALAVERA; FERNANDÉZ-GALIANO, 1987). Possui propagação sexuada, reproduzindo exclusivamente através de sementes. Suas folhas são basais oval-lanceoladas, branco-lanosas, com tricomas glandulares na parte inferior. Apresenta brácteas lanceoladas. Os pedicelos possuem indumento de

tricomas não glandulares tão ou mais longos que o diâmetro do pedicelo e tricomas glandulares mais curtos que o diâmetro do pedicelo. As sépalas são pubescentes-glandulares, sua corola varia entre 35-42 mm, escassamente pubescente no terço distal ou somente na margem, branco, por vezes, com a margem rosa, com pontos roxos muito pequenos na parte inferior interna (SILVA, 2017).



Figura 1: Flores de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*.

Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Digitalis_purpurea_ssp_heywoodii_1.jpg

2.2. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos presentes nos vegetais variam em quantidade de acordo com a espécie. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes encontrados nas plantas, suas variações de cores está relacionada à associação com pigmentos acessórios, dentre eles os carotenoides (SCHIOZER, 2013).

A clorofila *a* (Chl *a*) é encontrada em todos os organismos que realizam a fotossíntese oxigênica, aquela em que há a liberação de oxigênio. São responsáveis por realizar a fotoquímica que é a primeira fase do processo de fotossíntese. Os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e transferência de energia radiante para os centros de reação, por isso são denominados pigmentos acessórios. São

considerados pigmentos acessórios a clorofila *b* (Chl *b*) e os carotenoides (TAIZ & ZIEGER, 2004).

As moléculas de clorofila e os pigmentos acessórios como os carotenoides estão situadas nos cloroplastos, organela onde ocorrem as duas reações responsáveis pela fotossíntese. A reação fotoquímica ocorre nas membranas dos tilacóides, enquanto a bioquímica acontece no estroma dos cloroplastos (TAIZ & ZIEGER, 2004).

Derivadas da porfirina, as moléculas de clorofila apresentam um átomo central de Mg (magnésio) (figura 2). São estruturas macrocíclicas assimétricas completamente insaturadas formadas por quatro anéis de pirrol, estes, numerados de 1 a 4 ou de “a” a “d” (SCHOEFS, 2002). Na clorofila *a*, o anel de porfirina possui um grupo metil (-CH₃) no C-3, e a clorofila *b* um grupo aldeído (-CHO) em substituição ao grupo metil. As ligações entre as moléculas são frágeis, ou seja, não-covalentes, o que faz com que se rompam facilmente quando macerados os tecidos vegetais em solventes orgânicos. De acordo com Schiozer (2013), solventes polares são mais eficazes para extração total de clorofilas.

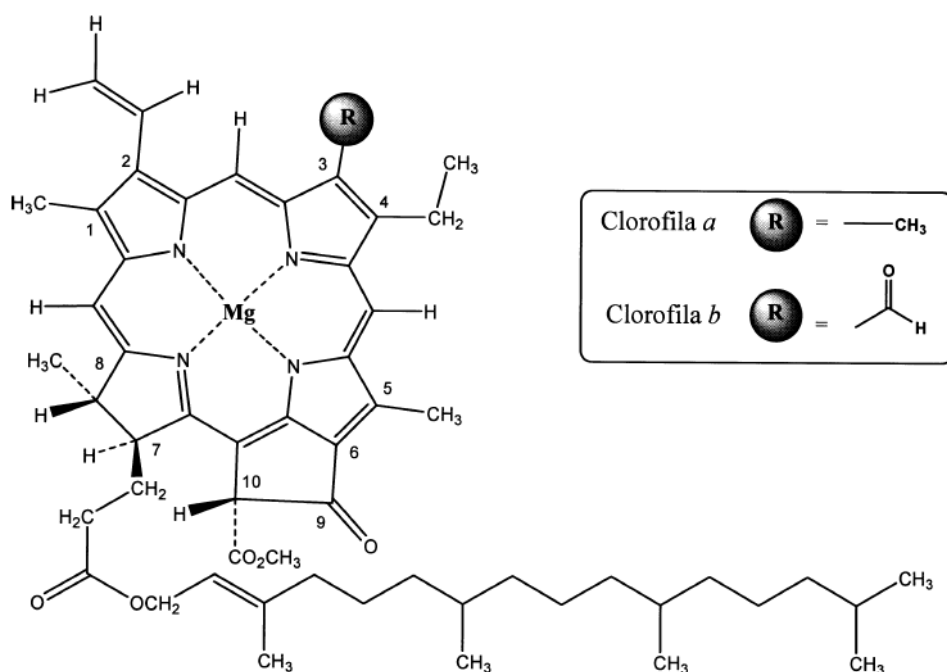


Figura 2: Estrutura das moléculas de clorofila *a* e *b* (Streit et al., 2005).

A degradação da clorofila *a* por mudanças de pH, temperatura ou luminosidade excessiva, tem como produtos resultantes o feoforbídeo *a* e a feofitina

a, ambos podem interferir na determinação real da Chl *a* já que absorvem luz e fluorescem na mesma região do espectro. Se estes feopigmentos resultantes estiverem presentes nas amostras, erros significativos serão observados na concentração de clorofila *a* (CETESB, 2014).

Os carotenoides são tetraterpenos (figura 3) formados por 40 átomos de carbonos, biosintetizados a partir do diterpeno geranylgeranyl-pirofosfato nos plastídeos de eucariontes. Diversos processos como a ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, ou a combinação entre eles, pode resultar em uma diversidade de estruturas de carotenoides. Podem ser divididos em dois grupos, os carotenos que são substâncias constituídas apenas por esqueleto de carbono e hidrogênio e as xantofilas que são oxigenadas (TORRES, 2012).

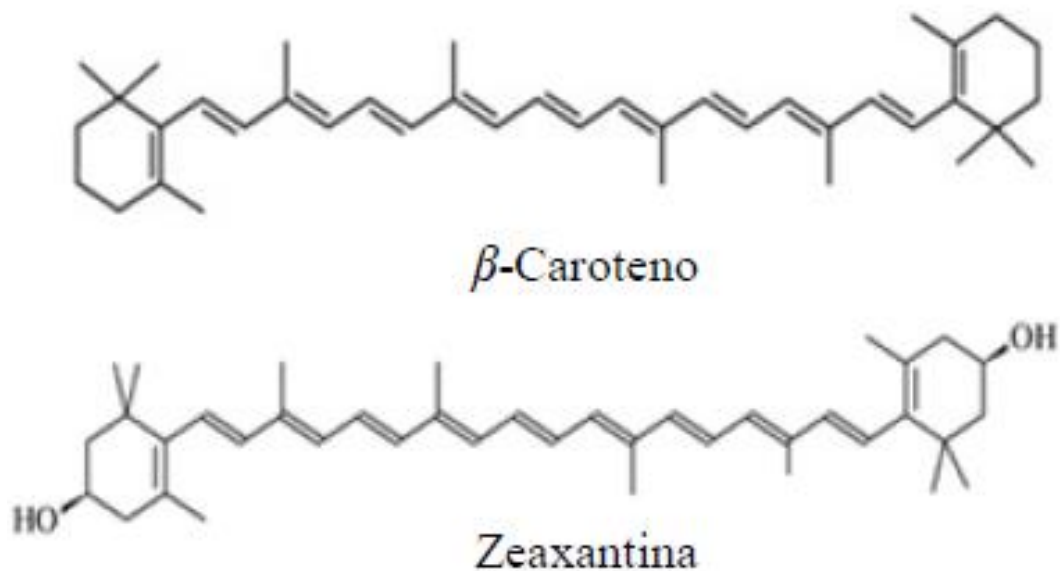


Figura 3: Estrutura molecular de um caroteno (β -Caroteno) e uma xantofila (Zeaxantina), (TORRES, 2012).

Carotenoides auxiliam na saúde humana. Apresentam efeitos de resposta do sistema imune contra cânceres, doenças do coração e degeneração macular que é a perda de visão da região central do campo visual por danos na retina. Atua também como antioxidante, promovendo excelente resultado no combate ao envelhecimento. São responsáveis pela cor de diversos vegetais, como a laranja, o maracujá, a abóbora, o tomate. E ainda na coloração de alguns animais que o adquirem através

da alimentação, como caranguejos, camarão, flamingos e guarás. No processo da fotossíntese, os carotenoides atuam como absorvedor de luz e protegem as moléculas de clorofila da oxidação pela alta intensidade luminosa (MESQUITA, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Propagação da espécie

Para a propagação da espécie, utilizou-se sementes de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* adquiridas comercialmente da Jelitto Seeds®, Alemanha. As sementes foram germinadas em bandejas de 128 células e acondicionadas em casa de vegetação. Após um período de cinco meses contados da germinação da primeira semente, parte das mudas foram transplantadas e cultivadas em canteiro e em vasos dentro de casa de vegetação no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (DAG/UFLA).

3.2. Delineamento experimental e condições gerais

O experimento foi realizado em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) com sete métodos extrativos e dois sistemas de cultivo. Os testes foram realizados seguindo dois protocolos distintos. Pela metodologia desenvolvida por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptação de Barnes et al. (1992) empregando três solventes extratores: o DMSO puro, o DMSO saturado com CaCO₃ e a acetona 80%, sendo as soluções extrativas incubados por dois períodos: 24 e 48 horas. Portanto, este experimento teve 6 tratamentos, sendo 3 solventes e 2 períodos de avaliação, com 5 repetições em cada. Para fins de comparação a metodologia clássica proposta por Lichtentaler (1987) também foi empregada. Em síntese, empregou-se maceração em gral das folhas frescas com acetona 80%. Essas análises também foram realizadas em quintuplicata. As leituras das absorbâncias foram realizadas espectrofotômetro TECAN

INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37).

3.3. Preparo dos solventes extratores

A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃) na proporção de 5 g L⁻¹ de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

A acetona 80% foi preparada utilizando-se água ultrapura.

3.4. Colheita e preparo do material vegetal

Folhas jovens de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* foram coletadas pela manhã, entre 8:00 h e 9:00 h. Folhas do terço médio das rosetas foram retiradas homogeneamente de diferentes plantas distribuídas pelo canteiro e vasos. A amostragem visou contemplar o espaço como um todo, sendo coletadas folhas de plantas presentes tanto nas extremidades como na área central do experimento.

O pecíolo foi removido e as folhas foram fragmentadas em tamanhos de aproximadamente 5 mm² retirando-se as nervuras centrais. Sob luz verde foram pesados 50 mg de folhas frescas de *Digitalis pupurea* subsp. *heywoodii* as quais foram empregadas nos processos de extração descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

3.4.1. Metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) adaptada por Barnes et al. (1992)

Sob luz verde, foram adicionados aos tubos de Falcon contendo o material vegetal 10 mL dos seguintes solventes extratores: DMSO, DMSO saturado com CaCO₃,

e acetona 80%. Os tubos foram incubados em estufa a 65°C por um período de 24 e 48 horas.

Após o período de incubação, 3 mL de solução de cada repetição foram transferidos para cubetas de quartzo e os valores de densidade óptica para clorofila *a* (649 nm), clorofila *b* (665 nm) e carotenoides (480 nm) foram mensurados em espectrofotômetro.

As equações para cálculo foram extraídas da metodologia de Wellburn (1994), conforme segue:

$$\text{Clorofila } a_{649} = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b_{665} = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides }_{480} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b) / 220.$$

Onde A é a leitura da absorvância a determinado comprimento de onda, e C_a e C_b os valores das respectivas clorofilas.

3.4.2. Metodologia de Lichtentaler (1987)

Sob luz verde, foram triturados em grala de porcelana e pistilo 50 mg do material vegetal com 2 mL de acetona 80%. Ao extrato resultante foi adicionado 8 mL do solvente e, em seguida, filtrado em papel.

A leitura das absorvâncias e os cálculos para o doseamento seguiram-se o mesmo descrito no item 3.4.1.

3.5. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o Software R com pacote Expdes para obtenção das médias. Os dados obtidos para os teores de clorofila e carotenoides

foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados obtidos para a quantificação de clorofilas e carotenoides em folhas de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em casa de vegetação.

Tabela 1 – Teores médios referentes a quantificação de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em plantas de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em casa de vegetação.

Método	Clorofila <i>a</i> (mg/g MF)	Clorofila <i>b</i> (mg/g MF)	Carotenoides (mg/g MF)
DMSO SAT 24h	0,6144 a	0,1960 c	0,1745 c
DMSO SAT 48h	0,5933 b	0,1660 d	0,1832 b
DMSO 24h	0,5846 b	0,1801 d	0,1719 c
DMSO 48h	0,6259 a	0,1947 c	0,1904 a
ACETONA 24h	0,3550 e	0,1655 d	0,1045 e
ACETONA 48h	0,5074 c	0,2313 a	0,1191 d
ACETONA TRITURADA GRAL	0,4485 d	0,2156 b	0,1041 e

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente em cada ensaio realizado segundo o teste 5% Scott-Knott.

Foram observadas variações estatisticamente significativas nos valores de clorofilas *a* e *b*, assim como os valores de carotenoides em plantas cultivadas em casa de vegetação.

A eficiência extrativa da clorofila *a*, foi melhor quando empregou-se o DMSO saturado com CaCO₃ por um período de incubação de 24 h e o DMSO por 48 h. Ambos métodos não diferiram estatisticamente entre si.

Junior e colaboradores (2010) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram a eficiência extrativa da clorofila *a*. Os melhores resultados observados por

Junior e colaboradores (2010) foram quando foi utilizado DMSO incubado por 24 ou 48 h, sugerindo ainda que quando as amostras são submetidas a outros procedimentos como aquecimento e saturação, o tempo de incubação pode ser reduzido sem que a eficiência do solvente seja afetada.

Os tratamentos em que se empregou a acetona 80% em maceração por 24 e 48 h, diferiram estaticamente entre todos os métodos extrativos e apresentaram os menores teores de clorofila *a*. Os resultados indicaram, portanto, que quando comparado ao método em que se utilizou DMSO e DMSO saturado incubados por 24 ou 48 h, a acetona 80% não foi eficiente para extrair a clorofila *a*.

Para a extração do teor de clorofila *b*, a acetona 80% incubada por 48 h diferiu estatisticamente dos demais métodos e apresentou a melhor eficiência extrativa. O método de extração em que foi empregado a maceração com acetona 80% foi o segundo mais efetivo para a extração da clorofila *b*. Os métodos em que se utilizou o DMSO saturado e DMSO, assim como a acetona 80% por 24 horas diferiram estatisticamente, porém apresentaram uma baixa recuperação deste pigmento.

Os resultados obtidos com a acetona 80% corroboram os resultados de Barnes e colaboradores (1992) e Shinano e colaboradores (1996) que demonstraram a ineficiência do DMSO na extração da clorofila *b*. Conforme esses autores, quando a acetona é incubada por um período de 24 h, esta demonstra uma certa dificuldade em atravessar a camada de cutina e cera das folhas do vegetal em um menor espaço de tempo.

Os teores médios obtidos para carotenoides diferiram estatisticamente entre si. A extração com DMSO incubado por 48 h teve uma maior recuperação deste pigmento. Os tratamentos submetidos a incubação por 24 h, assim como àqueles que utilizaram acetona 80% apresentaram baixa eficiência extrativa de carotenoides. Os resultados do presente estudo não corroboram com o de Santos e colaboradores (2007), que verificaram que a acetona 80% foi o melhor solvente para a extração de carotenoides em *Vitis* spp.

A clorofila *a* é responsável por transformar a energia luminosa em energia química no interior da célula vegetal e os carotenoides protegem as clorofilas da oxidação por altas intensidades luminosas (TAIZ & ZIEGER, 2004; MESQUITA, 2017). Diante disso, leva-se a propor a maceração com DMSO por 48 h para a extração de pigmentos fotossintéticos de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em casa

de vegetação, já que o mesmo apresentou uma melhor eficiência extrativa para dois pigmentos simultaneamente.

Na Tabela 2, estão expostos os resultados da quantificação de pigmentos fotossintéticos em folhas de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em campo.

Tabela 2 – Teores médios referentes a quantificação de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em plantas de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em campo.

Método	Clorofila <i>a</i> (mg/g MF)	Clorofila <i>b</i> (mg/g MF)	Carotenoides (mg/g MF)
DMSO SAT 24h	0,6368 d	0,1671 d	0,2082 a
DMSO SAT 48h	0,3151 f	0,0818 e	0,0815 e
DMSO 24h	0,7405 b	0,2016 c	0,2077 a
DMSO 48h	0,6910 c	0,1937 c	0,2043 b
ACETONA 24h	0,3750 e	0,1566 d	0,1087 d
ACETONA 48h	0,6347 d	0,2237 b	0,1477 c
ACETONA TRITURADA GRAL	0,8629 a	0,3558 a	0,1581 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente em cada ensaio realizado segundo o teste 5% Scott-Knott.

Para condições de campo, os valores de clorofilas *a* e *b* e carotenoides diferiram significativamente entre tratamentos.

A maceração com acetona 80% diferiu estatisticamente dos demais e teve a maior recuperação de clorofila *a*. A acetona 80%, DMSO e o DMSO saturado incubados por 24 e 48 h não foram efetivos para a extração de clorofila *a*. Estes resultados não corroboram com os de Santos e colaboradores (2007) que afirmaram que o DMSO é o solvente mais adequado para a da clorofila *a* em *Vitis* spp. Estes mesmos autores afirmaram que o DMSO tem uma elevada capacidade de difusão através de membranas semipermeáveis, o que facilitaria a extração do pigmento (SANTOS et al., 2007). Junior e colaboradores (2010), também afirmaram que o DMSO é o solvente mais adequado para a extração de clorofila *a*.

A maceração com acetona 80% foi o método mais eficaz na extração de clorofila *b*. A média obtida diferiu significativamente dos demais.

Para os carotenoides, o DMSO e o DMSO saturado incubados por 24 h não diferiram estatisticamente e apresentaram a melhor recuperação. Este resultado demonstram que não é necessário fazer a saturação para a extração deste pigmento para plantas de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* submetidas condição de cultivo em campo.

A espessura do tecido epidérmico, a camada epicuticular, o teor de clorofila e a proporção entre clorofila *a* e *b* são parâmetros que podem variar em relação à intensidade luminosa (TAIZ & ZIEGER, 2004). Conforme Fahn (1978) a estrutura e a quantidade de cera, depositada sobre a cutícula, tem grande importância na impermeabilização da superfície epidérmica. Além disso, sabe-se que o caráter hidrofílico/hidrofóbico de uma substância influi diretamente na escolha do melhor solvente para a sua extração (STREIT et al., 2005). As possíveis diferenças na espessura foliar e cuticular, assim como o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos solventes empregados no presente estudo podem ter influenciado as diferenças observadas nos teores dos pigmentos fotossintéticos de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em campo e em casa de vegetação.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que para a determinação quantitativa de pigmentos fotossintéticos há necessidade de otimização extrativa. Conforme o ambiente de cultivo que a espécie está submetida diferentes proporções de clorofila *a e b* e carotenoides serão encontradas.

Para *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*, cultivada em casa de vegetação, o melhor método extrativo de pigmentos fotossintéticos é a maceração com DMSO 48h. Para campo é a acetona 80% triturada em gral de porcelana.

6. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, I. C. A. et al. Effects on growth, essential oil content and composition of the volatile fraction of *Achillea millefolium* L. cultivated in hydroponic systems deficient in macro- and microelements. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 329-338, 2015.

BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. 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, p.85-100, 1992.

BARROSO, G.F. BMLP - **Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila a e feopigmentos pelo método fluorímetro TD-700.** Vitória, Espírito Santo, 1998. p.1-21.

BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.

CETESB. Determinação de Clorofila a e Feofitina a: método espectrofotométrico. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. v. 3, p. 2-3. 2014.

CLEMENTE, E. S. et al. Digitalis. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops.** Berlin: Springer-Verlag, 2011. chap. 5, p. 73-112.

FAHN, A. 1978, **Anatomia Vegetal.** Madrid, H. Blume Ediciones. 643p.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. (1979) A Method for Extraction of Chlorophyll from Leaf Tissue without Maceration. **Canadian Journal of Botany**, 57, 1332-1334.

JUNIOR, E.B.; ROSSIELO, R.O.P.; MORENZ, M.J.F.; RIBEIRO, R.C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.633-636, 2010.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L.; DOUCE, R. (Eds.). **Methods in enzymology**. Bad Honnef : Academic, v.148, p.350-382, 1987.

LÓPEZ-LÁZARO, M. et al. Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. heywoodii. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 701-704, Aug. 2003.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Rev. Virtual de Química**, n. 9 (2), 672-688. 2017.

NEWMAN, R.; YANG, P.; PAWLUS, A. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Mol Interv**, v. 8, p. 36-49, 2008.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; FERNANDES, K.R.G.; KUKI, K.N.; 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**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 888-890, 2007.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S.. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 3, n. 02, p. 6-24, 2013.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.361-371, 2002.

SERRANO, R. et al. Application of microscopy to *Digitalis thapsus*/*Digitalis purpurea* natural hybrid identification. In: MÉNDEZ-VILA, A. (Ed.). **Microscopy: advances in scientific research and education**. Formatex Research Center, 2014. v. 1, p. 377-384. (FORMATEX Microscopy Series, 6).

SILVA, G.M. **Adubação orgânica, micropropagação e validação analítica para doseamento de cardenólídeos totais em *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii***, 2017.p. 11-16.

STREIT, N.M; CANTERLE, L.P; CANTO, M.W; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. p.693. (Trad. SANTARÉM E.R. et al.).

TORRES, P.B. **Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz**. 2012 p. 13-15.

VALDÉS, B.; TALAVERA, S.; FERNANDÉZ-GALIANO, E. **Flora vascular de Andalucía Occidental 2**. 2. ed. Barcelona: Ketres, 1987.

WELLBURN, A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, As Well As Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal Plant Physiology**, 1994. p. 144, 307-313.

YEH, J. et al. Inhibitory effects of *Digitalis* on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Journal Urology**, v. 166, p. 1937-1942, 2001.