



Validação das unidades arbitrárias do teor de clorofilas obtido em folhas intactas de seringueira

Validation of arbitrary units of chlorophyll contents obtained in intact leaves of rubber tree

Elenice de Cássia Conforto^{1*}, Marinônio Lopes Cornélio², Regiane Peres Andreoli³, Elaine Cristine Piffer Gonçalves⁴

Resumo - A determinação do conteúdo de clorofilas foliares é uma característica de interesse dos ecofisiologistas e dos produtores rurais. Com vistas à utilização prática e nas publicações científicas, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer, para folhas de seringueira, equações capazes de converter para o sistema internacional as unidades arbitrárias que expressam os teores de clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b) e clorofila total (Chl_{tot}) obtidos em folhas intactas com uso de clorofilômetro portátil. Folhas em diferentes posições da planta e diferentes estádios de maturação, representativas de um grande intervalo de concentração de pigmentos, foram coletadas e analisadas em campo com uso do ClorofiLOG Falker®, através de quatro avaliações em 45 folíolos medianos. Estes foram posteriormente processados em laboratório para a obtenção do extrato de pigmentos com uso de dimetilsulfóxido (DMSO) por incubação em banho-maria, dosagem em espectrofotômetro de absorção molecular e conversão em teor de pigmentos por unidade de massa fresca, com uso de equações convencionais. Os dados foram avaliados quanto ao coeficiente de correlação de Pearson e testados diferentes modelos de regressão. Para todas as variáveis, o ajuste linear é o mais adequado, com coeficientes de correlação das equações de ajuste (*r*) de 0,74 para Chl_b e 0,88 para Chl_a e Chl_{tot}.

Palavras-chave - Ajuste linear. ClorofiLOG Falker. Dimetilsulfóxido. *Hevea brasiliensis*.

Abstract - The determination of foliar chlorophyll content is a characteristic that interests ecophysiologicalists and rural producers. With consideration for practical uses as well as scientific publications, our present work aims to establish equations, for rubber tree leaves, that can convert arbitrary units of expressing chlorophyll content to the international system. Chlorophyll *a* (Chl_a), chlorophyll *b* (Chl_b), and total chlorophyll (Chl_{tot}) were obtained from intact leaves using a portable chlorophyll detecting instrument. Leaves from different positions on the plant, at various stages of maturity, and representing a large spectrum of pigment concentrations, were collected and analyzed in the field using the Clorofil OG Falkner® instrument, through four evaluations in forty-five medium leaflets. At the laboratory, leaflets underwent a process of pigment extraction. They were incubated in a water-bath with dimethylsulfoxide (DMSO), dosed in molecular absorption spectrophotometer, and converted into pigment content per unit of fresh weight using conventional equations. The data were evaluated according to the Pearson correlation coefficient and tested with different regression models. For all variables, the linear fit is the most adequate, with correlation coefficients (*r*) 0.74 for Chl_b and 0.88 for Chl_a and Chl_{tot}.

Key words - Linear fitting. ClorofiLOG Falker. Dimethyl sulfoxide. *Hevea brasiliensis*.

*Autor para correspondência.

Enviado para publicação em 22/10/2013 e aprovado em 08/08/2014

¹Professora Assistente-Doutora, Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil, elenice@ibilce.unesp.br

²Professor Adjunto, Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil, mario@ibilce.unesp.br

³Bióloga, Assistente Acadêmica, Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil, regianep@ibilce.unesp.br

⁴Pesquisadora, Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios da Alta Mogiana, Colina, SP, Brasil, elainegoncalves@apta.sp.gov.br

Introdução

O principal substrato para a síntese de borracha é a sacarose, produzida através do processo fotossintético, que acontece em duas etapas. Na primeira, das reações luminosas, os pigmentos antena dos cloroplastos foliares absorvem a energia solar e, através de ressonância, transferem a excitação resultante para o centro de reação fotoquímica; na segunda, através das reações de carboxilação, os produtos da primeira etapa são utilizados na conversão enzimática do dióxido de carbono atmosférico em sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As clorofilas (a) e (b), além dos carotenoides, são pigmentos chave das reações luminosas. Deste modo, a determinação do conteúdo de clorofilas foliares e conhecimento de como ele varia entre espécies é uma característica de interesse dos ecofisiologistas e dos produtores rurais. A pigmentação foliar pode ser diretamente relacionada com o estresse fisiológico, havendo aumento na concentração de carotenoides e diminuição na de clorofilas nas situações de estresse e durante a senescência foliar (LARCHER, 2004), limitando o potencial fotossintético e a produção primária. Estudos realizados com pupunheira mostraram correlação linear da assimilação de CO₂ em função das leituras com clorofilômetro, indicando que esta monitoração pode ser um meio complementar, rápido e de baixo custo para se estimar importantes eventos fisiológicos nesta espécie (TUCCI *et al.*, 2011).

Muito do nitrogênio foliar é incorporado à clorofila, de modo que sua quantificação pode ser uma medida indireta do estado nutricional. Em plantas de milho (RAMBO *et al.*, 2011) e feijoeiro (SILVEIRA *et al.*, 2003) foi verificado que o teor relativo de clorofila foliar pode ser associado à estimativa da necessidade de nitrogênio na adubação em cobertura.

A quantidade de clorofilas nas folhas é expressa geralmente em termos de peso ou concentração molar, por unidade de massa (fresca ou seca) ou área foliar, dependendo do propósito. O extrato de pigmentos é obtido por métodos diversos, sendo as amostras foliares usadas diretamente ou passando por maceração, congelamento ou liofilização, em extrações a quente ou a frio, que incluem o uso de diversos solventes, dependendo do autor. O extrato é posteriormente analisado em espectrofotômetro ou em HPLC (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2000). Os valores de absorvância são convertidos em conteúdo de clorofila através de fórmulas originalmente propostas por Arnon (1949) e ainda utilizadas por outros autores (LICHTENTHALER; WELBURN, 1983; HENDRY; PRICE, 1993; RICHARDSON *et al.*, 2002). Tais métodos são destrutivos, demandam tempo que variam de minutos (RIGON *et al.*, 2012a, b) a dias (ARGENTA *et al.*, 2001), e ainda geram resíduos que devem ser neutralizados.

Outra opção consiste no uso de equipamentos óticos, baseados na absorvância e/ou refletância da luz pela folha intacta. Embora sejam métodos rápidos, não destrutivos e passíveis de realização em campo, expressam o conteúdo relativo de clorofilas através de índices próprios, tais como SPAD (Soil Plant Analytical Divison Value), que varia de 0 a 99,9 ou ICF (índice de clorofila de Falker), que varia de 0 a 70. Desta forma, a comparação entre dados fica restrita àqueles obtidos com uso de equipamento similar.

Assim, objetivou-se com o presente estudo buscar, para as folhas de seringueira, equações que permitam validar as unidades arbitrárias do índice de clorofila de Falker (ICF), convertendo-as em unidades do sistema internacional, com vistas à utilização prática e nas publicações científicas.

Material e métodos

Para a condução da pesquisa foi utilizada uma planta adulta do clone RRIM 600 (12 anos) e cinco plantas jovens (2 anos) dos clones RRIM 937, PB 350, RRIM 600 e PR 255, cultivadas em São José do Rio Preto, SP. O solo do local de estudo é classificado em Argissolo Vermelho-Amarelo, em fase de relevo suave ondulado, variação Lins Marília e, segundo análise do Laboratório de Solos da AFCRC (Catanduva, SP), apresenta os seguintes atributos físicos e químicos: pH 5,6; matéria orgânica: 20 g dm⁻³; P e S, respectivamente, 17 e 7 mg dm⁻³; K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e [H⁺ + Al³⁺], respectivamente: 3,4 - 23 - 13 e 20 mmol_c dm⁻³; Capacidade de Troca Catiônica: 59,4 mmol_c dm⁻³; Saturação de Bases: 66,3%; teores de cobre, ferro, manganês, zinco e boro, respectivamente, 0,4 - 35 - 12,8 - 2,4 e 0,29 mg dm⁻³; conteúdo de areia total, silte e argila, respectivamente: 691 - 93 e 216 g kg⁻¹, resultando em uma estrutura franco argilo-arenosa.

Com uso de um podão, em cada planta jovem foi coletado um ramo e, na planta adulta, dois ramos, apresentando folhas representativas de um grande intervalo de concentração de pigmentos: folhas de sol e de sombra, nos diversos estádios de maturação e senescentes. Em campo, ainda presos ao ramo, folíolos medianos de duas a três folhas foram avaliados quanto ao índice de clorofila de Falker (ICF) com uso do clorofilômetro (ClorofiLog Falker CFL 1030, Brasil), sendo utilizado o valor médio entre quatro medidas, duas em cada lado da nervura central. No total, 45 folíolos medianos foram avaliados.

Cada ramo empregado foi acondicionado em saco preto e levado ao laboratório para a extração dos pigmentos com uso do dimetilsulfóxido (DMSO), escolhido por conferir maior estabilidade ao extrato (RICHARDSON *et al.*, 2002). Os mesmos folíolos amostrados em campo foram manipulados individualmente para limpeza,

seccionamento, homogeneização e amostrada uma fração de 100 mg. O material foi incubado com 7 mL de DMSO por 65°C durante 10 h (DAUD *et al.*, 2012), sendo o volume ajustado para 10 mL, e dosado em espectrofotômetro de absorção molecular com leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm. As concentrações dos pigmentos foram calculadas de acordo com as fórmulas propostas por Arnon (1949):

$$\text{Clorofila } a \text{ (Chl}_a\text{)} = [(12,7.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.M) \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (Chl}_b\text{)} = [(22,9.A_{645}) - (4,68.A_{663})].V/(1000.M) \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Clorofila total (Chl}_{\text{tot}}\text{)} = [(20,2.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.M) \quad \text{Eq. 3}$$

onde A_{663} e A_{645} representam os valores das absorbâncias; V é o volume de DMSO em mL utilizado para a extração e M é a massa fresca foliar em grama, sendo o teor de pigmentos expresso em mg por grama de massa fresca. Os valores também foram convertidos para μmol por litro, multiplicando-se ($\text{Chl}_a \times 1,119$) e ($\text{Chl}_b \times 1,102$), conforme Hendry e Price (1993).

A análise dos dados consistiu na determinação do coeficiente de correlação de Pearson (com uso do Excel) entre as medidas obtidas com o clorofilômetro e as do extrato para os teores de Chl_a , Chl_b e Chl_{tot} . Em seguida, os valores foram plotados em gráfico de dispersão e os procedimentos de ajuste linear e não linear foram testados, com uso do software Microcal Origin 4.1.

Resultados e discussão

Os valores do coeficiente de correlação de Pearson entre a leitura realizada com o clorofilômetro e a resultante da análise do extrato de pigmentos foram, para clorofila total = 0,879; para clorofila *a* = 0,864 e para clorofila *b* = 0,679. Estes valores concordam com os obtidos por Barbieri Junior *et al.* (2012) para folhas de capim, com uso de equipamento similar ao do presente estudo, sendo de 0,721 para Chl_{tot} ; 0,646 para Chl_a e 0,797 para Chl_b , os quais foram considerados adequados.

Na Figura 1 são apresentados os gráficos de dispersão entre medidas destrutivas e as não destrutivas,

considerando-se duas unidades de medida usuais em estudos científicos.

Os valores do coeficiente de correlação das equações (*r*) não variaram em função da unidade de medida escolhida para expressar o teor de pigmentos (mg por grama de massa fresca ou $\mu\text{mol L}^{-1}$). O melhor ajuste obtido foi o linear ($p \leq 0,05$), similar ao recomendado para plantas de couve (AMARANTE *et al.*, 2008), milho (ARGENTA *et al.*, 2001; AMARANTE *et al.*, 2010) e videira (AMARANTE *et al.*, 2009); e para Chl_a e Chl_{tot} para mamoneira (RIGON *et al.*, 2012b). Este modelo difere daquele proposto para folhas de gergelim (RIGON *et al.*, 2012a), algodoeiro (BRITO *et al.*, 2011), *Betula papyrifera* (RICHARDSON *et al.*, 2002), e para folhas de plantas de limão, cupuaçu e urucum e araquá-boi (JESUS; MARENCO, 2008), para as quais se recomendam ajustes quadráticos para as três variáveis.

Uma vez que a validação das unidades arbitrárias obtidas com uso de diferentes equipamentos pode requerer equações diferentes, apesar do modelo de ajuste ser o mesmo (RICHARDSON *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2011), é recomendável que as equações empregadas sejam específicas para espécie e equipamento.

O menor coeficiente de correlação (*r*) foi verificado para clorofila *b*. Com uso de equipamento similar ao desta pesquisa, Brito *et al.* (2011) em determinações com folhas de algodoeiro verificaram menor valor para esta (0,80) do que para a clorofila *a* (0,91); para folhas de mamoneira, Rigon *et al.* (2012b) consideraram o valor tão baixo (0,53) que o descartaram como uso de fator de calibração para este tipo de clorofila. Por outro lado, em folhas de gergelim (RIGON *et al.* 2012a), os coeficientes foram altos tanto para a clorofila *a* quanto para a clorofila *b*.

Em equipamento diferente do modelo em estudo, a Chl_b apresentou tanto alta correlação - valores acima de 0,90 (RICHARDSON *et al.*, 2002), quanto baixa correlação - valores menores que 0,72 (ARGENTA *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2005). Assim, pode-se supor que o efeito está mais relacionado com a espécie do que com o tipo de equipamento empregado.

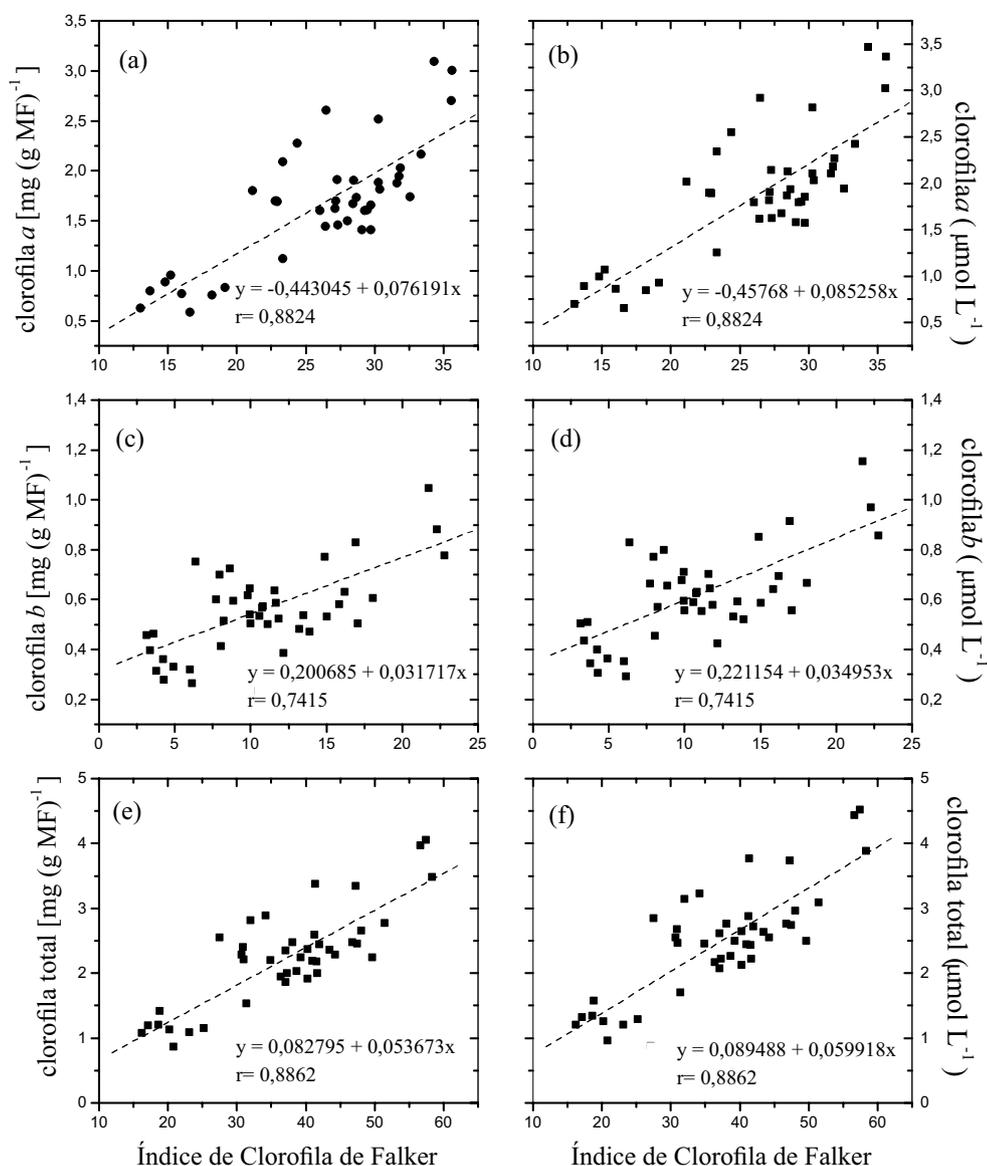


Figura 1 – Correlação entre índice de clorofila de Falker (x) e teor de pigmentos foliares (y) em folhas de seringueira, expressos em mg por grama de massa fresca (a, c, e) e μmol L⁻¹ (b, d, f).

Figure 1 - Correlation between Falker chlorophyll index (x) and content of foliar pigments (y) in rubber tree leaves, expressed in mg per gram of fresh weight (a, c, e) and μmol L⁻¹ (b, d, f).

Conclusões

Em folhas de seringueira, o índice de clorofila de Falker é convertido em unidades do sistema internacional através de regressão linear, com maior correlação para clorofila a e clorofila total.

Agradecimento

À UNESP-PROPe (Edital RENOVE 14/2012).

Literatura científica citada

- AMARANTE, C. V. T.; BISOGNIN, D. A.; STEFFENS, C. A.; ZANARDI, O. Z.; ALVES, E. O. Quantificação não destrutiva de clorofilas em folhas através do método colorimétrico. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 471-475, 2008.
- AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A.; SANGOI, L.; ZANARDI, O. Z.; MIQUELOTO, A.; SCHWEITZER, C. Quantificação de clorofilas em folhas de milho através de métodos ópticos não destrutivos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 1, p. 39-50, 2010.

- AMARANTE, C. V. T.; ZANARDI, O. Z.; MIQUELOTO, A.; STEFFENS, C. A.; ERHART, J.; ALMEIDA, J. A. Quantificação da área foliar e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira 'Cabernet Sauvignon' mediante métodos não-destrutivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 680-686, 2009.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n.1, p. 1-15, 1949.
- BARBIERI JUNIOR, E.; ROSSIELLO, R. O. P.; SILVA, R. C. M. M.; RIBEIRO, R. C.; MORENZ, M. J. F. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2242-2245, 2012.
- BRITO, G. G.; SOFIATTI, V.; BRANDÃO, Z. N.; SILVA, V. B.; SILVA, F. M.; SILVA, D. A. Non-destructive analysis of photosynthetic pigments in cotton plants. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n.4, p. 671-678, 2011.
- DAUD, R. D.; CONFORTO, E. C.; FERES, J. R. F. Changes in leaf physiology caused by *Calacarus heveae* (Acari, Eriophyidae) on rubber tree. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 2, p. 127-137, 2012.
- HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G. A. F.; Grime, J. P. (Eds.) **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman Hall, 1993, p.148-152.
- JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 4, p. 815-818, 2008.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Trad. Carlos Henrique B. A. Prado. São Carlos: RiMa, 2004. 531 p.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, n. 3, p.591-592, 1983.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Changes in carotenoides, tocopherol and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, v. 210, n. 6, p. 925-931, 2000.
- NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G.; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P.; PINHO, P. J. Uso do SPAD 502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p.517-521, 2005.
- RAMBO, L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; SILVA, A. A.; SANGOI, L.; VIEIRA, V. M. Índices nutricionais de N e produtividade de milho em diferentes níveis de manejo e de adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n.4, p.390-397, 2011.
- 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.
- RIGON, J. P. G.; BELTRÃO, N. E. M.; CAPUANI, S.; BRITON NETO, J. F.; SILVA, F. V. F. Análise não destrutiva de pigmentos fotossintéticos em folhas de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 258-261, 2012a.
- RIGON, J. P. G.; CAPUANI, S.; BELTRÃO, N. R. M.; BRITO NETO, J. F.; SOFIATTI, V.; FRANÇA, F. V. Determinação não destrutiva de pigmentos da fotossíntese em folhas de mamoneira. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 3, p. 325-329, 2012b.
- SILVEIRA, P. M.; BRAZ, A. J. B. P.; DIDONET, A. D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1083-1087, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª. Ed. Trad. Armando Molina Divan Junior. Porto Alegre: Artmed, 2013. pp. 164-236.
- TUCCI, M. L. S.; MODOLO, N. M. E.; MACHADO, E. C. Gas exchanges in peach palms as a function of the spad chlorophyll meter readings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.spe 1, p. 267-274, 2011.