

# DETERMINAÇÃO DE CLOROFILAS EM CANOLA ATRAVÉS DE MÉTODO NÃO DESTRUTIVO

**Carlos Alberto Gonsiorkiewicz Rigon<sup>1</sup>; Marcela Maria Zanatta<sup>2</sup>;  
Leonardo Oliveira Silvestre<sup>2</sup>; Roberto Bordin<sup>2</sup>; Hilda Hildebrand Soriani<sup>3</sup>;  
Vanderlei Rodrigues da Silva<sup>4</sup>; Gilberto Omar Tomm<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia-UFRGS; <sup>2</sup> Acadêmico (a) do curso de Agronomia-UFSM/FW, bolsista grupo PET Ciências Agrárias; <sup>3</sup> Professora da UFSM campus de Frederico Westphalen; <sup>4</sup>Orientador e Professor da UFSM campus de Frederico Westphalen, RS; <sup>5</sup>Pesquisador Embrapa Trigo.

## RESUMO

A mensuração da taxa fotossintética pode servir de suporte para a tomada de decisões, principalmente sobre a adubação nitrogenada. Para a mensuração desses pigmentos, existe a metodologia clássica, com a destruição do vegetal e métodos não destrutivos e instantâneos, com o uso de leitores portáteis de clorofila. Deste modo, objetivou-se estabelecer uma relação entre a leitura do índice de clorofila (ICF) com os pigmentos fotossintéticos encontrados a partir do método clássico (extração em laboratório) na cultura da canola. A obtenção de discos foliares para a extração dos pigmentos fotossintéticos em laboratório e a leitura do ICF com equipamento portátil foi realizada em cultivares de canola cultivadas na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria campus de Frederico Westphalen, RS. Em plantas aleatórias retirou-se 4 discos foliares de 0,8 cm<sup>2</sup>, perfazendo uma amostra. Neste mesmo momento, realizou-se a leitura com o equipamento portátil eletrônico ClorofiLOG Falker<sup>®</sup>. Após a leitura, cada amostra foi acondicionada em caixa de gelo para análise em laboratório. As amostras foram maceradas utilizando-se 5 mL de acetona 80% com auxílio de pistilo em cadinho de porcelana. A leitura das absorbâncias das amostras realizou-se a nos comprimentos de onda de 663 nm, 645 nm e 480 nm em espectrofotômetro de duplo feixe Modelo NOVA 2100PC. A partir dessas leituras, foram calculadas as concentrações de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl), carotenoides (x+c) e clorofila total/carotenoides (Chl/x+c). Os valores encontrados foram expressos em µg/cm<sup>2</sup>. Os dados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o índice de clorofila (ICF) como variável independente e as concentrações de pigmentos quantificadas como variáveis dependentes. Os valores de coeficiente de determinação para a correlação do ICF com a Chl a, Chl b e Chl, foram de 0,95, 0,91 e 0,95, respectivamente. A correlação do ICF com os carotenoides foi de 0,60 e com a razão clorofila total/carotenoides de 0,89. As leituras do ClorofiLOG Falker<sup>®</sup>, com exceção para a concentração de carotenoides, apresentam boa correlação com os pigmentos fotossintetizantes obtidos pela espectrofotometria em folhas de canola, principalmente para clorofila a, b e clorofila total.

**Palavras-chave:** *Brassica napus*, ClorofiLOG, portátil.

## INTRODUÇÃO

O cultivo da canola (*Brassica napus* L. var. *oleífera*) por razões comerciais e intrínsecas da cultura, vem ganhando destaque na região sul do Brasil (KAEFER et al., 2014). O sucesso produtivo desta espécie advém de condições climáticas favoráveis, e por um conjunto de boas práticas de manejo. Dentro deste conjunto, a adubação nitrogenada desempenha papel importante, devido ao caráter

altamente responsivo da canola para esse tipo de adubação (KAEFER et al., 2014; NARITS, 2010; TOMM et al., 2009).

A falta de nitrogênio (N) no sistema de cultivo da canola implica em baixas produtividades e prejudica o desenvolvimento da cultura (TOMM et al., 2009). Outro ponto a ser observado é quanto ao excesso da adubação nitrogenada, que muitos autores apontam como prática prejudicial para a produção de grãos dessa cultura (KAEFER et al., 2015; SANCHES et al., 2014).

A determinação do conteúdo de N nas plantas pode ser realizada de maneira indireta através da quantificação dos teores de clorofila nas folhas (BOWMAN et al., 2002). Para muitas plantas a clorofila nas folhas está altamente correlacionada com a concentração de N e produtividade (SMEAL; ZHANG, 1994). Desta maneira, a determinação do conteúdo de clorofila nas folhas pode servir de suporte para a tomada de decisões, principalmente sobre a adubação nitrogenada. Entretanto, a metodologia clássica adotada como padrão para a mensuração dos pigmentos clorofilianos impõe uma coleta destrutiva do vegetal, e uma sequência de técnicas laboratoriais onerosas, com gastos de tempo e solventes (RIGON et al., 2012a).

Para facilitar a mensuração dos pigmentos de clorofila, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com a utilização de medidores eletrônicos apresentando bons resultados como o SPAD-502<sup>®</sup> (MINOLTA, 1989) em café (NETTO et al., 2005), algodoeiro (NEVES et al., 2005) e frutíferas (JESUS; MARENCO, 2008) e o ClorofiLOG<sup>®</sup> (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA, 2008) em gergelim (RIGON et al., 2012a), mamoneira (RIGON et al., 2012b) e capim Tifton 85 (JUNIOR et al., 2012). Esses equipamentos portáteis permitem determinar de forma indireta o conteúdo de clorofila presente nas folhas através da quantidade de luz transmitida pela folha em dois ou três comprimentos de ondas (RIGON et al., 2012a). O equipamento portátil ClorofiLOG<sup>®</sup> opera através de três diodos que emitem comprimentos de ondas, dois na faixa do vermelho (635 nm e 660 nm) e um no infravermelho próximo (880 nm). A partir da combinação destes valores gera o ICF-Índice de Clorofila Falker (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA, 2008).

Para correlacionar a leitura do aparelho (ICF) com a quantidade real de clorofila das folhas, é necessária uma calibração individual para cada cultura, em virtude de mudanças morfológicas ocorrentes entre as espécies (RIGON et al., 2012a).

Com a intenção de facilitar a mensuração de compostos fotossintéticos e, carência de informações desta técnica para a cultura da canola no Brasil, objetivou-se com o presente trabalho: 1. Criar modelos matemáticos que correlacione a leitura do índice de clorofila pelo ClorofiLOG<sup>®</sup> com os teores de pigmentos fotossintéticos obtidos pela metodologia clássica, para a cultura da canola; 2. Avaliar os teores de clorofilas em diferentes cultivares de canola, a partir dos modelos matemáticos encontrados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de discos foliares para a extração dos pigmentos fotossintéticos em laboratório e para a leitura do ICF com auxílio do equipamento portátil ClorofiLOG<sup>®</sup>, foram semeadas 6 cultivares de canola em campo experimental da Universidade Federal de Santa Maria campus de Frederico Westphalen, sendo elas Hyola 433, Hyola 50, Hyola 61, Hyola 76, Hyola 571CL e Hyola 575CL. A semeadura ocorreu de forma manual no dia 16/06/2015. As parcelas apresentavam tamanho de 4x1,7 metros, com 5 linhas, espaçadas 34 centímetros, totalizando 40 plantas/m<sup>2</sup>. O solo apresentava característica argilosa, classificado como Latossolo Vermelho distrófico (SANTOS et al., 2006), tendo suas características químicas: pH (H<sub>2</sub>O) 5,0; matéria orgânica 2,7 %; P 7,2 mg/dm<sup>3</sup>; K 136 mg/dm<sup>3</sup>; 3 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> de Ca; 1,2 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> de Mg; 2,1 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> acidez potencial; capacidade de troca de cátions 11,6 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> e saturação por bases 60%.

Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos em laboratório e do ICF com o equipamento portátil, em plantas aleatórias no estágio de início de floração, retiraram-se 4 discos foliares de 0,8 cm<sup>2</sup>, perfazendo uma amostra. Para que a correlação entre a clorofila extraída em laboratório com o ICF através da leitura do equipamento portátil abrangesse desde valores mais baixos até valores

maiores de concentração de pigmentos, foram selecionadas folhas de pigmentação do verde claro até o verde mais escuro. Foram retiradas 30 amostras no total. Nos mesmos discos, realizou a leitura com o equipamento portátil eletrônico ClorofiLOG® 1030. Após, cada amostra foi colocada diretamente em microtubo de 2 mL e acondicionadas em caixa de gelo. Depois de colhidas todas as amostras, as mesmas foram levadas para laboratório e armazenadas em refrigerador a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a data da extração dos pigmentos.

Para a extração as amostras foram maceradas utilizando-se 5 mL de acetona 80% com auxílio de pistilo em cadinho de porcelana e posteriormente transferidas para tubos de ensaio, sendo os extratos submetidos à centrifugação por 3 minutos em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi separado e realizou-se a leitura das absorvâncias das amostras nos comprimentos de onda de 663 nm, 645 nm e 480 nm em espectrofotômetro de duplo feixe Modelo NOVA 2100PC. A partir dessas leituras, foram calculadas as concentrações de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl) carotenoides (x + c) e clorofila total/carotenoides (Chl/x + c), utilizando as fórmulas propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os valores encontrados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , levando em consideração o volume do solvente utilizado e a área extraída.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e para diferença significativa foi aplicado análise de regressão e teste Tukey para as médias. Para os modelos matemáticos, foi usada a leitura do ICF pelo equipamento portátil como variável independente, e o conteúdo dos pigmentos extraídos em laboratório como variável dependente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

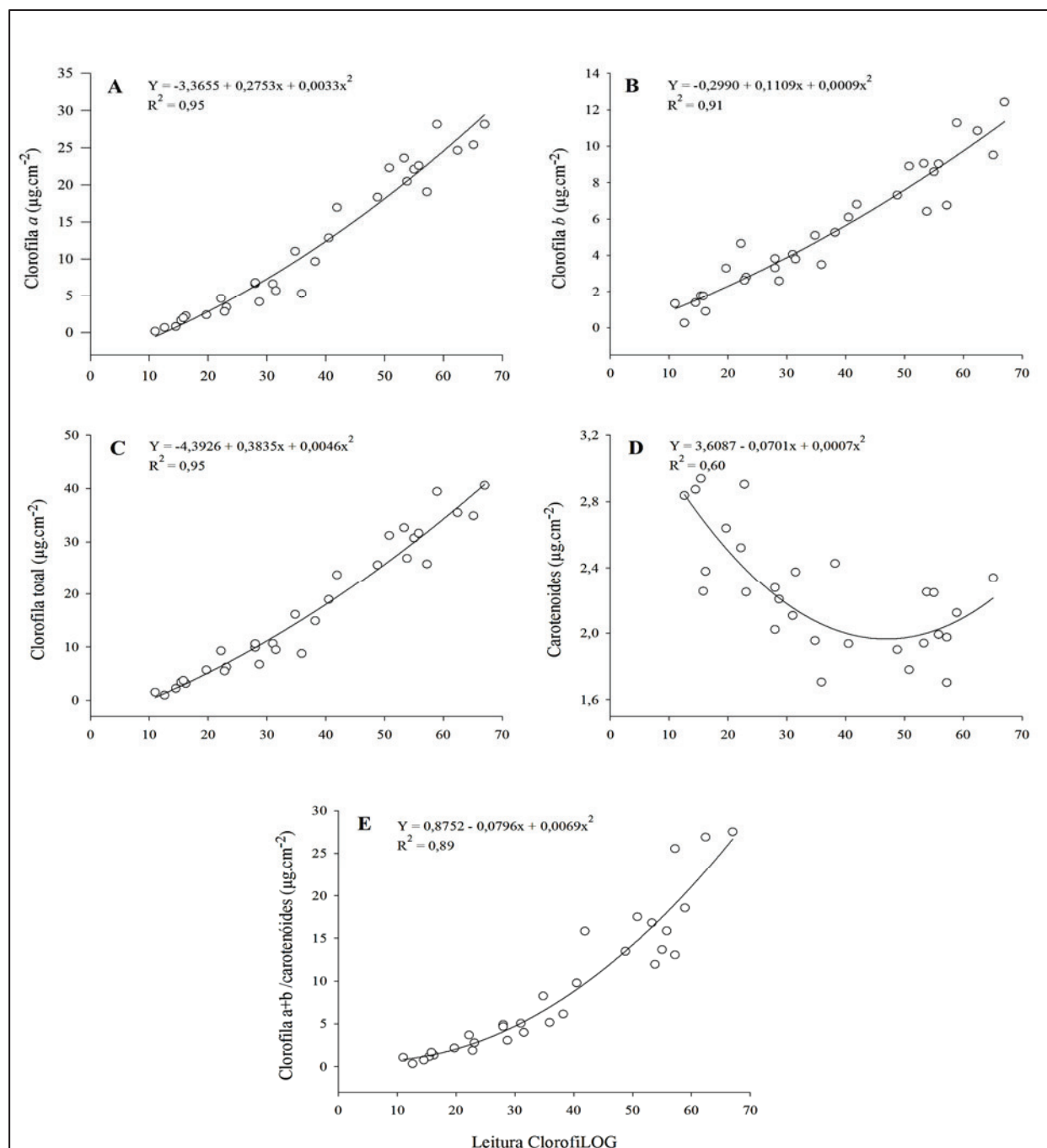
Na análise da correlação do ICF obtido pela leitura do equipamento eletrônico nas folhas de canola com o teor de Chl a em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  encontradas na extração em laboratório, nota-se que houve uma boa relação entre as leituras, apresentando coeficiente de determinação de 0,95, como pode ser visto na Figura 1A. Diante disso, afirma-se que a leitura instantânea do equipamento portátil utilizado, estima com grande precisão o conteúdo de clorofila a nas folhas de canola. Desta maneira, o modelo matemático gerado na Figura 1A poderá ser utilizado na estimativa do teor de Chl a em folhas de canola.

De mesmo modo, Rigon et al. (2012a) também verificaram alta relação entre a leitura do clorofilômetro com Chl a extraída em laboratório em folhas de gergelim (0,98). Markwell et al., (1995) estimaram modelo matemático com grande precisão das leituras com a Chl a, tanto para a cultura da soja quanto para a de milho. Entretanto, Júnior et al., (2012) trabalhando com capim Tifton 85 observaram baixa relação, com coeficiente de determinação de apenas 0,64.

Houve uma boa relação também com a leitura do equipamento portátil com o conteúdo de Chl b em canola, como pode ser visto na Figura 1B. O coeficiente de determinação de 0,91 demonstra que o ajuste quadrático pode ser usado com boa precisão para determinação desse pigmento. Muitos autores afirmam ser difícil a obtenção de boa relação da clorofila b com a leitura dos equipamentos portáteis. Segundo Neves et al. (2005) isso ocorre pelo fato de que o pico de absorção da clorofila a ser similar ao comprimento de onda emitido pelo equipamento. Rigon et al. (2012b) utilizando mesmo equipamento portátil verificaram coeficiente de determinação de apenas 0,53 para o mesmo pigmento em mamoneira. No entanto, no presente estudo, verificou-se alta relação entre a leitura do ClorofiLOG® e a Chl b em canola.

De mesmo modo que para outras clorofilas, verificou-se uma alta relação entre as leituras do equipamento portátil com os valores encontrados em laboratório para a Chl. O modelo matemático quadrático mostrado na Figura 1C se ajustou com coeficiente de determinação de 0,95, demonstrando ser possível o seu uso para a mensuração deste pigmento usando o equipamento. Estes dados corroboram com os valores encontrados por Junior et al. (2012) e Rigon et al. (2012a, 2012b), trabalhando com gergelim, mamoneira e capim, com coeficiente de determinação de 0,98, 0,98 e 0,79, respectivamente. E com os encontrados por Netto et al. (2005) em café e Jesus e Marengo

(2008) em arçá-boi, com coeficiente de determinação de 0,92 e 0,96, utilizando equipamento portátil modelo SPAD-502.



**Figura 8.** Relação entre a leitura do ClorofiLOG® com teores de clorofila  $a$  (A), clorofila  $b$  (B), clorofila total (C), carotenoides (D) e clorofila  $a + b$ /carotenoides (E) em folhas de canola.

A relação entre a leitura do equipamento portátil ClorofiLOG com a concentração de carotenoides na folha apresentou ajuste para modelo quadrático com coeficiente de determinação de 0,60, como pode ser visto na Figura 1D. Deste modo, o conteúdo de carotenoides em folhas de canola não pode ser determinado com o uso do equipamento portátil, pois esse não apresenta boa precisão para permitir sua adoção em trabalhos de pesquisas. Entretanto, a relação entre clorofila total e carotenoides com a leitura do equipamento portátil obteve alta relação, como pode ser visto na Figura 1E, com

coeficiente de determinação de 0,89. Esses resultados corroboram com os encontrados por Rigon et al. (2012b) para mamoneira.

Os carotenoides apresentam importante função como pigmento acessório e desempenham papel fundamental na fotoproteção (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os carotenoides podem prevenir a foto-oxidação da clorofila, quando essa está sob forte intensidade de luz (HENDRY; PRICE, 1993), salientando a importância da mensuração dessa relação nas plantas.

## CONCLUSÕES

Baseados nos modelos matemáticos desse trabalho, com exceção de conteúdo de carotenoide, os demais pigmentos em canola podem ser medidos com o equipamento portátil ClorofiLOG® 1030 com grande precisão, tendo ganho de tempo e economizando reagentes gastos com o método clássico de laboratório.

## REFERÊNCIAS

BOWMAN, D. C.; CHERNEY, C. T.; RUFTY JUNIOR, T. W. Fate and transport of nitrogen applied to six warm-seasenturfgrasses. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 833-841, 2002.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila** (ClorofiLOG / CFL 1030). Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. (Rev. B., 33 p.). Disponível em : <<http://www.falker.com.br/produto-clorofilog-medidor-clorofila.php>> . Acesso em 24 jan. 2017.

HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME J. P. (Ed.). **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 Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 815-818, 2008.

JUNIOR, E. B.; ROSSIELLO, R. O. P.; SILVA, R. V. 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**, Santa Maria, v. 42, n. 12, p. 2242-2245, dez. 2012.

KAEFER, J. E.; GUIMARÃES, V. F.; RICHART, A.; TOMM, G. O. MÜLLER, A. L. Produtividade de grãos e componentes de produção da canola de acordo com fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 4, p. 273-280, abr. 2014.

KAEFER, J. E.; RICHART, A.; NOZAKI, M. de H.; DAGA, J.; CAMPAGNOLO, R.; FOLLMANN, P. E. Canola response to nitrogen sources and split application. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 11, p. 1042-1048, 2015.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J. C.; MITCHELL, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 46, n. 3, p. 467-472, 1995.

MINOLTA CAMERA COMPANY. **Radiometric instruments divisions: chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka, 1989.

NARITS, L. Effect of nitrogen rate and application time to yield and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. oleifera subvar. biennis). **Agronomy Research**, local de edição, v. 8, p. 671-686, 2010. Special Issue III.

NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; BRESSAM-SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005.

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**, Brasília, DF, v. 40, n. 5, p. 517-521, maio 2005.

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**, Campina Grande, 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. Non-destructive determination of photosynthetic pigment in the leaves of castor oil plants. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 3, p. 325-329, 2012b.

SANCHES, A. C.; GOMES, E. P.; RAMOS, W. B.; MAUAD, M.; SANTOS, S.; BISCARO, G. A. Produtividade da canola sob irrigação e doses de adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 7, p. 688-693, 2014.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de OLIVEIRA, J. B. de; COELHO, M. R.; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

SMEAL, D.; ZHANG, H. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1495-1503, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TOMM, G. O.; WIETHÖLTER, S.; DALMAGO, G. A.; SANTOS, H. P. dos. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 88 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 92).