

**INVESTIGAÇÕES INICIAIS DO "E-NOSE" NO ESTRESSE HÍDRICO DA SOJA,
RESULTADOS COMPARATIVO COM MEDIDAS DE CO₂ E UMIDADE RELATIVA (%).**

P. S. de P. Herrmann^{1,*}, A. T. Neto¹

¹ *Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, CEP 13560-741, São Carlos, SP*

^{*} *Autor correspondente, e-mail: paulo.herrmann@embrapa.br*

Resumo: Os novos métodos não invasivos de fenotipagem de plantas são considerados o avanço na área, bem como sua inserção no melhoramento de plantas. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos sensores e novas metodologias é de fundamental importância. Este trabalho apresenta estudos iniciais, com o nariz eletrônico ("E-Nose"), nesta nova área. A técnica busca emular a estrutura de um nariz humano. A intensidade da emissão pela soja quando submetida ao estresse hídrico, sob condições controladas de laboratório, foi avaliada. Um "E-nose" comercial foi utilizado para este experimento e foi construída uma câmara de gás dedicada, e instrumentada com sensores de umidade relativa (%), temperatura (° C), sensor de CO₂ (ppm) para obtenção de informações no período de estresse da soja. Um padrão de respiração foi observado, inicialmente caracterizado por uma baixa produção de CO₂ ou absorção de oxigênio, seguido de uma elevação repentina, apresentada por um maior nivelamento e, finalmente, um declínio. Comparação da resposta de todos esses sensores com o "E-nose" foi realizada. Resultados preliminares mostram a sensibilidade do conjunto de sensores para o volume a ser medido, bem como a potencialidade no uso da técnica com a câmara instrumentada. Investigações futuras usando soja serão realizadas em condições controladas pelo ambiente, principalmente e a mineração de dados.

Palavras-chave: "e-nose", soja, estresse hídrico, fenotipagem não-invasiva.

***INITIAL INVESTIGATION USING ELECTRONIC NOSE ON SOYBEAN WATER STRESS,
COMPARATIVE RESULTS WITH CO₂ AND RELATIVE HUMIDITY MEASUREMENTS.***

Abstract: New noninvasive methods of plant phenotyping are a breakthrough in the area, as well as their insertion in plant breeding. In this sense, the development of new sensors and new methodologies is considered of fundamental importance. This paper presents recent studies with the electronic nose in this new area. A technical aims to emulate the structure of a human nose. The intensity of emission by soybeans when subjected to water stress conditions under controlled laboratory was evaluated. A commercial "E-nose" was used for this experiment and a dedicated gas chamber was constructed, and instrumented with relative percentage (%), temperature (° C) and CO₂ sensor sensors for use in the stress period. A breathing pattern was observed, initially characterized by low CO₂ (ppm) production or oxygen uptake, followed by a sudden rise, shown by a higher levelling and finally a decline. Comparison of the response of all these sensors with the E-nose was performed. Preliminary results show the sensitivity of the sensor array to the volume to be measured, as well as the potentiality of using the technique with the instrumented chamber. Future investigations using soy will be carried out under conditions controlled by the environment, mainly by data mining.

Keywords: E-Nose, soybean, water stress, noninvasive phenotyping

1. Introdução

A vegetação terrestre contribui com 90% das emissões globais de compostos orgânicos voláteis (COVs) (KINDLER-SCHARR et al., 2009). Tem sido demonstrado que as plantas emitem compostos orgânicos voláteis (COVs) quando afetados por fatores bióticos e abióticos. (JANSEN et al., (2011) e FISHER et al., (2018)). A perspectiva promissora da utilização das medidas dos COVs

na fenotipagem de plantas, como uma medida rápida e não invasiva da dinâmica fenotípica, foi apresentada por Niederbacher e colaboradores em trabalho publicado em 2015. Para a detecção de compostos orgânicos voláteis (COVs) difundidos em meio gasoso em pequenas porções, na ordem de partes por milhão (ppm), se faz necessária a utilização de sensores altamente sensíveis. Desse modo, o controle de odor e análise de aromas pode ser realizado por esse arranjo de sensores de gás chamado de Nariz Eletrônico (“Electronic Nose”), o qual mede somente substâncias químicas voláteis os quais são componentes de odores (mistura de vapores com essas substâncias). O conceito de nariz eletrônico foi proposto inicialmente em 1982 na Universidade de Warwick por Persaud e Dodd (1982). A definição mais aceita foi dada por Gardner e Barlett (1994) que descreve o sistema como “um instrumento composto de um arranjo de sensores eletrônicos, que apresentam especificidade e um sistema padrão de reconhecimento capaz de reconhecer substâncias olfativas de estrutura simples a complexas” (SCHALLER et al, (1998)). A intensidade da emissão pela soja quando submetida sob condições controladas de laboratório ao estresse hídrico foi avaliada. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, assim sendo observa-se a importância do setor para agricultura nacional e desta forma investigar novas técnicas provenientes da fenotipagem de plantas para estudar fatores abióticos é de importância fundamental. Informações advindas das medidas com dióxido de carbono (CO₂), umidade relativa (%) e temperatura (°C), os quais possuem sensores internos na câmara, foram comparados com os resultados do E-Nose, durante o período de estresse hídrico da soja.

2. Materiais e Métodos

Experimentos com a soja foram realizados durante o período de 28 dias, sendo que o “days after sowing (DAS)” foi de 16 até 44. Foram coletadas informações diárias do E-Nose, de CO₂ (interno e externo à câmara), umidade relativa (%) e temperatura (°C). Abaixo a relação de materiais e dos métodos empregados nesse trabalho:

2.1. “Electronic Nose (E-Nose)” Alpha FOX 2000

O “Electronic Nose” Alpha Fox 2000 consiste basicamente dos seguintes componentes: - Unidade eletrônica (câmara com seis sensores semicondutores de óxido metálico (M.O.S)) que medem resistência elétrica (Ω); - Porta de injeção de amostra gasosa que se encontra na parte superior da Câmara do sistema; - Pacote avançado de software (α Soft 12.4) para aquisição e tratamento dos dados sensoriais; - Manômetro para controle do fluxo de gás do equipamento; - Fonte de energia.

2.1.1. Método de cálculo usado com os valores obtidos do E-Nose

A grandeza elétrica medida pelo E-Nose é valor da variação da resistência elétrica (Ω) no tempo, para cada sensor CMOS. Desta forma pode-se acompanhar o processo de adsorção e dessorção do gás que se está medindo. Obtêm-se primeiro os valores de resistência elétrica (Ω), posteriormente de posse desses valores calcula-se a sensibilidade ($\eta\%$) utilizando a equação (1):

$$\eta_{\%} = \left(\frac{R_i - R_0}{R_0} \right) * 100 [\%] \quad (1)$$

onde R_0 é o valor inicial da resistência elétrica (Ω), antes da inserção do gás e R_i é o valor da resistência elétrica (Ω) a qual varia no tempo, após a inserção do gás.

Com a curva de sensibilidade ($\eta\%$) obtida, calcula-se a área da mesma por intermédio do valor da sua integral.

2.2. Câmara de teste instrumentada

Neste presente trabalho, utilizou-se uma câmara cilíndrica especialmente projetada para a adequação de uma planta, no caso a soja (*Glycine max*) geneticamente modificada (GMO), em condições controladas. A câmara contém três sensores internos, os quais são: sensor de CO₂ (ppm)

(interno e externo), de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (%). A câmara possui as seguintes dimensões: Altura até a tampa com os sensores (h) = 57,0 cm; raio interno (R_{in}) = 12,5 cm e volume (V) = 28.980,00 cm^3 ou 28,98 litros. O experimento com a soja em crescimento foi realizado dentro da câmara, com a localização da mesma em condições ambiente.

2.3. Soja (*Glycine Max*)

Para a realização desse experimento utilizou-se duas sementes de soja (*Glycine max*) geneticamente modificada, A soja é uma planta herbácea incluída na classe Magnoliopsida (Dicotiledônea), ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine* L. É uma planta que possui grande variabilidade genética tanto no ciclo vegetativo (V_n) como no reprodutivo (R_n), sendo influenciada pelo meio ambiente (AGROLINK, 2016). As medidas foram realizadas acompanhando as fases vegetativas, por intermédio da observação dos estágios de evolução da planta, os quais são: VE = Emergência; VC=Cotiledonar; V1=Primeiro nó; V2=Segundo nó; V3 = Terceiro nó; V4=Quarto nó até V5=Quinto nó.

2.4. Tipo de solo

O solo utilizado para esse experimento foi um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico (LVAd) - granulometria: ARGILA: 369 g/kg; SILTE: 54 g/kg; AREIA: 577 g/kg - umidade na capacidade de campo (considerada na tensão de água de 10 KPa): 0,295 cm^3/cm^3 - umidade no ponto de murcha permanente (considerado na tensão de água de -1500 kPa): 0,134 cm^3/cm^3 . “O solo foi retirado da Embrapa Laboratório Nacional de Agricultura de Precisão (LANAPRE), com o local tendo as seguintes coordenadas geográficas 21°57'14” S e 47°51'08” W, 860 (m).

2.5. Procedimento experimental

2.5.1. Procedimento padrão de extração do gás da câmara de teste instrumentada

Utilizou-se uma seringa Hamilton de 2500 μl , inseriu-se a agulha da mesma na porta de injeção da câmara instrumentada, contendo a soja e retirou-se o volume 500 μl de amostra de gás para análises no “E-nose” entre 11:00 e 12:00.

3. Resultados e Discussão

Foram obtidos graficamente os dados extraídos diariamente durante 28 dias (DAS 16 a 44) para obter as relações entre as medidas realizadas com “E-Nose” e os sensores de medidas de CO_2 , de umidade relativa (%) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), que estão instalados internamente na câmara. As figuras 1 (A), (B) e (C) apresentam essas relações da área da curva de sensibilidade do “E-Nose” versus CO_2 (ppm) em 1(A), em 1(B) os valores da área da curva de sensibilidade do “E-Nose” versus umidade relativa (RH(%)) e em 1(C) os valores da área da curva de sensibilidade do “E-Nose” versus a temperatura ($^{\circ}\text{C}$). A figura 1(D) e 1(E) apresenta os valores de valores de umidade relativa (RH(%)), CO_2 (ppm) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no interior da câmara, as quais forma obtidas no tempo, tendo o seu início no DAS 16 até 44 (28 dias de medidas). Esse é o período em que o vaso contendo a soja, não foi mais abastecido com água destilada. O solo foi umedecido regularmente até o DAS 15.

As regressões lineares apresentadas nos gráficos são consideradas, para fins de análise dos dados na figura 1(A), (B) e (C), linhas de tendências. Mostrando certo grau de influência das medidas obtidas com CO_2 (1(A)), e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (1(C)) com relação aos dados de E-Nose. Em relação a RH (%) observa-se que não houve variação significativa com a RH (%) (1(B)). Uma das possíveis explicações é o fato de que ocorrendo o estresse hídrico moderado, tem-se que a mesma afeta fotossíntese foliar aumentando a eficiência na utilização de água no processo fotossintético, pois nessa fase é que ocorre o fechamento estomático (AGURLA et al., 2018). A diminuição da concentração de CO_2 nos espaços intercelulares está, normalmente, associada à ocorrência fotossíntese. A figura 1(C) mostra que há uma linha de tendência para um leve aumento da temperatura dos gases medidos com E-Nose, e esse comportamento demonstra que a transpiração da planta passa a ser limitada.

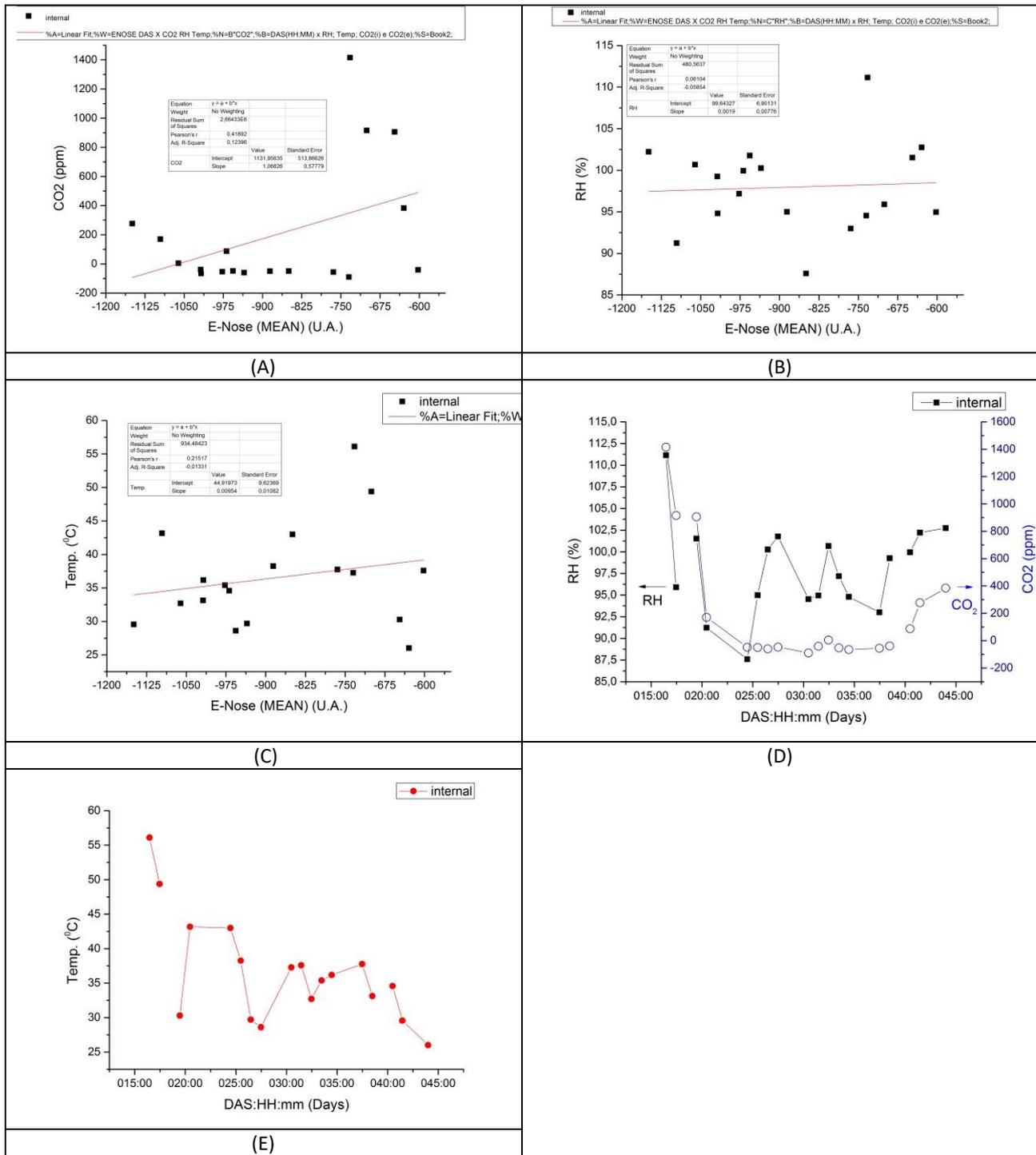


Figura 1. Gráficos mostrando as relações entre as medidas com E-Nose (área da curva de sensibilidade) versus CO₂ (ppm) em 1(A), versus umidade relativa (RH(%)) em 1(B) e versus a temperatura (°C). Os valores de umidade relativa (RH(%)), CO₂ (ppm) e temperatura (°C), obtidas no tempo, entre o DAS 16 a 44 (28 dias de medidas), podem ser vistos na figura 1(D) e 1(E) respectivamente

4. Conclusões

Resultados preliminares mostram a sensibilidade do conjunto de sensores para o volume a ser medido, bem como a potencialidade no uso da técnica com a câmera instrumentada para este fim. Observa-se que a umidade relativa (%), CO₂ (ppm) e Temperatura (°C) no interior da câmara são parâmetros importante nas medidas realizadas com o E-Nose e a consequente relação com o processo fotossintético da planta. Futuros trabalhos estão sendo realizados objetivando abaixar a

umidade interna da câmara, bem como o controle do CO₂ nas medidas com o E-Nose e a utilização de ferramentas de mineração de dados e inteligência artificial.

Agradecimentos

Agradecimento ao corpo técnico e a infraestrutura do laboratório de sensores, do Laboratório Nacional de Nanotecnologia para Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação. Ao Gabriel Belasalma aluno CNPq / PIBIC.

Referências

- AGROLINK. Características da soja (Glycine max). 2016. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/caracteristicas_361509.html. Acesso em: 11 dez. 2017
- AGURLA, S.; GAHIR, S.; MUNEMASA, S.; MURATA, Y.; RAGHAVENDRA, A.S.. Mechanism of Stomatal Closure in Plants Exposed to Drought and Cold Stress, In: Iwaya-Inoue M., Sakurai M., Uemura M. (eds) Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, Singapore, vol. 1081, p. 215-232, 2018.
- FISHER; M. C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J.. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security, Science, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018
- GARDNER, J.W.; BARTLETT, P. N.. A brief history of electronic noses, Sensors and Actuators B: Chemical, v. 18, Issu. 1-3, p. 210-211, March 1994,
- JANSEN, R.M.C.; WILDT, J., KAPPERS, I.F.; BOUWMEESTER, H.J.; HOFSTEE, J.W.; van HENTEN, E.J.. Detection of Diseased Plants by Analysis of Volatile Organic Compound Emission, Annual review of phytopathology, v. 49, n. 1, p. 157-174, 2011.
- KIENDLER-SCHARR, A.; WILDT, J.; DAL MASO, M.; HOHAUS, T.; KLEIST, E.; MENTEL, T. F.; TILLMANN, R.; UERLINGS, R.; SCHURR, U.; WAHNER, A.. New particle formation in forests inhibited by isoprene emissions, Nature, v. 461, n. 17, p. 381 – 384, 2009.
- NIEDERBACHER, B.; WINKLER, J.B.; SCHNITZLER, J.P.. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping, Journal of Experimental Botany, v. 66, n.18, p. 5403–5416, 2015.
- PERSAUD, K.C.; DODD, G.. Analysis of Discrimination Mechanisms in the Mammalian Olfactory System Using a Model Nose. Nature, v. 299, p. 352-355, 1982.
- SCHALLER, E.; BOSSET, J. O.; ESCHER, F.. ‘Electronic Noses’ and Their Application to Food, LWT - Food Science and Technology. vol. 31, n. 4, p. 305-316, 1998.