



**JACQUELINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE ZINCO EM  
MUDAS DE CAFEIRO: METABOLISMO DE  
CARBOIDRATOS E RESPOSTAS  
ANTIOXIDANTES**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**JACQUELINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE ZINCO EM MUDAS DE CAFEEIRO:  
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Santos, Jacqueline Oliveira dos.

Deficiência e excesso de zinco em mudas de cafeeiro :  
metabolismo de carboidratos e respostas antioxidantes / Jacqueline  
Oliveira dos Santos. – Lavras : UFLA, 2014.

68 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Estresse oxidativo. 2. Metabolismo de carboidratos. 3.  
Espécies reativas de oxigênio. 4. Prolina. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 583.52

**JACQUELINE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**DEFICIÊNCIA E EXCESSO DE ZINCO EM MUDAS DE CAFEEIRO:  
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dra. Vânia Aparecida Silva

EPAMIG

Dra. Milene de Oliveira Santos

UFLA

Dr. José Donizeti Alves  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2014**

Aos meus pais, pelo amor, bons conselhos,  
acolhimento nas horas tristes e incentivo em todos os  
momentos da minha vida...

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e proteção sempre presentes em minha vida.

Aos meus queridos pais, Sebastião e Alaide pelo exemplo de caráter e humildade, por me mostrarem sempre o caminho certo a seguir.

À Fapemig, pela bolsa de estudos e por proporcionar a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos tão preciosos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Donizeti Alves, pelo apoio e desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca pelas correções e sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta dissertação.

Aos integrantes do Laboratório: Meline, Helbert, Kamila, Isabel, Cinthia, Lissa, Dayane, Ian, Cleide, Jéssica, Valter, Lorena e Sandro que contribuíram na montagem e desenvolvimento do experimento. Vocês foram fundamentais!

À Meline pela paciência, pelo direcionamento e por toda a ajuda no mestrado.

Ao Jean, Mariana Arthur, Ana Cristina pelas boas dicas em fisiologia.

Aos colegas do setor de Fisiologia Vegetal pela ajuda e pela companhia.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal por fazerem a condução mais tranquila do experimento e pela ajuda sempre que se fez necessário.

Aos meus primos Thiago, Thatiana, Liria e Eliane pelo carinho e amizade.

Às amigas, Juliana Martins, Ana Paula Fernandes, Vladimira Cabanova, Lissa Vasconcelos, Bruna Marangon, Ingrid, Rafaela Balisa, Helena e Fabiana Honório pelos bons conselhos e por fazerem meus momentos mais felizes.

À querida Rep Auer pelos momentos de alegria.

Aos queridos de Telêmaco Borba, Eliane, Carlos Henrique, Carla, Victor e Luiz Carlos que foram minha segunda família.

Aos momentos de diversão com os amigos Leandro Luiz, David Cavalcante, Roni César, Ronaldo Facini e Wellington Renan.

Ao meu time lindo que me encheu de alegrias em 2013.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho!

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar as respostas fisiológicas de mudas de cafeeiro cultivar Catuaí frente à deficiência e ao excesso de zinco. Dessa maneira, mudas com seis meses de idade foram transferidas para recipientes plásticos, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon. Na imposição dos tratamentos, foram utilizadas soluções completas, com a exclusão do nutriente Zn e solução com 4x o nutriente Zn. As avaliações foram realizadas em folhas totalmente expandidas e em raízes no início do tratamento e após 30 e 60 dias. A deficiência e o excesso de zinco reduziram o crescimento, os teores carboidratos na parte aérea, já nas raízes os teores de amido e AR se mantiveram enquanto os teores de AST aumentaram. Os níveis de clorofila a e b e massa seca foliar reduziram em plantas sob excesso e deficiência de zinco. Ambos os tratamentos induziram o aumento na produção peróxido de hidrogênio e uma maior atividade da CAT, APX e maiores teores de ascorbato e prolina. No entanto, essa maior atividade do sistema antioxidante não foi suficiente para evitar que danos causados pelas EROs ocorressem, possibilitando um aumento nos teores de malondealdeído, que é um produto secundário da peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Metabolismo de carboidratos. Espécies reativas de oxigênio. Prolina.

## ABSTRACT

The present study was performed with the intent of evaluating the physiological responses of Catuaí coffee cultivar seedlings regarding zinc deficiency and excess. Thus, seedlings with six months of age were transferred to plastic recipients containing Hoagland and Arnon nutritive solution. In the treatments we used complete solutions, with the exclusion of zinc, and a solution with 4x the amount of Zn. Evaluations were performed on completely expanded leaves and on roots at the beginning of the treatment and after 30 and 60 days. Zinc deficiency and excess reduced growth, carbohydrate levels in the shoots and, in the roots, starch and AR levels were maintained while the AST levels increased. The levels of chlorophyll a and b, as well as leaf dry mass decreased in plants under zinc excess and deficiency. Both treatments induced an increase in the production of hydrogen peroxide, a higher CAT and APX activity, and higher levels of ascorbate and proline. However, this higher activity of the antioxidant system was not sufficient to prevent damages caused by ROS, enabling an increase in the levels of malondealdeido, which is a byproduct of lipid peroxidation.

Keywords: Oxidative stress. Carbohydrate metabolism. Oxygen-reactive species. Proline

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Teores de Zn em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias.....	28
Gráfico 2	Altura das plantas (A) e comprimento da raiz (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	29
Gráfico 3	Número de folhas (A) e área foliar (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias.....	30
Gráfico 4	Massa seca de parte aérea (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	31
Gráfico 5	Teores de clorofila “a” (A) e clorofila “b” (B) em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias. Efeitos da deficiência e excesso de Zn no teor de clorofila “a” de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí.....	32
Gráfico 6	Teores de carotenoides em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias. Efeitos da deficiência e excesso de Zn no teor de clorofila “a” de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí .....	33
Gráfico 7	Teores de açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias.....	34

Gráfico 8	Teores de açúcares redutores (AR) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	35
Gráfico 9	Teores de amido em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	36
Gráfico 10	Teores de prolina em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	37
Gráfico 11	Teores de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias.....	38
Gráfico 12	Teores de ascorbato em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	39
Gráfico 13	Atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT e APX em folhas (A, C, E) e raízes (B, D, F), respectivamente, de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias .....	41
Gráfico 14	Teores de Malondealdeído em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias.....	42

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Condução do experimento.....	21
3.1.1	Teores de zinco.....	22
3.1.2	Crescimento vegetativo.....	23
3.1.3	Clorofilas e carotenoides.....	23
3.1.4	Carboidratos.....	23
3.1.5	Peróxido de hidrogênio.....	24
3.1.6	Ascorbato.....	24
3.1.7	Peroxidação lipídica.....	25
3.1.8	Enzimas antioxidantes.....	25
3.1.8.1	Peroxidase do ascorbato (APX).....	26
3.1.8.2	Catalase (CAT).....	26
3.1.8.3	Dismutase do superóxido (SOD).....	26
3.1.9	Determinação do teor de prolina.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	Teores de zinco.....	28
4.2	Crescimento Vegetativo.....	29
4.3	Clorofila e Carotenoides.....	31
4.4	Carboidratos.....	33
4.5	Prolina.....	36
4.6	Metabolismo antioxidante.....	37
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A abrangência de grandes áreas, para o cultivo do café, remete a adversidades edafoclimáticas relacionadas a diferentes fatores, dentre eles as deficiências e desequilíbrios nutricionais. Nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes minerais é de grande importância para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (WELCH; WEBB; LONERAGAN, 1982). Os principais micronutrientes requeridos pelo cafeeiro são boro (B), cobre (Cu), Ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) que, embora em pequenas quantidades, são de grande importância para o crescimento, desenvolvimento e produção. Dentre eles, o cobre e o zinco são elementos essenciais para o crescimento normal da planta e para o metabolismo (MIGUEL et al., 2002), desempenhando importantes funções em vários processos fisiológicos tais como componente estrutural e catalítico de proteínas e enzimas, processo fotossintético entre outros (SHARMA; AGRAWAL, 2005).

Os solos brasileiros apresentam baixa fertilidade natural, o que explica a necessidade do uso de maior quantidade de insumos agrícolas para aumento da produtividade. Entretanto, os fertilizantes minerais, utilizados na agricultura para fornecimento de nutrientes para plantas, podem ser fontes de contaminação com elementos-traço, caso ultrapassem as concentrações toleráveis, causando impactos negativos ao ecossistema e, inclusive, ameaçando a saúde humana (RODRIGUES; NALINI JÚNIOR, 2009). A deficiência ou a absorção excessiva de micronutrientes afeta vários processos fisiológicos, induzindo efeitos negativos na planta, podendo prejudicar seu desenvolvimento (BROADLEY et al., 2007). A maioria das lavouras cafeeiras de Minas Gerais apresenta deficiência por Zn, comprometendo a produção de grãos (CORRÊA et al., 2000).

A deficiência de zinco é considerada um dos elementos mais limitantes à produção de café no Brasil, principalmente, em solos de cerrado, lixiviados ou sujeitos à erosão (MALAVOLTA, 1980). Zinco (Zn) é um micronutriente essencial para todos os organismos e liga-se a milhares de proteínas, sejam elas estruturais ou enzimas e a fatores de transcrição para chaperonas em bactérias, seres humanos e plantas (ANDREINI et al., 2006; BROADLEY et al., 2007). Os principais sintomas de deficiência são raquitismo das plantas, clorose internerval das folhas mais novas, internódios curtos e menor crescimento radicular em virtude da incapacidade de absorver zinco suficiente para o seu desenvolvimento (YOSHIDA; TANAKA, 1969).

Assim como a deficiência, o excesso de zinco em áreas agrícolas, também, induz efeitos negativos. O uso de fontes antrópicas, como os biossólidos, fertilizantes fosfatados de origem de rochas sedimentares e resíduos industriais apresentam teores elevados de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni e Zn (MATTIGOD; PAGE, 1983; GRANT; SHEPPARD, 2008). Essa prática é crescente no programa de fertilização, complementando a adubação, com a finalidade de reduzir o uso de fertilizantes químicos e, conseqüentemente, o custo da nutrição das culturas (TEZOTTO et al., 2011).

Em concentrações supra ótimas, o zinco torna-se tóxico, com efeitos negativos no transporte de íons e processos metabólicos, tais como fotossíntese, transpiração e atividades enzimáticas podendo inibir o crescimento (CAKMAK, 2000; VAILLANT et al., 2005). Altos níveis de Zn podem, também, contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem afetar, diretamente, o crescimento das plantas e a atividade fotossintética (CUYPERS; VANGRONSVELD; CLIJSTERS, 2001).

Estudos da fisiologia de déficit e excesso de micronutrientes na cultura do café têm se tornado uma constante, embora pesquisas que demonstrem os efeitos negativos desse estresse na fisiologia do café, ainda, sejam insuficientes.

Assim sendo, há necessidade de estudos para avaliar as respostas bioquímicas e fisiológicas em mudas de café frente à deficiência e excesso de zinco em solução nutritiva. Para tanto, objetivou-se neste trabalho avaliar as respostas fisiológicas de mudas de cafeeiro cultivar Catuaí frente à deficiência e ao excesso de zinco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Como metal de transição de número atômico 30, o zinco é o 23º elemento mais abundante na Terra. O zinco tem cinco isótopos estáveis  $^{64}\text{Zn}$  (48,63 %),  $^{66}\text{Zn}$  (27,90 %),  $^{67}\text{Zn}$  (4,90 %),  $^{68}\text{Zn}$  (18,75%) e  $^{70}\text{Zn}$  (0,62 %), que, combinados, formam a fração de zinco em parte aérea e raízes de plantas (WEISS et al., 2004). Em solução, o Zn existe no estado de oxidação +2 assim como  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  e é estável sob condições fisiológicas, em razão da camada de valência ser completa no subnível d (BARAK; HELMKE, 1993; AULD, 2001). Além disso, o  $\text{Zn}^{2+}$  apresenta um pequeno raio atômico, o que permite a formação de ligações covalentes fortes com S, N e O. O zinco é encontrado em inúmeros compostos tais como sais solúveis, incluindo sulfatos, nitratos, acetatos, tiocianatos, percloratos, cianetos, zincatos de metais alcalinos e em compostos fracamente solúveis, incluindo fosfato de zinco - amônio, hidróxido e carbonato de zinco; além de uma série de complexos orgânicos solúveis e insolúveis (LINDSAY, 1979; BARAK; HELMKE, 1993). O Zinco é um micronutriente essencial para o crescimento normal e desenvolvimento de todos os organismos vivos, incluindo seres humanos e plantas (BROADLEY et al., 2007). O Zn atua como um cofator para a atividade de mais de 200 enzimas e é necessário para muitos processos biológicos (COLEMAN, 1998; HUDDLE; GIBSON; CULLINAN, 1998; MEUNIER et al., 2005). Sua essencialidade como um micronutriente para plantas superiores foi estabelecida pela primeira vez por Sommer Lipman (1926).

Geralmente o zinco é absorvido como cátion livre bivalente ( $\text{Zn}^{2+}$ ), mas a um pH elevado pode ser absorvido como cátion monovalente ( $\text{ZnOH}^+$ ) (MARSCHNER, 1995). A absorção de zinco por meio da membrana plasmática da raiz é mediada pelo transporte ativo secundário. Os transportadores de metal da família ZIP (permeases de zinco, ferro) são o sistema de captação primário

em plantas onde as proteínas do canal, também, podem estar presentes (PALMGREN; CLEMENS; WILLIAMS, 2008; LEE et al., 2010). O zinco está envolvido em vários processos fisiológicos como crescimento, ativação enzimática, síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, lipídios, auxinas, ácidos nucleicos, expressão e regulação gênica e desenvolvimento reprodutivo (formação de pólen) (MARSCHNER, 1995; ÇAKMAK, 2000; MENGEL; KIRBY, 2001; CHANG; LIN; HUANG, 2005). Envolvido na manutenção da estrutura e integridade funcional das membranas biológicas (BROWN; ÇAKMAK; ZHANG, 1993; MARSCHNER, 1995; SADEGHZADEH; RENGEL, 2011), principalmente em decorrência de sua ligação sulfídrica com vários outros compostos (RENGEL; WHEAL, 1997; WILLSON, 1988). Também é indispensável para a atividade de várias enzimas vegetais, sendo parte estrutural da anidrase carbônica, Cu/Zn dismutase do superóxido e da RNA polimerase, além de atuar como cofator para todas as seis classes de enzimas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) (BROADLEY et al., 2007).

O Zn está estreitamente envolvido no metabolismo de nitrogênio nas plantas e, conseqüentemente, na síntese proteica (TSUI, 1948; MENGEL; KIRBY, 1987). Römheld (2001) observou que os teores de proteínas, formadas em folhas de cafeeiros com deficiência em Zn, foram menores que em folhas normais. Como consequência, há acúmulo de aminoácidos, já que nestas condições, a síntese de proteína e o nível proteico são acentuadamente reduzidos (KITAGISHI; OBATA; KONDO, 1987; MENGEL; KIRBY, 1987; ÇAKMAK; MARSCHNER; BANGHERTH, 1989).

Estudos demonstram que o cafeeiro apresenta pouca eficiência na absorção e translocação do zinco, o que caracteriza diferentes respostas entre cultivares. Em cultivar Catuaí, Santos et al. (2005) verificaram que a cultivar foi menos exigente em zinco, quando comparadas com as cultivares Icatu e Mundo

Novo. Zabini et al. (2007), avaliando 14 progênies de café, em solução nutritiva com ausência e presença de zinco, constatou que as progênies Tupi IAC 43765 e UFV 40665 foram menos exigentes em zinco.

Cakmak et al. (1998) sugeriram que a deficiência de Zn em plantas pode ocorrer em regiões áridas e semi-áridas, em solos calcários com pH em torno de 7,0 a 8,6 e, principalmente, em solos com pouca capacidade de água, em que o transporte de Zn, considerando a solução do solo, é comprometido (EKIZ et al., 1998). O Zn é um elemento pouco móvel na planta e sua deficiência pode ser visualmente constatada pelo encurtamento dos internódios, clorose em folhas novas, deformação nas folhas (a chamada “folha pequena”) sendo este um sintoma típico. Por ser um micronutriente imóvel, os sintomas aparecem primeiro nas folhas mais novas (RÖMHELD, 2001). A deficiência em zinco deprime a capacidade fotossintética da folha, havendo uma redução na concentração de clorofilas a e b, resultante de danos na eficiência quântica do fotossistema II (PSII) (CHEN et al., 2008). Em condições críticas de Zn, há diminuição da concentração de CO<sub>2</sub> intercelular, da condutância estomática (SHARMA; KUMAR; BISHT, 1994) e da atividade da rubisco (MARSCHNER 1995; SASAKI et al., 1998).

O efeito da deficiência de zinco no cafeeiro é caracterizado pelo surgimento de folhas novas pequenas e coriáceas. Os ramos mostram-se com um número de folhas reduzido e internódios curtos, conferindo um aspecto de roseta na ponta dos galhos e a produtividade pode ser afetada seriamente (MALAVOLTA, 1986). Segundo Corrêa et al. (2000), cerca de 54,7% das lavouras cafeeiras da região Sul do Estado de Minas Gerais apresentaram teores foliares de zinco abaixo da faixa crítica definida por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

A toxicidade por Zn depende da espécie e do estágio de crescimento da planta e, em geral, os seus sintomas estão relacionados com a inibição do

crescimento e redução da biomassa (CAMBROLLE et al., 2011). O excesso de Zn inibe a germinação de sementes, o desenvolvimento radicular (LINGUA et al., 2008) e promove a clorose foliar (EBBS; KOCHIAN, 1997). Em nível celular, as quantidades supra ótimas podem alterar, significativamente, a atividade mitótica (ROUT; DAS, 2003), afetando a integridade e permeabilidade da membrana (STOYANOVA; DONCHEVA, 2002), e até mesmo levando à morte celular (CHANG; LIN; HUANG, 2005).

Pela inibição competitiva, o zinco afeta a absorção e translocação de magnésio e ferro entre os cátions, pela similaridade entre o raio iônico do  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  e do  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (MARSCHNER, 1995). O excesso deste elemento, também, provoca inibição da fotossíntese pela redução da atividade da RuBP carboxilase/oxigenase (Rubisco), causada, presumivelmente, pela competição do zinco com o magnésio no sítio de ativação da Rubisco e pela diminuição da atividade do fotossistema II (PS II) em função do deslocamento de manganês pelo excesso de Zn na membrana do tilacoide (MISRA; RAMANI, 1991; MARSCHNER, 1995; FAGERIA, 2001; KAYA; HIGGS, 2001).

Em cafeeiro na dose de  $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , Pedrosa et al. (2012) encontraram uma redução de 26% na matéria seca total das plantas indicando a possibilidade de toxidez nessas condições de zinco. Alta disponibilidade de Zn pode causar efeitos de toxidez em plantas não tolerantes e os sintomas são diminuição do sistema radicular e do tamanho das folhas e, conseqüentemente, diminuição na produção de massa seca na planta (ADRIANO; PAULSEN; MURPHY, 1971).

O zinco exerce um efeito sobre o metabolismo de carboidratos em consequência das transformações induzidas na fotossíntese e na transformação dos açúcares (ALLOWAY, 2008). Alterações nos níveis de carboidratos podem estar associadas com a regulação osmótica das células-guarda, que controlam os movimentos dos estômatos e regulam o fluxo de água (TALBOTT; ZEIGER, 1993). Além disso, a acumulação e privação de carboidratos têm sido

diretamente correlacionadas com mudanças nos processos fotossintéticos (MOYA; ROS; PICAZO, 1993). As células vegetais, geralmente, respondem a concentrações elevadas de metais pesados por mudanças nos níveis de hidratos de carbono (SAMARAKOON; RAUSER 1979; MOYA; ROS; PICAZO, 1993; COSTA; SPITZ, 1997; JHA; DUBEY, 2004). O Zn pode induzir uma diminuição de açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose) em partes aéreas, este efeito pode ser em virtude de uma redução da fotossíntese que é, frequentemente, relatada à presença de metais pesados (KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2002).

Estudos demonstram que a deficiência e excesso de zinco causam efeitos citotóxicos e induzem os processos oxidativos pela geração de EROs (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) e peroxidação lipídica (PRASAD; PARADHA; SHARMILA, 1999; RAO; SRESTRY, 2000; REMANS et al., 2012). Independentemente da via de produção, os níveis de EROs no interior das células das plantas devem ser controlados pelos sistemas de defesa antioxidante para evitar um dano em cadeia (MITTLER et al., 2004; FOYER; NOCTOR, 2005).

A acumulação de EROs é em razão da ruptura do equilíbrio entre a produção e a atividade do sistema antioxidante, composto de antioxidantes enzimáticos como a catalase (CAT), peroxidases (POD) e dismutase do superóxido (SOD) e não enzimáticos, como por exemplo, glutatona, carotenoides, ascorbato e aminoácidos como a prolina (TUKENDORF; RAUSER, 1990, VANGRONSVELD; CLIJSTERS, 1994; SCHUTZENDUBEL; POLLE, 2002).

A geração de EROS, também, pode induzir mecanismos de defesa antioxidante em resposta a condições de estresse. A enzima antioxidante dismutase do superóxido (SOD) é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  (FRIDOVICH, 1986). A catalase (CAT), a

peroxidase da glutatona (GPX) e a peroxidase do ascorbato (APX) consistem em sistemas principais de eliminação de  $H_2O_2$  nas células (MITTLER, 2004; GILL; TUTEJA, 2010). Estas enzimas funcionalmente interrelacionadas podem fornecer proteção, eliminando as EROS para minimizar o dano oxidativo em resposta ao estresse.

Em circunstâncias normais, as concentrações das espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo vegetal e tanto quanto sua produção e remoção são bem equilibradas. No entanto, a condição de estresse pode desencadear o estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010) aumentando, assim, a atividade do metabolismo antioxidante.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Condução do experimento

Mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí) foram cultivadas em sacos de polipropileno de 500 mL, com dimensões de 5 cm de diâmetro e 12 cm de altura. O substrato utilizado foi o padrão para mudas de cafeeiro, constituído de terra de subsolo peneirada e esterco de curral curtido e peneirado nas proporções 2:1, acrescido cloreto de potássio e superfosfato simples nas proporções 1:10 (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2002). Mudas selecionadas, quanto à uniformidade de tamanho e de vigor, foram transferidas para recipientes plásticos com capacidade de doze litros, contendo solução nutritiva de Hoaglang e Arnon (1950). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com as condições controladas. Antes da imposição dos tratamentos, as mudas passaram por um período de aclimatação com duração de 21 dias, nos quais foram utilizadas soluções com concentrações crescentes, começando com  $\frac{1}{4}$  da força, durante sete dias,  $\frac{1}{2}$  força por sete dias e força completa por 7 dias. Plantas aclimatadas foram submetidas a três tratamentos, constituídos por soluções controle, deficiente e com excesso de zinco. Para o tratamento controle, foram utilizadas as concentrações originais da solução nutritiva ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn), enquanto que no tratamento de deficiência foi utilizada a mesma solução do controle, porém com a exclusão do nutriente zinco ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn). No tratamento de excesso de zinco foi utilizada a solução controle acrescida de quatro vezes a dose recomendada do nutriente zinco ( $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). O volume da solução nutritiva, nos recipientes plásticos, foi mantido pela reposição diária com água deionizada. O pH da solução foi ajustado, diariamente, para  $5,5 \pm 0,5$  com solução de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). As soluções foram trocadas semanalmente e mantidas sob aeração constante durante todo o período experimental.

As avaliações foram realizadas em folhas totalmente expandidas e em raízes no início do tratamento e após 30 e 60 dias de imposição dos tratamentos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo 3x3, sendo três tratamentos (controle, deficiência e excesso de zinco), três tempos (0, 30, e 60 dias) e três repetições. Cada parcela experimental foi constituída por cinco plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 0,05 de probabilidade.

### **3.1.1 Teores de zinco**

Os teores foliares e radiculares de zinco foram determinados, conforme Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), em que 500 mg de material seco e moído foram levados para tubo de digestão e foram adicionados 6 mL de uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> na proporção de 2:1 (v/v). Em seguida, as amostras foram levadas para bloco digestor aumentando, gradativamente, a temperatura até atingir 160°C e ficaram nessa temperatura até o volume ser reduzido à metade (cerca de 40 minutos). A temperatura foi aumentada para 210° C e mantida nesta temperatura até que se obtiveram fumos brancos de HClO<sub>4</sub> e o extrato apresentou-se incolor (cerca de 20 minutos). Após esfriar, o extrato foi transferido para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão volumétrico foi, então, completado com água deionizada. A determinação do teor de zinco foi feita por espectrometria de absorção atômica.

### **3.1.2 Crescimento vegetativo**

As medidas de altura das plantas e do comprimento das raízes foram obtidas tomando-se o comprimento entre o coleto e o ápice foliar e entre o coleto e o ápice da raiz primária, respectivamente. A área foliar total foi estipulada pela fórmula  $AF = [(comprimento \times largura) \times 0,667] \times \text{número total de folhas por planta}$  (BARROS et al., 1973; GOMIDE et al., 1977) e o número total de folha foi obtido por contagem direta. A massa seca de raiz e parte aérea (caule e folhas) foram obtidas de amostras secas em estufa de ventilação forçada a 70° C até peso constante.

### **3.1.3 Clorofilas e carotenoides**

Para a determinação dos teores de clorofila, foram macerados 0,1 g de tecido foliar do primeiro par de folhas completamente expandido de cada tratamento em acetona 80%. O volume final foi completado para 10 mL, sendo realizadas as leituras espectrofotométricas a 646,8 e 663,2 nm e, para os teores de carotenoides, foram realizadas leituras a 470 nm, conforme metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001).

### **3.1.4 Carboidratos**

Os carboidratos foram extraídos da massa seca de folhas e raízes pela homogeneização de 200 mg de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40° C. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes, combinados (ZANANDREA et al., 2010).

Para extração do amido, o pellet foi, novamente, ressuspensionado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida foram adicionadas 16 unidades da enzima amiloglucosidase, incubando-se em banho-maria a 40° C por duas horas. Após a centrifugação a 5.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL. Para a quantificação do amido, sacarose e açúcares solúveis totais foi utilizado o método da Antrona (DISCHE, 1962) e para os açúcares redutores o protocolo descrito por Miller (1959), por meio do método DNS.

### **3.1.5 Peróxido de hidrogênio**

Matéria fresca de folhas e raízes (200 mg) foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado, medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

### **3.1.6 Ascorbato**

A concentração de ascorbato foi determinada, conforme descrito por Arakawa et al. (1981). 50 mg de tecido de material fresco de folhas foram macerados em TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 g, por 15 minutos, a 4° C. Aliquotas (40 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl<sub>3</sub> 0,03% em etanol (m/v), a mistura foi homogeneizada vigorosamente e incubada a 30° C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm.

### 3.1.7 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de folhas foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Aliquotas (250  $\mu$ L) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação [0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA], incubando-se, em seguida, a 95° C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação:  $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$ , em que:  $\xi$  (coeficiente de extinção =  $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ ); b (comprimento ótico = 1).

### 3.1.8 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas e raízes, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15  $\mu$ L de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 6  $\mu$ L de DTT 0,5 M, 12  $\mu$ L de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

### **3.1.8.1 Peroxidase do ascorbato (APX)**

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 950  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação, composto por 500  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 50  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM e 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.1.8.2 Catalase (CAT)**

A CAT foi avaliada, segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 950  $\mu\text{L}$  do meio de incubação, contendo 500  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28° C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de  $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.1.8.3 Dismutase do superóxido (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1  $\mu\text{M}$ , NBT 75  $\mu\text{M}$  e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ . Os tubos com o meio de reação e 10  $\mu\text{L}$  de amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo

da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A560 \text{ amostra com extrato enzimático} - A560 \text{ controle sem enzima}) / (A560 \text{ controle sem enzima})$ . Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

### **3.1.9 Determinação do teor de prolina**

Foi utilizado o método descrito por Torello e Rice (1986) com pequenas modificações. Amostras de 500 mg de matéria fresca de folhas foram primeiramente homogeneizadas manualmente em gral de porcelana, com 10 ml de ácido sulfosalicílico a 3% e, em seguida, submetidas à centrifugação a 6250 x g durante 20 minutos. Em tubo de ensaio, contendo 2 ml de sobrenadante, foram adicionados 2 ml de ninhidrina ácida (BATES; WALDREN; TEARE, 1973) e 2 ml de ácido acético glacial. Em seguida as amostras foram mantidas 1 hora em banho-maria fervente. Após resfriamento por imersão em banho de gelo, a intensidade da cor foi medida a 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com curva padrão de prolina e os resultados expressos em micromol de prolina/g de matéria fresca.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teores de zinco

Os teores de zinco se mantiveram constantes em folhas (Gráfico 1A) e raízes (Gráfico 1B) de plantas controle em todas as avaliações. Em plantas deficientes, os teores de zinco nas folhas reduziram aos 30 dias de tratamento e se mantiveram até os 60 dias, enquanto que nas raízes esses teores decresceram até os 60 dias. Ao final do experimento, os teores de zinco foram de 9,04 e 10,74 mg Kg<sup>-1</sup> em folha e raiz, respectivamente. Plantas cultivadas sob condições de excesso de Zn (8 μmol L<sup>-1</sup>) apresentaram um aumento crescente desse nutriente ao longo do período experimental, com valores finais de 35,27 mg Kg<sup>-1</sup> nas folhas e 85,4 mg Kg<sup>-1</sup> nas raízes. Aos 30 e aos 60 dias de tratamento, plantas deficientes apresentaram menores teores de zinco em folhas e raízes do que plantas controle, enquanto no tratamento de excesso de zinco as plantas apresentaram maiores teores desse nutriente em relação às plantas controle.

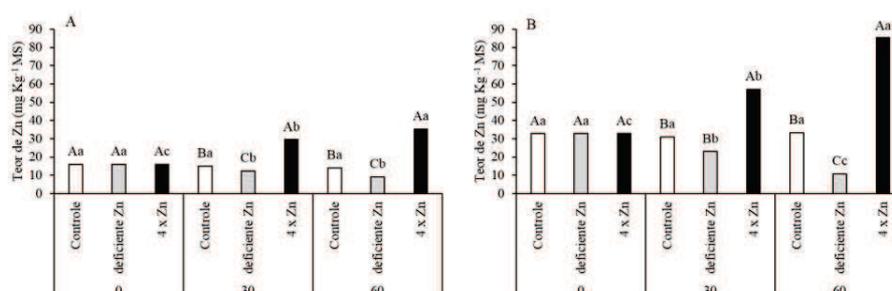


Gráfico 1 Teores de Zn em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam os tratamentos (controle, deficiente e excesso) em cada tempo de coleta; letras minúsculas o efeito do tempo dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

## 4.2 Crescimento Vegetativo

Em relação à altura das plantas, até os 30 dias, não houve diferença entre os tratamentos. Ao final do experimento, o menor valor para altura das mudas foi encontrado no tratamento de indução da deficiência, com redução de 19% em relação ao controle (Gráfico 2A). Plantas controle apresentaram um crescimento em altura até os 60 dias, enquanto que plantas sob excesso e deficientes em zinco apresentaram crescimento significativo até os 30 dias, mantendo-se constante até o final do experimento. No que se refere ao comprimento de raízes, os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento, com aumento progressivo ao longo do período experimental, não se diferenciando em cada tempo de coleta (Gráfico 2B).

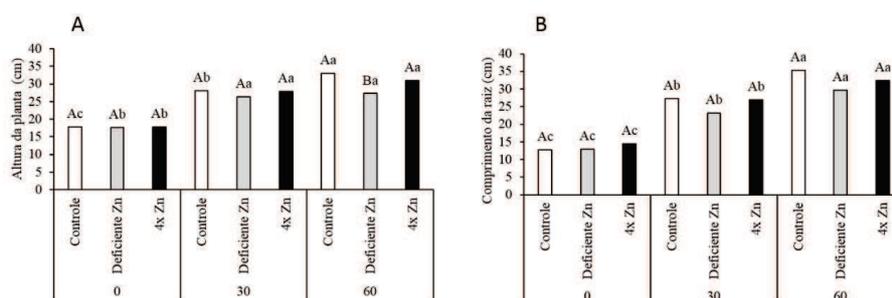


Gráfico 2 Altura das plantas (A) e comprimento da raiz (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam os tratamentos (controle, deficiente e excesso) em cada tempo de coleta; letras minúsculas o efeito do tempo dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Em todos os tratamentos, o número total de folhas aumentou com o tempo. Não ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos nos tempos 0 e 30 dias, porém ao final do experimento, aos 60 dias, os valores médios de

número de folhas de plantas controle foram substancialmente maiores que os demais tratamentos (Gráfico 3A). Os resultados para área foliar demonstraram um aumento progressivo em todos os tratamentos no tempo (Gráfico 3B).

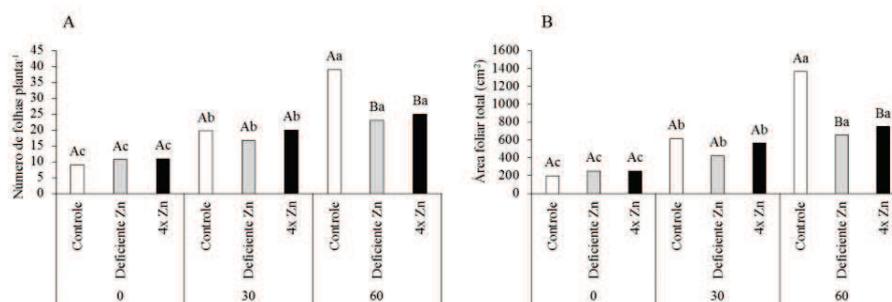


Gráfico 3 Número de folhas (A) e área foliar (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam os tratamentos (controle, deficiente e excesso) em cada tempo de coleta; letras minúsculas o efeito do tempo dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

A produção de matéria seca da parte aérea (Gráfico 4 A) e raiz (Gráfico 4B) aumentou, durante os tempos em todos os tratamentos, porém o efeito significativo foi encontrado aos 60 dias, com maiores valores para o controle, não diferindo entre excesso e deficiência de zinco em folhas. Nas raízes, entretanto, aos 60 dias, plantas com excesso de zinco apresentaram maiores valores que as deficientes.

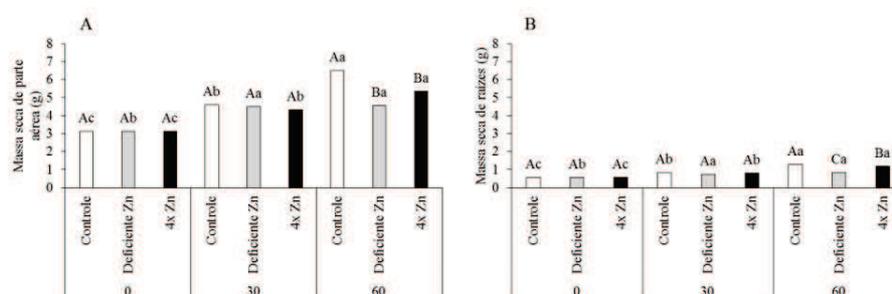


Gráfico 4 Massa seca de parte aérea (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuai controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam os tratamentos (controle, deficiente e excesso) em cada tempo de coleta; letras minúsculas o efeito do tempo dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

### 4.3 Clorofila e Carotenoides

Os teores de clorofila “a” e clorofila “b” apresentaram alterações em resposta à deficiência e ao excesso de Zn. A clorofila “a” diminuiu 38% e 20% em plantas deficientes, quando comparadas ao controle, nos 30 e 60 dias, respectivamente (Gráfico 5A). No entanto, em condições supra ótimas a clorofila “a” foi menos sensível, diminuindo 12 % e 20% em comparação com o tratamento controle nos dois tempos. O teor de clorofila “b”, aos 30 dias de tratamento, diminuiu cerca de 47% e 17% nas plantas com deficiência e excesso de Zn, respectivamente, em relação ao controle. Após 60 dias de experimento, houve uma redução de 41% em plantas deficientes e de 22,73% nas com excesso, quando comparadas às plantas controle (Gráfico 5B).

Em relação às clorofilas “a” e “b”, observou-se um aumento em suas concentrações nas plantas controle e sob excesso de zinco até os 30 dias, seguido de uma diminuição do teor ao final do experimento. Já nas plantas deficientes, o teor diminuiu aos 30 dias e se manteve constante até a última avaliação. Os

níveis de clorofila “a” e “b” se distinguiram entre excesso e deficiência na segunda avaliação, no entanto, aos 60 dias houve diferença apenas para clorofila “b”.

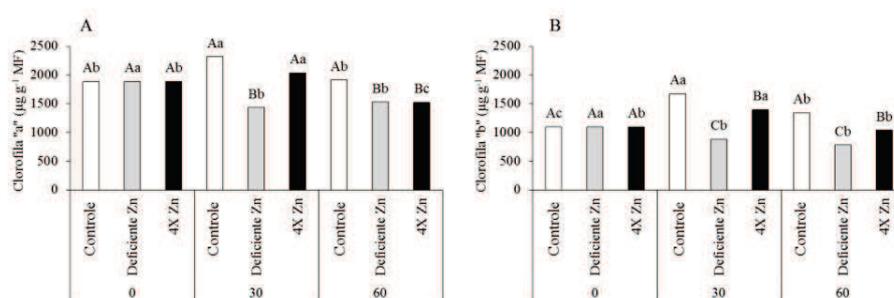


Gráfico 5 Teores de clorofila “a” (A) e clorofila “b” (B) em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias. Efeitos da deficiência e excesso de Zn no teor de clorofila “a” de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Os teores de carotenoides se mantiveram constantes até 30 dias, a partir de quando apresentaram um incremento substancial para as plantas sob deficiência e excesso de zinco (Gráfico 6). Aos 30 dias observou-se um decréscimo de 27% e 22% para deficiência e excesso, respectivamente, em relação ao controle. Ao final do período de avaliação, ocorreu um aumento dos conteúdos de carotenoides de 35% em plantas deficientes e 71% em plantas sob excesso, quando comparadas ao controle.

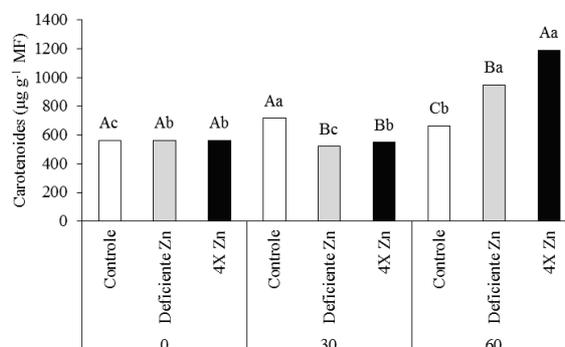


Gráfico 6 Teores de carotenoides em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias. Efeitos da deficiência e excesso de Zn no teor de clorofila “a” de mudas de cafeeiro cultivares Catuaí

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 4.4 Carboidratos

Após a exposição das mudas de cafeeiro aos tratamentos de excesso e deficiência de zinco, houve um decréscimo nos teores de açúcares solúveis totais em folhas e um aumento em raízes (Gráfico 7A e B). Aos 30 dias, plantas submetidas à deficiência de zinco apresentaram nas folhas uma diminuição no teor de AST de 22% quando comparadas com o controle. Não houve diferença entre plantas sob excesso e as controle (Gráfico 7A). Após 60 dias, os teores de AST foram diferentes entre todos os tratamentos, com uma diminuição de 14% em plantas deficientes e 24% em plantas sob excesso de zinco em relação ao controle. Ao longo dos tempos avaliados, ocorreu uma diminuição no teor de AST em folhas de plantas sob deficiência já aos 30 dias. Entretanto, para o excesso de zinco esta redução ocorreu aos 60 dias de estresse.

Nas raízes, a partir dos 30 dias, foram observados maiores teores de AST em plantas deficientes ou com excesso de zinco (Gráfico 7b). Enquanto

que no tratamento controle, o teor de AST se manteve constante ao longo do período experimental, plantas submetidas ao estresse por excesso ou deficiência de zinco, apresentaram um acúmulo destes açúcares aos 30 dias, que se manteve até o final do experimento.

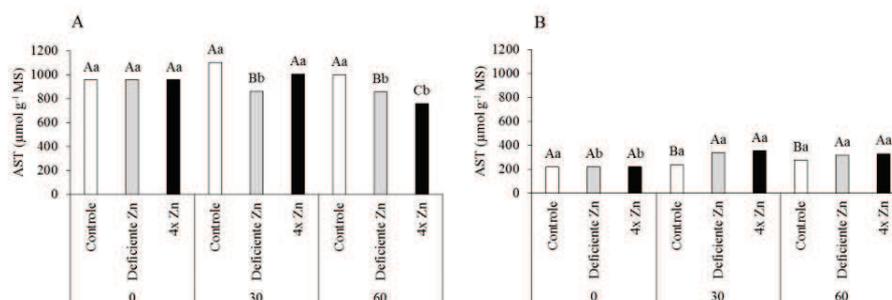


Gráfico 7 Teores de açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Os teores de açúcares redutores (AR) nas folhas, ao contrário do observado para açúcares totais, foram maiores em plantas deficientes em zinco aos 30 e 60 dias, enquanto que plantas submetidas ao excesso de zinco não diferiram do controle (Gráfico 8A). Em todos os tratamentos houve um aumento nos teores de AR aos 30 dias, mantendo-se constantes até o final do experimento. Nas raízes (Gráfico 8B), a partir de 30 dias, maiores teores de AR foram encontrados em plantas deficientes em zinco. Apenas estas plantas apresentaram um aumento no teor de AR aos 30 dias, mantendo-se até os 60 dias de estresse, enquanto nas plantas controle e sob excesso de zinco esses teores foram constantes.

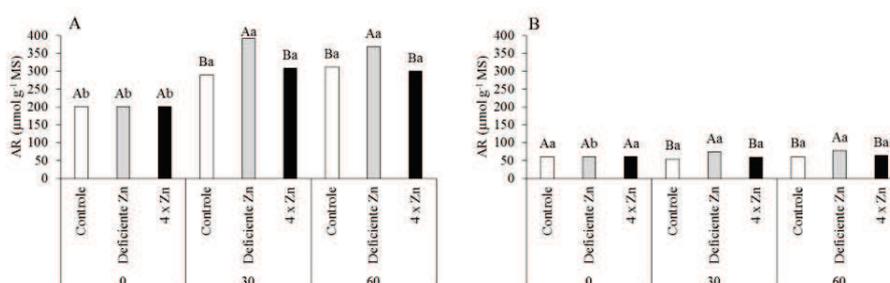


Gráfico 8 Teores de açúcares redutores (AR) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Quanto ao amido, ocorreu mesma tendência observada para AST, em que não houve acúmulo na parte aérea, quando as mudas foram cultivadas na ausência e excesso de zinco (Gráfico 9A). Plantas submetidas ao excesso de zinco não difeririam estaticamente do controle em todos os tempos. A partir dos 30 dias de experimento, ocorreu uma diminuição do teor de amido de 21% nas plantas com ausência de zinco quando comparadas às plantas controle e, ao final do experimento, a diminuição do teor de amido foi de 32%. As raízes não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas à testemunha (Figura 13b).

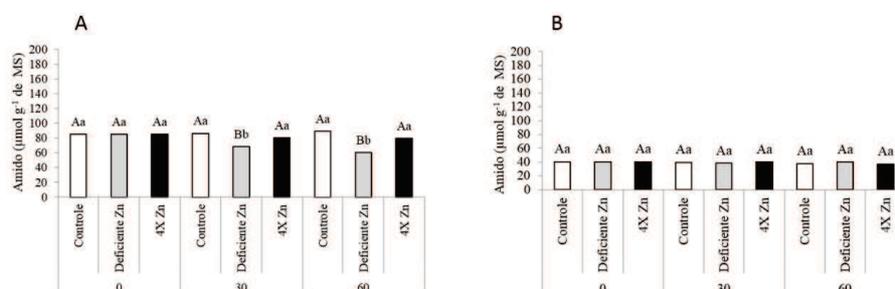


Gráfico 9 Teores de amido em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuai controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 4.5 Prolina

Os menores teores de prolina em folhas de cafeeiro foram encontrados em plantas sob deficiência de zinco, enquanto que os maiores teores foram apresentados por plantas sob excesso deste nutriente (Gráfico 10). Ao final do período experimental, os níveis de prolina foram 31% menores em plantas deficientes e 76% maiores em plantas sob excesso de zinco, quando comparadas com as plantas controle. Ao longo do tempo, os níveis de prolina reduziram aos 30 dias e se mantiveram constantes até o final do experimento em plantas sob deficiência. Em plantas submetidas ao excesso de zinco houve um aumento progressivo nesses níveis ao longo dos dias de experimento. Em raízes os teores de prolina não foram demonstrados em razão da sua baixa quantificação.

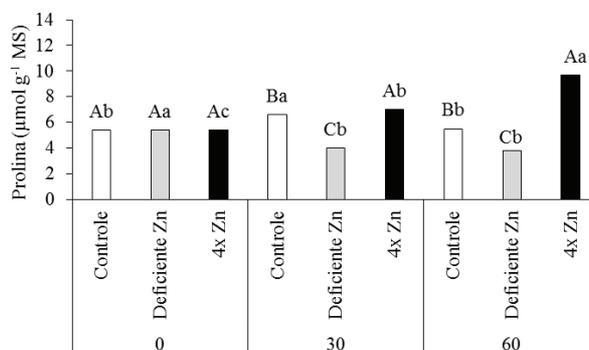


Gráfico 10 Teores de prolina em folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 4.6 Metabolismo antioxidante

As mudas de Catuaí exibiram um aumento nos teores foliares de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ao longo do experimento, em condições de deficiência e excesso de zinco (Gráfico 11A), quando comparadas ao controle. Esse aumento, ao final do experimento, foi de 47% em plantas deficientes e 24% naquelas submetidas ao excesso de zinco em relação às plantas controle. Plantas deficientes em zinco apresentaram um aumento progressivo nos teores de  $H_2O_2$ , enquanto nas plantas sob excesso desse nutriente o aumento ocorreu aos 30 dias e os níveis se mantiveram até o final do experimento. Nas raízes, aos 30 dias, (Gráfico 11B) o teor de peróxido foi mais elevado em plantas deficientes, quando comparadas aos outros tratamentos, enquanto que aos 60 dias os maiores teores foram encontrados em plantas deficientes, seguidas de plantas sob excesso de zinco e, finalmente, plantas controle. Aos 60 dias de tratamento, os níveis de peróxido de hidrogênio aumentaram 41% e 12%, respectivamente, em plantas deficientes e sob excesso de zinco, quando comparadas às plantas

controle. Ao longo do período experimental a produção de peróxido de hidrogênio nas raízes apresentou a mesma tendência das folhas.

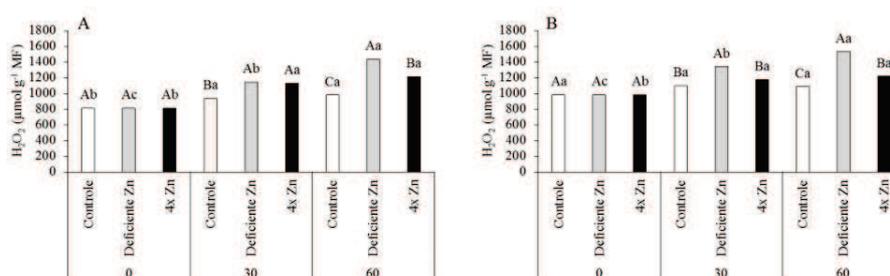


Gráfico 11 Teores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Os teores do antioxidante ascorbato em folhas de café (Gráfico 12) foram mais elevados em plantas deficientes e sob excesso de zinco a partir dos 30 dias de estresse, quando comparadas com o controle. Aos 30 dias esses teores foram maiores em plantas deficientes, seguidos pelas submetidas ao excesso de zinco e, por último, pelas plantas controle, enquanto aos 60 dias esses valores foram semelhantes entre as plantas submetidas ao excesso ou à deficiência desse nutriente. Ao final do experimento, o conteúdo de ascorbato foi 166% e 145% maior em plantas deficientes e sob excesso de zinco, respectivamente, em relação ao controle. Ao longo do tempo, os teores de ascorbato aumentaram em plantas deficientes e submetidas ao excesso de zinco aos 30 dias, a partir de quando se mantiveram constantes. Os níveis de ascorbato encontrados em raízes de café, submetidas a todos os tratamentos, foram muito baixos e não se diferiram entre si (dados não demonstrados).

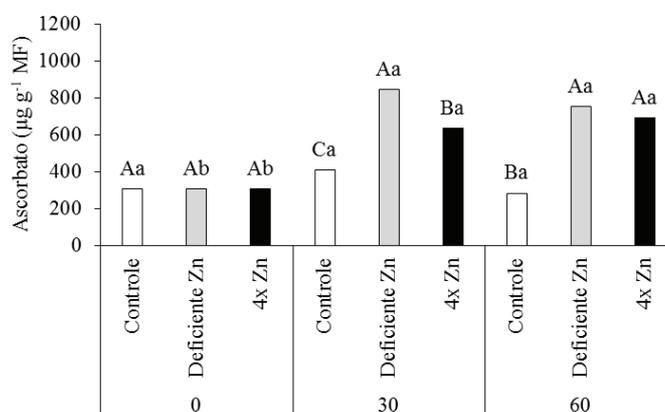


Gráfico 12 Teores de ascorbato em folhas (A) e raízes (B) de mudas de cafeeiro cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

A atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) em folhas (Gráfico 13A) e raízes (Gráfico 13B) diminuiu em plantas sob deficiência de zinco e aumentou em plantas sob excesso ao longo do período experimental. Plantas deficientes apresentaram uma redução progressiva na atividade da SOD, sendo 51% menor que as plantas controle aos 60 dias de estresse. Por outro lado, em plantas sob excesso de zinco houve um aumento progressivo na atividade desta enzima, sendo 40% superior ao controle ao final do experimento. Nas raízes de plantas sob deficiência e excesso (Gráfico 13B) até o 30º dia não foram observadas diferenças entre os tratamentos, porém, ao final do experimento, a atividade da SOD diminuiu 26% no tratamento de deficiência e aumentou 16% em plantas sob excesso de zinco, quando comparado ao grupo controle. A catalase (CAT) apresentou um aumento na atividade em folhas (Gráfico 13C) e raízes (Gráfico 13D) dos tratamentos deficiente e com excesso de zinco ao longo do tempo. A partir dos 30 dias, maiores atividades da CAT foram encontradas

em plantas deficientes, seguidas por plantas sob excesso e pelo controle. Ao longo do período experimental notou-se um incremento crescente em plantas com ausência de zinco, sendo a atividade desta enzima 75% maior que no controle aos 60 dias de estresse. Por outro lado, em plantas sob excesso, a atividade aumentou aos 30 dias e permaneceu constante até o final do experimento, quando foi 36% superior à das plantas controle. Nas raízes (Gráfico 13D) de plantas dos tratamentos deficiente e com excesso de zinco, a atividade da CAT foi superior à do controle aos 30 dias, entretanto, aos 60 dias, a atividade foi maior em plantas deficientes, seguidas pelas com excesso e pelas controle. A atividade da CAT aumentou, progressivamente, ao longo do tempo nas plantas deficientes, enquanto que, em plantas submetidas ao excesso de zinco, esse aumento ocorreu somente aos trinta dias. Ao final do experimento, plantas deficientes e em excesso apresentaram um aumento de 94% e 37%, respectivamente, na atividade desta enzima em relação ao controle.

Nas folhas a peroxidase do ascorbato (APX) apresentou maior atividade nos tratamentos de deficiência e excesso de zinco, a partir dos 30 dias (Gráfico 13E). Ao final do experimento, esta atividade foi 103% e 45% maior na deficiência e no excesso, respectivamente, em relação ao controle. Nas raízes (Gráfico 13F), a partir dos 30 dias, maior atividade foi encontrada em plantas deficientes em zinco. Essas plantas apresentaram um aumento progressivo ao longo do tempo, atingindo valores 84% maiores que o controle. Plantas sob excesso de zinco mantiveram a atividade ao longo do período experimental, não se diferenciando do controle.

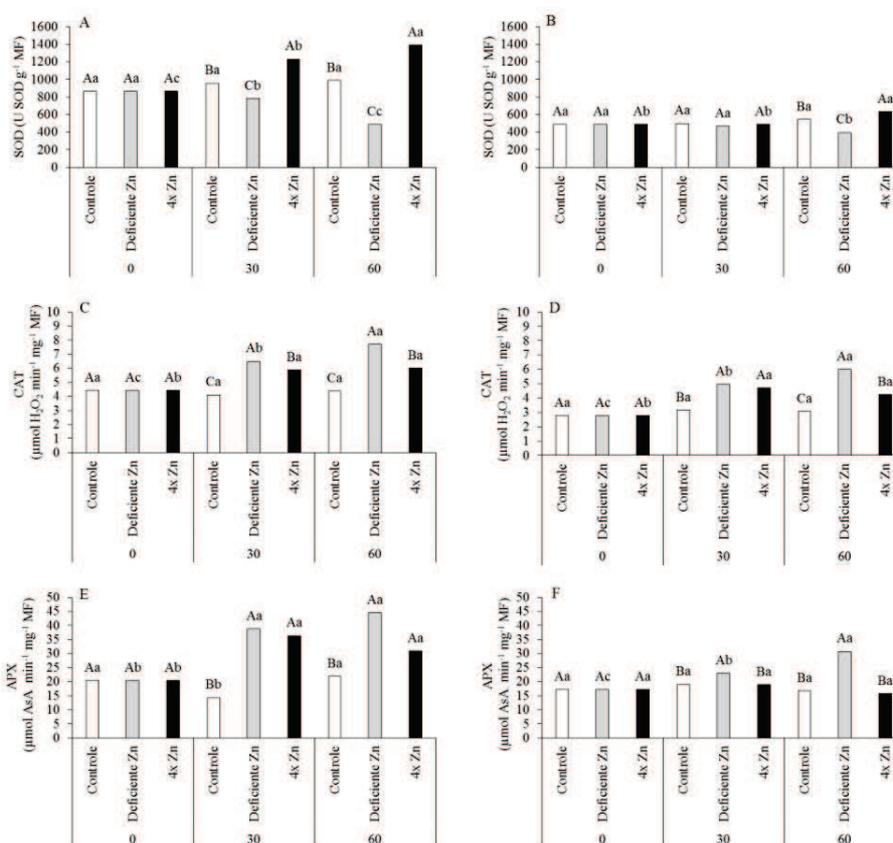


Gráfico 13 Atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT e APX em folhas (A, C, E) e raízes (B, D, F), respectivamente, de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Para os teores foliares de malondialdeído (MDA) (Gráfico 14A), até os 30 dias de experimento não houve diferença estatística entre os tratamentos, no entanto, aos 60 dias o teor de MDA aumentou 47% e 44%, respectivamente, para plantas cultivadas em ausência e excesso de zinco, quando comparadas ao

controle. Comparados os tratamentos no tempo, houve um aumento significativo para a deficiência e o excesso de zinco somente aos 60 dias. Nas raízes (Gráfico 14B), os teores de MDA diferiram entre os tratamentos somente aos 60 dias, com maiores valores em plantas deficientes, seguidos do excesso e, por fim, o controle. Plantas deficientes tiveram um aumento progressivo nos teores radiculares de MDA ao longo do período experimental, enquanto que em plantas sob excesso de zinco esse aumento se deu somente aos 60 dias. Dessa forma, ao final do período experimental esse aumento foi de 120% para plantas deficientes e 54% para plantas submetidas ao excesso de zinco, quando comparadas ao controle.

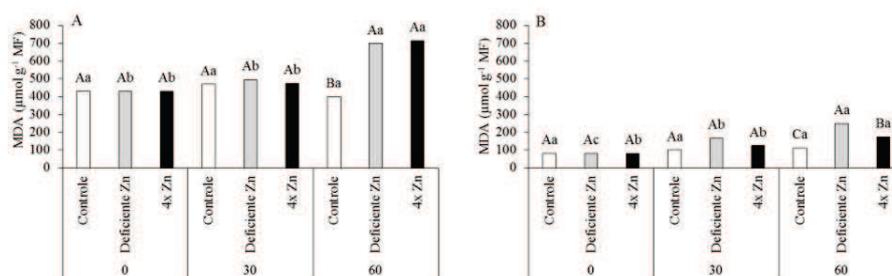


Gráfico 14 Teores de Malonaldeído em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café cv. Catuaí controle e submetidas à deficiência e excesso de Zn por 0, 30 e 60 dias

Nota: Letras maiúsculas comparam as cultivares em cada tempo de coleta, dentro de cada tratamento (controle, deficiente e excesso); letras minúsculas o efeito entre os tempos dentro de cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

## 5 DISCUSSÃO

Nas plantas o zinco pode ser encontrado em concentrações de 3 a 150 mg Kg<sup>-1</sup> de matéria seca (FERNANDES, 2006). No caso específico do cafeeiro, vários autores descreveram faixas críticas de concentrações desse elemento em folhas variando entre 15 e 30 mg kg<sup>-1</sup> (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; REUTER; ROBINSON, 1986). Neste caso, comprovou-se que pelos teores foliares de zinco as plantas deste estudo já se encontravam em deficiência aos 30 dias (12,3 mg kg<sup>-1</sup>) e em excesso aos 60 dias (35,27 mg kg<sup>-1</sup>) de tratamento. Os teores de zinco foram influenciados, significativamente, pelo seu fornecimento na solução nutritiva nos tratamentos de deficiência e excesso de zinco.

A eficácia nutricional depende da absorção efetiva das plantas e essa pode variar em função de fatores como variação genética, características morfológicas, intensidade dos drenos, compartimentalização de minerais, assim como interação com outros nutrientes (MALAVOLTA et al., 2001).

Zabini et al. (2007), em estudos com progênies de cafeeiros, encontraram diferenças nos teores foliares e radiculares de zinco decorrentes das concentrações utilizadas desse micronutriente. A raiz foi o órgão com maior redução (66,4%) do teor de zinco em plantas deficientes quando comparadas ao controle. Já em folhas, esta redução foi de apenas 35% em relação ao controle, indicando que, quando o teor de zinco é restrito, há uma maior realocação dos órgãos armazenadores para as partes mais metabolicamente ativas. Neste trabalho, as reduções nos conteúdos de zinco em plantas deficientes foram semelhantes aos encontrados por Zabini et al. (2007) com valores de 35,7% em folhas e 67,9% em raízes, quando comparadas ao controle.

O excesso e a deficiência em Zn reduziram, significativamente, o acúmulo de massa seca nas plantas em relação ao tratamento controle (Gráfico

4). Na deficiência esta redução, quanto ao controle, teve maior efeito na raiz (34%) do que na parte aérea (29%). Para o excesso de zinco ocorreu o efeito contrário com maior redução na parte aérea (17,63%) do que na raiz (7,81%), quando comparados ao controle. Resultados semelhantes para deficiência e excesso foram descritos em outras espécies tais como trigo (CAKMAK et al., 1998; RENGEL, 2001), milho (SINGH et al., 2005), maçã (LUDI et al., 2012) e para o excesso de zinco em beterraba (SAGARDOY et al., 2011).

Considerando os dados apresentados, pode-se afirmar que a deficiência de zinco, a partir dos 30 dias e para o excesso a partir dos 60 dias de imposição do estresse, acarretou uma redução do crescimento vegetal comparado a plantas controle. Pelos dados apresentados (Gráfico 4), nota-se que a ausência do suprimento de zinco, assim como em condições supra ótimas, resultou em um efeito depressivo nos parâmetros de crescimento. Isso pode ser em virtude da redução das taxas fotossintéticas aliadas à redução dos pigmentos fotossintéticos (Gráfico 5), assim como o decréscimo de fotoassimilados, como os açúcares solúveis, acarretando em uma menor massa seca (Gráfico 7). Essas respostas nos rendimentos, também, podem estar associadas a desequilíbrios nutricionais nas plantas levando a distúrbios metabólicos. A inibição e o excesso geram uma absorção diferenciada de outros nutrientes, acarretando em uma deturpação da homeostase da planta (MALAVOLTA, 1980; MENGEL; KIRBY, 1987). Esses resultados estão de acordo com Wissuwa, Ismail e Yanagihara (2006) em arroz, Hong e Ji-Yun (2007) em milho, Hajiboland e Amirazad (2010) em estudos com repolho.

Fávaro (1992), após 58 dias de imposição de cafeeiros a condições de excesso de zinco, encontrou uma redução do crescimento vegetativo e da expansão das folhas indicando efeito fitotóxico de zinco em teores mais elevados. Em razão da abrangência da atividade do zinco no metabolismo, sua redução no crescimento e desenvolvimento das plantas em condições de excesso

podem ser consequência de vários processos de diferentes vertentes. A diminuição de parâmetros vegetativos, em condição de excesso, pode estar relacionado com a interação com outros minerais, bem como o efeito direto do zinco na fotossíntese (Gráfico 5) ou na distribuição de açúcares translocáveis da fonte para o dreno (Gráfico 7).

Segundo Martinez et al. (2005), a matéria seca das folhas, caules e raízes do cafeeiro, em solução nutritiva com diferentes concentrações de Zn, manteve-se constante, independentemente do aumento dessas concentrações. Possivelmente, o crescimento da planta não foi afetado em decorrência da reserva de Zn contida na semente. Observou-se, também, que a quantidade média de matéria seca da raiz das plantas que se desenvolveram na solução sem zinco foi ligeiramente maior que de raízes que se desenvolveram nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn, possivelmente, em razão do efeito tóxico dessas concentrações. E foi observada mínima mobilidade no floema do cafeeiro. Os mesmos autores concluíram que o caule do cafeeiro se apresenta como local de armazenamento de zinco, mesmo que temporário, e não somente local de transporte do nutriente.

Os resultados obtidos, para as plantas submetidas ao excesso de zinco, demonstram que a cultivar catuaí apresentou tolerância ao excesso de zinco, uma vez que o crescimento em altura não foi afetado. Porém ocorreu uma redução no número de folhas, na área foliar e acúmulo de massa seca foliar e radicular, quando comparados ao controle. Essa tolerância pode ser em virtude da ação protetora anterior aos 60 dias, em que os níveis de osmoprotetores como carotenoides (Gráfico 6) e prolina (Gráfico 10), assim como a atividade do sistema antioxidante enzimático (Gráfico 13) e não enzimático (Gráfico 12) permaneceram elevados, sugerindo uma manutenção das atividades metabólicas da planta.

O limite de toxicidade de Zn pode variar entre espécies, tempo de exposição ao estresse e composição do meio de crescimento. Em plantas de cafeeiro, Pedrosa et al. (2013) verificaram redução da massa seca total quando submetidas ao excesso de zinco. Em plantas de *Eucalyptu smaculata* e *Eucalyptus urophylla*, concentrações de 400 – 1600 mM de zinco inibiram o crescimento da planta e reduziram o número de folhas e comprimento das raízes após cinco semanas de tratamento (DONCHEVA; STOYANOVA; VELIKOVA, 2001). Já em *Pisum sativum* a inibição do crescimento ocorreu após a aplicação 1000 µM de Zn (SOARES et al., 2001).

O zinco, em condições de estresse, pode afetar sistemas homeostáticos iônicos, interferindo na captação, transporte e regulação de íons, resultando na interrupção dos processos metabólicos (ROUT; DAS, 2003). O aparato fotossintético é um dos sítios-alvo de ação do Zn nas plantas, uma vez que, em concentrações tóxicas, perturba o invólucro do cloroplasto e a integridade das membranas dos tilacoides (CHERIF et al., 2010). Neste trabalho, verificou-se que a concentração de pigmentos fotossintéticos foi reduzida pelos tratamentos impostos a partir dos 30. Juntamente com o decréscimo das clorofilas “a” e “b” foram observados sintomas visuais de clorose internerval nas plantas submetidas aos tratamentos. Tais resultados estão de acordo com os encontrados em plantas da família solanácea (VAILLANT et al., 2005), em *Coffea arabica* (ZABINI et al., 2007) e em *Lolium perenne* (MONNET et al., 2001). Além disso, o Zn, em condições de deficiência ou supra ótimas, pode inibir o transporte de elétrons do fotossistema II (PSII) com concomitante diminuição da biossíntese de clorofila (CHALOUB; MAGALHÃES; SANTOS, 2005).

Observa-se que os carotenoides desempenham um papel chave no controle de radicais livres e peróxidos, uma vez que estão envolvidos diretamente na proteção das membranas fotossintéticas (APEL; HIRT, 2004). Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por Zabini et al. (2007)

em progênies de cafeeiro e por Peck, McDonald e Graham (2010) em trigo, enquanto que em tomate os níveis de carotenoides mantiveram-se constantes mesmo sob condições de deficiência de zinco (CHERIF et al., 2010).

Existe uma relação direta entre massa seca da parte aérea e raiz, com os parâmetros de crescimento e a translocação de carboidratos (CAKMAK et al., 1994). Ao final deste experimento, notou-se uma diminuição nos teores de açúcares solúveis totais (Gráfico 7A) na parte aérea e um aumento nas raízes de plantas deficientes e sob excesso de zinco (Gráfico 7B). Essa redução teve uma relação direta com o menor acúmulo de massa seca (Gráfico 4A) nas folhas dessas plantas, quando comparadas ao controle. Com esses resultados sugere-se que ocorreu uma maior translocação de AST em condições de excesso e deficiência de zinco, permitindo assim, o desenvolvimento das raízes, ainda que em proporções menores que o controle. A maior translocação de AST, também, foi verificada em plantas deficientes em fósforo, garantindo a manutenção do crescimento radicular das mesmas (FREDEEN; RAO; TERRY, 1989).

No caso do excesso de zinco, de acordo com Sagardoy et al. (2011), o acúmulo de AST nas raízes pode estar envolvido com um aumento da respiração pelas vias do citocromo e oxidase alternativa. Desta maneira, a maior translocação de AST em plantas deficientes e sob excesso de zinco pode ter sido uma estratégia utilizada para a manutenção da atividade respiratória de plantas submetidas ao estresse, visando a uma maior sobrevivência. Essa maior translocação de AST está relacionada com maiores níveis de AR em plantas deficientes, sugerindo que os AR sejam produtos da clivagem dos AST translocados da folha, estando disponíveis para a atividade respiratória, proporcionando o crescimento radicular.

A síntese de amido, também, foi reduzida, provavelmente, pela diminuição da atividade do amido sintase. Estudos relatam a influência do zinco na atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos em beterraba

(BROWN; ÇAKMAK; ZHANG , 1993). Resultados contrastantes a este foram encontrados em trigo (PEARSON; RENGEL 1997) em que houve o aumento de amido em condições de deficiência e excesso de zinco.

A maior produção de aminoácidos, particularmente a prolina, tem uma correlação direta com a acumulação de metais em plantas (KOVAC et al., 2009; RADIC et al., 2010). A ação protetora da prolina está conectada com sua capacidade de remover as espécies reativas de oxigênio (TRIPATHI; GAUR, 2004; SHARMA; DIETZ, 2006), impedindo a peroxidação lipídica (MEHTA; GAUR, 1999) e, assim, indicando uma ação protetora ou um papel regulador na manutenção da homeostase celular. No presente estudo, plantas em condições supra ótimas aumentaram o teor de prolina nas folhas, contribuindo com os resultados relatados em trigo por Bassi e Sharma (1993), em *Brassica juncea* e *Cajanus cajan* por Alia et al. (1995), em feijão Andrade et al. (2009) e em trigo por Li et al. (2013).

Estudos sobre o efeito da deficiência de zinco nos níveis de prolina são escassos, entretanto, no presente estudo ocorreu uma redução significativa no teor de prolina, em plantas de café deficientes em zinco. A diminuição dos teores de prolina pode ser por reações de degradação desse aminoácido, que são catalizadas por enzimas mitocondriais como a prolina desidrogenase (KAVI-KISHOR et al., 1995; PAVLIKOVA et al., 2008) em várias condições de estresse.

Neste estudo, plantas deficientes e em condições supra ótimas de zinco até os 30 dias não exibiram valores diferenciados do controle para MDA. A manutenção dos valores de MDA justifica-se por um sistema eficiente caracterizado pelo aumento dos sistemas antioxidantes enzimáticos (Gráfico 13) e não enzimático (Gráfico 10, 12). A partir do 30º dia, ocorreu um aumento nos teores de MDA, sugerindo uma redução da detoxificação dos teores de peróxido de hidrogênio pelo metabolismo. Observou-se uma relação direta entre maiores

teores de MDA e ocorrência de estresse oxidativo, em raízes e folhas de plantas, submetidas à deficiência e ao excesso de zinco aos 60 dias. O excesso de Zn pode afetar a absorção de outros nutrientes tais como Cu, Fe e Mn, e a deficiência desses elementos pode causar estresse oxidativo (DEL RIO et al., 1991). Altos níveis de Zn, também, podem contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio, por meio do deslocamento de outros metais dos seus sítios ativos em proteínas, em consequência da semelhança dos raios dos íons do zinco com os Fe e Mg (MARSCHNER, 1995). Outra indução de estresse oxidativo se dá pelo efeito estimulante da ação de algumas enzimas sob condições tóxicas, como é o caso da maior atividade da enzima lipoxigenase, desencadeando a peroxidação lipídica (WECKX; CLIJSTERS, 1997) e, conseqüentemente, vários processos antioxidantes podem ser iniciados.

Vários estudos têm relatado que baixas concentrações de Zn em células vegetais podem aumentar a produção de  $O_2^{\cdot -}$  no aparato fotossintético, no fluxo de elétrons (MARSCHNER; CAKMAK, 1989; CAKMAK et al., 1994; CAKMAK; ENGELS, 1999). A deficiência de zinco aumenta a produção de NADP oxidases que se ligam às membranas causando danos e aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (CAKMAK, 2000). Sob deficiência de zinco, várias plantas têm a tendência de absorver e translocar ferro em excesso que, sendo um metal redox, interfere em vários processos fisiológicos na planta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; PRICE; HENDRY, 1991; HENDRY, 1993; BECANNE; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998). Danos fotooxidativos são decorrentes do decaimento da eficiência fotossintética em condições de deficiência de zinco, assim como redução da fixação do  $CO_2$  e diminuição da atividade da SOD (CAKMAK; ENGELS, 1999; ALOWAY, 2008)

Plantas submetidas a estresse por metais convertem  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot -}$  em radicais altamente reativos como radical hidroxila  $OH\cdot$  pela reação de Haber-

Weiss, o qual desencadeia o processo de peroxidação lipídica (APEL; HIRT, 2004). Geralmente, um acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio faz com que haja a peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e danos ao DNA e a outros componentes celulares (STOBRAWA; LORENC-PLUCIN, 2007). O MDA é o produto direto da peroxidação lipídica em membranas, sendo considerado um dos sintomas de estresse oxidativo mais agressivos no metabolismo da planta (YAMAMOTO et al., 2002).

Ambos os tratamentos, de ausência e excesso de zinco, desencadearam um aumento nos teores de MDA ao final do experimento, corroborando com os resultados encontrados por Cherif et al. (2010) em tomate e por Ghnaya et al. (2011) em (*Brassica napus* cv. Jumbo). Também se observou maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições de deficiência e de excesso de zinco em plantas de café. Resultados semelhantes foram encontrados por Gupta, Pathak e Pandey (2011), trabalhando com *Vigna mungo* e por Prabhu e Krishnaswamy (2011) em arroz, sob excesso e deficiência de zinco, por Jain et al. (2010) em cana de açúcar submetida ao excesso de zinco e por Chen et al. (2008) em arroz sob condição de deficiência desse nutriente.

Plantas deficientes e em excesso de zinco mantiveram teores de MDA constantes até os 60 dias, porém uma maior produção de MDA em folhas foi observada ao final do experimento, possivelmente, pela atividade ineficiente do metabolismo antioxidante. Esse desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a remoção das mesmas pelo metabolismo antioxidante está relacionado à redução no crescimento, número de folhas e acúmulo de massa seca ao final do período experimental. Ocorreu, também, uma redução nos teores de clorofilas “a” e “b” e um acúmulo de carotenoides em folhas do cafeeiro aos 60 dias de estresse. Embora os teores de AsA, prolina (plantas em excesso de zinco) e a atividade das enzimas CAT e APX tenham sido elevados desde os 30 dias, o que fez com que mantivesse o desenvolvimento e o

crescimento das plantas, a mobilização deste sistema antioxidante foi suficiente para remover as EROs produzidas até os 60 dias. Isto pode ser evidenciado pelos elevados teores de peróxido de hidrogênio, a partir de 30 dias de estresse, culminando com a peroxidação lipídica demonstrada pelo aumento nos teores de MDA aos 60 dias de estresse.

Nas raízes o excesso e a deficiência do zinco desencadearam vários processos fisiológicos, como um aumento da concentração de MDA concomitante ao aumento da concentração de  $H_2O_2$  ao final do experimento. Embora tenha ocorrido um aumento na atividade do sistema antioxidante enzimático, a mesma não foi suficiente para conter os danos causados pelo excesso de produção de EROs, sob estresse, levando a um menor acúmulo de massa seca em raízes quando comparadas ao controle. No entanto, a maior translocação de carboidratos, possivelmente, proporcionou a manutenção do crescimento radicular não somente por fornecer substratos para a via glicolítica, mas também por neutralizar a ação das EROs (KEUNEN et al., 2013)

A enzima SOD pode catalisar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo um antioxidante enzimático intracelular de grande importância na tolerância ao estresse por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das EROS (GILL; TUTEJA, 2010). As isoformas da SOD são classificadas pelo metal cofator: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD), estando localizadas em diferentes compartimentos celulares (MITTLER, 2002). No presente estudo, a redução na atividade da SOD nos tratamentos de ausência de zinco em folhas e raízes, corrobora com estudos anteriores com trigo (CAKMAK; MARSCHNER, 1988), milho (HONG; JI-YUN, 2007) e pepino (GAO; LI; YU, 2009). Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que o Zn participa no processo da estabilidade da isoforma Cu/Zn-SOD, atuando como fator estrutural. O tratamento de excesso de zinco promoveu uma maior

atividade da SOD em folhas e raízes, assim como descrito em cana-de-açúcar (PRASAD; SARADHI; SHARMILA, 1999), feijão (MICHAEL; KRISHNASWAMY, 2011) e trigo (LI et al., 2013).

As enzimas CAT e APX decompõem  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e  $H_2O$  (TAYEFINASRABADI et al., 2011), constituindo o principal sistema de eliminação do  $H_2O_2$  nas células. Em plantas de café submetidas à deficiência e ao excesso de zinco, houve um aumento da atividade dessas enzimas em folhas e raízes, corroborando com os resultados encontrados em cana de açúcar (JAIN et al., 2010). No entanto, outros estudos apresentaram resultados divergentes, em que a atividade da CAT foi reduzida em resposta ao excesso de zinco em folhas e raízes de *Eruca sativa* (OZDENER; AYDIN, 2010). Desta forma, os metais podem induzir mudanças na atividade de enzimas antioxidantes e essa indução está correlacionada com a espécie, órgãos e a intensidade e duração do estresse.

Danos fotossintéticos relacionados com a formação de EROs levam à inativação de várias enzimas relacionadas à fotossíntese. Neste estudo, o aumento da atividade do sistema antioxidante juntamente com o ascorbato demonstram sua atuação, durante os períodos que antecedem a severidade do estresses, indicando uma atuação precoce do complexo antioxidante. Ainda assim, esta proteção não foi suficiente para evitar danos às membranas, ou para a manutenção dos níveis de clorofila e crescimento de plantas submetidas ao estresse.

## 6 CONCLUSÕES

Os teores foliares de zinco mostraram que as mudas de café se encontravam sob deficiência a partir dos 30 dias e sob excesso de zinco aos 60 dias de tratamentos. Os tratamentos de deficiência e excesso de zinco apresentaram um padrão de resposta semelhante, porém, em mudas sob deficiência, estas respostas foram mais acentuadas.

A deficiência e o excesso de zinco reduziram os teores de AST e amido na parte aérea, já nas raízes os teores de amido e AR se mantiveram enquanto os teores de AST aumentaram. Os níveis de clorofila a e b e massa seca foliar reduziram em plantas sob excesso e deficiência de zinco. Ambos os tratamentos induziram o aumento na produção de peróxido de hidrogênio e uma maior atividade da CAT, APX e maiores teores de ascorbato e prolina. No entanto, essa maior atividade do sistema antioxidante não foi suficiente para evitar que danos causados pelas EROs ocorressem, possibilitando um aumento nos teores de malondealdeído, que é um produto secundário da peroxidação lipídica.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANO, D. C.; PAULSEN, G. M.; MURPHY, L. S. Phosphorus-iron and phosphorus-zinc relationship in corn (*Zea mays* L.) seedlings as affected by mineral nutrition. **Agronomy Journal**, Madison, v. 63, n. 1, p. 36-39, Jan. 1971.
- ALIA, K. V. et al. Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*, **Phytochemistry**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 45-47, May 1995.
- ALLOWAY, B. J. Micronutrients and crop production. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). **Micronutrient deficiencies in global crop production**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-40.
- ANDRADE, S. A. L. et al. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, n. 10, p. 1363-1370, Mar. 2009.
- ANDREINI C. et al. Zinc through the three domains of life. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 11, p. 3173-3178, Nov. 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, June 2004.
- ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.
- AULD, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. **Biomaterials**, London, v. 14, n. 3-4, p. 271-313, Sept./Dec. 2001.
- BARAK, P.; HELMKE, P. A. The chemistry of zinc. In: ROBSON, A. D. (Ed.). **Zinc in soil and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 1-13.
- BARROS, R. S. et al. Determinação da área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. "Bourbon Amarelo"). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 20, n. 108, p. 44-52, mar. 1973.
- BASSI, R.; SHARMA, S. S. Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. **Phytochemistry**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1339-1342, Aug. 1993.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 205-207, Aug. 1973.

BECANNE, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress : toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, n. 1, p. 137-147, Apr. 1998.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, Hoboken, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007.

BROWN, P. H.; CAKMAK, I.; ZHANG, Q. Form and function of zinc in plants. In: BOBSON, A. D. (Ed.). **Zinc in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. Chap. 7, p. 90-106.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, Feb. 1978.

CAKMAK, I. et al. Effect of zinc and iron deficiency on phyto siderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 1-17, June 1994.

CAKMAK, I. et al. Morphological and hysiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. **Euphytica**, Netherlands, v. 100, n. 3, p. 349-357, Apr. 1998.

CAKMAK, I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **New Phytologist**, Hoboken, v. 146, n. 2, p. 185-205, May 2000.

CAKMAK, I.; ENGELS, C. Role of mineral nutrients in photosynthesis and yield formation. In: RENGEL, Z. (Ed.). **Mineral nutrion of crops: mechanisms and implications**. New York: The Haworth Press, 1999. p. 141-168.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants. **Journal Plant Physiology**, Jena, v. 132, n. 3, p. 356-361, Apr. 1988.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H.; BANGERTH, F. Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.40, n. 3, p. 405-412, 1989.

CAMBROLLE, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marshshrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, Oxford, v. 86, n. 9, p. 867-874, Nov. 2011.

CHALOUB, R. M.; MAGALHÃES, C. C. P.; SANTOS, C. P. Early toxic effects of zinc on PSII of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (cyanophyceae). **Journal of Phycology**, Hoboken, v. 41, n. 6, p. 1162-1168, Nov. 2005.

CHANG, H.-B.; LIN, C.-W.; HUANG, H.-J. Zinc induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 261-266, July 2005.

CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 132, n. 1, p. 89-101, Jan. 2008.

CHERIF, J. et al. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Switzerland, v. 101, n. 3, p. 332-339, Dec. 2010.

COLEMAN, J. E. Zinc enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 2, n. 2, p. 222-234, Apr. 1998.

CORREA, J. B. et al. Diagnose nutricional de cafeeiros do sul de Minas Gerais-safra 999/2000: II.Micronutrientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 26., Marília. **Anais...** Rio de Janeiro: MA/PROCAFE, 2000. p. 106-108.

COSTA, G.; SPITZ, E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. **Plant Science**, Limerick, v. 128, n. 2, p. 131-140, Oct. 1997.

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 8, p. 657–664, July/Aug. 2001.

DEL RIO, L. A et al. Nutritional effect and expression of SODs: induction and gene expression; diagnostics; prospective protection against oxygen toxicity. **Free Radical Research Communications**, New York, v. 13, n. 1, p. 819–827, 1991.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-520.

DONCHEVA, S.; STOYANOVA, Z.; VELIKOVA, V. Influence of succinate on zinc toxicity of pea plants. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 6, p. 789-804, May./Agu. 2001.

EBBS, S. D.; KOCHIAN, L. V. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 26, n. 3, p. 776–781, May 1997.

EKIZ, H. et al. Effects of zinc fertilization and irrigation on grain yield and zinc concentration of various cereals grown in zinc-deficient calcareous soils. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 2245-225, 1998.

FAGERIA, N. K. Screening method of lowland rice genotypes for zinc uptake efficiency. **Scientia Agricola**, Campina Grande, v. 58, n. 3, p. 623-626, jul./set. 2001.

FAVARO, J. R. A. **Crescimento e produção de Coffea arabica L. em resposta à nutrição foliar de zinco na presença de cloreto de potássio**. 1992. 91 p. Tese (Doutorado em Filosofia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, Rockvill, v. 17, n. 1, p. 1866–1875, July 2005.

FREDEEN, A. L.; RAO, I. M.; TERRY, N. Influence of phosphorus nutrition on Growth and Carbon Partitioning in Glycine max. **Plant Physiology**, Rockville, p. 89, n. 1, p. 225-239, Jan. 1989.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 247, n. 1, p. 1-11, Jan. 1986.

GAO, J.-J.; LI, T.; YU, X.-C. Gene expression and activities of SOD in Cucumber seedlings were related with concentrations of Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, or Zn<sup>2+</sup> under low temperature stress. **Agricultural Sciences in China** v. 8, n. 6, p. 678-684, Aug. 2009.

GHNAYA, A. B. et al. Modulation of Zn-induced oxidative stress, polyamine content and metal accumulation in rapeseed (*Brassica napus* cv. Jumbo) regenerated from transversal thin cell layers in the presence of zinc. **International Research Journal of Biotechnology**, Paris, v. 2, n. 3, p. 62–71, Mar. 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, v. 12, p. 909-930, Sept. 2010.

GOMIDE, M. B. et al. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros Mundo Novo e Catuaí. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 118-123, dez. 1977.

GRANT, C. A.; SHEPPARD, S. C. Fertilizer impacts on cadmium availability in agricultural soils and crops. **Human and Ecological Risk Assessment**, Philadelphia, v. 14, n. 2, p. 210-228, Apr. 2008.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. **Cafeicultura**. Lavras: Editora da UFLA, 2002.

GUPTA, B.; PATHAK, G. C.; PANDEY, N. Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 85-91, Jan. 2011.

HAJIBOLAND, R.; AMIRAZAD, F. Growth, photosynthesis and antioxidant defense system in Zn-deficient red cabbage plants. **Plant Soil and Environment**, Praga, v. 56, n. 5, p. 209-217, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, **Biochemical Journal**, London, v. 219, n. 1, p. 1-14, Apr. 1984.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical process and seed longevity. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 141-153, Sept. 1991.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experiment Station**, Gainesville, v. 347, n. 42, p. 1-32, 1950.

HONG, W.; JI-YUM, J. Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea Mays* L.). **Agricultural Sciences in China**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 988-995, Aug. 2007.

HUDDLE, J. M.; GIBSON, R. S.; CULLINAN T. R. Is zinc a limiting nutrient in the diets of rural pregnant Malawian women? **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 79, n. 3, p. 257-265, Mar. 1998.

JAIN, R. et al. A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiology Plant**, Heidelberg, v. 32, n. 5, p. 979-986, Sept. 2010.

JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 161, n. 7, p. 867-872, July 2004.

KAVI-KISHOR, P. B et al., Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 4, p. 1387-1394, Aug. 1995.

KAYA, C.; HIGGS, D. Inter-relationships between zinc nutrition, growth parameters and nutrient physiology in a hydroponically grown tomato cultivar. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1491-1503, Oct. 2001.

KEUNEN, E. L. S. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, n. 36, p. 1242–1255, Jan. 2013.

KITAGISHI, K.; OBATA, H.; KONDO, T. Effect of zinc deficiency on 80S ribosome content of meristematic tissues of rice plant. **Soil Science & Plant Nutrition**, Tokyo, v. 33, p. 423-429, 1987.

KOVAC, J. et al. Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, n. 2, p. 603–609, Feb. 2009.

KURDZIEL, B.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M. N. V. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. New York: Springer, 2002. Chap. 6, p. 146-181.

LEE, S. et al. Zinc deficiency-inducible ZIP8 encodes a plasma membrane-localized zinc transporter in rice. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 29, n. 6, p. 551–558, June 2010.

LI, X. et al. Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, n. 89, p. 150-157, Dec. 2013.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: John Wiley & Sons, 2001. p. 1-8.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York: JohnWiley & Sons, 1979.

- LINGUA, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 153, n. 1, p. 137–147, May 2008.
- LUDI, et al. Mechanistic aspects of molecular formation and crystallization of zinc oxide nanoparticles in benzyl alcohol. **Nanoscale**, Cambridge, v. 4, n. 6, p. 1982-1995, Mar. 2012.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.
- MALAVOLTA, E. et al. Cacau, café, chá, fumo e mate. In: FERREIRA, M. E. et al. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/, 2001. p. 425-458.
- MALAVOLTA, E. **Micronutrientes na adubação**. São Paulo: Nagy, 1986.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1989.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic, 1995.
- MARSCHNER, H.; CAKMAK, I. High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc-, potassium- and magnesium-deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 134, n. 1, p. 308-315, May 1989.
- MARTINEZ, H. E. P. et al. Translocação e compartimentalização de Zn em função de doses aplicadas em feijoeiro e cafeeiro via radicular. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 491-497, maio/jun. 2005.
- MATTIGOD, S. V.; PAGE, A. L. Assessment of metal pollution in soil. In: THORNTON, I. (Ed.). **Applied environmental geochemistry**. London: Academic Press, 1983. p. 355-394.

MEHTA S. K.; GAUR J. P. Heavy metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. **New Phytology**, Hoboken, v. 143, n. 2, p. 253–259, Aug. 1999.

MENGEL, K.; KIRBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 4. ed. Switzerland: International Potash Institute, 1987.

MENGEL, K.; KIRBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academics Publishers, 2001.

MEUNIER, N. et al. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 1, n. 3, p. 231–249, July, 2005.

MICHAEL, P. I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, n. 74, p. 171-177, Dec. 2011.

MIGUEL, A. E. et al. Teores de micronutrientes nas amostras de solo analisadas pelo laboratório do mapa em Varginha, Sul de Minas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 28., Caxambu, 2002. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. p. 76-77.

MILLER, G. L. Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MISRA, A.; RAMANI, S. Inhibition of iron absorption by zinc induced Fe-deficiency in Japanese mint. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 13, n. 1, p. 37-42, 1991.

MITTLER R, et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490–498, Oct. 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MONNET, F. et al. Relationship between PSII activity, CO<sub>2</sub> fixation, and Zn, Mn, and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, n. 9, p. 1137-1144, Apr. 2001.

MOYA, J. L.; ROS, R.; PICAZO, I. Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 75–80, May 1993.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, June 1981.

OMAIMA, M. H.; EL-METWALLY, I. M. Efficiency of zinc and potassium sprays alone or in combination with some weed control treatments on weeds growth, yield and fruit quality of Washington Navel Orange Orchards. **Journal of Applied Sciences Research**, Dordrecht, v. 3, n. 7, p. 613-621, 2007.

OZDENER, Y.; AYDIN, B. K. The effect of zinc on the growth and physiological and biochemical parameters in seedlings of *Eruca sativa* (L.)(Rocket). **Acta Physiologiae Plantarum**, London, v. 32, n. 3, p. 469-476, May 2010.

PALMGREN, M. G.; CLEMENS, S.; WILLIAMS, L. E. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 464-473, Sept. 2008.

PAVLIKOVA, D. et al. Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 70, n. 2, p. 223–230, June 2008.

PEARSON, J. N.; RENGEL, Z. Genotypic differences in the production and partitioning of carbohydrates between roots and shoots of wheat grown under zinc or manganese deficiency. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 6, p. 803-808, 1997.

PECK, A. W.; MCDONALD, G. K.; GRAHAM, R. D. Zinc nutrition influences the protein composition of flour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Cereal Science**, London, v. 47, n. 2, p. 266-274, Mar. 2008.

PEDROSA, A. W. et al. Crescimento de cultivares de café em resposta a doses contrastantes de zinco. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 3, p. 295-305, set. 2012.

PRABHU, I. M.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, n. 74, p. 171– 177, Dec. 2011.

PRASAD, K. V. S. K.; SARADHI, P. P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 1-10, Aug. 1999.

PRICE A. H.; HENDRY, A. F. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 14 n. 5, p. 477-484, June 1991.

RADIC, S. et al. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 73, n. 3, p. 336-342, Mar. 2010.

RAO, K. V. M.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, Shannon, v. 157, p. 113-128, Aug. 2000.

REMANS, T. et al. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature, **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 84, n. 1, p. 61-71, Dec. 2012.

RENGEL, Z. Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 32, n. 7, p. 1163-1186, Sept. 2001.

RENGEL, Z.; WHEAL, M. S. Kinetic parameters of Zn uptake by wheat are affected by the herbicide chlorosulfuron. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 48, p. 935-941, 1997.

REUTER, D. J.; ROBINSON, J. B. **Plant analysis: an interpretation manual**. Melbourne: Inkata Press, 1986.

RODRIGUES, A. S. de; NALINI JÚNIOR, H. A. Valores de background geoquímico e suas implicações em estudos ambientais. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 62, n. 2, p. 155-165, 2009.

RÖMHELD, V. Aspectos fisiológicos dos sintomas de deficiência e toxicidade de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. In: FERREIRA, M. E. et al. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq, 2001. p. 71-85.

ROUT, G. R.; DAS, P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. **Agronomie**, Paris, v. 23, n. 1, p. 1-3, Jan./Feb. 2003.

SADEGHZADEH, B.; RENGEL, Z. Zinc in soils and crop nutrition. In: HAWKESFORD, M. J.; BARRACLOUGH, P. (Ed.). **The molecular basis of nutrient use efficiency in crops**. London: John Wiley, 2011. p. 335–376.

SAGARDOY, R et al. Carboxylate metabolism in sugar beet plants grown with excess Zn. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, n. 7, p. 730-733, May 2011.

SAMARAKOON, A. B.; RAUSER, W. E. Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel, and zinc. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, n. 6, p. 1165–1169, June 1979.

SANTOS, P. S. D. et al. Avaliação de cultivares de café em função da disponibilidade de zinco no solo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Café, 2005.

SASAKI, T. et al. Deficiency of beta 1 integrins in teratoma interferes with basement membrane assembly and laminin-1 expression. **Experimental Cell Research**, New York, v. 238, n. 1, p. 70-81, Feb. 1998.

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal- induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1351-1365, Nov. 2002.

SHARMA, P. N.; KUMAR, N.; BISHT, S. S. Effect of zinc deficiency on chlorophyll content, photosynthesis and water relations of cauliflower plants. **Photosynthetica**, Netherlands, v. 30, p. 353–359, 1994.

SHARMA, R. K.; AGRAWAL, M. “Biological effects of heavy metals: an overview.” **Journal of Environmental Biology**, Muzaffarnagar, v. 26, n. 2, p. 301–313, June 2005.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K. J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 711–726, Feb. 2006.

SINGH, B. et al. Improving zinc efficiency of cereals under zinc deficiency. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 1, p. 36–44, Jan. 2005.

SOARES, C. R. F. S. et al. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 339-348, fev. 2001.

SOMMER, A. L.; LIPMAN, C. B. Evidence on the in-dispensable nature of zinc and boron for higher green plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 1, n. 3, p. 231-249, July 1926.

STOBRAWA, K.; LORENC-PLUCIN, G. Changes in carbohydrate metabolism in fine roots of the native European black poplar (*Populus nigra* L.) in a heavymetal-polluted environment. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 373, n. 1, p. 157-165, Feb. 2007.

STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plan. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 111-116, May/Aug. 2002.

TALBOTT, I. D.; ZEIGER, E. Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 4, p. 43-47, Aug. 1993.

TAYEFINASRABADI, H. et al. Some biochemical properties of catalase from safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv. M-CC-190). **African Journal of Agricultural Research**, Elmaford, v. 6, n. 23, p. 5221-5226, Oct. 2011.

TEZOTTO, T. et al. Nutrição do cafeeiro exposto ao cádmio, níquel e zinco P. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., Araxá. **Anais...** Araxá: SBI Café, 2011.

TORELLO, W. A.; RICE, L. A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. **Plant and Soil**, The Hague, v. 93, n. 2, p. 241-247, 1986.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. **Planta**, New York, v. 219, n. 3, p. 397-404, July 2004.

TSUI, C. The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, p. 172-180, 1948.

TUKENDORF, A.; RAUSER, W. E. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Science**, Shannon, v. 70, n. 2, p. 155–166, 1990.

VAILLANT, N. et al. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 7, p. 1005–1013, May 2005.

VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. Toxic effects of metals. FARAGO, M. E. (Ed.). **Plants and the chemical elements**. Einheim: VCH Publishers, 1994. p. 149–177.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Shannon, v. 151, n. 1, p. 59–66, Feb. 2000.

WECKX, J. E. J.; CLIJSTERS, H. M. M. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 35, n. 5, p. 405–410, May 1997.

WEISS, D. J. T. et al. Isotopic discrimination of zinc in higher plants. **New Phytologist**, Hoboken, v. 165, n. 3, p. 703–710, Mar. 2004.

WELCH, R. M.; WEBB, M. J.; LONERAGAN, J. F. Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity (Crops). In: SCAIFE, A. (Ed.). **Plant nutrition**. England: Warwick University, 1982. p. 710–715.

WILLSON, R. L. Zinc and iron in free radical pathology and cellular control. In: MILLS, C. F. (Ed.). **Zinc in human biology**. London: Springer, 1988. p. 147–172.

WISSUWA, M.; ISMAIL, A. M.; YANAGIHARA, S. Effects of zinc deficiency on rice growth and genetic factors contributing to tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 2, p. 731–741, Oct. 2006.

YAMAMOTO, Y. et al. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 1, p. 63–72, Jan. 2002.

YOSHIDA, S.; TANAKA, A. Zinc deficiency of the rice plant in calcareous soils. **Soil Science & Plant Nutrition**, Tokyo, v. 15, n. 2, p. 75–80, Apr. 1969.

ZABINI, A. V. et al. Concentração de micronutrientes e características bioquímicas de progênies de cafeeiros (*coffea arabica* L.) eficientes no uso de zinco **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 95-103, out./dez. 2007.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Elmsford, v. 57, n. 8, p. 661-669, Jan. 2010.