

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Metabolismo do nitrogênio e estado nutricional do cafeeiro (*Coffea arabica*)**

**André Rodrigues dos Reis**

Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba  
2007**

**André Rodrigues dos Reis**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Metabolismo do nitrogênio e estado nutricional do cafeeiro (*Coffea arabica*)**

Orientador:  
Prof. Dr. **JOSÉ LAÉRCIO FAVARIN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Reis, André Rodrigues dos  
Metabolismo do nitrogênio e estado nutricional do cafeeiro (*Coffea arabica*) / André  
Rodrigues dos Reis. - - Piracicaba, 2007.  
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Aminoácidos 2. Ativação enzimática 3. Café 4. Glutamina 5. Metabolismo mineral  
6. Nitrogênio I. Título

CDD 633.73

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

## **DEDICO**

Ao meu grande pai Constantino Rodrigues dos Reis, por seus rígidos ensinamentos, pois dessa forma me tornei uma pessoa mais cautelosa, sempre me ensinando o significado das palavras honra, dedicação, respeito e esforço próprio.

À minha mãe Francisca Cardoso dos Reis, a qual sempre acreditou no meu potencial, esteve sempre presente me apoiando, incentivando nos momentos difíceis, de desespero, mas também nos momentos de alegrias, de vitórias e de conquistas. Tu és uma pessoa única, iluminada e tenho muito orgulho de ser seu filho. Saiba que minhas vitórias até o momento não foi apenas mérito meu, somente nós dois sabemos o quão dura foi a batalha. Sempre me lembro de suas palavras “...quanto maior o sofrimento, a dor, mais saborosa será a vitória”, testemunhei isso e hoje lhe ofereço mais essa conquista. Porém adianto que meus sonhos ainda não se concretizaram, muito pelo contrário, eles estão só começando, terminei uma pequena etapa e ainda há muito que fazer e sei que poderei contar sempre com a senhora, independente onde eu esteja...

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao estimado Professor Dr. José Laércio Favarin, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, paciência e apoio em todas as etapas deste trabalho.

Aos Professores Dr. Eurípedes Malavolta e Antônio Luis Gallo pela amizade, atenção, apoio e colaboração no trabalho de pesquisa.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produção de Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Ref. Proc. 06/54552-0) pelo apoio financeiro e institucional prestado para a realização deste trabalho.

Aos Biólogos Ênio Tiago de Oliveira, Cleusa Pereira Cabral e Gislei Gonçalves pela grande amizade desenvolvida, apoio, incentivo e auxílio na condução dos experimentos e análises laboratoriais.

Às secretárias Sílvia Borghesi e Luciana Lopes e os funcionários Celestino “Tino” e Marcelo Batista pela grande amizade desenvolvida, colaboração e convívio salutar.

Aos meus “irmãos” Milton Ferreira de Moraes e José Lavres Júnior pelo convívio, amizade, pela união fraterna, convívio diário e auxílio mútuo.

Ao estagiário Samuel Neves Alves pela colaboração durante a execução do experimento e pela amizade.

Aos amigos da ESALQ e do CENA, em especial a Marcelo Júnior Gimenes, Rafael Vivian, Evandro Binotto, Suzi Manesco, Renata Fini, Bianca Magali, Paula Salgado, Tiago Tezzoto, Fabiana Taveira de Camargo, Rodrigo de Almeida, Cristiana de Gaspari-Pezzopane, Carlos Ragassi.

À Biblioteca da ESALQ, em especial a Sílvia Maria Zinsly e Eliana Maria Garcia pela revisão das normas técnicas, pelo pronto atendimento e orientação no uso dos recursos informacionais da biblioteca.

Ao GEA (Grupo de Experimentação Agrícola) pelo auxílio nos trabalhos de campo, pela amizade e convívio.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho e que de forma injustas não citadas aqui.

“O inverno nunca falha em tornar-se primavera”

Daisaku Ikeda

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Absorção do N pelas plantas.....	11
1.2 Metabolismo do nitrogênio.....	12
1.3 Assimilação de nitrogênio pelas plantas.....	14
1.4 Atividade da redutase do nitrato (RN).....	15
1.5 Atividade da glutamina sintetase (GS).....	17
1.6 Material e Métodos.....	19
1.6.1 Caracterização do solo utilizado.....	20
1.6.2 Dados meteorológicos.....	20
1.6.3 Extração e determinação da atividade da RN.....	21
1.6.4 Preparo dos extratos para análise de GS.....	23
1.6.5 Determinação da atividade da GS.....	23
1.6.6 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS).....	24
1.7 Resultados e Discussão.....	24
1.8 Conclusões.....	31
Referências.....	31
2 RELAÇÃO ENTRE FOTOSSÍNTESE, CLOROFILA E LEITURAS SPAD EM FOLHAS DE CAFÉ EM FUNÇÃO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA.....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
2.1 Introdução.....	38
2.1.1 O papel bioquímico do N na assimilação do carbono.....	38
2.1.2 Capacidade fotossintética e nitrogênio foliar.....	39
2.1.3 Uso clorofilômetro para monitorar o nitrogênio.....	40
2.2 Material e Métodos.....	43
2.2.1 Medidas fotossintéticas.....	43
2.2.2 Extração e determinação de clorofila.....	44
2.2.3 Leituras SPAD.....	44
2.3 Resultados e Discussão.....	46



2.4 Conclusões.....	42
Referências.....	52
3 REMOBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES, AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E AMIDO PELAS FOLHAS E FRUTOS EM CAFEIEIRO.....	56
Resumo.....	56
Abstract.....	57
3.1 Introdução.....	57
3.2 Revisão Bibliográfica.....	58
3.3 Composição química do café.....	59
3.4 Material e Métodos.....	61
3.4.1 Composição química.....	61
3.4.2 Determinação de proteína solúvel total (PTS).....	61
3.4.3 Determinação de aminoácidos totais .....	62
3.4.3.1 Obtenção dos extratos para análise qualitativa de aminoácidos.....	62
3.4.3.2 Análise qualitativa de aminoácidos.....	62
3.5 Determinação de carboidratos.....	63
3.5.1 Determinação de amido.....	63
3.5.1.1 Obtenção do extrato.....	63
3.5.1.2 Quantificação de amido .....	63
3.5.1.3 Determinação de açúcares redutores .....	64
3.6 Resultados e Discussão.....	64
3.6.1 Teores de NPK e Ni em folhas e frutos.....	64
3.6.2 Degradação de compostos durante senescência foliar.....	69
3.6.3 Composição química de grãos.....	72
3.6.4 Produtividade de cafeeiro.....	75
3.7 Conclusões.....	76
Referências.....	76

## RESUMO

### **Atividade da redutase do nitrato e sintetase da glutamina durante a fase reprodutiva do cafeeiro**

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar atividade da redutase do nitrato (RN), sintetase da glutamina (GS) e conteúdo de proteína total solúvel (PTS) em folhas de cafeeiro durante o desenvolvimento dos frutos em condições de campo. O experimento foi instalado em blocos ao acaso em esquema fatorial 3x6, constituído pela combinação de 3 doses de N (0, 150 e 350 kg ha<sup>-1</sup>) e avaliado em seis diferentes fases fenológicas (janeiro, fevereiro, março, abril, maio e junho), com sete repetições. No experimento foi utilizada a cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 com seis anos implantada num Nitossolo Vermelho Eutroférico, no município de Piracicaba-SP. Com relação à atividade da RN, GS e PTS em função das doses de N verificou incremento nos valores da atividade destas enzimas e do teor de proteína total solúvel em função da dose de N. As maiores atividades da RN foram obtidas no mês de janeiro (0,834, 1,370 e 1,781  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ ), bem como para a GS (82,47, 95,31 e 136,72  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ ). O teor de proteína solúvel total (PTS) apresentou a mesma tendência (0,62, 5,66 e 6,52 mg mL<sup>-1</sup>). Estes valores foram obtidos em frutos na fase chumbinho. Durante o desenvolvimento dos frutos do cafeeiro a atividade das enzimas estudadas e o conteúdo de PTS foliar diminuíram, ao longo do tempo de janeiro a junho (maturação frutos).

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*; Nitrogênio; Atividade enzimática; Assimilação de nutrientes

## ABSTRACT

### **Nitrate reductase and glutamine synthetase activity during coffee plant reproduction**

The aim of this work was to evaluate the nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) activity, total soluble protein content (PTS) in coffee leaves during the fruits development in field conditions. The study was carried out in ESALQ/USP (University of São Paulo), Piracicaba, São Paulo, Brazil in a Red Nitosol eutrofic. The experimental design was a complete randomized, in a factorial outline 3 x 6, constituted by combination of 3 levels (0, 150 and 350 kg ha<sup>-1</sup>) of nitrogen in six different periods (January, February, March, April, May and June) in plants (Cultivar Catuaí Vermelho IAC 44). The RN, GS activity and leaves PTS content was linear increased in relation of levels of N applied. In accordance with the present study, the enzymes had presented greater activity during the January than other months (0,834, 1,370 and 1,781  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{DF h}^{-1}$ ) of RN; (82,47, 95,31 and 136,72  $\mu\text{mol yGH h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PTS}$ ) of GS and (0,62, 5,66 and 6,52 mg mL<sup>-1</sup>) of total soluble protein (PTS), in the treatments T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>, respectively. In January, the fruits were young grains and this period the coffee plant has high enzymatic activity. However, the capacity of nitrate assimilation during the annual cycle of coffee plants can be change through the environment and climatic variations and this phase (January) was verified a great precipitation. During the coffee fruits development, the RN and GS activity and the foliar PTS content had decreased, this occur due to the process of senescence of leaves, promote it the remobilization to other plant organs, as seed filling.

**Keywords:** *Coffea Arabica*; Nitrogen; Enzymatic activity; Nutrients assimilations

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Absorção do n pelas plantas

No solo, o N encontra-se em formas orgânicas (restos culturais e matéria orgânica), mineral ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) e em formas gasosas combinadas ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{NO}$ ). Da quantidade total de N presente no solo, apenas 2% encontra-se disponível às plantas. Anualmente são liberados cerca de 20 a 30 kg  $\text{ha}^{-1}$  de N, para cada ponto percentual de matéria orgânica contida no solo (HAVLIN et al., 2005).

Nas plantas o N representa de 1 a 6% da sua matéria seca absorvido sob diferentes formas (HAVLIN et al., 2005), que incluem: absorção pelas folhas de pequenas quantidades de  $\text{NH}_3^+$  (MATTSON; SCHJOERRING, 1999), fixação biológica do  $\text{N}_2$  atmosférico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002), absorção de  $\text{NH}_4^+$  através da mineralização da matéria orgânica e adubos nitrogenados, absorção de aminoácidos presentes na solução do solo pelas raízes e folhas (MALAVOLTA, 2006). Porém, às formas preferenciais de absorção de N pelas plantas são aquelas mais abundantes na solução do solo,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

A forma predominante de N no solo, normalmente, é o  $\text{NO}_3^-$  (HAVLIN et al., 2005; OLSON; KURTZ, 1982). Isto porque, em condições de boa drenagem e altas temperaturas o amônio proveniente da mineralização da matéria orgânica e/ou solubilização de alguns fertilizantes nitrogenados, é rapidamente nitrificado, predominando a forma de  $\text{NO}_3^-$  nos solos. Em períodos de baixas temperaturas e umidade associada à mesma, o processo de nitrificação é limitado, levando a um acúmulo nos solos do nitrogênio amoniacal, sendo este usado preferencialmente para síntese de aminoácidos e proteínas Havlin et al. (2005).

A absorção do  $\text{NO}_3^-$  da solução do solo causa modificações no pH rizosférico, com efeito sobre a absorção de outros nutrientes (HAVLIN et al., 2005). Tais incrementos, podem levar o pH da rizosfera a diferir até 2 unidades do restante do solo, acidificando ou

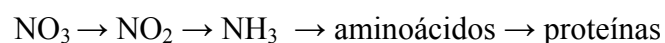
alcalinizando o meio, dependendo da fonte de N absorvida ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) Havlin et al. (2005).

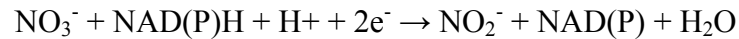
Independente das formas de N disponíveis no solo para absorção pelas plantas, algumas espécies condicionadas por fatores como idade, variáveis ambientais e genéticas, tornam-se mais sensíveis à absorção e acúmulo de algumas formas de N. Em estudo realizado por Fernandes, (1990) com duas variedades de arroz sob combinação de luz e temperatura, fornecendo diferentes fontes de N para as plantas (sulfato de amônio e nitrato de cálcio), verificou-se maior acúmulo de matéria fresca nas plantas que receberam fontes nítricas de N. Para as plantas que receberam fontes amoniacais houve diminuição do peso de massa fresca e acúmulo de aminoácidos livres, com intensa mobilização de cadeias de carbono para evitar o efeito tóxico do  $\text{NH}_4^+$  livre, colocando-o sob a forma de amidas com grande deslocamento de carboidratos para as raízes Fernandes, (1990).

## 1.2 Metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio é o nutriente mais dispendioso e o único exigido em grande quantidade para a maioria das culturas, principalmente o cafeeiro. Ainda que presente em altos níveis nos solos, a quantidade do N na forma mineral é geralmente baixa. No ecossistema natural há perda contínua de N, não só devido à absorção destes pelas plantas, mas também por lixiviação, volatilização e desnitrificação Peoples et al. (1995).

As plantas assimilam a maioria do nitrato absorvido por suas raízes em compostos orgânicos nitrogenados, como segue: primeiro ocorre a redução do nitrato a nitrito, no citoplasma, pela enzima redutase do nitrato (RN) (TISCHINER, 2000), conforme a seguinte reação:





$$\Delta G = -34,2 \text{ kcal/mol } (-143 \text{ k/mol}); \Delta E = 0,74 \text{ V}$$

em que, NAD(P)H indica NADH ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida).

A forma mais comum da RN utiliza somente o NADH como doador de elétrons, enquanto a outra forma da enzima encontrada, predominantemente, em tecidos não-clorofilados, como raízes, pode usar tanto o NADH quanto o NADPH (WARNER; KLEINHOF, 1992). As duas formas de RN das plantas superiores são constituídas de três subunidades idênticas, com três grupos prostéticos cada: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme e o complexo molibdênio, onde são transferidos para nitrato.

Entre os fatores que regulam a RN nas plantas está o nitrato, a luz, os carboidratos, que atuam na transcrição e tradução (TAIZ; ZEIGER, 2004) e também conforme verificado por Kaiser e Huber (2001), por uma modulação pós-traducional. A atuação da luz e dos carboidratos se dá pela estimulação da proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina da proteína RN, promovendo a sua ativação.

O nitrito é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico (TAIZ; ZEIGER, 2004). As células vegetais transportam rapidamente o nitrito que foi originado na redução do nitrato do citosol para o interior dos cloroplastos das folhas e nos plastídeos das raízes. Nessas organelas, a enzima nitrito redutase (NiR) reduz o nitrito a amônio.

O amônio derivado da absorção pela raiz, ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, é convertido a glutamina e glutamato pelas ações sequenciais da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase, que estão localizadas no citosol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos.

Uma vez assimilado em glutamina ou glutamato, o nitrogênio pode ser transferido para outros compostos orgânicos por meio de diversas reações, incluindo a transaminação. A

interconversão entre glutamina e asparagina sintase equilibra o metabolismo do carbono e do nitrogênio (CORUZZI; BUSH, 2001).

### **1.3 Assimilação de nitrogênio pelas plantas**

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas. A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais. A conversão do nitrato à amônia, mediada pela RN, a qual reduz nitrato a nitrito, e pela redutase do nitrito, que converte nitrito à amônia. A amônia é então assimilada nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico das fontes para os drenos Lam et al. (1996).

Com exceção das plantas com associações simbióticas com *Rhizobium*, as plantas de cultivos comerciais adquirem nitrogênio principalmente pela absorção do nitrato pelas raízes. Na célula o nitrato é reduzido a nitrito e em seguida a amônio pelas enzimas NR e NiR respectivamente. A seguir o amônio é incorporado em aminoácidos pela ação conjunta das enzimas GS e sintetase do glutamato (GOGAT) Delú Filho et al. (1998).

O nitrato é a principal forma de N disponível para as plantas após a calagem e adubação, mas em áreas onde o pH é naturalmente baixo ou não foi devidamente corrigido a atividade microbiana é baixa, impedindo a conversão do amônio. A maioria das plantas absorvem o N na forma de nitrato, sendo que a forma amoniacal tem efeito tóxico para as células Coelho et al. (1991).

A assimilação redutiva do nitrogênio é um processo dispendioso energeticamente às plantas, razão porque ocorre, predominantemente, nas folhas, centro da síntese de energia (ATP) e agentes redutores (fornecedores de elétrons). O processo de incorporação do N

compete com a fotossíntese por carboidrato e energia, consumindo 12 ATPs para cada N assimilado pela planta Epstein e Bloom (2006).

Altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  são tóxicos para plantas, pois  $\text{NH}_4^+$  pode dissipar os gradientes de prótons trans-membrana requerido tanto para o transporte elétrico fotossintético quanto respiratório e para isolamento de metabólitos nos vacúolos Taiz e Zeiger (2004).

#### **1.4 Atividade da redutase do nitrato (RN)**

A RN é considerada enzima chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos nas raízes ou na parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O fluxo catalítico da RN ou a capacidade total de redução do nitrato pelas plantas depende: (i) da disponibilidade de substrato no citoplasma (concentração em estado de equilíbrio do NADPH e nitrato); (ii) do nível de RN funcional - quantidade de RN polipeptídica e da disponibilidade de cofatores e íons metálicos, FAD, heme, Fe, Mo-MPT (molibdênio–molibdopterina) e molibdênio; e, (iii) da intensidade da atividade da RN funcional (CAMPBELL, 1999).

Cada processo é regulado direta ou indiretamente e a capacidade de redução do nitrato é controlada em relação ao nível metabólico total da planta, por sensores e rotas de tradução de sinais. A resposta das plantas à quantidade de nitrato depende de outros fatores, entre os quais o material genético e o ambiente como, por exemplo, a luz, os quais influenciam a RN, bem como outros componentes do metabolismo do nitrato (CAMPBELL, 1999).

A RN é a principal proteína contendo molibdênio encontrado nos tecidos vegetativos, por isso na deficiência de molibdênio acumula nitrato (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A comparação entre as seqüências de aminoácidos da RN de diversas espécies com aquelas de outras proteínas já caracterizadas que se ligam ao FAD, heme ou ao molibdênio,



resultou em um modelo para a RN com três domínios apresentados na Figura 01. O domínio de ligação do FAD aceita dois elétrons do NADH ou do NADPH. Os elétrons são deslocados pelo domínio heme para o complexo molibdênio, onde são transferidos para o nitrato.

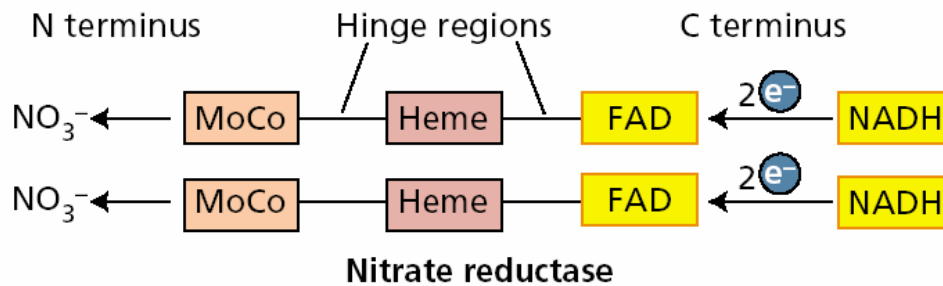


Figura 1 – Modelo de dímero da RN indicando os três domínios de ligação, dos quais as seqüências de polipeptídeos são similares nos eucariontes: complexo molibdênio (MoCo), grupo heme e FAD. O NADPH liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), através de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O nitrato é reduzido no complexo molibdênio próximo à região amino terminal. As seqüências dos polipeptídeos nas regiões *hinge* são altamente variáveis entre as espécies.

Fonte: (TAIZ; ZEIGER, 2004)

Vários experimentos já foram conduzidos usando genótipos de várias origens para testar a hipótese de se utilizar a atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar na seleção de materiais produtivos e responsivos à adubação nitrogenada.

Alguns trabalhos têm mostrado diferenças na atividade da RN entre partes da planta, destacando, normalmente, parte aérea e sistema radicular (LI; OAKS, 1993). Há registros também de diferenças entre RN de bainhas e folhas de *Brachiaria* sp Fernandes et al. (1978).

O potencial de assimilação do nitrato pode ser obtido pela razão entre as atividades da enzima induzida pelo nitrato e da RN inicial da folha. Este critério é adequado para o diagnóstico e orientação da adubação, porque no quociente são compensadas flutuações de atividades enzimáticas atribuídas a fatores ambientais (TALEISNIK; PACHECO, 1980).

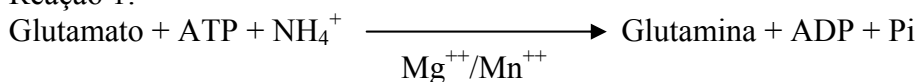
### 1.5 Atividade da glutamina sintetase (GS)

A GS foi primeiramente purificada e caracterizada em plantas em 1956. Em particular, sua característica é a alta afinidade por  $\text{NH}_3$  o que favorece a incorporação em compostos orgânicos. Originalmente, a glutamina foi considerada um doador de N amida somente para uma limitada quantidade de compostos. Porém, a descoberta da NAD(P)H glutamato sintase em bactéria (TEMPEST et al., 1971) e posteriormente glutamato sintase dependente de ferredoxina em plantas (LEA; MIFLIN, 1974). Estabeleceu-se uma rota, conhecida como ciclo do glutamato sintase, na qual o amônio é convertido a compostos orgânicos pela assimilação via sintetase da glutamina Miflin e Habash (2002).

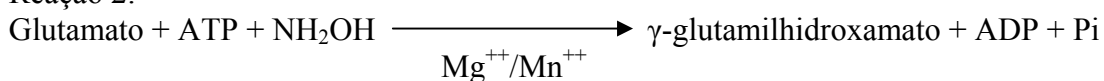
O amônio produto do processo de redução do nitrato não pode ser acumulado, portanto, deve ser rapidamente assimilado, ou seja, incorporado em compostos orgânicos evitando seu acúmulo nos tecidos. A enzima responsável é a sintetase da glutamina (GS), que catalisa a união do  $\text{NH}_4^+$  com o ácido glutâmico para formar glutamina, a qual é altamente eficiente. Dessa forma, em condições normais, o  $\text{NH}_4^+$  é mantido em concentrações baixas em tecido foliar Miflin e Habash (2002).

Conforme mostrado abaixo a GS utiliza glutamato, ATP e amônia com conseqüente produção de glutamina, ADP e Pi (Reação 1). Além da atividade sintetase, a GS funciona também biossinteticamente produzindo  $\gamma$ -glutamilhdroxamato a partir de glutamato, ATP e hidroxilamina (Reação 2). Funciona também como transferase produzindo  $\gamma$ -glutamilhdroxamato a partir de glutamina e hidroxilamina (Reação 3) Farden e Robertson (1980).

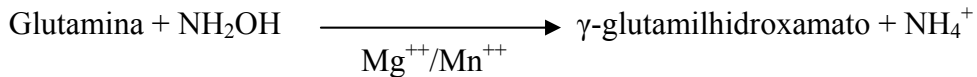
Reação 1:



Reação 2:



Reação 3:



A principal rota de assimilação do nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) pelas plantas se dá por meio da atividade da GS, a qual ocorre em diferentes isoformas e localizações na planta (McNALLY et al., 1983; HIREL et al., 1984).

Estruturalmente a GS é composta, predominantemente, de oito subunidades, resultando num arranjo octamérico. Cada subunidade tem massa molecular em torno de 47 kDa que resulta numa massa molecular total da enzima igual a 380 kDa (ROBERT; WONG, 1986) sugeriram que havia duas isoformas da enzima GS nas plantas, uma localizada no citoplasma (GS1) e a outra no cloroplasto ou plastídio (GS2).

Em estudo realizado sobre a ocorrência de isoenzimas da sintetase da glutamina (GS) em *Chrololela kessleri* foi observada a mesma massa molecular para GS1 e GS2 em torno de 350 kDa, com predominância da GS1 da ordem de 60 % a 80 % em relação a GS2, bem como uma maior estabilidade da GS1 ao calor - 30 °C durante 30 minutos (SUMAR et al., 1984). Segundo Bennett e Cullimore (1989) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) existe pelo menos quatro isoformas da enzima GS, inclusive em radículas de plântulas em germinação, assim como isoformas específicas para as plantas noduladas.

Nas folhas também existem duas enzimas diferentes a GS1 e a GS2. A GS1 é restrita ao citossol enquanto a GS2 ao cloroplasto (HIREL et al., 1984). Tem sido sugerido que a enzima GS1 possui a função de assimilação da amônia no citossol em condições de escuro (McNALLY et al., 1983). A enzima GS2 das folhas é induzida pela luz e o íon  $\text{NH}_4^+$ , estando envolvida, também, no uso do  $\text{NH}_4^+$  da fotorrespiração Edwards e Coruzzi (1989). Wallsgrove et al. (1987) demonstraram que a amônia produzida durante a fotorrespiração pode ser reassimilada pela planta no cloroplasto.

De acordo com Lam et al. (1996) a enzima GS, localizada nos plastídios das raízes, forma N-amida consumido in loco, enquanto a GS dos cloroplastos foliares reassimila o nitrogênio na forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) formado durante a fotorrespiração. A quantidade de carboidrato e de radiação influencia a expressão das formas dessa enzima presente nos plastídios, sem efeito sobre as formas citossólicas.

De maneira semelhante à RN a regulação da atividade da GS pode ser induzida por diferentes estímulos externos ou fisiológicos, dependendo do órgão da planta ou da isoforma da enzima (PUJADE-RENAUD et al., 1994). A luz, por exemplo, aumenta a quantidade de RNAm da enzima GS2 em folhas de ervilha, fumo e tomate (BECKER et al., 1993). EDWARDS e CORUZZI (1989) observaram que a expressão de um gene nuclear para GS2 é afetada, sensivelmente, pela luminosidade. Tjaden et al. (1995) descreveram a flutuação da atividade da enzima GS2 conforme a quantidade de radiação e da atividade da RN, observando aumentos da GS na presença de luz concomitantemente ao aumento da atividade da RN.

A partir da análise de extratos Woolfolk e Stadtman (1964) concluíram que a atividade da GS poderia ser quantificada por meio da formação do  $\gamma$ -glutamil hidroxamato, a qual pode ser inibida pela ação do AMP, GTP, CTP, alanina, glicina e triptofano nas concentrações de 0,002 a 0,005 M. Análises eletroforéticas evidenciaram que a enzima GS é composta por dois tipos de subunidades polipeptídicas. Tanto a isoforma da GS presente nas raízes como nas folhas são compostas de polipeptídeos denominados  $\alpha$  e  $\beta$  (LARA et al., 1984).

## **1.6 Material e Métodos**

O experimento foi realizado entre outubro de 2005 a julho de 2006, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), no município

de Piracicaba, no Estado de São Paulo, na latitude de 22°42'S, longitude de 47°38'W e 580 m de altitude.

Foram utilizadas plantas de café (*Coffea arabica*) cultivar Catuaí Vermelho IAC-44, plantadas em covas ao longo de curvas de nível em maio de 2001, com espaçamento de 1,75m entre linhas e 0,75m entre plantas, com uma população de, aproximadamente, 7.600 plantas por hectares.

### 1.6.1 Caracterização do solo utilizado

O solo da área experimental é classificado como Nitossolo Vermelho eutroférico, horizonte A moderado e textura argilosa (VIDAL TORRADO; SPAROVEK, 1993). A caracterização da fertilidade do solo foi feita por amostragem da camada de 0 a 20 cm de profundidade e analisada quimicamente (Tabela 1).

O experimento de adubação nitrogenada foi instalado com delineamento estatístico inteiramente casualizado com três tratamentos representando os níveis de N na forma de sulfato de amônio (18% N) e 5 repetições, descritos a seguir: T<sub>0</sub> - testemunha; T<sub>1</sub> – 150 kg ha<sup>-1</sup> e T<sub>2</sub> – 300 kg ha<sup>-1</sup>. As doses de N foram aplicadas em quatro épocas durante a estação das chuvas. A maior dose foi definida com base na expectativa de produção e na recomendação oficial (RAIJ et al., 1996).

Tabela 1- Características químicas da camada 0-20 cm do Nitossolo Vermelho Eutroférico da área experimental

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	.....mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....						%
5,3	31	8	4,3	29	20	30	53,1	83,1	64

### 1.6.2 Dados meteorológicos

O clima é do tipo Cwa segundo Köppen, classificado como tropical de altitude, com médias históricas anuais de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa iguais

a 21,1° C, 1.257 mm e 74%, respectivamente. A estação chuvosa se estende de outubro a março e o período seco vai de junho a setembro. Os dados obtidos na área experimental foram fornecidos pelo Posto Agrometeorológico automatizado do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, instalado no local do experimento, onde foram determinados os seguintes atributos climáticos: temperatura do ar, umidade relativa, velocidade do vento, precipitação, radiação solar e evapotranspiração (Figura 2).

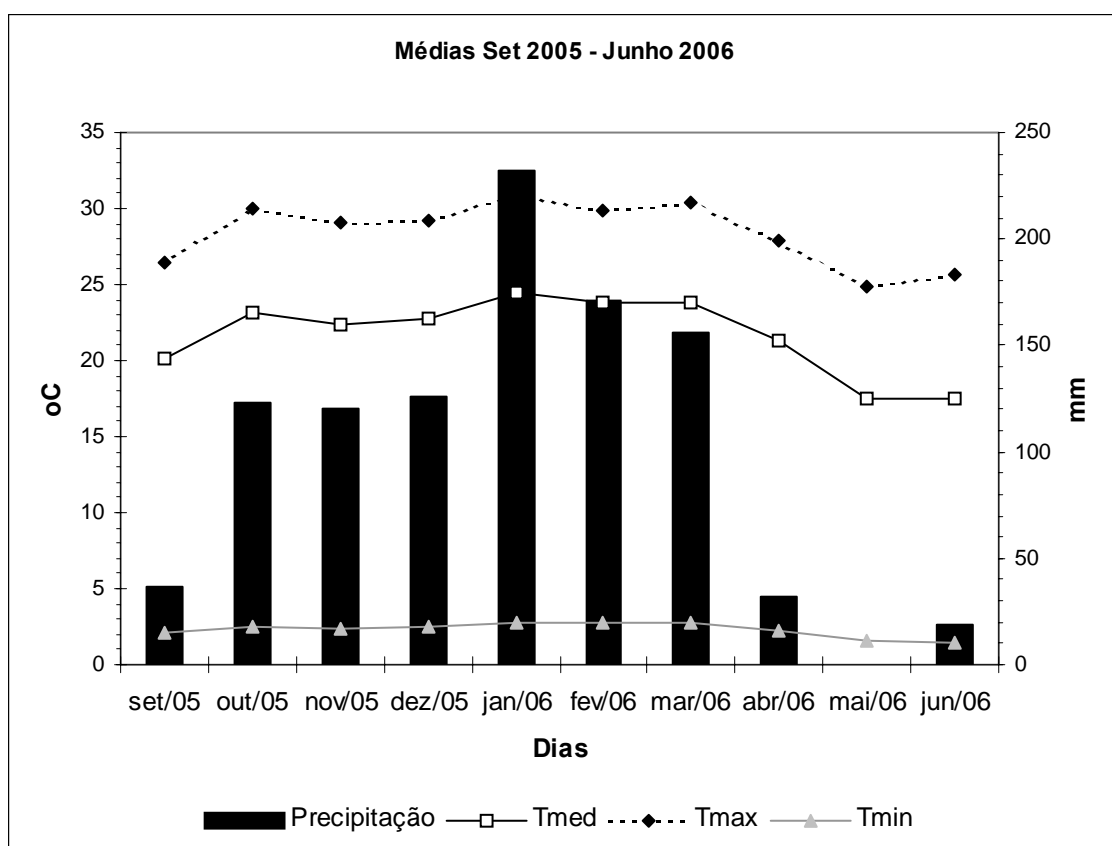


Figura 2 - Dados climáticos da área experimental, Fazenda Areão, município de Piracicaba

### 1.6.3 Extração e determinação da atividade da RN

A determinação enzimática foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Campus ESALQ-USP.

A determinação da atividade da RN foi feita empregando-se o ensaio in vivo modificado de Radin, (1974). As amostras foram coletadas entre 9:00 h e 10:00 h, esse

procedimento foi adotado para permitir a comparação da ação enzimática nos diferentes níveis de nitrogênio sem a interferência da luminosidade.

As amostras de tecido fresco foram coletadas, armazenadas em sacos plásticos em caixa de isopor com gelo, transportadas até o laboratório e limpas com água deionizada. Em seguida, pesou-se 100 mg de massa fresca, estes foram obtidos discos foliares e colocados em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução tampão fosfato, pH 7,4 50 mM + KNO<sub>3</sub> 200 mM (Figura 3).

Essas amostras foram infiltradas a vácuo durante 5 minutos com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo o material vegetal foram incubados em banho-maria a 33° C por 30 minutos ao abrigo da luz, envoltas com folha de alumínio.

A paralização da reação foi feita com a adição de 1 mL de sulfanilamida a 1 % em HCl 2 N e, a seguir, adicionou-se 1 mL de naftilenodiamino 0,05 %. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da enzima determinada pela quantidade de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) produzida, comparando os valores obtidos com uma curva padrão para esse íon, previamente estabelecida. Os resultados obtidos dessa variável foram expressos em  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ .

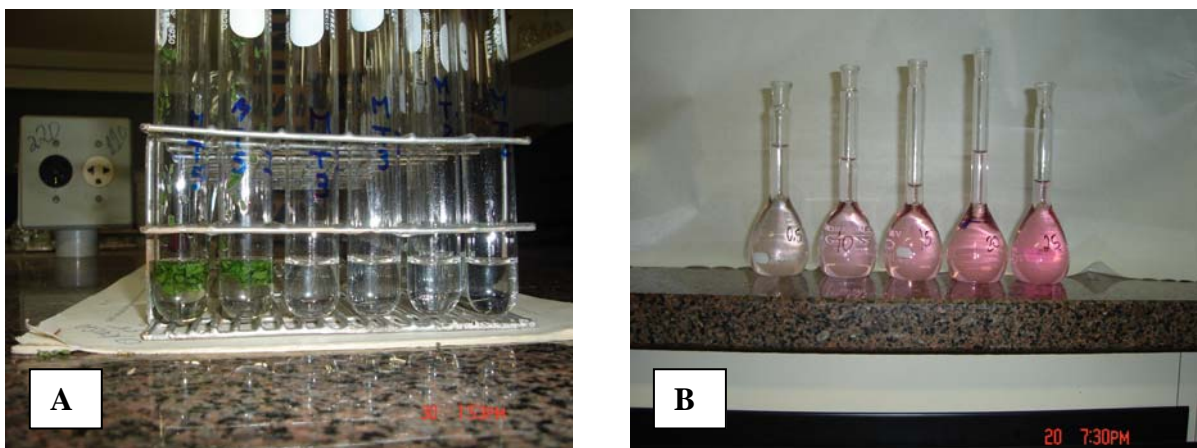


Figura 3 - Metodologia de avaliação da atividade da RN (A) discos foliares em solução tampão, (B) Solução para obtenção da curva padrão

#### **1.6.4 Preparo dos extratos para análise de GS**

De cada tratamento coletou-se 1,0 g de material vegetal na forma de discos de folhas, o qual foi fracionado e submetido a uma pequena quantidade de nitrogênio líquido durante a maceração, tendo sido adicionado 2,0 ml da solução de extração, antes desse processo (maceração em graal).

O material foi homogeneizado e depois centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos a 4° C. O material sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, acondicionado em recipiente com gelo moído e, em seguida, foi realizada a determinação das atividades enzimáticas.

#### **1.6.5 Determinação da atividade da GS**

A atividade da GS foi obtida utilizando o método proposto por Elliott (1953), o qual explora a atividade biossintética dessa enzima na formação de  $\lambda$ -glutamil hidroxamato.

Essa reação foi realizada sob agitação contínua em banho-maria a 30 °C em tubo de ensaio, no qual foram adicionados 0,25 mL de tampão TRIS – HCL 200 mM, pH 7,5; 0,1 mL de ATP 50 mM, pH 7,0; 0,25 mL de glutamato de sódio 500 mM; 0,05 mL de MgSO<sub>4</sub>; 0,05 mL de cisteína 100 mM; 0,15 mL de hidroxilamina 100 mM, pH 7,0 e 0,15 mL de extrato como descrito em 2.4, totalizando 1 mililitro (ml).

Após o período de incubação a reação foi interrompida pela adição de 1mL do reagente cloreto férrico - FeCl<sub>3</sub> (10 %)/TCA (24 %)/HCl (6 N), 1:1:1 – formando um complexo marrom amarelado como precipitado. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm e no material sobrenadante foi realizada a leitura colorimétrica para determinar a formação de  $\lambda$ -glutamil hidroxamato.



A leitura foi feita a 540 nm em espectrofotômetro marca HITACHI modelo U – 3210, sendo a determinação da atividade enzimática realizada a partir da comparação da leitura obtida com uma curva padrão, preparada previamente.

Os resultados obtidos dessa variável foram expressos em  $\mu\text{moles } \lambda\text{-glutamil hidroxamato produzido por hora por miligrama de proteína}$  ( $\mu\text{M de } \lambda\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ).

#### **1.6.6 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS)**

Para a determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) foi utilizada a metodologia de Bradford (1976), usando extratos preparados com o tampão TRIS descrito em GS. Numa alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato foi acrescentada 5 mL do reagente de BRADFORD resultando em uma mistura colorida, em que foi feita a leitura a 595 nm em espectrofotômetro marca HITACHI, modelo U – 3210.

O reagente de BRADFORD foi preparado com 100 mg de COMASSIE BRILLIANT BLUE G – 250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95 % e 100 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85 %. O volume dessa mistura foi aferido para 1 litro e filtrado duas vezes utilizando filtro de papel qualitativo da marca REAGEN.

O teor de proteínas total solúvel (PTS) das amostras foi calculado a partir de uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA), sendo os resultados obtidos dessa variável expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de matéria fresca (MF).

### **1.7 Resultados e Discussão**

A atividade da RN, GS, teor de PTS aumentou com as doses de N aplicado (Tabela 2), corroborando resultados obtidos por (MALAVOLTA et al., 2004; REIS et al., 2007) para atividade da RN e N foliar. Em todas as épocas avaliadas a atividade da enzima se ajustou ao modelo linear. A atividade da RN em cafeeiros correlacionou positivamente com a

produtividade, o que indica ser um bom parâmetro para estimar o estado nutricional e a produtividade do cafeeiro (Figura 4).

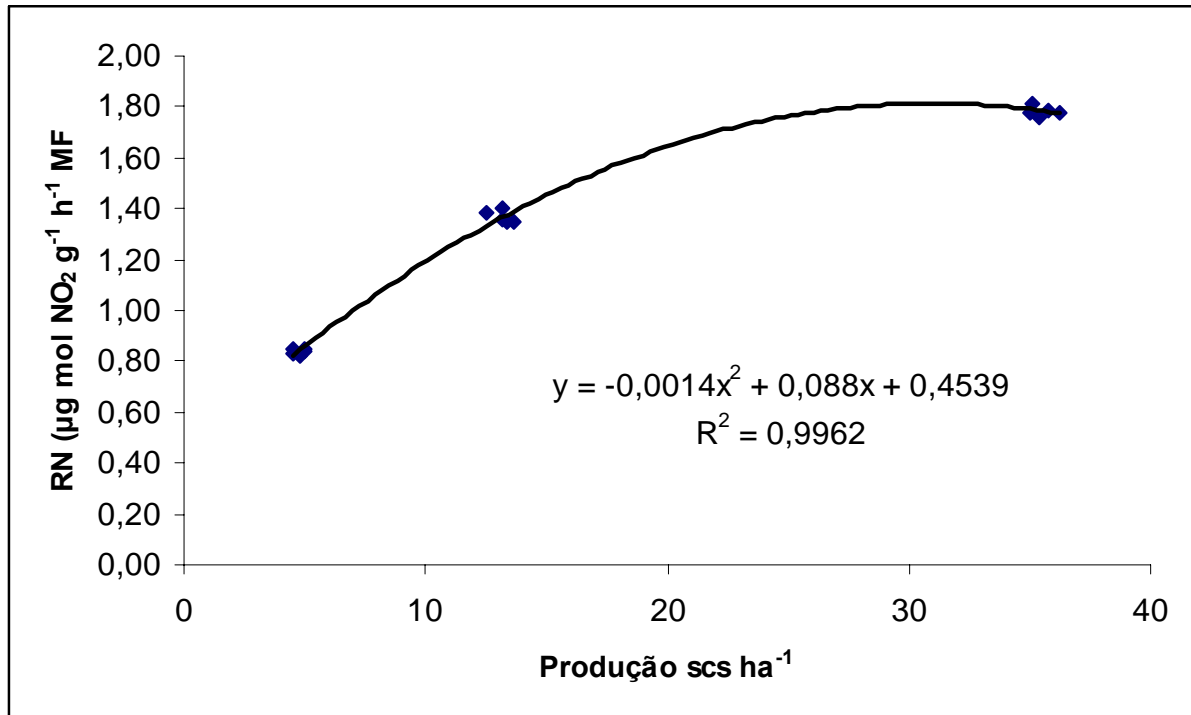


Figura 4 - Correlação entre atividade da RN e produtividade do cafeeiro

A atividade da RN durante a fase reprodutiva do cafeeiro (Figura 5) apresentou maiores valores no mês de janeiro (0,834, 1,370 e 1,781  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$  nos tratamentos 0, 150 e 300  $\text{kg ha}^{-1}$ , respectivamente) na fase chumbinho e início de granação de frutos, conforme escala fenológica de Pezzopane et al. (2003).

No mês de janeiro, os frutos estavam na fase chumbinho e as folhas apresentavam alta atividade da RN, corroborando resultados obtidos por Taleisnik et al. (1980) e Carelli et al. (1989). Porém variações ambientais e climáticas também podem contribuir na alteração da capacidade de assimilação de nitrato durante o ciclo do cafeeiro (Da MATTA et al., 1999).

Tabela 2 - Atividade da RN ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  MF), GS ( $\mu\text{mol } \gamma\text{GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  PTS) e teor de PTS ( $\text{mg g}^{-1}$ )

	Doses de N ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	RN ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1}$ MF)	GS ( $\mu\text{mol } \gamma\text{GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ PTS)	PTS ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Jan	0	0,83	82,48	0,618
	150	1,37	95,31	5,66
	300	1,78	136,72	6,52
	R <sup>2</sup>	0,99	0,91	0,86
	Equação	$y = 0,0032x + 0,852$	$y = 0,1808x + 77,713$	$y = 0,0197x + 1,3157$
Fev	0	0,76	75,87	0,527
	150	1,28	93,14	4,916
	300	1,48	131,82	5,916
	R <sup>2</sup>	0,94	0,95	0,88
	Equação	$y = 0,0024x + 0,8095$	$y = 0,1865x + 72,3$	$y = 0,018x + 1,0921$
Mar	0	0,62	70,92	0,421
	150	1,07	89,65	4,108
	300	1,37	120,67	5,554
	R <sup>2</sup>	0,98	0,98	0,94
	Equação	$y = 0,0025x + 0,6443$	$y = 0,1658x + 68,871$	$y = 0,0171x + 0,7944$
Abr	0	0,52	64,31	0,335
	150	0,96	82,40	2,951
	300	1,18	113,99	3,216
	R <sup>2</sup>	0,96	0,97	0,81
	Equação	$y = 0,0022x + 0,5567$	$y = 0,1656x + 62,062$	$y = 0,0096x + 0,7269$
Mai	0	0,42	54,01	0,301
	150	0,85	69,54	2,038
	300	0,96	90,04	2,328
	R <sup>2</sup>	0,89	0,99	0,84
	Equação	$y = 0,0018x + 0,4695$	$y = 0,1201x + 53,181$	$y = 0,0068x + 0,5423$
Jun	0	0,28	52,25	0,266
	150	0,68	64,81	2,218
	300	0,77	85,56	2,568
	R <sup>2</sup>	0,88	0,97	0,86
	Equação	$y = 0,0017x + 0,329$	$y = 0,111x + 50,889$	$y = 0,0077x + 0,5333$

A maior atividade da RN em janeiro, provavelmente está relacionada aplicação do fertilizantes e das diferenças de precipitação no período da coleta do material (Figura 1). Taleisnik et al. (1980), observaram na Costa Rica, que a atividade da RN foliar apresentava variações sazonais e altas correlações com o período de maior precipitação. Os maiores valores de atividades da enzima foram detectadas quando o solo apresentava umidade

próxima da capacidade de campo, enquanto nas estações de baixa precipitação a atividade da RN foliar foi menor, o que coincidia com a fase de maturação dos frutos.

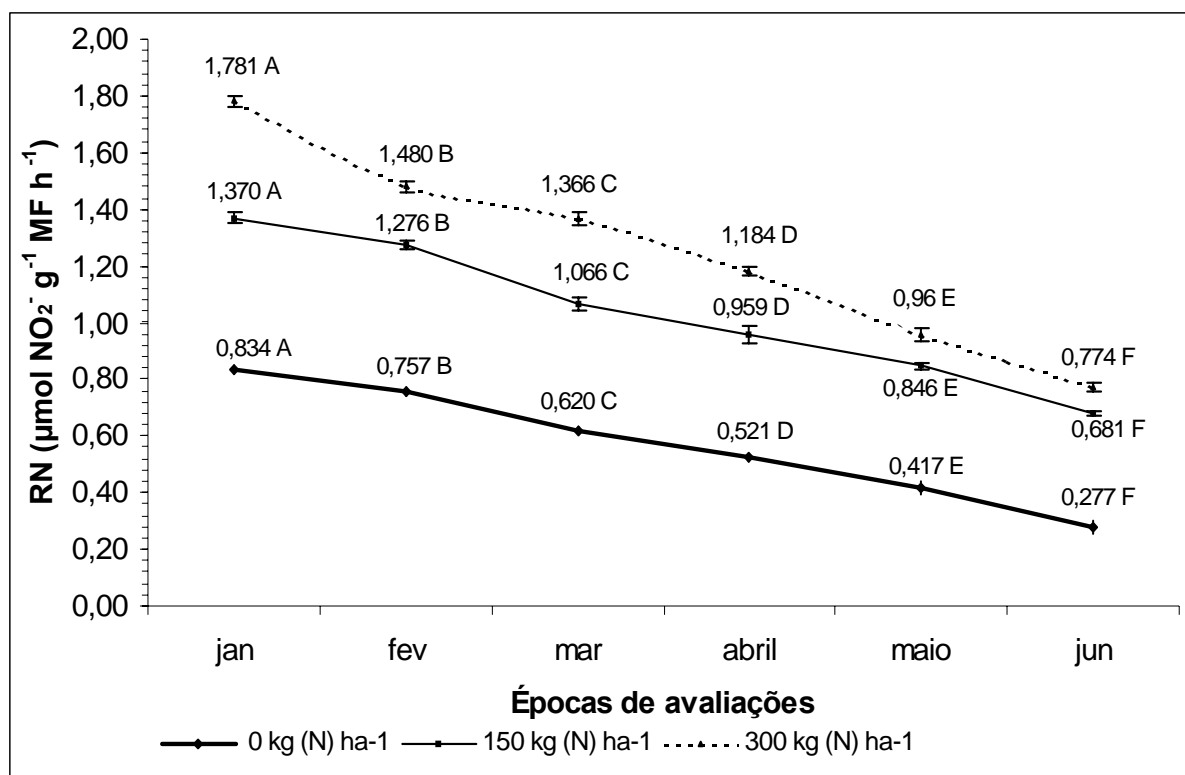


Figura 5 - Atividade da RN durante a fase reprodutiva do cafeeiro

A sensibilidade da atividade da RN foi observada durante o estabelecimento do déficit hídrico, uma vez que Meguro e Magalhães (1983), observaram em diferentes cultivares de cafeeiro uma significativa redução da atividade da enzima em valores de  $\Psi_a$  hídrico foliar entre -1,0 MPa e -3,0 MPa.

Em todos os tratamentos a atividade da GS diminuiu (Figura 6) acompanhando a redução do teor de PTS durante o desenvolvimento dos frutos e em função da senescência foliar (Figura 7). No mês de janeiro, a GS também apresentou maior atividade na fase chumbinho, com as menores expressões desta enzima no mês de abril, na fase de frutos cereja, bem como em julho quando predominava frutos passa.

No mês de janeiro, a GS também apresentou maior atividade na fase chumbinho, com as menores expressões desta enzima no mês de abril, na fase de frutos cereja, bem como em

julho quando predominava frutos passa. A GS é a enzima que forma glutamina nos tecidos senescentes (MIFLIN; LEA, 1977; OAKS; HIREL, 1985). Em vários trabalhos foram constatados que a menor atividade da GS diminui no período reprodutivo (SIMPSON; DALLING, 1985; HAYASHI; CHINO, 1990; KAMACHI et al., 1991; SOUZA et al., 1999), devido a alta demanda de carboidratos, açúcares e proteínas para a formação do endosperma.

A GS no tecido vegetal está presente em pelo menos duas isoformas: a GS1, localizada no citossol, e a GS2, localizada no cloroplasto (OAKS; HIREL, 1985), a queda na atividade da enzima observada durante a senescência pode ser atribuída à diminuição da isoforma GS2, que, como outras proteínas cloroplásticas, sofre hidrólise preferencial durante esse período. Em cloroplastos isolados observou-se que a GS2 é mais susceptível à hidrólise e degrada mais rapidamente do que a Rubisco e outras enzimas de assimilação de carbono (MITSUHASHI; FELLER, 1992; THOENEN; FELLER, 1998). A GS1 citossólica, por sua vez, se mantém constante e pode até aumentar ligeiramente durante a senescência (MAKINO et al., 1983; KAMACHI et al., 1991). A GS1 converte glutamato em glutamina, o que aumenta a eficiência de transporte de nitrogênio, pois a glutamina carrega dois nitrogênios para cada cinco carbonos, o que explica a deficiência de N em folhas velhas.

Segundo Buchanan-Wollastos e Ainsworth (1997) a GS1 citossólica está envolvida na remobilização de compostos nitrogenados, pois a expressão de genes que codificam para GS1 aumenta durante a senescência. Entretanto, pode haver controle pós-traducional da GS1 por fosforilação, o que protege a enzima da degradação, e também podem ocorrer interações com proteínas 14-3-3, que aumentam a atividade da GS1 (FINNEMANN; SCHOERRING, 2000).

Enquanto a GS1 citossólica permanece ativa por mais tempo, a GS2 plastidial é perdida nas folhas na fase inicial de senescência, juntamente com outras proteínas cloroplásticas, o que ocasiona a diminuição da atividade da GS total nessa fase fenológica (maturação).

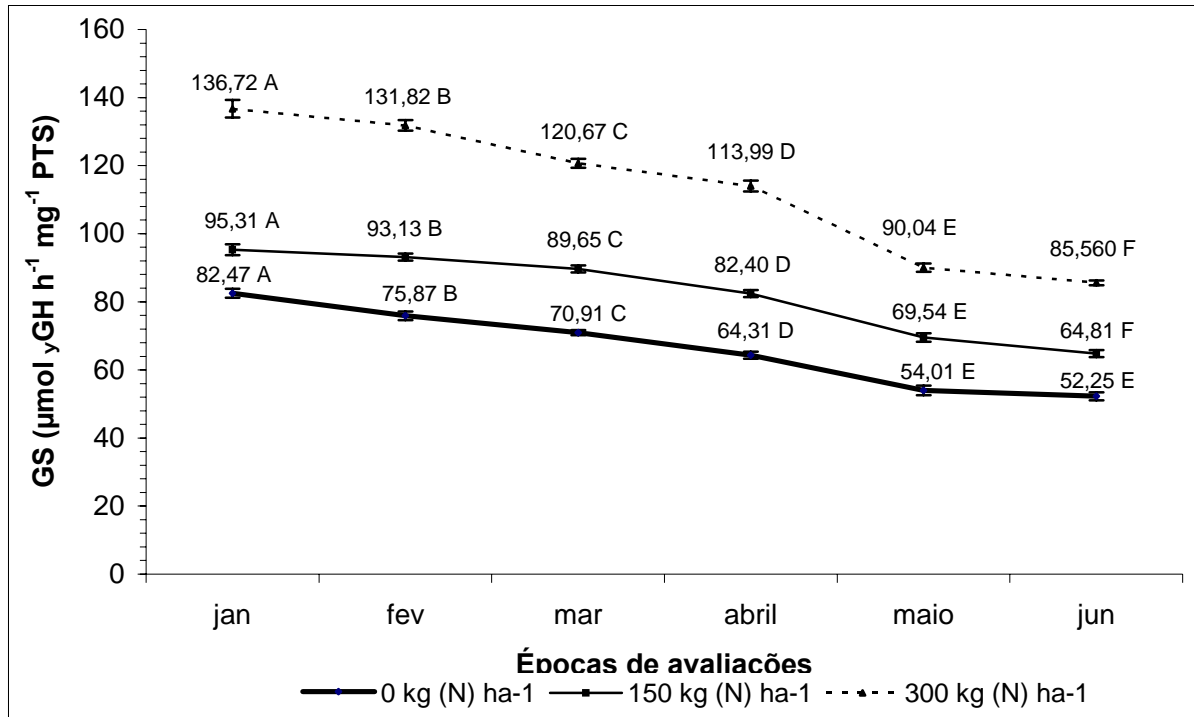


Figura 6 - Atividade da GS durante a fase reprodutiva do cafeeiro

Embora a atividade da GS apresenta alta correlação com a produtividade, observa-se pouca diferença na atividade entre plantas deficientes e plantas com teor adequado ( $T_2$  - 150 kg ha<sup>-1</sup>) em N (Figura 6). No mesmo período de avaliação a RN apresentou boa concordância como o estado nutricional do cafeeiro em janeiro, a qual é a época de amostragem de diagnose foliar. Portanto, o uso dos valores da atividade da RN é mais recomendado para avaliar o estado nutricional em relação a GS. Além disso, o uso da metodologia para avaliar a atividade RN é mais fácil, prático e de menor custo. Outra limitação do uso da atividade da GS para interpretação do estado nutricional deve-se a origem da amônia do tecido vegetal, pois esta pode ser proveniente do fertilizante bem como da fotorrespiração (MIFLIN; HABASH, 2002).

O nitrogênio por participar da composição dos aminoácidos, desempenha um efeito direto no conteúdo de PTS como verificado na Tabela 2. O nitrogênio absorvido pelas plantas combina com cadeias carbônicas para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais. Por ocasião da fase de enchimento de

grãos essas reservas são quebradas, translocadas e armazenadas nesses órgãos na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 1995).

O teor de PTS foliar diminuiu significativamente durante o período avaliado (Figura 7). Em todos os tratamentos, as folhas entraram em senescência à medida que os frutos se desenvolviam, o que provavelmente explicaria a diminuição do conteúdo de PTS. Nessa fase, as folhas ainda permaneceram túrgidas, indicando que as membranas e as organelas ainda estavam intactas, porém em processo de degradação da clorofila (FELLER; KEIST, 1986). Para Matile (1992) com o início da senescência, o influxo de nitrogênio decresce como consequência da diminuição da taxa transpiratória da cultura e uma rede de exportação é iniciada. O aminoácido derivado da degradação de proteína solúvel de folhas que estão próximas da fase de senescência é reutilizado em outros órgãos da planta, como por exemplo, os grãos.

A proteólise e a remobilização de nitrogênio são constantemente associadas como resposta da planta ao estresse e a senescência. A senescência associada à maturação ou enchimentos dos frutos é um evento danoso para a biologia da planta, mas importante para a produtividade em razão do enchimento de grãos (LEA, 2001). As duas principais hipóteses sobre indução de senescência entre a floração e a frutificação é a baixa síntese de hormônios ou a grande retirada de nutrientes das folhas, pois com a senescência há remobilização de recursos protéicos para a fase reprodutiva (FELLER; FISCHER, 1994). Essa visão sugere uma possível ligação entre a função da proteólise na vida celular, incluindo resposta a estresse por falta de nitrogênio, sendo a PTS remobilizada durante senescência.

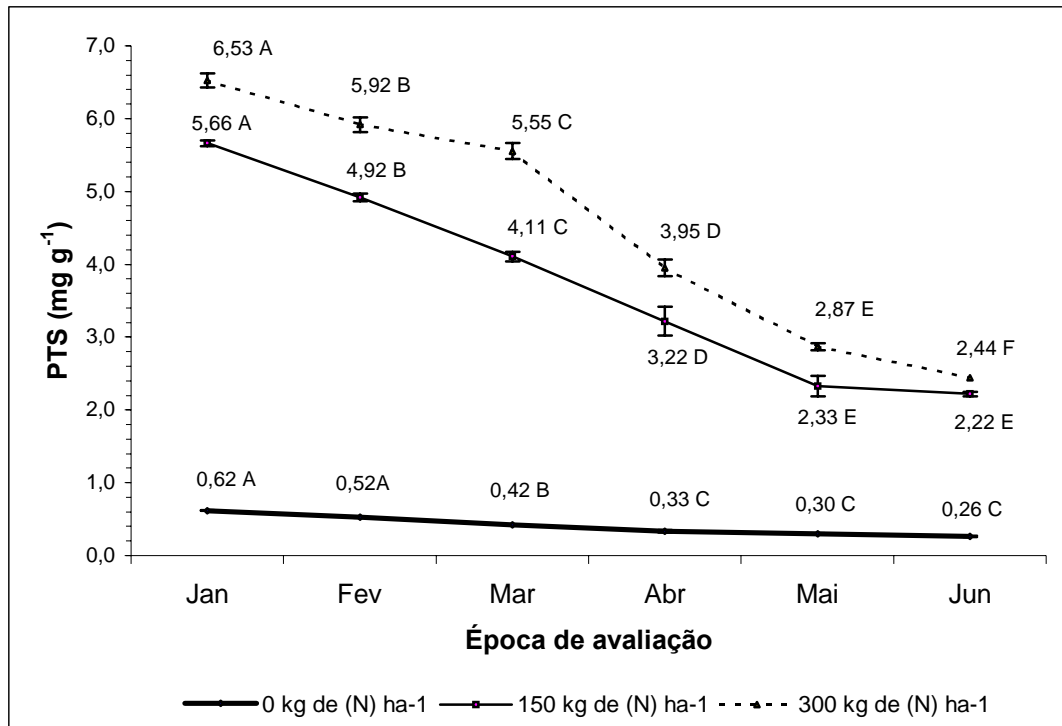


Figura 7 - Conteúdo de PTS foliar durante maturação dos frutos de café

## 1.8 Conclusões

A atividade da RN e GS e o teor de N e PTS foliar diminui conforme a maturação dos frutos e apresentaram alta correlação com a produtividade.

A metodologia da RN é mais recomendado para avaliar o estado nutricional do N em relação a GS, por ser mais fácil, prático e de menor custo.

## Referências

BECKER, T.W.; NEEF-CAMPA, C.; ZEHACKER, C.; HIREL, B. Implication of the phytochrome in light regulation of the tomato gene(s) encoding ferredoxin dependent glutamate synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 31, n. 5, p. 725-729, 1993.

BENNETT, M.J.; CULLIMORE, J.V. Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. **Planta**, Berlin, v. 179, p. 433-440, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.



BUCHANAN-WOLLASTON, V.; AINSWORTH, C. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, p. 821-834, 1997.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 277-303, 1999.

CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I.; MAGALHÃES, A.C. Assimilação de nitrato durante o desenvolvimento reprodutivo de plantas de café. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 59-64, 1989.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G.E.; BAHIA, A.F.C. ; GUEDES, G.A.A. Balanço de nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) em um latossolo vermelho-escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 15, p. 187-193, 1991.

CORUZZI, G.; BUSH, D.R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 1, p. 61-64, 2001.

COSTA, F.M.P. **Crescimento e desenvolvimento do cafeeiro sob efeito da adubação nitrogenada**. 2006. 80 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Da MATTA, F.M.; AMARAL, J.A.T.; RENA, A.B. Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. **Field Crop Research**, v.60, p.223-229, 1999.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M. ; ALVES, J. D. ; PURCINO, A.A.C. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.

EDWARDS, J.W.; CORUZZI, G.M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. **The Plant Cell**. Baltimore, v. 1, p. 241-248, 1989.

ELLIOTT, W.H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 201, p. 661-672, 1953.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2.ed. São Paulo: Ed. Planta, 2006. 401 p.

FARDEN, K.J.F.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGENSEN, F.J. (Ed.). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York: John Willey, 1980. p. 265-314.

FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Critical Review of Plant Science**, Boca Raton, v. 13, p. 241-273, 1994.

FELLER, U.; KEIST, M. Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: LAMBERS, H.; NEETESON, J.J.; STULEN, I. ( Ed.). **Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants**. Dordrech: Martinus Nijhoff, 1986. p. 219-234.

FERNANDES, M.S.; FERREIRA, M.B.; FREIRE, L.R. Efeitos da interação de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na atividade da nitrato redutase e acumulação de N-protéico em *Brachiaria sp.* **Turrialba**, San Jose, v. 28, n. 3, p. 187-191, 1978.

FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de N sobre a absorção e assimilação de nitrogênio em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, p. 1-6, 1990.

FINNENMANN, J.; SCHJOERRING, J.K. Pos-traducional regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. **Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 24, p. 171-181, 2000.

HAVLIN, J.L; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers - An introduction to nutrient management**. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. 515 p.

HAYASHI, H. ; CHINO, M. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 31, p. 247-251, 1990.

HIREL, B.; WEATHERLEY, C.; CRETIN, C.; BERGOUNIOUX, C.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 74, p. 448-450, 1984.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Post-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1981-1989, 2001.

KAMACHI, K.;YAMAYA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 411-417, 1991.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569-593, 1996.

LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, London, v. 251, p. 614-616, 1974.

LEA, P.L.; MOROT-GAUDRY, J.F. ( Ed.). **Plant nitrogen**. Berlin; London: Springer, 2001. 407 p.

LI, X.Z.; OAKS, A. Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 102, p. 1251-1257, 1993.

MALAVOLTA, E.; NOGUEIRA, N.G.L.; HEINRICH, R.; HIGASHI, E.N.; RODRÍGUEZ, V.; GUERRA, E.; OLIVEIRA, S.C.; CABRAL, C.P. Evaluation of nutritional status of the cotton plant with respect to nitrogen. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.35, p.1007–1019, 2004.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ed. Ceres, 2006. 638 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 1990. 674 p.

MATILE, P. Chloroplast senescence. In: BAKERS, N.R.; THOMAS, H. (Ed.). **Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 413-440.

MATILE, P.; SCHELLENBERG, M.; VICENTINI, F. Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. **Planta**, Berlin, v. 201, p. 96-99, 1997.

MATTSON, M.; SCHJOERRING, J.K. Controlled environment measurements of ammonia exchange in two grass species. In: NITROGEN WORKSHOP, 10., 1999, Copenhagen. **Abstracts ...** Copenhagen: KVL, 1999. 1v.

McNALLY, S.F.; ORBANJO, T.O.; HIREL, B.; STEWART, G.R. Glutamine synthetase isoenzymes of *Striga harmonica* and other angiosperm root parasites. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, p. 610-614, 1983.

MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 58, p. 147-152, 1983.

MIFLIN, B.J.; HABASH, D. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.979-987, 2002.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 28, p. 299-329, 1977.

MITSUHASHI, W.; FELLER, U. Effects of light and external solutes on the catabolism of nuclear-encoded stromal proteins in intact chloroplasts isolated from pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 2100-2105, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 625 p.

OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Rockville, v. 36, p. 345-365, 1985.

OLSON, R.A.; KURTZ, L.T. Crop nitrogen requirements, utilization, and fertilization. In: STEVENSON, F.J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.245-267.

PEDROSO, P.A.C. **Efeito de doses crescentes de fertilizante nitrogenado na atividade da nitrato redutase, na produção e rendimento de café, (*Coffea arabica* L.) cv. “Mundo Novo”**. 1977. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 3-28, 1995.

PEZZOPANE, J.R.M.; PEDRO JUNIOR, M.J.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO, M.B.P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro (*Coffea arabica*). **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

PUJADE-RENAUD, V.; CLEMENT, A.; PERROT-RECHENMANN, C.; PREVOT, J.C.; CHRESTIN, H.; JACOB, J.L.; GUERN, J. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 127-132, 1994.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1996. 279p.

RADIN, J.W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 53, p. 458-463, 1974.

REIS, A.R. **Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila SPAD-502, atividade da enzima redutase do nitrato e qualidade fisiológica de sementes**. 2005. 51 p. (Trabalho de graduação) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, Ilha Solteira, 2005.

REIS, A.R.; FURLANI JÚNIOR, E.; HAGA, K.I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.29, p.192-199, 2007.

ROBERT, F.M.; WONG, P.P. Isoenzymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L. root nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 142-148, 1986.

RUFTY, B.; THOMAS, J.E; REMMLER, J.L.; WILBER H. CAMPBELL, W.H.; VOLK, R.J. Intracellular localization of nitrate reductase in roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, p. 675-680, 1986.

SIMPSON, R.; ALLING, M.J. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). III-Enzymology and transport of amino acids from senescing flag leaves. **Planta**, Berlin, v. 151, p. 447-456, 1985.

SHIMIZU, M.S.; MAZZAFERA, P. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 3, p. 259-265, 2000.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M., FERNANDES, M.S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, p. 2049-2063, 1998.

SUMAR, N.; CASSELTON, P.J.; McNALLY, S.F.; STEWART, G.R. Occurrence of isoenzymes of glutamine synthetase in the *Chlorella kessleri*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 74, p. 204-207, 1984.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TALEISNIK, E.; PACHECO, R. Evaluación del efecto de dosis crecientes de nitrato sobre la actividad de la reductasa del nitrato, nitrógeno derivado del fertilizante en café. **Turrialba**, San José, v. 30, p. 29-34, 1980.

TALEISNIK, E.; BRICEÑO, J.A.; CARVAJAL, J.F. Variación estacional de la reductasa de nitrato em el café. **Turrialba**, San José, v. 43, p. 330-337, 1989.

TEMPEST, D.W.; MEERS, J.L.; BROWN, C.M. Synthesis of glutamate in aerobacter aerogenes by a hitherto unknown route. **Biochemical Journal**, London, v. 117, p. 405-407, 1971.

THOENEN, M.; FELLER, U. Degradation of glutamine synthetase in intact chloroplasts isolated from pea (*Pisum sativum*) leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 279-286, 1998.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, p. 1005–1024, 2000.

TJADEN, G.; EDWARDS, J.W.; CORUZZI, G.M. Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 108, p. 1109–1117, 1995.

VIDAL TORRADO, P.; SPAROVEK, G. **Mapa pedológico detalhado do Campus “Luiz de Queiroz”**. Piracicaba: Esalq, 1993. (Escala 1:10.000).

WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. **Planta**, Berlin, v. 154, p. 473-476, 1987.

WARNER, R.L.; KLEINHOF, A. Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 245–252, 1992.

WOOLFOLK, C.A.; STADTMAN, E.R. Cumulate feedback inhibition in multiple and product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. New York, v. 17, n. 4, p. 313-319, 1964.

## 2 RELAÇÃO ENTRE FOTOSSÍNTESE, CLOROFILA E LEITURAS SPAD EM FOLHAS DE CAFÉ EM FUNÇÃO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA

### Resumo

O nitrogênio é exigido em grande quantidade pela planta de café e responde por aumentos significativos no rendimento da cultura, sendo considerado o nutriente que mais limita a sua produção. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a relação matemática entre a concentração foliar de nitrogênio, além de clorofila extraível e a sua coloração estimada, indiretamente, por meio de leituras não destrutivas utilizando o clorofilômetro portátil SPAD-502 e assimilação de CO<sub>2</sub> pelo medidor portátil de fotossíntese LICOR 4600. A calibração do referido método em condições de campo é fundamental para a sua utilização prática, uma vez que alguns trabalhos realizados sobre esse assunto foram conduzidos com mudas de café em casa de vegetação, condições muito diferentes daquelas em que as plantas estão sujeitas no campo. Para a calibração da leitura feita com o clorofilômetro e o medidor portátil de fotossíntese LICOR 6400 e os teores foliares de nitrogênio e clorofila. Utilizou-se três níveis de adubação nitrogenada: T<sub>0</sub> - testemunha; T<sub>1</sub> - 150 kg ha<sup>-1</sup> N e T<sub>2</sub> - 300 kg ha<sup>-1</sup> N, adotando o delineamento de blocos ao acaso com três tratamentos (doses de N) e cinco repetições. Após as leituras os pares de folhas foram coletados para extração de clorofila e determinação do teor de nitrogênio. As leituras e as análises químicas para o N e clorofila foram realizadas mensalmente durante o desenvolvimento do fruto desde a fase chumbinho até a colheita. Durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos (janeiro a junho), a relação entre o teor foliar de nitrogênio e a leitura com o clorofilômetro (SPAD), fotossíntese e o teor de clorofila foram linear e positiva. O medidor portátil de clorofila é uma boa ferramenta para monitorar o estado nutricional do cafeeiro no que diz respeito ao nitrogênio. No período avaliado, houve decréscimo em todos os tratamentos de N total, fotossíntese, clorofila e leituras SPAD devido à senescência foliar.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica* ; Proteínas; N foliar; Clorofila

## **RELATIONSHIP AMONG PHOTOSYNTHESIS, CHLOROPHYLLS AND SPAD READINGS IN COFFEE LEAVES IN RELATION TO N SUPPLY**

### **Abstract**

The role of N in agricultural production is intimately connected to photosynthesis. Nitrogen metabolism changes at the onset of senescence from assimilation to remobilization. The export of nitrogen from senescent plant parts is important for the efficient use of this macronutrient. The objective of this study was to establish a correlation among the photosynthetic pigments content, total nitrogen and the photosynthesis variables with the SPAD-502 readings in *Coffea arabica* leaves. Correlations were established among the chlorophyll content, nitrogen content, and chlorophyll *a* and *b* with SPAD-502 readings taken on coffee leaves at different months. The results show that all variables decreased with time. However, correlation increased linearly with nitrogen doses. Total chlorophyll as well presented a direct linear correlation with readings of the portable chlorophyll meter. The SPAD readings have shown to be a good tool to diagnose the integrity of the photosynthetic system in coffee leaves. Thus, the portable chlorophyll SPAD-502 can be used to evaluate the nitrogen status and can also help interpretation of the photosynthetic process in coffee plants.

**Keywords:** *Coffea Arabica*; Proteins; Leaf nitrogen ; Chlorophyll

### **2.1 Introdução**

#### **2.1.1 O papel bioquímico do N na assimilação do carbono**

O N é um nutriente requerido para a síntese de proteínas estrutural e enzimática. As enzimas são responsáveis pela síntese não somente de proteínas, mas também de metabólitos intermediários, componentes de estrutura da célula, armazenamento de carboidratos e pigmentos. Estes vários componentes constituem a planta e são requeridos para o crescimento de células, as quais serão responsáveis pelos componentes da produção (LAWLOR et al., 2001).

O papel do nitrogênio na produtividade agrícola está intimamente relacionado com a fotossíntese. Nesse processo a energia de fótons é convertida em energia química, armazenada no ATP e metabólitos intermediários reduzidos, primeiramente o NADPH, o qual é usado na

síntese de assimilados de carbono e nitrogênio, particularmente carboidratos e aminoácidos (LAWLOR, 2002).

A assimilação do CO<sub>2</sub> em relação com o teor foliar de nitrogênio foi revisado por (LAWLOR et al., 2001; LAWLOR 2002) e pode ser resumido na síntese de aminoácidos e proteínas, componentes indispensáveis para a vida celular. Uma rápida assimilação de CO<sub>2</sub> requer grande quantidade de cloroplastos, principalmente complexo clorofila proteína captadora de luz (LHCP), transporte de elétrons e NADP<sup>+</sup> reduzido como componentes da tilacóide (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A principal proteína dos cloroplastos e folhas é a Rubisco, a qual catalisa a reação entre CO<sub>2</sub> e RuBP, gerando triose fosfato, que é exportada do cloroplasto para o citossol, onde é convertida em sacarose (LAWLOR, 2002). A Rubisco tem baixa atividade catalítica por massa de proteína, assim, a assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas C<sub>3</sub> requer alta quantidade da enzima, sendo composta aproximadamente 50% da proteína solúvel. A atividade metabólica nas folhas corresponde a grande teor de nitrogênio. Se o fornecimento de nitrogênio é baixo durante a expansão foliar, a síntese protéica diminui e os componentes formados são inadequados para a máxima capacidade de assimilação do CO<sub>2</sub> (LAWLOR et al., 1989).

### **2.1.2 Capacidade fotossintética e nitrogênio foliar**

O N apresenta uma pequena fração da biomassa da planta, em média, 3% da matéria seca. Esta concentração em diferentes tecidos da planta é um fator altamente limitante para o crescimento e produtividade, pois esse elemento é um controlador de diversos processos na planta, tais como, distribuição da matéria seca em diferentes partes da planta e na assimilação do carbono a partir da fotossíntese Levin et al., (1989).



As folhas assimilam CO<sub>2</sub> pela fotossíntese, produzindo grande massa de carboidratos, particularmente sacarose, a qual é exportada para o resto da planta. A síntese de carboidratos ocorre em função da fotossíntese foliar menos a respiração, além da fotorrespiração, a qual está intimamente relacionada com a utilização de fotoassimilados (LEA; MOROT-GAUDRY, 2001). O complexo metabólico envolvido nesses processos requer um grande número de diferentes enzimas, pigmentos e proteínas.

O N foliar é um bom indicador da capacidade de carboxilação e do transporte de elétrons na folha. Esta resposta da fotossíntese ao teor de N foliar linear pode ser explicada por um simples efeito de massa, pois quanto maior a disponibilidade de N maior será o teor de N foliar e, conseqüentemente, haverá produção de maior quantidade de compostos fotossintéticos como proteínas e enzimas (NIJS et al., 1995; LU; ZHANG, 2000). Em função da interação entre o metabolismo do N e do C, estudos de mudanças ambientais que afetam a assimilação de carbono deveriam levar em conta o fluxo desse nutriente na planta. Muitas espécies mostram um considerável decréscimo do N foliar após longa exposição a concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>, pelo menos quando expressadas em matéria seca. Este decréscimo pode coincidir com a diminuição da área foliar especificada, sendo que, qualquer decréscimo no N foliar, geralmente, reduz a capacidade fotossintética na folha.

Muitos estudos têm demonstrado que a deficiência no fornecimento do N, comparada às plantas controle, decresce significativamente a capacidade de assimilação do carbono. O decréscimo na assimilação de carbono pode estar associado tanto na diminuição da concentração como da atividade da Rubisco (LU; ZHANG, 2000).

### **2.1.3 Uso clorofilômetro para monitorar o nitrogênio**

O nitrogênio é um dos nutrientes que afetam significativamente o rendimento das lavouras cafeeiras, sendo indispensável que as plantas apresentem níveis suficientes do

nutriente para garantir a produção de carboidratos e amido consumidos durante a floração (MALAVOLTA et al., 2002), bem como para a formação e crescimento dos ramos, folhas e frutos. Os sintomas de deficiência dos nutrientes são mais intensos a partir da granação, em particular, nos anos de grande carga de frutos. O amarelecimento da planta se deve a elevada concentração de N nos cloroplastos, de 50 % a 70 % das células foliares (STOCKING; ONGUM, 1962).

A análise foliar é, normalmente, a técnica utilizada para avaliar o estado nutricional da planta, que apesar de ser amplamente difundida apresenta como inconveniente à demora na obtenção dos resultados. Assim, o diagnóstico nutricional para a recomendação da adubação e o ajuste da dose de nitrogênio é, freqüentemente, realizado na última aplicação (RAIJ et al., 1996), podendo prejudicar a vegetação e a frutificação do cafeeiro.

Os resultados de pesquisas demonstram que a concentração de clorofila e, obviamente, a intensidade da cor verde da folha pode ser um indicador do teor de nitrogênio. As variações no suprimento e estado nutricional em relação a este nutriente possibilitam a detecção precoce da deficiência, pela avaliação indireta da clorofila (ARREGUI et al., 2006). Esse método poderá servir, também, como um teste rápido e prático para a avaliação do teor de nitrogênio foliar em tempo hábil, auxiliando o manejo adequado da adubação da planta pelos técnicos e cafeicultores.

A determinação dos teores foliares de N apresenta-se como possibilidade de detecção de deficiência de nutriente, no entanto, na prática é complexo efetuar uma série de amostragens e análises para determinação das necessidades desse elemento, com resposta em curto prazo. A possibilidade de detecção indireta do N contido nas folhas, por meio da avaliação do teor de clorofila, tem sido preconizada como meio eficaz para a resolução desse problema, além de se correlacionar positivamente com a produtividade do cafeeiro Reis et al., (2006).

O teor de clorofila é geralmente determinado pela extração de folhas e determinadas por espectrofotometria (ARNON, 1949). Os métodos tradicionalmente usados para a determinação da quantidade de clorofila são destrutivos do tecido foliar e muito trabalhosos na extração e quantificação das mesmas Uddling et al. (2007). Por outro lado, o medidor de clorofila SPAD-502 fornece leituras que correspondem ao teor do pigmento presente na folha. Este equipamento permite que sejam feitas leituras indiretas da concentração de clorofila e de N na folha, uma vez que o mesmo fornece a intensidade da cor verde (MALAVOLTA, 2006).

Vários trabalhos encontraram correlação entre o índice de cor verde com o conteúdo de clorofila na folha (YAMAMOTO et al., 2002; ESPOSTI et al., 2003; KAPOTIS et al., 2003; MURILLO-AMADOR et al., 2004; WANG et al., 2004; ARREGUI et al., 2006). Esta relação é obtida porque 50 % a 70 % do N total das folhas serem integrantes de enzimas que estão associadas aos cloroplastos (CHAPMAN; BARRETO, 1997; STOCKING; ONGUN, 1962).

Pelos estudos realizados por (ARGENTA et al., 2004) evidencia que a utilização adequada do aparelho requer alguns cuidados como, por exemplo, o teor de N foliar deve ser a única variável que influencia o teor de clorofila, uma vez que muitas deficiências e alguns excessos de nutrientes causam clorose; a cultivar, idade e parte da folha afetam a tonalidade, assim como a leitura precisa ser padronizada usando como referência folhas com concentração conhecida de N.

O consumo de luxo deste nutriente na forma de nitrato eleva a sua concentração acima do nível adequado sem, no entanto, influenciar no teor de clorofila (BLACKMER; SCHEPERS, 1995). Esta baixa sensibilidade ao consumo de luxo de N é um indicador confiável do medidor de clorofila. Este fato ocorre porque a planta não produz clorofila além da necessidade mesmo quando há uma absorção em excesso do nutriente. Para Schröder et al.,

(2000) um indicador eficiente é àquele que prediz tanto a deficiência quanto o excesso, uma vez que, neste caso, pode causar danos ao ambiente e aumentar o custo de produção.

O agricultor ou o técnico pode efetuar tantas leituras quantas forem necessárias sem a destruição da folha, cujo procedimento permite o monitoramento do estado nutricional, pois a intensidade da cor verde da folha sinaliza, com antecedência, o risco de deficiência de N e a sua correção com a adubação nitrogenada.

A maior limitação à utilização do teor de clorofila como indicador do nível de N deve-se a impossibilidade de estimar a quantidade de N suplementar (WASKOM et al. 1996). Por outro lado, os indicadores de solo também não são suficientes para orientar, com segurança, quando aplicar deste nutriente (SCHRÖDER et al. 2000). Do exposto, fica evidente a necessidade da integração de indicadores de N (solo e planta) para aumentar a eficiência da recomendação da adubação nitrogenada. Ressalta-se que foi obtida uma relação direta entre o teor de N na folha e o rendimento de grãos de milho por Waskom et al., (1996).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a relação matemática entre a concentração foliar de nitrogênio, determinada pela análise química, com a sua coloração uma vez que a mesma pode estimar, indiretamente, a quantidade de nitrogênio por meio de leituras não destrutivas de tecidos foliares, utilizando o clorofilômetro e medidor portátil de assimilação de CO<sub>2</sub>. A calibração do referido método em condições de campo é fundamental para a sua utilização prática, uma vez que os trabalhos realizados sobre esse assunto foram conduzidos com mudas de café em casa de vegetação (LIMA FILHO et al., 1997; REIS et al., 2002), condições muito diferentes daquelas em que as plantas estão sujeitas no campo.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Medidas fotossintéticas**

As medidas de fotossíntese foram realizadas a partir das 8:00 h até aproximadamente 10:30 h em dias sem nuvens, utilizando um medidor portátil de fotossíntese (PPS - modelo LI-6400, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA) para analisar a fixação de CO<sub>2</sub> por folhas.

### 2.2.2 Extração e determinação de clorofila

Para a análise do teor de clorofila extraível foi coletado o terceiro par de folhas de ramos produtivos. As amostras de cada folha de 0,1g de tecido foliar foram trituradas e homogeneizadas em almofariz, para a extração da clorofila. À massa foi acrescentado 5 mL de acetona a 80 % e depois filtrado com papel de filtro em funil. Uma alíquota de 3 mL do extrato foi retirada para a leitura em absorvância nos comprimentos de onda de 645 nm e 663 nm. As concentrações de clorofila a, clorofila b e clorofila total foram determinadas de acordo com as equações (1, 2 e 3) propostas por ARNON (1949):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (22,9 \times \text{Leitura } 663 \text{ nm}) - (2,29 \times \text{Leitura } 645 \text{ nm}) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (22,9 \times \text{Leitura } 645 \text{ nm}) - (4,69 \times \text{Leitura } 663 \text{ nm}) \quad (2)$$

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (20,2 \times \text{Leitura } 645 \text{ nm}) + (8,02 \times \text{Leitura } 663 \text{ nm}) \quad (3)$$

### 2.2.3 Leituras SPAD

A leitura obtida com o clorofilômetro depende da quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda, nas quais a absorção pela clorofila é diferente. Estas faixas são o vermelho (650 nm) com alta absorção e que não é afetada pelos carotenóides, e o infravermelho (940 nm) cuja absorção é muito baixa, fornecendo a calibração interna do aparelho.

Um sistema interno do equipamento emite luz vermelha e infravermelha que atravessam a folha. Um fotodiodo de silício (receptor) converte a luz transmitida em sinais

elétricos análogos, que são amplificados e transformados em sinais digitais, armazenados para o cálculo do valor obtido pelo clorofilômetro SPAD – 502, visualizado no monitor e armazenado, automaticamente, na memória do aparelho. A leitura do medidor corresponde a uma área de 2 mm x 3 mm, cujas folhas devem possuir espessura máxima de 1,2 mm. A profundidade de inserção da folha para a leitura é, no máximo, 12 mm (MINOLTA, 1989).

A maior absorção de luz pela clorofila a e pela clorofila b ocorre com comprimentos de onda de 430 nm e a menor absorção com comprimento de onda de 750 nm, quando a maior parte da irradiância é refletida ou transmitida. O método do clorofilômetro fornece leituras que variam entre 0 a 80, sendo os maiores valores indicativos de folhas com tonalidade mais intensa da cor verde (DWYER et al., 1995).

Para a calibração da leitura feita com o clorofilômetro e os teores foliares de nitrogênio foram utilizados três níveis de adubação nitrogenada: T<sub>0</sub> - sem fornecimento de N; T<sub>1</sub> - 150 kg ha<sup>-1</sup> N e T<sub>2</sub> - 300 kg ha<sup>-1</sup> N, adotando o delineamento de blocos ao acaso com três tratamentos (doses de N) e cinco repetições. Após as leituras os pares de folhas foram coletados para análise química e determinação do teor de nitrogênio (MALAVOLTA et al., 1997). As leituras e as análises químicas para o N foram realizadas após cada um dos quatro parcelamentos da adubação nitrogenada.

Os dados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS – System for Windows 6.11 (SAS Institute, 1996). Realizou-se a análise de variância e em função do nível de significância pelo teste F, para o efeito dos tratamentos, procedeu-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação das médias entre os tratamentos. As correlações entre leitura SPAD de clorofila, teor de clorofila extraível, fotossíntese líquida, teores de N total e produtividade do cafeeiro foram obtidas e testadas mediante procedimento CORR, pelo programa estatístico SAS.

### 2.3 Resultados e discussão

Pela análise de regressão linear verificou efeito significativo para as doses de nitrogênio em relação a fotossíntese, clorofila, teor foliar de nitrogênio e leituras SPAD em todos as épocas avaliadas (Tabela 1). A eficiência da adubação nitrogenada é baixa, isso reforça a resposta do cafeeiro ao fornecimento desse elemento.

olhas com elevado teor de nitrogênio apresentam grande teor de clorofilas o que resulta em melhor capacidade fotossintética em relação às folhas deficientes em nitrogênio (EVANS, 1983). Assim, a fotossíntese líquida aumenta linearmente com os níveis de proteínas solúveis, conseqüentemente maior será a assimilação de dióxido de carbono por unidade de nitrogênio em folhas com teor adequado desse elemento, em relação às folhas deficientes. A deficiência de nitrogênio diminui a eficiência com que a biomassa é produzida por unidade de interceptação de radiação solar, assim a planta apresenta menor taxa de fotossíntese líquida na falta de N (LAWLOR, 1994; LEA; MOROT-GAUDRY, 2001).

Durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos (janeiro a junho) houve correlação positiva entre os teores foliares de clorofila *a*, *b* e total, fotossíntese, nitrogênio foliar, leituras SPAD e produtividade em função das doses de N (Tabela 2). No período avaliado, houve decréscimo em todos os tratamentos devido o início da senescência, fenômeno que antecipou nas plantas que apresentavam deficiência de nitrogênio. Esse processo tem sido observado em várias espécies cultivadas (FELLER, 1986) e sugerido a existência de um controle fisiológico, do qual as células remobilizam frações de baixo peso molecular como aminoácidos para o enchimento dos grãos, sendo o nitrogênio o principal elemento para esse processo.

As leituras SPAD foram correlacionadas significativamente com os teores foliares de clorofila, nitrogênio e fotossíntese, bem como a produtividade (Tabela 2). Mediante uma análise de contraste entre os dados de produtividade do cafeeiro com as leituras SPAD para

cada época de avaliação, verificou-se que em janeiro (fase chumbinho) houve correlação significativa, o que indica que esta ferramenta é eficaz para prever a produtividade da cultura. A correlação nessa fase de desenvolvimento do fruto é extremamente importante, pois há possibilidade de corrigir deficiências de nitrogênio no cafeeiro, na fase inicial de desenvolvimento do fruto.

Tabela 1 - Fotossíntese, nitrogênio foliar, clorofila e leituras SPAD durante o desenvolvimento dos frutos em função de doses de nitrogênio

	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )	Fotossíntese ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	N (g kg <sup>-1</sup> )	Clor <i>a</i> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Clor <i>b</i> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Clor Total ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	SPAD leituras
Jan	0	1,93	15,66	8,22	9,47	17,69	24,23
	150	9,49	31,4	35,49	25,66	61,15	58,41
	300	15,43	33,3	39,21	33,56	72,78	70,86
	R <sup>2</sup>	0,99	0,83	0,84	0,96	0,90	0,93
	Equação	$y = 2,1974 + 0,045x$	$y = 17,967 + 0,0588x$	$y = 12,14 + 0,1033x$	$y = 10,85 + 0,0803x$	$y = 22,991 + 0,1836x$	$y = 27,852 + 0,1554x$
Fev	0	1,75	14,7	8,19	8,99	17,18	23,30
	150	9,60	30,03	32,87	24,92	57,80	58,04
	300	14,73	32,71	38,39	33,15	71,55	69,91
	R <sup>2</sup>	0,98	0,86	0,88	0,97	0,92	0,92
	Equação	$y = 2,2052 + 0,0433x$	$y = 16,81 + 0,06x$	$y = 11,381 + 0,1007x$	$y = 10,277 + 0,0805x$	$y = 21,658 + 0,1812x$	$y = 27,112 + 0,1554x$
Mar	0	1,38	15,80	7,84	8,53	16,37	23,00
	150	7,45	25,48	29,84	23,17	53,01	57,70
	300	11,51	30,59	30,83	29,28	60,11	68,60
	R <sup>2</sup>	0,98	0,97	0,78	0,95	0,87	0,92
	Equação	$y = 1,7112 + 0,0338x$	$y = 16,562 + 0,0493x$	$y = 11,346 + 0,0766x$	$y = 9,949 + 0,0692x$	$y = 21,295 + 0,1458x$	$y = 26,967 + 0,152x$
Abr	0	1,24	14,86	7,02	7,96	14,98	21,19
	150	6,86	25,01	27,85	20,96	48,81	54,67
	300	12,69	31,27	28,60	26,74	55,34	68,11
	R <sup>2</sup>	0,99	0,98	0,78	0,95	0,87	0,94
	Equação	$y = 1,2071 + 0,0382x$	$y = 15,508 + 0,0547x$	$y = 10,364 + 0,0719x$	$y = 9,164 + 0,0626x$	$y = 19,528 + 0,1345x$	$y = 24,526 + 0,1564x$
Maio	0	1,14	18,83	6,30	7,22	13,52	18,79
	150	6,19	28,00	26,10	19,59	45,69	53,31
	300	11,88	31,20	28,11	25,64	53,76	67,91
	R <sup>2</sup>	0,99	0,93	0,82	0,96	0,89	0,95
	Equação	$y = 1,0333 + 0,0358x$	$y = 19,825 + 0,0412x$	$y = 9,2676 + 0,0727x$	$y = 8,2736 + 0,0614x$	$y = 17,541 + 0,1341x$	$y = 22,107 + 0,1638x$
Jun	0	1,05	14,68	6,16	6,98	13,15	18,23
	150	5,36	24,90	25,60	18,49	44,09	52,61
	300	9,69	27,09	27,34	24,51	51,85	67,83
	R <sup>2</sup>	0,99	0,88	0,81	0,97	0,89	0,95
	Equação	$y = 1,2619 + 0,0288x$	$y = 16,018 + 0,0414x$	$y = 9,1112 + 0,0706x$	$y = 7,8981 + 0,0584x$	$y = 17,009 + 0,129x$	$y = 21,424 + 0,1653x$



A utilização do clorofilômetro portátil SPAD-502 tem aumentado muito nas últimas décadas para monitorar o teor de nitrogênio Uddling et al. (2007). Na literatura existem muitos trabalhos científicos utilizando o aparelho, porém somente parte dessas pesquisas estudaram as relações entre as leituras do clorofilômetro com os teores de clorofila da folha (Tabela 2). Os resultados do presente estudo corroboram as curvas de calibração do clorofilômetro SPAD e as relações com clorofilas extraíveis para a predição da adubação nitrogenada obtidos por (XU et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002; ESPOSTI et al., 2003; WANG et al., 2004).

A adubação nitrogenada pode afetar o crescimento e produtividade das plantas pela alteração da área foliar e capacidade fotossintética. Essas fortes relações entre teor de nitrogênio foliar e assimilação de CO<sub>2</sub> são verificadas na Tabela 2 (teor foliar x fotossíntese). Esses resultados concordam com estudos realizados anteriormente por (EVANS, 1983; LAWLOR et al., 1989, NAKANO et al., 1997), os quais obtiveram alta relação entre o fornecimento de nitrogênio e fotossíntese. A relação entre os componentes do sistema fotossintético pode devido o teor de nitrogênio no tecido foliar, refletindo na adaptação da maquinaria fotossintética.

Estudos realizados por (LU; ZHANG, 2000) indicam que plantas deficientes em N a capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> decresceu significativamente, devido a redução da Rubisco, pois as plantas deficientes apresentam menor teor de clorofila. Em plantas C3 como o cafeeiro, aproximadamente 75% do N está localizado no cloroplasto, particularmente na Rubisco, a qual é a enzima chave da carboxilação e também uma proteína de membrana relacionada com a cadeia transportadora de elétrons (LAWLOR et al., 2001).

Tabela 2 - Relação entre épocas de amostragens, doses de nitrogênio, taxa fotossintética, nitrogênio foliar, clorofila *a*, *b* e total, leituras SPAD em folhas de cafeeiro e produtividade

	Época	Dose	Fotos.	N	Clor <i>a</i>	Clor <i>b</i>	Clor total	SPAD	Prod
Época	1	0	-0,23 <sup>ns</sup>	-0,25 <sup>ns</sup>	-0,25 <sup>ns</sup>	-0,25 <sup>ns</sup>	-0,25 <sup>ns</sup>	-0,09 <sup>ns</sup>	-
Dose		1	0,96*	0,90*	0,86*	0,93*	0,89*	0,96*	0,96*
Foto			1	0,94*	0,91*	0,98*	0,95*	0,94*	0,94*
N				1	0,95*	0,97*	0,96*	0,95*	0,79*
Clor <i>a</i>					1	0,97*	0,99*	0,95*	0,78*
Clor <i>b</i>						1	0,99*	0,97*	0,89*
Clor total							1	0,96*	0,83*
SPAD								1	0,87*
Prod									1

<sup>ns</sup> – Não significativo \* - Significativo a 1 % (p<F 0,0001) pelo Teste Tukey

Outros autores (SHIRAIWA; SINCLAIR, 1993), também observaram efeito positivo de doses de nitrogênio na atividade fotossintética. A fotossíntese diminui em plantas eficientes de N devido à redução de fótons absorvidos e conseqüentemente, com uma queda na taxa de transporte de elétrons no cloroplasto (LU; ZHANG, 2000).

Os papéis do N na formação da colheita se exercem pela sua participação em compostos nitrogenados como aminoácidos, proteínas e enzimas. O N é o maior responsável pela vegetação que se reflete no índice de área foliar. No cafeeiro há muita folha e pouco fruto, o que possivelmente reflita um dreno ou demanda maior por parte das gemas vegetativas (MALAVOLTA, 2006).

Altas correlações têm sido demonstradas entre teor foliar de nitrogênio e proteína solúvel (SINCLAIR; HORIE, 1989). As taxas fotossintéticas em cafeeiro aumentaram linearmente com o teor foliar do elemento até um valor crítico. Assim o nitrogênio pode limitar o desenvolvimento em vários ambientes, além disso, altas taxas fotossintéticas correlacionaram com o teor de proteína solúvel, indicando que o teor foliar de nitrogênio pode ser um bom critério para estimar a capacidade de assimilação de carbono em várias condições ambientais e nutricionais, ou seja, em plantas deficientes ou não em nitrogênio. Plantas com baixos teores de nitrogênio foliar apresentam baixas taxa fotossintética, baixo acúmulo de matéria seca e produtividade (DWYER et al., 1995).

A flutuação sazonal dos teores foliares de clorofila *a*, *b* e total, fotossíntese, nitrogênio e leituras SPAD são observadas suas amplitudes entre seus valores extremos (Figura 2). Durante o desenvolvimento dos frutos a taxa fotossintética diminui devido à senescência foliar (FELLER; FISCHER, 1994).

Durante o desenvolvimento do fruto, as folhas entram em senescência com a degradação de pigmentos foliares, principalmente proteínas, as quais representam quantitativamente a fração mais importante do nitrogênio foliar. Essas proteínas podem ser degradadas por hidrolases para aminoácidos durante a senescência foliar e remobilizadas para outros órgãos, principalmente os frutos durante o enchimento de dos grãos (FELLER, 1990).

Com o início da senescência o influxo de nitrogênio decresce como consequência da baixa transpiração e a sua remobilização na planta.

Geralmente, plantas deficientes em nitrogênio apresentam baixo teor de proteínas nos cloroplastos e rápida degradação como verificado na Tabela 1 e Figura 2. A perda de estruturas de membranas está associada com baixo teor protéico (LAWLOR et al., 2001).

As várias respostas fisiológicas apresentam correlações positivas com doses de nitrogênio. A relação significativa entre o teor total de clorofila, nitrogênio, SPAD e clorofila, representam uma alternativa para monitorar e prever o estado nutricional no que se refere ao nitrogênio, uma vez que esse elemento é componente da molécula de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2004).

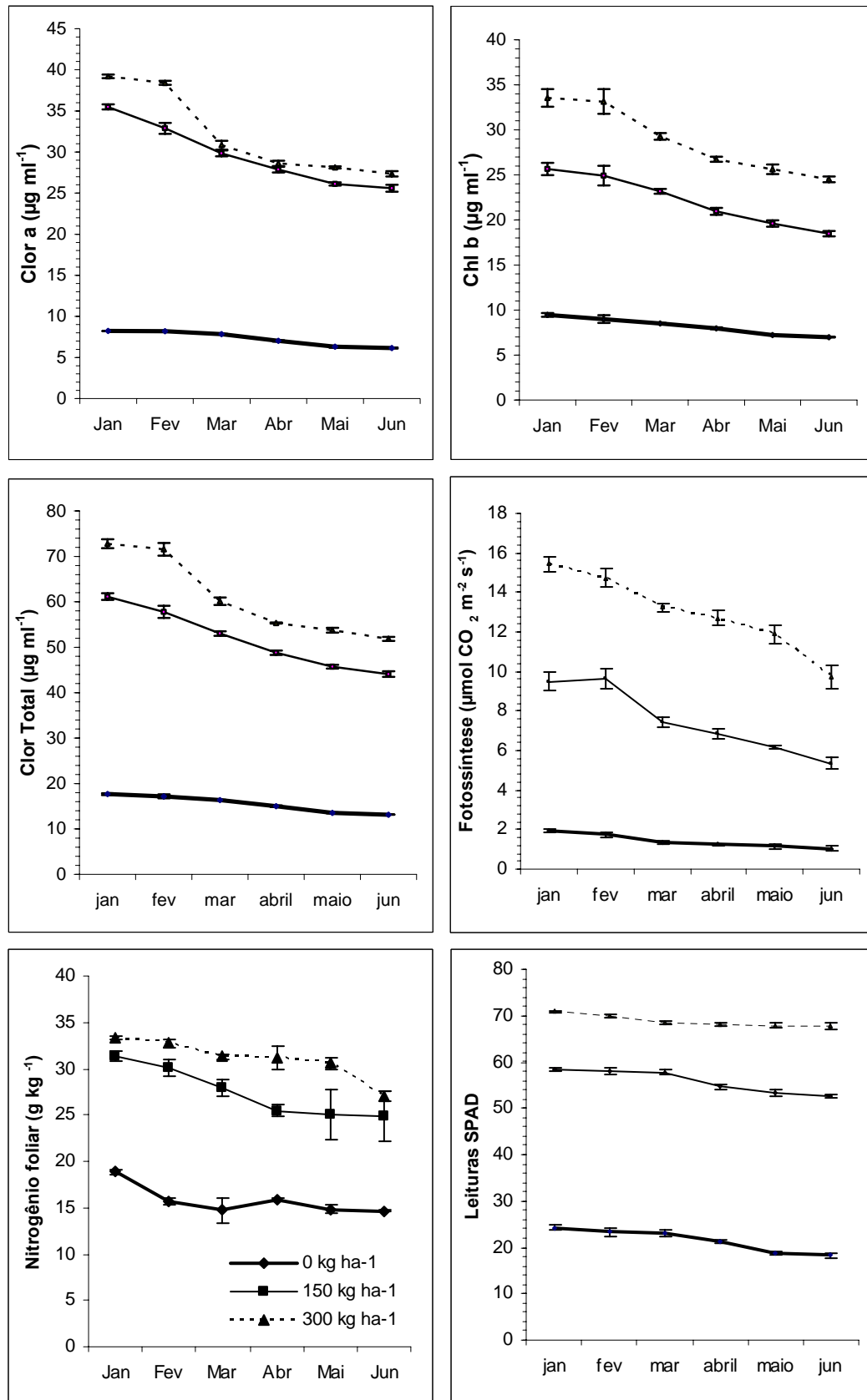


Figura 2 - Teor de clorofila, nitrogênio, fotossíntese e leituras SPAD em folhas de café durante o desenvolvimento do fruto em função de doses de nitrogênio

## 2.4 Conclusões

Durante a frutificação as folhas entram em senescência, com decréscimo na taxa fotossintética, nos teores de clorofila, de nitrogênio foliar e leituras SPAD.

A fotossíntese, a clorofila, o teor de nitrogênio foliar e as leituras SPAD correlacionaram significativamente com as doses de N.

O medidor de clorofila SPAD 502 foi eficiente para avaliar o estado nutricional do cafeeiro em relação ao teor de N, bem como apresentou correlações significativas para a estimativa da concentração de clorofilas, fotossíntese e produtividade. Este equipamento pode ser utilizado para prever a produtividade do cafeeiro, assim como a fotossíntese.

## Referências

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F, SANGOI, L. Leaf relative chlorophyll content as an indicator parameter to predict nitrogen fertilization in maize. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1359-1387, 2004.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in insolated chloroplasts. Polyphenol oxydase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, p. 1-15, 1949.

ARREGUI, L.M.; LASA, B.; LAFARGA, A.; IRANETA, I.; BAROJA, E.; QUEMADAC, M. Evaluation of chlorophyll meters as tools for N fertilization in winter wheat under humid Mediterranean conditions. **European Journal of Agronomy**, London, v. 24, p. 140–148, 2006.

BLACKMER, T.M.; SCHEPERS, J.S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 9/10, p. 1791-1800, 1995.

CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 89, n. 4, p. 557-562, 1997.

DWYER, L.M.; ANDERSON, A.M.; MA, B.L. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 179-182, 1995.

ESPOSTI, M.D.D, DE SEQUEIRA, D.L.; PEREIRA, P.R.G.; VENEGAS, V.H.A., SALOMAO, L.C.C, FILHO, J.A.M. Assessment of nitrogenized nutrition of citrus rootstocks using chlorophyll concentrations in the leaf. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, p. 1287–1299, 2003.

EVANS, J.R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, p. 1605-1608, 1983.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; CLARK, R.B. **Physiology of crop production**. Binghamton: Food Products Press, 2006. 345 p.

FELLER, U. Proteolytic enzymes in relation to leaf senescence. In: DALLING, M.J. (Ed.). **Plant proteolytic enzymes**. Boca Raton: CRC Press, 1982. v. 2, p. 49-68.

FELLER, U. Nitrogen remobilization and protein degradation during senescence. In: ABROL, Y.P. (Ed.). **Nitrogen in higher plants**, Somerset: Research Studies Press, 1990. p. 195-222.

FELLER, R.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Limerick, v. 13, n. 3, p. 241-273, 1994.

KAPOTIS, G.; ZERVOUDAKIS, G.; VELTSISTAS, T.; SALAHAS, G. Comparison of chlorophyll meter readings with leaf chlorophyll concentration in *Amaranthus vltus*: correlation with physiological processes. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, p. 395–397, 2003.

LAWLOR, D.W. Relation between carbon and nitrogen assimilation, tissue composition and whole plant function. In: ROY, J.; GARNIER, E. (Ed.). **A whole perspective and carbon nitrogen interactions**. The Hague: SPB Academic Publ., 1994. p. 47-60.

LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 773-787, 2002.

LAWLOR, D.W.; KONTTURI, M.; YOUNG, A.T. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, p. 43-52, 1989.

LAWLOR, D.W.; LEMAIRE, G.; GASTAL, F. Nitrogen, plant growth and crop yield. In: LEA, P.J.; MOROT-GAUDRY, J.F. (Ed.). **Plant nitrogen**. Berlin: Springer Verlag, 2001. p. 343-367.

LEA, J.P.; MOROT-GAUDRY, J.F. **Plant nitrogen**. Berlin: Springer Verlag, 2001. 407 p.

LEVIN, S.A.; MOONEY, H.A.; FIELD, C. The dependence of plant root: shoot ratios on internal nitrogen concentration. **Annals of Botany**, London, v. 151, p. 135-143, July 1989.

LIMA FILHO, O.F., MALAVOLTA, E.; CABRAL, C.P. Avaliação preliminar de um medidor portátil de clorofila como ferramenta para o manejo da adubação nitrogenada do cafeeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 642–650, 1997.

LU, C.; ZHANG, J. Photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as by nitrogen deficiency in maize plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 151, p. 135-143, 2000.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.

MALAVOLTA, E.; FAVARIN, J.L.; MALAVOLTA, M.; CABRAL, C.P.; HEINRICH, R.; SILVEIRA, J.S.M. Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 1017-1022, 2002.

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

MURILLO-AMADOR, B.; AVILA-SERRANO, N.Y.; GARCIA-HERNANDES, J.L.; LOPEZ-AGUILAR, R.; TROYO-DIEGUEZ, E.; KAYA, C. Relationship between a nondeceives. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 167, p. 363–364, 2004.

NAKANO, H.; MAKINO, A.; MAE, T. The effects of elevated partial pressures of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, p. 191-198, 1997.

NIJS, I.; BEHAEGHE, T.; IMPENS, I. Leaf nitrogen content as a predictor of photosynthetic capacity in ambient and global change conditions. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 22, n. 2/3, p. 177-183, 1995.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1996. 279 p.

REIS, A.R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 163-171, 2006.

REIS, A.R.; FURLANI JUNIOR, E.; SANTOS, M.R.T. dos; MARTINEZ, W.V. Avaliação do comportamento de *Coffea canephora* Pierre a aplicação de nitrogênio e sua relação com as leituras de clorofila. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambú. **Anais ...** Caxambu: EPAMIG, 2002. p. 374-375.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: version 6.11. 4<sup>th</sup> ed. Cary, 1996. v. 2, 842 p.

SCHRÖDER, J.J.; NEETESON, J.J.; OENEMA, O. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of the art. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 151-164, 2000.

SHIRAIWA, T.; SINCLAIR, T.R. Distribution of nitrogen among leaves in soybean canopies. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 804-808, 1993.

SINCLAIR, T.R.; HORIE, H. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 808-812, 1989.

STOCKING, C.R.; ONGUM, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. **American Journal of Botany**, New York, v. 49, n. 1, p. 284-289, 1962.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

UDDLING, J., GELANG-ALFREDSSON, J., PIIKKI, K., PLEIJEL, H. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. **Photosynthetica Research**, Prague, v. 91, p. 37-46, 2007.

WANG, Q.B.; CHEN, M.J.; LI, Y.C. Nondestructive and rapid estimation of leaf chlorophyll and nitrogen status of peace lily using a chlorophyll meter. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 27, p. 557-569, 2004.

WASKOM, R.M.; WESTFALL, D.G.; SPELLMAN, D.E. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 27, n. 3, p. 545-560, 1996.

XU, W.; ROSENOW, D.T.; NGUYEN, H.T. Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, p. 365-367, 2000.

YAMAMOTO, A.; NAKAMURA, T.; ADU-GYAMFI, J.J.; SAIGUSA, M. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeon pea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). **Journal Plant of Nutrition**, New York, v. 25, p. 2295-2301, 2002.



### 3 REMOBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES, AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E AMIDO PELAS FOLHAS E FRUTOS EM CAFEIEIRO

#### Resumo

O objetivo foi avaliar a remobilização de NPK e níquel em folhas e frutos de cafeeiro em função de diferentes doses de adubação nitrogenada durante a fase reprodutiva. O experimento foi instalado em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3x6, constituído pela combinação de três doses de N (0, 150 e 350 kg ha<sup>-1</sup>) e avaliado em seis diferentes épocas (janeiro, fevereiro, março, abril, maio e junho), com quatro repetições, utilizando o cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 com seis anos, implantado num Nitossolo Vermelho eutroférico, no município de Piracicaba-SP. O teor de N foliar aumentou em função das doses de N fornecidas. Houve decréscimo no teor de N e K nas folhas do cafeeiro durante a fase de desenvolvimento dos grãos, com exceção do fósforo, que apresentou ligeiro aumento no tecido foliar. Os teores foliares e nos grãos de P e K estão abaixo dos valores padrões, enquanto os teores de Ni estavam acima dos padrões para o cafeeiro. Nos grãos cereja e passa há maior concentração de P em relação ao verde cana, porém quando apresenta teores adequados de N foliar, a fase verde cana apresenta maior teor de N nos grãos. O teor de aminoácidos totais foi maior no estágio cereja independentemente das doses de N. O teor de amido e açúcar redutor nos grãos foram superiores no estágio cereja, independentemente da dose de N. O teor de proteína solúvel total foi superior no estágio de fruto passa, com resposta linear e positiva a dose de N.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, N; P ;K; Ni

## MOBILIZATION OF MINERAL ELEMENTS, AMINOACIDS, SUGARS AND STARCH BY LEAVES AND FRUITS OF THE COFFEE PLANTS

### Abstract

The objective of this work was the evaluation of the extent of mobilization of NPK and Ni, amino acids, starch and sugars in leaves and fruits of the coffee plants during the reproductive period, and as a function of rates of nitrogen. The experiment was set up in randomized blocks, as a 3x6 factorial, consisting of the combination of three rates (0, 150 and 350 kg ha<sup>-1</sup>), with evaluation made in 6 months (January, February, March, April, May and June) and four replicates. Six year old plants of the cultivar Catuai Vermelho IAC 44 growing on a Red Nitosoil eutroferic in the county of Piracicaba, SP were the experimental material. Linear regression showed an increase in leaf N, aminoacids, sugars and proteins on all months. During fruit development there was a decrease in leaf N and K, and a slight raise in P concentration. The content of P both in the leaves and in the beans are lower than standard values. This is due to low levels of this elements in the soil when the experiment began. During the development level found at the cane-green stage. At this stage bean N is higher than in other periods. The content of sugars and starch are bigger in the cherry bean fruits stage.

**Keywords:** *Coffea Arabica*; N; P K ; Ni

### 3.1 Introdução

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas. Depois que a folha do cafeeiro termina sua expansão ela passa a ser exportadora de nutrientes. De acordo com Calbo (1989), a degradação de compostos celulares resulta na migração de fotoassimilados e elementos minerais móveis, especialmente N e K para drenos tais como frutos e raízes, resultando até na queda da folha.

O desfolhamento acentuado ou depauperamento do cafeeiro se deve à excessiva mobilização de nutrientes pelos frutos, como consequência da grande carga de frutos e pequena razão folha/fruto (RENA et al., 1983). Mesmo em ano de baixa produção a demanda de nutrientes continua, sendo direcionada, principalmente, para o crescimento de ramos

plagiotrópicos, formação de novos ramos, folhas e raízes que vão substituir o fruto como dreno de carboidratos e nutrientes (MALAVOLTA et al., 2002).

A avaliação da capacidade de absorção e de remobilização do nitrogênio em cada estágio do desenvolvimento da planta fornece dados importantes para a avaliação de sua eficiência na utilização desse nutriente e pode ser utilizada no planejamento de uma cafeicultura eficiente.

A nutrição do cafeeiro é analisada principalmente sob o ponto de vista da produção, e por ser uma cultura de alta exigência nutricional, a adubação baseada exclusivamente nas quantidades dos nutrientes exportados nos grãos, não constitui uma recomendação correta. Sendo necessário levar em consideração também a quantidade dos elementos minerais necessários para a manutenção da planta e para a produção de novos ramos, folhas e raízes (MALAVOLTA et al., 1974).

Assim como a avaliação do estado nutricional de uma planta é determinada pela análise foliar, a análise química de frutos determina a quantidade de nutrientes exportados pela produção. Essa análise tem mostrado que o nitrogênio e o potássio são os dois elementos exigidos pelo cafeeiro em maior proporção na formação dos frutos (VALARINI; BATAGLIA, 2005).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a remobilização de macronutrientes (N, P e K), níquel, amido, aminoácidos totais, açúcar redutor e proteínas solúveis de folhas e frutos em café arábica durante o crescimento e expansão dos frutos de café.

### **3.2 Revisão Bibliográfica**

Em trabalhos realizados por (CATANI; MORAES, 1958; CATANI et al., 1965), constata-se que o nitrogênio, potássio e cálcio são absorvidos intensamente com o aumento da idade do cafeeiro, enquanto o fósforo e o magnésio são absorvidos de modo menos

pronunciado. Os autores observaram, entre dois e meio e três e meio anos de idade, as exigências minerais da cultura duplicavam, devendo-se quase exclusivamente ao início de produção de grãos.

Durante a formação do fruto há um decréscimo na concentração foliar dos principais macronutrientes, tornando evidente que qualquer interpretação dos teores de nutrientes encontrados pela análise foliar deve levar em consideração a época de amostragem (CATANI et al., 1967; GALLO et al., 1970; HIROCE, 1981).

Quando a folha do cafeeiro termina sua expansão, passa a ser potencial exportadora de nutrientes. De acordo com Calbo (1989), a degradação de compostos celulares resulta na migração de fotoassimilados e elementos minerais móveis, especialmente N e K para drenos tais como frutos e raízes, resultando até na queda da folha.

Os casos severos de desfolhamento, conhecidos por depauperamento do cafeeiro, de acordo com Rena et al. (1983), ocorrem devido à excessiva mobilização de nutrientes pelos frutos, resultado da grande carga e pequena razão folha/fruto, característica da espécie.

Mesmo em ano de baixa produção a demanda de nutrientes continua, sendo direcionada principalmente, para o crescimento de ramos plagiotrópicos e para a formação de novos ramos, folhas e raízes que vão substituir o fruto como dreno de carboidratos e nutrientes (MALAVOLTA et al., 2002).

### **3.3 Composição química do café**

Com relação à composição química dos grãos de café, Rinantonio (1987) verificou para café arábica uma faixa de teores de 55 a 65,5% de carboidratos, em que 6 a 12,5 % correspondiam a carboidratos solúveis e 34 a 53% constituem estruturas insolúveis. Os ácidos fenólicos de 8 a 11%; 0,1% de ácido acético, propiônico, butírico e valérico; 0,7 a 1,4% de ácido cítrico; 0,3% a 0,7% de ácido málico; 0,3 a 0,5% de ácido quínico; 6,7 a 9,2% a ácido

clorogênico e 1 a 3% de lignina. Os lipídeos respondem por 15 a 18%, com 0,2 a 0,3% de gordura e 7,7 a 17,8% a óleos, compostos nitrogenados de 11 a 15%, sendo 0,2 a 0,8 % de aminoácidos, como ácido glutâmico, aspártico, asparagina e outros; 8,5 a 12% de proteína; 0,8 a 1,4% de cafeína e 0,6 a 1,2% de trigonelina. Os minerais correspondem a 5,4% com 1,68 a 2,0% de potássio; 0,07 a 0,35% de cálcio; 0,16 a 0,31% de magnésio; 0,13 a 0,22% de fosfato e 0,13% de sulfato.

O amadurecimento dos frutos de café é caracterizado por vários fatores, destacando-se entre eles o aumento no teor de açúcares solúveis em decorrência da degradação do amido (PIMENTA, 1995). Dentre os açúcares do café predominam os não redutores, particularmente a sacarose, sendo que os redutores se apresentam em pequenas quantidades (MAZZAFERA, 1999). Durante o processo de torração do café os açúcares redutores principalmente, reagem com aminoácidos (reação de Maillard) dando origem a compostos coloridos desejáveis, responsáveis pela cor marrom do café. Nestas reações são produzidos compostos voláteis, que apresentam um grande efeito no aroma do produto final (CHAGAS, 1994).

O teor médio de açúcares totais é de 3,6 % para frutos no estágio de maturação cereja (LEITE, 1991), mostrando se bem inferiores aos teores obtidos por Navellier (1970) que é de 8,0 %. Segundo o autor as condições climáticas da região em estudo podem ter acarretado um menor desdobramento de amido em açúcares, sendo os cafés dessa região mais ricos em amido e com menores teores de açúcares quando comparados aos cafés de outros locais. Com relação a açúcares redutores foi observado um teor de 0,18% e para redutores de 3,40%, teor este inferior ao em torno de 5,3% apresentado por Wolfrom et al. (1960).

### **3.4 Material e Métodos**

O presente experimento em sua fase laboratorial foi conduzida em parte no laboratório de bioquímica de plantas do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

#### **3.4.1 Composição química**

Os grãos e as folhas foram submetidos à secagem em estufa a 65° C com circulação de ar forçada durante 48 horas. Posteriormente, o material foi moído e preparado para a análise química, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

#### **3.4.2 Determinação de proteína solúvel total (PTS)**

Inicialmente 0,5 g de cada amostra seca foram submetidas a uma extração com 10mL de acetona gelada sendo em seguida centrifugada a 4000 g durante 5 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado sendo repetida a extração mais uma vez, e o precipitado resultante foi seco em chapa aquecedora a 90° C. Após a secagem foi adicionado 5mL de NaOH 0,1 N o material foi homogeneizado com bastão de vidro e agitação mecânica por 15 min. e centrifugado a 4000 g durante 10 minutos a 25 °C.

O sobrenadante foi coletado e armazenado em outro tubo, repetiu-se o processo mais uma vez os sobrenadantes foram combinados e, a mistura foi homogeneizada por 15 min. sob agitação mecânica.

Para a determinação de proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976) modificado, coletou-se 0,1mL dos extratos obtidos juntamente com 0,1mL de HCl 0,01 N e 0,3 mL de água destilada acrescentando-se 2,5mL do reagente de Bradford, que dão origem a uma mistura cuja intensidade de coloração foi lida em espectrofotômetro a 595 nm.

O teor de proteína das amostras foi calculado tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com albumina de soro bovino (BSA).

### **3.4.3 Determinação de aminoácidos totais**

#### **3.4.3.1 Obtenção dos extratos para análise qualitativa de aminoácidos**

Baseado na metodologia de Bielinski e Turner (1966) modificada. Em 0,5 g do material vegetal seco (pó), adicionou-se 5mL de uma solução metanol/água (1:1) + 3mL de clorofórmio. O material foi homogeneizado com bastão de vidro seguido de agitação mecânica por 15 minutos, e em seguida centrifugada a 4000 g durante 1 minuto a 4 °C, coletando-se o sobrenadante e armazenando-o. Ao precipitado foram novamente adicionados os mesmos reagentes iniciais seguindo-se o mesmo procedimento para a obtenção do segundo sobrenadante.

Para a análise dos aminoácidos os dois sobrenadantes foram reunidos e mantidos em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a separação das fases, tomou-se a fase superior para a análise.

#### **3.4.3.2 Análise qualitativa de aminoácidos**

Análise dos extratos obtidos no item anterior foi baseada na metodologia modificada de Cocking e Yemm (1954) onde 0,1mL foi acrescentado a 4,9mL de água destilada + 2 mL de solução alcoólica de ninidrina 5%. Após a homogeneização mecânica, as amostras foram submetidas a banho maria a 90 °C durante 15 min. e em seguida resfriadas para leitura espectrofotômetro a 570 nm.

A concentração de aminoácidos totais das amostras foi calculada tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com Leucina.

### **3.5 Determinação de carboidratos**

#### **3.5.1 Determinação de amido**

##### **3.5.1.1 Obtenção do extrato**

Inicialmente 0,5 g de cada amostra seca foi submetida a uma extração com 2 mL de uma solução clorofórmio/éter (1:1) sendo em seguida centrifugada a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado sendo repetida a extração mais uma vez. Ao precipitado resultante da segunda extração foi adicionado 2 mL de éter, homogeneizado mecanicamente e em seguida centrifugado a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em chapa aquecedora a 90 °C.

Após a secagem foi adicionado 5mL de NaOH 0,1 N sendo o material homogeneizado com bastão de vidro e agitação mecânica por 15 min., sendo em seguida incubado em banho maria a 100 °C durante 15 minutos. Após o resfriamento as amostras foram centrifugadas a 4000 g durante 15 min. a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de amido.

##### **3.5.1.2 Quantificação de amido**

Análise dos extratos obtidos no item anterior foi baseada na metodologia modificada de Allen et al. (1974) e Dubois et al. (1956), onde em 0,2 mL da amostra foi acrescentado 9,8 mL de água destilada. Uma alíquota de 1mL das amostras diluídas foram acrescidas de 0,5mL de uma solução de fenol 5% + 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) colocado diretamente sobre as mesmas. A mistura ficou em repouso por 10 min., sendo homogeneizada mecanicamente por 15 minutos, em seguida as amostras foram submetidas a banho-maria 30 °C durante 25 minutos, após resfriamento as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 485 nm.

A concentração de amido das amostras foi calculada tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com amido solúvel.



### **3.5.1.3 Determinação de açúcares redutores**

A análise foi baseada na metodologia modificada de Nelson (1944). Para cada tratamento foram analisados 0,1 g das amostras. A esse material foi adicionado água destilada até completar 5 mL, sendo em seguida aquecido em banho-maria a 60 °C por 30 minutos.

O material foi filtrado em papel filtro Whatman nº 3, e as amostras foram diluídas na proporção de 0,1 mL de amostra/ 4,9 mL de água destilada. Em seguida a 1mL das amostras foram adicionados 1mL de água destilada + 1mL da solução de Somoghy, aquecendo-se em água fervente por 10 min e resfriada, logo após acrescentou-se 1 mL da solução de Nelson + 7 mL de água destilada. A intensidade de coloração foi lida em espectrofotômetro a 450 nm, contra branco contendo 1 mL de água destilada + 1 mL da solução de Somoghy, submetidos a fervura por 10 minutos, resfriadas e acrescentado mais 1 mL da solução de Nelson + 7 mL de água destilada.

A concentração de açúcares redutores das amostras foi calculada tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com glicose.

## **3.6 Resultados e discussão**

### **3.6.1 Teores de NPK e Ni em folhas e frutos**

O teor foliar de N, aminoácidos totais, açúcar redutor e proteína solúvel apresentaram resposta linear e positiva em função da dose de N, em todas as épocas avaliadas (Tabela 1). O nitrogênio por participar da composição dos aminoácidos, desempenha efeito direto no conteúdo de proteínas conforme aumento no fornecimento doses de adubação nitrogenada (MARSCHNER, 1995).

As plantas de café submetidas ao tratamento T<sub>0</sub> (sem N) durante três anos agrícolas, apresentaram teores foliares muito abaixo dos valores padrões para cafeeiro em produção (15 g kg<sup>-1</sup>), os quais variam de 26 a 32 g.kg<sup>-1</sup> (MALAVOLTA et al., 1997). Para coletas ao longo

do ano, os resultados obtidos pelo presente estudo corroboram com os dados já apresentados por Valarini e Batáglia (2005).

Os teores de nitrogênio nas folhas de ramos com frutos de café apresentam valores decrescentes de acordo com as épocas de amostragens (Figura 1). Corroborando resultados obtidos por Catani e Moraes (1958), em que as folhas de cafeeiro apresentaram tendência de aumento na concentração de nitrogênio em janeiro e decréscimo em julho.

A concentração de nitrogênio nos frutos aumenta linearmente com as doses de nitrogênio (Figura 2) em todas as fases fenológicas dos frutos. Durante a formação do fruto, os aminoácidos derivados da senescência foliar são reutilizados para o enchimento do grão, principalmente na formação de compostos nitrogenados no endosperma. Plantas com deficiência de nitrogênio apresentam maiores teores do elemento na fase cereja, enquanto que plantas suplementadas com altas doses de nitrogênio apresentam maiores concentrações do elemento na fase verde (Figura 2).

Os teores foliares de fósforo durante a fase reprodutiva do cafeeiro apresentaram um leve aumento (Figura 1) principalmente em plantas que apresentavam deficiência de nitrogênio. Valarini e Batáglia (2005) observaram diminuição do teor de fósforo ao longo dos meses, de maneira mais acentuada entre fevereiro a maio, período em que a redistribuição provavelmente é direcionada para a maturação do fruto.

O cafeeiro exige teores relativamente pequenos de fósforo tanto para o crescimento quanto para a formação dos frutos. Sua absorção segue a mesma tendência observada para nitrogênio, com pequenas variações sazonais (Figura 1) do seu teor conforme as alterações climáticas e o período de desenvolvimento da cultura Malavolta (2006).

Comparando-se os teores de fósforo foliar com os valores padrões (1,2 a 2,0 g.kg<sup>-1</sup>) de acordo com Malavolta et al. (1997), verifica-se que os valores obtidos no presente trabalho

são inferiores (Tabela 1), devido ao baixo teor de fósforo disponível no solo durante a realização do experimento.

Frutos de café na fase verde apresentam menores teores de fósforo independentemente dos tratamentos (Figura 2), enquanto que na fase cereja os valores são maiores.

A variação do teor foliar de potássio durante o desenvolvimento dos frutos foi diferente entre os tratamentos (Figura 1). Em plantas deficientes em nitrogênio ( $T_0$ ), houve tendência de diminuição, apresentando maior valor em janeiro e menores teores de potássio em junho. Nos tratamentos  $T_1$  e  $T_2$  houve tendência de maiores valores entre maio a junho, não corroborando os dados de (CATANI; MORAES, 1958), os quais verificaram maiores valores de potássio em janeiro e menores em julho, como também foi observado por (SOUZA et al., 1975).

Comparando-se os teores foliares de potássio nas amostras com os valores padrões (18 a  $25 \text{ g.kg}^{-1}$ ) conforme Malavolta et al. (1997), observa-se que os valores obtidos estão abaixo dos teores adequados para a cultura, porém há uma tendência de remobilização para os grãos (Figura 2). Plantas deficientes em nitrogênio, apresentaram frutos com maior teor de potássio nas fases verde e cereja (Figura 2), o que provavelmente explica a diminuição dos teores foliares (Figura 1).

Provavelmente as diminuições no teor de nitrogênio e potássio das folhas, de janeiro a maio, tiveram como dreno principal a formação dos frutos, neste caso poderia estar acontecendo um suprimento contínuo via solo, remobilização das folhas mais velhas, ou provavelmente os dois processos simultaneamente.

Tabela 1 - Teor de N, P, K (g kg<sup>-1</sup>), amido (mg g<sup>-1</sup>), aminoácidos totais (mg g<sup>-1</sup>), açúcar total (mg g<sup>-1</sup>) e proteína solúvel (mg g<sup>-1</sup>) em folhas de café

		T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	R <sup>2</sup>	Equação
<b>Jan</b>	N	15,66	31,4	33,3	0,83	y = 17,967 + 0,0588x
	P	0,73	0,78	0,76	ns	Ns
	K	14,25	11,99	12,78	ns	Ns
	Amido	14,1	16,2	15,8	ns	Ns
	Aminoácidos totais	8,90	9,80	15,60	0,85	y = 8,0833 + 0,0223x
	Açúcar redutor	40	61	75	0,98	y = 0,1167x + 41,167
	Proteína solúvel	0,62	5,66	6,52	0,86	y = 1,3157 + 0,0197x
<b>Fev</b>	N	14,7	30,03	32,71	0,86	y = 16,81 + 0,06x
	P	0,73	0,78	0,76	ns	Ns
	K	14,25	11,99	12,78	ns	Ns
	Amido	13,7	15,8	15,2	ns	Ns
	Aminoácidos totais	8,69	9,27	14,95	0,82	y = 7,8361 + 0,0209x
	Açúcar redutor	35	56	71	0,99	y = 0,12x + 36
	Proteína solúvel	0,53	4,92	5,92	0,88	y = 1,0921 + 0,018x
<b>Mar</b>	N	15,80	25,48	30,59	0,97	y = 16,562 + 0,0493x
	P	0,79	0,80	0,79	ns	Ns
	K	13,76	10,42	12,68	ns	Ns
	Amido	16,9	13,2	11,7	ns	Ns
	Aminoácidos totais	4,88	9,00	15,17	0,98	y = 4,5374 + 0,0343x
	Açúcar redutor	33	55	70	0,98	y = 0,1233x + 34,167
	Proteína solúvel	0,42	4,11	5,55	0,94	y = 0,7944 + 0,0171x
<b>Abr</b>	N	14,86	25,01	31,27	0,98	y = 15,508 + 0,0547x
	P	0,81	0,79	0,76	ns	Ns
	K	12,48	11,70	13,76	ns	Ns
	Amido	18,0	12,5	14,6	ns	Ns
	Aminoácidos totais	7,37	8,06	11,47	0,88	y = 6,9145 + 0,0137x
	Açúcar redutor	30	50	65	0,99	y = 0,1167x + 30,833
	Proteína solúvel	0,33	3,22	3,95	0,89	y = 0,6927 + 0,0121x
<b>Mai</b>	N	18,83	28,00	31,20	0,93	y = 19,825 + 0,0412x
	P	0,80	0,80	0,78	ns	Ns
	K	11,30	12,48	13,27	ns	Ns
	Amido	14,9	14,4	14,5	ns	Ns
	Aminoácidos totais	7,06	12,97	13,24	0,78	y = 7,9976 + 0,0206x
	Açúcar redutor	28	45	50	0,90	y = 0,0733x + 30
	Proteína solúvel	0,30	2,33	2,86	0,89	y = 0,549 + 0,0086x
<b>Jun</b>	N	14,68	24,90	27,09	0,88	y = 16,018 + 0,0414x
	P	0,82	0,77	0,76	ns	Ns
	K	11,60	12,29	14,74	ns	Ns
	Amido	14,2	12,7	13,5	ns	ns
	Aminoácidos totais	5,12	8,23	8,75	0,85	y = 5,5533 + 0,0121x
	Açúcar redutor	22	40	48	0,95	y = 0,0867x + 23,667
	Proteína solúvel	0,27	2,21	2,43	0,82	y = 0,555 + 0,0072x

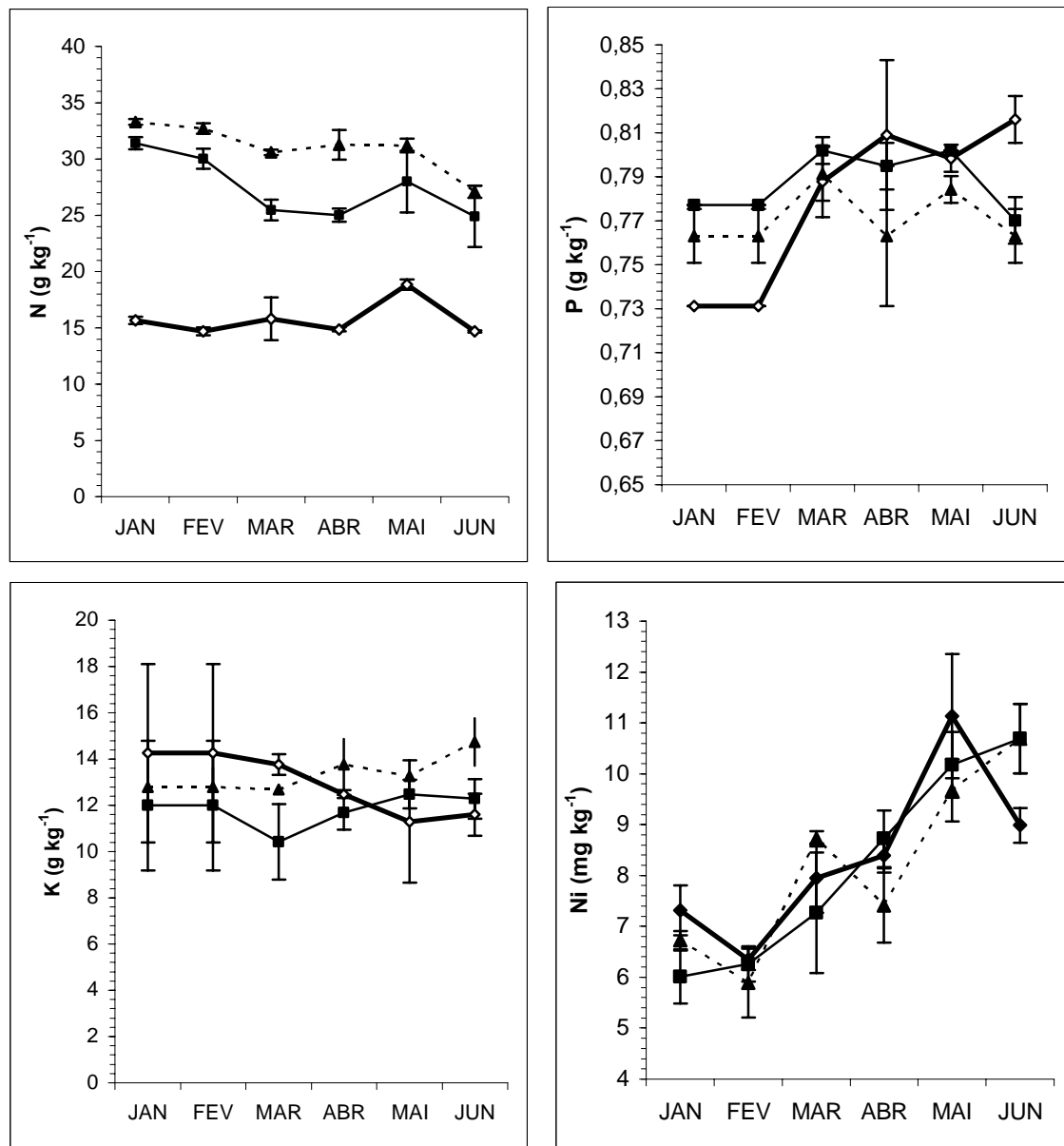


Figura 1 - Teor foliar de N, P, K e Ni durante o desenvolvimento dos frutos de café em relação a doses de nitrogênio ( $\diamond$  testemunha,  $\blacksquare$   $150 \text{ kg ha}^{-1}$  e  $\blacktriangle$   $300 \text{ kg ha}^{-1}$ )

As doses de N não alteraram significativamente os teores foliares de Ni (Figura 1), entretanto para este nutriente houve um aumento contínuo nos teores foliares, em relação às épocas de avaliações. O maior teor foi encontrado em maio ( $11 \text{ mg g}^{-1}$ ), época em que os frutos estavam na fase passa. Os teores foliares de Ni estão acima dos observados por Malavolta et al. (2006) em cafeeiro, que variou de  $0,5$  a  $5 \text{ mg g}^{-1}$ . Segundo Pavan e Bingham (1982), os teores foliares de Ni acima de  $35 \text{ mg g}^{-1}$  são considerados tóxicos para o cafeeiro.

O maior teor de Ni nos grãos ocorre na fase passa (Figura 02), enquanto em plantas deficientes em nitrogênio (testemunha), o teor de Ni não variou significativamente entre os estádios verde, cereja e passa. Nas plantas nutridas adequadamente em N o teor de Ni nos frutos passa foi significativamente superior aos teores determinados nas fases cereja e verde. A mobilidade do Ni no floema é alta, portanto na senescência até 70% do Ni acumulado na parte aérea pode se deslocar para a semente Malavolta (2006). O Ni é prontamente transportado para os órgãos reprodutivos pela seiva do floema e podem ser acumulados nas sementes e grãos, órgãos dependentes do transporte de seiva para acúmulo desse elemento (WELCH, 1995). O maior acúmulo de Ni nos frutos passa, pode ter coincidido com a época de amostragem (maio), período em que houve o maior acúmulo de Ni nas folhas do cafeeiro.

### **3.6.2 Degradação de compostos durante senescência foliar**

A degradação do conteúdo de amido, aminoácidos totais, açúcar redutor e proteína solúvel nas folhas durante o desenvolvimento dos frutos do cafeeiro em relação à adubação nitrogenada estão apresentados na Figura 3. O nitrogênio absorvido pelas plantas combina com cadeias carbônicas e formam aminoácidos, que resultam em proteínas armazenadas nos tecidos vegetais. Por ocasião da fase de enchimento de grãos essas reservas são quebradas, translocadas e armazenadas nesses órgãos na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 1995).

Durante o crescimento e expansão dos frutos de café, as folhas a partir de fevereiro entram em senescência, apresentando um aspecto amarelado. A senescência é caracterizada pela transição do metabolismo da assimilação para a remobilização do nitrogênio (PEOPLES; DALLING, 1988).

Em todos os tratamentos, o teor de proteína solúvel foliar diminuiu drasticamente durante o período avaliado (Figura 3). À medida que os frutos desenvolviam, as folhas

entraram em senescência, o que provavelmente explicaria a diminuição do conteúdo de proteína solúvel, N foliar e clorofila, pois as mesmas são dependentes de N em suas estruturas.

O teor de aminoácidos totais também decresce durante a senescência foliar, porém não na mesma proporção em relação as proteínas (Figura 3). O acúmulo de aminoácidos normalmente não é observado durante a senescência, o que indica que o floema é uma via eficiente para a remobilização de compostos. O acúmulo de aminoácido pelas folhas pode ocorrer devido a diversos fatores, sendo o principal a maturação dos frutos ou estresse (PEOPLES; DALLING, 1988). De acordo com os dados da Figura 3, verifica-se uma diminuição do teor de aminoácidos até abril, seguido de acréscimo durante o mês de maio. Provavelmente, esse acúmulo de aminoácidos nas folhas em todos os tratamentos foi devido ao estresse hídrico ocorrido no referido mês (maio), seguido de decréscimo em junho.

O teor de amido nas folhas é diferente entre os tratamentos durante o crescimento e expansão dos frutos (Figura 3). Em plantas deficientes em nitrogênio, o teor de amido foliar aumenta a partir de fevereiro, enquanto nos tratamentos T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> diminuem. O aumento no teor de amido foliar em plantas deficientes em nitrogênio, no presente experimento, corrobora com resultados obtidos por Malavolta et al. (2004), os quais verificaram aumento na quantidade nos grãos de amido nas folhas de algodão submetido à deficiência nitrogenada. A variação sazonal desses teores foi bastante similar em todas as plantas, independentemente do tratamento (0, 150 e 300 kg ha<sup>-1</sup> N). Por outro lado, esses teores de amido foram inversamente proporcional com a produtividade, com maior teor no T<sub>0</sub>, tratamento em que as plantas apresentaram a menor produtividade. Alguns autores associam a redução dos teores de amido na planta com a formação de frutos e com a seca de ramos (PATEL, 1970; CARVALHO et al., 1993), porém os autores concluem que o teor de amido não é um bom parâmetro para estimar o vigor e produtividade de plantas de café. Supõe-se que a carência de carboidratos

seja uma das principais causas. Contudo, parece que a redução do teor de amido, nas folhas ou nos ramos frutíferos, não está associada à formação dos frutos, pois esses teores variam semelhantemente nas plantas com frutos ou sem frutos (CARVALHO et al., 1993).

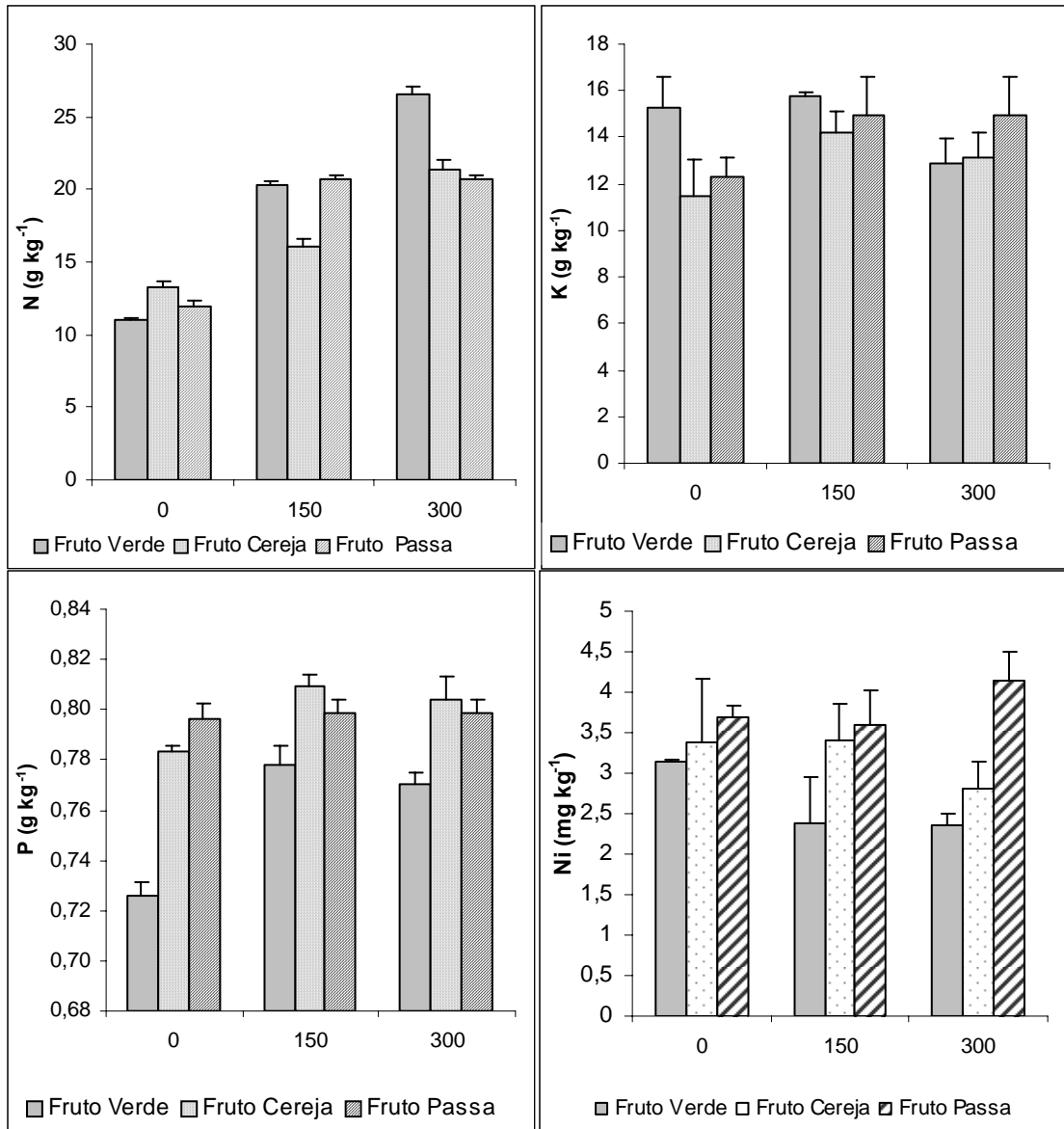


Figura 2 - Teor de N, P e K dos frutos de café em diferentes fases fenológicas em relação a doses de nitrogênio (testemunha, 150 kg ha⁻¹ e 300 kg ha⁻¹)

Provavelmente as diminuições no teor de nitrogênio e potássio das folhas, de janeiro a maio, tiveram como dreno principal a formação dos frutos, neste caso poderia estar



acontecendo um suprimento contínuo via solo, remobilização das folhas mais velhas, ou provavelmente os dois processos simultaneamente.

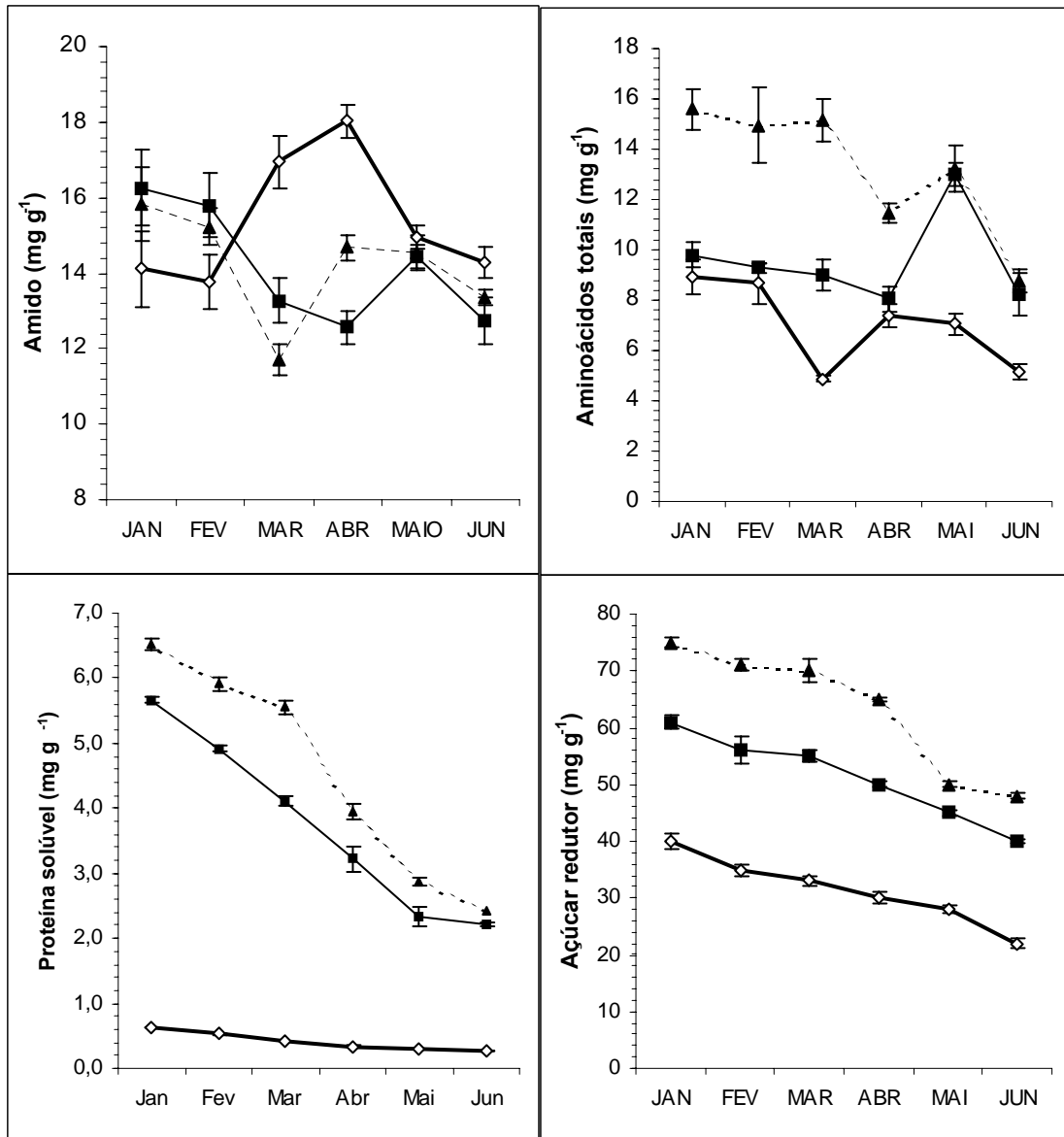


Figura 3 - Teor foliar de amido, aminoácidos totais, açúcar redutor e proteína solúvel durante o desenvolvimento dos frutos de café em relação a doses de nitrogênio (◇ testemunha, ■ 150 kg ha<sup>-1</sup> e ▲ 300 kg ha<sup>-1</sup>)

### 3.6.3 Composição química de grãos

Os resultados obtidos para açúcares redutores, aminoácidos totais, proteína e amido no grão estão apresentados na Figura 4.

Houve diferença significativa entre as amostras dos diferentes estádios de maturação e em níveis de nitrogênio. Os teores mais elevados de açúcar redutor foram verificados significativamente em frutos colhidos cereja, valores intermediários para o fruto passa e menores teores nos frutos verdes. Nas plantas deficientes de N os grãos apresentaram maior teor de açúcar redutor na fase verde. Estes resultados corroboram com estudos realizados por Pimenta (1995), porém o autor estudou apenas a variação sazonal do açúcar redutor em diferentes estádios de maturação.

À medida que a maturação intensifica, há um aumento gradativo nos teores de açúcares redutores nos frutos, atingindo valores máximos na fase cereja. Quando estes frutos secam na própria planta e perdem sua mucilagem, rica em carboidratos, os teores destes açúcares diminuem. Esta diminuição nos açúcares pode ser atribuída a um início de senescência dos frutos no quais os açúcares são transformados pela via anaeróbica com produção de álcool e ácidos Pimenta (1995).

Os teores de açúcar redutor em cada tratamento para os diferentes estádios de maturação (Figura 04), estão acima da faixa estabelecida por Tango (1971) e Njoroge (1987) que é entre 0 a 5 mg g<sup>-1</sup> para cafés provenientes de mistura de frutos derriçados. Os teores encontrados nos grãos colhidos no estágio cereja estão acima de 5 mg g<sup>-1</sup> encontrado por Pimenta (1995) e de 1,8 mg g<sup>-1</sup> obtido por Leite (1991), para cafés colhidos no mesmo estágio na região de Lavras-MG. Pode-se atribuir tais diferenças às variações climáticas entre anos Pimenta (1995), visto serem os experimentos realizados em épocas e regiões diferentes.

Há variação temporal e espacial no uso de reservas e na produção de carboidratos no metabolismo da copa, caules, raízes e estruturas de reservas. O transporte de carboidratos apresenta variações na direção do dreno preferencial. A taxa de importação de carboidratos, por um dreno específico, pode ser alterada por mudanças na força dreno ou por competição entre drenos. Em plantas cultivadas produtoras de grãos, as folhas mais próximas ao solo

abastecem o sistema radicular e as mais próximas ao ápice suprem os meristemas da parte aérea (LARCHER, 2000). Plantas superiores acumulam carboidrato não estrutural durante períodos de excesso de produção e gastam estas reservas quando as taxas de utilização excedem a de produção (KOZLOWSKI, 1992).

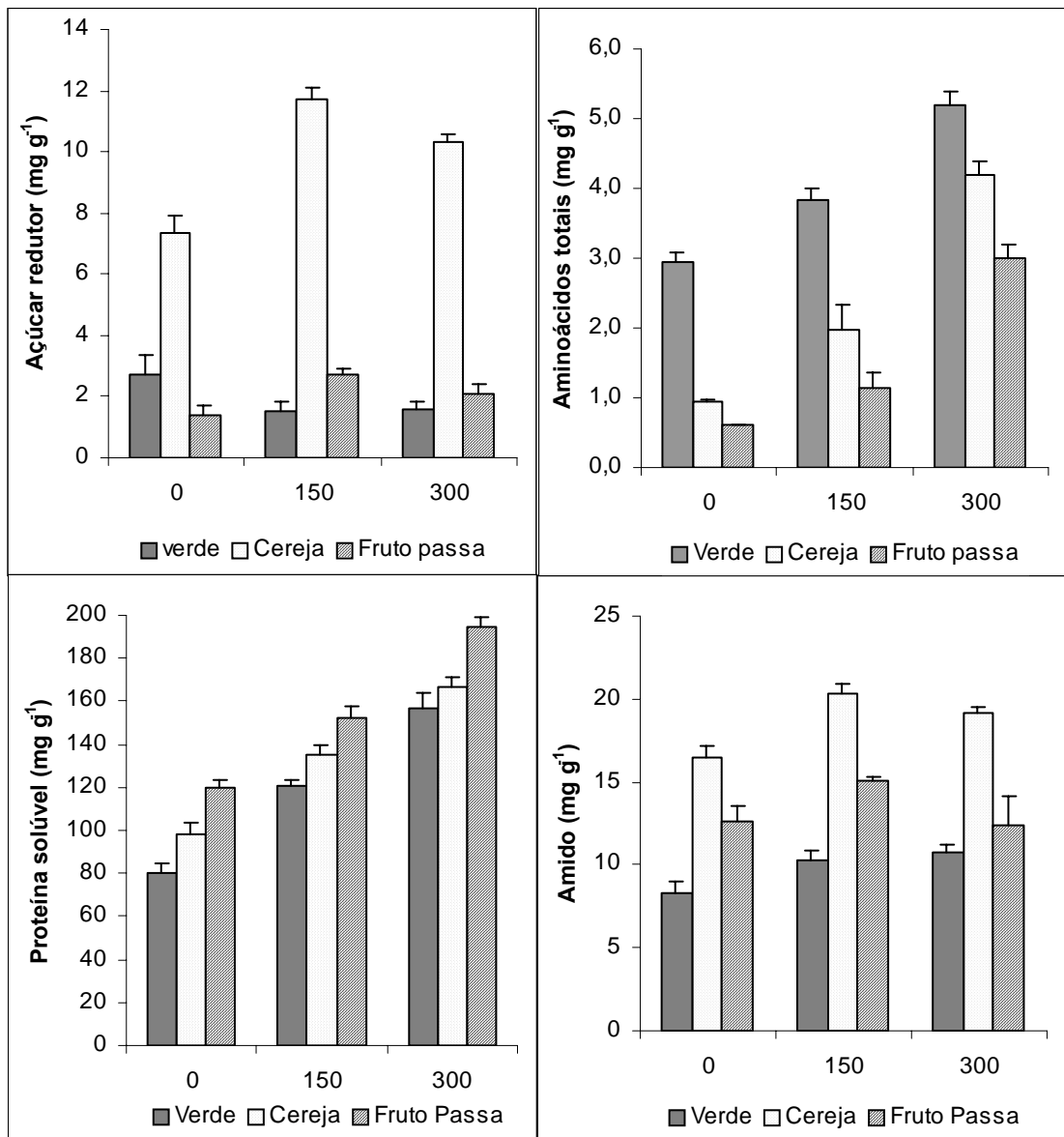


Figura 4 - Teor de amido, aminoácidos totais, açúcar redutor e proteína solúvel dos frutos de café em diferentes fases fenológicas em relação a doses de nitrogênio (testemunha, 150 kg ha<sup>-1</sup> e 300 kg ha<sup>-1</sup>)

### 3.6.4 Produtividade de cafeeiro

A Figura 5 refere-se à produtividade em sacas por hectare no ano agrícola 2006/07 quando foi realizada a pesquisa. A produtividade das plantas do tratamento 300 kg ha<sup>-1</sup> foi praticamente o triplo da produtividade das plantas de 150 kg ha<sup>-1</sup>. Os resultados corroboram estudos realizados por (COSTA, 2006; FENILLI, 2006), o que evidencia a importância do fertilizante na produtividade do cafeeiro.

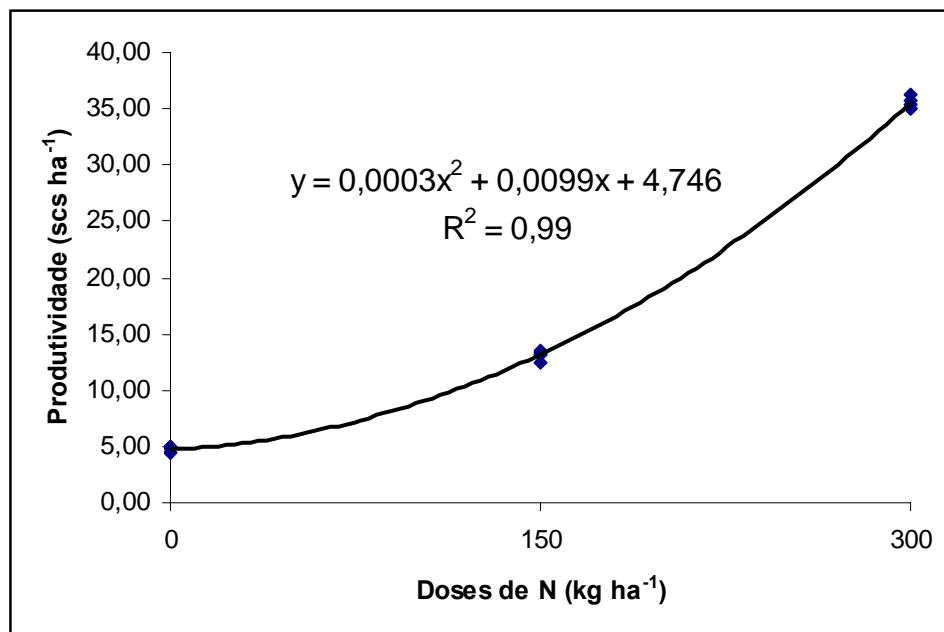


Figura 5 - Média da produtividade de cafeeiro em função de doses de N

### 3.7 Conclusões

O teor de aminoácidos totais foi maior no estágio cereja independentemente das doses de N.

O teor de amido e açúcar redutor nos grãos foram superiores no estágio cereja, independentemente da dose de N.

O teor de proteína solúvel total foi superior no estágio de fruto passa, com resposta linear e positiva a dose de N.

Em plantas com teor adequado de N o teor de Ni cresceu na seguinte ordem: fruto verde, cereja e passa.

Os teores foliares de N, K, açúcar redutor, aminoácidos totais e proteína solúvel diminuíram durante o desenvolvimento dos frutos, enquanto o teor foliar de Ni aumentou.

### Referências

ALLEN, S.E.; GRIMSHAW, H.M.; PARKINSON, J.A.; QUARMBY, C. Inorganic constituents. In: ALLEN, S.E. **Chemical analysis of ecological materials**. London: Blackwell Scientific, 1974. p. 184.

CALBO, A.G. Senescência em folhas e migração de solutos. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2., 1989, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1989. p. 123-134.

CARVALHO, C.H.S.; RENA, A.B.; PEREIRA, A.A.; CORDEIRO, A.T. Relação entre a produção, teores de N, P, K, Ca, Mg, amido e a seca de ramos do Catimor (*Coffea arabica* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 665-673, 1993.

CATANI, R.A.; MORAES, F.R.P. A composição química do cafeeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 45-52, 1958.

CATANI, R.A.; PELLEGRINO, D.; ALCARDE, J.C.; GRANER, C.A.F. Variação na concentração e na quantidade de macro e micronutrientes no fruto do cafeeiro, durante o seu desenvolvimento. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 24, p. 249-263, 1967.

CATANI, R.A.; PELEGRINO, D.; BERGAMIN FILHO, H.; GLORIA, N.A. da; GRANER, C. A.F. A absorção de N, P, K, Ca, Mg e S pelo cafeeiro aos dez anos de idade. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 22, p. 81-89, 1965.

CHAGAS, S.J.R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais**. 1994 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

COCKING, E.C.; YEMM, E.W. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Biochemical Journal**, London, v. 58, p.7-8, 1954.

COSTA, F.M.P. **Crescimento e desenvolvimento do cafeeiro sob efeito da adubação nitrogenada**. 2006. 80 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DUBOIS, M.; GIBBS, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBENS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

FENILLI, A.M.B. **Destino do nitrogênio (<sup>15</sup>N) do fertilizante em uma cultura de café**. 2006. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GALLO, J.R.; HIROCE, R.; BATAGLIA, O.C.; MORAES, F.R.P. Levantamento de cafezais do Estado de São Paulo pela análise química foliar. Solos Podzolizados de Lins e Marília, Latossolo Roxo e Podzólico Vermelho Amarelo. **Bragantia**, Campinas, v. 29, p. 237-247, 1970.

HIROCE, R. Diagnose foliar em cafeeiro. In: MALAVOLTA, E.; YAMADA, T.; GUIDOLIN, J.A. (Ed.). **Nutrição e adubação do cafeeiro**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1981. p. 117 -137.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LEITE, I.P. **Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 1991. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

KOZLOWSKI, T. T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. **Botanical Review**, New York, v. 58, n. 2, p. 107-222, 1992.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P.; MELLO, F.A.F.; BRASIL SOBRINHO, M.O.C. Nutrição mineral e adubação do cafeeiro. In: \_\_\_\_\_. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. p. 203-255.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JR, J.; MALAVOLTA, M. Micronutrientes e metais pesados: essencialidade e toxidez. In: PATERNIANI, E. **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2006. p. 117-154.

MALAVOLTA, E.; FAVARIN, J.L.; MALAVOLTA, M.; CABRAL, C.P.; HEINRICH, R.; SILVEIRA, J.S.M. Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p.1017-1022, 2002.

MALAVOLTA, E.; NOGUEIRA, N.G.L.; HEINRICH, R.; HIGASHI, E.N.; RODRIGUES, V.; GUERRA, E.; OLIVEIRA, S.C.; CABRAL, C.P. Evaluation of nutritional status of the cotton plant with respect to nitrogen. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 35, n. 7, p. 1007-1019, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1990. 674 p.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 547-554, 1999.

NAVILLIER, P. Coffee. In: SNELL, F.D.; ETTRE, L.S. (Ed.). **Encyclopedia of industrial chemical analysis**. New York: John Wiley, 1970. v. 10, p. 373-447.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375-380, 1944.

NJOROGE, S.M. Notes on the chemical basis of coffee quality. **Kenya Coffee**, Nairobi, v.2, n.1, p. 152-154, 1987.

PATEL, R.Z.A. Note on the seasonal variations in starch content of different parts of *Arabica coffee* trees. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 36, p. 1-4, 1970.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T. Toxidez de metais em plantas. II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 323-328, 1982.

PEOPLES, M.; DALLING, M. The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: NOODÉN, L.; LEOPOLD, A.C. (Ed.). **Senescence and aging in plants**. New York: Academic Press, 1988. p.237-252.

PIMENTA, C.J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

RENA, A.B.; PEREIRA, A. A.; BARTHOLO, G.F.; Teor foliar de minerais, conteúdo caulinar de amido e o depauperamento de algumas progênies de cafés resistentes à ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRA, 10., 1983, Poços de Caldas. **Anais ...** Rio de Janeiro: IBC; GERCA, 1983. p. 169-170.

RINANTONIO, V. Coffee. In: GERHARTZ, W.; YAMAMOTO, Y.S.; CAMPBELL, F. T.; PFEFFERKORN, R.; ROUNSAVILLE, J.F.; ULLMANN, F. **Ullman's encyclopedia of industrial chemistry**. New York: VCH, 1987. v. A7, p. 315-338.

SOUZA, V.H S.; MAESTRI, M.; BRAGA, J.M.; CHAVES, J.R.P. Variações no teor de alguns elementos minerais nas folhas e frutos de café. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 22, n. 123, p. 318-331, 1975.

TANGO, J.S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 28, p. 48-73, 1971.

VALARINI, V.; BATAGLIA, O. Macronutrientes em folhas e frutos de cultivares de café arabica de porte baixo. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 661-672, 2005.

WELCH, R.M. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 1, p. 49-82, 1995.

WOLFROM, M.L.; PLUNKETT, R.A.; LAVER, M.L. Carbohydrates of the coffee bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 8, n. 1, p. 58-65, 1960.