

**INSTITUTO AGRONÔMICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

**BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM ZINCO EM  
ALFACE**

**CAROLINA CINTO DE MORAES**

**Orientador: Luis Felipe Villani Purquerio**

**Co-orientador: Fernando César Sala**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de **Doutor** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola.

Campinas, SP  
2020

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônomo

M827b Moraes, Carolina Cinto de  
Biofortificação agrônômica com zinco em alface / Carolina Cinto de Moraes. Campinas, 2020. 78 fls.

Orientador: Luis Felipe Villani Purquerio  
Co-orientador: Fernando César Sala  
Tese (Doutorado) Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agrônomo

1 Alface 2. Nutrição de plantas 3. Micronutrientes. 4. Teores de Zn  
5. Segurança alimentar. 6. *Lactuca sativa*. I. Purquerio, Luis Felipe Villani  
II. Sala, Fernando César III. Título

CDD. 635.52



SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO AGRÔNOMO**  
Pós-Graduação Agricultura Tropical e Subtropical  
Fone: (19) 2137.0659/2137.0601  
Avenida Barão de Itapura, 1.481 - Caixa postal  
28 13020-902 - Campinas, SP

**Certificado de Aprovação de Defesa de Tese**

**“Biofortificação agronômica com zinco em alface”**

Aluna: Carolina Cinto de Moraes

Área de Concentração: Tecnologia da Produção Agrícola

Orientador: Luis Felipe Villani Purquerio

Coorientador: Fernando César Sala

Aprovado pela banca examinadora:

*Purquerio*

---

Dr. Luis Felipe Villani Purquerio

*[Handwritten signature]*

---

Dr. Thiago Leandro Factor

*[Handwritten signature]*

---

Dra. Simone da Costa Mello

*[Handwritten signature]*

---

Dra. Neidiquele Maria Silveira - IAC

*[Handwritten signature]*

---

Dr. Fernando César Bachiega Zambrosi

Campinas, 16 de abril de 2020

## DEDICATÓRIA

A Deus, que é minha fonte de esperança e a cada dia me capacita em minha jornada.

Aos meus pais Fernando e Marilda, meus maiores exemplos de amor, esforço e caráter.

À minha irmã Luiza, amiga e companheira.

## DEDICO

*“Deus não conduz jamais Seus filhos de maneira diferente da que eles escolheriam se pudessem ver o fim desde o princípio, e discernir a glória do propósito que estão realizando como Seus colaboradores”*

Ellen G. White

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu amor por mim, que é maior do que eu possa imaginar.

Ao Dr. Luis Felipe Villani Purquerio, mais que um orientador, um grande parceiro e amigo, obrigada pelo incentivo, por me mostrar oportunidades e pela contribuição na minha formação profissional ao longo desses anos de parceria.

Ao Prof. Dr. Fernando César Sala, pelas valiosas contribuições e motivação desde os tempos de graduação.

Ao Dr. Estêvão Vicari Mellis, pela participação e parceria desde a idealização deste trabalho.

À Dra. Neidiquele Silveira, pela parceria, auxílio nas análises enzimáticas e importantes contribuições no artigo.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Fisiologia Vegetal Coaracy Moraes Franco.

À Pós-Graduação do Instituto Agrônomo pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao querido casal Prof. Dr. Paulo César Tavares de Melo e Dra. Arlete Marchi Tavares de Melo por sempre compartilharem seus vastos conhecimentos e por me proporcionarem uma significativa fase no período do doutorado.

Aos meus pais, Marilda e Fernando Moraes, pelo amor, apoio e incentivo nessa jornada. À minha irmã Luiza C. Moraes pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos de pós-graduação Gabriel Stefanini Mattar, Humberto S. Araújo, Adriana Modolon Duarte, Laís De Paula e Caroline Rodrigues pela excelente convivência, parceria, trabalho em equipe e boas risadas.

Aos pesquisadores do Centro de Horticultura, pelo auxílio, amizade, confraternizações e por sempre compartilharem seus conhecimentos, em especial a Dra. Laura Melletti e ao Dr. José Carlos Feltran.

Aos pesquisadores e professores da PG – IAC, pela atenção e contribuição nesta etapa da minha formação.

Aos meus familiares, amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Características e tendências no cultivo de alface.....	3
2.2 Dinâmica da deficiência de zinco e seu impacto sobre a saúde da população .....	5
2.3 Biofortificação com zinco .....	6
2.4 Biofortificação agronômica com zinco em hortaliças folhosas.....	7
2.5 Tolerância das plantas ao zinco.....	9
2.6 Zinco e metabolismo antioxidante.....	10
3 REFERÊNCIAS .....	13
CAPÍTULO 1 .....	19
Resumo .....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	26
Discussão .....	32
Conclusões.....	35
Referências .....	35
CAPÍTULO 2 .....	39
Resumo .....	40
Abstract.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	43
Resultados.....	46
Discussão .....	52
Conclusões.....	54
Referências .....	55
CAPÍTULO 3 .....	58
Resumo .....	59
Abstract.....	60
Introdução.....	61
Material e métodos .....	62
Resultados.....	66
Discussão .....	71
Conclusões.....	72
Referências .....	73
Material suplementar .....	76
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	77

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Níveis de significância de acordo com ANOVA para comprimento do caule (CC), massa fresca da planta (MF), massa seca das folhas (MSF) e raízes (MSR), acúmulo de Zn nas folhas (ACF) e raízes (ACR) em função de doses de Zn no solo (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg dm<sup>-3</sup>) em duas épocas de cultivo.....26
- Tabela 2. Quantidade de Zn em uma porção de 50 g de massa fresca (MF) de folhas das cultivares de alface Vanda e Saladela nas épocas de cultivo 1 (E1 - março a abril) e 2 (E2 – maio a julho) e a contribuição desta porção em porcentagem para a recomendação de ingestão diária de Zn. ....32

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Teores limites de Zn em folhas de alface biofortificada cv. Vanda e Saladela, teor limite de Zn no solo e doses limites de Zn aplicadas no solo nas épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a junho). ....48

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1. Significância de acordo com ANOVA para as características teor de Zn, massa seca e características bioquímicas\* nas folhas da cv. Vanda, em função de doses de Zn no solo (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg dm<sup>-3</sup>) em duas épocas de cultivo.....67
- Tabela S1. Atributos químicos do solo usado no experimento. ....76

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Comprimento do caule (A) e massa fresca comercial (B) da alface Vanda em função e de épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. ....27
- Figura 2. Comprimento do caule (A) e massa fresca comercial (B) da alface Saladela em função e de épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. ....27
- Figura 3. Massa seca das folhas (A) e raízes (B) da alface Vanda em função e doses de zinco e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.....28
- Figura 4. Massa seca das folhas (A) e raízes (B) da alface Saladela em função e doses de zinco e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.....29
- Figura 5. Acúmulo de Zn nas folhas (A) e raízes (B) da alface Vanda em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. ....30
- Figura 6. Acúmulo de Zn nas folhas (A) e raízes (B) da alface Saladela em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . 31

### CAPÍTULO 2

- Figura 1. Teores de Zn nas folhas (A) e na raiz (B) da alface Vanda em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . 46
- Figura 2. Teores de Zn no solo após a colheita de alface Vanda, em função de doses de Zn aplicadas no solo. As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . ....47

- Figura 3. Relação entre massa seca das folhas e teores de Zn nas folhas de Vanda. As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . 48
- Figura 4. Teores de Zn nas folhas (A) e na raiz (B) da alface Saladela em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . .....49
- Figura 5. Teores de Zn no solo após a colheita de alface Saladela, em função de doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . 50
- Figura 6. Relação entre massa seca das folhas e teores de Zn nas folhas de Saladela nas épocas de cultivo E1 (março a abril - A) e E2 (maio a julho - B). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ . .....51
- Figura 7. Plantas de alface Vanda (A) e Saladela (B) submetidas a doses de 0 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> e suas folhas medianas provenientes das doses de 0 a 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> na época de cultivo 2.....51

### CAPÍTULO 3

- Figura 1. Condições ambientais ao longo do período experimental. Temperaturas diárias máxima, média e mínima do ar (T) e umidade relativa média do ar (UR) de 07 de março a 06 de abril (E1) e 29 de maio a 09 de julho de 2018 (E2). .....66
- Figura 2. Massa seca das folhas e raízes de alface Vanda em função de doses de Zn no solo (A) e épocas de cultivo (B) E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4). .....68
- Figura 3. Teor de Zn nas folhas (A) e nas raízes (B) em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho) da alface Vanda. Letras maiúsculas em B representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4). ...68
- Figura 4. Concentração de aldeído malônico – MDA (A) e peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) em folhas de alface Vanda em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Letras maiúsculas representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4). .....69
- Figura 5. Atividade da superóxido dismutase – SOD (A), catalase – CAT (B) e ascorbato peroxidase - APX (C) em folhas de alface Vanda em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Letras maiúsculas representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4). .....70

## Biofortificação agronômica com zinco em alface

### RESUMO

A biofortificação agronômica com zinco (Zn) em plantas voltadas para alimentação é uma estratégia para combater a baixa ingestão de Zn pelos seres humanos. Estima-se que um terço da população sofra com problemas relacionados à deficiência deste nutriente. A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais produzida e consumida no mundo e pode ser importante fonte de Zn quando biofortificada. No entanto, os teores e acúmulo deste nutriente pela alface podem variar em função da quantidade de fertilizante com Zn aplicado, do genótipo e da época de cultivo. Sendo assim, para que a biofortificação seja sustentável é preciso conhecer o desempenho das plantas sob doses de Zn no solo em diferentes épocas de cultivo, considerando a sensibilidade à toxidez do nutriente e o metabolismo antioxidante das plantas biofortificadas. Os objetivos deste trabalho foram i) avaliar o efeito da aplicação de doses de Zn em solo, na produção e acúmulo de Zn em alfaces (cv. Vanda e Saladela) em duas épocas de cultivo; ii) identificar os teores limites de Zn no solo e nas duas cultivares de alface através da perda de biomassa em duas épocas de cultivo; iii) investigar o efeito da biofortificação agronômica com Zn nas respostas antioxidantes em folhas de alface cultivada em duas épocas. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos foram doses de Zn, (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) na forma de sulfato de zinco no solo contido em vasos, e duas épocas de cultivo, março a abril de 2018 (Época 1, E1) e maio a julho de 2018 (Época 2, E2). Realizaram-se dois experimentos independentes para as cultivares Vanda (crespa) e Saladela (romana crocante). Concluiu-se que: i) Independentemente da época, o acúmulo de Zn pelas folhas da Vanda aumentou 8,9 vezes em função do aumento das doses, chegando a 7,0 mg planta<sup>-1</sup>. Para Saladela, o aumento foi de 11 vezes na E1 e 8 vezes na E2, com maiores acúmulos de 10,6 e 12,3 mg planta<sup>-1</sup>, respectivamente. O uso da maior dose de Zn não reduziu a produtividade de Vanda, mas para Saladela, houve redução em ambas as épocas. A dose mais adequada para biofortificação das plantas foi de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, em ambas as épocas de cultivo para Vanda e 35 e 12 mg Zn dm<sup>-3</sup> na E1 e E2, respectivamente, para Saladela; ii) O teor limite de Zn nas folhas de alface Vanda foi 704,1 mg kg<sup>-1</sup>, independentemente da época de cultivo. O teor limite no solo foi de 18,9 mg dm<sup>-3</sup>. Os teores limites nas folhas da Saladela foram 1023,5 e 583,6 mg kg<sup>-1</sup> na E1 e E2, respectivamente, que corresponderam aos teores no solo de 18,0 e 11,8, mg dm<sup>-3</sup> respectivamente. iii) A biofortificação agronômica em alface com doses de 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> resultou em maior peroxidação lipídica (MDA) e menor massa seca, indicando que estas doses no solo foram fatores de estresse para a planta, induzindo ao aumento da atividade da SOD em ambas as épocas de cultivo. As atividades da CAT e APX não variaram significativamente nas doses de 20 a 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, mas foram suficientes para manter as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A biofortificação agronômica em alface foi possível e as plantas apresentaram potencial de acúmulo de Zn, podendo trazer benefícios à população. No entanto, devido às perdas de biomassa e toxicidade de Zn nas plantas sob altas doses deste nutriente no solo, ressalta-se a importância de balizar as mesmas em função da sensibilidade das plantas e épocas de cultivo, visando uma prática sustentável.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*, nutrição de plantas, teores de Zn, micronutrientes, segurança alimentar.

## Agronomic biofortification of lettuce with zinc

### ABSTRACT

Zinc (Zn) agronomic biofortification of food-driven plants is a strategy to combat low human Zn intake. It is estimated that one-third of the population suffers from problems related to the deficiency of this nutrient. Lettuce (*Lactuca sativa*) is the most produced and consumed leafy vegetable in worldwide and can be an important source of Zn when biofortified. However, the Zn content and its accumulation by lettuce vary depending on the amount of fertilizer with Zn applied, the genotype and the growing season. Therefore, for biofortification to be sustainable, it is necessary to know the performance of plants under Zn doses in the soil at different growing seasons, considering the sensitivity to Zn toxicity and the antioxidant metabolism of biofortified plants. The aims of this study were i) to evaluate the effect of the application of Zn doses in soil on the production and Zn accumulation in lettuce (cv. Vanda and Saladela) in two growing seasons; ii) to identify the limit contents of Zn in the soil and in the two lettuce cultivars through the loss of biomass in two growing seasons; iii) to investigate the effect of agronomic biofortification with Zn on antioxidant responses in lettuce leaves grown in two seasons. The experimental design was randomized blocks, in a 6 x 2 factorial scheme, with four replications. The treatments were 0, 5, 10, 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> in the form of zinc sulfate, applied to soil in pots, and two growing seasons, March to April (S1) and May to July (S2) of 2018. Two independent experiments were carried out for the cultivars Vanda (curly type) and Saladela (crispy roman type). It was concluded that: i) Zn accumulation by Vanda leaves increased 8.9 times, reaching 7.0 mg Zn plant<sup>-1</sup>, regardless of the season. For Saladela, the increase was 11 and 8 times in S1 and S2, respectively, reaching 10.6 and 12.3 mg Zn plant<sup>-1</sup>. The highest dose of Zn did not reduce the yield of Vanda, whereas for Saladela, there was a reduction in both seasons. The agronomic biofortification of lettuce was more adequate with the dose of 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, in both growing seasons for Vanda and 35 and 12 mg Zn dm<sup>-3</sup> in S1 and S2, respectively, for Saladela; ii) The limit Zn content in Vanda lettuce leaves was 704.1 mg kg<sup>-1</sup>, regardless of the growing season. The limit soil content was 18.9 mg dm<sup>-3</sup>. The limit contents in Saladela leaves were 1023.5 and 583.6 mg kg<sup>-1</sup> in S1 and S2, respectively, corresponding to the soil contents of 18.0 and 11.8 mg dm<sup>-3</sup> respectively; iii) Agronomic biofortification in lettuce with doses of 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> resulted in higher lipid peroxidation (MDA) and lower dry mass, indicating that these doses in the soil were stress factors for the plant, leading to increased activity of SOD in both growing seasons. CAT and APX activities did not vary significantly of 20 to 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, but sufficient to maintain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. Agronomic biofortification in lettuce was possible and the plants showed potential for Zn accumulation, which may bring benefits to the population. However, due to the loss of biomass and Zn toxicity in plants under high doses of this nutrient in the soil, the importance of guiding agronomic biofortification is emphasized, depending on the plants' sensitivity and growing seasons, aiming at a sustainable practice.

**Keywords** - *Lactuca sativa*, plant nutrition, Zn content, micronutrients, food security.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Zinco (Zn) é um elemento essencial para a saúde humana, pois realiza funções estruturais e catalíticas em cerca de 10 % de todas as proteínas. No entanto, pelo menos 1/3 da população mundial sofre com a sua deficiência, o que prejudica funções bioquímicas e fisiológicas, provocando diversos tipos de problema de saúde, como câncer, infertilidade, atraso no desenvolvimento em crianças, enfraquecimento do sistema imunológico. A falta de Zn nos seres humanos está associada a dietas pouco diversificadas e baseadas em cereais, que possuem baixos teores de Zn, além de biodisponibilidade limitada pelo ácido fítico.

É conhecido que a deficiência de Zn em culturas voltadas para alimentação humana ocorre, principalmente, em função dos baixos teores deste nutriente no solo. Portanto, para resolver esse problema, nos últimos anos foram desenvolvidas estratégias para enriquecer os alimentos com nutrientes, dentre elas, a biofortificação. Esta técnica pode ser feita através de melhoramento genético de plantas ou a partir de práticas de manejo de nutrição de plantas, esta última é denominada biofortificação agrônômica.

A biofortificação agrônômica pode ser realizada com aplicações de fertilizantes no solo, em solução nutritiva (cultivo sem solo) ou foliar. É uma solução para a melhoria da qualidade nutricional dos alimentos e tem sido estudada principalmente em grãos e cereais por representarem a maioria das calorias consumidas. No entanto, as hortaliças folhosas contêm mais Zn do que os cereais, além de grande potencial para absorver o nutriente pelas raízes e acumular nas folhas. Assim, devem ser exploradas para mitigar a baixa ingestão deste micronutriente e melhorar a saúde humana.

A alface é a hortaliça folhosa mais produzida e consumida no Brasil e no mundo, além de ser uma das espécies mais eficientes na absorção de metais, dessa forma pode ser importante fonte de Zn quando biofortificada, especialmente entre pessoas de baixa renda ou com dieta vegetariana, que estão mais sujeitas a menor ingestão desse micronutriente. No entanto, os teores e acúmulo do Zn pela alface podem variar em função da quantidade de fertilizante aplicado, do genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta. Além disso, a produção e qualidade da alface é afetada por condições climáticas.

As plantas cultivadas sob elevadas temperaturas no verão tropical podem apresentar o ciclo de cultivo mais curto, menor produção de biomassa e pendoamento precoce, o que reflete

diretamente na qualidade do produto. Por consequência, as práticas de manejo de nutrição das plantas devem ser diferenciadas e adequadas para cada condição climática. Sendo assim, para que a biofortificação agronômica com Zn em alface seja sustentável, é importante conhecer os efeitos de doses crescentes do Zn no solo na produção e qualidade de cultivares em diferentes épocas de cultivo.

Altas doses de fertilizante com Zn no solo podem causar toxidez na planta, o que limita a produtividade e qualidade, dificultando a biofortificação. Em níveis tóxicos, o Zn pode induzir a produção anormal de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plantas, responsáveis pelo estresse oxidativo, causando peroxidação lipídica e morte celular. Apesar disso, é conhecido que este nutriente desempenha um papel na defesa antioxidante da planta, podendo reduzir efeitos de condições que causam estresse. Portanto é fundamental conhecer a sensibilidade dos genótipos ao Zn, bem como o metabolismo antioxidante, em cada época de cultivo.

Esta tese foi estruturada com uma revisão de literatura, três capítulos e considerações gerais. No primeiro, intitulado “Biofortificação agronômica de alface com zinco sob condições tropicais”, foi testada a hipótese de que o aumento da aplicação de Zn no solo pode ser uma estratégia eficiente para biofortificar a alface. O objetivo foi avaliar o efeito da aplicação de doses de Zn em solo, na produção e acúmulo deste nutriente em alfaces (cv. Vanda e Saladela) em duas épocas de cultivo sob condições tropicais. O segundo capítulo foi intitulado “Limites para biofortificação agronômica de alface com zinco em condições tropicais” e testou a hipótese de que doses crescentes de sulfato de Zn no solo resultam em maiores teores deste elemento nas folhas e raízes de alface, porém podem causar perda na produção de biomassa devido à toxicidade. Dessa forma o objetivo foi identificar os teores limites de Zn no solo e nas plantas de alface cv. Vanda e Saladela através da perda de biomassa. O terceiro e último capítulo intitulado “A biofortificação agronômica com Zn afeta o metabolismo antioxidante da alface” testou a hipótese de que alta temperatura do ar e aumento da concentração de Zn na planta induz a danos oxidativos e aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Portanto o objetivo foi investigar o efeito da biofortificação agronômica com Zn nas respostas antioxidantes em folhas de alface cultivada em duas épocas. Nas considerações gerais abrangeu-se os principais resultados, enfatizando a influência do manejo do Zn na sustentabilidade da tecnologia em cultivo de alface e na nutrição humana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características e tendências no cultivo de alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais produzida e consumida no Brasil. No ano de 2012 o volume de produção no país foi de 1,6 milhões de toneladas, ficando atrás apenas do tomate e da melancia (ABCSEM 2014). Em 2015, a área de produção foi de aproximadamente 90.000 ha, a maior entre as hortaliças folhosas (ABCSEM 2016).

Os tipos varietais produzidos no Brasil são lisa, crespa, mimosa, americana, romana, roxa/vermelha e minialface (Sala e Costa 2012). O segmento de alface crespa liderou nos últimos anos, em 2015 correspondeu a 60% da área total de produção de alface. No entanto, a aceitação da alface americana pelo mercado consumidor vem crescendo, de 2010 para 2015, a área de produção deste segmento aumentou em aproximadamente 35% (ABCSEM 2016). Esse crescimento deve-se ao aumento das redes de lanchonetes *fast foods* que demandam esse tipo de alface e pela maior demanda e preferência do consumidor da classe média alta que já conhecia esse produto através de viagens ao exterior (Sala e Costa 2012).

Com as características de alface crespa e qualidade da americana, as alfaces crocantes tem sido uma inovação para a alficultura brasileira. Trata-se de um produto com um novo conceito, destacando-se por apresentar folhas com textura e crocância equivalentes à da americana e flabeladas como a do tipo crespa. Suas folhas são de coloração verde claro típica das crespas convencionais e com ondulações nos bordos foliares. Em comparação com a alface americana onde descarta-se cerca de 60% das folhas por ser de coloração verde escura e indesejável para processamento, as alfaces tipo crocante apresentam aproveitamento superior a 80% das folhas. Além disso, não formam cabeça, como a alface americana. Essa característica de tropicalização é uma de suas vantagens para o cultivo de verão, quando as perdas são elevadas em função de alta precipitação. Outra característica é o pendoamento lento, que ocorre mesmo em altas temperaturas observadas no verão. O tipo crocante pode ser cultivado no sistema convencional de canteiros, cultivo protegido e hidropônico, destacando superioridade em relação às crespas convencionais (Sala e Costa 2012).

No Brasil há algumas cultivares crocantes em comercialização, as quais foram desenvolvidas pela UFSCar e estão licenciadas para venda pelas seguintes empresas e institutos:

Fercam, Feltrin, Fundação Biodinâmica e Fundação Mokiti Okada. Em 2017 foi lançada a cultivar Saladela, que se destaca por apresentar características da americana e da romana, com folhas crocantes, flabeladas e sabor adocicado. Inovações como a alface Saladela podem estimular a demanda de hortaliças por parte da população brasileira, auxiliando na qualidade nutricional da dieta.

Em experimento prévio (dados não publicados) verificou-se que a cv. Saladela tem teor de Zn aproximadamente 25% maior em relação à cv. Vanda do tipo crespa, comumente consumida no Brasil. Sendo assim, com seu sabor adocicado e crocância associados ao potencial em acumular Zn, esta cultivar pode trazer grande contribuição no combate à má nutrição de Zn em adultos e crianças.

Conforme estudos sugerem, a composição mineral da alface, a produção e qualidade do produto para comercialização podem ser influenciadas por variações genotípicas (Rouphael et al. 2017, Mampholo et al. 2016, Rouphael et al. 2012), práticas de manejo (Sönmez et al. 2017, Rouphael et al. 2012) e fatores climáticos (Kosma et al. 2013). Embora possa ser cultivada o ano todo, a alface se adapta melhor sob temperaturas médias entre 15 e 18 °C e máximas entre 21 e 24 °C, apresentando maior produção nas épocas mais frias do ano em países tropicais. (Filgueira 2013). Dessa forma, seu cultivo é suscetível a variações climáticas de diferentes épocas do ano.

Por exemplo, as condições climáticas influenciam na duração do ciclo de cultivo de alface. Plantas produzidas na faixa ideal de temperatura levam entre 70 e 100 dias para atingirem a maturidade horticultural, enquanto em períodos com temperaturas mais elevadas e fotoperíodo longo, a colheita ocorre entre 55 a 70 dias após a semeadura (Filgueira 2013, Tudela et al. 2017). Dufault et al. (2009) verificaram a produção de seis cultivares de alface romana em 22 datas de plantio (de setembro a abril, em três anos) em condições de clima temperado. Os autores demonstraram que a cada 1 °C de aumento na temperatura média máxima ou mínima, o momento da colheita reduziu em 5 dias. Ainda, a elevação de 5 °C reduziu o ciclo de cultivo em 50 %. Neste mesmo estudo, Dufault et al. (2009) verificaram que o número de plantas comercializáveis aumentou quando a temperatura foi maior que 12 °C.

No Brasil, em condições tropicais, Ferreira et al. (2014) constataram que a produção de biomassa de alface crespa foi maior quando cultivada em maio/junho (temperatura média de 24,3 °C e 97,3 horas de luz), do que em outubro/dezembro (temp. média de 25,9 °C e 122,4 horas de luz). Além de redução na produção, plantas expostas a altas temperaturas são induzidas ao

pendoamento precoce, o que resulta em sabor amargo e folhas mais rígidas. Ainda, quando as temperaturas elevadas se associam à alta umidade relativa do ar, as plantas se tornam mais suscetíveis ao ataque de fungos e bactérias, refletindo diretamente na qualidade do produto (Sala e Costa 2012).

Conforme o exposto, diferenças climáticas afetam características fisiológicas da planta de alface, bem como a produção e qualidade do produto. Portanto, é importante que estudos com esta cultura sejam feitos em diferentes épocas de cultivo para que se determinem práticas de manejo adequadas para cada condição.

## **2.2 Dinâmica da deficiência de zinco e seu impacto sobre a saúde da população**

O zinco (Zn) é um micronutriente vital em seres humanos para síntese proteica e crescimento celular. No entanto, a deficiência deste nutriente prevalece nos países de baixa e média renda, o que prejudica uma vasta gama de funções bioquímicas e fisiológicas, provocando diversos tipos de câncer, infertilidade, diminuição de massa, queda de cabelo, unhas deformadas, perda do paladar, atraso no desenvolvimento esquelético, mental e maturidade sexual, diminuição da capacidade de aprendizagem, dermatites, diarreia persistente, diminuição do sistema imunológico e alta suscetibilidade a doenças infecciosas e dificuldade na cicatrização das feridas. Estima-se que, pelo menos 1/3 da população mundial sofra com a deficiência de Zn e que aproximadamente 800.000 mortes por ano no mundo entre crianças menores de cinco anos podem estar associadas à deficiência de Zn (WHO 2013, Black 2003).

A ingestão diária de Zn recomendada para adultos é de 15 mg (Kiekens 1995). Este valor pode variar conforme a referência, nos EUA, por exemplo, a recomendação diária é entre 8 a 13 mg, no Reino Unido é de 7 a 13 mg (Institute of Medicine – USA 2001; Department of Health – UK 1991). De acordo com os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), há inadequação de ingestão de Zn no Brasil de 24 % para homens e 22 % para mulheres.

A baixa ingestão dietética do Zn ocorre em decorrência dos baixos teores deste nutriente nos alimentos, sendo uma das principais razões para a deficiência na população humana (Cakmak et al. 2010). No entanto, é conhecido que a deficiência de Zn em culturas voltadas para alimentação humana ocorre, principalmente, em função da baixa solubilidade e teor deste nutriente no solo. Foi relatado deficiência nos solos de diversos locais do mundo, principalmente Ásia e África (Alloway

2008). No Brasil, este problema ocorre onde há solos altamente desgastados pelas intempéries (oxissolos, ultissolos e latossolos) na região do Campo Cerrado na planície central e costa úmida do Atlântico (Fageria e Stone 2007).

A disponibilidade da forma solúvel  $Zn^{2+}$  no solo está diretamente relacionada com alguns fatores: solos com baixo teor de Zn ( $10-30 \text{ mg kg}^{-1}$ ), compactação da zona da raiz, textura, solos calcários ( $\text{pH} > 7,4$ ), teor de matéria orgânica, atividade microbiana, temperatura do solo, espécie e variedades de plantas, altos níveis de fósforo, efeito do nitrogênio (Lindsay 1972).

A maior preocupação entre os profissionais na agricultura consiste em aumentar a produtividade das culturas para atender a demanda de alimentos da população mundial, assim, técnicas cultivo e melhoramento genético de cultivares resistentes a condições adversas vem sendo estudados e desenvolvidos. Deste modo, possibilitou-se o aumento da produtividade, porém, além das características produtivas, é importante considerar a qualidade nutricional dos alimentos produzidos, a qual tem sido negligenciada. Este fenômeno, segundo Welch e Graham (2000), se tornou o principal responsável pelo aumento dos casos de desnutrição em seres humanos.

Sendo assim, aumentar a concentração de Zn nas plantas de culturas alimentares, resultando tanto em melhor produtividade quanto na melhoria da saúde humana é um importante desafio global. Entre os elementos essenciais, a deficiência de Zn é uma das mais preocupantes, gerando interesse nas comunidades científicas e organizações de saúde internacionais (White e Zasoski 1999, Hotz e Brown 2004, Welch e Graham 2004).

### **2.3 Biofortificação com zinco**

Diante da deficiência de Zn nos solos, nas plantas e conseqüentemente nos seres humanos, uma estratégia para combater este problema seria o enriquecimento deste nutriente nas partes comestíveis das plantas, o qual pode ser feito através de melhoramento genético ou a partir de métodos agrícolas, em especial a fertilização (White e Brown 2010). Esta estratégia é conhecida como biofortificação e tem como objetivo aumentar as concentrações biodisponíveis de Zn nos alimentos. Assim, a ingestão de alimentos biofortificados pode manter teores adequados do nutriente no organismo humano, além de incrementar a produtividade das culturas em solos inférteis (Almeida et al. 2016).

O melhoramento genético convencional tem sido o principal foco de programas para biofortificar as culturas alimentares básicas com níveis suficientes de carotenoides, Fe, Zn e provitamina (White e Broadley 2009). Contudo, a biofortificação com micronutrientes em alimentos utilizando fertilizantes é denominada biofortificação agrônômica. Este tipo de biofortificação é realizada com aplicação de fertilizantes com Zn no solo, em solução nutritiva ou foliar (Cakmak, 2008).

A biofortificação agrônômica é uma solução para a melhoria da qualidade nutricional dos alimentos e pode ser considerada uma complementação para garantir o sucesso dos programas de biofortificação genética. Existindo, portanto, a necessidade de unir o potencial genético das culturas com estratégias de adubação (Cakmak, 2008).

Os fertilizantes com Zn podem ser aplicados diretamente no solo em três tipos de compostos, os inorgânicos, os quelatos sintéticos e os complexos naturais orgânicos, que variam em seu teor de Zn, preço e eficácia para culturas em diferentes tipos de solo. A fonte inorgânica sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) é mais comum e amplamente utilizada devido à sua alta solubilidade e baixo custo. Outras fontes inorgânicas são óxido de zinco ( $ZnO$ ), carbonato de zinco ( $ZnCO_3$ ), nitrato de zinco ( $Zn(NO_3)_2$ ) e cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) (Alloway, 2008).

Recentemente a biofortificação agrônômica com Zn tem sido estudada em algumas culturas, principalmente em cereais, como trigo, arroz e milho, uma vez que estas culturas representam a maioria das calorias consumidas, especialmente em países em desenvolvimento (Cakmak e Kutman 2018). No entanto, Clemens (2017) sugere que uma estratégia complementar seria a biofortificação de hortaliças folhosas atrelada à promoção do consumo, pois estas contêm muito mais Zn do que os cereais (Broadley et al., 2007).

#### **2.4 Biofortificação agrônômica com zinco em hortaliças folhosas**

Estudos indicam que as famílias Brassicaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae, nas quais há uma vasta gama de espécies de hortaliças folhosas, contém plantas hiperacumuladoras de elementos minerais, incluindo Zn (Cappa e Pilon-Smiths, 2014). Essas plantas apresentam naturalmente concentrações de 50 a 100 vezes maiores de um metal, incluindo cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), selênio (Se) e zinco (Zn), em relação as da vegetação que a circunda, ou equivalente de 100 a 10,000 mg  $kg^{-1}$  de massa seca (Van der Ent et al., 2013).

Embora haja poucos estudos com biofortificação de Zn em hortaliças folhosas, Clemens (2017) reforça o potencial dessas culturas para o maior acúmulo de Zn e questiona: por que não introduzir a biofortificação em hortaliças folhosas? Segundo White e Broadley (2011), espécies da família Asteracea tendem a ter alto teor de Zn na parte aérea.

Além do potencial genético dessas plantas, as concentrações de Zn em hortaliças folhosas são geralmente maiores do que em grãos, tubérculos e frutas, uma vez os órgãos de reserva obtêm a maioria de seus minerais através do floema e Zn é pouco móvel no floema (White e Broadley 2011). Sendo assim, as folhas podem contribuir substancialmente para a ingestão dietética de Zn, apesar do baixo teor calórico (Henderson et al. 2003).

Na literatura foram encontrados alguns trabalhos com relação à biofortificação agrônômica de Zn em folhosas (Broadley et al. 2010, Padash et al. 2016, Barrameda-Medina et al. 2017a, Barrameda-Medina et al. 2017b, White et al. 2018, Rugeles-Reyes et al. 2019). Ressalta-se que as culturas estudadas em todos estes trabalhos foram das famílias Brassicaceae e Asteraceae, ambas pertencentes ao grupo das hiperacumuladoras de Zn, conforme descrito anteriormente.

Com o objetivo de caracterizar a variação genética natural, Broadley et al. (2010) caracterizaram 270 acessos de *Brassica oleracea* L. cultivadas com 5 mg Zn kg<sup>-1</sup> de solo e sem fertilização e observaram que os teores de Zn na parte aérea variaram de 4,3 a 20,4 mg kg<sup>-1</sup> sob condições sem fertilização e de 14,8 a 42,5 mg kg<sup>-1</sup> com a aplicação de Zn, concluindo que a escolha da cultivar e as condições de cultivo afetam o teor de Zn, portanto, ambos devem ser levados em consideração em projetos de biofortificação.

Em couve, Barrameda-Medina et al. (2017b) observaram que a produção de biomassa não foi afetada, ao passo que o teor aumentou de 59 para 465 µg g<sup>-1</sup> nas plantas cultivadas sob concentrações de 10 a 100 µmol L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, respectivamente. Barrameda-Medina et al. (2017a) constataram aumento no teor de Zn nas folhas, na produção de biomassa e concluíram que a biofortificação agrônômica com Zn favoreceu o metabolismo do nitrogênio em alface.

Para determinar o teor limite de Zn na parte aérea de folhosas, White et al. (2018) estudaram cinco genótipos de repolho e quatro de brócolis. Para os genótipos de repolho aplicaram-se cinco concentrações crescentes em substrato, variando de 0,075 até 3000 mg L<sup>-1</sup> de Zn, para brócolis as concentrações foram de 0,15 até 450 mg L<sup>-1</sup> de Zn, ambos via nitrato de zinco. O aumento da concentração de Zn foi linear para todos os genótipos e a concentração crítica, aquela em que a massa seca é reduzida para menos de 90% do máximo valor observado (White e Broadley 2011),

variou de 0,074 a 1,201 mg Zn g<sup>-1</sup> de massa seca entre os genótipos de repolho e de 0,117 a 1,666 mg Zn g<sup>-1</sup> de massa seca entre os genótipos de brócolis. As maiores concentrações excederam valores estimados por White e Broadley (2011) quanto ao potencial de absorção do Zn por hortaliças folhosas, o que sustenta a hipótese de que elas podem alcançar maiores concentrações deste nutriente em comparação com grãos, raízes ou tubérculos.

Visando biofortificar rúcula com aplicações foliares de Zn, Rugeles-Reyes et al. (2019) observaram que 1,5 e 1,0 kg ha<sup>-1</sup> aplicados aos 25 dias após a emergência resultaram em teores nas folhas de 246,5 e 209,4 mg Zn kg<sup>-1</sup>. Estes valores representaram aumento de 279 e 222 %, respectivamente, em relação aos teores das plantas que não receberam aplicações de Zn.

Fontes et al. (2014) estudaram aplicações no solo de 0, 4, 12, 36 e 72 kg ha<sup>-1</sup> de Zn (sulfato de zinco) no cultivo das alfaces cv. Mimosa e Regina Verão, pertencentes aos tipos varietais mimosa e lisa, respectivamente. Os autores observaram que, mesmo com concentrações aplicadas de Zn muito maiores que a recomendada de 3 kg ha<sup>-1</sup> para o local do cultivo (Fontes, 1999), não houve efeito sobre a produtividade em comparação com as concentrações mais baixas em ambas as cultivares. Essa observação sugere que a alface está entre as espécies de plantas que toleram altas concentrações de Zn (Clemens 2017). Por outro lado, as maiores concentrações de Zn no solo resultaram em maiores teores de Zn nas folhas de ambas as cultivares, especialmente as mais velhas, alcançando valores acima de 1000 µg g<sup>-1</sup>.

No Brasil são escassos os estudos com biofortificação agrônômica com Zn em alface. Visto que a maioria dos trabalhos são internacionais e com cultivares que não fazem parte do mercado brasileiro, evidencia-se a necessidade de mais estudos neste sentido, visando um efetivo programa de biofortificação agrônômica.

## **2.5 Tolerância das plantas ao zinco**

Embora as quantidades de Zn em alguns solos sejam suficientes para suprir as necessidades das culturas (Graham et al., 1999), a absorção pelas plantas é muitas vezes limitada pela disponibilidade do nutriente e aquisição pelas raízes (Broadley et al. 2007, White e Broadley 2009).

Quando aplicado em maior quantidade, os tecidos das raízes apresentam concentrações de Zn mais elevadas em relação aos tecidos da parte aérea devido à regulação genética de absorção e transporte desse micronutriente, entre outros fatores (Gupta et al. 2016). Dessa forma o acúmulo

nas plantas e a produtividade são limitadas pela toxicidade do Zn nas células das raízes sob estas condições. As concentrações limites de Zn na folha para a maioria das plantas situam-se entre 100 e 700 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca (Fageria 2009).

Os sintomas de toxicidade de Zn compreendem baixa produtividade, crescimento lento, clorose induzida por deficiência de Fe através de reduções na síntese de clorofila e degradação de cloroplasto, interferência na absorção de P, Mg e Mn (Chaney 1993). A suscetibilidade à toxidez do Zn difere entre as culturas, em solos ácidos as gramíneas geralmente são menos sensíveis à toxicidade em comparação com as dicotiledôneas (Chaney 1993). Entre as dicotiledôneas, as hortaliças folhosas são mais sensíveis, especialmente das famílias Brassicaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae, devido à sua elevada capacidade de absorção desse nutriente (Chaney 1993). Por outro lado, observou-se em estudos com biofortificação que essas hortaliças toleram altas concentrações de Zn nas folhas, com valores de 259 (Padash et al. 2016) e 1000 mg Zn kg de massa seca (Fontes et al. 2014) em alface e 465 mg Zn kg (Barrameda-Medina et al. 2017b) em couve.

Alguns estudos também sugerem que em situações de estresse a planta produz compostos envolvidos no transporte do elemento via xilema e, conseqüentemente, ocorre a desintoxicação no citoplasma e vacúolo (Küpper et al. 2000, Assunção et al. 2003). Entre estes compostos estão os ácidos orgânicos, que agem como quelatos para sequestrar Zn da célula (Haydon e Cobbett 2007). Dessa forma ocorre o equilíbrio na translocação e acúmulo do nutriente, garantindo distribuição do Zn na planta e desintoxicação (Barrameda-Medina et al. 2014b). Um estudo revelou que a couve sob condições de toxicidade de Zn, foi mais tolerante que alface por apresentar eficiência na distribuição do elemento, o que resultou em maior concentração do nutriente nas folhas sem redução da biomassa (Barrameda-Medina et al. 2014b).

## **2.6 Zinco e metabolismo antioxidante**

O Zn desempenha um papel fundamental na célula da planta, como o metabolismo das proteínas, a expressão gênica, a integridade estrutural e funcional das biomembranas e o metabolismo fotossintético C (Marschner, 1995). Sua deficiência ou toxicidade pode causar níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas e danos relevantes para plantas (Marschner, 1995; Cakmak, 2000).

As EROs são inevitavelmente formadas em eventos metabólicos como subprodutos de reações redox do oxigênio molecular, principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Karuppanapandian et al. 2011). Essas moléculas podem ser geradas como resultado de excitação, formando oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ou de sucessivas adições de elétrons ao  $\text{O}_2$ , reduzindo-o ao radical aniônico superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (Bhattacharjee 2010).

Estudos demonstraram que as EROs desempenham um papel importante no processo de desenvolvimento da planta e estão envolvidas nas respostas intracelulares, moleculares, bioquímicas e fisiológicas (Pan e Du 2017). No entanto, estes oxidantes são fortemente reativos e podem causar peroxidação lipídica na membrana da célula e até sua morte (Gechev et al. 2005, Ryter et al. 2007). Sendo assim, é conhecido que as EROs são responsáveis por danos induzidos pelo estresse e precisam ser eliminadas para a manutenção do crescimento normal da planta (Pan e Du 2017).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma ERO cujo pequeno tamanho permite-lhe atravessar membranas celulares e migrar para compartimentos diferentes, dessa forma, os danos se difundem na célula. Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  participa da reação formadora de  $\text{OH}^{\cdot}$ , o oxidante mais reativo na família das EROs. (Karuppanapandian et al. 2011).

O acúmulo excessivo de Zn pode ser tóxico às plantas e induzir a produção anormal de EROs, responsáveis pelo estresse oxidativo, causando peroxidação lipídica e morte celular (Mourato et al. 2012, Barrameda-Medina et al. 2014, Alonso-Blázquez et al. 2015). Sofo et al. (2018) observaram que os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA (indicativo da peroxidação lipídica) foram maiores em plantas de alface submetidas à solução com maior concentração de Zn. Por outro lado, a menor concentração não foi suficiente para causar estresse oxidativo.

Entretanto, a própria planta forma um sistema de defesa antioxidante para controlar o nível de EROs, incluindo enzimas antioxidantes e sistemas não enzimáticos (Sharma et al., 2007). As principais enzimas na atividade antioxidante de uma planta são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidase (GPX) (Foyer et al., 2005).

A SOD é a primeira enzima antioxidante na linha de defesa contra efeitos tóxicos de EROs, catalisando a reação de dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio molecular. (Cakmak 2000). A CAT é uma das principais enzimas na eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Atua nos peroxissomos e glioxissomos e

pode ser encontrada também em mitocôndrias. Ela e APX convertem moléculas de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e oxigênio molecular (Dubey 2011). O equilíbrio entre as atividades de SOD e APX ou CAT é fundamental para determinar o nível de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio, bem como ocorrer a desintoxicação (Mittler 2002).

Segundo Pan e Du (2017), a estrutura das enzimas antioxidantes contém um metal correspondente, sendo assim, o processo antioxidante requer a participação de alguns íons metálicos. Por exemplo, cobre, zinco, ferro e manganês são componentes de Cu / Zn-SOD, Fe-SOD e Mn-SOD (Sandalio et al. 1987). Dessa forma, a quantidade destes elementos metálicos afeta as atividades enzimáticas, bem como a capacidade antioxidante da planta e, conseqüentemente, altera o conteúdo das EROs (Pan e Du 2017). Em estudo com diferentes concentrações de Cu e Zn no solo, Haghghi e Silva (2016) observaram que, na data da colheita, a atividade de SOD em alface aumentou conforme doses crescentes de Cu e Zn no solo (50; 100; e 150 mg kg<sup>-1</sup> de solo).

Através da atividade antioxidante, o Zn pode reduzir efeitos de condições abióticas e bióticas que causam estresse na planta, como salinidade do solo e infecção por patógenos (Weisany et al. 2012, Sida-Arreola et al. 2017). Em soja, Weisany et al. (2012) constataram que sob três níveis de salinidade, a peroxidação lipídica nas plantas foi menor quando as plantas receberam Zn na adubação, além disso, a concentração de  $H_2O_2$  nessas plantas decresceu em aproximadamente 50 % em todos os níveis de salinidade. Em feijão, Sida-Arreola et al. (2017) aplicaram três doses de Zn visando a biofortificação agrônômica e observaram que a aplicação do Zn, além de melhorar a qualidade nutricional, aumentou a capacidade antioxidante da planta.

Conforme o exposto, sabe-se que o Zn é um importante componente para a atividade antioxidante e, conseqüentemente, resistência da planta a condições de estresse. Por outro lado, o excesso na planta pode causar toxidez e maior produção de EROs. Para alface, pouca informação está disponível sobre os efeitos do Zn no metabolismo das EROs e na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas. Este conhecimento pode fornecer informações importantes para o manejo da adubação e biofortificação agrônômica com Zn.

### 3 REFERÊNCIAS

Alloway, B. J. Zinc in soils and crop nutrition. (2008). Brussels: IZA Publications, International Zinc Association.

Almeida, H. J., Dutra, A. F., Cecílio Filho, A.B. (2016). Biofortificação de hortaliças e saúde global – um enfoque para selênio, zinco, ferro e iodo. In Prado, R.M.; Cecílio Filho, A.B. Nutrição e adubação de hortaliças (p. 103-150). Jaboticabal: FCAV/CAPES

Alonso-Blázquez, N., García-Gómez, C., Fernández, M. D. (2015). Influence of Zn-contaminated soils in the antioxidative defence system of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) at different exposure times: potential use as biomarkers. *Ecotoxicology*, 24, 279–291.

Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças - ABCSEM. (2014). 2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil. Disponível em: <[http://www.abcsem.com.br/imagens\\_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%2029MAIO2014.pdf](http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%2029MAIO2014.pdf)> Acessado em: 21 ago. 2019.

Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças - ABCSEM. (2016). O Mercado de Folhosas: Números e tendências. Disponível em:<<http://www.abcsem.com.br/noticias/3328/palestras-2-seminario-nacional-de-folhosas>> Acessado em: 21 ago. 2019.

Assunção, A. G. L., Schat, H., Aarts, M. G. M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.*, 159, 351–360.

Barrameda-Medina, Y., Blasco, B., Lentini, M., Esposito, S., Baenas, N., Moreno, D.A., Ruiz, J. M. (2017b). Zinc biofortification improves phytochemicals and amino-acidic profile in *Brassica oleracea* cv. Bronco. *Plant Science*, 258, 45–51.

Barrameda-Medina, Y., Lentini, M., Esposito, S., Ruiza, J. M., Blasco, B. (2017a) Zn-biofortification enhanced nitrogen metabolism and photorespiration process in green leafy vegetable *Lactuca sativa* L. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 1828–1836.

Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J. M. (2014). Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *PlantSci.*, 227, 110–121.

Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Ruiz, J. M., Blasco, B. (2014b). Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants: I. Growth, distribution, and accumulation of Zn, and metabolism of carboxylates. *Environ. Exp. Bot.*, 107, 98–104.

Bhattacharjee, S. (2010). Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: Gupta, S. D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants (p. 1-30). Enfield: Science Publishers.

Black, R. (2003). Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *Journal of Nutrition*, 133, 1485-1489.

Broadley, M. R., Lochlainn, S. O., Hammond, J. P., Bowen, H.C., Cakmak, I., Eker, S., Erdem, H., King, G. J., White, P. J. (2010). Shoot zinc (Zn) concentration varies widely within Brassicaoleracea L. and is affected by soil Zn and phosphorus (P) levels. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 85, 375–380.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.*, 173, 677–702.

Cakmak, I. and Kutman, U.B. (2019). Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science* this issue, 69, 172–180.

Cakmak, I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol*, 146: 185-205.

Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 302, 1–17.

Cakmak, I., Kalayci, M., Kaya, Y., Torun, A. A., Aydin, N., Wang, Y., Arisoy, Z., Erdem, H., Yazici, A., Gokmen, O., Ozturk, L., Horst, W. J. (2010). Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9092–9102.

Cappa, J. J. and Pilon-Smits, E. A. H. (2014). Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. *Planta*, 239, 267–275.

Chaney, R. L. (1993). Zinc phytotoxicity. In: Robson A. D. (Ed). *Zinc in soil and plants* (p. 135–150). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Clemens, S. (2017). How metal hyperaccumulating plants can advance Zn biofortification. *Plant Soil*, 411, 111–120.

Department of Health (UK). (1991). Report on Health and Social Subjects 41. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients. London: HMSO.

Dubey, R. S. (2011). Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: Gupta, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants (p. 178-203). Enfield: Science Publishers.

Dufault, R. J., Ward, B., Hassell, R. L. (2009). Dynamic relationships between field temperatures and romaine lettuce yield and head quality. *Sci. Hortic.* 120, 452-459.

- Fageria, N. K. (2009). *The Use of Nutrients in Crop Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fageria, N. K. and Stone, L. F. (2007). Micronutrient deficiencies in crops in South America. In Alloway, B. J. (Ed), *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production* (p. 245-266). Dordrecht: Springer.
- Ferreira, R. L. F., Alves, A. S. S. C., Araújo Neto, S. E., Kusdra, J. F., Rezende, M. I. F. L. (2014). Produção orgânica de alface em diferentes épocas de cultivo e sistemas de preparo e cobertura de solo. *Bioscience Journal*, 30,1017-1023.
- Fontes, P. C. R. (1999). Sugestões para adubação para hortaliças em Minas Gerais. Alface. In: Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., Alvarez, V. V. H. (Eds), *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes para Minas Gerais* (p. 171-177). 5a Aproximação. Viçosa: CFSEMG.
- Fontes, R. L. F., Pereira, J. M. N., Neves, J. C. L. (2014). Uptake and translocation of Cd and Zn in two lettuce cultivars. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 907-922.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Gechev, T. and Hille, J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Cell Biol.*, 168, 17-20.
- Graham, R. D., Welch, R. M., Sounders, D. A., Ortiz-Monasterio, I., Bouis, H. E., Bonierbale, M., De Haan, S., Burgos, G., Thiele, G., Liria, R., Meis-Ner, C. A., Beebe, S. E., Potts, M. J., Kadian, M., Hobbs, P. R., Gupta, R. K., Twomlow, S. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Advantages in Agronomy*, 26, 1-74.
- Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89–109.
- Haghighi, M. and Silva, J. A. T. (2016). Application of Biosolids to Soil Affects Cu and Zn Accumulation and Antioxidant Activity of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 39, 252-260.
- Haydon, M. J., Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *NewPhytol.*, 174, 499–506.
- Henderson, L., Irving, K., Gregory, J., Bates, C. J., Prentice, A., Perks, J., Swan, G., Farron, M. (2003). *The National Diet and Nutrition Survey: Adults Aged 19 -64 Years. Volume 3: Vitamin and Mineral Intake and Urinary Analysis*. Her Majesty's Stationery Office (HMSO), London,UK.
- Hotz, C. and Brown, K. H. (eds.). (2004). Assessment of the risk of zink deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin*, 25, S91-S204.

Hunt, J. R. (2003). Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *Am J Clin Nutr.*, 78, 633S–639S.

Institute of Medicine (USA). (2001). *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, (Arsenic), Boron, Chromium, Cooper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington, D C: National Academies Press.

Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.*, 5, 709–725.

Kiekens, L. (1995). Zinc. In: Alloway, B. J. (ed.), *Heavy Metals in Soils* (p. 284–303). London: Chapman e Hall.

Kosma, C., Triantafyllidis, V., Pappasavvas, A., Salahas, G., Patakas, A. (2013). Yield and nutritional quality of greenhouse lettuce as affected by shading and cultivation season. *Emir. J. Food Agric.*, 25, 974-979.

Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F. J., McGrath, S. P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212, 75–84.

Lindsay, W. L. (1972). Zinc in Soils and Plant Nutrition. *Advantages in Agronomy*, 24, 147-186.

Mampholo, B. M., Maboko, M. M., Soundy, P., Sivakumar, D. (2016). Phytochemicals and overall quality of leafy lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties grown in closed hydroponic system. *J. Food Qual.*, 39, 805–815.

Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Orlando: Academic Press.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7, 405–410.

Mourato, M., Reis, R., Martins, L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity, in: G. Montanaro, B. Dichio (Eds.), *Advances in Selected Plant Physiology Aspects* (p. 23–44). Rijeka, Croatia: InTech.

Padash, A., Shahabivand, S., Behtash, F., Aghae, A. (2016). A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Scientia Horticulturae*, 213, 367–372.

Pesquisas de Orçamentos Familiares – POF. (2008). Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. 2008-2009. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>> Acessado em: 10 jul. 2019.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F., Colla, G. (2012). Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *J. Food Agric. Environ.*, 10, 680–688.

Rouphael, Y., Kyriacou, M. C., Vitaglione, P., Giordano, M., Pannico, A., Colantuono, A., De Pascale, S. (2017). Genotypic variation in nutritional and antioxidant profile among iceberg lettuce cultivars. *Acta Scie. Polon. Hort. Cult.*, 16, 37–45.

Rugeles-Reyes, S. M., Cecílio Filho, A. B., Aguilar, M. A. L., Silva, P. H. S. (2019). Foliar application of zinc in the agronomic biofortification of arugula. *Food Sci. Technol*, Ahead of Print.

Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A. M. K. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox. Sign.*, 9, 49-89.

Sala, F. C., Costa, C. P. (2008). 'Gloriosa': Cultivar de alface americana tropicalizada. *Horticultura Brasileira*, 26, 409-410.

Sala, F. C., Costa, C. P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 30, 187-194.

Sandalio, L. M., Palma, J. M., Del Río L. A. (1987). Localization of manganese-superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci.*, 51, 1-8.

Sharma, P., Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedling exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.*, 26, 2027-2038.

Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Ávila-Quezada, G. D., Flores-Córdova, M. A., Márquez-Quiroz, C., Preciado-Rangel, P. (2017). Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans? *Emir. J. Food Agric.* 29, 237–242.

Sofo, A., Moreira, I., Gattullo, C. E., Martins, L. L., Mourato, M. (2018). Antioxidant responses of edible and model plant species subjected to subtoxic zinc concentrations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 261-268.

Sönmez, I., Kalkan, H., Demir, H., Külcü, R., Yaldiz, O., Kaplan, M. (2017). Mineral composition and quality parameters of greenhouse grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) depending on fertilization with agricultural waste composts. *Acta Sci Polonorum Hortorum*, 16, 85–95.

Tudela, J. A., Hernández, N., Pérez-Vicente, A., Gil, M. I. (2017). Growing season climates affect quality of fresh-cut lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 123, 60–68.

Van Der Ent, A., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Pollard, A. J., Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil*, 362, 319–334.

- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., Ghassemi-Golezani, K. (2012). Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Omics*, 5, 60-67.
- Welch, R. M., Graham, R. D. (2000). A new paradigm for world agriculture: productive, sustainable, nutritious, health fulfood systems. *Food and Nutr. Bulletin*, 21, 261-366.
- Welch, R. M., Graham, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J Exp Bot*, 55, 353–364.
- White, J. G. and Zasoski, R. J. (1999). Mapping soil micronutrients. *Field Crop Res.*, 60:11–26.
- White, P. J. and Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - Iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.*, 182, 49–84.
- White, P. J. and Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-11.
- White, P. J. and Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.*, 105, 1073-1080.
- White, P. J., Pongrac, P., Sneddon, C. C., Thompson, J. A., Wright, G. (2018). Limits to the biofortification of leafy Brassicas with zinc. *Agriculture*, 32, 2-14.
- World Health Organization (WHO). (2013). Urinary iodine concentrations for determining iodine status in populations. WHO/NMH/NHD/EPG/13.1.
- Yuri, J. E., Mota, J. H., Souza, R. J. de, Resende, G. M. de; Freitas, S. A. C. de; Rodrigues Júnior, J. C. (2002). *Alface americana: cultivo comercial*. Lavras> UFLA.

## **CAPÍTULO 1**

### **Biofortificação agronômica de alface com zinco sob condições tropicais**

## Biofortificação agronômica de alface com zinco sob condições tropicais

### Resumo

A baixa ingestão de zinco (Zn) causa severos problemas de saúde, inclusive podendo levar a morte. A alface é a principal hortaliça folhosa no mundo e tem potencial para mitigar este problema, pois pode absorver grandes quantidades do elemento. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de doses de Zn em solo, na produção e acúmulo de Zn em alfaces em duas épocas de cultivo sob condições tropicais. Os tratamentos foram 0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> e duas épocas de cultivo, março a abril (E1) e maio a julho (E2) de 2018. Em experimentos independentes, utilizou-se as cvs. de alface Vanda (tipo crespa) e Saladela (tipo romana crocante). Houve redução da massa seca das plantas em função das doses crescentes de Zn em ambas as cultivares. O acúmulo de Zn pelas folhas da Vanda aumentou 8,9 vezes com o aumento das doses, chegando a 7,0 mg planta<sup>-1</sup>, independentemente da época, enquanto para Saladela, o aumento foi de 11 e 8 vezes na E1 e E2, respectivamente, com valores máximos de 10,6 e 12,3 mg planta<sup>-1</sup>. O uso de maiores doses de Zn não reduziu a produtividade de Vanda, mas para Saladela, houve redução em ambas as épocas. A biofortificação agronômica de alface foi possível e mais adequada com a dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, em ambas as épocas de cultivo para Vanda e 35 e 12 mg Zn dm<sup>-3</sup> na E1 e E2, respectivamente, para Saladela. O consumo de 50 g dessas plantas biofortificadas dentro do limite permitido de Zn nos alimentos, pode contribuir com até 20 % na sua ingestão diária recomendada.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*, biofortificação agronômica, zinco, nutrição de plantas, micronutrientes, acúmulo de Zn, segurança alimentar.

## Agronomic biofortification of lettuce with zinc under tropical conditions

### Abstract

Low zinc intake causes severe health problems, including death. However, lettuce is the main leafy vegetable in the world and has the potential to alleviate this problem as it can absorb large amounts of zinc. In order to evaluate the Zn accumulation in lettuce and biomass production of lettuces, Zn doses 0, 5, 10, 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> were applied to the soil in two growing seasons, from March to April (S1) and May to July (S2) 2018, under tropical conditions. It was carried out in two independent experiments for lettuce varieties Vanda (curly type) and Saladela (crispy roman type). There was a reduction in plant dry matter as a function of increasing zinc doses for both varieties. However, zinc accumulation by Vanda leaves increased 8.9 times, reaching 7.0 mg Zn plant<sup>-1</sup>, regardless of season. For Saladela, the increase was 11 and 8 times in S1 and S2, respectively, reaching 10.6 and 12.3 mg Zn plant<sup>-1</sup>. The use of higher zinc doses did not reduce the yield of Vanda, but for Saladela, there was a reduction in both seasons. Agronomic biofortification with Zn in tropical conditions was possible for lettuce and the most appropriate occurred at doses of 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, in both growing seasons for Vanda and 35 and 12 mg Zn dm<sup>-3</sup> in S1 and S2, respectively, for Saladela. The consumption of 50 g of these biofortified plants within the allowed limit of Zn in food, can contribute up to 20% in its recommended daily intake.

**Keywords:** *Lactuca sativa*, agronomic biofortification, plant nutrition, micronutrients, zinc accumulation, food security.

## Introdução

A deficiência de zinco (Zn) em seres humanos prevalece nos países de baixa e média renda e provoca diversos problemas de saúde. Cerca de 800.000 mortes por ano no mundo entre crianças menores de cinco anos podem estar associadas à essa deficiência (World Health Organization - WHO 2013).

A baixa ingestão do Zn ocorre em decorrência dos baixos teores deste nutriente nos alimentos, como consequência dos baixos teores disponíveis nos solos. Foi constatado deficiência de Zn em solos principalmente da Ásia, África e América do Sul. No Brasil, isso ocorre na região do Cerrado e na costa do Atlântico (Cakmak et al. 2010).

Uma estratégia para combater este problema é aplicação de fertilizantes com Zn no solo visando o enriquecimento deste elemento nos alimentos. Esta prática, denominada biofortificação agrônômica, além de suprir exigências nutricionais pelas pessoas, pode aumentar a produtividade das culturas em solos deficientes (White e Brown 2010, Almeida et al. 2016).

A biofortificação agrônômica com Zn tem sido estudada principalmente em grãos e cereais, uma vez que estas culturas representam a maioria das calorias consumidas, especialmente em países em desenvolvimento. No entanto, Clemens (2017) sugere que uma estratégia complementar seria a biofortificação de hortaliças folhosas, pois estas contêm mais Zn do que os cereais especialmente as espécies das famílias Brassicaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae (Broadley et al. 2007, White e Broadley, 2011). Embora o consumo de hortaliças folhosas seja proporcionalmente menor na dieta humana em relação a cereais, ressalta-se que elas têm grande potencial para acumular Zn e devem ser exploradas para mitigar a baixa ingestão deste micronutriente e melhorar a saúde humana (White et al. 2018).

Há poucos trabalhos sobre biofortificação agrônômica com Zn em folhosas (Broadley et al. 2010, Padash et al. 2016, Barrameda-Medina et al. 2017a, Barrameda-Medina et al. 2017b, White et al. 2018). Broadley et al. (2010) caracterizaram 270 acessos de *Brassica oleracea* L. e observaram que os teores de Zn na parte aérea variaram de 4,3 a 20,4 mg kg<sup>-1</sup> sem fertilização e de 14,8 a 42,5 mg kg<sup>-1</sup> com a aplicação de 5 mg Zn kg<sup>-1</sup>. Segundo os autores, a escolha da cultivar e as condições de cultivo afetam o teor desse nutriente e ambos devem ser levados em consideração em projetos de biofortificação. Em couve, Barrameda-Medina et al. (2017b) observaram que a produção de biomassa não foi afetada pelas concentrações de Zn, ao passo que o teor deste

micronutriente aumentou em 687% ( $465 \mu\text{g g}^{-1}$ ) nas plantas cultivadas sob a maior concentração ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

A alface é a hortaliça folhosa mais produzida e consumida no Brasil e no mundo, com diversos tipos varietais (Sala e Costa, 2012), além disso, é uma das espécies mais eficientes na absorção de metais (Clemens 2017). Porém sua composição mineral, produtividade e qualidade do produto são influenciadas pelas condições climáticas (Kosma et al. 2013). Embora possa ser cultivada o ano todo, a alface se adapta melhor sob temperaturas médias entre 15 e 18 °C e máximas entre 21 e 24 °C (Filgueira 2013). As plantas cultivadas sob elevadas temperaturas podem apresentar o ciclo de cultivo mais curto, menor produção de biomassa e pendoamento precoce, o que reflete na qualidade do produto (Dufault et al. 2009, Sala e Costa 2012). Sendo assim, as práticas de manejo de nutrição das plantas devem ser diferenciadas e adequadas para cada condição climática.

É escassa a informação sobre biofortificação agrônômica com Zn em alface, especialmente em condições tropicais. Portanto, pesquisa nesse sentido se faz necessária para avaliar o desempenho da planta sob doses crescentes desse nutriente no solo em diferentes épocas de cultivo.

A fim de incrementar os teores de Zn nas folhas, foi testada a hipótese de que o aumento da aplicação de Zn no solo pode ser uma estratégia eficiente para biofortificar a alface. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de doses de Zn em solo, na produção e acúmulo do nutriente em alfaves em duas épocas de cultivo sob condições tropicais.

## **Material e Métodos**

### **Condições de cultivo e delineamento experimental**

Os experimentos foram conduzidos em ambiente protegido, em Campinas, Estado de São Paulo ( $22^{\circ}54'20''$  Sul e  $47^{\circ}05'34''$  Oeste, altitude 674,0 m). O clima regional é tropical de altitude, tipo Cwa, segundo classificação de Köppen.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos foram doses de Zn, (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn  $\text{dm}^{-3}$ ) na forma de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), e duas épocas de cultivo, março a abril de 2018 (Época 1, E1) e maio a julho de 2018 (Época 2, E2). Os blocos experimentais foram compostos por quatro linhas cultivo, com espaçamento de 30 x 30 cm, sendo consideradas como parcelas úteis as plantas das

duas linhas centrais. Realizaram-se experimentos independentes para as cultivares Vanda e Saladela.

### **Procedimentos experimentais**

Um *datalogger*, modelo CR1000 (Campbell), posicionado a 1,5 m de altura no centro do ambiente protegido, coletou dados de temperatura (°C) e umidade relativa (%) do ar, máxima, média e mínima, durante a realização dos experimentos.

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico Típico (Embrapa 2006). A análise química do solo revelou os seguintes resultados: M.O = 9 g dm<sup>-3</sup>; pH = 5,5; P = 25 mg dm<sup>-3</sup>; K = 1,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 19 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg 6 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 12 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC = 38,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 26,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V = 69%; S = 4 mg dm<sup>-3</sup>; B = 0,14 mg dm<sup>-3</sup>; Cu = 0,4 mg dm<sup>-3</sup>; Fe = 16 mg dm<sup>-3</sup>; Mn = 3,6 mg dm<sup>-3</sup> e Zn = 0,6 mg dm<sup>-3</sup> (Raij et al. 2001).

Para cada época o solo foi peneirado em malha de 5 mm e seco ao ar. Posteriormente 3440 g foram pesados para preencher 2500 cm<sup>3</sup> em cada vaso de polietileno com capacidade de 3000 cm<sup>3</sup>. Este volume de solo foi acondicionado em sacos plásticos, onde aplicou-se 2,4 g de superfosfato simples e 0,6 g de calcário para elevar a saturação por bases a 80%. O solo foi incubado por 20 dias com umidade em 80 % da capacidade de campo.

As quantidades de sulfato de Zn referentes aos tratamentos foram diluídas em 160 ml de água e aplicadas no solo contido nos sacos plásticos, com posterior homogeneização do fertilizante e acondicionado nos vasos, que continham uma camada de 2 cm de pedrisco no fundo para facilitar a drenagem. O solo foi incubado por mais 15 dias com umidade a 80 % da capacidade de campo antes do transplante das mudas.

Em seguida, mudas com 3 a 4 folhas verdadeiras das variedades de alface Vanda, do tipo crespa, e Saladela, do tipo romana crocante, cultivadas em substrato a base de fibra de coco, foram transplantadas para os vasos em 7 de março de 2018 para E1 e 29 de maio de 2018 para E2.

Em ambas as épocas as plantas foram fertilizadas com nitrato de potássio, nitrato de cálcio, nitrato de amônio, monoamônio fosfato e ácido bórico via fertirrigação três vezes por semana (Trani et al. 2018). As quantidades totais para todo o ciclo de cultivo foram de, respectivamente, 4,0; 1,0; 3,3; 0,5 e 0,1 g por vaso.

Monitorou-se semanalmente o pH da água para irrigação e solução nutritiva, o qual foi mantido em 6. A cada duas linhas de cultivo havia uma linha gotejadora, com tubos e emissores (espaguete) para a irrigação por gotejamento (vazão de 2,4 L h<sup>-1</sup>). O total de água aplicada no cultivo das plantas para a área de 55 m<sup>2</sup> do experimento foi de 2670 L na E1 e 2690 L na E2.

### **Características avaliadas**

A colheita ocorreu simultaneamente nos experimentos independentes de Vanda e Saladela, aos 30 dias após o transplante (DAT) no E1 e aos 41 DAT no E2. Após a colheita avaliou-se o comprimento do caule (cm) e massa fresca (g) comercial de 2 plantas por parcela, posteriormente, as plantas, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de 60 °C até massa constante para determinação da massa seca (g) das folhas e da raiz.

Em seguida, o material seco foi triturado em moinho tipo Wiley e determinou-se o teor de Zn por meio de digestão nítrico perclórico e leitura em espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP – OES).

O acúmulo de Zn foi determinado pelo produto entre o teor dele no tecido vegetal e a quantidade de massa seca da parte correspondente (mg planta<sup>-1</sup>).

Com base nas quantidades acumuladas e na massa fresca (MF) das folhas estimou-se a contribuição da alface biofortificada na recomendação de ingestão diária de 10 mg de Zn (Institute of Medicine – USA 2001, Department of Health – UK 1991). Para isso, se estabeleceu um consumo de 50 g de MF das folhas das cultivares e determinou-se a quantidade de Zn nesta porção.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através da análise de variância e por meio do teste F. Para as doses de Zn, regressões polinomiais linear, quadrática e cúbica e a não linear sigmoideal foram aplicadas através do programa estatístico SigmaPlot, para ajustar os dados de produção de massa fresca, seca e acúmulo de Zn. Para as épocas de cultivo, foi aplicado o teste de Tukey (5%) para comparar as médias dos tratamentos.

## Resultados

### Condições climáticas

Durante a E1 as médias das temperaturas máximas, médias e mínimas foram de 33,5; 25,3 e 20,2 °C e as da umidade relativa do ar foram de 86,4; 65,6 e 34,6 %. Durante a E2 a temperatura e a umidade relativa do ar foram mais baixas, com médias das máximas, médias e mínimas de 28,8; 20,5 e 14,9 °C e 79,8; 57,9 e 30,3 %, respectivamente.

### Características produtivas

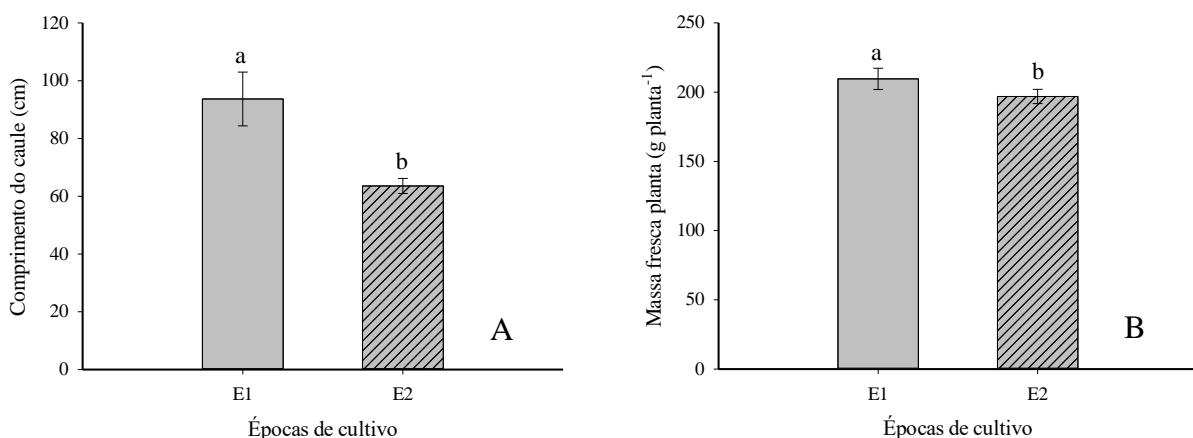
As doses de Zn influenciaram a produção de biomassa e o acúmulo de Zn nas folhas e raízes. As épocas (E1 e E2) influenciaram no comprimento do caule, massa fresca comercial, massa seca das folhas e raízes e acúmulo de Zn nas raízes das plantas de Vanda. Para Saladela houve interação significativa dos tratamentos para massa fresca comercial, massa seca das folhas e acúmulo de Zn nas folhas e raízes. Já o comprimento do caule foi influenciado isoladamente pela época e a produção de massa seca nas raízes, por ambos os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Níveis de significância de acordo com ANOVA para comprimento do caule (CC), massa fresca da planta (MF), massa seca das folhas (MSF) e raízes (MSR), acúmulo de Zn nas folhas (ACF) e raízes (ACR) em função de doses de Zn no solo (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg dm<sup>-3</sup>) em duas épocas de cultivo.

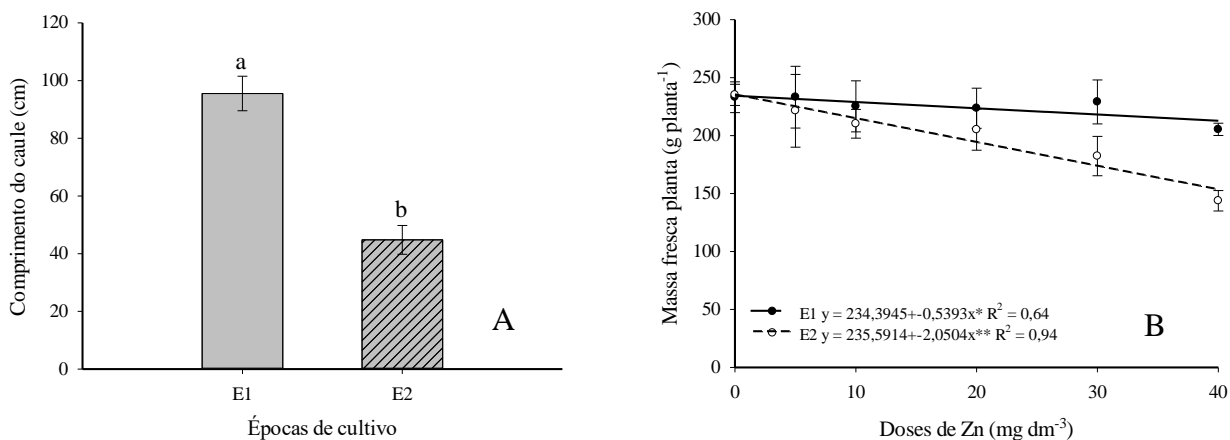
Vanda						
Fontes de variação	CC	MF	MSF	MSR	ACF	ACR
Doses Zn	ns	ns	< 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,001
Época	< 0,001	< 0,05	< 0,01	< 0,05	ns	< 0,001
Doses Zn x época	ns	ns	ns	ns	ns	< 0,05
Saladela						
Fontes de variação	CC	MF	MSF	MSR	ACF	ACR
Doses Zn	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001
Época	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,05	< 0,001	< 0,001
Doses Zn x época	ns	< 0,05	< 0,01	ns	< 0,001	< 0,001

O comprimento do caule foi maior na E1 em relação a E2, com valores observados de 94 e 64 cm para Vanda e 95 e 45 cm para Saladela, respectivamente (Figuras 1 e 2A). A massa fresca comercial, foi maior na E1 em comparação com E2, com valores de 210 e 197 g, respectivamente,

para Vanda (Figura 1B). Para Saladela, em ambas as épocas as massas frescas comerciais foram semelhantes na dose 0 mg Zn dm<sup>-3</sup>, com aproximadamente 234 g, no entanto, com o aumento das doses houve redução linear com maior intensidade na E2 em relação a E1. Na maior dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> observou-se, respectivamente, 144 e 205 g planta<sup>-1</sup> (Figura 2B).

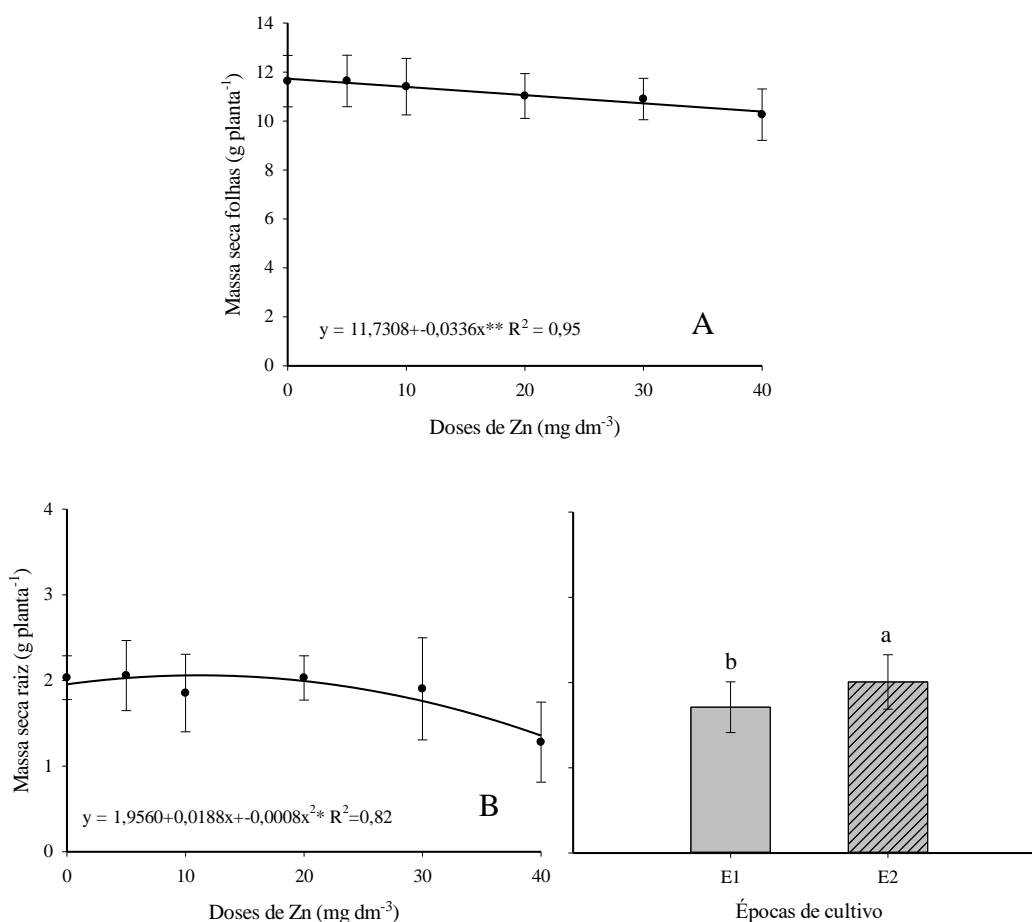


**Figura 1.** Comprimento do caule (A) e massa fresca comercial (B) da alface Vanda em função e de épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey.



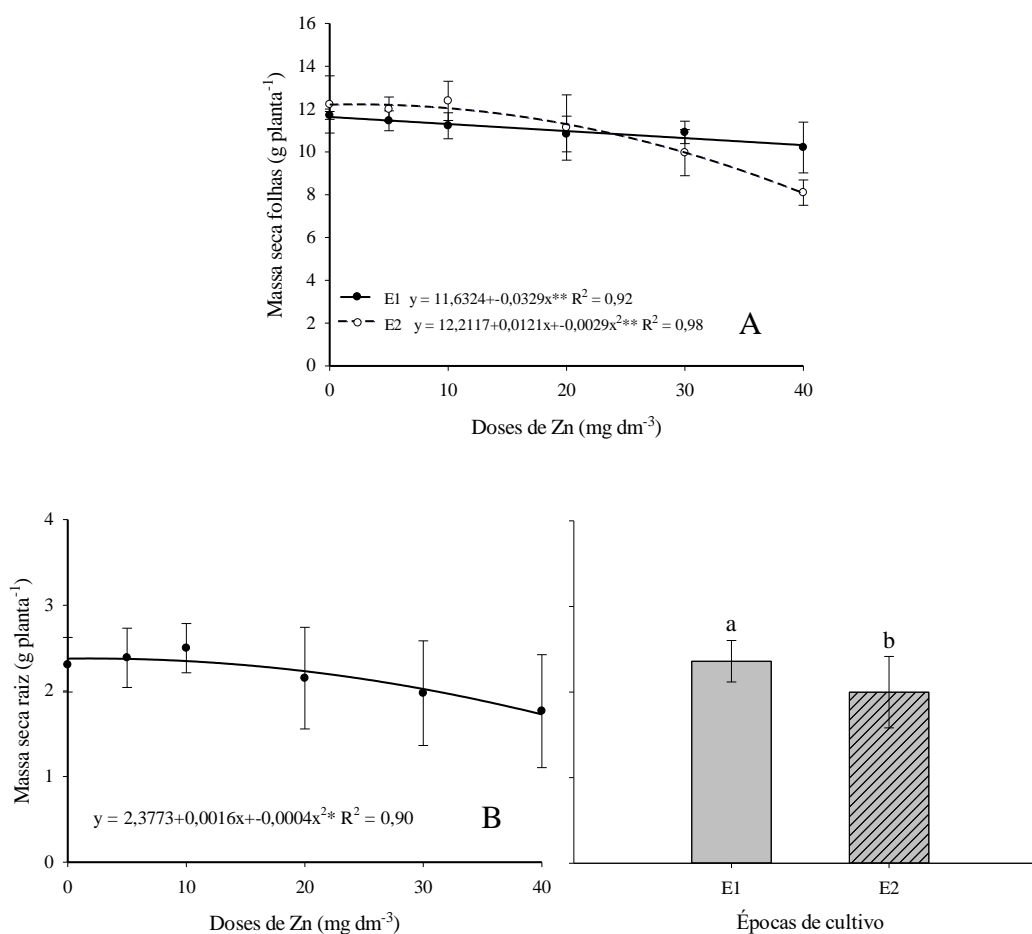
**Figura 2.** Comprimento do caule (A) e massa fresca comercial (B) da alface Saladela em função e de épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.

A produção de massa seca nas folhas reduziu em função do aumento das doses de Zn, independentemente da época, para Vanda. Foi observado nas doses extremas 11,6 e 10,3 g planta<sup>-1</sup> (Figura 3A). Para Saladela, na E1 a redução da massa seca foi linear de 11,7 na dose 0 para 10,2 g planta<sup>-1</sup> na dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Na E2 os dados se ajustaram a uma função quadrática, assim, o maior valor de 12,2 g planta<sup>-1</sup> foi observado na dose de 2 mg Zn dm<sup>-3</sup> e o menor de 8,1 g planta<sup>-1</sup> na dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Portanto, verificou-se que a redução da massa seca das folhas em função das doses foi mais expressiva na E2 (Figura 4A).



**Figura 3.** Massa seca das folhas (A) e raízes (B) da alface Vanda em função e doses de zinco e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.

A massa seca das raízes apresentou os maiores valores de 2,1 e 2,4 g planta<sup>-1</sup> nas doses 11 e 2 mg Zn dm<sup>-3</sup>, respectivamente para as plantas de Vanda e Saladela. Com o aumento das doses, houve redução de massa e os menores valores observados foram de 1,3 e 1,7 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente na dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>. A E1 resultou em menor média de massa seca de raiz para Vanda e maior para Saladela, com 1,7 e 2,4 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente. Na E2 os valores foram de, respectivamente, 2,0 e 1,9 g planta<sup>-1</sup> (Figuras 3 e 4B).

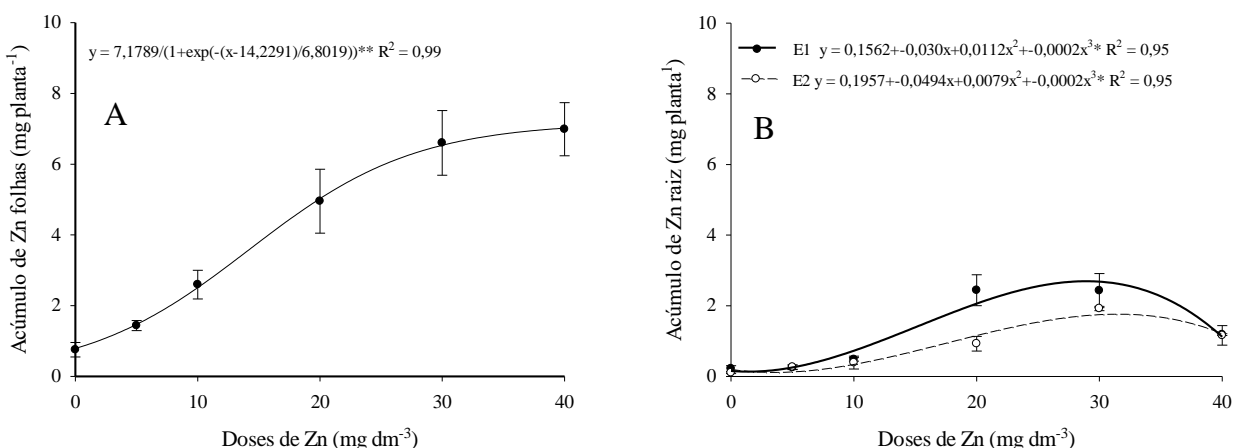


**Figura 4.** Massa seca das folhas (A) e raízes (B) da alface Saladela em função e doses de zinco e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste de Tukey. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.

## Acúmulo de Zinco

Somente as doses de Zn influenciaram no acúmulo deste nutriente nas folhas, enquanto nas raízes houve interação significativa entre as doses e as épocas para Vanda. Para Saladela, houve interação significativa entre os tratamentos tanto no acúmulo das folhas quanto da raiz (Tabela 1).

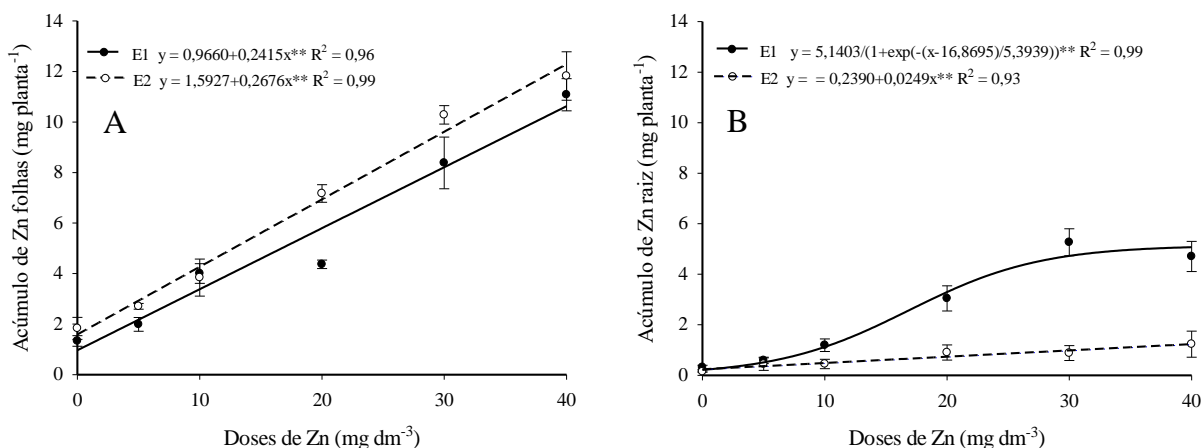
Independentemente da época, o acúmulo de Zn pelas folhas da Vanda aumentou 8,9 vezes em função do aumento das doses. Este aumento foi mais acentuado até a dose de 27 mg Zn dm<sup>-3</sup>, quando atingiu 6,3 mg planta<sup>-1</sup>. Posteriormente houve estabilização até a maior dose, com o valor estimado de 7,0 mg planta<sup>-1</sup> (Figura 5A). O acúmulo verificado nas raízes incrementou de 0,15 até 2,7 mg planta<sup>-1</sup> da menor dose até 29 mg Zn dm<sup>-3</sup> na E1, e de 0,19 até 1,7 mg planta<sup>-1</sup> até 32 mg planta<sup>-1</sup> na E2. Após este ponto, com o aumento das doses houve decréscimo do acúmulo nas raízes atingindo o mínimo de 1,2 mg planta<sup>-1</sup> com 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> em ambas as épocas (Figura 5B).



**Figura 5.** Acúmulo de Zn nas folhas (A) e raízes (B) da alface Vanda em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \* e \*\* significância da regressão em  $P < 0,1$  e  $P < 0,01$ , respectivamente.

No experimento realizado com a Saladela, o aumento das doses ocasionou aumento linear no acúmulo de Zn nas folhas da planta. Para E1, a variação foi de 0,9 a 10,6 mg planta<sup>-1</sup>, já na E2 foi de 1,6 a 12,3 mg planta<sup>-1</sup>, aumentando 11 e 8 vezes, respectivamente em cada época (Figura 6A). O incremento do acúmulo nas raízes na E1 foi pequeno até a dose de 6 mg Zn dm<sup>-3</sup>

(0,6 mg planta<sup>-1</sup>), a partir desse ponto o acúmulo se intensificou até atingir 4,5 mg planta<sup>-1</sup> com 28 mg Zn dm<sup>-3</sup> e posteriormente houve estabilização até a maior dose (5,1 mg planta<sup>-1</sup>). Na E2 o aumento foi linear, variando de 0,2 a 1,2 mg planta<sup>-1</sup>, entre as doses extremas. Na dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> as raízes da Saladela acumularam 4 vezes mais Zn na E1 em comparação com a E2 (Figura 6B).



**Figura 6.** Acúmulo de Zn nas folhas (A) e raízes (B) da alface Saladela em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

Considerando-se a estimativa da contribuição da alface biofortificada com Zn na recomendação de ingestão diária de 10 mg de Zn, observou-se que as quantidades de Zn na porção de 50 g obtidas no tratamento E2 foram maiores em relação ao E1, especialmente para Saladela nas doses de 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Comparando-se as plantas biofortificadas com as não biofortificadas (dose 0 mg Zn dm<sup>-3</sup>), constatou-se na E1 e E2 contribuição de até 17 e 18 % a mais na ingestão diária, respectivamente para Vanda enquanto Saladela pode contribuir com até 26 e 39 % na E1 e E2, respectivamente (Tabela 2).

No entanto, ressalta-se que a concentração máxima de Zn permitida em alimento fresco pela legislação brasileira de alimentos é de 50 mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca (ABIA 1991, Mesquita Filho et al. 2001). Considerando-se os acúmulos de Zn nas folhas, este limite foi ultrapassado quando as plantas de Saladela foram submetidas a doses maiores que 35 e 26 mg Zn dm<sup>-3</sup> nas E1 e E2, respectivamente.

**Tabela 2.** Quantidade de Zn em uma porção de 50 g de massa fresca (MF) de folhas das cultivares de alface Vanda e Saladela nas épocas de cultivo 1 (E1 - março a abril) e 2 (E2 – maio a julho) e a contribuição desta porção em porcentagem para a recomendação de ingestão diária de Zn.

Doses Zn	Zn em 50 g de MF		Recomendação diária de Zn <sup>1</sup>	
..... mg dm <sup>-3</sup> .....	..... mg .....		..... % .....	
<b>Vanda</b>				
	E1	E2	E1	E2
0	0,2	0,2	2	2
5	0,4	0,4	4	4
10	0,7	0,7	7	7
20	1,3	1,4	13	14
30	1,7	1,9	17	19
40	1,9	2,0	19	20
<b>Saladela</b>				
	E1	E2	E1	E2
0	0,2	0,4	2	4
5	0,5	0,7	5	7
10	0,8	1,1	8	11
20	1,4	1,9	14	19
30	2,1	2,9	21	29
40	2,8	4,3	28	43

<sup>1</sup> Recomendação de ingestão de 10 mg Zn dia<sup>-1</sup> (Institute of Medicine – USA, 2001; Department of Health – UK, 1991)

## Discussão

A alface, embora possa ser cultivada o ano todo, se adapta melhor sob temperaturas médias entre 15 e 18 °C e máximas entre 21 e 24 °C, apresentando maior produção nas épocas mais frias do ano em países tropicais. Temperaturas mais elevadas aceleram o ciclo de cultivo e podem resultar em plantas menores (Filgueira 2013). As temperaturas registradas durante a E2 foram mais adequadas para produção, resultando em maior média de massa seca de folhas e raízes nas plantas de Vanda. Já as condições de cultivo na E1 resultaram em maior média de massa seca de raiz nas plantas de Saladela. Além da época de cultivo, a variação na produtividade pode ocorrer também em função de cultivares (Oliveira et al. 2004).

As diferenças climáticas entre as épocas também influenciaram no crescimento, sendo que sob temperaturas mais altas na E1 o comprimento do caule foi maior para ambas as cultivares, enquanto o ciclo de cultivo foi mais curto em relação ao observado na E2.

O comprimento do caule é uma característica importante pois caules excessivamente longos prejudicam a comercialização da alface, bem como o beneficiamento, afetando a qualidade final do produto. Além disso, caules longos podem indicar o início do processo de florescimento da alface, fato que estimula a produção de látex e torna o sabor das plantas amargo, inviabilizando sua comercialização (Resende et al. 2005, Souza et al. 2008). As doses não influenciaram o comprimento do caule e, embora as épocas tenham influenciado, todas as plantas se mantiveram dentro do padrão comercial.

O aumento das doses de Zn aplicadas no solo reduziu a produção de massa seca das folhas e raízes em ambas as cultivares. Esse nutriente pode limitar o crescimento das plantas quando em falta ou excesso no solo, causando deficiência e toxicidade (Alloway 2008). Ainda, as hortaliças folhosas podem ser mais sensíveis à toxicidade do Zn devido à sua alta capacidade de absorção deste nutriente (Chaney 1993, Broadley et al. 2007).

Apesar da queda na produção de biomassa com o aumento das doses, o acúmulo de Zn observado nas folhas aumentou consideravelmente, indicando o potencial de absorção desse nutriente pela alface. Segundo Clemens (2017) plantas das famílias Brassicaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae podem apresentar predisposição genética para hiper acumular Zn. Por essa razão a alface é um alimento que deve ser explorado em programas de biofortificação.

Quando o Zn é fornecido às plantas via fertilização no solo, os teores nos tecidos vegetais decrescem na ordem raízes > folhas > frutos, sementes, uma vez que os órgãos de reserva obtêm a maioria de seus minerais através do floema, onde o Zn é pouco móvel (Broadley et al. 2012). Assim, a alface, por apresentar as folhas como a parte comestível, quando biofortificada pode apresentar maior quantidade do nutriente que os grãos e cereais.

O acúmulo de Zn nas raízes estabilizou ou caiu na maioria das vezes em função do aumento das doses, indicando que a queda da massa seca nas maiores doses foi mais significativa que a absorção do Zn. No entanto para Saladela na E2 há indicativos de que a maior absorção pelas raízes tenha sido mais significativa que a redução da massa seca. Embora na E2 o acúmulo de Zn tenha sido menor que na E1 para ambas as cultivares, não se observou esta diferença para o acúmulo nas folhas, sugerindo-se que houve maior transporte do nutriente da raiz para as folhas na E2.

A estabilização no acúmulo de Zn nas folhas da Vanda e contínuo aumento para Saladela, pode indicar regulação genética para absorção, transporte e distribuição do nutriente pois segundo Clemens (2017) há variação no acúmulo de Zn dentro das espécies. Broadley et al. (2010) caracterizaram 270 acessos de *Brassica oleracea* L. e observaram que os teores de Zn na parte aérea variaram de 14,8 a 42,5 mg kg<sup>-1</sup>, concluindo que tanto a escolha da cultivar quanto as condições de cultivo afetaram o teor e ambos devem ser levados em consideração em projetos de biofortificação.

A porcentagem de contribuição de Zn da alface biofortificada na recomendação de ingestão diária de 10 mg de Zn evidencia o potencial desta hortaliça para mitigar a deficiência do nutriente na população. Um dos motivos é que as hortaliças folhosas não contêm quantidades significativas de ácido fítico, que liga os metais aos compostos insolúveis, reduzindo sua absorção pelo trato gastrointestinal dos seres humanos (Hunt 2003), dessa forma praticamente todo o Zn acumulado pela alface pode estar prontamente biodisponível ao organismo humano (White et al. 2018).

Assim, a porção diária de 50 g de alface biofortificada pode contribuir mais que maiores porções de grãos e cereais, pois estes apresentam grandes quantidades de ácido fítico. Para trigo, Chatta et al. (2017) constataram que três cultivares biofortificadas com aplicação de sulfato de zinco apresentaram entre 4,0 e 5,6 mg de Zn em 100 g de grãos, porém nesta mesma porção havia entre 911 e 1090 mg de ácido fítico. Analisando seis cultivares de arroz biofortificadas com Zn, Saha et al. (2017) observaram que os teores no arroz cozido variaram de 11,2 a 15,6 mg Zn kg<sup>-1</sup>, enquanto que o ácido fítico variou de 1400 a 2600 mg kg<sup>-1</sup>, assim, em 300 g de arroz cozido havia entre 1,5 e 1,9 mg de Zn biodisponível, o que corresponde a 15 e 19 % de contribuição na recomendação de ingestão diária de Zn.

Ressalta-se que, para ambas as cultivares, o grande acúmulo de Zn nas folhas não interferiu nas quantidades de outros nutrientes na planta (dados não apresentados). Segundo Gupta et al. (2016), metais absorvidos na forma de cátion, como ferro (Fe) e cobre (Cu), competem pelo mesmo sítio de absorção do Zn e por proteínas transportadoras na planta, dessa forma, o excesso de Zn pode causar deficiência destes metais. No entanto não se observou este fato no presente estudo.

Considerando que uma perda de produtividade significativa é aquela abaixo de 90 % do máximo valor observado (White e Broadley, 2011), não houve redução em ambas as épocas para Vanda em função das doses de Zn. Para Saladela na E1 não ocorreu perdas, porém na E2 ocorreu a partir da dose de 13 mg Zn dm<sup>-3</sup> quando as plantas acumularam 4,8 mg de Zn.

Respeitando a perda mínima de produtividade e o limite máximo permitido de Zn nos alimentos, a alface pode ser biofortificada agronomicamente com aumento na quantidade foliar de 9 vezes para Vanda independentemente da época e 11 vezes para Saladela no E1 e 3 vezes E2. Como a alface já está na alimentação diária da população mundial, sendo a principal hortaliça folhosa consumida, os resultados observados beneficiarão a população pela maior ingestão do nutriente sem mudança na dieta (White et al. 2018). Além disso, o produtor rural será beneficiado pela agregação de valor ao seu produto, no entanto é interessante que políticas públicas se envolvam em programas de biofortificação agrônômica para auxílio técnico aos produtores rurais e inserção do produto à população necessitada de Zn na alimentação.

## **Conclusões**

Foi possível biofortificar agronomicamente a alface em condições tropicais respeitando a perda mínima de produtividade e o limite máximo permitido de Zn nos alimentos.

As doses de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, em ambas as épocas de cultivo para Vanda e 35 e 12 mg Zn dm<sup>-3</sup> nas E1 e E2, respectivamente, para Saladela mostraram melhores resultados.

Houve redução na massa seca das folhas e raízes em função das doses de Zn, no entanto, a redução na produtividade ocorreu apenas para Saladela.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado da primeira autora.

## **Referências**

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. (1991). Compêndio da Legislação de Alimentos– Revisão. Vol 1, São Paulo, Brasil.

Alloway, B. J. Zinc in soils and crop nutrition. (2008). Brussels: IZA Publications, International Zinc Association.

Almeida, H. J., Dutra, A. F., Cecílio Filho, A.B. (2016). Biofortificação de hortaliças e saúde global – um enfoque para selênio, zinco, ferro e iodo. In Prado, R.M.; Cecílio Filho, A.B. Nutrição e adubação de hortaliças (p. 103-150). Jaboticabal: FCAV/CAPES.

- Barrameda-Medina, Y., Blasco, B., Lentini, M., Esposito, S., Baenas, N., Moreno, D.A., Ruiz, J. M. (2017b). Zinc biofortification improves phytochemicals and amino-acidic profile in *Brassica oleracea* cv. Bronco. *Plant Science*, 258, 45–51.
- Barrameda-Medina, Y., Lentini, M., Esposito, S., Ruiza, J. M., Blasco, B. (2017a) Zn-biofortification enhanced nitrogen metabolism and photorespiration process in green leafy vegetable *Lactuca sativa* L. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 1828–1836.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.*, 173, 677–702.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In Marschner, P. (Ed.), *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd Edn (p. 191–248). London: Academic Press.
- Broadley, M. R., Lochlainn, S. O., Hammond, J. P., Bowen, H.C., Cakmak, I., Eker, S., Erdem, H., King, G. J., White, P. J. (2010). Shoot zinc (Zn) concentration varies widely within Brassicaoleracea L. and is affected by soil Zn and phosphorus (P) levels. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 85, 375–380.
- Cakmak, I., Kalayci, M., Kaya, Y., Torun, A. A., Aydin, N., Wang, Y., Arisoy, Z., Erdem, H., Yazici, A., Gokmen, O., Ozturk, L., Horst, W. J. (2010). Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9092–9102.
- Chaney, R. L. (1993). Zinc phytotoxicity. In: Robson A. D. (Ed). *Zinc in soil and plants* (p. 135–150). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Chattha, M. U., Hassan, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Mahmood, A., Chattha, M. U., et al. (2017). Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. *Front. Plant Sci.* 8:281.
- Clemens, S. (2017). How metal hyperaccumulating plants can advance Zn biofortification. *Plant Soil*, 411, 111–120.
- Department of Health (UK). (1991). Report on Health and Social Subjects 41. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients. London: HMSO.
- Dufault, R. J., Ward, B., Hassell, R. L. (2009). Dynamic relationships between field temperatures and romaine lettuce yield and head quality. *Sci. Hortic.* 120, 452-459.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro.
- Fercam. Alface Saladela (2018). Disponível em: <https://sementesfercam.com.br/alface-saladela/> Acessado em: 2 fev. 2018.

Filgueira, F. A. R. (2013). Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3rd edn. Viçosa: Editada da UFV.

Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89–109.

Hunt, J. R. (2003). Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *Am J Clin Nutr*, 78: 633S–639S.

Institute of Medicine (USA). (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, (Arsenic), Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, D C: National Academies Press.

Kosma, C., Triantafyllidis, V., Pappasavvas, A., Salahas, G., Patakas, A. (2013). Yield and nutritional quality of greenhouse lettuce as affected by shading and cultivation season. *Emir. J. Food Agric.*, 25, 974-979.

Mesquita Filho, M. V., Souza, A. F., Furlani, P. R. (2001). Hortaliças de bulbo, tubérculo, raiz e fruto. In Ferreira, M. E., Cruz, M. C. P., Raij, B. van and Abreu, C. A. (Eds.), *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura* (p. 511-532). Jaboticabal: CNPQ/ FAPESP/POTAFOS.

Oliveira, A. C. B., Sedyama, M. A. N., Pedrosa, M. W., Garcia, N. C. P., Garcia, S. L. R. (2004). Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. *Acta Scientiarum, Agronomy*, 26, 211-217.

Padash, A., Shahabivand, S., Behtash, F., Aghae, A. (2016). A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Scientia Horticulturae*, 213, 367–372.

Raij, B. van; Andrade, J.C.; Cantarella, H., Quaggio, J.A. (2001). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agrônômico, 284p.

Resende, G. M., Yuri, J. E., Carvalho, J. G., Souza, R. J., Rodrigues Junior, J. C., Mota, J. H. (2005). Resposta da alface americana (*Lactuca sativa* L.) a doses e épocas de aplicação de cobre. *Ciência Agrotecnologia*, 29, 1209-1214.

Saha, S., Chakraborty, M., Padhanb, D., Sahac, B., Murmub, S., Batabyalb, K., Sethd, A., Hazrab, G.C., Mandalb, B., Belle, R. W. (2017). Agronomic biofortification of zinc in rice: Influence of cultivars and zinc application methods on grain yield and zinc bioavailability. *Field Crops Research*, 210, 52–60.

Sakata. Folhosas – alface. (2017). Disponível em: <<http://www.sakata.com.br/produtos/hortalicas/folhosas/alface>> Acessado em: 7 ago. 2017.

Sala, F. C., Costa, C. P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 30: 187-194.

Sarruge, J. R., Haag, H. P. (1974). Análise química das plantas. Piracicaba: ESALQ, 56 p.

Souza, M. C. M., Resende, L. V., Menezes, D., Loges, V., Soute, T. A., Santos, V. F. (2008). Variabilidade genética para características agronômicas em progênies de alface tolerantes ao calor. *Horticultura Brasileira*, 26, 354-358.

Trani, P. E., Purquerio, L. F. V., Figueiredo, G. J. B., Tivelli, S. W., Blat, S. F. (2018). Alface, Almeirão, Agrião-d'água, Chicória, Coentro, Espinafre e Rúcula. In Trani, P.E. et al. Hortaliças: recomendações de calagem e adubação para o estado de São Paulo (p. 23-26). Campinas: CATI.

White, P. J. and Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.*, 105, 1073-1080.

White, P. J. and Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-11.

White, P. J., Pongrac, P., Sneddon, C. C., Thompson, J. A., Wright, G. (2018). Limits to the biofortification of leafy Brassicas with zinc. *Agriculture*, 32, 2-14.

World Health Organization (WHO). (2013). Urinary iodine concentrations for determining iodine status in populations. WHO/NMH/NHD/EPG/13.1.

## **CAPÍTULO 2**

### **Limites para biofortificação agrônômica de alface com zinco em condições tropicais**

## Limites para biofortificação agronômica de alface com zinco em condições tropicais

### Resumo

A biofortificação agronômica é uma solução para a melhoria da qualidade nutricional dos alimentos. Esta técnica implica no desafio de aumentar a concentração de Zn na parte comestível das plantas para benefício na saúde humana, sem perdas na produtividade e qualidade. Porém, doses elevadas de fertilizantes com Zn utilizados na biofortificação podem causar toxicidade nas plantas, com redução de massa e qualidade visual. Portanto, para se evitar prejuízos deve-se conhecer o teor limite de Zn nas plantas. Esse valor corresponde a redução de 10% da máxima massa seca. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os teores de Zn em duas cultivares de alface e no solo em função de doses de Zn aplicadas no solo em duas épocas de cultivo, identificando os teores limites. Os tratamentos foram doses de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> e duas épocas de cultivo E1 (março a abril de 2018) e E2 (maio a julho de 2018) em experimentos independentes para as cultivares de alface Vanda e Saladela. Os teores de Zn nas folhas e no solo aumentaram em função das doses aplicadas para ambas as cultivares. O teor limite de Zn nas folhas de Vanda foi 704,1 mg kg<sup>-1</sup>, independentemente da época de cultivo. O teor limite no solo foi de 18,9 mg dm<sup>-3</sup>. Os teores limites nas folhas da Saladela foram 1023,5 e 583,6 mg kg<sup>-1</sup> na E1 e E2, respectivamente, que corresponderam aos teores no solo de 18,0 e 11,8, mg dm<sup>-3</sup> respectivamente. A alface biofortificada apresentou altos teores de Zn nas folhas, no entanto é importante limitar a biofortificação agronômica respeitando a sensibilidade dos genótipos ao Zn em cada época de cultivo, visando adequada produtividade e qualidade.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*, biofortificação agronômica, zinco, nutrição de plantas, teor limite, toxicidade.

## Limits for agronomic biofortification of lettuce with zinc under tropical conditions

### Abstract

Agronomic biofortification is a solution for improving the nutritional quality of food. This technique entails the challenge of increasing the concentration of Zn in the edible part of plants for human health benefit without loss in productivity and quality. High doses of Zn fertilizers used in biofortification can cause plant toxicity, with reduced mass and visual quality. Therefore, to avoid losses it is necessary to know the critical Zn content in plants. This value corresponds to a 10 % reduction in the maximum dry mass. Thus, the aim of this study was to evaluate the Zn contents in two lettuce cultivars and in soil as a function of Zn doses applied to the soil in two growing seasons and to identify the critical Zn content. The treatments were doses of 0, 5, 10, 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> and two growing seasons E1 (March to April 2018) and E2 (May to July 2018) in independent experiments for the lettuce cultivars Vanda and Saladela. Leaf and soil Zn contents increased as a function of the applied doses for both cultivars. The critical foliar Zn content of Vanda was 704.1 mg kg<sup>-1</sup>, regardless of the growing season. The critical soil content was 18.9 mg dm<sup>-3</sup>. The critical foliar contents in Saladela were 1023.5 and 583.6 mg kg<sup>-1</sup> in E1 and E2, respectively, corresponding to the soil contents of 18.0 and 11.8 mg dm<sup>-3</sup> respectively. Biofortified lettuce presented high leaf Zn content, however it is important to limit agronomic biofortification respecting the sensitivity of genotypes to Zn in each growing season, aiming at adequate productivity and quality.

**Keywords:** *Lactuca sativa*, biofortification, zinc, plant nutrition, critical content, toxicity.

## Introdução

Com o crescimento contínuo da população mundial, haverá necessidade de incremento na produção de alimentos na ordem de 70 a 100% para atender a demanda (RSL 2009, Godfray et al. 2010). Tecnologias para o cultivo de plantas e desenvolvimento de genótipos adaptados para diferentes locais tem resultado em aumento da produtividade. Porém, além das características produtivas, é importante considerar a qualidade nutricional dos alimentos produzidos (Welch e Graham, 2000), visando segurança alimentar e saúde das pessoas.

Sendo assim, o aumento na concentração de Zn nas partes comestíveis de plantas resulta em benefício para a saúde humana e, sua obtenção sem redução na produtividade é um importante desafio global. A biofortificação agrônômica é uma solução para a melhoria da qualidade nutricional dos alimentos e pode ser considerada uma complementação para garantir o sucesso dos programas de biofortificação genética (Cakmak 2008).

Os fertilizantes com Zn utilizados na biofortificação podem ser aplicados diretamente no solo em três tipos de compostos, os inorgânicos, os quelatos sintéticos e os complexos naturais orgânicos. A fonte inorgânica sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) é mais comum e amplamente utilizada devido à sua alta solubilidade e baixo custo (Alloway 2008).

Sob altas doses de fertilizante com Zn no solo, normalmente as plantas respondem com maior absorção. Devido a regulação genética de absorção e transporte desse micronutriente, entre outros fatores (Gupta et al. 2016) as raízes apresentam concentrações de Zn mais elevadas em relação à parte aérea. Dessa forma, tanto a biofortificação agrônômica como a produtividade podem ser limitadas pela toxicidade nas células da planta (Bouis e Welch, 2010, Fageria 2009). Assim, por questões econômicas e ambientais, os fertilizantes devem ser usados de forma racional (Blasco et al. 2015).

A suscetibilidade à toxidez do Zn difere entre as culturas. As hortaliças folhosas, especialmente das famílias Brassicaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae, por apresentarem alta capacidade de absorção deste nutriente (Cappa e Pilon-Smiths, 2014), podem ser sensíveis e apresentarem sintomas de crescimento lento, clorose e baixa produtividade e qualidade (Chaney 1993). Por outro lado, observou-se em estudos com biofortificação que essas hortaliças toleram altas concentrações de Zn nas folhas, com valores de 259 (Padash et al. 2016) e 1000 mg Zn kg de

massa seca em alface (Fontes et al. 2014) e 465 mg Zn kg em couve (Barrameda-Medina et al. 2017).

Para determinar o teor limite de Zn na parte aérea de folhosas (aquele em que a massa seca é reduzida para menos de 90 % do máximo valor observado (White e Broadley, 2011)), White et al. (2018) estudaram cinco genótipos de repolho e quatro de brócolis. Para o repolho aplicaram-se doses de Zn variando de 0,075 até 3000 mg Zn L<sup>-1</sup>, e para brócolis, de 0,15 até 450 mg Zn L<sup>-1</sup>, resultando em teores limites que variaram de 74 a 1201 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca entre os genótipos de repolho e de 117 a 1666 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca entre os genótipos de brócolis.

As hortaliças folhosas, quando biofortificadas com Zn podem ser importante fonte deste micronutriente, especialmente entre pessoas de baixa renda ou com dieta vegetariana (Kumssa et al. 2015, White 2016). A alface é a hortaliça folhosa mais produzida e consumida no mundo (Sala e Costa, 2012) e é uma das espécies mais eficientes na absorção de Zn (Clemens 2017). No entanto, não se conhece os limites para a biofortificação agrônômica desta cultura em diferentes condições de cultivo. Sendo assim, este estudo testou a hipótese de que doses crescentes de sulfato de Zn no solo resultam em maiores teores de Zn nas folhas e raízes de alface, porém podem causar perda na produção de biomassa devido à toxicidade.

O objetivo deste estudo foi avaliar os teores de Zn em duas cultivares de alface e no solo em função de doses de Zn e duas épocas de cultivo, identificando os teores limites na biofortificação agrônômica através da perda de biomassa.

## **Material e Métodos**

### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos foram doses de Zn, (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) na forma de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e duas épocas de cultivo, março a abril de 2018 (E1) e maio a julho de 2018 (E2). Os blocos experimentais foram compostos por quatro linhas cultivo, com espaçamento de 30 x 30 cm, sendo que as plantas das duas linhas centrais foram consideradas úteis, totalizando 48 plantas úteis por bloco. Incluindo as plantas de bordadura, o total foi de 104 plantas por bloco. Realizaram-se experimentos independentes para as cultivares Vanda e Saladela.

## Condições de cultivo e Procedimentos experimentais

Os experimentos foram conduzidos em ambiente protegido, em Campinas, São Paulo (22°54'20" Sul e 47°05'34" Oeste, altitude 674,0 m). O clima regional é tropical de altitude, tipo Cwa, segundo classificação de Köppen.

Dados de temperatura (°C) e umidade relativa (%) do ar, máxima, média e mínima, durante os experimentos foram registrados por um *datalogger*, modelo CR1000 (Campbell), posicionado a 1,5 m de altura no centro do ambiente protegido.

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico Típico (Embrapa, 2006). As características químicas são: M.O = 9 g dm<sup>-3</sup>; pH = 5,5; P = 25 mg dm<sup>-3</sup>; K = 1,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 19 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg 6 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 12 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC = 38,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 26,7 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V = 69%; S = 4 mg dm<sup>-3</sup>; B = 0,14 mg dm<sup>-3</sup>; Cu = 0,4 mg dm<sup>-3</sup>; Fe = 16 mg dm<sup>-3</sup>; Mn = 3,6 mg dm<sup>-3</sup> e Zn = 0,6 mg dm<sup>-3</sup> (Raij et al. 2001).

O solo foi peneirado em malha de 5 mm e seco ao ar, posteriormente 3440 g de solo foram acondicionados em sacos plásticos, onde aplicou-se 2,4 g de superfosfato simples e 0,6 g de calcário para elevar a saturação por bases a 80%.

Após 20 dias de incubação com umidade em 80 % da capacidade de campo, as quantidades de sulfato de Zn referentes aos tratamentos foram diluídas em 160 ml de água e aplicadas no solo contido nos sacos plásticos. Esta massa de solo preencheu 2500 cm<sup>3</sup> em cada vaso de polietileno com capacidade de 3000 cm<sup>3</sup>, que continham uma camada de 2 cm de pedrisco no fundo para facilitar a drenagem. O solo foi incubado por mais 15 dias com umidade a 80 % da capacidade de campo.

Mudas de alface Vanda, do tipo crespa, e Saladela, do tipo romana crocante foram produzidas em bandejas de 200 células com substrato a base de fibra de coco. Quando tinham 3 a 4 folhas verdadeiras foram transplantadas para os vasos. Na E1 o transplante ocorreu em 7 de março de 2018 e na E2 em 29 de maio de 2018.

Para a fertilização utilizou-se nitrato de potássio, nitrato de cálcio, nitrato de amônio, monoamônio fosfato e ácido bórico via fertirrigação três vezes por semana em ambas as épocas (Trani et al. 2018). As quantidades totais para todo o ciclo de cultivo foram de, respectivamente, 4,0; 1,0; 3,3; 0,5 e 0,1 g por vaso.

Monitorou-se semanalmente o pH da água para irrigação e solução nutritiva, o qual foi mantido em 6. A cada duas linhas de cultivo havia uma linha gotejadora, com tubos e emissores

(espaguete) para a irrigação por gotejamento (vazão de 2,4 L h<sup>-1</sup>). Para a área de 55 m<sup>2</sup> de experimento, o total de água aplicada no cultivo das plantas no E1 foi de 2670 L, no E2 foi de 2690 L.

### **Características avaliadas**

A colheita ocorreu simultaneamente nos experimentos independentes de Vanda e Saladela, aos 30 dias após o transplante (DAT) no E1 e aos 41 DAT no E2. Duas plantas das linhas de cultivo centrais de cada parcela foram secas em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de 60 °C até massa constante, posteriormente determinou-se a massa seca (g) das folhas.

Em seguida, o material seco foi triturado em moinho tipo Wiley e determinou-se o teor de Zn por meio de digestão nítrico perclórico e leitura em espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP – OES).

Foram retiradas amostras de solo de um vaso por parcela e os teores de Zn foram determinados por meio de extração com solução de DTPA (ácido dietileno-triaminopenta cético e trietanolamina) (Raij et al. 2001) e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica.

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância e por meio do teste F e expressados com a média das repetições e desvio padrão da média. As relações entre os teores de Zn e as doses aplicadas no solo foram ajustadas através do programa estatístico SigmaPlot com regressões polinomiais linear  $y = y_0 + ax$ , quadrática  $y = y_0 + ax + b^2$  e a não linear sigmoidal  $y = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$ . As relações entre massa seca das folhas e teores de Zn foram ajustadas pela equação polinomial linear.

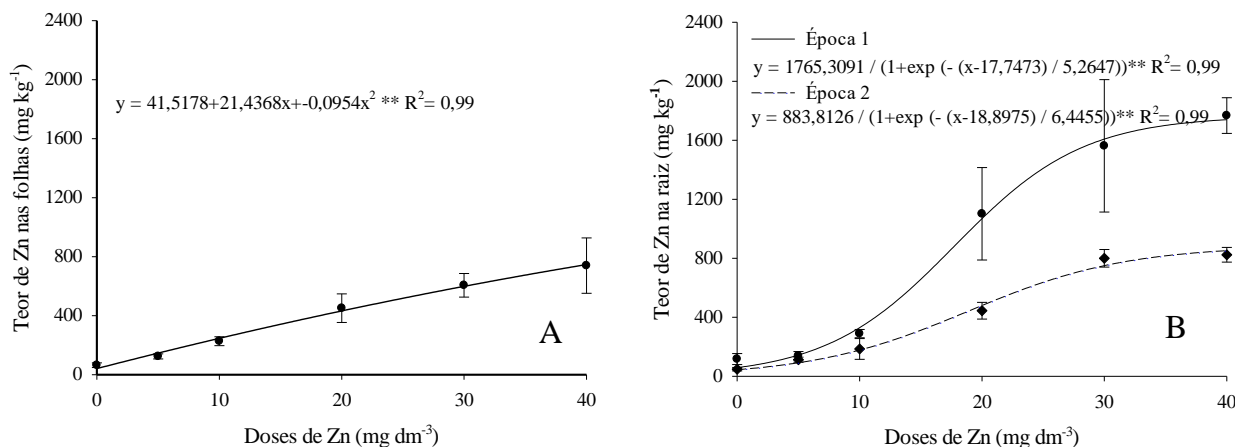
Através da correlação entre a massa seca e os teores de Zn nas folhas foi possível determinar o teor limite nas cultivares, correspondente a produção de massa seca de 90 % do máximo valor observado (White e Broadley, 2011). Conhecendo-se os teores limites de Zn nas folhas, calculou-se as doses de Zn críticas a serem aplicadas no solo através dos parâmetros das equações de ajuste da relação entre teor nas folhas e doses de Zn. A partir das doses limites, foram calculados os teores limites no solo com os parâmetros da equação de ajuste da relação do teor de Zn no solo e doses aplicadas.

## Resultados

Durante a época de cultivo 1 (E1) as médias das temperaturas máximas, médias e mínimas foram de 33,5; 25,3 e 20,2 °C e as da umidade relativa do ar foram de 86,4; 65,6 e 34,6 %, respectivamente. Durante a E2 as médias das máximas, médias e mínimas de 28,8; 20,5 e 14,9 °C e 79,8; 57,9 e 30,3 %, respectivamente.

### Cultivar Vanda

Os teores de Zn nas folhas aumentaram em função das doses aplicadas no solo, independentemente da época de cultivo, com ajuste polinomial quadrático. Na ausência de aplicação de Zn (0 mg dm<sup>-3</sup>) o teor estimado foi de 41,5 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca, o que correspondeu a apenas 5 % do maior valor observado na maior dose (40 mg dm<sup>-3</sup>) de 746,3 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 1A).



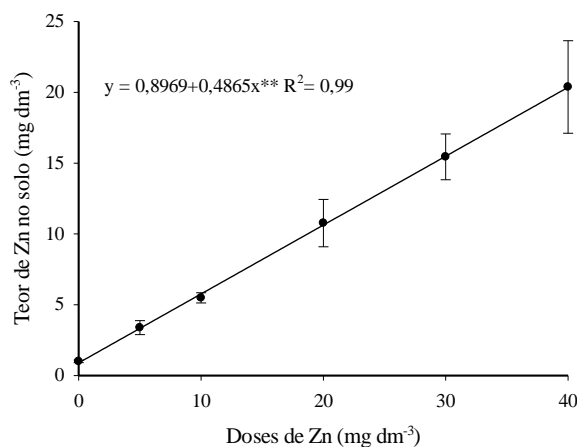
**Figura 1.** Teores de Zn nas folhas (A) e na raiz (B) da alface Vanda em função das doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

Houve interação significativa entre os tratamentos para os teores de Zn observados nas raízes, que foram pequenos até as doses de 7 e 6 mg Zn dm<sup>-3</sup> para as E1 e E2, respectivamente, com 210,4 e 105,3 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca. Com o posterior aumento das doses houve também aumento nos teores, atingindo valores estimados de 1739,9 e 851,6 mg kg<sup>-1</sup> para E1 e E2,

respectivamente. Observou-se na E1 que este incremento foi mais expressivo, de 29 vezes em relação ao menor valor observado, enquanto na E2 foi de 19 vezes. Ressalta-se que o maior incremento dos teores ocorreu até as doses 28 e 31 mg Zn dm<sup>-3</sup> na E1 e E2, respectivamente, após houve tendência a estabilização (Figura 1B).

Comparando-se os teores de Zn entre folhas e raízes verificou-se variações com o aumento das doses de Zn. Na E1 a proporção foi equilibrada, próximo a 1:1 nas doses de 0 e 5 mg Zn dm<sup>-3</sup>. A medida que as doses aumentaram, observou-se maior concentração do Zn nas raízes, chegando 2,7 vezes maior que nas folhas na dose de 30 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Na E2 a maior parte do Zn concentrou-se nas folhas até a dose de 10 mg Zn dm<sup>-3</sup>, nas doses de 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> as raízes passaram a apresentar em média 1,2 vezes mais Zn que as folhas.

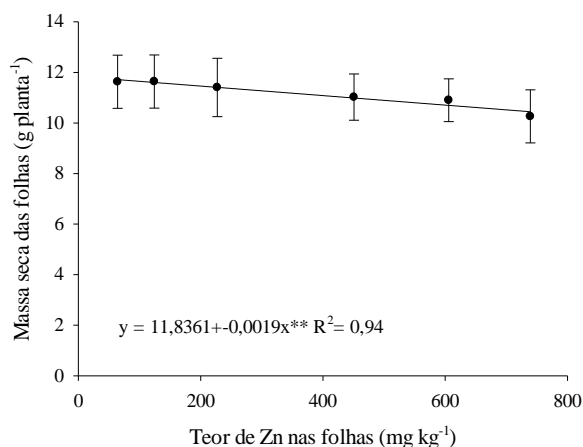
Os teores de Zn no solo após a colheita apresentaram um aumento linear em função das doses aplicadas, independentemente da época de cultivo. Com 0 mg Zn dm<sup>-3</sup> o valor estimado foi de 0,9 mg Zn dm<sup>-3</sup> enquanto na maior (40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) o teor foi de 20,3 mg Zn dm<sup>-3</sup>, portanto houve um aumento de 23 vezes (Figura 2). Notou-se que a correlação dose de Zn e teores no solo foi de 2:1, com valor de coeficiente de Pearson de 0,99. Assim, nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> os teores foram de 5, 10, 15 e 20 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Teores de Zn no solo após a colheita de alface Vanda, em função de doses de Zn aplicadas no solo. As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

A massa seca das folhas reduziu linearmente de 11,7 para 10,4 g planta<sup>-1</sup> em função dos

teores observados neste tecido vegetal, independentemente da época de cultivo (Figura 3). Considerando que a perda de massa crítica é aquela abaixo de 90 % do máximo valor observado, este fato ocorreu com o teor de Zn de 704,1 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca, sendo este, portanto, o teor limite nas folhas da Vanda (Tabela 1).



**Figura 3.** Relação entre massa seca das folhas e teores de Zn nas folhas de Vanda. As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

A partir do teor limite determinou-se que a dose limite a ser aplicada no solo foi de 37 mg Zn dm<sup>-3</sup>, independentemente da época de cultivo. Com base na dose limite, estimou-se que o teor de Zn crítico no solo foi de 18,9 mg dm<sup>-3</sup> (Tabela 1).

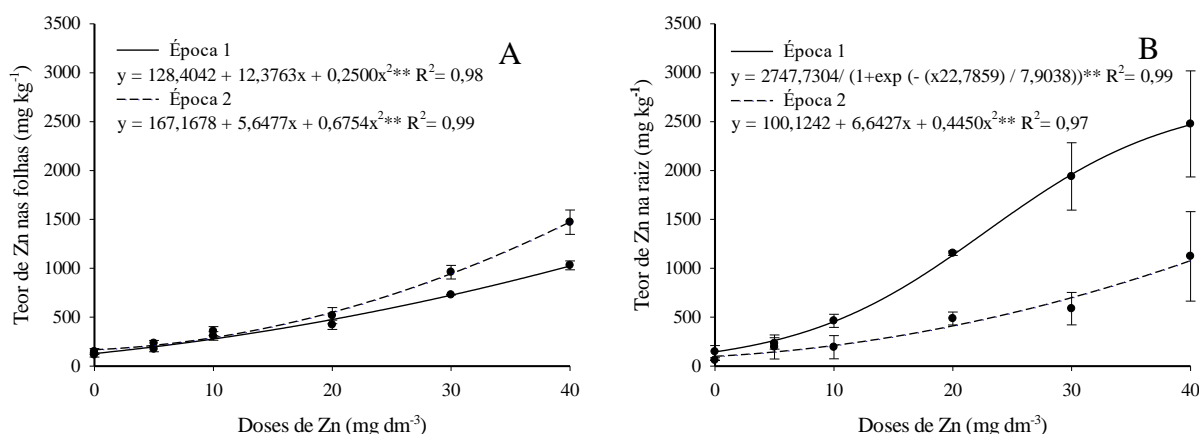
**Tabela 1.** Teores limites de Zn em folhas de alface biofortificada cv. Vanda e Saladela, teor limite de Zn no solo e doses limites de Zn aplicadas no solo nas épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a junho).

		Teor limite de Zn		Dose limite de Zn
		Folhas (mg kg <sup>-1</sup> MS)	Solo (mg dm <sup>-3</sup> )	mg dm <sup>-3</sup>
Vanda		704,1	18,9	37
Saladela	E1	1023,5	18	40
Saladela	E2	583,6	11,8	21

## Cultivar Saladela

Para os teores de Zn nas folhas da Saladela, houve interação significativa entre os tratamentos, assim, houve um aumento em função das doses no solo em ambas a épocas de cultivo, com ajuste dos dados a função quadrática.

Na E1 o teor nas folhas das plantas submetidas à dose de 0 mg Zn dm<sup>-3</sup> foi de 128,4 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca, enquanto o observado na maior dose (40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) foi de 1023,4 mg kg<sup>-1</sup>. Na E2 este aumento foi maior, pois os teores de Zn variaram de 167,2 até 1473,7 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca nas doses de 0 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, respectivamente (Figura 4A). Estes incrementos foram de 8 e 9 vezes na E1 e E2, respectivamente.



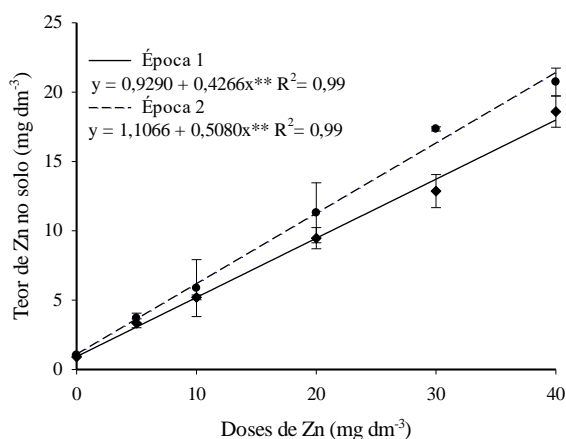
**Figura 4.** Teores de Zn nas folhas (A) e na raiz (B) da alface Saladela em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

Houve interação significativa entre os tratamentos quando se analisou os teores de Zn na raiz. Na E1 os dados se ajustaram a uma função sigmoide. Na dose de 0 mg Zn dm<sup>-3</sup> o teor foi de 145,6 mg kg<sup>-1</sup> com posterior aumento até a dose de 7 mg Zn dm<sup>-3</sup> e intensificação até 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, atingindo 2468 mg kg<sup>-1</sup>, o que representou um aumento de 17 vezes. Os teores nas raízes das plantas cultivadas na E2 se ajustaram a uma equação polinomial quadrática em função das doses, com menor aumento quando comparado com a E1. A variação foi de 100,1 até 1077,8 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca nas doses de 0 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, respectivamente, representando aumento de 11 vezes (Figura 4B).

Na E1 a maior concentração do Zn esteve nas raízes em todas as doses, variando de

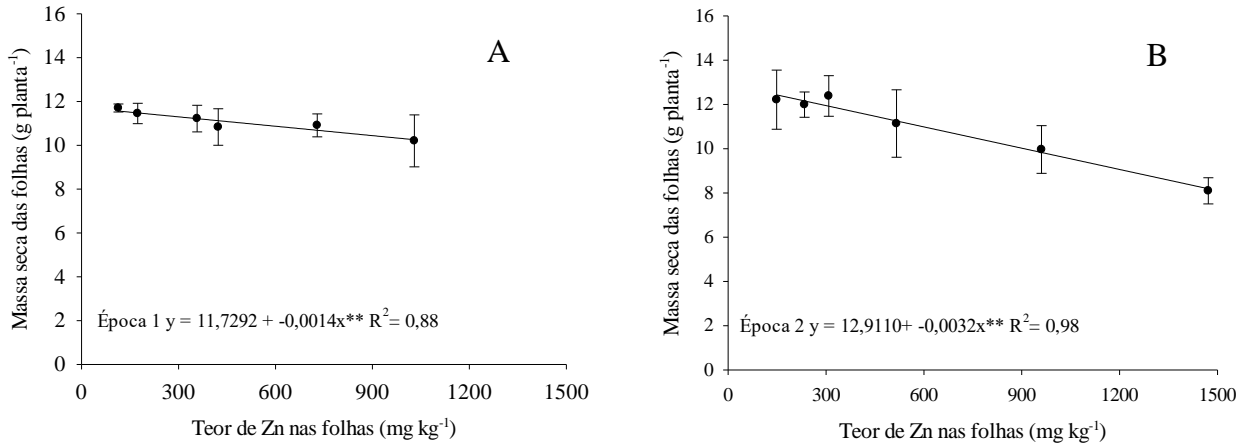
1,4 (dose 5 mg Zn dm<sup>-3</sup>) até 2,6 (dose 30 mg Zn dm<sup>-3</sup>) vezes maior que nas folhas. Na E2 somente na dose de 0 mg Zn dm<sup>-3</sup> as raízes apresentaram 2,6 vezes maior concentração de Zn que as folhas. Com o aumento das doses o nutriente concentrou-se mais nas folhas, com 1,2 (dose 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) até 1,7 (doses 10 e 20 mg Zn dm<sup>-3</sup>) vezes maior que nas raízes.

Em ambas a épocas de cultivo houve aumento linear nos teores de Zn no solo em função das doses, sendo que na E1, o menor valor observado foi de 0,9 mg dm<sup>-3</sup> e o maior de 18,0 9 mg dm<sup>-3</sup> na dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Na E2 esta variação foi de 1,1 a 21,4 mg dm<sup>-3</sup> entre as doses extremas (Figura 5). Embora haja a semelhança de aumento de 19 vezes em ambas a épocas de cultivo, o valor do parâmetro *a* da equação linear foi distinto, conferindo diferença na inclinação das retas para E1 e E2, respectivamente. Apesar disso as duas correlações ficaram próximas a 2:1 (Figura 5).



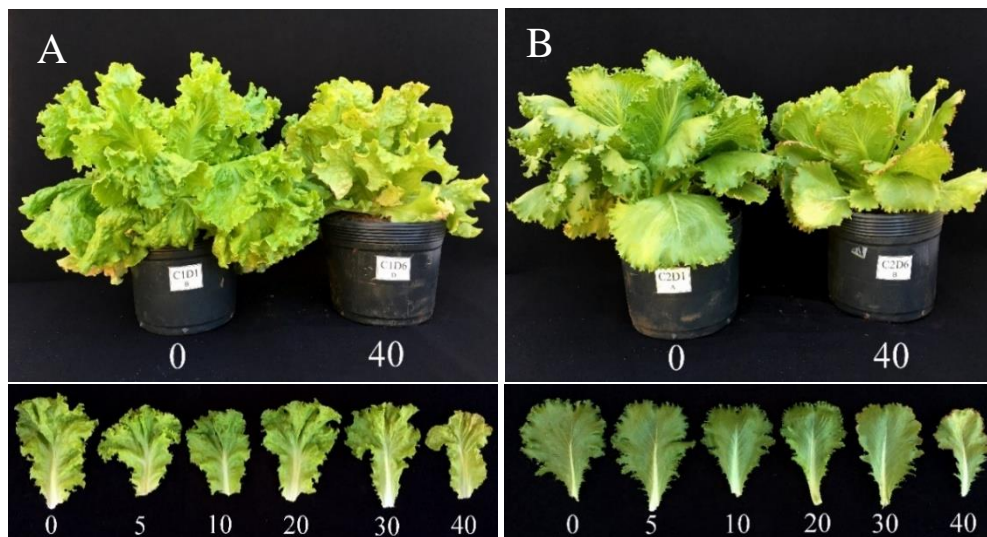
**Figura 5.** Teores de Zn no solo após a colheita de alface Saladela, em função de doses de Zn aplicadas no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

Houve redução linear na massa seca das folhas em função dos teores de Zn nas folhas para ambas a épocas de cultivo. Na E1 a massa seca variou de 11,5 a 10,3 g planta<sup>-1</sup> para os teores de 128,4 e 1023,5 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Na E2 observou-se redução mais acentuada, com maior massa seca de 12,4 e a menor 8,2 g planta<sup>-1</sup>, correspondentes aos teores de 167,2 e 1473,7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6A e B). Dessa forma a perda de massa crítica ocorreu com um teor de Zn nas folhas maior para E1 que E2, com valores estimados de 1023,5 e 583,6 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo estes os teores limites nas folhas de Saladela (Tabela 1).



**Figura 6.** Relação entre massa seca das folhas e teores de Zn nas folhas de Saladela nas épocas de cultivo E1 (março a abril - A) e E2 (maio a julho - B). As barras representam o desvio padrão das médias. \*\* significância da regressão em  $P < 0,01$ .

Na E2, além da maior redução da biomassa, foram observadas manchas avermelhadas nas bordas das folhas das plantas submetidas as doses de 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> (Figura 7), estes sintomas foram considerados toxicidade por Zn.



**Figura 7.** Plantas de alface Vanda (A) e Saladela (B) submetidas a doses de 0 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> e suas folhas medianas provenientes das doses de 0 a 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> na época de cultivo 2.

A dose limites de Zn aplicada no solo na E1 foi a de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, na E2 foi a dose de 21 mg Zn dm<sup>-3</sup>. Assim, os teores limites de Zn no solo foram de 18,0 e 11,8 mg Zn dm<sup>-3</sup> para E1 e E2, respectivamente (Tabela 1).

## **Discussão**

O aumento no teor de Zn nas folhas em função das doses foi verificado em outras pesquisas. Porém, os teores alcançados no presente estudo foram maiores que os observados por Barrameda-Medina et al. (2017) e Padash et al. (2016), de 265 e 259 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca, respectivamente, e mais próximos aos observados por Fontes et al. (2014) (> 1000 mg kg<sup>-1</sup>). Somente a Saladela cultivada na E2 apresentou teores maiores nas folhas que nas raízes, o que acarretou em sintomas de fitotoxicidade de Zn nas folhas. Segundo Gupta et al. (2016) normalmente os teores de Zn são maiores nas raízes que na parte aérea como uma medida indireta da planta para proteger a parte fotossintética de níveis tóxicos de Zn, dessa forma, a biofortificação, bem como a produtividade, são limitadas pela toxicidade do Zn nas células radiculares, quando expostas a altas concentrações de Zn no solo (White e Broadley, 2011).

Para ambas as cultivares os teores nas raízes foram maiores na E1 que na E2, ao passo que não houve esta diferença nas folhas. Esta observação pode indicar maior absorção do Zn e retenção pelas raízes na E1 e/ou maior transporte do nutriente das raízes para as folhas na E2. Tanto a absorção quanto o transporte do Zn<sup>2+</sup> nas plantas são regulados por transportadores específicos (MTPs, ZIPs, HMAs, VITs) (Gupta et al. 2016). Há diversos estudos que mostram variações genéticas na expressão dessas proteínas transportadoras em várias espécies (Gaitán-Solís et al. 2015, Pinto 2015, Tan et al. 2014, Li et al. 2013, Verret et al. 2004), o que influencia na concentração de Zn nas partes da planta. No entanto há pouca informação em hortaliças folhosas, estudos nesse sentido são necessários inclusive para programas de biofortificação genética (Gupta et al. 2016).

Conforme observado neste estudo, a época de cultivo e, conseqüentemente, diferenças nas condições ambientais, influenciam na concentração do Zn na planta. White et al. (2018) relataram diferenças nas concentrações deste nutriente na parte aérea de genótipos de repolho e brócolis cultivados em anos diferentes, observação similar foi feita por Kopsell et al. (2004) em couve. Estas diferenças podem ocorrer em função de fatores climáticos, interações entre o Zn e outros

elementos, pH do solo, metabolismo da planta, efeito de diluição do nutriente devido ao crescimento da planta, temperatura da zona da raiz, comprimento do dia, duração do ciclo de cultivo e interações entre estes fatores (Duman et al. 2007, Broadley et al. 2007, White et al. 2018). Sugere-se, portanto, que a aplicação do Zn no solo visando a biofortificação agronômica de alface seja feita em quantidades diferentes em função da época de cultivo para cada genótipo, respeitando o potencial de absorção do Zn e sensibilidade da planta com o nutriente.

A concentração limite de Zn em hortaliças folhosas normalmente varia de 100 a 700 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca (White e Broadley, 2011). Constatou-se, portanto, que para Vanda em ambas as épocas e Saladela na E1, os valores ficaram acima do máximo sugerido na literatura, o que indica tolerância destas cultivares à altas doses de Zn. Estes resultados são interessantes para programas de biofortificação, pois buscam por genótipos com eficiência de uso do nutriente e alta tolerância às concentrações tóxicas do elemento (White e Brown, 2010, Blasco et al. 2011).

Apesar da tolerância ao Zn, a redução da massa seca observada em ambas as cultivares é um dos sintomas de toxicidade do nutriente. Os teores foliares associados a toxicidade podem variar de acordo com a espécie, no entanto os sintomas normalmente se tornam visuais com teores foliares acima de 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> (Broadley et al. 2007, Chaney 1993, Marschner 1995). No presente estudo este fato ocorreu somente para Saladela na E2 com teor a partir de 1012 mg Zn kg<sup>-1</sup>, sendo assim, nesta época de cultivo, doses a partir de 30 mg Zn dm<sup>-3</sup> resultaram em alfaces inviáveis para comercialização. A Vanda, apesar de ter apresentado redução na massa seca, poderia ser comercializada devido à ausência de sintomas visuais.

Quanto ao Zn no solo, a relação 2:1 entre as doses aplicadas e os teores observados após o cultivo é interessante para programas de biofortificação agronômica, pois permite estimar facilmente os teores de Zn no solo após a colheita caso as condições de cultivo sejam parecidas com as deste estudo. É possível também fazer um novo cultivo sem novas aplicações de Zn e seguir esta linha de pesquisa com biofortificação, visando o aproveitamento das quantidades residuais no solo. Porém mais estudos nesse sentido em diferentes condições de clima, solo e cultivo sem solo (sistema hidropônico) são necessários para complementar esse resultado.

Altos teores de Zn disponíveis no solo podem limitar o crescimento da planta. No entanto, os níveis tóxicos são muito variáveis dependendo da planta, da fauna do solo e dos microrganismos (Allowey 2008). No Brasil, Fageria (2000) relatou que os teores limites de Zn para arroz, feijão, milho, soja e trigo, foram de 35; 25; 60; 33 e 34 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente. Kabata-Pendias (2001)

listou valores limites de Zn para diversas espécies de plantas variando de 100 a 500 mg Zn dm<sup>-3</sup> de solo, sendo esses valores estabelecidos com a redução de 25% na produtividade.

Os teores limites no solo verificados no presente estudo estão abaixo dos relatados, no entanto não há dados para comparação de teores limites para alface. Além disso estes valores podem variar em função da disponibilidade do Zn no solo para as plantas, que é determinada pelo pH, matéria orgânica, umidade, composição mineral e granulométrica do solo (Allowey 2008). Para repolho, White et al. (2018) observou que a concentração crítica de Zn em substrato variou de 0,15 a 500,0 mg dm<sup>-3</sup> dependendo da cultivar e do ano de cultivo, para brócolis, esta variação foi de 43,0 a 408,0 mg dm<sup>-3</sup>.

## **Conclusões**

Os teores de Zn nas plantas de Vanda e Saladela aumentaram em função das doses em ambas as épocas de cultivo.

O teor limite de Zn nas folhas da cultivar Vanda foi 704,1 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca, independentemente da época de cultivo. O teor limite no solo foi de 18,9 mg dm<sup>-3</sup>.

Os teores limites nas folhas da Saladela foram 1023,5 e 583,6 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca nas épocas de cultivo 1 e 2, respectivamente, que corresponderam aos teores no solo de 18,0 e 11,8, mg dm<sup>-3</sup> respectivamente.

A alface biofortificada agronomicamente apresentou altos teores de Zn nas folhas, no entanto é importante limitar a biofortificação agrônômica respeitando a sensibilidade dos genótipos ao Zn em cada época de cultivo, visando adequada produtividade e qualidade.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado da primeira autora.

## Referências

- Alloway, B. J. Zinc in soils and crop nutrition. (2008). Brussels: IZA Publications, International Zinc Association.
- Barrameda-Medina, Y., Blasco, B., Lentini, M., Esposito, S., Baenas, N., Moreno, D.A., Ruiz, J. M. (2017). Zinc biofortification improves phytochemicals and amino-acidic profile in *Brassica oleracea* cv. Bronco. *Plant Science*, 258, 45–51.
- Blasco, B., Graham, N. S., Broadley, M. R. (2015). Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca, and Mg supply. *J. Plant Physiol.* 176, 16–24.
- Bouis, H. E.; Welch, R. M. (2010). Biofortification—sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global South. *Crop Sci.* 50, S20–S32.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.*, 173, 677–702.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 302: 1–17.
- Chaney, R. L. (1993). Zinc phytotoxicity. In: Robson A. D. (Ed). *Zinc in soil and plants* (p. 135–150). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Clemens, S. (2017). How metal hyperaccumulating plants can advance Zn biofortification. *Plant Soil*, 411, 111–120.
- Duman, F., Cicek, M., Sezen, G. (2007). Seasonal changes of metal accumulation and distribution in common club rush (*Schoenoplectus lacustris*) and common reed (*Phragmites australis*). *Ecotoxicology*, 16, 457-463.
- Fageria, N. K. (2000). Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo em solo de cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4, 390-395.
- Fageria, N. K. (2009). *The Use of Nutrients in Crop Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fontes, R. L. F., Pereira, J. M. N., Neves, J. C. L. (2014). Uptake and translocation of Cd and Zn in two lettuce cultivars. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 907-922.
- Gaitán-Solís, E., Taylor, N. J., Siritunga, D., Stevens, W., Schachtman, D. P. (2015). Overexpression of the transporters AtZIP1 and AtMTP1 in cassava changes zinc accumulation and partitioning. *Front. Plant Sci.* 6: 492.

Godfray, H. C. J., Beddington, J., Crute, I., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. et al. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327: 812–818.

Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89–109.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd Edn. Boca Raton: CRC Press.

Kopsell, D. E., Kopsell, D. A., Lefsrud, M. G., Curran-Celentano, J. (2004). Variability in elemental accumulations among leafy Brassica oleracea cultivars and selections. *J. Plant Nutr.*, 27, 1813–1826.

Kumssa, D. B., Joy, E. J. M., Ander, E. L., Watts, M. J., Young, S. D., Walker, S., Broadley, M. R. (2015). Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. *Sci. Rep.*, 5, 10974.

Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S. et al. (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol.*, 13:114

Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Orlando: Academic Press.

Padash, A., Shahabivand, S., Behtash, F., Aghaee, A. (2016). A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Scientia Horticulturae*, 213: 367–372.

Pinto, E., Ferreira, I. (2015). Cation transporters/channels in plants: tools for nutrient biofortification, *Journal of Plant Physiology*, 179:64-82.

Raij, B. van, Andrade, J. C., Cantarella, H., Quaggio, J. A. (2001). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agronômico.

Royal Society of London. (2009). *Reaping the Benefits: Science and the Sustainable Intensification of Global Agriculture*. London: Royal Society.

Sala, F. C., Costa, C. P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 30: 187-194.

Tan, S., Han, R., Li, P., Yang, G., Li, S., Zhang, P., Wang, W., Zhao, W., Yin, L. (2014). Over-expression of the *MxIRT1* gene increases iron and zinc content in rice seeds. *Transgenic Research*. 24, 109-122.

Trani, P. E., Purquerio, L. F. V., Figueiredo, G. J. B., Tivelli, S. W., Blat, S. F. (2018). Alface, Almeirão, Agrião-d'água, Chicória, Coentro, Espinafre e Rúcula. In Trani, P.E. et al. Hortaliças: recomendações de calagem e adubação para o estado de São Paulo (p. 23-26). Campinas: CATI.

Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett*, 576: 306–312.

Welch, R. M., Graham, R. D. (2000). A new paradigm for world agriculture: productive, sustainable, nutritious, health fulfood systems. *Food and Nutr. Bulletin*, 21: 261-366.

White, P. J. and Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-11.

White, P. J. (2016). Biofortification of edible crops. In *eLS*, John Wiley & Sons: Chichester, UK.

White, P. J. and Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.*, 105, 1073-1080.

White, P. J., Pongrac, P., Sneddon, C. C., Thompson, J. A., Wright, G. (2018). Limits to the biofortification of leafy Brassicas with zinc. *Agriculture*, 32, 2-14.

## **CAPÍTULO 3**

**A biofortificação agronômica com Zn afeta o metabolismo antioxidante de alface**

## A biofortificação agronômica com Zn afeta o metabolismo antioxidante de alface

### Resumo

A alface biofortificada com zinco (Zn) pode apresentar altos teores desse micronutriente nas folhas e auxiliar na mitigação da deficiência deste nutriente nas pessoas. No entanto, o excesso de Zn em alface, bem como as condições climáticas durante o cultivo podem ser fatores de estresse e induzir a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), causando danos oxidativos na planta e redução na produção. Por outro lado, o sistema antioxidante, incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), age em defesa aos danos celulares. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da biofortificação agronômica com Zn nas respostas antioxidantes em folhas de alface cultivada em duas épocas. Foram aplicadas doses no solo de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn  $dm^{-3}$  nas épocas de cultivo E1 (março a abril de 2018) e E2 (maio a julho de 2018). A biofortificação agronômica em alface com doses de 20, 30 e 40 mg Zn  $dm^{-3}$  resultou em maior peroxidação lipídica (MDA) e menor massa seca, indicando que estas doses no solo foram fatores de estresse para a planta. Estas condições induziram ao aumento da atividade da SOD em ambas as épocas de cultivo. As plantas cultivadas sob as temperaturas mais amenas da E2 apresentaram menor MDA em relação à E1, ao passo que a massa seca foi maior, sendo as condições climáticas da E2 mais favoráveis para as plantas biofortificadas com Zn. As atividades da CAT e APX se mantiveram estáveis nas doses de 20 a 40 mg Zn  $dm^{-3}$ , mas suficientes para manter as concentrações de  $H_2O_2$ .

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*, biofortificação agronômica, zinco, atividade antioxidante, enzimas.

## **Agronomic biofortification with Zn affects the antioxidant metabolism of lettuce**

### **Abstract**

Biofortified lettuce contains high leaf Zn and can mitigate the deficit of this nutrient in people. However, excess Zn in lettuce, as well as climatic conditions during cultivation, can be stress factors and induce the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), causing oxidative damage to the plant and reduced production. On the other hand, the antioxidant system, including the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), acts in defense of cell damage. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of agronomic biofortification with Zn on antioxidants responses in leaves of lettuce grown in two seasons. Soil doses of 0, 5, 10, 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> were applied in growing seasons E1 (March to April 2018) and E2 (May to July 2018). Agronomic biofortification in lettuce with doses of 20, 30 and 40 mg Zn dm<sup>-3</sup> resulted in higher lipid peroxidation (MDA) and lower dry mass, indicating that these doses in the soil were stress factors for the plant. These conditions led to an increase in SOD activity in both growing seasons. Plants grown under the milder temperatures of E2 showed lower MDA compared to E1, while the dry mass was higher. Thus, climatic conditions in E2 were more favorable for biofortified plants with Zn. CAT and APX activities remained stable at doses of 20 to 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, but sufficient to maintain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

**Keywords:** *Lactuca sativa*, agronomic biofortification, zinc, antioxidant activity, enzymes.

## Introdução

O zinco (Zn) é essencial para o crescimento e desenvolvimento de crianças e para o equilíbrio do funcionamento do organismo, pois participa da atividade catalítica de aproximadamente 100 enzimas, além de desempenhar papel no sistema imunológico (Kabata-Pendias e Mukherjee 2007). O organismo humano não possui um sistema especializado para armazenamento deste nutriente, portanto é necessária ingestão diária de Zn para manter o metabolismo celular normal e estima-se que pelo menos 33 % da população mundial sofra com a deficiência de Zn (Rink e Gabriel 2000, WHO 2013).

As hortaliças folhosas representam uma fonte de nutrientes de baixo custo, onde o Zn é prontamente disponível para o ser humano, portanto podem mitigar a deficiência deste nutriente nas pessoas (White et al. 2018). Dentre as folhosas, a alface é a mais produzida e consumida no mundo (Sala e Costa 2012), além de ser importante para a saúde humana, pois é rica em polifenóis das classes ácido fenólico e flavonoides, auxiliando na capacidade antioxidante do organismo, na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (Sofa et al. 2016).

Além destas propriedades naturalmente presentes, a alface tem potencial para absorver grande quantidade de Zn pelas raízes. Dessa forma, a biofortificação agrônômica, definida pelo processo de aumentar a concentração de elementos essenciais nas plantas através da fertilização, é uma tecnologia eficiente para incrementar o consumo de nutrientes como Fe e Zn pelos seres humanos (Cakmak 2008). Dependendo da quantidade fornecida de Zn, as folhas de alface podem conter teores acima de 1000 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa seca (Fontes et al. 2014, Clemens 2017).

No entanto, a aplicação de fertilizantes com Zn na rizosfera visando a biofortificação, pode resultar em acúmulo de excessivo e tóxico deste nutriente nas plantas, o que induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estas moléculas são responsáveis pelo estresse oxidativo, causando peroxidação lipídica, morte celular e, conseqüentemente, redução na produção (Mourato et al. 2012, Barrameda-Medina et al. 2014a, Alonso-Blázquez et al. 2015). Sofa et al. (2018) observaram que os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aldeído malônico (MDA - indicativo da peroxidação lipídica) foram maiores em plantas de alface submetidas à solução com maior concentração de Zn. Por outro lado, a menor concentração não foi suficiente para causar estresse oxidativo.

Em defesa à ação tóxica das EROs, as plantas têm um sistema antioxidante, incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) (Sharma et al., 2007). A SOD é a primeira enzima antioxidante na linha de defesa, catalisando a reação de dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e oxigênio molecular. (Cakmak 2000). Em seguida, a CAT e APX eliminam as moléculas de  $H_2O_2$  convertendo-as em  $H_2O$  e oxigênio molecular (Foyer e Noctor 2005, Huseynova 2012). Dessa forma, o equilíbrio entre as atividades de SOD e APX ou CAT é fundamental para determinar o nível de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio (Mittler 2002).

Estudos demonstraram que plantas expostas ao Zn apresentaram maior atividade antioxidante afim de eliminar as EROs e reduzir os danos oxidativos. Sofo et al. (2018) observaram que em alfices fertilizadas com maiores doses Zn houve um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, POD, APX e GPX em virtude da maior concentração de EROs. Em feijão, Sida-Arreola et al. (2017) constataram que a biofortificação agrônômica com Zn aumentou a atividade antioxidante da planta.

Além da toxicidade do Zn, épocas de cultivo com temperaturas do ar que ultrapassam a faixa adequada para o desenvolvimento de cada espécie podem causar estresse, o que induz a produção de EROs e os danos oxidativos na planta (Mittler 2002, Yin et al. 2008). Almeselmani et al. (2006) observaram aumento significativo na atividade de SOD, APX e CAT em trigo exposto a temperaturas mais altas que as plantas testemunhas. Em lentilha, Chakraborty e Pradhan (2011) observaram que a peroxidação lipídica, bem como a atividade da CAT, APX e SOD aumentou conforme aumento da temperatura em que as plantas foram submetidas (de 20 a 45 °C).

Em alface há pouca informação sobre influência da época de cultivo na defesa antioxidante, dessa forma, são necessários estudos nesse sentido para auxiliar na sustentabilidade da biofortificação agrônômica. Assim testou-se a hipótese de que alta temperatura do ar e aumento da concentração de Zn na planta induz a danos oxidativos e aumento da atividade de enzimas antioxidantes. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da biofortificação agrônômica com Zn nas respostas antioxidantes em folhas de alface cultivada em duas épocas.

## **Material e métodos**

### **Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental**

A cultivar de alface Vanda, do segmento crespa, tem ciclo médio de 30 dias após o transplante das mudas (Sakata, 2017). As mudas foram produzidas em bandejas de polipropileno com 200 células preenchidas com substrato de fibra de coco.

O experimento foi realizado em duas épocas de cultivo, a primeira (E1) de março a abril de 2018 e a segunda (E2) de maio a julho de 2018. A condução foi em ambiente protegido, em Campinas, São Paulo (22°54'20" Sul e 47°05'34" Oeste, altitude 674,0 m). O clima regional é tropical de altitude, tipo Cwa, segundo classificação de Köppen. Um *datalogger* posicionado a 1,5 m de altura no centro do ambiente protegido, coletou dados de temperatura (°C) e umidade relativa (%) do ar, máxima, média e mínima, durante a realização dos experimentos.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos foram seis doses de Zn (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>) na forma de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e duas épocas de cultivo. Os blocos experimentais foram compostos por quatro linhas de cultivo, espaçadas de 30 x 30 cm.

Para cada época o solo foi peneirado em malha de 5 mm e seco ao ar, posteriormente pesou-se 3440 g para preencher 2500 cm<sup>3</sup> em cada vaso de polietileno com capacidade de 3000 cm<sup>3</sup>. Este volume de solo foi acondicionado em sacos plásticos, onde aplicou-se 2,4 g de superfosfato simples e 0,6 g de calcário para elevar a saturação por bases a 80%. O solo foi incubado por 20 dias com umidade em 80 % da capacidade de campo.

As quantidades de sulfato de Zn referentes as doses foram diluídas em 160 ml de água destilada e aplicadas ao solo nos sacos e homogeneizado. O solo foi então acondicionado nos vasos que continham uma camada de 2 cm de pedrisco no fundo para facilitar a drenagem. O solo foi incubado por mais 15 dias com umidade a 80 % da capacidade de campo antes do transplante das mudas.

Mudas de trinta dias com três a quatro folhas verdadeiras foram transplantadas para os vasos em 7 de março de 2018 para E1 e 29 de maio de 2018 para E2. Com base na análise do solo (Tabela suplementar S1) e na recomendação de adubação para alface de Trani et al. (2018), as plantas foram fertilizadas com nitrato de potássio, nitrato de cálcio, nitrato de amônio, monoamônio fosfato e ácido bórico via fertirrigação três vezes por semana. As quantidades totais para todo o ciclo de cultivo foram de, respectivamente, 4,0; 1,0; 3,3; 0,5 e 0,1 g por vaso.

Monitorou-se semanalmente o pH da água para irrigação e solução nutritiva, o qual foi mantido em 6. A cada duas linhas de cultivo havia uma linha gotejadora, com tubos e emissores

(espaguete) para a irrigação por gotejamento (vazão de 2,4 L h<sup>-1</sup>). O total de água aplicada no cultivo das plantas na E1 foi de 2670 L, na E2 foi de 2690 L.

### **Características avaliadas**

A colheita ocorreu aos 30 dias após o transplante (DAT) na E1 e aos 41 DAT na E2. Duas plantas por parcela foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C até massa constante para determinação da matéria seca das folhas e raízes. Para análise bioquímica, folhas médias de uma planta por parcela foram coletadas, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -80 ° C para análises posteriores.

### **Concentração de Zn nas folhas e raízes**

O material seco foi triturado em moinho tipo Wiley e determinou-se o teor de Zn por meio de digestão nítrico perclórico e leitura em espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP – OES).

### **Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica**

A quantificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizada seguindo o método de Alexieva et al. (2001). Os homogeneizados foram obtidos a partir de 0,2 g de tecido fresco foliar moído em nitrogênio líquido com a adição de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 0,1 % de solução de ácido tricloroacético (TCA) (p/v). O extrato foi centrifugado a 10000 rpm e 4 °C por 15 min. O meio de reação consistiu em 1,2 ml de KI 1 mM, tampão fosfato de potássio (pH 7,5 e 0,1 M) e extrato bruto. Os microtubos foram incubados em gelo no escuro por 1 h. Após este período, a absorbância foi lida a 390 nm. Uma curva padrão foi obtida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os resultados foram expressos em μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> de massa fresca.

A peroxidação lipídica foi estimada pela detecção de aldeído malônico (MDA). Foram macerados 150 mg de tecido vegetal em 2 ml de TCA a 0,1% (p/v) e centrifugadas a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi adicionado a 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,5% (p/v) e a mistura foi incubada em banho-maria a 95 °C por 20 minutos. Após este tempo, a reação foi paralisada em banho com gelo. Em seguida foi realizado uma nova centrifugação a 10000 rpm por 10 min. Após 30 min de temperatura ambiente, determinou-se absorbância a 532 e 600 nm em espectrofotômetro, para descontar a absorbância inespecífica a 600 nm. Para calcular a quantidade de MDA na amostra

considerou-se o coeficiente de absorvidade do MDA de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e o resultado foi expresso em  $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$  (Heath e Packer 1968).

### **Extrato proteico e atividade de enzimas do sistema antioxidante**

Os extratos vegetais foram obtidos a partir do macerado de 0,2 g de tecido fresco das folhas com nitrogênio líquido, 1 % de PVPP e 2 ml de meio de extração contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), tilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM e fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM. Após centrifugação do homogeneizado a 15000 rpm por 15 min e  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , os sobrenadantes (extratos brutos) foram coletados e preservados em gelo. Os níveis de proteína dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (Bradford 1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada seguindo o procedimento descrito em Havir e McHale (1987). O meio de reação consistiu em 3 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), água deionizada,  $\text{H}_2\text{O}_2$  125 mM e extrato bruto. A reação foi realizada em banho-maria a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min. Monitorou-se o decréscimo na absorbância em 240 nm a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e a atividade da CAT foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressa em  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação foi composto por 3 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,0), água deionizada, ácido ascórbico 10 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM e extrato bruto. A reação foi realizada em banho-maria a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min. Monitorou-se o decréscimo na absorbância a 290 nm por 1 minuto a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A atividade da APX foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação consistiu em 3 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,8), metionina 50 mM, EDTA 5 mM, água deionizada, extrato bruto, riboflavina 100  $\mu\text{M}$  e riboflavina 100  $\mu\text{M}$  e cloreto de tetrazólio azul nitro 1 mM (NBT). As reações foram montadas em duplicatas, pois um grupo de tubos foi exposto à luz de lâmpada fluorescente (30 W) por 5 minutos e o outro grupo permaneceu no escuro. A absorbância foi medida a 560 nm. Uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução NBT em 50 %, sendo expressa como  $\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

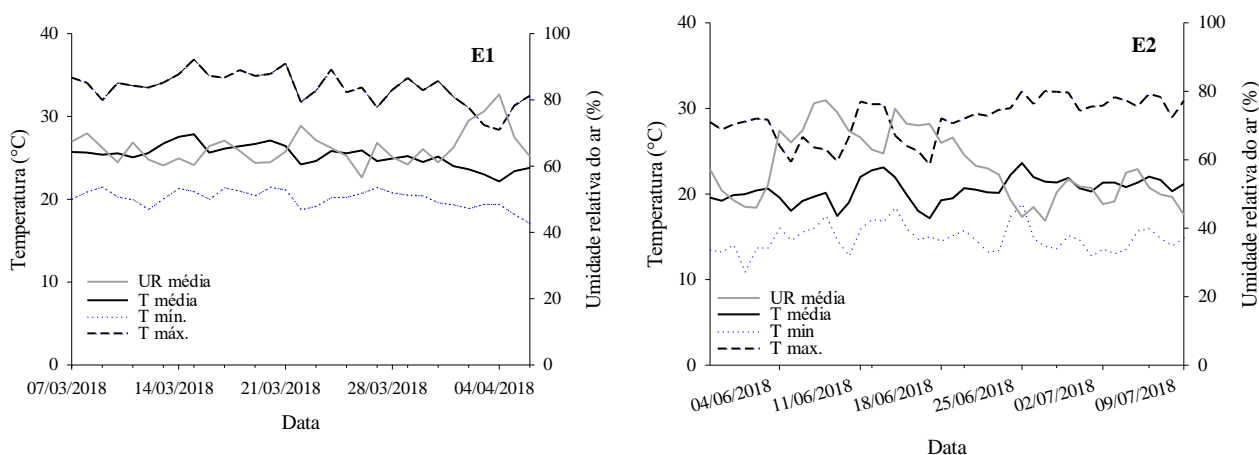
## Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através da ANOVA e do teste F. Quando as doses de Zn e as épocas de cultivo foram significativos, foi aplicado o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) para comparar as médias dos tratamentos. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

## Resultados

### Condições ambientais

De março a abril de 2018 (E1), as médias das temperaturas máxima, média e mínima foram de 33,5; 25,3 e 20,2 ° C, respectivamente. (Figura 1A). Nesse mesmo período, a umidade relativa do ar média foi de 65,6% (Figura 1A). De maio a junho de 2018 (E2), as médias das temperaturas máxima, média e mínima foram de 28,8; 20,5 e 14,9 ° C, respectivamente, e a umidade relativa média do ar foi de 57,9% (Figura 1B).



**Figura 1.** Condições ambientais ao longo do período experimental. Temperaturas diárias máxima, média e mínima do ar (T) e umidade relativa média do ar (UR) de 07 de março a 06 de abril (E1) e 29 de maio a 09 de julho de 2018 (E2).

As oscilações de temperatura, bem como a umidade relativa do ar, foram maiores ao longo da E2, (Figura 1B). As diferenças climáticas entre os experimentos causaram uma diferença na

duração do ciclo de cultivo. As plantas na E1 atingiram o ponto de colheita aos 30 DAT e na E2 aos 41 DAT.

### **Biomassa das plantas e concentração de Zn nas folhas e raízes**

Não foi observada interação entre as doses de Zn e as épocas de cultivo para a produção de massa seca nas folhas e raízes (Tabela 1). A massa seca das folhas em função das doses de Zn variou de 11,6 a 10,3 g e os maiores valores foram observados nas doses 0, 5 e 10 mg de Zn dm<sup>-3</sup>, com média para as duas épocas de 11,6; 11,6 e 11,4 g, respectivamente (Figura 2A). Nas doses de 20, 30 e 40 mg de Zn dm<sup>-3</sup> as massas foram significativamente menores que as primeiras, com valores de 11,0, 10,9 e 10,3 g, respectivamente (Figura 2A). Observou-se, portanto, que maiores quantidades de Zn no solo afetaram negativamente a produção de biomassa das plantas de alface Vanda, independentemente da época de cultivo.

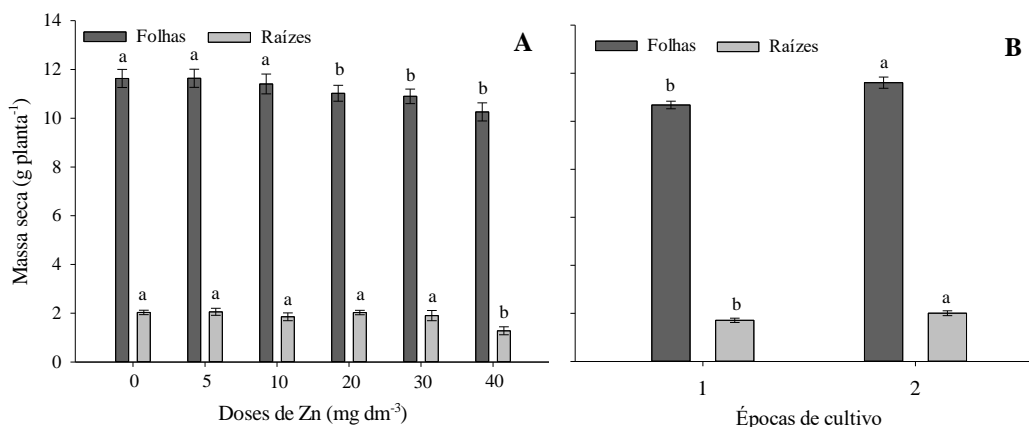
**Tabela 1.** Significância de acordo com ANOVA para as características teor de Zn, massa seca e características bioquímicas\* nas folhas da cv. Vanda, em função de doses de Zn no solo (0, 5, 10, 20, 30 e 40 mg dm<sup>-3</sup>) em duas épocas de cultivo

Fontes de variação	Teor Zn		Massa seca		
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	
Doses Zn	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,01	
Épocas cultivo	ns	< 0,001	< 0,01	< 0,05	
Doses Zn x épocas	ns	< 0,001	ns	ns	
Fontes de variação	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SOD	CAT	APX
Doses Zn	ns	< 0,05	< 0,01	ns	ns
Épocas cultivo	< 0,001	ns	ns	< 0,01	< 0,001
Doses Zn x épocas	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,05

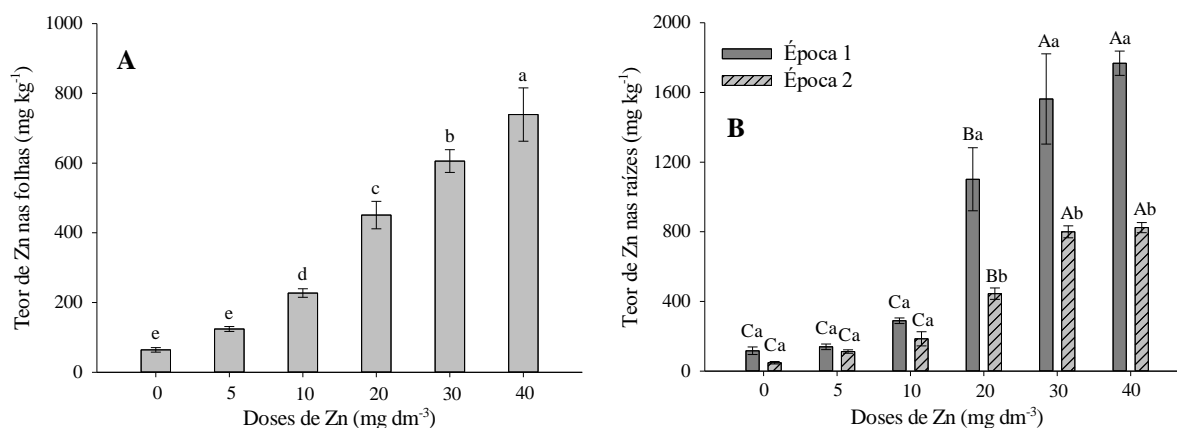
ns = não significativo (p > 0,05). \* Abreviações: MDA, aldeído malônico; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase.

Não houve variação significativa na massa seca das raízes nas doses de 0 a 30 mg Zn dm<sup>-3</sup>, independentemente da época de cultivo, com valores de 1,8 (10 mg Zn dm<sup>-3</sup>) a 2,0 g planta<sup>-1</sup> (5 mg Zn dm<sup>-3</sup>). Assim, não houve diferenças significativas entre essas massas. No entanto, o observado com 40 mg de Zn dm<sup>-3</sup> foi de 1,3 g e significativamente menor que os demais (Figura 2A).

Comparando a massa seca média das folhas e raiz entre as duas épocas de cultivo, observou-se que na E1 as massas foram significativamente menores, com valores de 10,7 g para as folhas e 1,7 g para a raiz, comparados com 11,6 e 2,0 g, respectivamente, na E2 (Figura 2B). As temperaturas mais altas e a umidade relativa do ar durante a E1 resultaram em um ciclo de cultivo 11 dias mais curto e podem ter influenciado na produção de biomassa.



**Figura 2.** Massa seca das folhas e raízes de alface Vanda em função de doses de Zn no solo (A) e épocas de cultivo (B) E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4).



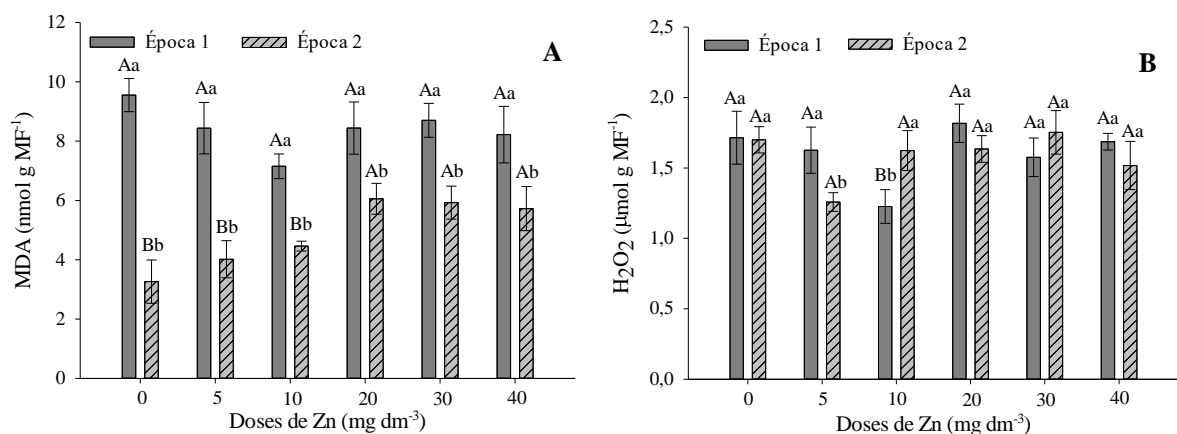
**Figura 3.** Teor de Zn nas folhas (A) e nas raízes (B) em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho) da alface Vanda. Letras maiúsculas em B representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média  $\pm$ desvio padrão (n=4).

Não houve interação significativa entre as doses de Zn e as épocas de cultivo para a concentração de Zn nas folhas, mas ocorreu nas raízes (Tabela 1). Independentemente da época, o teor nas folhas aumentou de acordo com as doses crescentes, com os menores valores observados nas doses de 0 e 5 mg Zn dm<sup>-3</sup> (Figura 3A).

Em relação à concentração de Zn na raiz, nas três primeiras doses observou-se valores próximos em ambas a épocas, não diferindo significativamente entre E1 e E2 (Figura 3B). A partir da dose de 20 mg Zn dm<sup>-3</sup>, houve aumentos significativos, atingindo 1767,9 mg kg<sup>-1</sup> e 823,6 mg kg<sup>-1</sup> na E1 e E2, respectivamente. Assim, a partir de 20 mg de Zn dm<sup>-3</sup>, as concentrações na E1 foram superiores a E2 (Figura 3B).

### Danos oxidativos

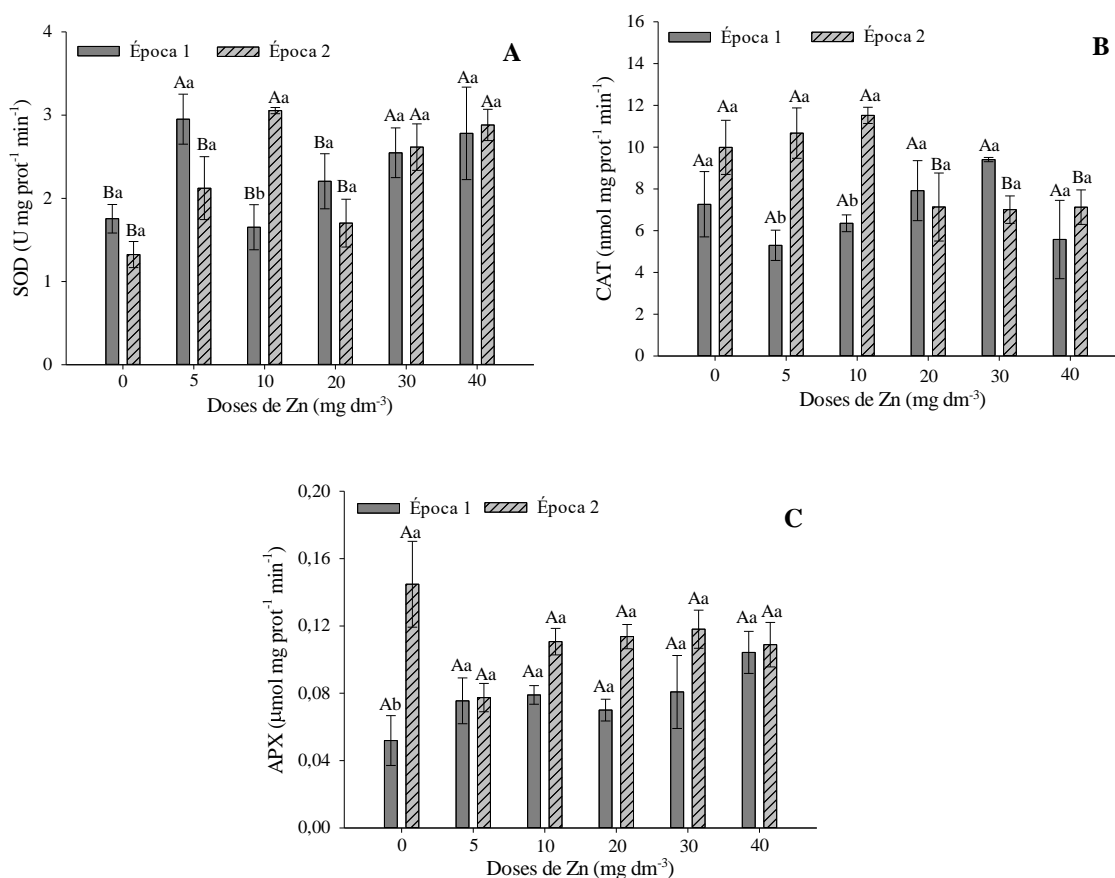
A peroxidação lipídica das folhas não foi alterada significativamente na E1 em função da dose utilizada. No entanto, o conteúdo de MDA foi significativamente maior em E1 comparado com E2 (Figura 4A). Na E2 houve um aumento na peroxidação a partir da dose de 20 mg dm<sup>-3</sup>. Em relação ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ambas as épocas apresentaram concentrações semelhantes, com reduções pontuais nas doses de 10 e 5 mg dm<sup>-3</sup> na E1 e E2, respectivamente (Figura 4B).



**Figura 4.** Concentração de aldeído malônico – MDA (A) e peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) em folhas de alface Vanda em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Letras maiúsculas representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média ±desvio padrão (n=4).

## Atividade antioxidante

Houve interação significativa entre as doses e as épocas de cultivo para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX (Tabela 1). A atividade da SOD nas folhas aumentou com as maiores doses (30 e 40 mg dm<sup>-3</sup>) na E1 e E2 (Figura 5A). A atividade de CAT nas folhas reduziu a partir de 20 mg dm<sup>-3</sup> na E2 (Figura 5B). Na E1 não houve diferença significativa em função das doses (Figura 5B). Para a atividade de APX nas folhas, não houve diferença entre as doses de Zn em ambas a épocas (Figura 5C).



**Figura 5.** Atividade da superóxido dismutase – SOD (A), catalase – CAT (B) e ascorbato peroxidase - APX (C) em folhas de alface Vanda em função de doses de Zn no solo e épocas de cultivo E1 (março a abril) e E2 (maio a julho). Letras maiúsculas representam diferença entre as doses de Zn e as letras minúsculas a diferença entre as épocas de cultivo. Os dados estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

## Discussão

Em condições de excesso de Zn no solo, normalmente os teores deste nutriente são maiores nas raízes que na parte aérea (Gupta et al. 2016), como confirmado no presente estudo para a dose de 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, onde o teor nas raízes atingiu 1740 e 851 mg Zn kg<sup>-1</sup> na E1 e E2, respectivamente. Dessa forma pode haver toxicidade de Zn nas células radiculares, prejudicando a produção de biomassa (White e Broadley 2011, Islam et al. 2007).

Os menores teores de Zn nas raízes observados na E2, em relação à E1, podem indicar que as condições climáticas da E2 foram mais favoráveis às plantas biofortificadas, conferindo maior tolerância ao Zn e maior massa seca das folhas. Alguns estudos sugerem que em situações de excesso de Zn, a planta produz ácidos orgânicos, como citrato, malato e oxalato, que agem como quelatos para sequestrar este nutriente da célula da raiz e transportá-lo via xilema. Dessa forma ocorre o equilíbrio na translocação e acúmulo do nutriente, garantindo distribuição do Zn na planta e a maior tolerância à toxicidade do elemento (Küpper et al. 2000, Assunção et al. 2003, Haydon e Cobbett 2007, Barrameda-Medina et al. 2014b).

O possível desequilíbrio na distribuição do nutriente na planta na E1 pode ter acarretado à maior peroxidação lipídica, o que resultou em danos celulares e menor biomassa. Além disso as maiores temperaturas do ar na E1 foram fator de estresse para a planta. Segundo Mittler (2002) em condições de temperaturas extremas, radiação solar, seca, salinidade, tensão mecânica e patógenos, há um excesso de produção das EROs nas plantas e, conseqüentemente, peroxidação lipídica.

Além dos fatores climáticos, as doses de Zn também induziram o estresse oxidativo, aumentando a concentração de MDA. Resultados semelhantes foram observados por Sofo et al. (2018), com aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA em plantas de alface e *Arabidopsis thaliana* L. cultivadas na maior dose de Zn (150 µM Zn).

Apesar da peroxidação lipídica, não houve diferenças nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em função das doses, este fato pode estar atribuído à diluição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no homogeneizado para sua quantificação. Segundo estudo de Silveira et al. (2017) em cana de açúcar sob déficit hídrico, o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreu localmente nas células do mesófilo próximas às células guardas dos estômatos, no entanto, quando se quantificou o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma geral no tecido foliar, não se observou diferenças em relação às plantas controle.

A maior atividade da SOD em ambas as épocas nas duas últimas doses pode indicar que

houve a produção de  $H_2O_2$ , pois esta enzima é a primeira na linha de defesa contra efeitos tóxicos de EROs, catalisando a reação de dismutação do  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O_2$  e oxigênio molecular (Cakmak 2000).

Além disso, a maior produção de  $H_2O_2$  pode ter sido compensada com o aumento da atividade da CAT em função das doses de Zn na E1, uma vez que esta enzima decompõe o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e oxigênio, sendo fundamental na desintoxicação de peróxidos (Lin e Kao 2000). Já na E2 houve redução da atividade da CAT nas maiores doses de Zn, possivelmente em função do menor dano oxidativo em relação à E1 e/ou às condições de cultivo, pois a atividade da CAT associa-se ao tecido vegetal estudado, às condições de cultivo e espécie vegetal (Bhaduri e Fulekar 2012).

A atividade da APX pareceu estar em equilíbrio com a atividade da CAT. Nas doses de 0 e 40 mg Zn  $dm^{-3}$  da E1 houve maior e menor atividade da CAT, respectivamente, e o oposto aconteceu com APX. Na E2 observou-se estabilidade na atividade das duas enzimas nas doses de 20 a 40 mg Zn  $dm^{-3}$ , assim como o observado para concentração de MDA e  $H_2O_2$ . Estes resultados estão de acordo com Mittler (2002), que afirmou que o equilíbrio entre as atividades de SOD e APX ou CAT é fundamental para determinar os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio, bem como ocorrer a desintoxicação.

As mudanças ocorridas no metabolismo antioxidante das alfices biofortificadas indicaram que as maiores doses de Zn foram fatores de estresse para as plantas. Estas condições induziram ao aumento da SOD como mecanismo de defesa. Além disso, houve redução na biomassa e danos visuais. Estes resultados estão de acordo com Sagardoy et al. (2009) e Broadley et al. (2007) que afirmaram que concentrações acima de 300 mg Zn  $kg^{-1}$  podem provocar redução do crescimento, alterações no metabolismo dos carboidratos, danos oxidativos às membranas, alterações da atividade fotossintética, entre outros processos.

Dessa forma, mais estudos são necessários com outras cultivares e outras condições de cultivo para complementar estes resultados e fortalecer os programas de biofortificação agrônômica, de forma que a tecnologia seja sustentável nos âmbitos econômico e ambiental.

## **Conclusões**

A biofortificação agrônômica em alface com doses de 20, 30 e 40 mg Zn  $dm^{-3}$  resultou em maior peroxidação lipídica (MDA) e menor massa seca, indicando que estas doses no solo foram fatores de estresse para a planta, induzindo ao aumento da atividade da SOD em ambas as épocas

de cultivo.

As plantas cultivadas sob as temperaturas mais amenas da E2 apresentaram menor peroxidação lipídica em relação à E1, ao passo que a massa seca foi maior, sendo as condições climáticas da E2 mais favoráveis para as plantas biofortificadas com Zn.

As atividades da CAT e APX se mantiveram estáveis nas doses de 20 a 40 mg Zn dm<sup>-3</sup>, mas suficientes para manter as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado da primeira autora.

## Referências

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.*, 24: 1337–1344.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., Singh, T. P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.*, 171:382–388.
- Alonso-Blázquez, N., García-Gómez, C., Fernández, M. D. (2015). Influence of Zn-contaminated soils in the antioxidative defence system of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) at different exposure times: potential use as biomarkers. *Ecotoxicology*, 24, 279–291.
- Assunção, A. G. L., Schat, H., Aarts, M. G. M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.*, 159, 351–360.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J. M. (2014a). Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *PlantSci.*, 227, 110–121.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Ruiz, J. M., Blasco, B. (2014b). Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants: I. Growth, distribution, and accumulation of Zn, and metabolism of carboxylates. *Environ. Exp. Bot.*, 107, 98–104.
- Bhaduri, A., Fulekar, M. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 11, 55–69.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248–254.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.*, 173, 677–702.
- Cakmak, I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol*, 146: 185-205.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 302: 1–17.
- Chakraborty, U., Pradhan, D. (2011). High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *J Plant Interact*, 6:43–52.
- Clemens, S. (2017). How metal hyperaccumulating plants can advance Zn biofortification. *Plant Soil*, 411, 111–120.
- Fontes, R. L. F., Pereira, J. M. N., Neves, J. C. L. (2014). Uptake and translocation of Cd and Zn in two lettuce cultivars. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 907-922.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28: 1056-1071.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59: 309–314.
- Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89–109.
- Havir, E. A., Mchale, N. A. (1987). Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 84: 450–455.
- Haydon, M. J., Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *NewPhytol.*, 174, 499–506.
- Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189–198.
- Huseynova, I. M. (2012). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochim Biophys Acta*. 1817, 1516–1523.
- Islam, E. ul., Yang, X. E., He, Z. L., Mahmood, Q. (2007). Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8, 1–13.

- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, B. (2007). Trace Elements from Soil to Human. Berlin: Springer-Verlag.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F. J., McGrath, S. P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212, 75–84.
- Lin, C. C., Kao, C.H. (2000). Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. *J Plant Growth Regul.*, 30, 151–155.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7, 405–410.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity, in: G. Montanaro, B. Dichio (Eds.), *Advances in Selected Plant Physiology Aspects* (p. 23–44). Rijeka, Croatia: InTech.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867–880.
- Rink, L., Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.*, 59, 541–552.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol.*, 11, 339–350.
- Sakata. Folhosas – alface. (2017). Disponível em: <<http://www.sakata.com.br/produtos/hortalicas/folhosas/alface>> Acessado em: 7 ago. 2017.
- Sala, F. C., Costa, C. P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 30: 187-194.
- Sala, F. C., Costa, C. P. (2012). Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 30: 187-194.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedling exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.*, 26: 2027-2038.
- Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Ávila-Quezada, G. D., Flores-Córdova, M. A., J., Márquez-Quiroz, C., PreciadoRangel, P. (2017). Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans? *Emir. J. Food. Agric.*, 29: 237–241.
- Silveira, N. M., Marcos, F. C. C., Frungillo, L., Moura, B. B., Seabra, A. B., Salgado, I., Machado, E. C., Hancock, J. T., Ribeiro, R. V. (2017). S-nitrosoglutathione spraying improves stomatal conductance, Rubisco activity and antioxidant defense in both leaves and roots of sugarcane plants under water deficit. *Physiol. Plant.*, 160: 383–395.

Sofo, A., Lundegårdh, B., Mårtensson, A., Manfra, M., Pepe, G., Sommella, E., De Nisco, M., Tenore, G. C., Campiglia, P., Scopa, A. (2016). Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce, *Sci. Hortic.* 204, 106–115.

Sofo, A., Moreira, I., Gattullo, C. E., Martins, L. L., Mourato, M. (2018). Antioxidant responses of edible and model plant species subjected to subtoxic zinc concentrations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49:261-268.

Trani, P. E., Purquerio, L. F. V., Figueiredo, G. J. B., Tivelli, S. W., Blat, S. F. (2018). Alface, Almeirão, Agrião-d’água, Chicória, Coentro, Espinafre e Rúcula. In Trani, P.E. et al. *Hortaliças: recomendações de calagem e adubação para o estado de São Paulo* (p. 23-26). Campinas: CATI.

White, P. J. and Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-11.

White, P. J., Pongrac, P., Sneddon, C. C., Thompson, J. A., Wright, G. (2018). Limits to the biofortification of leafy Brassicas with zinc. *Agriculture*, 32, 2-14.

World Health Organization (WHO). (2013). Urinary iodine concentrations for determining iodine status in populations. WHO/NMH/NHD/EPG/13.1.

Yin, H., Chen, Q. M., Yi, M.F. (2008). Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regul.*, 54:45–54.

## Material suplementar

**Tabela S1.** Atributos químicos do solo usado no experimento.

M.O.	pH	P	K	Ca	Mg	H + Al	S.B.	C.T.C.	V	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
g dm <sup>-3</sup>	-	mg dm <sup>-3</sup>	.....	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	.....	%	.....	mg dm <sup>-3</sup>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
9	5,5	25	1,7	19	6	12	26,7	38,7	69	4	0,14	0,4	16	3,6	0,6

O.M. –Matéria orgânica; S.B – Soma de bases; C.T.C. – Capacidade de troca catiônica; V – Saturação por bases.

## 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A deficiência de Zn na população é uma das mais preocupantes devido aos graves efeitos prejudiciais na saúde, gerando interesse nas comunidades científicas e organizações de saúde internacionais. Este estudo apresentou a importância e papel da nutrição mineral de plantas na redução deste problema, uma vez que o manejo de fertilizante com Zn tem relação com a concentração do nutriente na planta e, conseqüentemente, na quantidade ingerida.

A alface apresentou potencial de acúmulo de Zn nas folhas em função de doses aplicadas no solo, confirmando a hipótese de que esta estratégia pode ser eficiente para biofortificar esta espécie. Conforme demonstrado no capítulo 1, o consumo de 50 g dessas plantas biofortificadas dentro do limite permitido de Zn nos alimentos, pode contribuir com até 20 % na sua ingestão diária recomendada. Considerando que a alface é a principal hortaliça folhosa consumida, este produto trará benefícios à população, podendo inclusive ser inserido em merendas escolares. Ainda, a tecnologia apresentada neste estudo utiliza fertilizante de baixo custo, beneficiando o produtor rural que oferecerá produto com valor agregado.

Apesar do potencial de acúmulo pela alface, houve redução de massa das plantas e danos com sintomas visuais nas altas doses de Zn, o que reduziu a produtividade e tornou o produto inviável para comercialização. A Saladela, por apresentar maior concentração inicial de Zn que a Vanda, foi mais afetada pela toxidez do nutriente. Os teores limites nas plantas e no solo apresentados no capítulo 2 sugerem que o manejo do fertilizante na biofortificação agrônômica respeite a sensibilidade dos genótipos, visando adequada produtividade e qualidade.

As épocas de cultivo influenciaram significativamente na massa das plantas, teor e acúmulo de Zn, principalmente para Saladela. Estes resultados mostraram que, além do genótipo e doses de fertilizante, a absorção do nutriente pelas plantas também está relacionada com fatores climáticos. Portanto, a quantidade de Zn aplicado visando a biofortificação agrônômica deve ser balizada em função da época de cultivo. Assim, enfatiza-se a importância de estudos neste sentido visando contribuir para a sustentabilidade desta tecnologia.

O estudo do capítulo 3 confirmou a hipótese de que altas temperaturas do ar e concentrações de Zn nas folhas de alface causam danos oxidativos nas células da planta e aumento da atividade da SOD e CAT como sistema de defesa. Estes resultados ressaltam a necessidade de aliar a pesquisa científica básica com a aplicada, conhecendo os efeitos da biofortificação agrônômica com Zn na

planta, na produtividade e qualidade. Dessa forma, torna-se possível determinar as quantidades adequadas de fertilizantes, de forma que biofortificação agronômica não cause fitotoxicidade com consequente redução na produtividade e qualidade. No entanto, mais estudos nesta linha de pesquisa devem ser realizados em campo, com cultivo convencional em solo e em hidroponia para validação dos resultados e estabelecimento de recomendações de doses de Zn para biofortificação agronômica em escala comercial.