

IDENTIFICAÇÃO COLORIMÉTRICA EM CITRUS

Oswaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

A moléstia dos citrus, inicialmente denominada "podridão das radículas", hoje, mui acertadamente, batizada com o nome de "tristeza", vem devastando pomares paulistas e fluminenses, de maneira assustadora, a ponto de constituir, no momento, problema de magna importância para a citricultura nacional.

O fato da "tristeza" ter sido verificada somente em laranjeiras (e limoeiros?), cujos "cavalos" são de *C. aurantium* L., constitui particularidade notável desta moléstia. Parece indicar até, tratar-se do mesmo mal que, em Java e África do Sul, impede se formem pomares sobre "cavalo" de *C. aurantium* L e que, na Argentina, exterminou aquêles formados sobre idêntico "cavalo".

O estudo da suscetibilidade dos diferentes "cavalos" apenas tem sido realizado satisfatoriamente, nos poucos pomares das Estações Experimentais da Divisão de Experimentação e Pesquisas (Instituto Agrônomico). Nas plantações particulares, ora pela carência de dados sobre plantio, ora pela falta de escrúpulo de alguns viveiristas, a identificação do porta-enxerto só tem sido possível quando há brotações esporádicas (ladrões). Assim, freqüentemente ficamos em dúvida quanto à sua identidade, não sendo possível saber sobre a suscetibilidade ou não das outras variedades.

Tivemos necessidade, portanto, de lançar mão de um processo rápido de identificação do "cavalo" usado. Em vista dos resultados satisfatórios obtidos em outros países citricultores com o método colorimétrico, decidimo-nos tentar o seu emprêgo.

No presente trabalho, realizado com material de alguns dos principais municípios citrícolas do Estado de São Paulo, damos os resultados das observações feitas e algumas considerações de caráter geral.

BREVE REVISÃO DA LITERATURA

Baseando-se na quantidade variável de glucosídeos encontrada nas raízes dos citrus e no fato dêstes glucosídeos conterem fenóis, Hendriksen (3) fez, em 1928, as primeiras tentativas de determinação colorimétrica em *Citrus*. O seu método consistia: tratar um extrato aquoso de raízes frescas e moídas, com cloreto férrico. Das quatro variedades experimentadas (laranjas azêda e doce, grapefruit selvagem e limão rugoso), êste método apenas deu algum resultado com o limão rugoso.

Mais tarde, Halma e Haas (1) realizaram com as mesmas variedades acima, novas experiências de identificação, com o emprêgo de numerosos reagentes químicos e com o extrato aquoso da casca do tronco, sêca e moída. De todos os reagentes usados, o que melhores resultados deu, foi o de Almen, que é recomendado para os ácidos carbólico e salicílico. Êste método parece ser suficiente para a identificação das quatro espécies examinadas; Halma e Haas (1) mencionam, entretanto, os reagentes molibdato de amônio, cloreto férrico e cloreto titanoso, que poderão ser usados em determinações suplementares, para auxiliarem e confirmarem as observações feitas com o reativo de Almen.

Halma (2) pouco tempo depois introduziu uma modificação no processo de Almen, que vantajosamente requer menor quantidade de extrato, e, por conseguinte, menor porção de casca. Maiores diferenças colorimétricas em menor espaço de tempo, vêm em refôrço desta modificação.

Um trabalho bastante extenso sôbre o assunto, foi realizado, mais recentemente, por Marloth (4). Trabalhando na África do Sul, com os mesmos reagentes usados por Halma e Haas (1) na Califórnia (U.S.A.), obteve a identificação de quase tôdas as 15 diferentes espécies e variedades examinadas.

MATERIAL E MÉTODO

Iniciamos o nosso trabalho, fazendo uso da casca tirada logo acima do colo da planta. Isto trazia certos inconvenientes: a) prejudicava bastante a planta, que, na maioria das vêzes, pertencia a ensaios experimentais; b) incerteza, em alguns casos, de que se estava tomando material do "cavalo", em virtude de não se poder precisar a região do enxerto; c) possibilidade dos sais, empregados como preventivos nos troncos, influírem na reação. Em vista disso, resolvemos passar a empregar casca de raiz, com a qual desapareceriam as desvantagens acima enumeradas. Devemos lembrar, entretanto, que os resultados foram idênticos, quer usando-se casca do tronco, quer da raiz.

As primeiras determinações foram feitas com material colhido em Campinas; passamos, em seguida, a trabalhar com cascas de raiz coletadas em Limeira, Piracicaba e Ribeirão Preto. Demos, sempre, preferência aos "cavalos", cujos enxertos eram de laranjas doces (baía, baianinha, barão, pera, etc.) (*C. sinensis* Osbeck), que correspondem às combinações encontradas nas culturas, e, portanto, as que mais nos interessavam. Fizemos, também, algumas determinações em pés francos e em "cavalos" enxertados com limão Eureka; obtivemos, em todos êles, os mesmos resultados.

Quanto ao material usado, para facilidade de exposição, separamo-lo em dois grupos. No primeiro colocamos as seguintes espécies e variedades, que mais nos interessam e que constituem todos os "cavalos" possivelmente empregados no Estado: laranjas caipira e lima (*C. sinensis* Osbeck); limões rugosos da Flórida e nacional, ponderosa e gigante (*C. limonia* Osbeck); laranjas agro-sevilhana e agro-doce (*C. aurantium*

L.); tangerina cravo (*C. nobilis* Lour.); lima da Pérsia e limão cravo (*C. aurantifolia* Swingle); pomelo (*C. paradisi* Macf.) e *Poncirus trifoliata* Raf.. Incluímos no outro grupo, as espécies e variedades abaixo enumeradas, cujas observações foram realizadas, apenas para uma comparação mais completa entre os nossos resultados e os obtidos por Marloth (4): limões eureka e siciliano (*C. limonia* Osbeck); toranja vermelha (*C. maxima* Merrill); cidra (*C. medica* L.); kunkuat Nagami (*Fortunela margarita* Swingle); tangelo (híbrido) e citrangequat (híbrido).

As observações feitas com as amostras deste segundo grupo, não entram, portanto, nas considerações no texto. Apenas utilizamos os dados referentes às variedades eureka e siciliano (Fig. 4) na discussão sobre a espécie *C. limonia* Osbeck.

O método por nós usado foi o mesmo estabelecido por Halma e Haas (2), ou seja: colher um pedaço de casca do tronco ou da raiz, que seja suficiente para dar 0,5 gr de pó. Deve-se fazer previamente, uma ligeira raspagem superficial, para eliminar as impurezas presentes. (As nossas amostras sofriram, no laboratório, uma limpeza ainda mais minuciosa das substâncias estranhas). Depois de seco em um forno, à temperatura de 70° C., o material é moído em gral de porcelana e passado por uma peneira 40. Do pó assim obtido, tomam-se 0,5 gr em um vaso da Boêmia e juntam-se 20 cc de água destilada. Alguns minutos depois, filtra-se a solução, lavando-se o resíduo do filtro com mais 10 cc de água.

Em virtude da embebição pelo papel de filtro e pelo próprio pó, obtêm-se mais ou menos 27 cc de extrato, que serão suficientes para 5 determinações, uma vez que se usem, para cada uma delas, 5 cc de extrato.

Reagentes. Os reagentes indicados por Halma e Haas (1), que também foram usados por Marloth (4), são, como já foi mencionado atrás, em número de quatro: o de Almen; molibdato de amônio; cloreto férrico e cloreto titanoso.

Vejamos, como estes reagentes devem ser preparados e usados (2) (4).

O reagente de Almen é praticamente o mesmo de Millon para albuminas e fenóis. O seu grau de sensibilidade é de 1:400.000.

Prepara-se do seguinte modo: dissolvem-se 160 gr de mercúrio metálico para análise em 160 gr de ácido nítrico fumegante (usamos o de densidade 1,52); acrescentam-se, depois de completada a reação, 320 cc de água destilada. Obtem-se, por fim, o reagente, eliminando-se por decantação o precipitado amarelo que se forma.

Para o seu emprêgo tomam-se 5 cc do extrato aquoso de casca em tubo de ensaio, acrescentam-se 2 gotas de hidróxido de potássio (empregamos a 10%) e 10 gotas de uma solução saturada de sulfato de cobre. Colocam-se, em seguida, 10 gotas do reagente e ferve-se em banho-maria durante alguns minutos. O exame poderá ser feito logo depois, sendo, entretanto, vantajoso esperar que o precipitado formado se deposite, para se poder realizar um exame mais criterioso.

Prepara-se o molibdato de amônio, dissolvendo-se 100 gr de ácido molíbdico em uma mistura de 144 cc de hidróxido de amônio e 271 cc de água destilada. Despeja-se vagarosamente esta solução em uma

mistura fria de 489 cc de ácido nítrico concentrado (não fumegante), (o empregado por nós era de densidade 1,4) e 1148 cc de água destilada. Este reativo emprega-se (1) (4) juntando-se 10 gotas aos 5 cc de extrato aquoso de casca e fervendo-se por alguns minutos em banho-maria.

O cloreto férrico emprega-se em solução saturada, na proporção de 2 gotas para os 5 cc de extrato de casca. Após alguns minutos pode-se fazer a observação, sem necessidade de se ferver a solução.

Quanto ao cloreto titanoso, quarto e último reagente indicado, não nos foi possível, até o presente, a sua obtenção, motivo porque não o experimentamos.

RESULTADOS OBTIDOS

Reação de Almen — As colorações obtidas com este reagente, apesar de não corresponderem totalmente com as observadas por Marloth (4), foram as que melhores resultados deram, dada a constância nas diversas determinações realizadas.

Com este reativo conseguimos separar as 13 amostras examinadas, em três grupos bem distintos: 1) laranjas agro-sevilhana e agro-doce, que podemos reunir debaixo da designação única — laranja azêda (*C. aurantium* L.), com uma coloração **marrom-clara** (fig. 1); 2) laranjas caipira e lima (*C. sinensis* Osbeck) e limão gigante (*) (*C. limonia* Osbeck), que apresentam coloração **rósea-violeta** (fig. 2); 3) tôdas as 8 amostras restantes, que dão soluções "quase incolores" (fig. 3). As diferenças notadas entre as espécies e variedades dêste último grupo, são representadas apenas por leves tonalidades, que não podem, a nosso ver, ser consideradas como suficientes para qualquer separação. Além disso, essas tonalidades variam freqüentemente de uma determinação para outra.

A reação de Almen mostrou-se vantajosa pelo fato de os seus resultados terem sido os mesmos, quer usando-se casca de raiz, quer do caule, tanto empregando-se material de "cavalo" (sob laranja doce ou limão eureka), como de pé franco. As variações, quando presentes, eram muito pequenas e em nada influíam nas determinações dos dois primeiros grupos.

Halma e Haas (1) acrescentam ainda, que os seus resultados não foram influenciados pela idade da árvore, época do ano em que foram tiradas as amostras e nem pela variedade enxertada; era indiferente também que a variedade estivesse como "cavalo" ou como enxêto.

Pelo quadro I, no qual comparamos as colorações obtidas por Marloth (4) com as por nós observadas, podemos ver que, infelizmente, foram grandes as diferenças nos resultados obtidos. Entretanto, entre as poucas confirmações, chamamos atenção para as verificadas com as

(*) Este limão, apesar de dar uma coloração rósea-violeta um pouco mais avermelhada, deve ser incluído neste grupo, pois que a sua identificação é bastante difícil. Poderemos, entretanto, como veremos mais adiante, separá-lo da laranja doce (caipira e lima) por intermédio do cloreto férrico.

variedades de limões. Halma e Haas (1), e mais especialmente, Marloth (4), baseando-se nos seus resultados, dizem da possibilidade de se desdobrar a espécie *C. limonia* Osbeck em duas, uma constituída pela variedade limão rugoso e outra, pelas demais variedades, cujos representantes seriam os limões eureka e lisbon.

Pelas nossas observações, que foram realizadas com 6 variedades de *C. limonia* Osbeck, confirmamos a nítida diferença colorimétrica entre os limões rugoso (da Flórida ou nacional) e eureka, bem como, verificamos, de acôrdo com a hipótese acima, que os limões siciliano e gigante devem ser colocados entre as demais variedades do 2.º grupo (eureka e lisbon). Apenas teríamos que fazer, em vista do resultado obtido com a variedade ponderosa (que possivelmente não foi examinada pelos citados autores), pequena alteração na constituição dos dois grupos, incluindo esta variedade no grupo do limão rugoso.

Reação do molibdato de amônio. O molibdato de amônio, em vista de certos fatos que passaremos a expor, e a-pesar-de ter sido o reagente com o qual mais trabalhamos, foi o que deu os resultados mais negativos.

Tôdas as determinações com êste teste, feitas conforme o método de Halma e Haas (1) usando-se 5 cc de extrato aquoso e 10 gotas do reagente, foram totalmente inúteis; as soluções apresentavam-se amarelas, com mínimas diferenças de tonalidades.

Sempre preparando novas soluções do reagente, e seguindo com a máxima atenção todos os requisitos julgados necessários e essenciais por Marloth (4) fizemos muitas outras tentativas, obtendo sempre os mesmos resultados.

A obtenção de bons resultados com êste método reside, segundo Marloth (4), na questão da acidez do reagente; afirma êste autor que "a intensidade da coloração produzida com tôdas as espécies de citrus, depende do reagente ser o mais neutro possível".

Entretanto, como preparássemos o reativo, precisamente de acôrdo com as proporções estabelecidas, era natural que considerássemos a acidez do molibdato, como sendo a desejada, ou, pelo menos, muito próxima dela. Fazíamos, então, como é aconselhado, a variação dessa acidez, nos diversos ensaios, apenas com a adição de algumas gotas de hidróxido de potássio (a 10%).

Em virtude dos resultados sempre contraditórios e da importância atribuída à acidez, resolvemos determinar o pH do nosso reagente. Constatamos, então, contra nossas expectativas, ser impossível fazer-se a determinação do pH, tal a quantidade de ácido que o reagente continha.

Supondo, naturalmente, que a causa dos nossos insucessos fôsse devida a essa excessiva quantidade de ácido (excesso êsse, possivelmente proveniente da maior concentração do ácido por nós usado), experimentamos ainda novas determinações com êste reagente, modificando-o, porém, de maneira a obtê-lo com uma acidez próxima do neutro. Depois de algumas tentativas, somente conseguimos obtê-lo nestas con-

QUADRO I

COMPARAÇÃO ENTRE AS COLORAÇÕES OBTIDAS POR MARLOTH E POR NÓS,
COM A REAÇÃO DE ALMEN

Resultados de Marloth		Resultados nossos	
Amostras	Colorações	Amostras	Colorações
Sour Orange (Bitter Seville)	light brown	Agro-doce e agro-sevilhana	marrom-clara
Sweet Orange	pink	Laranja lima e caipira	róseo-violeta
Lime	light pink	Lima da Pérsia e limão cravo	quase incolor
Tangerine (Naartjie)	almost colorless	Tangerina cravo	quase incolor
Grapefruit	light brown pink	Pomelo	quase incolor
Rough lemon	almost colorless	Limões rugosos da Flórida e nacional	quase incolor
Lemon	dark brown	Limão ponderosa	quase incolor
		Limão gigante	róseo-violeta (avermelhada)
		Limões eureka e siciliano	marrom-escuro (avermelhada)
P. trifoliata	almost colorless (green tint)	P. trifoliata	quase incolor
Citron	very light brown	Cidra	quase incolor
Shaddock	almost colorless (purple tint)	Toranja melancia	marrom-clara
Kunquat	almost colorless (green tint)	Kunquat Nagami	quase incolor
Tangelo	light pink	Tangelo	róseo-violeta
Citrange	light pink	Citrangequat	marrom-violeta
Limequat	light brown	—	—
Citrus mitis	deep pink	—	—

dições (com pH=6,5), fazendo uma modificação acentuada na segunda solução, que passou a ser preparada com 160 cc de ácido nítrico (densidade = 1,4) a 30% e 400 cc de água. Os resultados obtidos com este novo reagente, cuja quantidade de ácido foi, aproximadamente, 4,5 vezes menor do que a indicada, não foram, no entanto, mais vantajosos que os anteriores.

Insistindo ainda, com as nossas tentativas, fizemos as mais variadas e profundas alterações no método, como, por exemplo, o emprêgo simultâneo do molibdato com violeta gentiana e sulfato de cobre. E, entre os resultados obtidos com estas modificações, alguns mostraram-se bastante interessantes, pelo fato de terem sido os que mais se aproximaram dos desejados. A coloração azul escura com o limão rugoso, que, segundo Marloth (4), é uma das maiores dificuldades, foi conseguida em muitas das combinações acima. Estes resultados, que seriam suficientes para a identificação de mais algumas variedades ainda não determinadas, continuaram, entretanto, sem utilidade prática, dada a enorme variabilidade dos mesmos nas diversas repetições.

Dêste modo, se bem que os resultados assim obtidos fôsem menos desanimadores, decidimos não prosseguir nos nossos trabalhos com este reativo, em vista da dificuldade de obtenção de material, que se tornava cada vez mais acentuada. Esta dificuldade deriva, como dissemos no início do presente trabalho, do fato da maioria dos "cavalos" necessários pertencer a ensaios experimentais.

Reação do cloreto férrico. Com tôdas as espécies e variedades, este reagente dá uma coloração marrom, formando série, cujos têrmos se diferenciam por pequenas variações na intensidade da côr e pela formação ou não de mínimas quantidades de precipitado. Sòmente as diferenças entre os têrmos extremos desta série, podem ser, portanto, consideradas como úteis.

Dêste modo, as determinações com o cloreto férrico seriam valiosas, em combinação com os resultados obtidos pelo emprêgo dos reagentes anteriores. Seria um reativo auxiliar do de Almen e do molibdato de amônio.

Como, porém, os reativos anteriores não deram resultados plenamente satisfatórios, o cloreto férrico tornou-se, para nós, de pequenas possibilidades práticas. Salientamos, entretanto, entre os resultados obtidos, os constatados com a laranja doce (caipira e lima) (Fig. 5) e limão gigante (Fig. 6), que se acham representados no quadro II. Estas duas espécies, que pelo reativo de Almen são grupadas, podem, agora, ser separadas e identificadas. (*)

(*) Como a laranja lima não constitue ainda um "cavalo" comercialmente conhecido e, dada a posição exatamente oposta da laranja caipira nesse particular, podemos, com probabilidades mínimas de êrro, considerar como **caipira**, tôda a amostra que der a coloração **rósea-violeta** com o Almen e **marrom-clara** com o cloreto férrico.

QUADRO II

RESULTADOS DE INTERESSE PRÁTICO OBTIDOS COM O CLORETO FÉRRICO

Espécies e variedades	Colorações
Laranja doce (Caipira e lima)	marrom (bastante turva)
Limões eureka, siciliano e gigante	marrom-escuro (límpida)
Limões ponderosa e rugosos da Flórida e nacional	marrom-clara (pouco turva)

Com relação à hipótese formulada por Marloth (4) a respeito da separação da espécie *C. limonia* Osbeck em duas, nada temos a acrescentar, pois tôdas as considerações feitas ao tratarmos da reação de Almen, foram confirmadas pelos resultados aqui verificados (quadro II).

CONCLUSÕES

Do exposto, podemos concluir que, em nosso meio, a identificação colorimétrica dos "cavalos" de *Citrus* não apresenta as mesmas possibilidades que as obtidas em outros países.

Apenas os reagentes de Almen e o cloreto férrico deram algum resultado, permitindo identificação de algumas das diversas espécies e variedades. Dado, porém, o fato feliz para nós, destes reagentes permitirem, com certa segurança, a identificação dos "cavalos" **azêda** e **caipira**, êles se apresentam bastante úteis, pois os nossos pomares são, na sua grande maioria, enxertados em um destes dois "cavalos".

Como resumo dos nossos resultados, damos, no quadro III, todos os dados julgados valiosos e de reais possibilidades na identificação colorimétrica. Como foi observado no texto, somente levamos em consideração, neste quadro, as espécies e variedades, que possam ser encontradas como "cavalo" em nosso Estado.

QUADRO III

Espécies e variedades	Reação de Almen	Reação do cloreto férrico
Laranja azêda	marrom-clara	—
Laranja doce (Caipira e lima)	róseo-violeta	marrom (bastante turva)
Limão gigante	róseo-violeta	marrom-escuro (límpida)
As 8 restantes espécies e variedades	quase incolor	—

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao sr. Coarací M. Franco, pelos valiosos auxílios prestados na execução dêste trabalho; aos srs. Sílvio Moreira, Antônio José Rodrigues Filho e Felipe W. C. de Vasconcelos, pela obtenção do material.

SUMMARY

In order to study the susceptibility of the various stocks with regard to the new disease "tristeza" ("sadness"), a quick and accurate identification of the stock is required. In orchards this cannot be done in most cases as stocks do not always exhibit sprouts and on account of erroneous information frequently given by owners.

We have tested the colorimetric identification, already employed in other countries. This identification is based on the differences of color obtained in the watery extract of the bark taken from the trunk or from the root, when treated by special reagents.

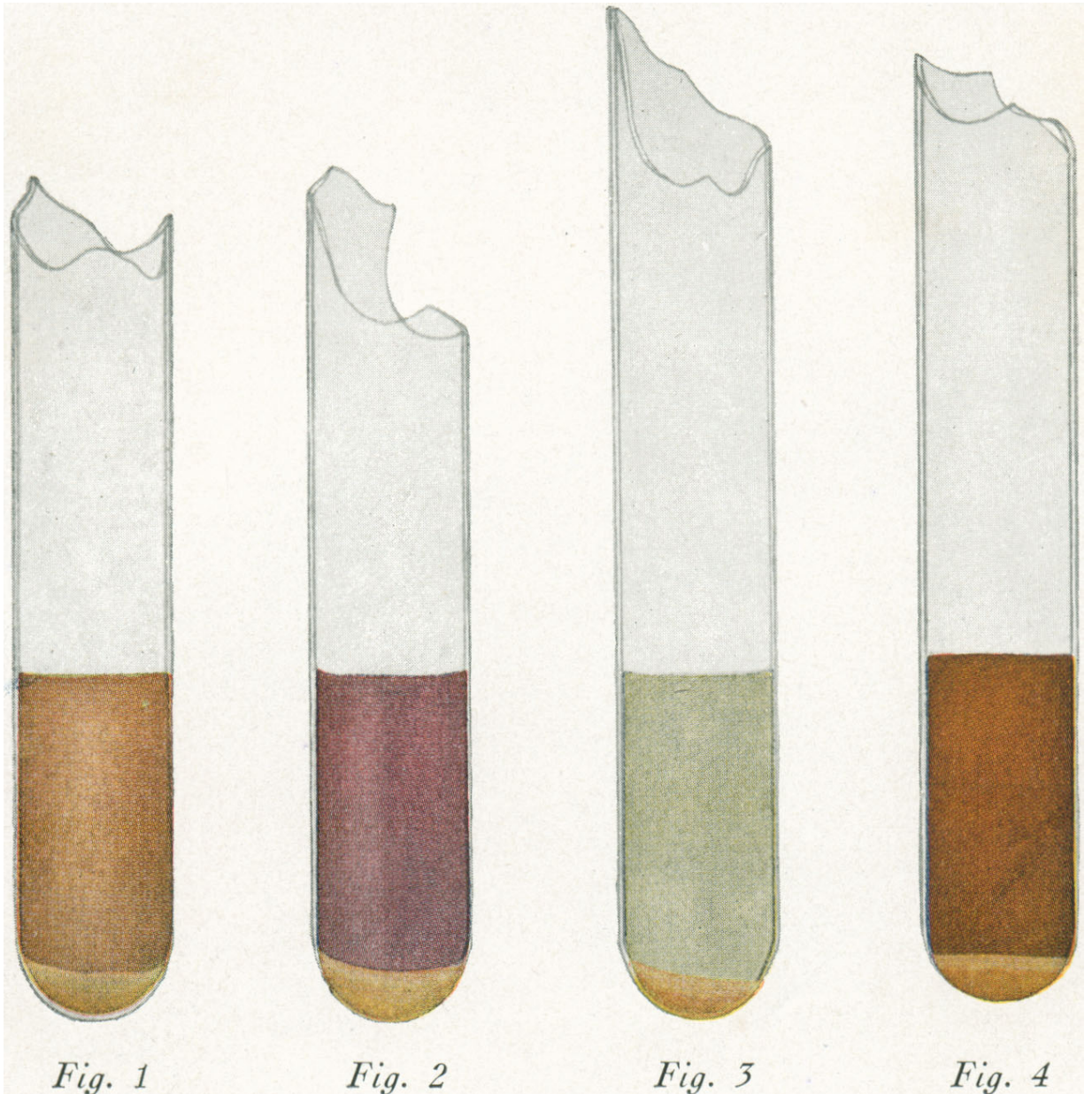
The results obtained are somewhat different from those described by the authors of the method. This is perhaps due to variation in environmental conditions.

Only the Almen and ferric chloride tests gave satisfactory results, making it possible to arrange the species and varieties examined into four groups: (1) *C. aurantium* L.; (2) *C. sinensis* Osbeck; (3) *C. limonia* Osbeck ("gigante" variety) and (4) all the others.

Although deficient in certain respects the test is valuable, permitting us to identify the stocks of orange trees, *azedá* as well as *caipira* the most employed in the citrus orchards of the State of S. Paulo.

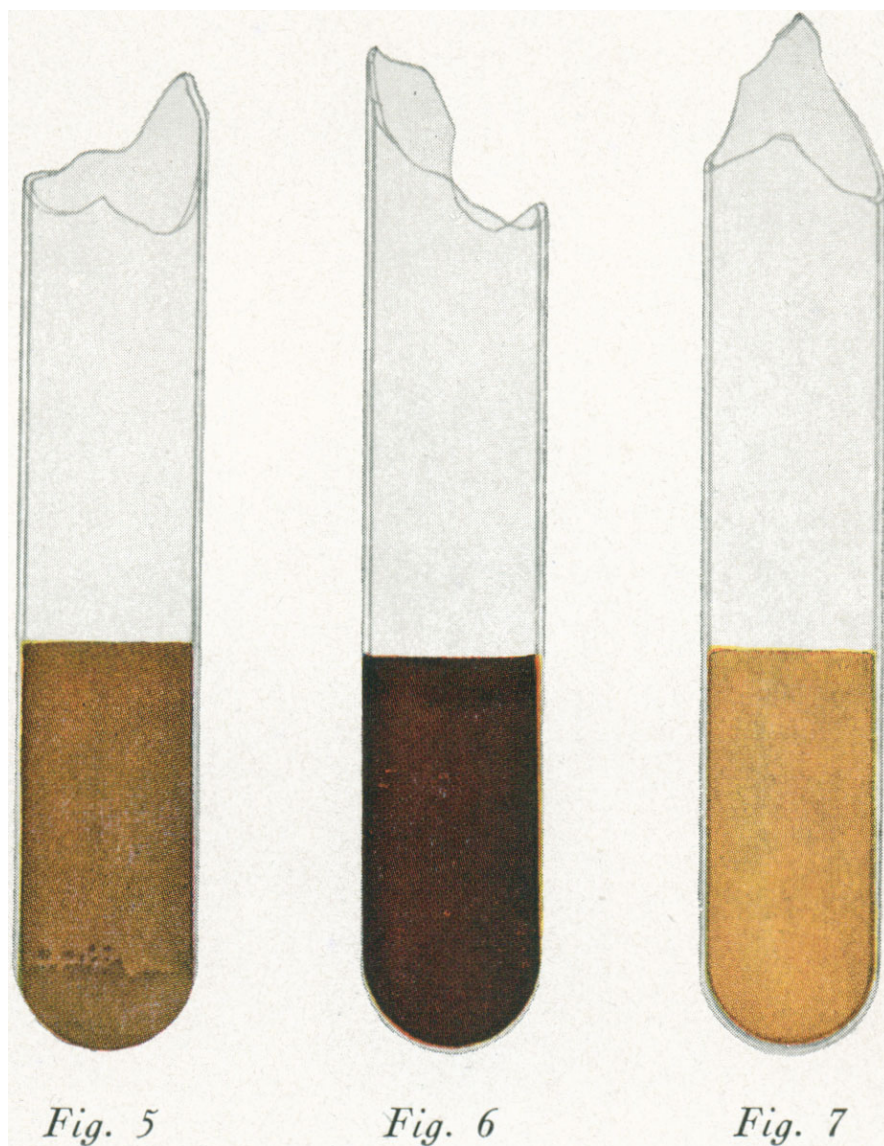
LITERATURA CITADA

1. Halma, F. F. e A. R. C. Haas. Identification of certain species of citrus by colorimetric tests. *Plant Physiology* 4:265-68. 1929.
2. Halma, A. F. Scion influence in citrus. *The Jour. Pomol. and Hort. Sci* 12:99-104. 1934.
3. Hendriksen, H. C. Identification of citrus budding stock: Porto Rican method for testing root system. *Florida Grower* 36:14-15. 1928.
4. Marloth, R. H. Notes on colorimetric tests for citrus species. *The Jour. Pomol. and Hort. Sci.* 14:1-8. 1936.



Colorações obtidas com reagente de Almen

- Fig. 1 — Laranja azêda (*C. aurantium* L.)
Fig. 2 — Laranja caipira (*C. sinensis* Osbeck)
Fig. 3 — Limão rugoso da Flórida (*C. limonia* Osbeck)
Fig. 4 — Limão siciliano (*C. limonia* Osbeck)



Colorações obtidas com o cloreto férrico

Fig. 5 — Laranja caipira (*C. sinensis* Osbeck)

Fig. 6 — Limão gigante (*C. limonia* Osbeck)

Fig. 7 — Limão rugoso da Flórida (*C. limonia* Osbeck)