

Fisiologia Vegetal - Protocolo da aula prática de nutrição

Fisiologia vegetal

2023-2024

Nutrição - Aula Prática

Todos nós temos a noção que cada um é aquilo que come. Nos dias de hoje, mais do que em qualquer outra época, a população (principalmente a dos países desenvolvidos) se preocupa com o corpo, a forma, a longevidade e tem a noção de que esses parâmetros estão muito associados à dieta. A população mais abastada e mais esclarecida tende a optar pela aquisição de produtos de agricultura biológica em detrimento dos de agricultura convencional, na convicção de que os produtos resultantes da agricultura biológica sejam mais saudáveis do que os resultantes das práticas convencionais (agricultura intensiva).

Por outro lado, o aumento crescente da população das cidades e a necessidade de promover a proximidade entre os locais de consumo e os locais de produção exige o desenvolvimento de técnicas de cultura mais sofisticadas e controladas.

No entanto a diferença da qualidade nutritiva dos produtos agrícolas de acordo com o modo de produção é ainda um assunto em discussão. O que não é muito óbvio para os cidadãos é que entre o modo de cultura e a qualidade nutritiva dos alimentos há modeladores muito importantes - a **FISIOLOGIA** da planta e qualidade do solo.

O objetivo desta aula prática é chamar a atenção para a importância das respostas fisiológicas na qualidade alimentar das plantas. Para tal vamos tomar como exemplo dois produtos (espinafres, acelgas, rúcula, alface ou outros) disponíveis no mercado e provenientes de modos de cultivo distintos (convencional e biológico) e iremos determinar vários parâmetros fisiológicos potencialmente associados à qualidade nutricional do alimento (cor da folha e sua relação com a concentração de azoto e proteína), concentração de nitratos e sua relação com a segurança alimentar, quantidade de açúcares solúveis e pH do extrato foliar e sua relação com o sabor do alimento. Num segundo momento da aula iremos também indagar sobre a qualidade do solo associado ao modo de produção convencional e biológico utilizando a cromatografia circular.

A discussão dos resultados será focada no facto de em sociedades e economias baseadas no conhecimento as decisões do consumidor serem baseadas em critérios objetivos e no conhecimento. Numa primeira fase da aula o aluno vai ser confrontado com a tomada de decisão sobre quais as qualidades a privilegiar na aquisição de vegetais. Numa segunda fase será feita a relação entre a qualidade do alimento e a qualidade do solo.

Esquema da aula

Cada grupo vai trabalhar com dois tipos de material vegetal (um cultivado de forma convencional, e outro de forma biológica) e dois tipos de solo (um proveniente da agricultura convencional e outro da agricultura biológica).

- 1 – Esclarecimento de dúvidas sobre os protocolos; ±15 min
- 2 - Distribuição do material por grupo; ± 5 min
- 3 - Preparação dos extratos e do cromatograma do solo; ± 30 min
- 4 - Determinação do SPAD das folhas; ±15 min
- 5 - Preparação dos extratos e pH, NO₃ e Brix; ± 60 min
- 5 – Finalização dos cromatogramas do solo; ± 15 min
- 6 - Discussão dos resultados; ± 15 min
- 7 - Arrumação da sala; ± 10 min

Nota: nesta aula os alunos têm a possibilidade de trazer material cultivado de forma biológica e de forma convencional para determinação de pH, NO₃⁻ e Brix.

Determinação de índices fisiológicos da planta

SPAD

O medidor de clorofila (ou SPAD) é um equipamento portátil usado para medir a cor verde com base nas respostas óticas quando a folha é exposta à luz que, por sua vez é utilizada para estimar a concentração foliar de clorofila (Kariya et al. 1982). O medidor permite leituras instantâneas e não destrutivas de uma planta com base na quantificação da intensidade luminosa (comprimento de onda de pico: cerca de 650 nm: díodo emissor de luz vermelho [LED]) absorvida pela amostra de tecido. Um segundo pico (pico de comprimento de onda: 940 nm, aproximadamente: LED de infravermelhos), é emitido simultaneamente com LED vermelho para compensar a espessura da folha (Hoel 1998). Pesquisas anteriores mostraram uma relação estreita entre a concentração de clorofila e de azoto na folha das plantas, porque uma grande parte do N foliar está contida na clorofila (Peterson et al., 1993). Consequentemente, o conteúdo de clorofila é amplamente utilizado para detetar deficiências de N e, posteriormente, melhorar a gestão do N no sector agrícola (Peterson et al 1993; Smeal e Zhang, 1994; Balasubramanian et al 2000).

Concentração foliar de nitrato

A concentração foliar de nitrato resulta do balanço entre a aquisição de nitrato pelas plantas e respectiva transferência para as folhas e a sua utilização no metabolismo através da sua redução a amónio, reação catalisada pela nitrato reductase. O conteúdo de nitrato nos vegetais pode ser letal para os animais herbívoros e hominívoros. No caso da alimentação humana o conteúdo de nitrato presente nas folhas (como alface e espinafre) encontra-se regulado por lei (European Commission Regulation (EC) No. 194197) não podendo os produtos ser comercializados se as concentrações de nitrato excederem os valores determinados. No entanto é também fundamental que a alimentação humana contenha um valor mínimo de nitratos, como é o caso da dieta mediterrânica. O nitrato foliar vai ser determinado no extracto foliar através da utilização de um eléctrodo seletivo.

pH

O pH é uma característica determinante do metabolismo, da partição de nutrientes entre os vários compartimentos e da própria aquisição de nutrientes. Por outro lado, o pH do vacúolo (o que se determina quando se faz um extrato aquoso) representa as soluções utilizadas pela planta para procurar manter estável o pH do citoplasma. Na aula prática vamos determinar o pH da superfície da folha (com o eléctrodo de contacto) e o pH do extrato foliar feito com base numa diluição de 1 g de material vegetal para 10 mL de água.

Brix

O Brix é um parâmetro relacionado com o teor de açúcares de uma solução aquosa. Uma solução com 1 grau Brix contém 1 g de sacarose em 100 g de solução, e representa a concentração da solução em percentagem com base no peso. Se a solução contiver sólidos dissolvidos, para além da sacarose, o Brix transforma-se numa aproximação ao teor de sólidos dissolvidos. O Bx ° é tradicionalmente utilizado nas indústrias de vinho, açúcar, sumos de frutas e mel. O Brix vai ser determinado com um refratómetro.

Cromatografia circular de Pfeiffer para análise de solos

Introdução

O método da cromatografia circular foi desenvolvido pelo bioquímico suíço Ehrenfried Pfeiffer na primeira metade do século XX (agora conhecida como “Pfeiffer’s Circular Chromatography” [PCC]) para analisar a qualidade de solos, produtos de compostagem e culturas agrícolas (Pfeiffer 1984). Este método tem como objetivo analisar a qualidade da amostra através da formação de padrões cromatográficos e da sua subsequente avaliação, através de um procedimento relativamente simples e rápido.

Nesta técnica, as substâncias a separar migram radialmente a partir do centro de papel de filtro redondo, criando padrões radiais e concêntricos, porque este é um método físico de separação dos diferentes componentes que constituem as substâncias complexas. Quando há formação de imagens e/ou padrões que apresentem grande complexidade e regularidade são considerados indicadores de alta qualidade, enquanto padrões com baixa complexidade e irregulares são geralmente observados em amostras com fraca qualidade (Kokornaczyk *et al.*, 2017). Como tal, esta técnica providencia um diagnóstico completo da saúde do solo através da interação das substâncias presentes na amostra (Graciano *et al.*, 2020).

Usando os cromatogramas obtidos, a qualidade química do solo pode ser avaliada, comparando os padrões obtidos com os registados numa base de dados, em que se estabelece a correlação entre os diferentes padrões com resultados de análises químicas feitas aos diferentes solos (Perumal *et al.*, 2016), como tal, pode ser demonstrado que diferentes parâmetros dos padrões obtidos, como por exemplo largura e cor das diferentes zonas do cromatograma, contraste entre zonas adjacentes e intensidade da cor da margem exterior, diferem entre amostras e se correlacionam com alguns dos compostos químicos da amostra (Kokornaczyk *et al.*, 2017).

Este método também permite uma monitorização frequente da resposta do solo às práticas de gestão implementadas em diferentes sistemas agrícolas, por ser um método de diagnóstico simples, rápido e relativamente barato, podendo ser realizado pelo próprio agricultor, apesar de não substituir os outros métodos químicos de análise do solo (Pfeiffer, 1984; Graciano *et al.*, 2020).

Interpretação do Cromatograma de Papel

Para a interpretação dos cromatogramas, três zonas gerais devem ser identificadas: centro (CZ), normalmente com cor clara ou mesmo branco; zona média (MZ), a área em que as espigas escuras aparecem; e zona exterior (OZ), que se estende para além das espigas e tem cor variável, desde o amarelo até castanho-escuro difuso; o diâmetro das zonas central e exterior deverá refletir a quantidade de matéria orgânica presente na amostra (Brinton, 2010; Kokornaczyk *et al.*, 2017).

Seguindo a metodologia de Kokornaczyk *et al.*, 2017 para avaliar os padrões obtidos e estabelecer um sistema para uniformizar a interpretação dos cromatogramas, os seguintes passos devem ser seguidos: com o auxílio de uma régua devem-se medir em cada zona previamente identificada - o raio total, o raio da zona central e a largura das zonas média e exterior; deve-se considerar como fronteira entre as zonas média e exterior a base das espigas. Para além disso, a avaliação visual dos cromatogramas deve ser feita atribuindo uma pontuação de 1 a 5, de acordo com o grau de desenvolvimento e quantidade de cada padrão (*canais, espigas, intensidade de cor, e anéis concêntricos*; Figura 1). Por exemplo: para os canais e espigas deve-se atribuir 1 ponto quando estes estão ausentes e 5 pontos quando estão totalmente desenvolvidos; para a intensidade da cor deve-se atribuir 1 ponto quando a cor parecer desbotada e 5 pontos quando for intensa. Deve-se atribuir 1 ponto por cada anel concêntrico visível no cromatograma.

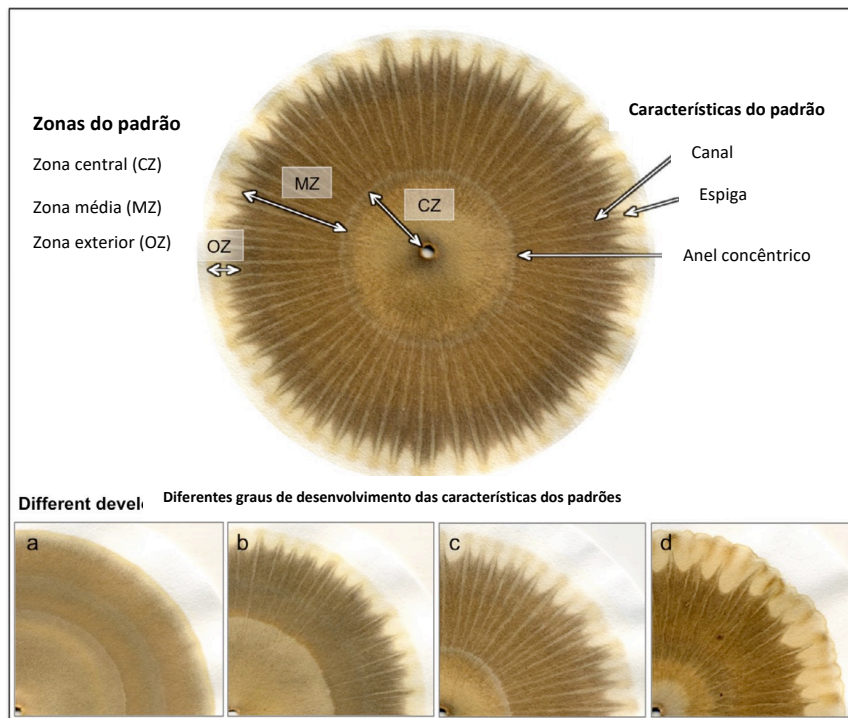


Figure 1. Exemplo de uma Cromatografia Circular, com indicação das várias zonas e padrões formados (no topo) e secções dos padrões (em baixo) ilustrando, de (a) a (d), um aumento no desenvolvimento de padrões radiais (isto é: canais e espigas), e intensidade da cor, e uma diminuição dos padrões concêntricos (isto é: anéis concêntricos). From: Kokornaczyk *et al.*, 2017

Kokornaczyk *et al.* (2017) analisou 16 amostras de solo através da cromatografia circular e de análises à composição química dos solos, e, apesar de ter uma quantidade limitada de amostras, reportou a existência de uma forte correlação entre os padrões obtidos nos cromatogramas e o conteúdo de matéria orgânica, azoto total, fosforo assimilável e níveis de brometo. De um modo geral, estes autores concluíram que cromatogramas com padrões radiais bem desenvolvidos (como canais e espigas) eram indicativos de solo com boa qualidade, enquanto os padrões concêntricos (como o número de anéis concêntricos) eram indicativos de solos com fraca qualidade. No entanto, apesar de ser um método muito fácil de usar, e os

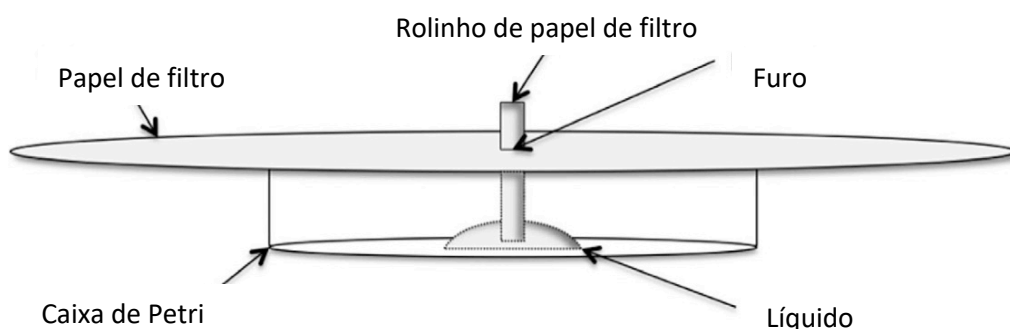
protocolos experimentais estejam bem descritos, mais estudos devem ser levados a cabo para criar um procedimento robustos e uniforme para a interpretação, com uma avaliação rigorosa da eficácia da cromatografia do solo como indicador da condição em que o mesmo se encontra (Ford et al., 2019).

Material necessário por grupo

- 2 Frascos ou Erlenmeyer de 50 mL
- solução de NaOH 1% (30 mL por 3 g de amostra)
- solução de AgNO₃ 0,5% (0,6 mL por amostra)
- 2 papéis de filtro com 150 mm – grade 1 + quadrado com 2cm x 2cm
- 2 caixas de Petri de 60 mm
- micropipeta 1000 mL e 5000 mL
- 2 provetas de 50 mL
- régua
- lápis

Protocolo

1. Pesar 3 g de amostra de solo para um frasco ou Erlenmeyer e adicionar 30 mL de solução aquosa de NaOH 1%.
2. Agitar o frasco à mão, misturando bem o solo na solução. Agitar novamente ao fim de 15, 30 e 60 minutos.
3. Após a última agitação, deixar o frasco repousar durante 60 minutos para extrair e sedimentar.
4. Entretanto, preparar o papel de filtro: fazer um furo no centro do papel e nesse furo enfiar um rolinho de papel de filtro feito a partir de um quadradinho de 2 cm x 2 cm. A partir do centro do papel fazer duas marcas, uma a 4 cm e outra a 6 cm.



5. No centro da placa de Petri colocar 0,6 mL da solução de AgNO₃ 0,5%, e colocar o papel de filtro previamente preparado em cima da placa, de modo que fique assente nos rebordos, e que o rolinho esteja em contacto com o líquido. Colocar tudo num local escuro até o papel de filtro embeber a solução até à marca dos 4 cm, deixar secar num local escuro.

6. Colocar 1,2 mL do sobrenadante recolhido após a extração do solo no centro da placa de Petri de 60 mm, colocar o papel de filtro com o rolinho a tocar no líquido e deixar embeber o papel até à marca dos 6 cm.
7. Deixar o papel secar à luz durante cerca de 12h, para que as cores se desenvolvam na totalidade.
8. Analisar os resultados obtidos.

Bibliografia

Brinton, W. F. (2010). Assessing Compost & Humus Condition by Circular Chromatography. *Journal of the Woods End Research Lab*, 1:1.

Ford, B., Cook, B., Tunbridge, D., and Tilbrook, P. (2019). Using paper chromatography for assessing soil health in southwestern Australia. Centre of Excellence in Natural Resource Management, University of Western Australia.

Graciano, I., Matsumoto, L., Demétrio, G., & Mello Peixoto, E. (2020). Evaluating Pfeiffer Chromatography for Its Validation as an Indicator of Soil Quality. *Journal of Agricultural Studies*, 8(3), 420-446. doi: <http://dx.doi.org/10.5296/jas.v8i3.16336>

Kokornaczyk, M. O., Primavera, F., Luneia, R., Baumgartner, S., & Betti, L. (2017) Analysis of soils by means of Pfeiffer's circular chromatography test and comparison to chemical analysis results, *Biological Agriculture & Horticulture*, 33:3, 143-157, doi: <https://doi.org/10.1080/01448765.2016.1214889>

Perumal, K., Ananthi, S., & Arunkumar, J. (2016). Innovative and simplest Alternative Analytical Technology (AAT) for testing soil nutrients. *Soil Science Reserch*, 1(1), 22-31.

Pfeiffer, E. E. (1984). *Chromatography applied to quality testing*. Wyoming: Bio-Dynamic Farming and Gardening Association. p. 44.