

Medidor portátil de clorofila: Determinação dos teores de clorofila e nitrogênio em andiroba e cumarú

Portable meter of chlorophyll: Determination of the contents of chlorophyll and nitrogen in andiroba and cumaru

Cristina A. Felseburgh^{1*}, Edgard S. Tribuzy².

RESUMO - Os métodos utilizados para extrair os pigmentos fotossintéticos como a clorofila do material de plantas são baseados na utilização de solventes orgânicos e ainda são destrutivos. O uso do medidor indireto portátil de clorofila SPAD-502 tem sido utilizado para quantificar de forma não destrutiva e rápida os teores de clorofila e nitrogênio foliar. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização do SPAD-502 para a predição dos teores de clorofila total e nitrogênio foliar em *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. O experimento foi realizado no viveiro da Universidade Federal do Oeste do Pará, foram utilizadas 10 plantas de cada espécie. As leituras com o clorofilômetro foram realizadas em seis pontos da folha, evitando medidas sobre a nervura central. Após as leituras, as folhas foram destacadas e levadas ao laboratório para a determinação do teor de clorofila e nitrogênio. Para as duas espécies estudadas, a análise de regressão foi significativa entre os teores de clorofila total e nitrogênio foliar com os valores do índice SPAD ($p \leq 0,01$). O estudo demonstrou que o SPAD-502 pode ser aplicado com precisão para estimar os teores de clorofila total e nitrogênio foliar nas espécies estudadas.

Palavras chave: clorofilômetro portátil, *Carapa guianensis*, *Dipteryx odorata*.

ABSTRACT - The methods used to extract the photosynthetic pigments as the chlorophyll from the plant material are based on the utilization of the organic solvents and are still destructive. The portable indirect meter of chlorophyll SPAD 502 has been used to quantify the levels of chlorophyll and foliar nitrogen in a non-destructive and fast way. This study aimed at evaluating the viability of the utilization of the SPAD-502 for the prediction of the levels of total chlorophyll and foliar nitrogen in *Carapa guianensis* Aubl and *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. The experiment was readings with the chlorophyll meter were taken on six points of the leaf, avoiding the readings on the midrib. The leaves were detached and taken to the lab for the determination of the content of chlorophyll and nitrogen after the readings. The regression analysis was significant between the levels of total chlorophyll and foliar nitrogen with the levels of the index SPAD ($p \leq 0.01$) for the two species that were studied. The study demonstrated that the SPAD 502 can be applied with precision to estimate the levels of total chlorophyll and foliar nitrogen in the studied species.

Key-words: portable chlorophyll meter, *Carapa guianensis*, *Dipteryx odorata*

INTRODUÇÃO

Os pigmentos fotossintéticos como a clorofila, carotenoides e xantofilas são essenciais para o desenvolvimento das plantas. As clorofilas são pigmentos responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química e por essa razão, são estreitamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente com seu crescimento (JESUS & MARENCO, 2008).

As técnicas utilizadas para extrair os pigmentos fotossintéticos do material de plantas são baseadas em métodos que utilizam solventes orgânicos como acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, (ARNON, 1949; LICHTENTHALER, 1987) entre outros, com a desestruturação do tecido. Utilizando-se dessa forma, métodos laboratoriais, os quais são demorados, dispendiosos, requerem a destruição da amostra e são pouco práticos na avaliação de plantas no campo.

No entanto, com o surgimento do instrumento SPAD-502 (SPAD-502, Minolta Corp., Ramsey, Japão “SPAD – soil plant analysis development”), um medidor portátil de clorofila, que fornece leituras que se relaciona com o teor de clorofila (NEVES et al., 2005; SALLA et al., 2007; JESUS & MARENCO, 2008; COSTE et al., 2010; FONSECA et al., 2012; RIGON et al., 2012) presente na folha, tornou-se possível a medição com um método não destrutivo, rápido, menos oneroso e prático.

O SPAD-502 fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pelo aparelho com base na quantidade de luz transmitida pela folha, em dois comprimentos de ondas, com diferentes absorvâncias da clorofila. O medidor de clorofila possui dois diodos que emitem luz 650 nm (vermelho) e a 940 nm (infravermelho). A luz em 650 nm situa-se próxima dos dois comprimentos primários de ondas associados à absorvância da clorofila (645 e 663 nm). O comprimento de onda de 940 nm serve como referência para compensar diferenças na espessura ou no

*autor para correspondência

Recebido para publicação em 11/05/2012; aprovado em 24/10/2012

¹ Eng. Florestal, Prof. Adjunto da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Av. Vera Paz, s/n, bairro Salé, 68035-110 Santarém-PA. Fone: (93)2101-4947. E-mail: crisalefel@gmail.com.*

² Eng. Agrônomo, Prof. Adjunto da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Av. Vera Paz, s/n, bairro Salé, 68035-110 Santarém-PA. Fone: (93)2101-4947. E-mail: estribuzy@gmail.com.

conteúdo de água da folha ou que sejam devidas a outros fatores. A luz que passa através da amostra da folha atinge um receptor (fotodiodo de silicone) que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. Por meio do conversor A/D, esses sinais analógicos são amplificados e convertidos em sinais digitais, sendo usados por um microprocessador para calcular os valores SPAD (MINOLTA, 1989).

Alguns estudos mostram ainda, a relação entre as leituras do SPAD-502 com o teor de nitrogênio (N) foliar de plantas (BALASUBRAMANIAN et al., 2000) isto, devido a este elemento ser um componente da estrutura química do anel de porfirina da molécula de clorofila (NETTO et al., 2002).

Devido o N ser um dos principais constituintes da molécula de clorofila (PAN et al., 2004) e ainda que, cerca de 70% do N contido nas folhas estão associados aos cloroplastos participando do metabolismo, da síntese e da estrutura destes pigmentos fotossintéticos (CHAPMAN & BARRETO, 1997), o SPAD-502 passou a destacar-se, dentre suas utilidades, como quantificador indireto dos teores de nitrogênio foliar. Dessa forma, o status do nitrogênio foliar reflete a cor da folha como o esverdeamento da folha, e essa propriedade espectral serve como base para o desenvolvimento de sensores óticos como o SPAD-502 (MINOLTA, 1989; DJUMAEVA et al., 2012).

A aplicação do clorofilômetro tem sido estudada para diversas culturas anuais como tomate (GUIMARÃES et al., 1999), milho (ZOTARELLI et al., 2003); algodoeiro (NEVES et al., 2005); abobrinha (PÔRTO et al., 2011), beterraba (TSIALTAS & MASLARIS, 2012), com resultados satisfatórios quanto à avaliação do estado nutricional de N (ZOTARELLI et al., 2003), utilizado também em espécies perenes como *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh (MOREAU et al., 2004) e *Quercus robur* L. (PERCIVAL et al., 2008). Além de outros estudos realizados correlacionando os índices SPAD-502 com elementos como enxofre (S), ferro (Fe) e manganês (Mn) (NEVES et al., 2005) e com características foliares como área foliar específica, espessura da folha e conteúdo de água (MARENCO et al., 2009).

Dessa forma, objetivou-se avaliar a relação entre os valores obtidos pelo clorofilômetro SPAD-502 e os teores absolutos de clorofila e nitrogênio em folhas de andiroba e cumarú.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no viveiro de mudas da Universidade Federal do Oeste do Pará, em Santarém, PA. Geograficamente está localizada a uma latitude de 02°25'04S, longitude 54°44'W de GRT e altitude de 51 m acima do nível do mar; o tipo climático é o Ami da classificação de Köppen (clima tropical chuvoso), a região apresenta uma estação seca, caracterizada por uma precipitação média em torno de 54,8 mm mês⁻¹ se estendendo geralmente pelos meses de agosto a novembro

e uma estação chuvosa caracterizada por meses com precipitações superiores a este valor, apresentando médias mensais em torno de 211,3 mm mês⁻¹ (INMET, 2011). A temperatura média anual é de 25 °C e a umidade relativa média do ar é de 85% (INMET, 2011). Os dados foram coletados entres os meses de abril e maio de 2011.

As espécies selecionadas para o estudo pelo seu potencial comercial madeireiro e medicinal foram andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) e cumarú (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., Fabaceae). Utilizaram-se neste estudo 10 plantas jovens de cada espécie. O teor relativo de clorofila foi obtido utilizando o clorofilômetro portátil SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, Japão) e os teores absolutos de clorofila e o teor de nitrogênio total foram determinados em laboratório.

Para cada espécie foram selecionadas folhas em diferentes estádios de desenvolvimento desde novas até maduras e totalmente expandidas, para obtenção de diferentes graus de esverdeamento, e consequentemente um gradiente nos teores de clorofila (JESUS & MARENCO, 2008).

As leituras com o clorofilômetro foram realizadas em seis pontos da folha para obtenção de uma média, evitando medidas sobre a nervura central. Para cada planta foram examinadas três folhas, com um total de 30 folhas por espécie e o clorofilômetro foi calibrado para cada espécie antes de sua utilização.

Após as leituras, as folhas foram destacadas e levadas ao laboratório. As amostras do material vegetal para as análises laboratoriais foram retiradas dos pontos onde haviam sido realizadas as leituras com o clorofilômetro.

Foram utilizadas 0,5 g de material vegetal para determinação do teor de clorofila sendo realizada pelo método de Lichtenthaler (LICHTENTHALER, 1987) e para o teor de nitrogênio foliar foram utilizadas 0,1 g. A determinação foi feita em um analisador elementar (Carlo Erba modelo 1110, Milão Itália), no qual gás proveniente da combustão foi purificado numa coluna de cromatografia gasosa e introduzido diretamente num espectrômetro – ThermoQuest-Finningar Delta Plus (Finningar-MAT, California, EUA) com a determinação da concentração do nitrogênio foliar gerada. As amostras foram analisadas no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP).

Os teores de clorofila e nitrogênio foliar foram expressos em unidade de massa. Foram realizadas análises de regressão entre os resultados dos teores absolutos de clorofila total, teores de N, e os resultados das leituras obtidas pelo clorofilômetro, tendo-se os teores de clorofila e nitrogênio total como variável dependente, e os valores do índice SPAD como variável independente. Para as análises dos dados foram utilizados os programas Bioestat e Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as duas espécies estudadas, a análise foi significativa entre os teores de clorofila total e os valores do índice SPAD ($p \leq 0,01$). O teor de clorofila total oscilou entre 185 e 793 $\mu\text{g g}^{-1}$ para andiroba e 150 e 701 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o cumarú (Figura 1A; Figura 1B). Estudos mostram

que em uma mesma espécie os teores de clorofila total variavam de 170 a 700 mg m^{-2} (BJORKMAN & DEMMING, 1987). Trabalhando com araçá-boi foram encontrados valores entre 50 e 750 mg m^{-2} (JESUS & MARENCO, 2008).

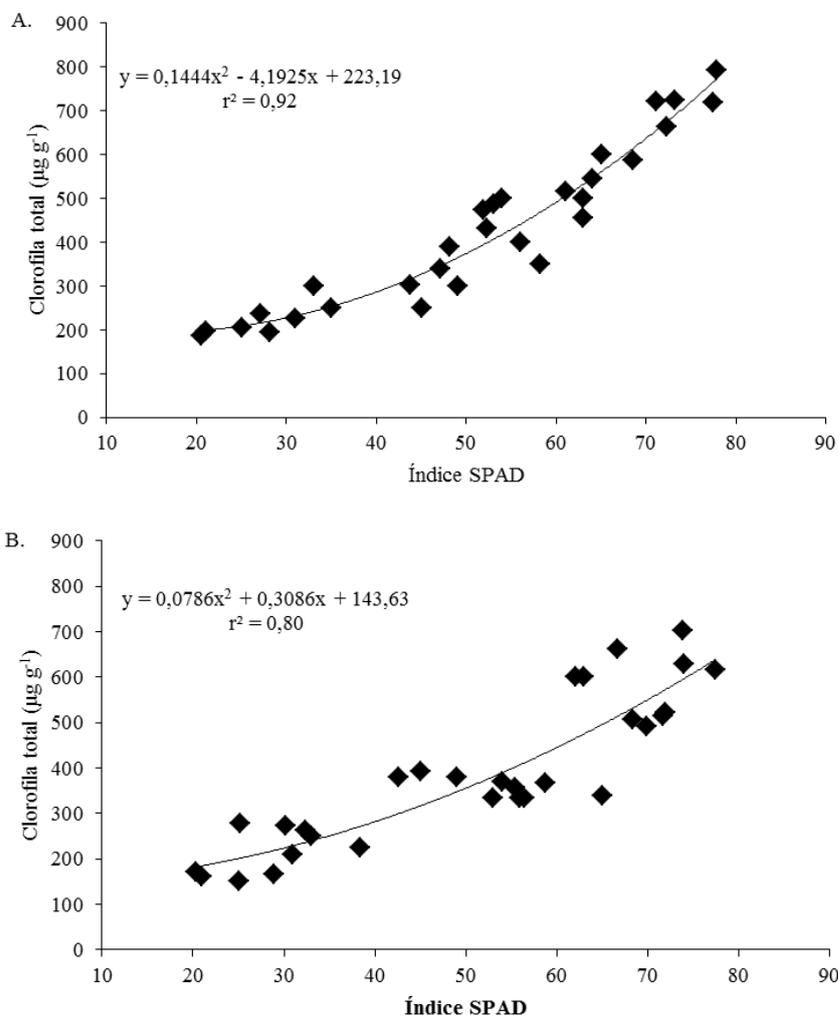


Figura 1. Teor de clorofila total em função do índice SPAD em andiroba (A) e cumarú (B)

A relação entre os teores de clorofila total e os índices SPAD mostrou coeficientes de determinação (r^2) entre 0,80 e 0,92. Os resultados estão de acordo com o encontrado por Jesus & Marengo (2008) que obtiveram coeficiente de determinação entre 0,67 e 0,92 para clorofila total. Trabalhando com plantas jovens tropicais de acariquara, mogno, pau-rosa e mangueira os coeficientes (r^2) encontrados estavam entre 0,18 e 0,93, os autores sugerem que os baixos valores de r^2 , indicam que as características da espécie podem influenciar a precisão do método (SALLA et al., 2007).

Em estudo com *Elaeagnus angustifolia*, *Gleditsia triacanthos* e *Robinia pseudoacacia* espécies da Ásia Central, vários tipos de regressão foram testados e comparados, em busca do melhor modelo para a relação

entre leituras SPAD e teor de clorofila, e os melhores modelos preditivos para cada espécie foram obtidos com os modelos de segundo grau com r^2 entre 0,64 e 0,83, entretanto, os autores ressaltam que as equações de calibração são válidas para as faixas de valores das leituras SPAD encontradas para cada espécie (DJUMAIEVA et al., 2012).

Diferenças observadas entre espécies podem ser relacionadas com a distribuição da clorofila em folhas como um resultado da organização estrutural de moléculas de clorofila em cloroplastos, cloroplastos nas células e células nas folhas. É geralmente aceito que, com o aumento da heterogeneidade da distribuição de clorofila dentro da folha, a absorção de uma determinada quantidade de clorofila diminui (COSTE et al., 2010).

Além disso, estresses abiótico ou biótico podem causar a descoloração da folha e impactar os valores SPAD e as estimativas de clorofila. Conseqüentemente, as relações funcionais devem ser desenvolvidas a cada estágio de desenvolvimento da planta para aumentar a precisão do método (DJUMAEVA et al., 2012).

As leituras efetuadas com o clorofilômetro estimam, adequadamente, o grau de esverdeamento das folhas de *Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch, e as leituras efetuadas pelo equipamento podem substituir, com boa precisão, as determinações tradicionais do teor de clorofila (NEVES et al., 2005).

Verificou-se que para as duas espécies estudadas, a análise foi significativa entre os teores de nitrogênio total e os valores do índice SPAD ($p \leq 0,01$). O teor de nitrogênio total oscilou entre 6,11 e 25,42 g Kg⁻¹ (Figura 2A; Figura 2B). Trabalhando com *E. angustifolia*, G.

triacanthos e *R. pseudoacacia* foram encontrados valores entre 30 e 40, 14 e 23 e 34 e 41,1 mg g⁻¹ de N foliar, respectivamente em diferentes anos avaliados. Uma vez que o N é um componente essencial da clorofila e por haver uma relação altamente positiva entre essas duas características, o SPAD tem sido usado com sucesso para determinar o N foliar. No entanto, o tipo de relação entre o SPAD e valores do teor de N, assim como o ajuste entre esses parâmetros podem diferir de acordo com a espécie, cultivar e estágio de crescimento da cultura (DJUMAEVA et al., 2012).

Para Fontes & Araújo (2007), o SPAD-502 é uma alternativa para avaliar o estado de N da planta em tempo real, pelo fato de haver correlação significativa entre a intensidade do verde e o teor de clorofila com a concentração de N da folha.

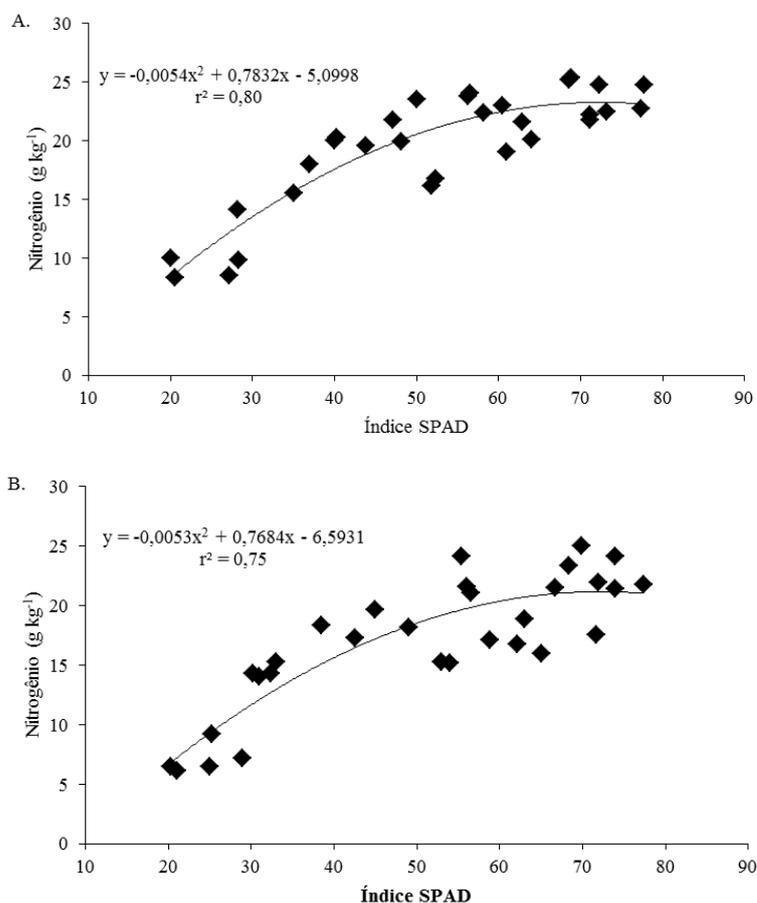


Figura 2. Teor de nitrogênio em função do índice SPAD em andiroba (A) e cumarú (B)

A relação entre os teores de nitrogênio total e os índices SPAD mostrou coeficientes de determinação (r^2) entre 0,75 e 0,80. Observa-se que teor de nitrogênio foliar diminui quando os valores obtidos pelo índice SPAD foram inferiores a 50 (Figura 2A; Figura 2B). Em estudo com *C. papaya*, o conteúdo de nitrogênio foi correlacionado com as leituras do clorofilômetro ($r^2=0,97$)

e o conteúdo de nitrogênio diminui acentuadamente quando os valores obtidos pela leitura SPAD foram inferiores a 40. Valores SPAD superiores a 40 estão associados com elevado conteúdo de pigmentos fotossintéticos e nitrogênio nas folhas (NETTO et al., 2002).

O teor relativo de clorofila, estimado com o clorofilômetro SPAD-502, relaciona-se com o teor de nitrogênio foliar na planta, podendo ser utilizado como ferramenta auxiliar para quantificar de forma indireta o teor de nitrogênio da folha (FONTES & ARAÚJO, 2007; NEVES et al., 2005; NETTO et al., 2002).

Dessa forma, o medidor SPAD-502 fornece um método simples e não destrutivo para estimar o teor de clorofila e nitrogênio, com a rapidez de um grande número de leituras, abrindo caminho para avaliações fisiológicas imediatas.

CONCLUSÃO

1- O medidor portátil de clorofila SPAD-502 pode ser aplicado para estimar o teor de clorofila total em plantas de andiroba e cumarú.

2- O teor de nitrogênio pode ser estimado com a utilização do clorofilômetro SPAD-502 para andiroba e cumarú.

AGRADECIMENTOS.

A Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e ao Laboratório de Ecologia Isotópica, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo CENA/USP.

REFERÊNCIAS

Arnon, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, v.24, p.1-15, 1949.

Balasubramanian, V.; Morales, A. C.; Cruz, R. T.; Thiagarajan, T. M.; Nagarajan, R.; Babu, M.; Abdulrachman, S.; HAI, L. H. Adaptation of the chlorophyll meter (SPAD) technology for real-time N management in rice: a review. *Int. Rice Res. Inst.*, n.5, p.25-26, 2000.

Björkman, O.; Demming, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, n.170, p.489-504, 1987.

Chapman, S. C.; Barreto, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. *Agronomy Journal*, v.89, p.557-562, 1997.

Coste, S.; Baraloto, C.; Leroy, C.; Marcon, E.; Renaud, A.; Ricahrdson, A. D.; Roggy, J. C.; Schimann, H.; Uddling, J.; H'erault, B. Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical

rainforest in French Guiana. *Ann. For. Sci.*, n.67, v.607, p.1-5, 2010.

Djumaeva, D.; Lamers, J. P. A.; Martius, C.; Vlek, P.L.G. Chlorophyll meters for monitoring foliar nitrogen in three tree species from arid Central Asia. *Journal of Arid Environments*, n.85, p.41-45, 2012.

Fonseca, P. R. B.; Fernades, M. G.; Dutra, F.; Souza, T. A.; Pontim, B. C. A. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, em híbridos de milho, (*Zea mays* L.) BT e isogênico. *Rev. Verde*, v.7, n.1, p.56-60, 2012.

Fontes, P. C. R.; Araújo, C. Adubação nitrogenada de hortaliças: princípios e práticas com o tomateiro. 1.ed. Viçosa: UFV, 2007, 148p.

Guimarães, T. G.; Fontes, P. C. R.; Pereira, P. R. G.; Alvarez, V.; Monnerat, P. H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. *Bragantia*, Piracicaba, v.58, n.1, p.209-216, 1999.

INMET. Normas Climatológicas. Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php>. Acesso em 15 de maio de 2011.

Jesus, S. V.; Marengo, R. A. O SPAD-502 como alternativa para determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta Amazonica*, v.38, n.4, p.815-818, 2008.

MINOLTA, C. Manual for chlorophyll meter SPAD-502. Osaka: Minolta Radiometric Instruments Divisions, 1989, 22p.

Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, San Diego, v.148, p. 362-385, 1987.

Marengo, R. A.; Vera, A. S. A.; Nascimento, H.C.S. Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica*, v.47, n.2, p.184-190, 2009.

Moreau, B.; Gardiner, E. S.; Stanturf, J. A.; Fisher, R. K. Estimating Leaf Nitrogen of Eastern Cottonwood Trees with a Chlorophyll Meter. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station, Asheville, NC: US, 2004, p. 594.

Netto, A. T.; Campostrini, E.; Oliveira, J. G.; Yamanishi, O. K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for

assessment of the photochemical process in *Carica papaya*
L. Braz. J. Plant. Physiology, v.14, n.3, p.203-210, 2002.

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. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, n.5, p.517-521, 2005.

Pan, Y.; Hom, J.; Jenkins, J.; Birdsey, R. Importance of foliar nitrogen concentration to predict foresty productivity in the mid-atlantic region. Forest Science, v.50, n.3, p.279-289, 2004.

Percival, G. C.; Keary, I.P.; Noviss, K. The potential of a chlorophyll content SPAD meter to quantify nutrient stress in foliar tissue of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*), English Oak (*Quercus robur*), and European Beech (*Fagus sylvatica*). Arboriculture and Urban Forestry, n.34, p.89-100, 2008.

Pôrto, M. L.; Puiatti, M.; Fontes, P. C. R.; Cecon, P. R.; Alves, J. C.; Arruda, J. A. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura da abobrinha. Horticultura Brasileira, n.29, p.311-315, 2011.

Rigon, J. P. G.; Beltrão, N. E. M.; Capuani, S.; Neto, J. F. B.; Silva, V. V. S. Análise não destrutiva de pigmentos fotossintéticos em folhas de gergelim. Rev. bras. Eng. Agríc. Ambient., v.16, n.3, p. 258-261, 2012.

Salla, L.; Rodrigues, J. C.; Marengo, R. A. Teores de clorofila em árvores tropicais determinados com o SPAD-502. Rev. Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.159-161, 2007.

Tsialtas, J. T.; Maslaris, N. Tracing nitrogen in soil-root-petiole-leaf continuum in sugar beets: can spad-502 help? Journal of Plant nutrition, v.35, n.4, 2012.

Zotarelli, L.; Cardoso, E. G.; Piccinin, J. L.; Urquiaga, S.; Boddey, R. M.; Torres, E.; Alves, B. J. R. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.9, n.2, p.1117-1122, 2003.