

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

**Metabolismo e qualidade da bebida em cafeeiro expostos ao cádmio,
níquel e zinco**

Tiago Tezotto

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

**Piracicaba
2010**

**Tiago Tezotto
Engenheiro Agrônomo**

Metabolismo e qualidade da bebida em cafeeiro expostos ao cádmio, níquel e zinco

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

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

**Piracicaba
2010**

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

Tezotto, Tiago

Metabolismo e qualidade da bebida em cafeeiro expostos ao cádmio, níquel e zinco / Tiago Tezotto. - - Piracicaba, 2010.
123 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bebidas - Qualidade 2. Cádmio 3. Café 4. Metais pesados do solo 5. Níquel 6. Nutrientes minerais do solo 7. Solo - Contaminação 8. Zinco I. Título

CDD 633.73
T355m

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

Aos meus pais Geraldo e Rosângela,

Ao meu irmão Guilherme,

Às minhas avós Virgínia e Ida,

porto seguro na minha caminhada e

que jamais mediram esforços

para que eu chegasse até aqui

DEDICO

Ao meu Tio Marcos,
incentivador maior de todas
as minhas conquistas

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fazer acreditar que é possível sempre conquistar aquilo que sonhamos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo nos primeiros meses de trabalho e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro com bolsa (2009/02852-9) e auxílio à pesquisa (2006/01248-2);

À Gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por ser berço de conhecimento “...*Desta Escola, por ele sonhada e dos jovens que a ela vêm ter, eis que surge a legião denodada de uma gente que aspira vencer. Cavaleiros que odeiam a guerra, bem armados de sãos ideais, converteram o humo da terra na pujança dos seus cafezais...*” Ode à ESALQ Salvador de Toledo Piza Jr. (1921);

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infraestrutura oferecida;

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. José Laércio Favarin, que do início da minha vida acadêmica me presenteou com ensinamentos e valores de vida, festejando as vitórias e me reerguendo nos tropeços. Agradeço não só por todo conhecimento compartilhado, pela confiança e pela alegria em ensinar e formar um novo pesquisador, mas especialmente pela oportunidade de ter dividido momentos maravilhosos ao lado destas duas pessoas, José Laércio e Graça;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela confiança e paciência durante a condução do experimento. Agradeço pelo aprendizado e experiência ao longo destes anos que contribuíram para meu crescimento profissional e que nossa amizade seja produtiva e duradoura. Conte comigo sempre;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo por me acolher no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP, e proporcionar condições irrestritas ao desenvolvimento deste trabalho;

À Prof. Dra. Orgheda L. A. D. Zucchi (Departamento de Física e Química, Universidade de São Paulo/FCFRP, Ribeirão Preto) e Prof. Dr. Marcos José Salvador (Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas) pelo auxílio nas determinações em EDXRF e pelos materiais de referência certificados;

À Dra. Aline Renné Coscione Gomes, (Instituto Agrônômico de Campinas, IAC) pela quantificação em ICP-OES;

Ao Prof. Dr. Cássio Hamilton Abreu Junior e a Cleusa Pereira Cabral (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA) pela ajuda com as digestões dos materiais vegetais;

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug e a Iolanda Aparecida Rufini (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA) pelo suporte nas análises em espectrofotômetro de chama;

Ao Prof. Dr. Jales Teixeira Chaves Filho (PUC-GO) pelos cortes histológicos dos grãos;

Aos colegas do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, ESALQ/USP, em especial a Dra. Salete Aparecida Gaziola pela amizade e carinho durante esses anos;

Aos colegas Milton Massao Shimizu e Sara Adrián López de Andrade, por me receber durante o período em que realizei as análises nas instalações do laboratório do Instituto de Biologia – UNICAMP;

A todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, pela convivência agradável e pela amizade, permitindo o pleno desenvolvimento deste trabalho;

À Luciane Aparecida Lopes Toledo, pela paciência, carinho e pelo trabalho realizado junto aos alunos do programa de pós-graduação em Fitotecnia;

Aos colegas da Sala 7 do Setor de Agricultura, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP – André Reis, Carlos Ragassi, Ana Paula Neto, Halan Vieira, Rafael Tadeu de Assis, Rodrigo Estevam Munhoz de Almeida (Txarli), Paula Rodrigues Salgado (Foker), Priscila de Oliveira , Adriene Woods Pedrosa, Luiz César Gottardo (Gota), Gabriel Costa Junqueira (Cumpañoero), Bruno Carvalho (Lecxotã), Ana Luisa (Cervicin) e Milton Ferreira de Moraes – pelos momentos de trabalho e companheirismo, descontração e confraternizações;

Aos estagiários e coordenadores do GEA e PACES nos anos de 2007, 2008, 2009 e 2010, pela disponibilidade sempre em ajudar e aprender. Pelas conversas, trocas de experiências e ajuda na colheita do experimento;

À bibliotecária Eliana Maria Garcia pelas correções na dissertação;

Aos colegas de república, Luiz Henrique Marcandalli, Rafael Tadeu de Assis e Halan Vieira pela agradável convivência nesse período;

Aos amigos que, mesmo distantes, sempre me incentivaram de alguma forma. Valeu por vocês existirem, Talaricos !!!

A todos que de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

Cultivar a alegria

"Não entregues tua alma à tristeza,
não atormentes a ti mesmo em teus pensamentos.

A alegria do coração é a vida do homem,
e um inesgotável tesouro de santidade.

A alegria do homem torna mais longa a sua vida.

Tem compaixão de tua alma, torna-te agradável a Deus, e sê firme;

concentra teu coração na santidade,

e afasta a tristeza para longe de ti,

pois a tristeza matou a muitos,

e não há nela utilidade alguma.

A inveja e a ira abreviam os dias,

e a inquietação acarreta a velhice antes do tempo.

Um coração bondoso e nobre banqueteia-se continuamente,

pois seus banquetes são preparados com solicitude.

(Eclo 30, 22-27)

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 Objetivo geral..... | 21 |
| 1.2 Objetivo específico..... | 21 |
| Referências..... | 22 |
| 2 PROCEDIMENTO SIMPLES PARA ANÁLISE DE NUTRIENTES EM FOLHAS E RAMOS DE CAFEIEIRO POR FLUORÊSCENCIA DE RAIOS-X (EDXRF)..... | 25 |
| Resumo..... | 25 |
| Abstract..... | 25 |
| 2.1 Introdução..... | 25 |
| 2.2 Material e Métodos..... | 27 |
| 2.2.1 Coleta do material vegetal para calibração..... | 27 |
| 2.2.2 Determinação dos teores de macronutrientes e micronutrientes no material vegetal por ICP-OES..... | 27 |
| 2.2.3 Calibração do espectrômetro de raios-X de energia dispersiva (EDXRF)..... | 27 |
| 2.2.4 Análise estatística..... | 28 |
| 2.3 Resultados e discussão..... | 28 |
| 2.4 Conclusões..... | 41 |
| Referências..... | 41 |
| 3 CÁDMIO, NÍQUEL E ZINCO EM CAFEIEIRO: DISTRIBUIÇÃO, EFEITO NO ESTADO NUTRICIONAL E PRODUTIVIDADE..... | 45 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo..... | 45 |
| Abstract..... | 45 |
| 3.1 Introdução..... | 45 |
| 3.2 Material e métodos..... | 47 |
| 3.3 Resultados e discussão..... | 49 |
| 3.4 Conclusões..... | 78 |
| Referências..... | 78 |
| 4 CÁDMIO, NÍQUEL E ZINCO EM CAFEEIRO: AVALIAÇÃO DA FISIOLOGIA DA PLANTA, BIOQUÍMICA DE GRÃOS E QUALIDADE DE BEBIDA..... | 87 |
| Resumo..... | 87 |
| Abstract..... | 87 |
| 4.1 Introdução..... | 88 |
| 4.2 Material e métodos..... | 90 |
| 4.2.1 Material vegetal..... | 90 |
| 4.2.2 Avaliação do crescimento..... | 90 |
| 4.2.3 Trocas gasosas..... | 91 |
| 4.2.4 Determinação do teor de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, carotenóides e leituras SPAD..... | 91 |
| 4.2.5 Determinação de proteína total solúvel..... | 91 |
| 4.2.6 Determinação da peroxidação lipídica..... | 92 |
| 4.2.7 Preparo da infusão..... | 92 |
| 4.2.8 Composição mineral dos grãos e da infusão..... | 92 |
| 4.2.9 Análise de componentes da qualidade da bebida..... | 92 |
| 4.2.10 Prova de xícara da bebida do café..... | 92 |

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 4.2.11 Cortes histológicos..... | 93 |
| 4.2.12 Delineamento experimental..... | 93 |
| 4.3 Resultados e discussão..... | 93 |
| 4.4 Conclusões..... | 112 |
| Referências..... | 113 |
| APÊNDICES..... | 119 |

RESUMO

Metabolismo e qualidade da bebida em cafeeiro expostos ao cádmio, níquel e zinco

A contaminação ambiental por metais pesados, entre os quais o cádmio (Cd), níquel (Ni) e zinco (Zn), tanto nos solos cultivados quanto nos produtos agrícolas, demanda constante monitoramento do solo, bem como a quantificação desses elementos nos diferentes órgãos dos vegetais. No manejo da adubação e outras práticas culturais, há contaminação indesejável de metais pesados que se acumulam nos solos ao longo dos anos, podendo causar danos ao crescimento vegetal, produção e/ou qualidade do produto agrícola. Considerando a relevância da problemática dos metais pesados nos sistemas agrícolas, é essencial o conhecimento da ação do Cd, Ni e Zn nos processos metabólicos no cafeeiro. A proposta desta pesquisa foi verificar a influência das aplicações de doses crescentes de Cd, Ni e Zn sobre as características nutricionais, fisiológicas e bioquímicas em plantas de cafeeiro em produção e na qualidade da bebida. Por meio dos parâmetros analisados até 128 dias, a ordem crescente de toxidez é de Ni, Zn e Cd. A distribuição de Cd é maior nos ramos, grãos e folha; Ni nas folhas, ramos e grãos e Zn nos ramos, folhas e grãos. O estado nutricional do cafeeiro não é afetado pela aplicação dos metais, com exceção do nitrogênio e do fósforo, que reduz nas maiores doses de Cd e Zn. A produtividade e qualidade da bebida são reduzidas em razão da aplicação dos metais.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; Metais pesados; Repartição de nutrientes; Espectrometria por fluorescência; Nutrição de plantas; Estresse de planta

ABSTRACT

Metabolism and beverage quality of coffee plants exposed to cadmium, nickel and zinc

Environmental contamination by heavy metals, including Cd, Ni and Zn, in both cultivated soils and agricultural products, takes constant monitoring of soils and the quantification of these elements in different plant parts. The management of fertilizer and other cultural practices, there are undesirable contamination of heavy metals that accumulate in soils over the years, causing damage to plant growth, production and/or quality of products. Considering the growing concern with heavy metals in agricultural systems is essential research focused on the physiological mechanism of Cd, Ni and Zn in coffee plants. Therefore, to evaluate the translocation of metals to coffee beans, the monitoring and the quantification of these elements in soils and different organs of coffee plants are required. The aim of this study was to evaluate the influence of applications times and rates of Cd, Ni and Zn on the nutritional, physiological and biochemical changes in coffee plants as well as cup quality drink under field condition. According to the results evaluated up to 128 days exposure to metals, the order of increasing toxicity was Ni>Zn>Cd. The distribution of Cd was higher in the plagiotropic branches>grain>leaf; Ni in leaves>stems>grains, and Zn in stems>leaves>grains, respectively. The nutritional status of coffee plants was not affected by the application of metals, except nitrogen and phosphorus, which reduced the highest levels of Cd and Zn. The coffee yield and cup quality drink decreased due to metals exposition.

Keywords: *Coffea arabica* L.; Heavy metal; Nutrient distribution; Fluorescence spectrometry; Mineral nutrition; Plant stress

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesados é um problema mundial, uma vez que estes materiais geralmente são estáveis, não degradam e persistem no ambiente. Os solos apresentam mecanismos de precipitação, processos de adsorção e reações de oxido-redução que naturalmente atenuam a biodisponibilidade e a lixiviação de baixas quantidades de metais pesados (HSEU et al., 2010).

O termo “metal pesado” é designado a um grupo heterogêneo de elementos, entre os quais inclui metais, semimetals e não metais, os quais possuem massa específica maior que 5 g cm^{-3} ou número atômico superior a 20 (MALAVOLTA et al., 2006). Entre estes elementos estão alguns nutrientes essenciais às plantas, como o cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn), denominados micronutrientes, em razão da pequena quantidade exigida pelos vegetais e para os até então, sem função conhecida nas plantas, tais como o cádmio (Cd), crômio (Cr) e chumbo (Pb), descritos como “metais pesados tóxicos” (MORAES, 2009).

Com o aumento das atividades industriais, como a mineração, fundição, queima de combustíveis fósseis, fabricação de baterias e eletrônicos (CHAOUI; GHORBAL; EL FERJANI, 1997; LAGRIFFOUL et al., 1998; CHEN; KAO, 1995; GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1996; PRASAD, 1995; SCHICKLER; CASPI, 1999), tem sido constatado uma elevação nos teores de metais pesados nos solos.

Em áreas agrícolas a adição de fontes antrópicas como os biossólidos que apresentam, com frequência, teores elevados de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni e Zn (MATTIGOD; PAGE, 1983); uso de fertilizantes fosfatados fabricados a partir de rochas sedimentares (McLAUGHLIN; PARKER; CLARKE, 1999; GRANT; SHEPPARD, 2008) e aplicação de fontes de micronutrientes provenientes de subprodutos industriais (MORTVEDT, 2001; MALAVOLTA, 1994) contribuem para o aumento dos teores desses metais pesados nos solos das áreas cultivadas. Quando estes elementos são absorvidos e, principalmente, bioacumulados nas plantas podem entrar na cadeia alimentar por meio do consumo dos produtos agrícolas (GHOSHROY et al., 1998).

O aumento da contaminação ambiental por metais pesados, tanto nos solos cultivados quanto nos produtos agrícolas, demanda constante monitoramento desses solos, bem como a quantificação dos elementos tóxicos presentes nos tecidos vegetais.

Tem se mostrado vantajoso o uso de técnicas analíticas de determinação elementar de ampla faixa de quantificação, que seja de baixo custo e apresente praticidade no preparo das amostras vegetais (MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009). A fluorescência de raios-X tem sido aplicada com sucesso na determinação de minerais em materiais vegetais (CHUPARINA; GUNICHEVA, 2003; MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009) e em solos contaminados (NECEMER et al., 2008; MARGUÍ et al., 2005; ASLAN; BUDAK; KARABULUT, 2004; ORESCANIN et al., 2003).

O uso de fontes antrópicas em cafezais é uma prática crescente no programa de fertilização, como forma de complementar a adubação, com a finalidade de reduzir o uso de fertilizantes químicos e, conseqüentemente, o custo da nutrição do cafeeiro. Há muitas especulações em relação aos efeitos dos altos teores de metais pesados, presentes nos resíduos industriais e urbanos aplicados no cafeeiro (MARTINS, 2005; FERREIRA, 2005). Embora haja algumas publicações referindo-se aos problemas de toxidez de metais em solos ácidos para muitas espécies cultivadas, ainda são escassos os trabalhos publicados sobre o efeito tóxico desses elementos em plantas de café (PAVAN; BINGHAM, 1982; MAZZAFERA, 1998).

Embora o problema ocorra há bastante tempo, o primeiro relato específico foi feito por Abreu et al. (2005), os quais estudaram os teores de alguns metais pesados em 13.416 amostras de solo de 21 Estados brasileiros, dos quais alguns eram cultivados com cafeeiro no Estado de São Paulo. Os autores constataram as seguintes faixas de teores: Cd (0 - 3,43 mg dm⁻³); Cr (0 - 42,9 mg dm⁻³); Ni (0 - 65,1 mg dm⁻³); Pb (0 - 63,9 mg dm⁻³) e Zn (0,1 - 453,0 mg dm⁻³). A maioria destes solos apresentavam 2,29%; 0,35%; 0,19% e 19,6% acima dos teores de referência para solos não cultivados, em relação a Cd, Cr, Ni e Pb, nessa ordem. Segundo os autores o alto nível desses elementos estaria relacionado com o uso de resíduos de biossólidos.

Em células de cafeeiro em suspensão expostas à solução concentrada com Cd verificou que este metal era rapidamente absorvido e acumulado em altas concentrações (GOMES-JUNIOR et al., 2006). Na formação de mudas de Catuaí

Vermelho (*Coffea arabica* L.) com biossólido o Cr, Co, Ni, Pb, Cu e Zn acumularam-se principalmente nas raízes, enquanto o Mn nas folhas (Franco et al., 2004). O emprego de biossólidos na fertilização de plantas de cafeeiros em produção, não prejudicou a qualidade da bebida (Martins, 2005), entretanto, não foram realizadas avaliações sobre o acúmulo dos metais pesados na planta, principalmente nos grãos.

A presente pesquisa foi realizada com base nas seguintes hipóteses: (i) a técnica de determinação de elementos por fluorescência de raio-X pode substituir com precisão a técnica de digestão úmida de material vegetal e leitura em ICP-OES geralmente empregada na determinação de elementos para avaliação da contaminação e do estado nutricional de plantas cultivadas; (ii) a presença de Cd, Ni e Zn no solo, pode diminuir a assimilação de outros nutrientes pelo cafeeiro, bem como prejudicar a produtividade; (iii) o metabolismo do cafeeiro pode ser afetado pela exposição aos metais pesados, o qual deve alterar com a dose e o metal aplicado; e (iv) as aplicações de Cd, Ni e Zn no solo podem elevar o teor no fruto do cafeeiro e interferir na síntese de compostos responsáveis pela qualidade da bebida.

1.1 Objetivo geral

A pesquisa foi realizada com o objetivo de verificar a influência das aplicações de doses crescentes de Cd, Ni e Zn sobre as características nutricionais, fisiológicas e bioquímicas em plantas de cafeeiro em produção e na qualidade da bebida.

1.2 Objetivos específicos

- Validar a técnica de fluorescência de raios-X em relação à técnica de digestão úmida e leitura em ICP-OES na determinação dos teores de nutrientes e contaminantes no cafeeiro.
- Avaliar a produtividade e parâmetros tecnológicos de grãos de cafeeiros expostos aos metais pesados Cd, Ni e Zn.
- Avaliar o crescimento, fotossíntese, proteínas e peroxidação lipídica nos cafeeiros expostos a Cd, Ni e Zn.
- Quantificar parâmetros bioquímicos que influenciam a qualidade da bebida, bem como a prova de xícara em grãos de cafeeiros submetidos a Cd, Ni e Zn.

Referências

- ABREU, C.A.; RAIJ, B. van; ABREU, M.F.; GONZÁLEZ, A.P. Routine soil testing to monitor heavy metals and boron. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 564-571, 2005.
- ASLAN, A., BUDAK, G., KARABULUT, A. The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca and Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey). **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, New York, v. 88, p. 423-431, 2008.
- CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Limerick, v.126, p. 21-28, 1997.
- CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 16, p. 249-252, 1995.
- CHUPARINA, E.V., GUNICHEVA, T.N. Nondestructive X-ray fluorescence determination of some elements in plant materials. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 58, n. 9, p. 856-861, 2003.
- FERREIRA, T.L. **Utilização de lodo de esgoto na implantação de cafezal em latossolo vermelho distrófico**. 2005. 89 p. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) – Instituto Agrônômico, Campinas, 2005.
- FRANCO, E., MIGLIORANZA, E., FONSECA, É.P. High metal contents in coffee plant organs developed in tubets with different proportions of biosolid composts and carbonized rice hulls. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 4, p. 503-510, 2004.
- GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 198, p. 139-143, 1996.
- GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, Washington, v. 13, p. 591-602, 1998.
- GOMES JUNIOR, R. A.; MOLDES, C.; DELITE, F. S.; POMPEU, G.; GRATAO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1330-1337, 2006.
- 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, 2008.

HSEU, Z.Y.; SU, S.W.; LAI, H.Y.; GUO, H.Y.; CHEN, T.C.; CHEN, Z.S. Remediation techniques and heavy metal uptake by different rice varieties in metal-contaminated soils of Taiwan: New aspects for food safety regulation and sustainable agriculture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 56, p. 31-52, 2010.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 200, p. 241-250, 1998.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153p.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JÚNIOR, J.; MALAVOLTA, M. Micronutrientes e metais pesados – essencialidade e toxidez. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. cap.4, p.117-154.

MARGUÍ, E., QUERALT, I., CARVALHO, M.L., HIDALGO, M. Comparasion of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 549, p. 197-204, 2005.

MARGUÍ, E., QUERALT, I., HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantification of metals in vegetal material. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 362-372, 2009.

MARTINS, D.R.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Qualidade do grão e da bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 115-126, 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.

MAZZAFERA, P. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 189-196, 1998.

McLAUGHLIN, M.J.; PARKER, D.R.; CLARKE, J.M. Metals and micronutrients – food safety issues. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 60, n. 1-2, p. 143-163, 1999.

MORAES, M.F. **Micronutrientes e metais pesados tóxicos: do fertilizante ao produto agrícola**. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MORTVEDT, J.J. Tecnologia e produção de fertilizantes com micronutrientes: presença de elementos tóxicos. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.; RAIJ, B. van; ABREU, C.A. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq; FAPESP; POTAFOS, 2001. cap.10, p. 237-254.

NECEMER, M., KUMP, P., SCANCAR, J., JACIMOVIC, R., SIMCIC, J., PELICON, P., BUDNAR, M., JERAN, Z., PONGRAC, P., REGVAR, M., VOGEL-MIKUS, K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. **Spectrochimica Acta**. Part B, Oxford, v. 63, p. 1240-1247, 2008.

ORESCANIN, V., KATUNAR, A., KUTLE, A., VALKOVIC, V. Heavy metals in Soil, Grape and Wine. **Journal of Trace and Microprobe techniques**, New York, v. 21, no. 1, p. 171-180, 2003.

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

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 35, p. 525-545, 1995.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

2 PROCEDIMENTO SIMPLES PARA ANÁLISE DE NUTRIENTES EM FOLHAS E RAMOS DE CAFEIEIRO POR FLUORESCÊNCIA DE RAIO-X (EDXRF)

Resumo

A espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e materiais de referência certificados para folhas foram utilizados para validar o método de análise por fluorescência de raios-X (EDXRF) para vários minerais em folhas e ramos de cafeeiro. O método é vantajoso por usar amostras de vegetal moída, de baixo custo e correlaciona com o método de referência.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; Toxicidade por metal; Nutrição mineral; Fluorescência por raios-X

Abstract

Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES) and certified reference materials made from leaves were used to validate a X-ray fluorescence method (EDXRF) for the analyses of several minerals in coffee leaves and branches. The method proved to be expedite as loose powder samples could be used, low cost and have a good correlation with referenced method.

Keywords: *Coffea arabica* L.; Metal toxicity; Mineral nutrition; X-ray fluorescence

2.1 Introdução

A composição mineral da planta é governada por características mineralógicas do solo, a capacidade em absorver os nutrientes, pela fertilização e pela poluição ambiental (QUERALT et al., 2005). A diagnose nutricional das plantas tem sido realizada por métodos colorimétricos, fotometria de emissão de chama, espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (FIFIELD; HAINES, 2000; MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Este último método é empregado principalmente para a análise de elementos traços.

O emprego desses métodos está condicionado ao preparo da amostra com a finalidade de destruir completamente a matriz orgânica do vegetal por incineração (queima em mufla) ou por digestão úmida (com ácidos fortes). A decomposição orgânica da amostra geralmente é perigosa, demorada, requer cautela para evitar a explosão destes ácidos em aquecimento e que muitas vezes pode limitar a aplicação do método analítico (NODA et al., 2006).

Por esta razão, cada vez mais são feitos estudos que buscam adequar métodos analíticos multielementares que minimizem tanto o preparo da amostra quanto o custo da análise. Neste sentido, a técnica de fluorescência por raio-X (XRF) é promissora, pois apresenta as características desejadas para a análise de tecido vegetal, dentre as quais podem ser citadas: (i) a possibilidade de executar análises diretamente nas amostras moídas; (ii) a capacidade de análise multielementar; (iii) a possibilidade de realizar análises qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas; e (iv) baixo custo da análise (MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009).

A fluorescência de raio-X tem sido aplicada com sucesso em estudos de composição mineral de plantas em fitorremediação (CHUPARINA; GUNICHEVA, 2003; MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009), contaminação do solo por resíduos industriais (NECEMER et al., 2008; MARGUÍ et al., 2005; ASLAN; BUDAK; KARABULUT, 2004; ORESCANIN et al., 2003) e também na agricultura (GRATÃO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006; MAITY et al., 2010; NODA et al., 2006).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a hipótese de que a técnica de análise de elementos por fluorescência de raio-X pode substituir com precisão a técnica de digestão nitroperclórica do material vegetal e leitura em ICP-OES empregada atualmente na análise de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn) em material vegetal para a avaliação do estado nutricional do cafeeiro.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta do material vegetal para calibração

Para determinação dos teores de macronutrientes e micronutrientes coletou-se o terceiro par de folhas de ramos plagiotrópicos, a meia altura de plantas da espécie *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20, com sete anos de idade, cultivadas no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil. As folhas foram lavadas com água deionizada para remoção de sujeiras e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 60 °C por 72 horas. Posteriormente as amostras foram moídas, peneiradas (malha 35 mesh), acondicionadas em frascos de acrílico com tampa plástica e armazenadas até a realização das determinações em ICP-OES e em EDXRF.

2.2.2 Determinação dos teores de macronutrientes e micronutrientes no material vegetal por ICP-OES

Para a determinação dos teores de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Ni no material vegetal, uma amostra de 0,5 mg foi submetida à digestão nitroperclórica de acordo com MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA (1997). Após a obtenção do extrato, o K foi determinado por fotometria de emissão de chama enquanto o P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Ni foram determinados por ICP-OES (JobinYvon, JY50P, Longjumeau, France). As determinações foram realizadas no Centro de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo, Brasil.

2.2.3 Calibração do espectrômetro de raios-X de energia dispersiva (EDXRF)

Para calibração do espectrômetro de raios-X (EDXRF), foram utilizadas amostras com ampla faixa de teores dos elementos de interesse previamente determinado por ICP-OES e analisadas por EDXRF para obtenção dos espectros e registro das intensidades de leitura no software do equipamento. O teor do elemento na amostra foi calculado por “parâmetros fundamentais” pelo software do EDXRF, o qual corrige o efeito da matriz orgânica permitindo que os teores dos elementos presentes, mas não determinados, como por exemplo, o carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, sejam

registrados no equipamento para que possam ser considerados nas correções e nos cálculos dos teores dos elementos de interesse. Para a determinação dos teores dos elementos nas amostras, usou um grama (1 g) do material vegetal moído e disposto em porta-amostras de polietileno com 20 mm de diâmetro. Estes porta-amostras foram cobertos com filme de polipropileno (Mylar[®]) de 6 µm de espessura. As amostras foram irradiadas em triplicata, durante 300 segundos sob vácuo, usando o espectrômetro de raios-X de energia dispersiva (modelo EDX-720 Shimadzu). A fonte de raio-X usada foi de ródio (Rh) com voltagem aplicável até 50 KeV, com filtro de zircônio (Zr), com detector semicondutor de Si(Li) de resolução de 0 à 40 KeV e colimador de 10 mm. A intensidade (cps/µA) da linha K α de cada elemento foi registrada. Para verificar a acurácia e a precisão da calibração os materiais certificados “Apple leaves” (NIST 1515), “Peach leaves” (NIST 1547) e “Tomato leaves” (NIST 1573a) foram analisados na condição descrita acima, com leitura de cinco repetições.

2.2.4 Análise estatística

Os teores dos elementos analisados e determinados pelo método ICP-OES e EDXRF foram comparados por meio de regressões lineares pelo software Sigma Plot 2000.

2.3 Resultados e discussão

Na determinação da acurácia e precisão do EDXRF os materiais certificados (“Apple leaves” (NIST 1515), “Peach leaves” (NIST 1547) e “Tomato leaves” (NIST 1573a), apresentaram valores médios de recuperação de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, e Zn de 109,7%, 100,3%, 96,3%, 99,3%, 90,6%, 106% e 114%, nessa ordem (Tabela 1). Valores semelhantes de recuperação de K, Ca, Fe, Mn e Zn foram obtidos por CARVALHO; SILVEIRA; CASIMIRO (2002), em material certificado de “Orchard leaves” (NIST SRM 1571), os quais foram iguais a 102%, 100%, 99%, 105,5% e 100% respectivamente.

Os resultados obtidos comparados com os valores certificados apresentaram para a maior parte dos elementos valores coerentes e/ou dentro da incerteza

associada. Para o Cu e o Ni não foi possível calcular a recuperação desses elementos, pois os valores certificados eram inferiores ao limite de detecção do método. Isso ocorreu devido ao preparo das amostras utilizado no presente trabalho, uma vez que a leitura dos materiais em porta-amostras de polietileno deve ser evitada, principalmente na determinação de elementos traços (MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009).

Tabela 1 – Teores dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS; n=5) em materiais certificados determinados por EDXRF (\pm desvio padrão)

| Padrão | | P | K | Ca | Mg | Cu $\mu\text{g g}^{-1}$ MS | Fe | Mn | Ni | Zn |
|---------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| NIST 1515 | EDXRF | 1750 ± 27 | 18700 ± 100 | 14900 ± 113 | 2500 ± 161 | ND | 81,3 $\pm 0,946$ | 60,3 $\pm 2,0$ | ND | 13,8 $\pm 1,2$ |
| | Certificado | 1590 ± 11 | 16100 ± 20 | 15260 ± 15 | 2710 ± 8 | 5,64 $\pm 0,24$ | 83 ± 5 | 54 ± 3 | 0,91 $\pm 0,12$ | 12,5 $\pm 0,3$ |
| | Recuperação (%) | 110 | 116 | 98 | 94 | - | 98 | 112 | - | 110 |
| NIST 1547 | EDXRF | 1420 ± 27 | 25000 ± 40 | 14300 ± 30 | 4500 ± 121 | ND | 191,1 $\pm 1,258$ | 103,9 $\pm 1,5$ | ND | 20,6 $\pm 0,64$ |
| | Certificado | 1370 ± 7 | 24300 ± 30 | 15600 ± 20 | 4320 ± 8 | 3,7 $\pm 0,4$ | 218 ± 14 | 98 ± 3 | 0,69 $\pm 0,09$ | 17,9 $\pm 0,4$ |
| | Recuperação (%) | 103 | 103 | 92 | 104 | - | 88 | 106 | - | 115 |
| NIST 1573a | EDXRF | 2490 ± 48 | 22200 ± 40 | 50100 ± 143 | 11900 ± 308 | ND | 317,8 $\pm 1,96$ | 245,1 $\pm 2,86$ | ND | 36,2 $\pm 0,8$ |
| | Certificado | 2160 ± 4 | 27000 ± 50 | 50500 ± 90 | 12000* | 4,7 $\pm 0,14$ | 368 ± 7 | 246 ± 8 | 1,59 $\pm 0,07$ | 30,9 $\pm 0,7$ |
| | Recuperação (%) | 116 | 82 | 99 | 100 | - | 86 | 100 | - | 117 |

* Valor não certificado; ND – não detectado

Os limites de detecção (Tabela 2) foram estimados a partir das amostras padrão das folhas de cafeeiro. Como amostra branco (ausência dos elementos na amostra vegetal) de matriz semelhante não são disponíveis para a calibração do equipamento, o limite de detecção foi calculado como $3 s/b$, em que s é o desvio padrão da intersecção em y e b é o coeficiente angular da reta de calibração (BARROS, 2002).

Tabela 2 – Valores dos limites de detecção obtidos na presente pesquisa

| P | K | Ca | Mg | Cu | Fe | Mn | Ni | Zn |
|-----|------|------|-----|-----|----|------|-----|-----|
| 140 | 4980 | 2800 | 830 | 7,2 | 44 | 16,2 | 4,7 | 2,0 |

O limite de detecção obtido para os elementos leves K e Ca foram maiores que os elementos metálicos, porém foi adequado se considerar que ambos os elementos (K e Ca) estão presentes em altos teores nos tecidos vegetais, o que permite afirmar que podem ser empregados na análise de rotina para diagnóstico do estado nutricional das plantas. A faixa de teores dos elementos encontrados nas plantas cultivadas de acordo com RAIJ et al. (1997) para P variam de (800 a 13.000 $\mu\text{g g}^{-1}$); K (5.000 a 80.000 $\mu\text{g g}^{-1}$); Ca (700 a 50.000 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mg (1.000 a 12.000 $\mu\text{g g}^{-1}$); Cu (2 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$); Fe (5 a 1.000 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mn (5 a 2.000 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (5 a 250 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Os limites de detecção na presente pesquisa foram maiores do que os obtidos por outros autores, devido ao método de preparo da amostra adotado. O preparo de amostra em pellets permite obter limites de detecção inferiores daqueles obtidos a partir de amostras preparadas em porta-amostras de polietileno. MARGUÍ et al. (2005) obtiveram os seguintes limites de detecção: K (10 $\mu\text{g g}^{-1}$); Ca (20 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mn (4 $\mu\text{g g}^{-1}$); Fe (3,1 $\mu\text{g g}^{-1}$); Cu (1,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (1,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) em material de referencia certificado "Orchard leaves" prensado em pellets.

A pesquisa evidenciou que a leitura em porta-amostras de polietileno sem a prensagem do material vegetal para a avaliação do estado nutricional de plantas apresentou vantagens em relação a outros métodos espectrométricos, principalmente, pelo tempo total de determinação em EDXRF, o qual foi menor do que as análises

químicas convencionais, por não depender da decomposição orgânica da matriz (BUDAK; KARABULUT, 1999).

Os valores obtidos com o método de EDXRF foram correlacionados com o método de ICP-OES por regressão linear, conforme proposto por (MILLER; MILLER, 2000). Os parâmetros do R^2 , da interceptação do eixo y (A) e do coeficiente angular da reta (B) foram avaliados. Quando os resultados a partir dos diferentes métodos fossem iguais, os parâmetros deveriam apresentar valores de $R^2 = 1$, $B = 1$ e $A = 0$. Como apresentado na Tabela 3, os dados experimentais se ajustam ao modelo linear, conforme visualizado nas figuras 1 a 9, para os elementos P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, respectivamente.

Tabela 3 – Faixa de teores dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) determinados e valores dos parâmetros da análise de regressão linear (RL) entre o método de EDXRF e de ICP-OES.

| Elemento | Faixa | Parâmetros da análise de RL | | |
|----------|-------------|-----------------------------|------------------------|----------|
| | | R^2 | A | B |
| P | 660-2010 | 0,9327 | -22,6711 ^{ns} | 1,0215** |
| K | 12240-24990 | 0,7934 | 2746,8513* | 0,8783** |
| Ca | 7650-20400 | 0,8322 | 3851,8327** | 0,6793** |
| Mg | 1600-4700 | 0,7582 | -981,4349* | 1,4989** |
| Cu | 4,2-556 | 0,9853 | 0,7443 ^{ns} | 0,9330** |
| Fe | 48,3-1183 | 0,9515 | 50,6917** | 0,7410** |
| Mn | 46,4-556 | 0,9891 | -3,2915 ^{ns} | 1,0371** |
| Ni | 11,6-52,3 | 0,9875 | 2,9151 ^{ns} | 0,8856** |
| Zn | 6-80,4 | 0,9658 | 3,5600** | 0,8617** |

Análise de regressão: Regressão Linear, $\text{EDXRF} = A + B \cdot \text{ICP}$ (A: interseção em y, B: coeficiente angular da reta)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: não significativo

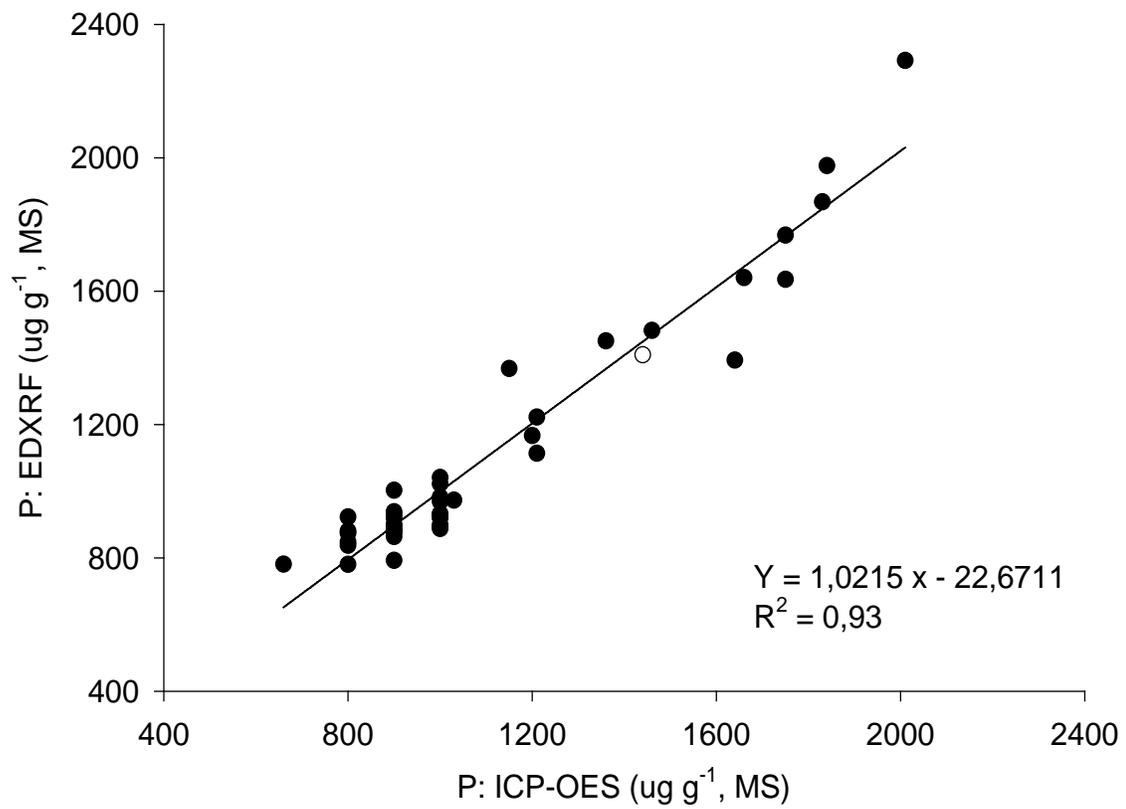


Figura 1 – Retas de padronização para o P obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

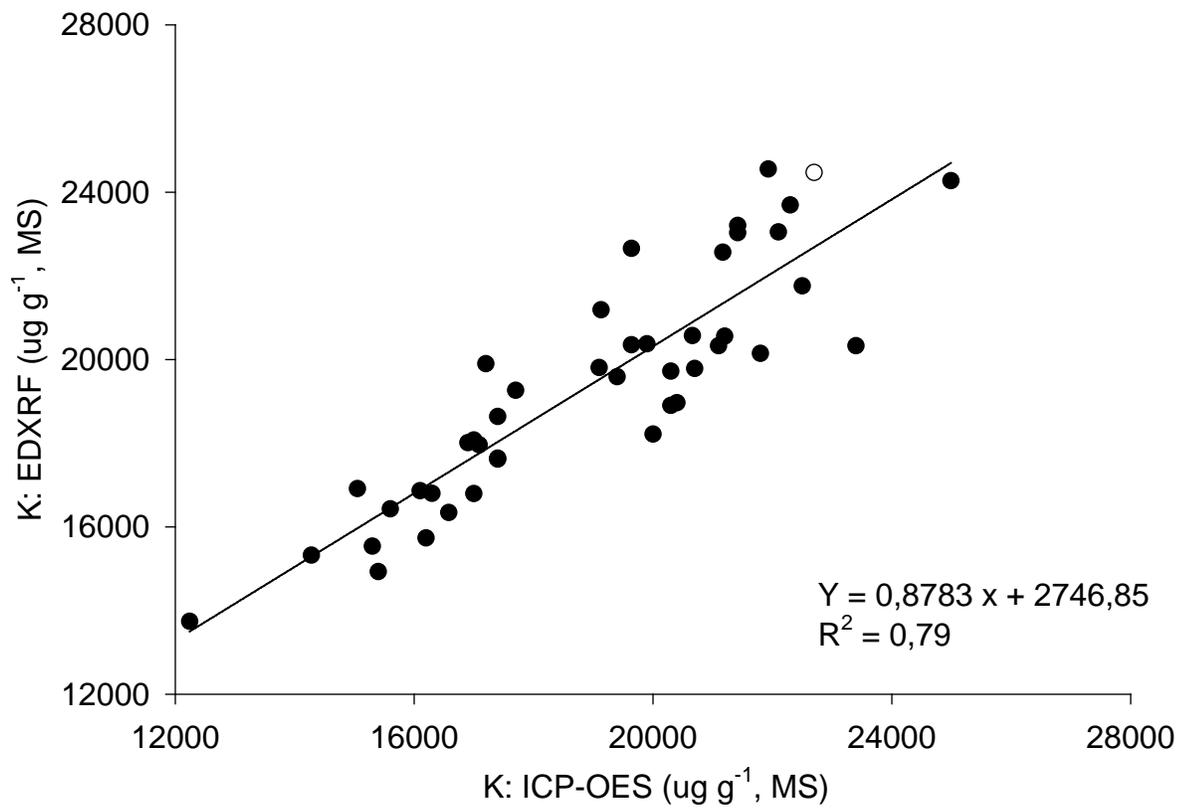


Figura 2 – Reta de padronização para o K obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

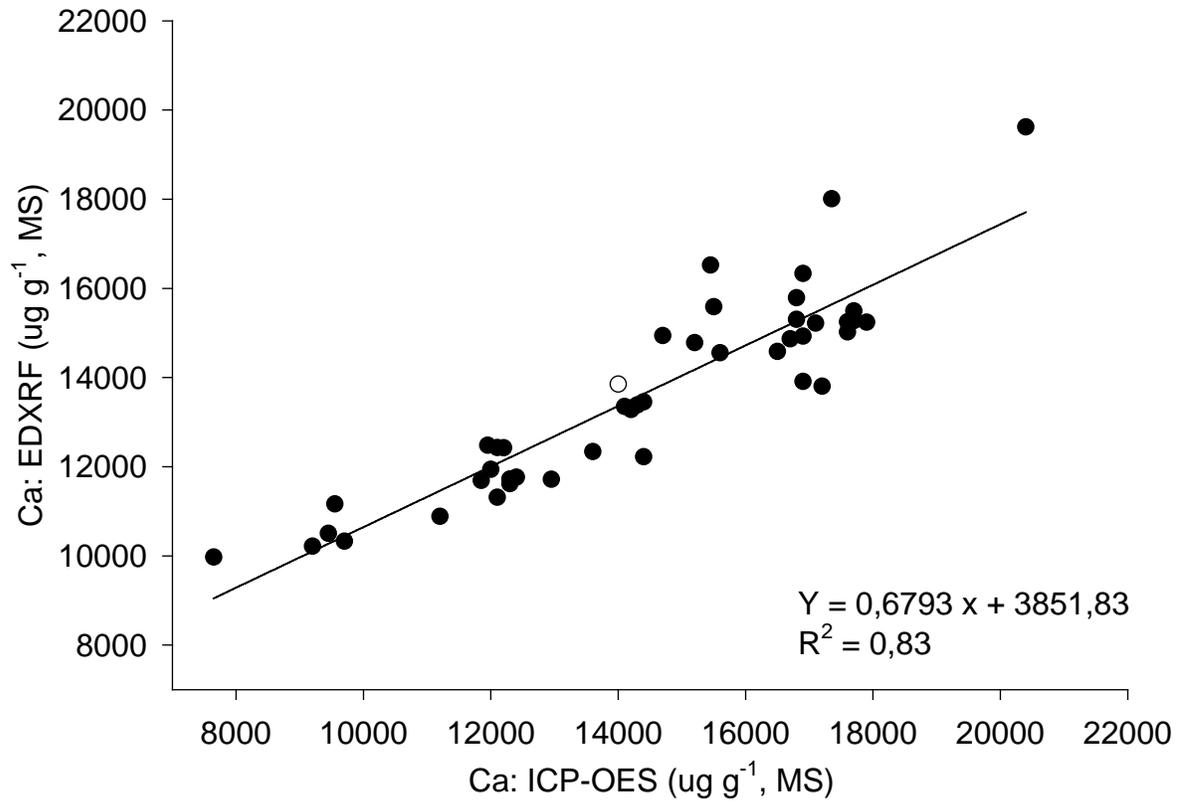


Figura 3 – Reta de padronização para o Ca obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

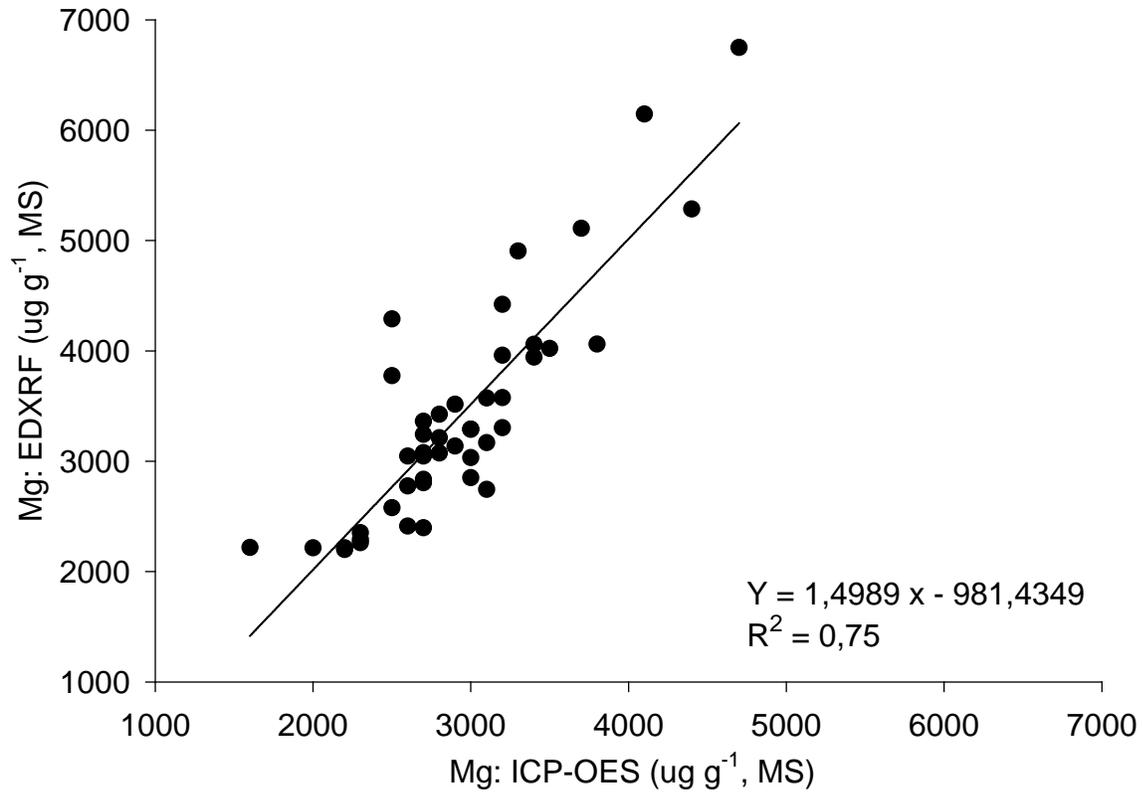


Figura 4 – Reta de padronização para o Mg obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

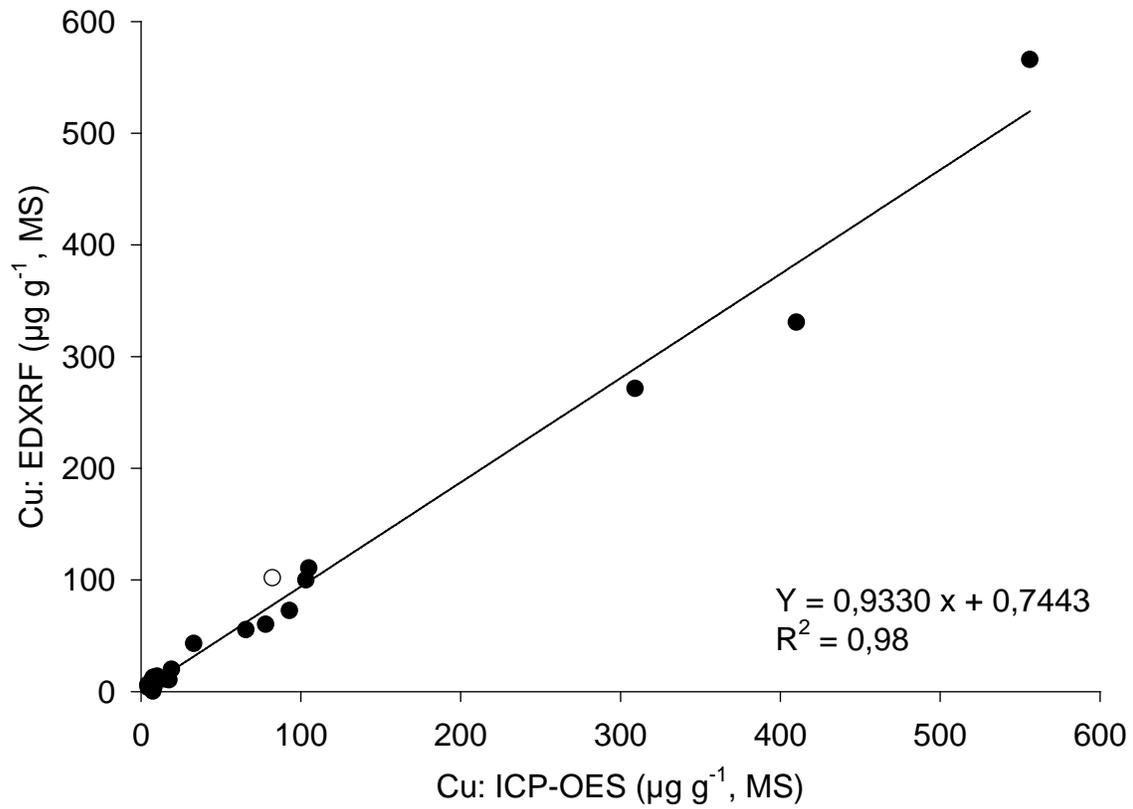


Figura 5 – Reta de padronização para o Cu obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

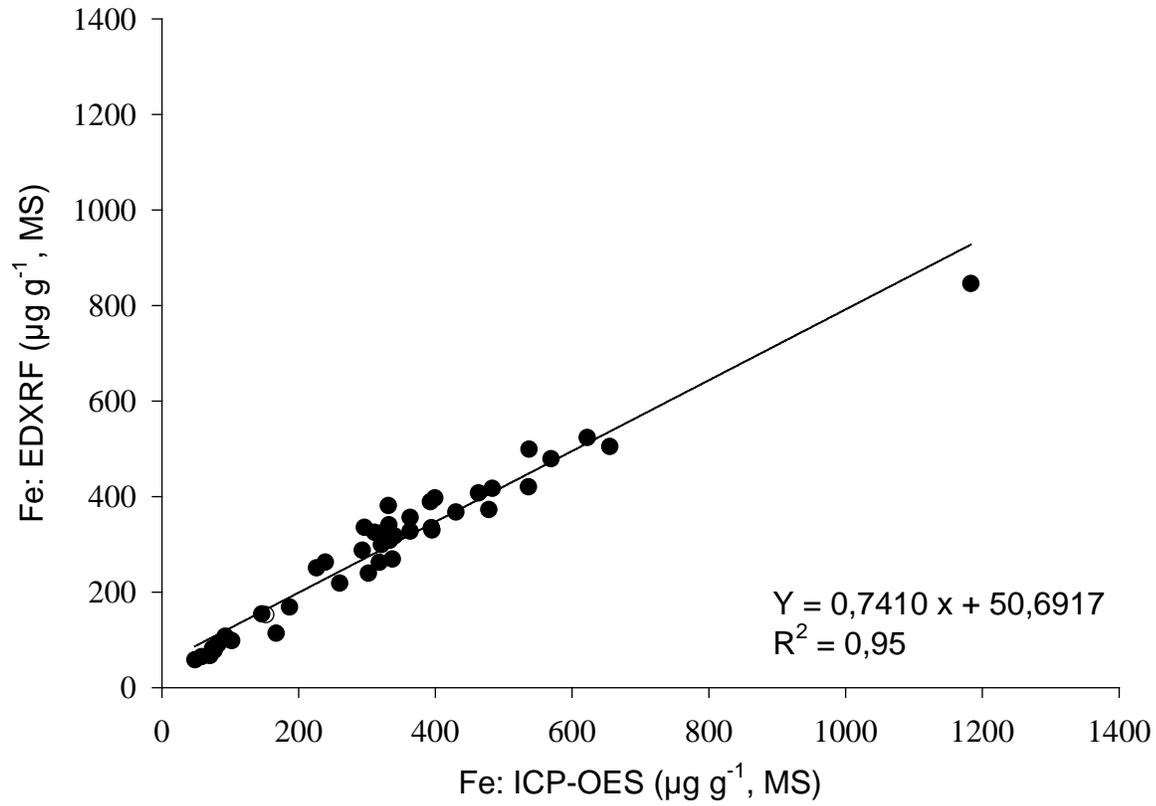


Figura 6 - Retas de padronização para o Fe obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

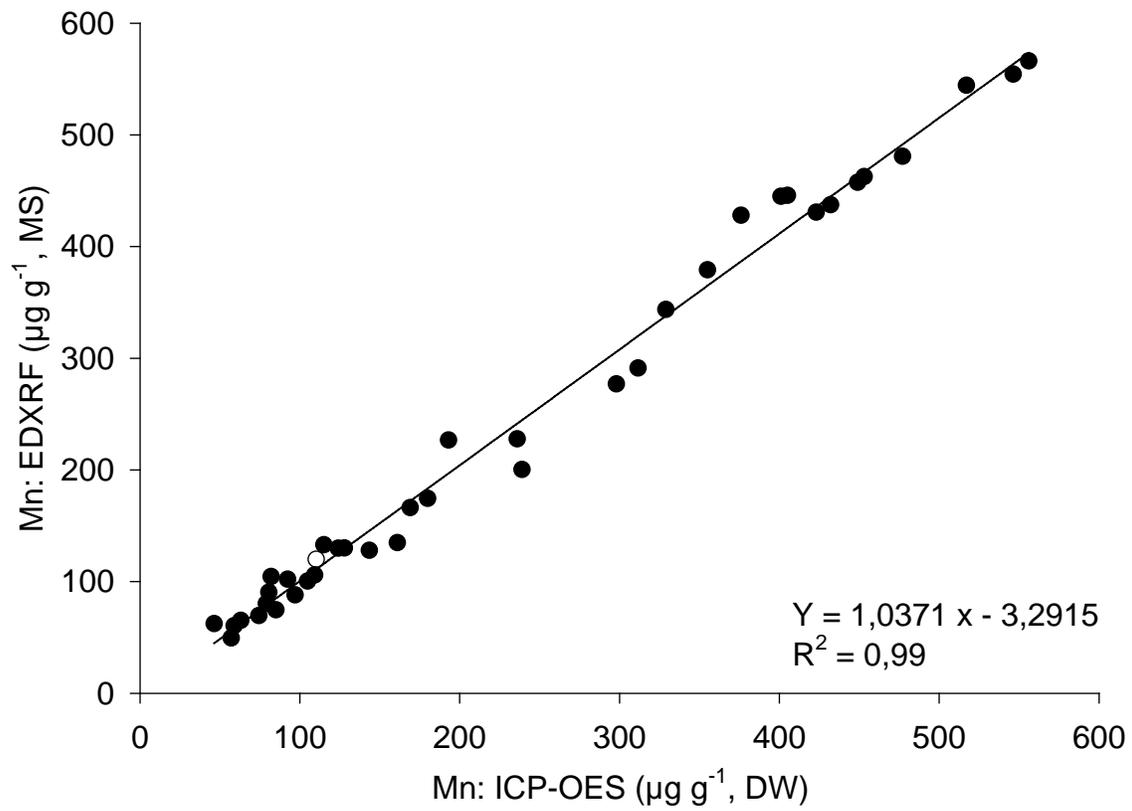


Figura 7 - Reta de padronização para o Mn obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

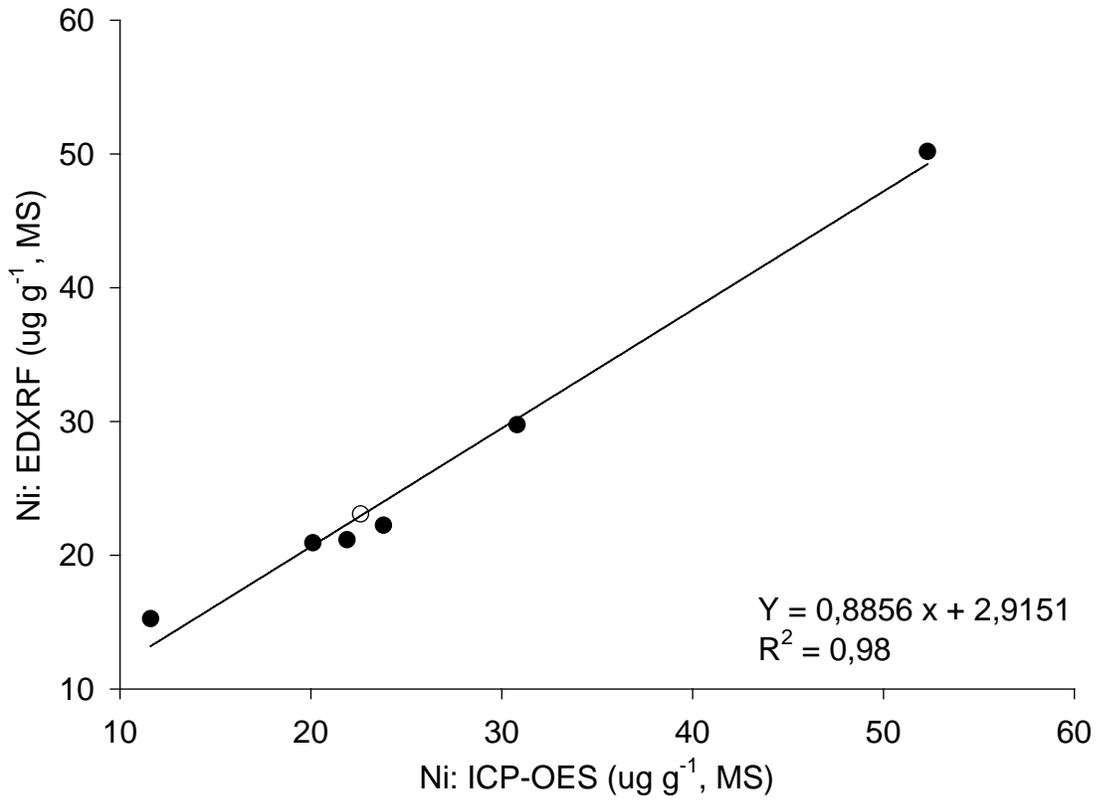


Figura 8 - Retra de padronização para o Ni obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

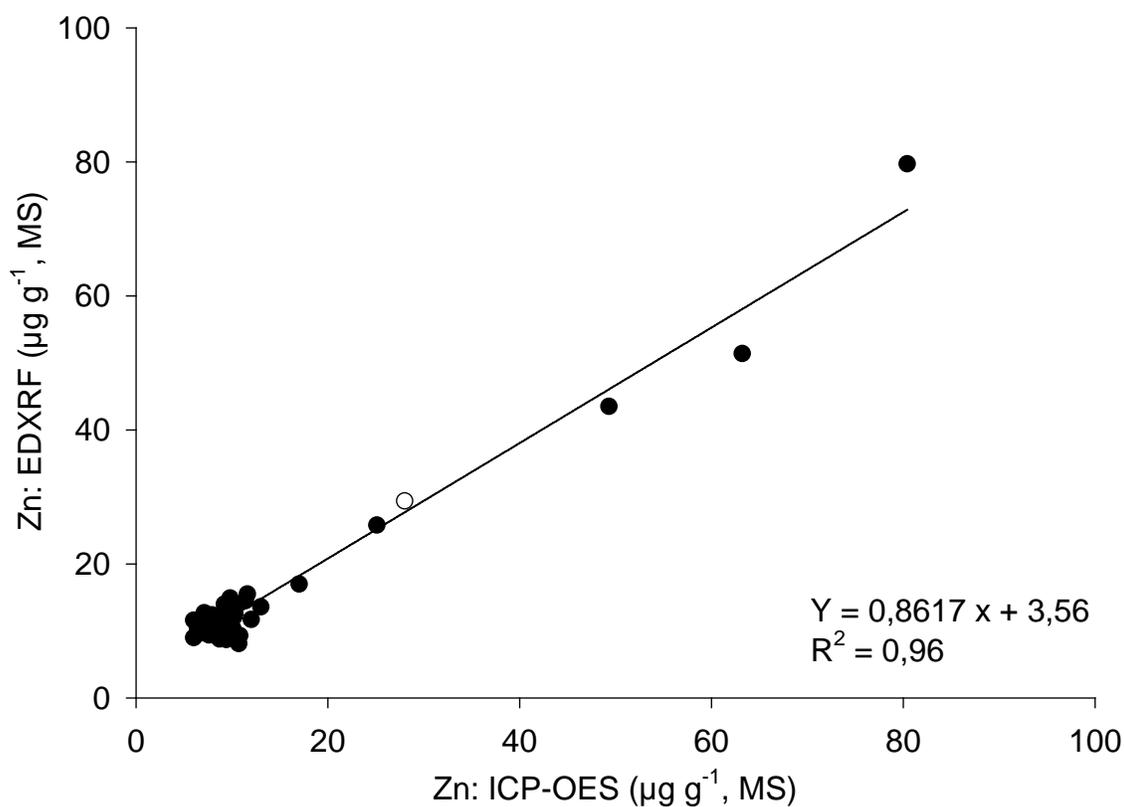


Figura 9 – Reta de padronização para o Zn obtida a partir da leitura das amostras padrão em EDXRF em razão do teor do elemento obtido em ICP-OES

2.4 Conclusões

O método de determinação por EDXRF permite quantificar os teores de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para o diagnóstico nutricional de plantas.

Os padrões obtidos por ICP-OES e o material foliar de referência certificado são adequados para a validação do método de fluorescência de raios-X (EDXRF).

Referências

ASLAN, A., BUDAK, G., KARABULUT, A. The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca and Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey). **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, New York, v. 88, p. 423-431, 2004.

BARROS, C.B. de. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, jul./dez., 2002.

BUDAK, G.; KARABULUT, A. X-ray fluorescence analysis of Malachite ore concentrates in the Narman region. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 54, p. 985-988, 1999.

CARVALHO, M.L.; SILVEIRA, L.; CASIMIRO, A. Effects of cadmium on cation concentrations in sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.): application of EDXRF. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, p. 827-829, 2002.

CHUPARINA, E.V., GUNICHEVA, T.N. Nondestructive X-ray fluorescence determination of some elements in plant materials. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, vol. 58, No. 9, p. 856-861, 2003.

FIFIELD, F.W.; HAINES, P.J. **Environmental analytical chemistry**. Oxford: Blackwell Science, 2000. 512 p.

GRATAO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p. 321-333, 2008.

MAITY, J.P.; KAR, S.; CHAKRABORTY, A.; SUDERSHAN, M.; SANTRA, S.C. Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Lousanne, v. 283, n. 1, p. 225-230, 2010.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Fosfato, 1997. 238 p.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantification of metals in vegetal material. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 362-372, 2009.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; CARVALHO, M.L.; HIDALGO, M. Comparasion of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 549, p. 197-204, 2005.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistic and chemometrics for analytical chemistry**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000. 288 p.

NECEMER, M.; KUMP, P.; SCANCAR, J.; JACIMOVIC, R.; SIMCIC, J.; PELICON, P.; BUDNAR, M.; JERAN, Z.; PONGRAC, P.; REGVAR, M.; VOGEL-MIKUS, K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. **Spectrochimica Acta**. Part B, Oxford, v. 63, p. 1240-1247, 2008.

NODA, T.; TSUDA, S.; MORI, M.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; KIM, S-J.; HASHIMOTO, N.; YAMAUCHI, H. Determination of the phosphorus content in potato starch using an energy-dispersive X-ray fluorescence method. **Food Chemistry**, London, v. 95, p. 632-637, 2006.

OLIVEIRA, A.L. de; ALMEIRA, E. de; SILVA, F.B.R. da; NASCIMENTO FILHO, V.F. Elemental contents in exotic brazilian tropical fruits evaluated by energy dispersive x-ray fluorescence. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p.82-84, 2006.

ORESCANIN, V.; KATUNAR, A.; KUTLE, A.; VALKOVIC, V. Heavy metals in soil, grape and wine. **Journal of Trace and Microprobe techniques**, New York, v. 21, n. 1, p. 171-180, 2003.

QUERALT, I.; OVEJERO, M.; CARVALHO, M.L.; MARQUES, A.F.; LLABRÉS, J.M. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques. **X-Ray Spectrometry**, London, v. 34, p. 213-217, 2005.

RAIJ, B van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. 285 p. (IAC. Boletim Técnico, 100).

3 CÁDMIO, NÍQUEL E ZINCO EM CAFFEEIRO: DISTRIBUIÇÃO, EFEITO NO ESTADO NUTRICIONAL E PRODUTIVIDADE

Resumo

Cada vez mais se torna importante obter informações sobre a absorção e distribuição de metais pesados tóxicos, especialmente cádmio (Cd), níquel (Ni) e zinco (Zn), nos diferentes órgãos do cafeeiro, uma vez que o uso de fontes antrópicas é uma prática crescente no programa de fertilização dos cafezais. Portanto, avaliou-se a distribuição de Cd, Ni e Zn em ramos, folhas e frutos, assim como seus efeitos no estado nutricional e na produtividade dos cafeeiros cultivados em condições de campo. A aplicação de Cd, Ni e Zn não afeta o estado nutricional, mas Cd reduz a concentração foliar de N, enquanto o Zn diminui a concentração foliar de P. O Zn e o Cd acumulam, preferencialmente, nos ramos e o Ni nas folhas. A produtividade média do cafeeiro é afetada pela aplicação da maior dose de Zn e Cd.

Palavras-chave: Macronutrientes; Micronutrientes; Acúmulo de metais pesados; Amadurecimento de fruto

Abstract

Becomes increasingly important to obtain information on absorption and distribution of toxic heavy metals, especially cadmium (Cd), nickel (Ni) and zinc (Zn) in plant parts of coffee, since the use of anthropogenic sources is a growing practice in fertilization programs of coffee farmers. Therefore, we evaluated the distribution of Cd, Ni and Zn in stems, leaves and fruits as well as their effects on nutritional status and productivity of coffee plants grown under field conditions. Application of Cd, Ni and Zn did not affect the nutritional status of coffee plants but Cd reduces N leaf concentration, whereas Zn concentration decreases P leaf. Zn and Cd accumulated preferentially in the branches and Ni in the leaves. Coffee yield is affected by the application of the highest dose of Zn and Cd

Keywords: Macronutrients; Micronutrients; Heavy metals accumulation; Fruit ripening

3.1 Introdução

Os metais pesados estão entre os principais contaminantes ambientais e são originados principalmente da intensa atividade agroindustrial. O acúmulo desses metais nos solos e nas plantas, especialmente cádmio (Cd), níquel (Ni) e zinco (Zn),

representam riscos para a saúde humana e para os ecossistemas, uma vez que podem entrar na cadeia alimentar (solo-planta-homem ou solo-planta-animal-homem) (McLAUGHLIN; PARKER; CLARKE, 1999; SILVA et al., 2005).

Em razão dos vários problemas que os metais pesados podem causar às plantas e, por consequência, ao homem, tem sido muito grande a quantidade de informações obtidas em estudos com plantas nos últimos anos. Apesar disso, em cafeeiro, poucos trabalhos têm estudado a absorção e distribuição de metais pesados tóxicos entre os diferentes órgãos da planta. Tais informações são importantes, uma vez que o uso de fontes antrópicas em cafezais é uma prática crescente no programa de fertilização, para complementar a adubação, reduzir o uso de fertilizantes químicos e, conseqüentemente, o custo da adubação.

Muitas especulações existem em relação aos efeitos dos altos teores de metais pesados, presentes nos resíduos industriais e urbanos ao cafeeiro (MARTINS; CAMARGO; BATAGLIA, 2005; PIRES; MATTIAZZO; BERTON, 2004; ANDRADE; SILVEIRA; MAZZAFERA, 2010), porém, são poucos os trabalhos publicados sobre o efeito tóxico desses elementos nos cafeeiros (PAVAN; BINGHAM, 1982; MAZZAFERA, 1998; FRANCO; MIGLIORANZA; FONSECA, 2004). Alguns estudos sobre o efeito de metais nesta espécie têm sido feitos em células em suspensão, no entanto este método não permite extrapolação dos dados para a planta nas condições de campo (GOMES-JÚNIOR et al., 2006a, 2006b, 2007; BOTTCHEER et al., 2010).

Na formação de mudas de Catuaí Vermelho (*Coffea arabica* L.) com biossólido observou acúmulo de Cr, Co, Ni, Pb, Cu e Zn principalmente nas raízes, enquanto o Mn acumulou nas folhas (FRANCO; MIGLIORANZA; FONSECA, 2004). O emprego de biossólidos na fertilização de cafeeiros em produção não prejudicou a qualidade da bebida (MARTINS; CAMARGO; BATAGLIA, 2005), entretanto, no referido trabalho, não foram realizadas avaliações sobre os locais de acúmulo dos metais pesados na planta.

Geralmente, o processo de acúmulo de metais pesados nas plantas consiste principalmente na absorção deste pelas raízes, transporte via xilema e distribuição para a parte aérea em tecidos drenos de metais (CLEMENS; PALMGREN; KRÄMER, 2002). Porém, vários trabalhos têm demonstrado que a absorção e distribuição de metais em plantas variam conforme a espécie estudada. Em arroz, o maior acúmulo de Cd ocorreu

nas raízes, na base do perfilho e nas regiões dos nós, a qual foi sugerida como o principal passo na translocação de Cd na planta (FUJIMAKI et al., 2010). Em milho, Cd e Zn acumularam preferencialmente no sistema radicular em relação à parte aérea, e pouco acumulou no grão. Já para girassol e fumo, as folhas foram o maior dreno de Cd. Para o Zn, em girassol, a distribuição foi semelhante entre raiz, colmo, folhas e grãos. Em fumo, o Zn acumulou principalmente nas folhas em relação ao colmo, enquanto raízes e flores apresentaram teores semelhantes (FÄSSLER et al., 2010). Em cafeeiro, caule e raiz foram os órgãos que mais acumularam Zn (PEDROSA, 2008).

Em *Evodiopanax innovans*, Takenaka, Kobayashi e Kanaya (2009) observaram maior acúmulo de Cd e Zn na casca da planta do que no limbo foliar. Já em *Rubus ulmifolius*, Marques et al. (2009) observaram que a raiz foi o tecido em que mais acumulou As, Pb e Ni.

Entretanto, muito dos trabalhos que estudaram a distribuição de metais em plantas foram realizados em mudas cultivadas em casa-de-vegetação em substrato ou em solução nutritiva e os resultados obtidos nem sempre são aplicados às plantas cultivadas em condições de campo, em razão dos fatores bióticos e abióticos exercerem forte influência no crescimento e na fisiologia da planta. Ainda, outros estudos que empregam bio sólidos como fonte de contaminação desconsideram a quantidade de matéria orgânica, o que pode interferir nos resultados, pela formação de complexos com os metais.

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a distribuição de Cd, Ni e Zn em ramos, folhas e frutos, assim como os efeitos da aplicação desses metais no estado nutricional e na produtividade dos cafeeiros cultivados em condições de campo.

3.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido de dezembro de 2007 a agosto de 2009 na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil. A área situa a 22°42' de latitude Sul e 47°38' de longitude Oeste e 580 m de altitude, em solo classificado como Nitossolo Vermelho, Eutroférico, latossólico, textura argilosa e

declividade média de 2%. De acordo com a classificação de Koppen o clima regional é do tipo Cwa, tropical de altitude com inverno seco, temperatura média anual de 22°C e precipitação pluvial média de 1280 mm anuais.

Nesta pesquisa foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20 com sete anos de idade, no espaçamento 3,4 m x 0,9 m (3.270 plantas ha⁻¹). O controle de pragas e doenças foi feito de acordo com técnicas agrônômicas recomendadas para esta cultura.

Como são raras as informações sobre teores de contaminação por metais pesados em solos brasileiros cultivados foi utilizado, na presente pesquisa, os teores de Cd, Ni e Zn propostos por Abreu et al. (2005). Para estes autores os níveis tóxicos determinados com extrator DTPA variam entre 150 a 452 mg dm⁻³ para o Zn, 30 a 65 mg dm⁻³ para o Ni e de 1 a 3 mg dm⁻³ para o Cd, para solos do Estado de São Paulo.

Para o cálculo da dose de metais pesados aplicado por planta considerou o volume de 1000 dm³, obtido pelo produto entre a área da projeção da copa de cada planta (2 m²) e a exploração radicular até 0,5 m de profundidade, região onde concentra a maior parte das raízes do cafeeiro (GINDEL, 1961; HUXLEY et al., 1974).

Assim, com base no exposto foram aplicadas as seguintes doses: 0, 15, 45 e 90 g planta⁻¹ para o Cd; 0, 35, 105 e 210 g planta⁻¹ de Ni; e 0, 100, 300 e 600 g planta⁻¹ de Zn. As doses foram parceladas em três aplicações, no início do experimento (18/12/2007), aos 63 dias (19/02/2008) e aos 95 dias (22/03/2008). As quantidades de cada metal foram aplicadas na forma de sulfato, as quais foram solubilizadas em 10 L de água e distribuiu 5 L sob a copa do cafeeiro de cada lado da planta voltada para a entrelinha. A aplicação foi feita lentamente permitindo a infiltração da solução no solo.

Em 17/01/2008, após 30 dias da aplicação dos metais foram fornecidos calcário e fertilizantes nas seguintes quantidades: 3.500 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico, para elevar a saturação de bases a 60% e 1.500 kg ha⁻¹ da formulação 20-00-20, que equivale a 300 kg ha⁻¹ de N e K₂O.

Aos 136 dias (24/04/2008) após o início dos tratamentos foram realizadas amostragens de solo na profundidade de 0-20 cm, para determinação do pH; matéria orgânica (g dm⁻³); P (mg dm⁻³); K, Ca, Mg, Al+H, CTC (mmol_c dm⁻³); B, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd e Ni (mg dm⁻³). Para avaliar a distribuição de Cd, Ni e Zn no perfil do solo foram

coletadas amostras em cinco profundidades: nos primeiros 5 cm; 5-15 cm; 15-25 cm; 25-50 cm; e 50-100 cm. Todas as amostras foram retiradas nos dois lados da planta voltados para a entrelinha e misturadas para formar uma amostra composta por tratamento. As análises foram realizadas no Centro de Solos do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), de acordo com a metodologia proposta por Raij et al. (2001).

As amostras do terceiro par de folhas do terço médio do cafeeiro foram coletadas na primeira aplicação de metais e após 35 dias, 63 dias e 128 dias. Os ramos foram coletados na primeira aplicação de metais e após 128 dias. O material foi seco em estufa a 60 °C por 72 horas e posteriormente, moídas para a quantificação de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Ni por difração de Raio-X (EDXRF, Shimadzu, São Paulo) e Cd por espectrometria de emissão por plasma (ICP-OES; JobinYvon, JY50P Longjumeau, France) no Centro de Solos do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

A colheita foi feita aos 210 dias após a aplicação quando as plantas, por meio da avaliação visual, apresentavam predominantemente frutos cereja. Após a colheita determinou-se a massa de frutos verde, cereja e seco em amostra de 0,5 kg e o resultado foi expresso em porcentagem da massa total de frutos. Os frutos colhidos foram secos em terreiro até umidade de 110 g kg⁻¹ (11%), beneficiados e avaliados a massa dos grãos.

Após digestão nitro-perclórica dos grãos (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997) determinou-se nos extratos os teores de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Zn, Mn, Ni e Cd por espectrometria de emissão por plasma (ICP-OES; JobinYvon, JY50P Longjumeau, France).

3.3 Resultados e discussão

A textura do solo da área experimental é classificada como muito argilosa (Tabela 1). Em relação aos resultados da análise química, considerando as classes de fertilidade do solo adequadas ao cultivo do cafeeiro, no início da aplicação dos tratamentos, em dezembro de 2007, o solo apresentava nos primeiros 20 cm os seguintes valores: 25,3 g dm⁻³ de matéria orgânica; acidez muito alta (pH em CaCl₂ igual a 3,7); teor alto de P (50,1 mg dm⁻³); muito alto de K (6,3 mmol_c dm⁻³); alta acidez

potencial (H+Al, 73,9 mmol_c dm⁻³). Além disso, também apresentava teor alto de Ca (13,9 mmol_c dm⁻³) e baixo teor de Mg (3,7 mmol_c dm⁻³) (RAIJ et al., 1997). Quanto aos micronutrientes, obteve-se teor baixo de B (0,2 mg dm⁻³) e teores muito alto de Cu (8,5 mg dm⁻³), Fe (58,7 mg dm⁻³), Mn (82,3 mg dm⁻³) e Zn (4,9 mg dm⁻³) (ABREU et al., 2005). Para o Cd (< 0,001 mg dm⁻³) e Ni (0,2 mg dm⁻³) (Tabela 2) os teores estão abaixo daqueles encontrados em solos não cultivados no Estado de São Paulo, cujos teores máximos encontrados foram iguais a 0,08 mg dm⁻³ e 1,85 mg dm⁻³ para Cd e Ni, nessa ordem (CANCELA, 2002).

Aos 136 dias após o início da aplicação dos metais e aos 106 dias depois da calagem e da fertilização (300 kg ha⁻¹ N e K₂O) observou no tratamento controle (sem metais) aumento do pH, dos teores de Ca e Mg (mmol_c dm⁻³), da soma de bases e da saturação por bases (V %), enquanto para a acidez potencial (H+Al) houve redução. Porém, nos tratamentos em que foram aplicados os metais, mesmo tendo sido feito a calagem, não observou aumento do pH comparativamente ao controle, após a correção aos 136 dias (Tabela 2).

Tem sido observado que a aplicação de sais metálicos, especialmente em altas concentrações, possui efeito significativo sobre acidificação do solo (SPEIR et al., 1999), sendo que o decréscimo no pH foi associado com a lixiviação dos ácidos gerados pela oxidação de sulfetos em solos (KLAUS; WIEGAND, 2006). A origem da acidez dos solos pode ser explicada por três processos: (i) lixiviação de bases (Ca, Mg e K), que são substituídas por íons H⁺ e, principalmente, íons Al³⁺, os quais, em parte, passam para a solução do solo; (ii) processos de troca de cátions da solução do solo (K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺, principalmente), durante a absorção radicular, por íons H⁺; e (iii) utilização de cloreto de potássio durante a adubação, o qual aumenta os teores de Al e Mn, componentes da acidez do solo de acordo com Malavolta (1993), citado por Salgado et al. (2006). De modo geral, aos 136 dias após a aplicação dos metais não foram observados grandes alterações dos teores no solo de matéria orgânica, P, K, B e Cu em relação ao controle. Entretanto, o fornecimento de 600 g planta⁻¹ de Zn reduziu em, aproximadamente, 50 % o teor de P nos primeiros 20 cm de profundidade (Tabela 2).

Com relação aos micronutrientes, 136 dias depois das aplicações de 15, 35 e 100 g planta⁻¹ de Cd, Ni e Zn respectivamente, aumentaram o teor de Fe e Mn disponível no solo, comparado com o controle (Tabela 2). Com a aplicação de Cd, houve aumento dos teores disponíveis de Fe, porém, o mesmo não foi observado para o Mn, exceto na dose de 15 g planta⁻¹ (Tabela 2). Já o incremento da dose de Ni e Zn reduziram o teor disponível de Mn, exceto nas menores doses (35 e 100 g planta⁻¹ de Ni e Zn, nessa ordem) e somente com a aplicação de 600 g planta⁻¹ de Zn reduziu o teor disponível de Fe para um nível menor que o controle (Tabela 2).

Apesar da aplicação dos metais no solo proporcionar redução de alguns nutrientes, aos 136 dias os teores de B (0,5 a 1,0 mg dm⁻³), Cu (4,7 a 8,5 mg dm⁻³), Fe (25,3 a 58,7 mg dm⁻³), Mn (29,5 a 80,5 mg dm⁻³) e Zn (3,9 a 328,2 mg dm⁻³) ficaram próximos as classes de teores médio e alto, conforme interpretação de resultados de análise de solo (RAIJ et al., 1997; RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ V., 1999). Portanto, nenhum micronutriente foi limitante ao desenvolvimento do cafeeiro durante a condução do experimento, o que justifica a ausência de sintomas visuais de deficiência, mesmo após a aplicação de doses elevadas desses metais.

Tabela 1 - Resultado da análise física das frações minerais do solo da área experimental nos primeiros 20 cm de profundidade

| Areia 2 – 0,05 mm | Silte 0,05 – 0,002 mm | Argila < 0,002 mm | Classe de textura |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|
| -----g kg ⁻¹ ----- | | | |
| 299 | 76 | 625 | Muito argilosa |

(CAMARGO et al., 1986)

Tabela 2 – Resultado da análise química do solo da área experimental nos primeiros 20 cm de profundidade, em razão da aplicação de doses crescentes de Cd, Ni e Zn

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | pH CaCl ₂ | MO g dm ⁻³ | P mg dm ⁻³ | K | Ca | Mg | H+Al mmol _c dm ⁻³ | SB | T | V % | B | Cd mg dm ⁻³ | Cu | Fe | Mn | Ni | Zn |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|-------------|-------------|--------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|------------|---------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Controle | 0 dias | 3,7 | 25,3 | 50,1 | 6,3 | 13,9 | 3,7 | 73,9 | 23,9 | 97,8 | 24,4 | 0,2 | <0,001 | 8,5 | 58,7 | 82,3 | 0,2 | 4,9 |
| | 136 dias | 5,0 | 27,3 | 66,0 | 5,5 | 49,6 | 16,4 | 36,7 | 71,5 | 108,4 | 65,0 | 0,5 | 0,2 | 6,5 | 31,6 | 63,0 | 0,3 | 12,4 |
| Cd | 15 | 4,2 | 23,3 | 65,7 | 4,3 | 22,0 | 4,7 | 60,0 | 31,0 | 91,3 | 33,9 | 0,5 | 37,8 | 6,7 | 58,7 | 80,5 | 0,6 | 3,9 |
| | 45 | 4,8 | 23,0 | 52,0 | 3,5 | 30,0 | 8,0 | 49,3 | 41,5 | 123,1 | 33,7 | 1,0 | 95,7 | 4,7 | 39,7 | 50,9 | 0,9 | 6,9 |
| | 90 | 4,0 | 27,0 | 64,0 | 4,5 | 16,3 | 4,3 | 74,7 | 25,1 | 99,4 | 25,3 | 0,7 | 124,3 | 6,0 | 44,3 | 63,5 | 0,3 | 7,0 |
| Ni | 35 | 4,7 | 22,7 | 68,7 | 4,9 | 16,0 | 4,0 | 47,7 | 24,9 | 103,6 | 24,1 | 0,5 | 0,1 | 7,0 | 51,7 | 75,3 | 43,2 | 9,6 |
| | 105 | 4,5 | 21,3 | 52,0 | 4,6 | 20,7 | 6,0 | 47,3 | 31,3 | 78,7 | 39,8 | 0,5 | 0,1 | 5,2 | 32,0 | 50,4 | 116,0 | 10,0 |
| | 210 | 4,1 | 22,3 | 54,3 | 5,8 | 23,3 | 5,3 | 67,3 | 34,4 | 101,5 | 33,9 | 0,7 | 0,1 | 6,4 | 33,3 | 43,3 | 133,1 | 9,3 |
| Zn | 100 | 4,7 | 24,0 | 70,7 | 5,3 | 36,7 | 12,7 | 49,0 | 54,7 | 103,7 | 52,7 | 0,5 | 0,2 | 7,0 | 47,7 | 76,3 | 0,2 | 115,6 |
| | 300 | 4,2 | 22,7 | 67,0 | 5,1 | 22,0 | 9,0 | 70,0 | 36,1 | 105,8 | 34,1 | 0,7 | 0,2 | 8,5 | 38,3 | 53,4 | 0,2 | 193,3 |
| | 600 | 4,6 | 22,3 | 27,3 | 4,4 | 25,3 | 5,3 | 54,7 | 35,0 | 90,0 | 39 | 0,5 | 0,7 | 4,9 | 25,3 | 29,5 | 0,3 | 328,2 |

A determinação do valor absoluto (teor total) de metais pesados no solo para monitoramento da poluição ambiental fornece informações inadequadas para a interpretação dos limites máximos permitidos de cada elemento, pois excluem as influências de atributos químicos, físicos e biológicos, que afetam a biodisponibilidade (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

A distribuição dos metais pesados no perfil do solo em razão da aplicação de Cd, Ni e Zn são apresentadas nas figuras 1A, 1B e 1C, respectivamente. De modo geral, os teores de metais apresentaram menor disponibilidade com o aumento da profundidade, sendo maiores nas amostras coletadas próximo a superfície do solo, sobretudo nos primeiros 25 cm de profundidade, o que demonstra uma baixa mobilidade destes elementos no perfil, provavelmente pela influência do elevado teor de argila e maior quantidade de matéria orgânica. Distribuições de metais semelhantes foram observadas por Iwegbue et al. (2010), em que os teores de metais reduziram com o aumento da profundidade.

De acordo com Gindel (1961) e Huxley et al. (1974), a maior concentração de raízes do cafeeiro encontram-se até 50 cm de profundidade. Em cafeeiro Bourbon Amarelo e Mundo Novo o sistema radicular distribui além de 2 m de profundidade, embora 90% das raízes estão localizadas nos primeiros 50 cm (INFORZATO; REIS, 1963). Desta forma, de acordo com a figura 1 a movimentação dos metais ocorreu até essa profundidade, permitindo pleno contato das raízes do cafeeiro com os metais aplicados.

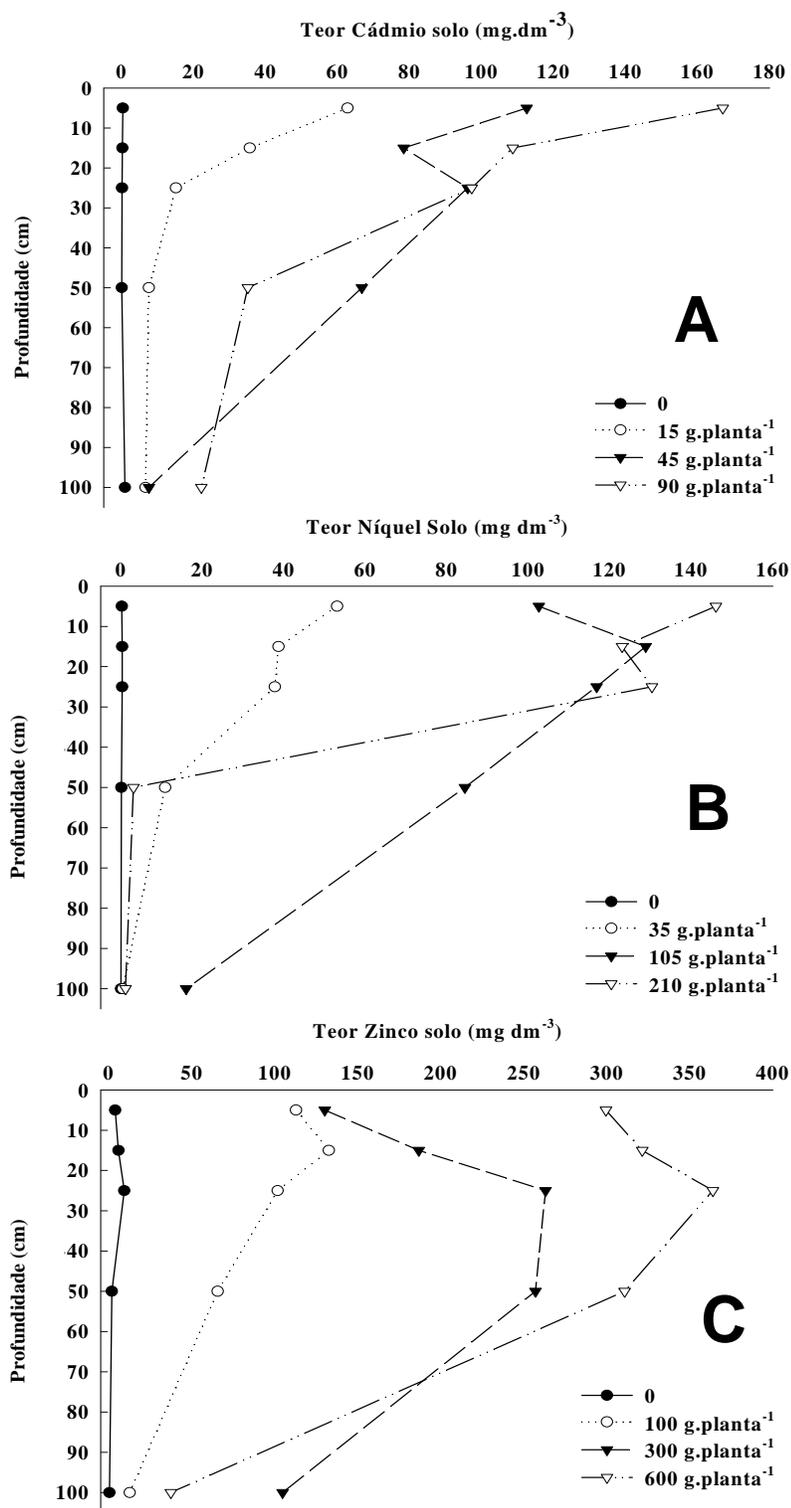


Figura 1 – Teores de cádmio (A), níquel (B) e zinco (C) no perfil do solo após 136 dias da aplicação

A análise da distribuição dos metais no perfil do solo mostrou que quanto maior a quantidade aplicada, maior o teor na camada superior, porém na camada mais profunda os teores tendem a se igualar, independente da quantidade aplicada. No entanto, enquanto havia queda gradual nas quantidades de Cd e Ni das camadas superiores para as inferiores, o Zn apresentou maior acúmulo na profundidade de 15-25 cm. Cd e Ni apresentaram maior acúmulo nos primeiros 5 cm.

Embora o Zn seja móvel na maioria dos solos, a fração de argila e o teor de matéria orgânica são capazes de adsorver o Zn fortemente, especialmente em solos calcareados (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; PEGANOVA; EDLER, 2004). Calcula-se que a fração argilosa retém mais de 60% do Zn distribuído nos solos (KABATA-PENDIAS; KRAKOWIAK, 1995). Além disso, hidróxidos de Al, Fe, e Mn são importantes na retenção do Zn em alguns solos, como da presente pesquisa. Os silicatos, carbonatos, fosfatos e óxidos também podem contribuir na retenção de metais no perfil do solo (McBRIDE; SAÚVE; HENDERSHOT, 1997).

Os teores disponíveis de Cd extraídos por DTPA na camada de 20 cm foram iguais a 37,8 mg dm⁻³; 95,7 mg dm⁻³ e 124,3 mg dm⁻³ em razão da aplicação de 15, 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd, respectivamente (Tabela 2). Os teores obtidos foram 30 a 100 vezes superiores aos reportados por vários trabalhos (ABREU et al., 2005; ALLOWAY, 1995; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 2005). Os valores de Cd apresentados na presente pesquisa são maiores que os limites máximos determinados pela CETESB (2005), para áreas agrícolas onde existe necessidade de intervenção (Tabela 3).

Para Ni, os teores disponíveis (extrator DTPA) foram iguais a 43,2 mg dm⁻³; 116,0 mg dm⁻³; e 133,1 mg dm⁻³ em função da aplicação de 35, 105 e 210 g planta⁻¹ de Ni, respectivamente. Na aplicação de 35 g planta⁻¹ de Ni constatou uma elevação no teor disponível para 35,1 mg dm⁻³ (Tabela 2), quantidade inferior ao apresentado por Abreu et al. (2005), os quais encontraram em solos do Estado de São Paulo teor disponível até 65 mg dm⁻³ de Ni. Entretanto, com a aplicação de 105 e 210 g planta⁻¹ de Ni os teores disponíveis na presente pesquisa foram elevados até próximo do limite máximo do teor total sugeridos por Kabata-Pendias e Pendias (2001), Alloway (1995) e CETESB (2005) (Tabela 3). Assim, esperava-se que a partir da aplicação de 105 g

planta⁻¹ de Ni, os cafeeiros apresentariam sintoma de toxidez, fato que não foi observado nas plantas utilizadas nesta pesquisa.

A aplicação de 100, 300 e 600 g planta⁻¹ de Zn elevou os teores disponíveis (extrator DTPA) no solo para 115,6 mg dm⁻³; 193,3 mg dm⁻³; e 328,2 mg dm⁻³, respectivamente (Tabela 2). No entanto, a maior quantidade de Zn aplicada não elevou o teor disponível além daquele apresentado por Abreu et al. (2005) em amostras de solos do Estado de São Paulo, cujo teor máximo foi igual a 452 mg dm⁻³ (Tabela 3).

Tabela 3 – Teores de metais pesados extraídos por DTPA nos solos brasileiros comparados com os limites máximos dos teores totais sugeridos pela CETESB (2005), por Alloway (1995) e por Kabata Pendias e Pendias (2001)

| Elemento | São Paulo, Brasil* | Outros estados Brasil* | CETESB (2005) | USA ** | Europa ** | Kabata-Pendias e Pendias (2001) |
|----------|---------------------------------------|---------------------------|------------------|--------|-----------|------------------------------------|
| | ----- DTPA, mg dm ⁻³ ----- | | | | | |
| Cd | 1 - 3 | 1 - 3 | 3 | 20 | 1 - 3 | 3 - 8 |
| Ni | 30 - 65 | 30 | 70 | 210 | 30 - 75 | 100 |
| Zn | 150 - 452 | 70 - 452 | 450 | 1400 | 150 - 300 | 400 - 700 |

* Abreu et al. (2005); ** Alloway (1995)

Os resultados da análise da folha diagnose (3º par de folhas), folhas novas (1º par de folhas) e dos ramos plagiotrópicos do cafeeiro, realizadas 128 dias após a aplicação dos tratamentos estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

De acordo com Raij et al. (1997), para a avaliação do estado nutricional do cafeeiro são considerados teores adequados na folha diagnose para o N (26-32 g kg⁻¹); P (1,2-2,0 g kg⁻¹); K (18-25 g kg⁻¹); Ca (10-15 g kg⁻¹); Mg (3,0-5,0 g kg⁻¹); e S (1,5-2,0 g kg⁻¹).

Os cafeeiros que receberam a aplicação de Ni e Zn, bem como o controle, aos 128 dias apresentaram teor de N na folha diagnose (Tabela 4) dentro da faixa adequada proposta por Raij et al. (1997) independente da dose aplicada. Porém, a aplicação do Cd reduziu o teor de N foliar, abaixo daquela considerada adequada em razão da aplicação de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd. O Cd afeta a absorção de nitrato, que por sua vez resulta em menor atividade da enzima redutase do nitrato, com prejuízo para o metabolismo do nitrogênio (BOUSSAMA et al., 1999; HERNANDEZ et al., 1997). Além disso, as enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase são sensíveis ao Cd, enquanto a glutamato desidrogenase mostra um aumento substancial de atividade sob a sua influência, o que ocasiona um acúmulo de amônio na planta (GOUJA et al., 2003).

Em relação às folhas novas (primeiro par de folhas) não houve redução do teor de N (Tabela 5), em que os valores foram superiores aos analisados na folha diagnose (Tabela 4), devido ao intenso metabolismo destas folhas, o qual foi atendido pela remobilização de compostos nitrogenados de outros órgãos do cafeeiro (LIMA FILHO; MALAVOLTA, 2003). Isto provavelmente ocorreu nas plantas em que houve restrição à absorção do N, pelo efeito tóxico do Cd às raízes (SALT et al., 1995), o que pode ser comprovado pela redução dos teores de Ca e B foliares (Tabela 5), em razão desses nutrientes serem imóveis no cafeeiro e os teores foliares dependerem basicamente da absorção radicular.

O teor de P reduziu com a aplicação de Cd e Zn, sendo que os valores encontrados estiveram abaixo da faixa adequada nas folhas diagnóstico (1,2-2,0 g kg⁻¹), para as aplicações de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd e 600 g planta⁻¹ de Zn (Tabela 4). Essa redução pode ser devido à maior redistribuição do P para atender os órgãos em

crescimento, em razão da menor absorção do elemento pelas raízes (LIMA FILHO; MALAVOLTA, 2003).

O resultado da análise das folhas novas (Tabela 5) demonstrou redução do teor de P foliar quando se aplicou Cd e Zn, os quais estiveram acima da faixa adequada proposta por Raij et al. (1997), bem como das folhas diagnóstico. Considerando que o teor disponível de P no solo estava acima do nível crítico (13 mg dm^{-3} , Tabela 2) estabelecido para culturas perenes (RAIJ et al., 1997), a redução do teor foliar de P nas folhas novas comparativamente ao controle pode ser explicada pela menor absorção do P pelas raízes afetadas pelo alto teor de Cd e Zn disponível no sistema radicular. O Cd no solo tem efeito negativo no crescimento e na atividade radicular (MITCHELL; FRETZ, 1977) e prejudica a capacidade das raízes em absorver água (CARLSON; BAZZAZ; ROLFE, 1975). Curiosamente o teor de P no ramo não sofreu alteração com a aplicação de Cd, Ni e Zn (Tabela 6).

Os teores de K, Ca, Mg e S não apresentaram grandes alterações nas folhas diagnóstico e no ramo plagiotrópico com a aplicação dos metais Cd, Ni e Zn (Tabelas 4 e 6). De modo geral, os teores de K e Mg na folha diagnóstico ficaram abaixo da faixa adequada (RAIJ et al., 1997), o que manifestou sintomas foliares de deficiência desses elementos nos cafeeiros. Com relação aos teores na folha nova, a aplicação de Cd levou a redução do teor foliar de K, Ca, Mg e S como consequência da aplicação de 15, 45 e 90 g planta^{-1} (Tabela 5). Há no mínimo dois mecanismos distintos que contribuem para a redução na absorção de macronutrientes e micronutrientes devido ao elemento Cd. O primeiro mecanismo físico-químico que se dá pelo tamanho do raio iônico do Cd ($1,03 \text{ \AA}$), o qual reduz a absorção do Zn ($0,83 \text{ \AA}$) e do Ca ($1,06 \text{ \AA}$) (YANG et al., 1996). Já o segundo mecanismo, se dá pela desordem no metabolismo celular, que resulta em alterações nas enzimas de membrana e na própria estrutura da membrana da célula radicular (PRASAD, 1995).

Na presente pesquisa, o teor de B não apresentou redução nas folhas diagnóstico, como consequência da aplicação de Cd, Ni e Zn (Tabela 4), permanecendo dentro da faixa adequada de $50 - 80 \text{ mg kg}^{-1}$ de B (RAIJ et al., 1997). Entretanto, nos resultados das análises das folhas novas, os teores de B foram menores que os valores observados para a folha diagnóstico (Tabela 5), com

decréscimo de B foliar no sentido da base para o ápice do ramo plagiotrópico, ou seja, da folha mais velha a folha mais nova, confirmando os resultados obtidos de Leite, Brown e Rosolem (2007).

Os resultados dos teores de Cu na folha diagnóstico e nas folhas novas (Tabela 4 e 5) ficaram dentro da faixa adequada para o cafeeiro de 10-20 mg kg⁻¹ de Cu (RAIJ et al., 1997). Somente na aplicação de Cd observou uma tendência de redução do teor de Cu nas folhas novas (Tabela 5), explicado pela redução da absorção, devido ao efeito tóxico do Cd no sistema radicular do cafeeiro. Os teores de Cu nos ramos foram, aproximadamente, duas vezes superiores aos teores deste nutriente encontrados nas folhas. Estes valores corroboram aqueles obtidos por Malavolta et al. (2002), que, também, observaram maiores teores desse micronutriente nos ramos de cafeeiro arábica. Provavelmente o ramo constitui um órgão de reserva de Cu para o cafeeiro.

Os teores de Fe não apresentaram alterações com a aplicação de Cd e Zn na folha diagnose, folhas novas e ramos (Tabelas 4, 5 e 6). Entretanto, a aplicação de Ni aumentou o teor desse micronutriente nas folhas novas (Tabela 5), contrário ao que foi observado por Mysliwa-Kurdziel, Prasad e Strzalka (2004), que relataram deficiência de Fe tanto pelo atraso na absorção ou pela imobilização do Fe no sistema radicular em razão da exposição ao Ni. Porém, o Ni pode substituir o Fe devido à similaridade dos seus raios iônicos (ALLOWAY, 1995), o que poderia disponibilizar o Fe para a solução do solo, possibilitando o aumento do teor de Fe disponível para absorção pelo cafeeiro. Os teores de Fe encontrados nas folhas diagnóstico de cafeeiros que receberam aplicação de Ni (Tabela 4) ficaram acima da faixa adequada de 50 – 200 mg kg⁻¹ de Fe indicada por Raij et al. (1997).

Para o Mn, a aplicação de Cd, Ni e Zn reduziu os teores na folha diagnóstico (Tabelas 4), porém os teores foliares encontrados ficaram na faixa considerada adequada 50 – 200 mg kg⁻¹ de Mn para o cafeeiro (RAIJ et al., 1997). Nas folhas novas (Tabela 5), houve redução do teor foliar de Mn somente nas aplicações com Cd e Zn, enquanto para o Ni, os teores foliares não foram alterados.

Com relação ao Zn, o teor nas folhas diagnóstico e nova nos tratamentos com Cd e Ni ficaram abaixo dos níveis considerados adequados para o cafeeiro (10 – 20 mg kg⁻¹ de Zn) (RAIJ et al., 1997). Porém, apesar do fornecimento de Zn em quantidades

muito acima daquelas recomendadas para o cafeeiro, os teores na folha diagnóstico só foram superiores à classe adequada com o fornecimento de 600 g planta⁻¹ de Zn. Entretanto, no ramo houve um acúmulo acentuado a partir da aplicação de 300 g planta⁻¹ de Zn, o que sugere que o mesmo é um órgão de acúmulo de Zn. Nas folhas novas os teores de Zn foram, de modo geral, superiores àqueles encontrados em folhas diagnóstico, o que poderia em parte ser reflexo da alta demanda deste nutriente em tecidos em crescimento (HASLETT; REID; RENGEL, 2001).

Tabela 4 – Resultado da análise da folha diagnose do cafeeiro em EDXRF aos 128 dias após a aplicação, em razão da aplicação de doses crescentes de Cd, Ni e Zn

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | N* | P | K | Ca | Mg | S | B** | Cu | Fe | Mn | Zn |
|-------|------------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| | | mg g ⁻¹ | | | | | | μg.g ⁻¹ | | | | |
| | Controle | 27,5 ± 0,7 | 1,6 ± 0,2 | 17,3 ± 2,0 | 16,7 ± 3,4 | 2,4 ± 0,3 | 1,8 ± 0,0 | 47,6 ± 15,8 | 14,6 ± 3,9 | 321,4 ± 40,2 | 465,5 ± 35,8 | 7,2 ± 0,4 |
| Cd | 15 | 26,8 ± 2,0 | 1,3 ± 0,2 | 14,9 ± 3,6 | 25,5 ± 5,4 | 2,9 ± 0,6 | 2,1 ± 0,7 | 72,4 ± 9,3 | 12,0 ± 2,4 | 376,8 ± 69,7 | 410,2 ± 87,9 | 7,0 ± 1,1 |
| | 45 | 22,9 ± 1,7 | 0,9 ± 0,1 | 10,3 ± 1,1 | 11,6 ± 1,7 | 1,1 ± 0,3 | 1,1 ± 0,1 | 54,3 ± 20,6 | 4,7 ± 1,6 | 192,0 ± 21,1 | 249,4 ± 82,0 | 4,9 ± 0,4 |
| | 90 | 21,8 ± 2,0 | 1,0 ± 0,2 | 16,1 ± 1,4 | 18,4 ± 11,3 | 1,7 ± 0,2 | 1,6 ± 0,1 | 48,1 ± 28,4 | 9,7 ± 4,6 | 329,1 ± 109,8 | 265,4 ± 88,3 | 6,8 ± 1,2 |
| Ni | 35 | 28,5 ± 1,4 | 1,2 ± 0,1 | 18,7 ± 3,7 | 25,4 ± 2,4 | 2,5 ± 0,7 | 1,7 ± 0,2 | 78,9 ± 10,7 | 15,0 ± 1,3 | 387,6 ± 57,0 | 335,4 ± 69,5 | 8,1 ± 1,3 |
| | 105 | 26,3 ± 1,4 | 1,4 ± 0,1 | 17,7 ± 0,1 | 27,2 ± 5,5 | 1,8 ± 0,6 | 1,9 ± 0,1 | 74,3 ± 16,8 | 12,1 ± 2,6 | 323,8 ± 52,2 | 278,0 ± 38,7 | 6,9 ± 0,2 |
| | 210 | 27,8 ± 3,4 | 1,2 ± 0,2 | 16,7 ± 2,7 | 24,0 ± 12,1 | 2,1 ± 0,4 | 1,6 ± 0,1 | 47,6 ± 9,1 | 12,7 ± 4,4 | 340,3 ± 72,0 | 230,0 ± 41,2 | 7,2 ± 0,6 |
| Zn | 100 | 28,0 ± 2,6 | 1,3 ± 0,1 | 13,5 ± 2,0 | 14,7 ± 8,2 | 2,5 ± 0,9 | 1,6 ± 0,3 | 49,2 ± 16,1 | 11,6 ± 2,1 | 327,7 ± 93,5 | 405,2 ± 49,0 | 10,5 ± 5,5 |
| | 300 | 24,9 ± 0,8 | 1,2 ± 0,1 | 15,8 ± 2,0 | 25,8 ± 2,7 | 2,2 ± 0,3 | 1,8 ± 0,1 | 101,4 ± 34,2 | 14,1 ± 3,0 | 412,9 ± 45,6 | 253,0 ± 37,3 | 15,1 ± 3,0 |
| | 600 | 27,4 ± 4,3 | 1,0 ± 0,1 | 12,9 ± 0,5 | 13,2 ± 2,1 | 2,3 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 | 40,5 ± 12,0 | 8,9 ± 1,7 | 269,7 ± 58,3 | 154,0 ± 42,5 | 35,4 ± 7,1 |

* - Método Kjeldahl (BREMER, 1965), ** - Método da Azometrina-H (BINGHAM, 1982)

Tabela 5 – Resultado da análise do primeiro par de folhas de cafeeiros em EDXRF aos 128 dias após a aplicação, em razão da aplicação de doses crescentes de Cd, Ni e Zn

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | N* | P | K | Ca | Mg | S | B** | Cu | Fe | Mn | Zn |
|-------|------------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| | | -----mg g ⁻¹ ----- | | | | | | | | | | |
| | | -----µg.g ⁻¹ ----- | | | | | | | | | | |
| | Controle | 34,6 ± 2,5 | 2,0 ± 0,1 | 17,9 ± 0,9 | 8,8 ± 2,7 | 2,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 31,6 ± 7,0 | 15,5 ± 1,3 | 134,6 ± 24,9 | 257,0 ± 105,2 | 9,3 ± 1,4 |
| Cd | 15 | 33,6 ± 3,9 | 1,9 ± 0,1 | 19,4 ± 0,3 | 9,9 ± 2,2 | 2,0 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1 | 32,8 ± 9,8 | 15,5 ± 1,4 | 135,6 ± 16,0 | 207,3 ± 20,8 | 8,5 ± 0,6 |
| | 45 | 31,8 ± 7,1 | 1,4 ± 0,2 | 16,6 ± 0,9 | 4,9 ± 1,6 | 1,6 ± 0,4 | 1,0 ± 0,2 | 27,1 ± 6,7 | 10,0 ± 2,6 | 119,0 ± 34,2 | 152,8 ± 72,1 | 7,1 ± 0,9 |
| | 90 | 29,7 ± 2,0 | 1,4 ± 0,1 | 13,2 ± 0,6 | 2,7 ± 1,7 | 1,4 ± 0,2 | 0,9 ± 0,1 | 23,7 ± 4,9 | 12,8 ± 0,4 | 173,4 ± 54,8 | 123,8 ± 35,6 | 6,9 ± 2,1 |
| Ni | 35 | 32,2 ± 3,5 | 1,8 ± 0,2 | 18,2 ± 1,3 | 12,1 ± 4,1 | 2,2 ± 0,2 | 1,2 ± 0,1 | 23,7 ± 2,2 | 15,7 ± 1,5 | 141,6 ± 18,2 | 166,8 ± 37,3 | 9,8 ± 1,4 |
| | 105 | 38,8 ± 3,5 | 1,8 ± 0,2 | 16,3 ± 1,5 | 10,3 ± 1,3 | 2,0 ± 0,3 | 1,5 ± 0,1 | 27,1 ± 6,3 | 13,5 ± 2,2 | 154,8 ± 5,5 | 168,2 ± 73,2 | 9,3 ± 0,2 |
| | 210 | 35,0 ± 1,9 | 1,8 ± 0,1 | 19,5 ± 0,6 | 11,8 ± 1,2 | 2,0 ± 0,3 | 1,5 ± 0,1 | 28,7 ± 3,9 | 13,2 ± 2,0 | 237,2 ± 20,4 | 163,2 ± 10,0 | 8,9 ± 0,8 |
| Zn | 100 | 33,1 ± 4,7 | 2,0 ± 0,1 | 18,7 ± 3,0 | 8,8 ± 3,1 | 2,0 ± 0,2 | 1,5 ± 0,2 | 28,0 ± 22,5 | 16,1 ± 1,5 | 135,5 ± 19,5 | 204,2 ± 58,6 | 13,3 ± 2,3 |
| | 300 | 35,3 ± 2,1 | 1,8 ± 0,1 | 16,3 ± 0,8 | 9,8 ± 1,3 | 1,7 ± 0,2 | 1,4 ± 0,2 | 26,9 ± 6,3 | 15,7 ± 1,9 | 126,2 ± 21,8 | 101,2 ± 13,0 | 12,3 ± 3,2 |
| | 600 | 37,8 ± 2,5 | 1,5 ± 0,2 | 16,4 ± 0,8 | 6,5 ± 1,6 | 2,2 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1 | 27,0 ± 8,1 | 14,4 ± 1,6 | 161,8 ± 22,4 | 98,4 ± 18,3 | 16,3 ± 3,1 |

* - Método Kjeldahl (BREMER, 1965), ** - Método da Azometrina-H (BINGHAM, 1982)

Tabela 6 – Resultado da análise de ramos de cafeeiros em EDXRF aos 128 dias após a aplicação, em razão da aplicação de doses crescentes de Cd, Ni e Zn

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | P | K | Ca mg g ⁻¹ | Mg | S | Cu | Fe | Mn μg.g ⁻¹ | Zn |
|-------|------------------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|
| | Controle | 1,3 ± 0,5 | 21,1 ± 4,1 | 11,7 ± 1,7 | 2,3 ± 0,4 | 1,7 ± 0,3 | 36,8 ± 5,9 | 177,0 ± 53,2 | 212,6 ± 69,5 | 26,2 ± 11,1 |
| Cd | 15 | 0,8 ± 0,1 | 18,6 ± 0,7 | 12,6 ± 0,2 | 2,5 ± 0,8 | 1,8 ± 0,1 | 28,2 ± 8,6 | 185,8 ± 10,7 | 211,3 ± 28,0 | 30,2 ± 12,7 |
| | 45 | 0,8 ± 0,2 | 17,5 ± 1,8 | 15,4 ± 2,2 | 2,1 ± 0,6 | 1,5 ± 0,2 | 24,8 ± 8,9 | 150,7 ± 27,1 | 101,1 ± 42,3 | 25,7 ± 12,2 |
| | 90 | 0,8 ± 0,1 | 18,5 ± 2,0 | 10,6 ± 0,3 | 1,5 ± 0,4 | 1,6 ± 0,3 | 30,4 ± 2,6 | 161,6 ± 28,4 | 233,9 ± 72,6 | 24,6 ± 4,0 |
| Ni | 35 | 1,1 ± 0,4 | 22,6 ± 3,3 | 10,5 ± 1,6 | 2,5 ± 0,5 | 1,8 ± 0,1 | 34,8 ± 2,7 | 150,2 ± 47,3 | 132,8 ± 13,0 | 23,5 ± 8,3 |
| | 105 | 0,8 ± 0,1 | 18,0 ± 1,6 | 11,6 ± 0,9 | 2,3 ± 0,7 | 1,5 ± 0,2 | 32,2 ± 6,2 | 182,9 ± 10,5 | 217,3 ± 38,2 | 31,7 ± 10,9 |
| | 210 | 0,7 ± 0,1 | 18,9 ± 0,2 | 12,1 ± 0,9 | 2,1 ± 0,4 | 1,6 ± 0,2 | 33,2 ± 4,4 | 181,7 ± 20,5 | 187,8 ± 12,5 | 34,3 ± 10,4 |
| Zn | 100 | 1,2 ± 0,3 | 22,0 ± 0,9 | 10,0 ± 0,9 | 1,8 ± 0,2 | 1,6 ± 0,1 | 30,1 ± 1,4 | 123,8 ± 5,9 | 163,5 ± 4,4 | 39,5 ± 19,0 |
| | 300 | 0,8 ± 0,1 | 18,4 ± 1,5 | 12,7 ± 1,7 | 1,9 ± 0,5 | 1,6 ± 0,2 | 33,6 ± 5,7 | 177,2 ± 28,5 | 129,3 ± 55,4 | 83,0 ± 33,5 |
| | 600 | 0,8 ± 0,1 | 17,0 ± 1,0 | 11,9 ± 0,6 | 2,6 ± 0,6 | 1,7 ± 0,1 | 32,8 ± 3,2 | 179,0 ± 29,2 | 127,4 ± 21,0 | 217 ± 61,0 |

A partir do momento da aplicação dos metais no solo foram amostradas folhas (3º par de folhas) no dia da aplicação e após 35, 63 e 128 dias. Nos ramos estas coletas foram feitas na aplicação e após 128 dias. Nos grãos, as análises foram realizadas após a colheita e beneficiamento dos frutos após 210 dias do fornecimento dos metais (safra 2007/2008).

Os teores foliares de Cd não aumentaram com a aplicação das doses crescentes do metal e permaneceram abaixo do limite de detecção ($0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ MS). Com relação ao teor no ramo, observou um aumento deste elemento em razão da aplicação de Cd no solo, porém este aumento não foi crescente em razão da dose (Figura 2A). Nos grãos os teores de Cd aumentaram em razão da aplicação crescente das doses de Cd no solo, em que o valor máximo determinado foi de $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ MS de Cd com a aplicação de 90 g planta^{-1} deste elemento (Figura 2B). Considerando os níveis de Cd aplicado e os teores disponíveis ao sistema radicular do cafeeiro, observa-se que pouco Cd foi translocado para ramos, folhas e grão de cafeeiro na presente pesquisa.

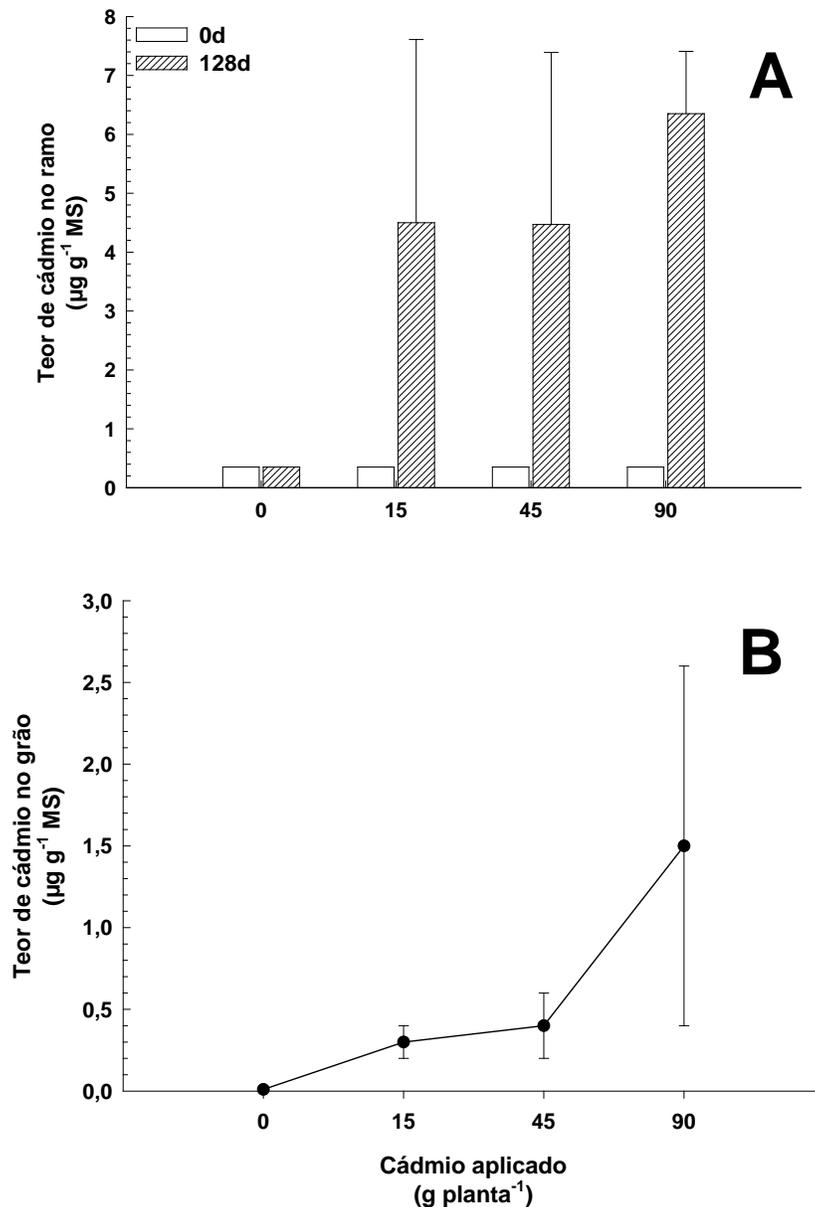


Figura 2 – Teor de Cd no ramo produtivo do cafeeiro (A) e nos grãos de café (B). Barras verticais representam o desvio padrão

Em muitas plantas tem sido observado que a maior parte do Cd absorvido é retido no órgão de contato e a sua translocação para outros órgãos é baixa. Isto foi observado em soja (CATALDO; GARLAND; WILDUNG, 1983) e arroz (SHAH; DUBEY,

1998; FUJIMAKI et al., 2010), sendo no primeiro caso 98% do Cd acumulado ficou fortemente retido no sistema radicular. Em trigo, a maior quantidade de ^{109}Cd foi detectada na folha aplicada, evidenciando também a baixa translocação quando absorvido foliarmente (RIESEN; FELLER, 2005).

O movimento do Cd da raiz para a parte aérea ocorre, provavelmente, via xilema e é governado pela transpiração das folhas. Evidência disto foi demonstrado por Salt et al. (1995), os quais mostraram que a indução do fechamento estomático pelo ABA reduziu drasticamente o acúmulo de Cd na parte aérea de *Brassica juncea*. No entanto, tem sido demonstrado em gramíneas que a absorção de Cd pelas raízes não é o fator limitante na translocação, mas sim o carregamento deste no xilema e o seu transporte para as sementes (URAGUCHI et al., 2009). Em arroz, o maior acúmulo do Cd absorvido fica armazenado na base do perfilho e nas regiões dos nós, os quais foram sugeridos como o principal passo na translocação de Cd para os grãos (FUJIMAKI et al., 2010).

Embora pouco se conheça sobre os processos envolvidos no movimento do Cd para os frutos em desenvolvimento, parece provável que o carregamento para as sementes ocorre via floema (POPELKA et al., 1996), comprovado em arroz, por Kensuke et al. (2007) que determinou valores entre 91 e 100% do Cd nos grãos por esta via de transporte.

Apesar dos teores de Cd nas raízes não terem sido quantificados, os dados obtidos indicam que devido à ausência de Cd foliar e as pequenas quantidades em ramos, é provável que o Cd tenha sido transportado do ramo para os frutos via floema. As elevadas quantidades adicionadas ao solo afetaram o sistema radicular, o qual teve a absorção de outros nutrientes dificultada (Tabela 5). No campo, as plantas que receberam as doses de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd apresentaram sintomas de déficit hídrico, como murcha da parte aérea e senescência do ponteiro do cafeeiro. Além disso, as folhas não foram órgãos preferenciais de acúmulo, cuja ordem foi nos ramos > grãos > folhas.

Assim, sugere-se que para o monitoramento da contaminação ambiental na cultura do cafeeiro, além da folha, órgão normalmente amostrado para análise, deve-se

considerar a coleta de ramos produtivos, uma vez que este pode contribuir para a redistribuição de elementos para os grãos em desenvolvimento.

Pode-se admitir que o Cd, metal pesado sem função no metabolismo vegetal e reconhecido como tóxico ao sistema radicular, a planta o acumula na raiz para evitar dano à parte aérea, conforme observado por Page, Weisskopf e Feller (2006). Esses autores determinaram que 80% do ^{109}Cd estava presente no córtex da raiz principal de *Lupinus albus*.

Em folhas, ramos e frutos o teor de Ni aumentou conforme as doses aplicadas no solo, sendo que o acúmulo foi na seguinte ordem: folha ($50 \mu\text{g g}^{-1}$ MS), ramo ($18 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) e fruto ($5 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) (Figuras 3A, B e C). De acordo com Pavan e Bingham (1982), teores de Ni acima de $35 \mu\text{g g}^{-1}$ MS foram tóxicos para mudas de café cultivadas em solução nutritiva. Na presente pesquisa foram encontrados valores muito superiores, contudo sem sintomas de toxidez, por se tratar provavelmente de plantas adultas em condições de campo.

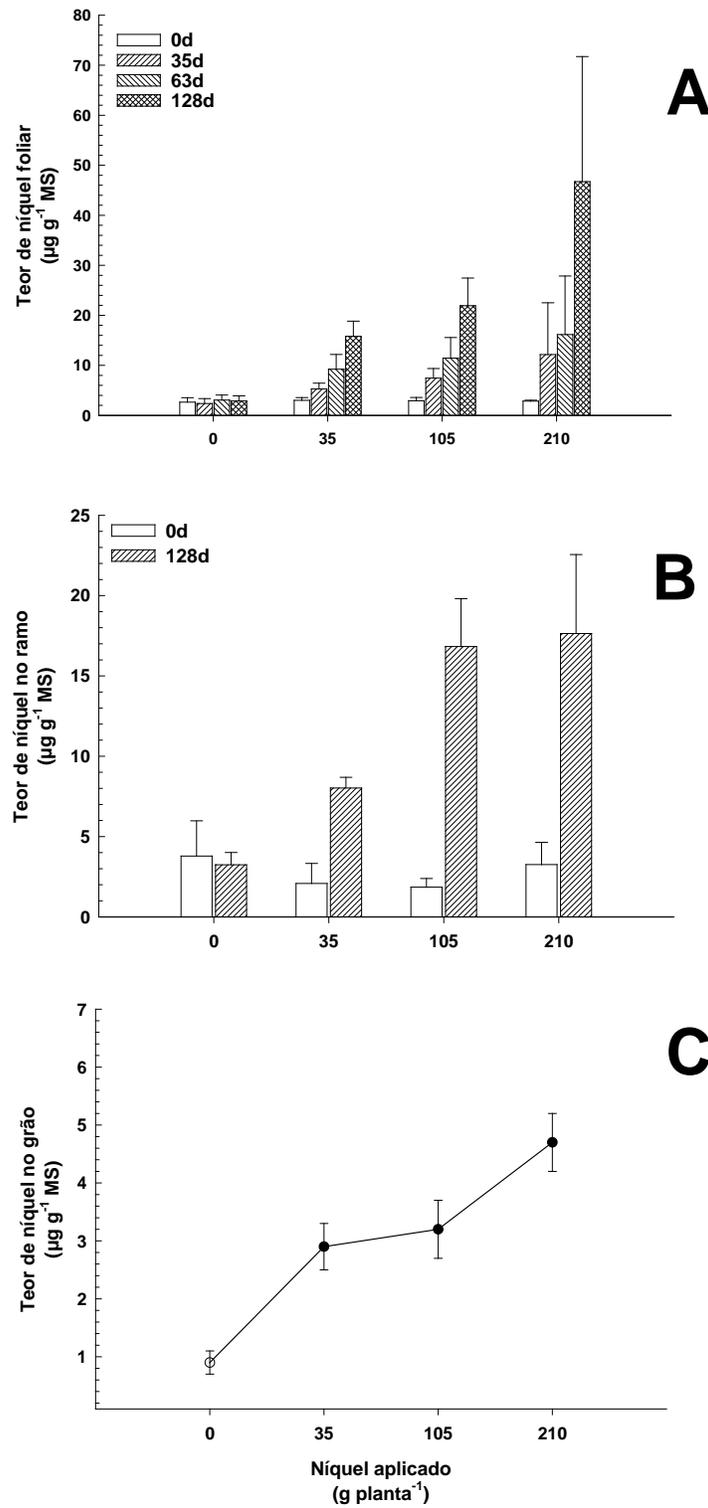


Figura 3 – Teor de Ni nas folhas (A), no ramo produtivo (B) e nos grãos de café (C).

Barras verticais representam o desvio padrão

O Ni é facilmente acumulado pelas plantas, ao contrário de outros elementos não essenciais, como, por exemplo, o Cd. O Ni é um elemento móvel nas plantas e pode acumular nas sementes, devido à sua grande mobilidade no floema. A aplicação foliar de ^{63}Ni em trigo teve grande mobilidade no floema, sendo transportado principalmente para as raízes e folhas jovens (RIESEN; FELLER, 2005). Em *Lupinus albus*, apenas 18,6% do ^{63}Ni foi encontrado na parte radicular, enquanto para o ^{109}Cd e ^{65}Zn , as porcentagens encontradas foram de 75 e 33%, respectivamente (PAGE; WEISSKOPF; FELLER, 2006).

Contraditoriamente, em cevada (BRUNE; DIETZ, 1995) e milho (BACCOUCH; CHAOU; EL-FERAJANI, 1998), o acúmulo de Ni foi maior na raiz do que na parte aérea. Também, Cardoso et al. (2005) observaram que pouco do Ni absorvido pelas raízes de *Crotalaria juncea* foram translocados para a parte aérea. Estes resultados contraditórios indicam que a distribuição de Ni nas plantas varia entre as espécies.

Em cafeeiro, Reis et al. (2009) encontraram em folhas e grãos de plantas crescendo no campo teores de Ni entre 2,4 a 6,0 mg kg⁻¹ MS, respectivamente, e que este metal nos grãos aumentaram em razão do estágio de desenvolvimento.

Nas plantas tratadas com a maior quantidade de Ni não observou sintomas de toxidez, o que sugere que o cafeeiro pode ser tolerante a altas doses de Ni. Trata-se possivelmente de um comportamento semelhante ao que ocorre em plantas tolerantes, em que a absorção radicular do metal, o rápido carregamento para o xilema e o maior acúmulo na parte aérea, respondem pela tolerância a exposição a este metal. Na parte aérea há maior número de mecanismos de tolerância que operam em relação ao sistema radicular (PAPOYAN; PIÑEROS; KOCHIAN, 2007). A aplicação de Zn no solo elevou o teor foliar somente na última avaliação (128 dias) após a aplicação de 300 e 600 g planta⁻¹, em relação ao início dos tratamentos (Figura 4A). Apesar da elevada disponibilidade de Zn no solo (Tabela 2) nas doses aplicadas, somente na maior dose houve aumento do teor foliar acima da faixa adequada de 10 a 20 mg kg⁻¹, estabelecida para o cafeeiro (RAIJ et al., 1997).

O maior incremento de Zn ocorreu nos ramos produtivos do cafeeiro (Figura 4B), em que a maior dose aplicada (600 g planta⁻¹ de Zn) o teor observado foi superior a 200 mg kg⁻¹ MS. O acúmulo de Zn nos ramos do cafeeiro corrobora os resultados obtidos

em tomateiro por Angelova, Babrikov e Ivanov (2009) e em mudas de cafeeiro por Andrade, Silveira e Mazzafera (2010). Isso sugere que os ramos do cafeeiro funcionam como um tecido de armazenamento de grande parte do Zn absorvido, podendo disponibilizá-lo em situações temporárias de deficiência. Porém, os resultados desta pesquisa são contrastantes com aqueles obtidos por Malavolta et al. (2002), que observaram que os teores de Zn na folha e no ramo eram semelhantes no cafeeiro. Há de se destacar que a quantidade de Zn aplicada por Malavolta et al. (2002) era cerca de 100 a 300 vezes menor àquelas usadas neste trabalho.

Apesar do Zn ser quimicamente semelhante ao Cd (CHESWORTH, 1991) e serem absorvidos e translocados em plantas por rotas similares (GRANT et al., 1998), os dados aqui apresentados evidenciam que o cafeeiro apresenta comportamento distinto quando a absorção e translocação destes elementos. Como o Zn é um micronutriente, faz sentido o seu movimento da raiz para a parte aérea via xilema para atingir as folhas (PAGE; WEISSKOPF; FELLER, 2006).

Porém, como observado na presente pesquisa, o transporte do Zn absorvido na raiz até as folhas é lento. Isso fez com que os sintomas de toxidez do Zn só fossem observados 660 dias após a aplicação, com a desfolha total dos ramos produtivos do cafeeiro. Contudo, diferentemente do Cd, o Zn pode não ter afetado o sistema radicular, uma vez que o ponteiro do cafeeiro não apresentou sinais de murcha ou desfolha.

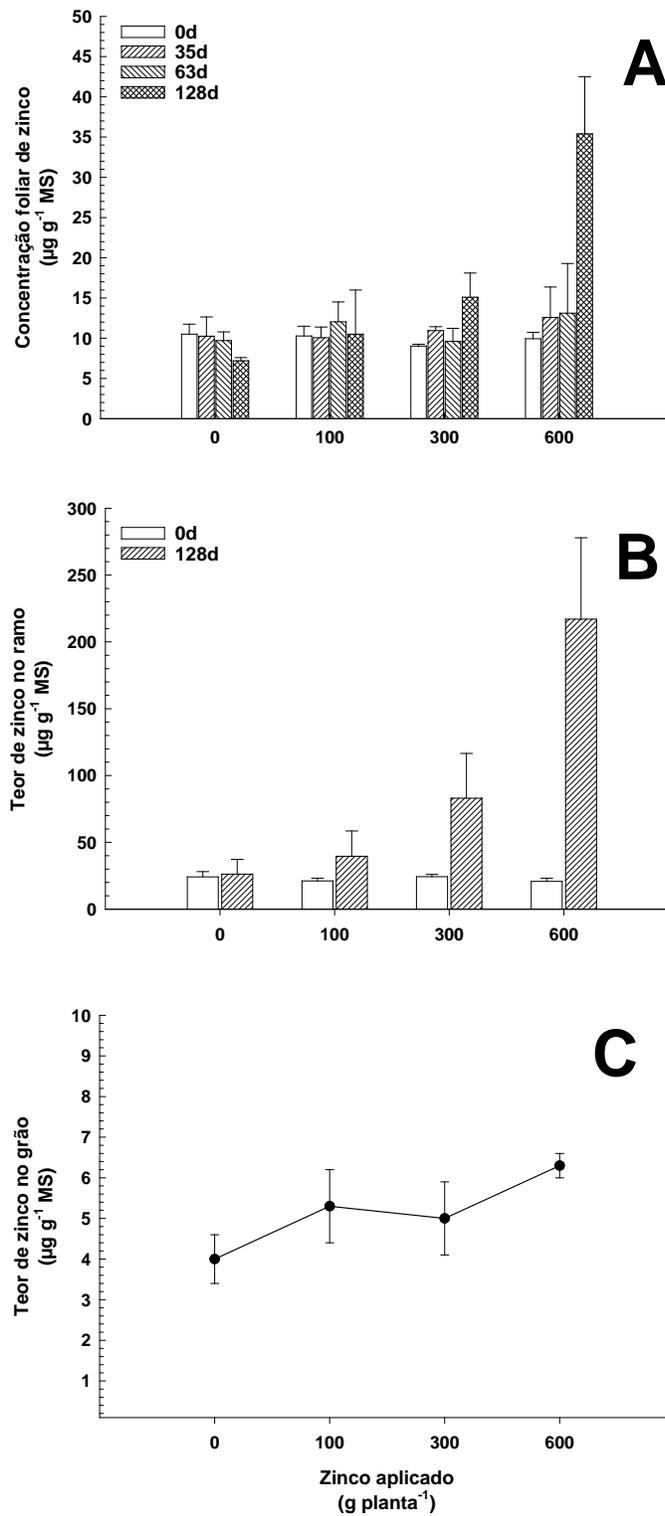


Figura 4 – Teor de Zn nas folhas (A), no ramo produtivo (B) e nos grãos de café (C). Barras verticais representam o desvio padrão

Na safra agrícola 2007/2008 houve redução da produtividade em razão da aplicação de Cd e Zn. Em relação à aplicação de Ni, em ambas as safras avaliadas, não houve redução da produtividade, apesar do teor de Ni disponível no solo estar acima dos teores considerados tóxicos para as plantas, o que evidência a capacidade do cafeeiro em tolerar elevados teores de Ni no solo.

Como o início da aplicação dos metais se deu após a antese, em dezembro de 2007, quando os frutos estavam no estágio chumbinho, houve redução da produtividade devido à queda de frutos no tratamento com Zn. É conhecida a importância desse nutriente na biossíntese de auxina, e a relação desse hormônio na modulação da biossíntese do etileno (MARSCHNER, 1995). Em razão disso, provavelmente a queda dos frutos nas plantas tratadas com este metal pode ter sido, em parte, provocado pela maior liberação de etileno pelo cafeeiro.

Nos tratamentos com Cd, essa queda ocorreu pela redução da absorção de água, uma vez que observou sintomas típicos de deficiência hídrica, sugerindo que o sistema radicular foi fortemente afetado por este metal. No segundo ano do experimento, safra 2008/2009, ocorreu a morte das plantas que receberam 45 e 90 gramas planta⁻¹ de Cd, razão porque não são apresentados dados da produtividade (Tabela 7).

Tabela 7 – Produtividade do cafeeiro nas safras 2007/2008 e 2008/2009, em razão da aplicação de doses crescentes de Cd, Ni e Zn

| Metal pesado | Aplicado g planta ⁻¹ | Produtividade (sacas ha ⁻¹)* | | |
|--------------|---------------------------------|------------------------------------------|-------------|-------------|
| | | 2007/2008 | 2008/2009 | Média |
| | Controle | 52,9 ± 19,0 | 66,9 ± 18,2 | 59,9 ± 14,9 |
| Cd | 15 | 59,3 ± 13,0 | 66,1 ± 24,4 | 62,7 ± 13,3 |
| | 45 | 39,1 ± 7,8 | ** | 19,5 ± 3,9 |
| | 90 | 29,5 ± 28,4 | ** | 14,8 ± 14,2 |
| Ni | 35 | 66,3 ± 14,2 | 43,9 ± 23,2 | 55,1 ± 10,3 |
| | 105 | 52,6 ± 23,1 | 64,2 ± 11,4 | 58,3 ± 16,7 |
| | 210 | 70,1 ± 6,5 | 42,9 ± 30,3 | 58,0 ± 18,3 |
| Zn | 100 | 60,6 ± 29,3 | 37,1 ± 28,4 | 45,6 ± 11,6 |
| | 300 | 48,2 ± 19,3 | 62,1 ± 17,7 | 55,1 ± 16,0 |
| | 600 | 38,7 ± 20,5 | 16,2 ± 7,5 | 27,4 ± 10,9 |

*Uma saca = 60 kg; ** Plantas mortas

A aplicação de 90 gramas planta⁻¹ de Cd na, safra de 2007/2008, ocasionou o secamento dos frutos ainda verde, devido à morte radicular e a diminuição da absorção de água, necessária para a evolução dos diferentes estádios da frutificação e da vegetação do cafeeiro (Tabela 8).

Na safra 2008/2009, observou uma maior porcentagem de frutos verdes em razão da aplicação do Ni, o que indica um atraso na maturação dos frutos do cafeeiro (Tabela 8). A grande proporção de frutos verde leva à maior perda de rendimento final, ao passo que o tipo e a bebida também são comprometidos (FREIRE; MIGUEL, 1985). O Ni tem sido reportado por inibir a biossíntese de etileno em frutos (ZHENG et al., 2006), devido à substituição do Fe²⁺ da ACC oxidase e formação de um complexo inativo enzima-metal (McGARVEY; CHRISTOFFERSEN, 1992). Em arábido, o Cd

proporcionou a maior produção de etileno na planta, enquanto Ni e Zn não induziram a produção de etileno (ARTECA; ARTECA, 2007).

Tabela 8 – Estádios de maturação dos frutos nas safras 2007/2008 e 2008/2009, em razão da aplicação de Cd, Ni e Zn

| Aplicado g planta ⁻¹ | Verde | | | Cereja | | | Seco | | |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| | 2008 | 2009 | Média | 2008 | 2009 | Média | 2008 | 2009 | Média |
| ----- % ----- | | | | | | | | | |
| Controle | 28,2 ± 13,5 | 27,7 ± 14,4 | 27,9 ± 12,1 | 66,4 ± 13,8 | 49,9 ± 8,3 | 58,1 ± 9,6 | 5,4 ± 4,6 | 20,4 ± 15,1 | 12,9 ± 8,0 |
| Cd | | | | | | | | | |
| 15 | 27,8 ± 10,7 | 43,1 ± 14,9 | 35,5 ± 12,0 | 68,6 ± 11,2 | 46,9 ± 10,1 | 57,8 ± 8,9 | 3,6 ± 2,0 | 16,4 ± 18,3 | 7,1 ± 8,3 |
| 45 | 30,7 ± 14,8 | * | 30,7 ± 14,8 | 63,2 ± 13,2 | * | 63,2 ± 13,2 | 6,1 ± 2,0 | * | 6,1 ± 2,0 |
| 90 | 0,0 ± 0,0 | * | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | * | 0,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 | * | 100,0 ± 0,0 |
| Ni | | | | | | | | | |
| 35 | 19,6 ± 8,3 | 61,6 ± 16,1 | 40,6 ± 8,4 | 66,3 ± 12,8 | 35,2 ± 16,7 | 50,8 ± 6,4 | 14,1 ± 7,8 | 3,1 ± 6,8 | 8,6 ± 4,3 |
| 105 | 22,9 ± 12,7 | 56,8 ± 19,4 | 39,8 ± 10,7 | 71,3 ± 14,3 | 34,2 ± 7,8 | 52,7 ± 10,6 | 5,8 ± 1,8 | 9,0 ± 18,0 | 7,4 ± 9,4 |
| 210 | 8,6 ± 6,1 | 77,7 ± 5,2 | 43,1 ± 3,1 | 75,9 ± 5,5 | 21,0 ± 6,5 | 48,5 ± 4,8 | 15,5 ± 5,1 | 1,1 ± 2,2 | 8,3 ± 2,8 |
| Zn | | | | | | | | | |
| 100 | 27,1 ± 10,2 | 41,9 ± 3,5 | 31,6 ± 10,4 | 67,9 ± 8,8 | 31,6 ± 24,2 | 56,5 ± 14,1 | 5,0 ± 2,6 | 26,2 ± 24,1 | 11,8 ± 9,4 |
| 300 | 28,1 ± 31,8 | 53,3 ± 8,9 | 40,7 ± 13,8 | 60,2 ± 24,9 | 31,3 ± 6,7 | 45,7 ± 15,7 | 14,5 ± 8,4 | 8,3 ± 9,0 | 10,0 ± 6,6 |
| 600 | 17,3 ± 20,3 | 20,8 ± 28,7 | 19,0 ± 17,9 | 71,8 ± 23,7 | 17,3 ± 17,7 | 44,6 ± 15,2 | 10,9 ± 4,4 | 59,4 ± 44,5 | 35,2 ± 21,5 |

Os resultados de massa e tamanho de grãos apresentaram pouca alteração em relação à aplicação crescente de Ni e Zn no cafeeiro. No entanto, o maior nível de Cd (90 g planta^{-1}) reduziu em 28% a massa de grãos, resultando em grãos de menor tamanho, em que somente 6,3% dos grãos apresentaram tamanho acima de peneira 16+ (Tabela 9)

Tabela 9 – Massa e peneira média de grãos de cafeeiro na safra 2007/2008, em razão da aplicação de Cd, Ni e Zn

| Metal pesado | Aplicado g planta^{-1} | Massa 100 grãos mg grão^{-1} | Tamanho (%) | |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | | Peneira 14 + 15 | Peneira 16+ |
| | Controle | $14,78 \pm 0,25$ | $21,6 \pm 2,4$ | $72,3 \pm 2,2$ |
| Cd | 15 | $14,90 \pm 0,13$ | $18,8 \pm 1,5$ | $69,8 \pm 2,0$ |
| | 45 | $14,02 \pm 0,54$ | $23,5 \pm 2,9$ | $73,0 \pm 4,8$ |
| | 90 | $10,82 \pm 1,30$ | $50,3 \pm 2,0$ | $6,3 \pm 1,2$ |
| Ni | 35 | $13,91 \pm 0,28$ | $25,2 \pm 1,6$ | $68,8 \pm 2,2$ |
| | 105 | $14,96 \pm 0,40$ | $20,0 \pm 1,8$ | $77,3 \pm 2,7$ |
| | 210 | $14,30 \pm 0,44$ | $25,8 \pm 3,9$ | $68,8 \pm 4,7$ |
| Zn | 100 | $14,35 \pm 0,61$ | $22,8 \pm 3,1$ | $71,6 \pm 4,5$ |
| | 300 | $14,39 \pm 0,39$ | $19,3 \pm 1,3$ | $77,5 \pm 1,3$ |
| | 600 | $14,84 \pm 0,54$ | $27,5 \pm 4,4$ | $68,0 \pm 4,8$ |

A formação de frutos de café depende das condições climáticas e das características do solo, principalmente em relação à disponibilidade hídrica, fundamental para a fase de expansão e granação dos frutos. Em situações de temperaturas médias elevadas e de deficiência hídrica na fase de granação, o índice de grãos de pequena quantidade de massa atingiu até 45% do total de grãos de café de acordo com Camargo e Camargo (2001). No maior nível de Cd aplicado no cafeeiro, observou inicialmente murcha da planta com senescência no ponteiro do cafeeiro, sintomas típicos de estresse hídrico, o que pode ter prejudicado a granação dos frutos.

A redução desses parâmetros, além de comprometer a qualidade de bebida, deprecia a classificação comercial do grão em relação ao tamanho (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002).

3.4 Conclusões

O estado nutricional do cafeeiro, em relação aos teores foliares de K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe e Mn não é prejudicado pela aplicação de Cd, Ni e Zn, aos 128 dias. O teor de N foliar não altera com a aplicação de Ni e Zn, porém reduz com a dose de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd. Em relação ao P foliar, o teor diminui nas doses de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd e 600 g planta⁻¹ de Zn. O teor de Zn nas folhas não foi afetado pela aplicação de Cd e Ni.

A distribuição dos teores dos metais pesados varia com o órgão do cafeeiro. Os maiores teores de Zn são determinados no ramo (30 a 230 mg kg⁻¹), folha (7 a 35 mg kg⁻¹) e nos grãos (4 a 6,5 mg kg⁻¹); para o Ni a ordem é na folha (4 a 45 mg kg⁻¹), ramo (3 a 18 mg kg⁻¹) e nos grãos (1 a 5 mg kg⁻¹); e em relação ao Cd a ordem de acúmulo é ramo (0 a 6,2 mg kg⁻¹); grãos (0 a 1,5 mg kg⁻¹) e ausência na folha.

A produtividade média de duas safras do cafeeiro não é prejudicada pelas doses de Ni; reduz na maior dose de Zn (600 g planta⁻¹), assim como nas maiores doses de Cd (45 e 90 g planta⁻¹).

Referências

ABREU, C.A.; RAIJ, B. van; ABREU, M.F.; GONZÁLEZ, A.P. Routine soil testing to monitor heavy metals and boron. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 564-571, 2005.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 368 p.

ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D.; MAZZAFERA, P. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 5381-5391, 2010.

ANGELOVA, V.R.; BABRIKOV, T.D.; IVANOV, K. Bioaccumulation and distribution of lead, zinc and cadmium in crops of solanaceae family. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 40, p. 2248-2263, 2009.

ARTECA, R.N.; ARTECA, J.M. Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 1480-1488, 2007.

BACCOUCH, S.; CHAOU, A.; EL-FERAJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, p. 689-694, 1998.

BINGHAM, F.T. Boron. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 431-447. (Serie Agronomy, 9).

BORGES, F.B.; JORGE, J.T.; NORONHA, R. Influência da idade da planta e da maturação dos frutos no momento da colheita na qualidade do café. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, Campinas, v. 22, p. 158-163, 2002.

BOTTCHER, A.; NOBILE, P.M.; MARTINS, P.F.; CONTE, F.F.; AZEVEDO, R.A.; MAZZAFERA, P. A role for ferritin in the antioxidant system in coffee cell cultures. **Biometals**, London, DOI: 10.1055/s-0030-1250314, 2010.

BOUSSAMA, N.; OUARITI, O.; SUZUKI, A.; GHORBAL, M.H. Cd-stress on nitrogen assimilation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 310-317, 1999.

BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1149-1178.

BRUNE, A.; DEITZ, K.J. A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel and zinc concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, p. 853-868, 1995.

CAMARGO, A.P.; CAMARGO, M.B.P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, p. 65-68, 2001.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1986. 94p. (IAC, Boletim Técnico, 106).

CANCELA, R. **Contenido de macronutrientes, micronutrientes, metales pesados y otros elementos in suelos naturales de São Paulo (Brasil) y Galicia (España)**. 2002. 574 p. Tesis (Doctoral) - Universidad de La Coruña, Coruña, 2002.

CARDOSO, P.F.; GRATAO, P.L.; GOMES JUNIOR, A.L.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 267-272, 2005.

CARLSON, R.W.; BAZZAZ, F.A.; ROLFE, G.L. The effects of heavy metals on plants. II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni and Ti. **Environmental Research**, San Diego, v. 10, p. 113-120, 1975.

CATALDO, C.D.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Cadmium uptake, kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 73, p. 844-848, 1983.

CHESWORTH, W. Geochemistry of micronutrients. In MORTVEDT, J.J.; COX, R.R.; SHUMAN, L.M.; WELCH, R.M (Ed.). **Micronutrients in agriculture**, 2nd ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 1-30.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 309-315, 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Decisão de Diretoria Nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, 01 de dezembro de 2005. Poder Executivo – Seção I, p.48.

FÄSSLER, E.; ROBINSON, B.H.; GUPTA, S.K.; SCHULIN, R. Uptake and allocation of plant nutrients and Cd in maize, sunflower and tobacco growing on contaminated soil and effect of soil conditioners under field conditions. **Nutrient cycling in agroecosystems**, Dordrecht, v. 87, p. 339-352, 2010.

FRANCO, E.; MIGLIORANZA, E.; FONSECA, E.P. High metal contents in coffee plant organs developed in tubets with different proportions of biosolid composts and carbonized rice hulls. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 503-510, 2004.

FREIRE, A.C.F; MIGUEL, A.C. Rendimento e qualidade do café colhido nos diversos estádios de maturação em Varginha-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Anais...** Rio de Janeiro: IBG; Gerca, 1985. p. 146-148.

FUJIMAKI, S.; SUZUI, N.; ISHIOKA, N.S.; KAWACHI, N.; ITO, S.; CHINO, M.; NAKAMURA, S-I. Tracing cadmium from culture to spikelet: Noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 152, p. 1796-1806, 2010.

- GINDEL, I. Ecological behavior of the coffee plant under semi-arid conditions. **Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles**, The Hague, v. 8, p. 329-362, 1961.
- GOMES-JÚNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Funcional Plant Biology**, Victoria, v. 34, p. 449-456, 2007.
- GOMES-JÚNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; GRATAO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant, physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 420-429, 2006a.
- GOMES-JÚNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATAO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in reponse to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1330-1337, 2006b.
- GOUIA, H.; SUZUKI, A.; BRULFERT, J.; GHORBAL, M.H. Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 367-376, 2003.
- GRANT, C.A.; BUCKLEY, W.T.; BAILEY, L.D.; SELLES, F. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 78, p. 1-17, 1998.
- HASLETT, B.S.; REID, R.J.; RENGEL, Z. Zinc mobility in wheat: Uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. **Annals of Botany**, London, v. 87, p. 379-386, 2001.
- HERNANDEZ, E.; OLGUÍN, E.; TRUJILLO, S.Y.; VIVANCO, J. Recycling and treatment of anaerobic effluents from pig waste using *Lemma* sp. under temperature climatic conditions. In: WISE, D.L. (Ed.). **Global environment biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1997. p. 293-304.
- HUXLEY, P.A.; PATEL, R.Z.; KABAARA, A.M.; MITCHELL, H.W. Tracer studies with ³²P on the distribution of functional roots of Arabica coffee in Kenya. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 77, p. 159-180, 1974.
- INFORZATO, R.; REIS, A.J. Estudos comparativo do sistema radicular dos cafeeiros Bourbon amarelo e Mundo Novo. **Bragantia**, Campinas, v. 22, p. 741-750, 1963.
- IWEGBUE, C.M.A.; NWAJEI, G.E.; OGALA, J.E.; OVERAH, C.L. Determination of trace metal concentrations in soil profiles of municipal waste dumps in Nigeria. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 32, p. 415-430, 2010.
- KABATA-PENDIAS, A.; KRAKOWIAK, A. Soil parameters as a base for the calculation of background heavy metal status. In: WILKENS, R.D.; FÖRSTNER, U.; KNÖCHEL, A. (Ed.). **Heavy metal in environment**. Edinburg: CEP, 1995. p. 398-401.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A.B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007. 576 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 432p.

KENSUKE, T.K.; FUJIMAKI, S.; FUJIWARA, T.; YONEYAMA, T. Quantitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 53, p. 72-77, 2007.

KLAUS, U.; WIEGAND, J. Long-term effects of the Aznalcóllar mine spill-heavy metal content and mobility in soils and sediments of the Guadiamar river valley. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 367, p. 855-871, 2006.

LEITE, V.M.; BROWN, P.H.; ROSOLEM, C.A. Boron translocation in coffee trees. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, p. 221-229, 2007.

LIMA FILHO, O.F. de; MALAVOLTA, E. Studies on mineral nutrition of the coffee plant (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho). LXIV. Remobilization and re-utilization of nitrogen and potassium by normal and deficient plants. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 63, p. 481-490, 2003.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro, colheitas máximas econômicas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 210p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.

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

MARQUES, A.P.G.C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A.O.S.S.; CASTRO, P.M.L. Arsenic, lead and nickel accumulation in *Rubus ulmifolius* growing in contaminated soil in Portugal. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v. 165, p. 174-179, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 2nd edn. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTINS, D.R.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Qualidade do grão e da bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 115-126, 2005.

MAZZAFERA, P. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 189-196, 1998.

- McBRIDE, M.B.; SAUVÉ, S.; HENDERSHOT, W. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.188, p. 153-159, 1997.
- McGARVEY, D.J.; CHRISTOFFERSEN, R.E. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 5964-5967, 1992.
- McLAUGHLIN, M.J.; PARKER, D.R.; CLARKE, J.M. Metals and micronutrients – food safety issues. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 60, p.143-163, 1999.
- MITCHELL, C.D.; FRETZ, T.A. Cadmium and zinc toxicity in seedlings white pine, red maple, and Norway spruce. **Ohio Agricultural Research and Development Center Research Circular**, Ohio, v. 226, p. 21-25, 1977.
- MYSLIWA-KURDZIEL, B.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2004. p. 146-181.
- PAGE, V.; WEISSKOPF, L.; FELLER, U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, p. 329-341, 2006.
- PAPOYAN, A.; PIÑEROS, M.; KOCHIAN, L.V. Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p. 51-58, 2007.
- PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T. Toxidez de metais em plantas. II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 323-328, 1982.
- PEGANOVA, S.; EDLET, K. Zinc. In: MERIAN, E.; ANKE, M.; IHNAT, M.; STOEPLER, M. (Ed.). **Elements and their compounds in the environment**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 1203-1239.
- PIRES, A.M.M.; MATTIAZZO, M.E.; BERTON, R.S. Ácidos orgânicos como extratores de metais pesados fitodisponíveis em solos tratados com lodo de esgoto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 39, p. 671-676, 2004.
- POPELKA, J.C.; SCHUBERT, S.; SCHULZ, R.; HANSEN, A.P. (1996) Cadmium uptake and translocation during reproductive development of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Angewandte Botanik**, Berlin, v. 70, p. 140-143, 1996.
- PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG. 1997. 285p. (IAC. Boletim Técnico, 100).
- REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 33, p. 315-324, 2009.
- RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359p.
- RIESEN, O.; FELLER, U. Redistribution of nickel, cobalt, manganese, Zinc, and Cadmium via the phloem in young and maturing wheat. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 28, p. 421-430, 2005.
- SALGADO, B.G.; MACEDO, R.L.G.; ALVARENGA, M.I.N.; VENTURIN, N. Avaliação da fertilidade dos solos de sistemas agroflorestais com cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em Lavras-MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, p. 343-349, 2006.
- SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 109, p. 1427-1433, 1995.
- SHAH, K.; DUBEY, R.S. A 18 kDa Cd inducible protein complex: Its isolation and characterization from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 152, p. 448-454, 1998.
- SILVA, A.L.O. da; BARROCAS, P.R.G.; JACOB, S.C.; MOREIRA, J.C. Dietary intake and health effects of selected toxic elements. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 79-93, 2005.
- SPEIR, T.W.; KETTLES, H.A.; PERCIVAL, H.J., PARSHOTAM, A. Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, p. 1953-1961, 1999.
- TAKENAKA, C.; KOBAYASHI, M.; KANAYA, S. Accumulation of cadmium and zinc in *Evodiopanax innovans*. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 31, p. 609-615, 2009.
- URAGUCHI, S.; MORI, S.; KURAMATA, M.; KAWASAKI, A.; ARAO, T.; ISHIKAWA, S. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 2677-2688, 2009.

YANG, X.E.; BALIGAR, V.C.; MARTENS, D.C.; CLARK, R.B. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, p. 643-656, 1996.

ZHENG, Q.L.; NAKATSUKA, A.; MATSUMOTO, T.; ITAMURA, H. Pre-harvest nickel application to the calyx of "Saijo" persimmon fruit prolongs postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 42, p. 98-103, 2006.

4 CÁDMIO, NÍQUEL E ZINCO EM CAFEIEIRO: AVALIAÇÃO DA FISIOLOGIA DA PLANTA, BIOQUÍMICA DE GRÃOS E QUALIDADE DE BEBIDA

Resumo

Vários processos fisiológicos e bioquímicos podem ser desencadeados pela exposição das plantas ao cádmio, níquel e zinco. Nesta pesquisa avaliou-se o efeito desses metais na taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos, área foliar, trocas gasosas, pigmentos, proteínas e peroxidação lipídica em cafeeiro em produção, bem como sobre os atributos bioquímicos dos grãos e a qualidade da bebida avaliada pela prova de xícara. A aplicação de Cd e Ni não afeta a taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos, exceto quando é aplicado 600 g planta⁻¹ de Zn. O Ni não afeta a fisiologia da planta, já a aplicação de 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd diminui a fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática, e de 600 g planta⁻¹ de Zn reduz a fotossíntese líquida e condutância estomática, bem como as concentrações de pigmentos. A proteína total solúvel aumenta somente na menor dose de Ni. A qualidade da bebida é afetada pela aplicação das maiores doses de Cd e Ni.

Palavras-chave: Fotossíntese; Proteína; Cafeína; Infusão

Abstract

Several physiological and biochemical process can be triggered by plant exposure to cadmium, nickel and zinc. This research evaluated the effect of these heavy metals in the growth rate of primary branches, leaf area, gas exchange, pigments, proteins and lipid peroxidation of coffee plants, as well as the biochemical characteristics of grains and the coffee beverage evaluated by test cup. Application of Cd and Ni does not affect the rate of branches growth, except when applied 600 g plant⁻¹ of Zn. Ni does not affect coffee physiology, since the application of 45 and 90 g plant⁻¹ of Cd decreased net photosynthesis, transpiration and stomatal conductance, and 600 g plant⁻¹ of Zn reduces net photosynthesis and stomatal conductance, and pigments concentration. Total soluble protein increases only in the smallest dose of Ni. Cup quality is affected by the application of higher doses of Cd and Ni.

Keywords: Photosynthesis; Protein; Caffeine; Infusion

4.1 Introdução

Em razão do aumento da poluição ambiental por metais pesados tem sido objetos de muitas pesquisas recentes os efeitos tóxicos do Cd, Ni e Zn, principalmente em relação ao crescimento e à produtividade das plantas. No entanto, os efeitos tóxicos desses metais em cafeeiros em produção nas condições de campo são de difícil compreensão, apesar de relatos na literatura sobre a interação de metais pesados com aspectos fisiológicos e bioquímicos do cafeeiro (GOMES-JÚNIOR et al., 2006a, 2006b, 2007). Nas plantas, a toxidez de Cd, Ni e Zn geralmente estão relacionadas à redução do crescimento, clorose em folhas novas, redução na taxa fotossintética e alterações nas atividades enzimáticas, principalmente no metabolismo do nitrogênio (WANI; KHAN; ZAIDE, 2007; DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997; PARIDA; CHHIBBA; NAYYAR, 2003).

Dentre esses metais pesados, o Cd é um dos poluentes mais agressivos e persistentes no ambiente proveniente de atividades antropogênicas. Este metal em baixos teores é tóxico e não apresenta função conhecida nos vegetais. Plantas afetadas por Cd apresentam fotossíntese comprometida, composição mineral alterada e desbalanço hídrico (DRAZKIEWICZ; BASZYNSKI, 2005; MISHRA et al., 2006; EKMEKÇI; TANYOLAÇ; AYHAN, 2008). Gomes-Junior et al (2006b) estudaram a exposição ao Cd de células de cafeeiro em suspensão e demonstraram que baixos teores de Cd não induziu estresse oxidativo nas células no que diz respeito ao crescimento e ao conteúdo de TBARS, embora alguma alteração na atividade de enzimas antioxidantes tenha sido observada.

O Ni satisfaz o critério direto (DIXON et al., 1975) e indireto (BROWN; WELCH; CARY, 1987) de essencialidade, passando da categoria de tóxico para essencial. Porém, em altas concentrações é altamente tóxico para humanos, animais e plantas (POULIK, 1997). Nas plantas, os sintomas gerados pela toxicidade do Ni incluem clorose e necrose foliar, inibição do crescimento da parte aérea, redução da área foliar e radicular (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004), redução das taxas de fotossíntese e respiração (SCHICKLER; CASPI, 1999), baixa germinação de sementes (RAO; SRESTY, 2000) e redução da produtividade (POULIK, 1997). Gomes-Junior et al.

(2006a) observaram um estímulo no crescimento de células em suspensão exposta a 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Ni, enquanto a exposição a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Ni inibiu o crescimento das células do cafeeiro, com forte aumento no conteúdo de TBARS. Reis et al. (2009) determinaram valores de 6 mg kg^{-1} de Ni foliar para fins de diagnóstico nutricional do cafeeiro avaliados nas fases de expansão e granação dos frutos.

O Zn é um micronutriente essencial a planta, pois está envolvido numa série de reações enzimáticas catalisadoras do metabolismo do ácido nucléico. Por outro lado, o excesso de Zn inibe várias funções metabólicas, que resultam em redução do crescimento e senescência (JIN et al., 2008). Altos teores de Zn induzem estresse oxidativo, por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que resultam na oxidação celular e peroxidação lipídica das membranas de células vegetais (YANG et al., 2006). Os sintomas de toxidez de Zn incluem ainda redução da produção e do crescimento, clorose devido à deficiência de ferro e interferência na absorção de outros nutrientes (BROADLEY et al., 2007; CHANEY, 1993; CLEMENS, 2001; MARSCHNER, 1995; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2008).

A fertilização do cafeeiro com biossólido pode ser adotada por cafeicultores, como prática agrícola, uma vez que a mesma não afeta a qualidade da bebida (MARTINS; CAMARGO; BATAGLIA, 2005). Porém, pouco se sabe sobre as respostas fisiológicas de cafeeiros em produção à exposição ao Cd, Ni e Zn em condições de campo.

A qualidade do café é avaliada, principalmente, por meio dos aspectos físicos dos grãos, como a cor, tamanho, densidade e percentual de defeitos que podem ser afetados por inúmeros fatores (VAAST et al., 2006), dentre eles, a aplicação de metais pesados. Em relação os atributos bioquímicos dos grãos, como o conteúdo de cafeína, trigonelina, ácido clorogênico, lipídeos e sacarose são considerados importantes precursores na formação do aroma do café e nas propriedades organolépticas da bebida (DART; NURSTEN, 2006).

Esta pesquisa foi realizada com objetivo de avaliar o efeito do Cd, Ni e Zn em parâmetros fisiológicos, como a taxa de crescimento de ramos plagiotrópicos, área foliar, trocas gasosas, quantidade de pigmentos, proteínas e peroxidação lipídica, bem

como os atributos bioquímicos dos grãos e a qualidade da bebida propriamente dita, em cafeeiro em produção e em condições de campo.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

Nesta pesquisa foram utilizadas plantas *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20 com sete anos de idade, no espaçamento 3,4 m x 0,9 m (3.270 plantas ha⁻¹), na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil. A área experimental situa a 22°42' de latitude Sul e 47°38' de longitude Oeste e altitude média de 580 m. O solo da área experimental é classificado como Nitossolo Vermelho, Eutroférico, latossólico, textura argilosa (Capítulo 3).

Para a realização da pesquisa foram aplicadas as seguintes doses de Cd (0; 15; 45; 90 g planta⁻¹); para o Ni (0; 35; 105; 210 g planta⁻¹); e para o Zn (0; 100; 300; 600 g planta⁻¹). As quantidades de cada metal foram aplicados na forma de sulfato, após diluição em 10 L de água, a qual foi distribuída em 5 litros no solo de cada lado da planta voltadas para a entrelinha, sob a projeção da copa do cafeeiro (Capítulo 3).

No início dos tratamentos e aos 128 dias foram amostrados o terceiro par de folhas de ramos do terço médio da planta de cada lado da entrelinha e, posteriormente, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

A colheita foi feita após 210 dias do início do fornecimento dos metais (safra 2007/2008), quando as plantas, por meio da avaliação visual, apresentavam predominantemente frutos cereja. Os frutos colhidos foram secos em terreiro até umidade de 110 g kg⁻¹, beneficiados e armazenados para as avaliações.

4.2.2 Avaliação do crescimento

Na sequência da primeira aplicação dos metais, foram marcados quatro ramos do terço médio de cada planta direcionado para a entrelinha, por meio de etiquetas no último internódio. Após 128 dias foi medido o comprimento do ramo a partir desse

internódio e calculou-se a taxa de crescimento relativo (TCR; cm dia^{-1}), obtida de acordo com a expressão 1:

$$\text{TCR} = \Delta\text{CR}/\Delta t \quad (1)$$

em que: TCR (cm dia^{-1}) corresponde à taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos identificados, ΔCR (cm) à variação do comprimento desses ramos em cada intervalo de amostragem e Δt (dias) aos intervalos entre as amostragens.

No final do experimento foi determinada a área foliar total dos novos lançamentos dos ramos plagiotrópicos por meio do integrador óptico de área foliar (LICOR-3100).

4.2.3 Trocas gasosas

A taxa de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e a condutância estomática (gs) foram determinadas ao longo do dia, no terceiro par de folhas na porção mediana, nos dois lados da planta, com um medidor portátil modelo ADC.

4.2.4 Determinação do teor de clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenóides e leituras com SPAD

Para análise do teor de clorofila extraível foi coletado o terceiro par de folhas de ramos produtivos aos 128 dias. As folhas foram coletadas, envoltas em papel alumínio e colocadas em gelo. As leituras com clorofilômetro portátil SPAD-502 [Soil-Plant Analysis Development (SPAD) Section Minolta Câmera CO. EDT, Japão] foram obtidas e as folhas congeladas, e no laboratório liofilizadas e armazenadas em dessecador no escuro. A clorofila e os carotenóides foram extraídos com etanol 95% e o teor avaliado com espectrofotômetro (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983).

4.2.5 Determinação de proteína total solúvel

A proteína total solúvel do material vegetal (folhas e grãos) foi extraída de acordo Gomes-Junior et al. (2007), determinado pelo método Bradford (1976), utilizando-se a

albumina de soro bovina (BSA) como padrão protéico. Os teores foram expressos em mg g^{-1} de material vegetal fresco.

4.2.6 Determinação da peroxidação lipídica

O dano oxidativo aos lipídeos foi estimado pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrio (TBARS) total e expresso na forma de equivalente malondialdeído (MDA), adaptado de Heath e Packer (1968). A concentração de MDA foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação (155 mM cm^{-1}).

4.2.7 Preparo da infusão

Do pó de café (4,8 g), obtido dos grãos torrados e moídos, foi feita a infusão com a adição de 30 mL de água Miliq fervente em erlenmeyer de 50 ml. Após a adição da água, estes foram cobertos com vidro de relógio para extração por 5 minutos (MONTEIRO et al., 2007). Posteriormente, a infusão foi filtrada em papel filtro em tubos Falcon e em seguida, 5 ml da bebida foram digeridos via digestão úmida conforme Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

4.2.8 Composição mineral dos grãos e infusão

Os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn nos grãos e na infusão foram determinados por espectrometria de emissão por plasma (ICP-OES; JobinYvon, JY50P Longjumeau, France) em extratos obtidos após digestão nitro-perclórica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

4.2.9 Análises de componentes da qualidade da bebida

Os grãos maduros de café foram analisadas para cafeína, ácidos clorogênicos (5-CQA), sacarose, glicose, frutose e aminoácidos totais solúveis, de acordo com Shimizu e Mazzafera (2000a,b), Mazzafera (1998a) e Geromel et al. (2007).

4.2.10 Prova de xícara da bebida do café

As amostras de grãos de café foram beneficiadas por via seca e enviadas para escritório de prova de xícara, com reconhecida competência no mercado.

4.2.11 Cortes histológicos

Nas análises histológicas foram utilizados grãos de cafeeiro expostos aos metais Cd, Ni e Zn, de acordo com metodologia utilizada por Goulart et al. (2007).

4.2.12 Delineamento experimental

A pesquisa foi realizada em blocos casualizados com cinco repetições, em que os resultados foram apresentados por meio da média e desvio padrão.

4.3 Resultados e discussão

As aplicações dos metais Cd e Ni, de forma geral, não afetaram a taxa de crescimento do ramo plagiotrópico (Tabela 1), enquanto para o Zn houve um incremento com a maior dose do metal aos 128 dias. O aumento do crescimento dos ramos plagiotrópicos pode ser explicado pelo baixo teor de Zn detectado nas folhas diagnóstico do cafeeiro (4,9 a 8,1 mg kg⁻¹, Tabela 4, Capítulo 3) comparado ao teor adequado (10-20 mg kg⁻¹) estabelecido para o cafeeiro (RAIJ et al., 1997). A deficiência de Zn pode manifestar-se por sintomas moderados, como a clorose e folhas menores, até a forma mais intensa, quando as plantas têm o crescimento e a produção comprometidos (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Tabela 1 - Taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos (TCR; cm dia⁻¹) e área foliar (AF; cm²) dos novos lançamentos foliares de cafeeiros expostos a doses de Cd, Ni e Zn no período de 128 dias após a aplicação dos metais

| Metais | Aplicado g planta ⁻¹ | TCR cm dia ⁻¹ | AF cm ² |
|--------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | Controle | 0,056 ± 0,009 | 126,74 ± 28,71 |
| Cd | 15 | 0,056 ± 0,015 | 113,40 ± 29,21 |
| | 45 | 0,042 ± 0,009 | 95,55 ± 19,82 |
| | 90 | 0,042 ± 0,006 | 84,85 ± 17,70 |
| Ni | 35 | 0,050 ± 0,008 | 141,74 ± 36,76 |
| | 105 | 0,045 ± 0,006 | 142,41 ± 28,96 |
| | 210 | 0,046 ± 0,005 | 77,90 ± 7,17 |
| Zn | 100 | 0,054 ± 0,015 | 185,26 ± 49,10 |
| | 300 | 0,058 ± 0,017 | 202,18 ± 22,32 |
| | 600 | 0,142 ± 0,044 | 189,71 ± 46,67 |

A interpretação dos resultados da área foliar dos novos lançamentos fica dificultada, devido ao elevado desvio padrão, exceto na maior dose de Ni (210 g planta⁻¹), em que esta variável reduziu 61,5% em relação ao controle. Esta observação pode ser explicada pela tendência de apresentar folhas mais lanceoladas, em relação aos lançamentos foliares da planta controle.

As plantas tratadas com Zn e Ni, em geral, apresentaram fotossíntese semelhante ao controle, com diminuição somente nas maiores doses desses metais (600 g planta⁻¹ de Zn e 210 g planta⁻¹ de Ni), enquanto a aplicação de Cd reduziu a assimilação de CO₂ em todas as doses aplicadas (Tabela 2).

O aumento da fotossíntese em plantas com Zn pode estar relacionado com sua ação no controle da abertura estomática (SHARMA; TRIPATHIA; BISHT, 1995), exceto na maior dose de zinco, como observado na presente pesquisa (Tabela 2). Para o Ni sabe-se que este não afeta a abertura estomática (PAPAZOGLU; SERELIS; BOURANIS, 2007), e que acumula nas células subsidiárias, sem alteração nas células guardas em folhas de *Thlaspi montanum*, uma planta hiperacumuladora desse metal (HEATH; SOUTHWORTH; D'ALLURA, 1997). Na presente pesquisa a condutância estomática na maior dose de N prejudicou substancialmente a abertura estomática (Tabela 2).

Tabela 2 - Condutância estomática (g_s : $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (E : $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), assimilação líquida do carbono (A : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em cafeeiro expostos a doses de metais, no período de 128 dias

| Metal | Aplicado g planta^{-1} | ----- g_s ----- $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | ----- E ----- $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | ----- A ----- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
|-------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| | Controle | 0,22 ± 0,24 | 2,82 ± 6,07 | 5,41 ± 3,23 |
| Cd | 15 | 0,15 ± 0,13 | 3,61 ± 1,92 | 4,88 ± 2,96 |
| | 45 | 0,06 ± 0,05 | 1,58 ± 0,40 | 1,53 ± 1,52 |
| | 90 | 0,07 ± 0,02 | 1,90 ± 0,83 | 1,13 ± 0,50 |
| Ni | 35 | 0,19 ± 0,19 | 3,85 ± 2,17 | 5,88 ± 4,08 |
| | 105 | 0,25 ± 0,40 | 3,91 ± 1,74 | 6,18 ± 3,73 |
| | 210 | 0,09 ± 0,08 | 2,65 ± 1,23 | 4,10 ± 2,66 |
| Zn | 100 | 0,23 ± 0,33 | 2,89 ± 1,99 | 5,05 ± 3,56 |
| | 300 | 0,19 ± 0,18 | 3,89 ± 2,01 | 5,44 ± 3,83 |
| | 600 | 0,08 ± 0,06 | 2,55 ± 1,63 | 3,08 ± 2,08 |

Por outro lado, as plantas tratadas com Cd sempre apresentaram menores taxas fotossintéticas do que o controle, evidenciando que mesmo sem acumular nos tecidos

foliares do cafeeiro, como aconteceu com os demais metais, seus efeitos são muito mais danosos, como relatado por Prasad (1995).

A aplicação de Cd provocou aos 128 dias a senescência foliar, nas doses de 45 e 90 g planta⁻¹, em que os cafeeiros que receberam essas doses apresentaram sintomas de murchamento (Tabela 3). O aumento do teor de Cd aplicado proporcionou redução no comprimento radicular, altura de plantas, número de ramos produtivos e no teor de clorofila quando aplicado no algodoeiro cultivado em casa de vegetação (BACHIR et al., 2004). Em relação ao Ni, os teores de clorofila foram superiores àqueles determinados nas plantas controle, independentemente da dose aplicada. Folhas com elevado teor de nitrogênio apresentam grande teor de clorofilas o que resulta em melhor capacidade fotossintética em relação às folhas deficientes em nitrogênio (EVANS, 1983). Assim, a fotossíntese líquida aumenta linearmente com os níveis de proteínas solúveis, com maior assimilação de dióxido de carbono por unidade de nitrogênio em folhas com teor adequado desse elemento (LAWLOR, 1994; LEA; MOROT-GAUDRY, 2001).

A quantidade de proteínas solúveis aumentou com o fornecimento de Ni e não variou com as doses de Cd (15, 45 e 90 g planta⁻¹) e Zn (100, 300 e 600 g planta⁻¹) em relação ao controle aos 128 dias (Figura 1A-C). Apesar do Cd afetar o metabolismo de nitrogênio em diversas espécies de plantas, como observaram Hernández, Gárate e Carpena-Ruiz (1997), em que o Cd não só inibe a absorção e o transporte de nitrato, como também prejudica a sua assimilação, pela inibição da atividade da redutase do nitrato, na presente pesquisa não foi observado variação quanto ao teor de proteínas solúveis nas plantas de cafeeiro em razão do fornecimento de doses de Cd.

Tabela 3 - Concentrações de clorofila *a*, *b*, total, carotenóides ($\mu\text{g ml}^{-1}$) e leituras com SPAD em cafeeiros expostos as doses dos metais Cd, Ni e Zn aos 128 dias. Média de 5 repetições e desvio padrão

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | Chl a $\mu\text{g ml}^{-1}$ | Chl b $\mu\text{g ml}^{-1}$ | Chl Total $\mu\text{g ml}^{-1}$ | Carotenóides $\mu\text{g ml}^{-1}$ | SPAD |
|-------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| | Controle | 8,63 ± 1,20 | 2,93 ± 0,41 | 11,56 ± 1,60 | 2,11 ± 0,21 | 58,9 ± 6,4 |
| Cd | 15 | 7,70 ± 0,95 | 2,66 ± 0,21 | 10,36 ± 1,13 | 2,08 ± 0,17 | 57,1 ± 4,4 |
| | 45 | - | - | - | - | - |
| | 90 | - | - | - | - | - |
| Ni | 35 | 10,18 ± 1,20 | 3,34 ± 0,39 | 13,52 ± 0,94 | 2,58 ± 0,42 | 66,4 ± 5,2 |
| | 105 | 8,95 ± 1,58 | 2,99 ± 0,43 | 11,94 ± 1,99 | 2,21 ± 0,29 | 62,5 ± 6,9 |
| | 210 | 10,43 ± 1,70 | 3,43 ± 0,55 | 13,87 ± 2,23 | 2,37 ± 0,25 | 64,9 ± 3,1 |
| Zn | 100 | 8,30 ± 1,37 | 2,81 ± 0,35 | 11,11 ± 1,72 | 2,05 ± 0,21 | 60,6 ± 8,5 |
| | 300 | 6,87 ± 0,73 | 2,39 ± 0,30 | 9,27 ± 1,00 | 1,86 ± 0,23 | 53,9 ± 4,5 |
| | 600 | 5,14 ± 0,70 | 1,98 ± 0,17 | 7,13 ± 0,85 | 1,50 ± 0,12 | 43,6 ± 6,5 |

- plantas com sintomas de murchamento

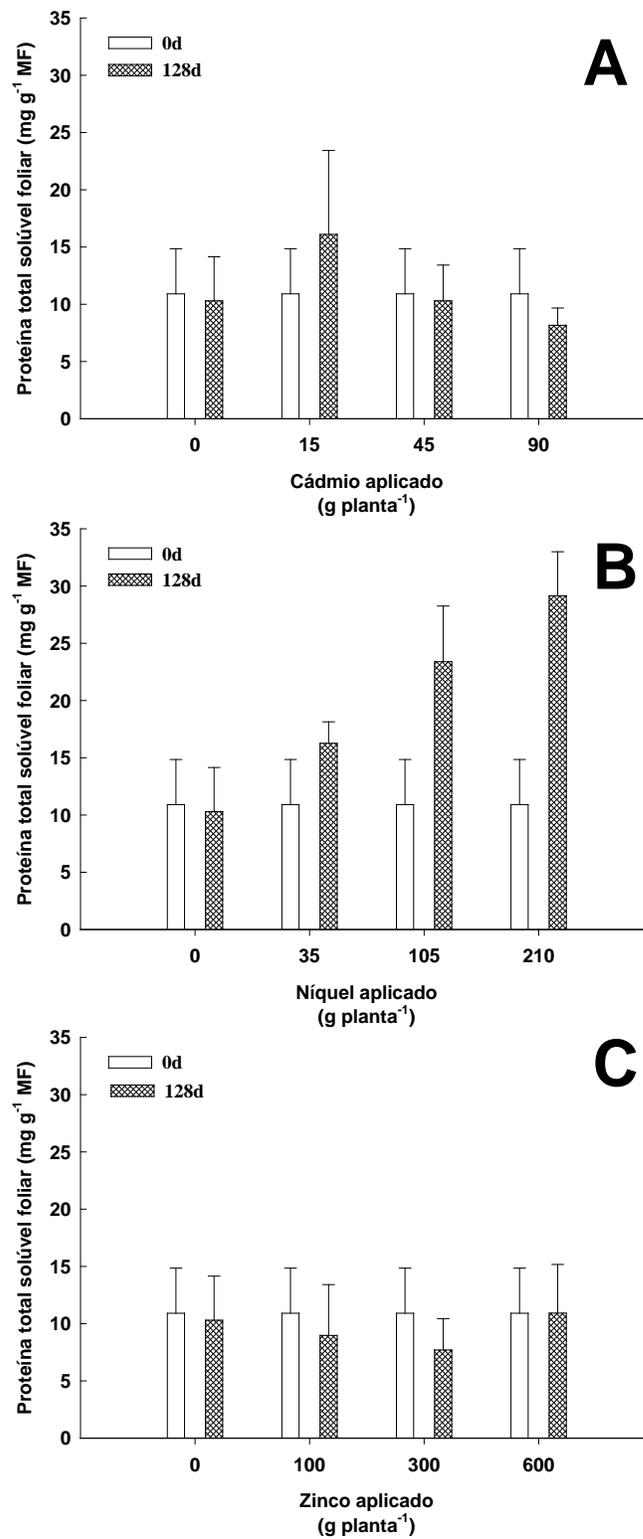


Figura 1 – Teor foliar de proteína total solúvel em cafeeiro exposto ao metal Cd (A), Ni (B) e Zn (C)

O aumento no conteúdo foliar de proteínas solúveis em decorrência da aplicação de doses de Ni pode ser explicado pela participação deste metal na enzima urease (GERENDÁS; SALLELMACHER, 1997; 1999), a qual permite o uso da uréia externa ou gerada internamente, como fonte de nitrogênio (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; ANDREWS; BLAKELEY; ZERNER, 1984). Entretanto, a relevância fisiológica da urease com o fornecimento de Ni para as plantas não está esclarecida.

A peroxidação lipídica foliar apresentou diferente resposta em relação às doses dos metais Cd, Ni e Zn (Figura 2A, B e C). As espécies reativas de oxigênio (EAOs) reagem com ácidos graxos insaturados causando a peroxidação de lipídeos das membranas, indicada pelo aumento no conteúdo de MDA. Na quantificação foliar do MDA nos cafeeiros tratados com Cd observou um aumento maior aos 128 dias do fornecimento, em que o MDA devido à aplicação de 90 g planta^{-1} Cd foi três vezes superior ao controle (Figura 2A). Apesar do Cd não ter sido acumulado neste órgão (Figura 1, Capítulo 3), ficou evidente o estresse causado pela aplicação de Cd no cafeeiro em relação ao déficit hídrico. Várias pesquisas relatam o aumento de MDA devido ao estresse hídrico (AKCAY et al., 2010; GAO et al., 2008), o que estaria relacionado com prejuízos às raízes. Com relação ao Ni e Zn (Figura 2B-C) não houve variação no conteúdo de MDA aos 128 dias em relação ao controle.

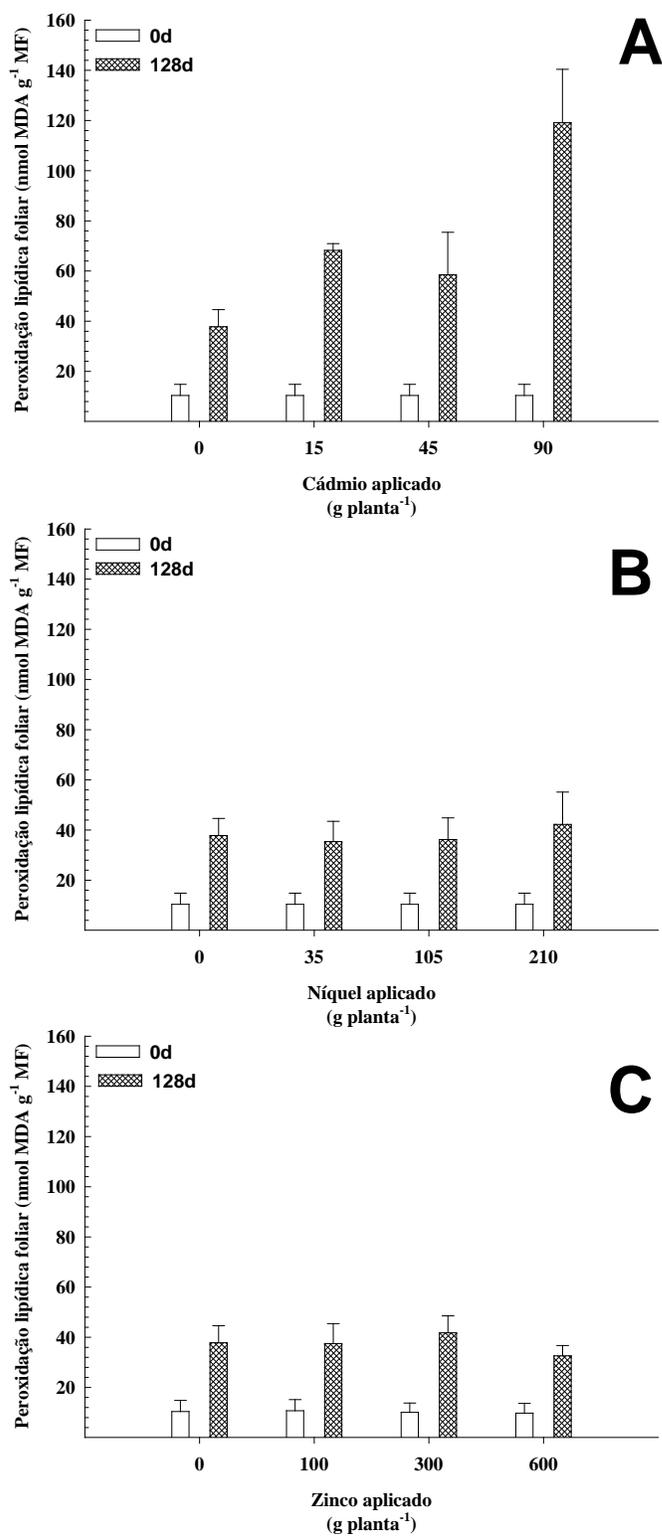


Figura 2 - Conteúdo de MDA em matéria fresca de folha de cafeeiro exposto as dose de Cd (A), Ni (B) e Zn (C), no início do experimento e aos 128 dias após a aplicação

Os aminoácidos sob condições de estresse podem acumular-se em concentrações elevadas e, assim, contribuir para uma maior habilidade da cultivar em tolerar o estresse pela exposição ao metal pesado. De fato, muitos aminoácidos são considerados antioxidantes não enzimáticos participando do metabolismo oxidativo da célula. Um caso bastante conhecido é da prolina, aminoácido que pode estar envolvido no processo de retenção de água na célula, proteção e estabilização de macromoléculas e estruturas celulares (BOHNERT; JENSEN, 1996). Outro fator que contribui para a proteção contra o estresse oxidativo é a disponibilidade de nitrogênio ao cafeeiro (RAMALHO et al., 1998).

Na presente pesquisa, os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe e Mn nos grãos não apresentaram alteração em razão da aplicação de doses de Cd, Ni e Zn nas plantas (Tabela 4). Com relação ao teor de Cd e Ni houve aumento no teor nos grãos decorrente da aplicação de doses desses metais. Para o Zn, somente a maior dose do elemento ($600 \text{ g planta}^{-1}$ de Zn) elevou o teor acima daquele determinado no controle (Tabela 4). Portanto, os grãos do cafeeiro consistem em drenos dos metais analisados.

Apesar das elevadas doses de metais aplicadas no cafeeiro, somente o Cd mostrou sintomas de toxidez nas plantas aos 128 dias do início da aplicação, em que as plantas apresentavam sintoma de estresse hídrico, como já discutido no Capítulo 3. Ressalta-se que o Cd não é um elemento essencial para a nutrição das plantas, o qual quando absorvido em níveis tóxicos, inibe o crescimento (MEDIOUNI et al., 2006; LIU; SHEN; LI, 2007) e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EAOs), que resultam em várias perturbações metabólicas (YAKIMOVA et al., 2006; DURCEKOVA et al., 2007). Porém, em cafeeiros, a necessidade de nutrientes e metabólitos, para atender a demanda dos frutos e dos órgãos em crescimento, pode ser translocado de órgãos de reserva, como raízes, caule, ramos e folhas (LIMA FILHO; MALAVOLTA, 2003).

Os teores de Ni e Zn determinados nos grãos (Tabela 4) apresentaram valores inferiores àqueles regulamentados pelo Decreto Nº 55.871, de 26 de março de 1965 (ANVISA, 1965), ainda em vigor, cujos limites máximos de tolerância (LMT) em alimentos (massa seca) para estes elementos é 5 mg kg^{-1} (Ni) e 50 mg kg^{-1} (Zn). Com relação ao Cd, o LMT em alimentos é 1 mg kg^{-1} . Com isso, os grãos colhidos dos

cafeeiros que receberam a maior dose deste metal apresentaram teores (Tabela 4), acima do limite regulamentado pela ANVISA.

Na composição química da bebida de café, as concentrações de P, K, Ca, Mg, S e B não variaram em razão das doses aplicadas dos metais pesados (Tabela 5). Dos elementos metálicos avaliados na bebida, o Mn foi o único a ser detectado, o qual reduziu com o aumento das doses de Cd, Ni e Zn. O Cu, Fe, Zn, Cd e Ni estavam abaixo do limite de detecção, o que não permitiu a quantificação destes elementos na bebida (Tabela 5). A ausência desses metais na bebida pode ser explicada pela capacidade de adsorção da parede celular do grão do cafeeiro (UTOMO; HUNTER, 2006, 2010a, 2010b). Os resultados da análise da infusão de café feita por (MALIK et al., 2008), mesmo sem a aplicação de metais pesados, apresentou a seguinte composição: $K > Ni > P > B > Mg > Ca > Mn > Cu > Zn > Al > Fe$; enquanto na presente pesquisa foi observada a seguinte ordem: $B > K > P > Mg > Mn > S > Ca$.

Tabela 4 – Resultado da composição mineral dos grãos de cafeeiros

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | mg g ⁻¹ | | | | | | μg.g ⁻¹ | | | | | |
|-------|------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | | P | K | Ca | Mg | S | B | Cd | Cu | Fe | Mn | Ni | Zn |
| | Controle | 1,4±0,1 | 16,2±1,3 | 2,1±0,5 | 1,7±0,1 | 1,5±0,2 | 6,7±1,6 | <0,1 | 15,2±1,8 | 52,3±48,0 | 33,8±7,3 | 0,9±0,2 | 4,0±0,6 |
| Cd | 15 | 1,3±0,1 | 17,6±0,8 | 1,6±0,2 | 1,6±0,1 | 1,3±0,1 | 5,0±0,5 | 0,3±0,1 | 14,0±0,6 | 36,4±23,3 | 31,6±0,9 | 0,9±0,1 | 3,6±0,4 |
| | 45 | 1,4±0,1 | 14,5±0,5 | 1,8±0,5 | 1,6±0,1 | 1,5±0,1 | 8,5±1,2 | 0,4±0,2 | 12,7±1,6 | 27,4±3,7 | 29,2±5,6 | 0,5±0,3 | 3,8±0,5 |
| | 90 | 1,6±0,4 | 17,7±2,1 | 1,8±0,3 | 1,7±0,2 | 1,8±0,3 | 10,5±3,7 | 1,5±1,1 | 16,9±1,7 | 35,0±5,0 | 28,8±4,0 | 0,5±0,2 | 5,0±0,9 |
| Ni | 35 | 1,2±0,1 | 17,8±0,4 | 2,1±0,2 | 1,7±0,1 | 1,4±0,1 | 5,5±0,5 | <0,1 | 11,8±0,8 | 37,4±25,6 | 29,4±1,1 | 2,9±0,4 | 3,9±0,4 |
| | 105 | 1,3±0,1 | 15,1±0,2 | 1,8±0,1 | 1,7±0,1 | 1,5±0,1 | 5,7±0,7 | <0,1 | 11,4±1,7 | 26,0±1,0 | 28,7±5,5 | 3,2±0,5 | 3,6±0,1 |
| | 210 | 1,2±0,1 | 14,9±0,7 | 2,9±1,0 | 1,6±0,1 | 1,6±0,1 | 8,0±1,6 | <0,1 | 11,9±1,0 | 108,8±100,5 | 27,0±4,5 | 4,7±0,5 | 3,9±0,6 |
| Zn | 100 | 1,3±0,1 | 16,5±0,7 | 1,9±0,2 | 1,6±0,1 | 1,3±0,1 | 6,8±2,4 | <0,1 | 12,9±0,7 | 36,6±16,4 | 31,4±5,1 | 0,8±0,3 | 5,3±0,9 |
| | 300 | 1,3±0,1 | 17,8±1,6 | 1,5±0,2 | 1,6±0,1 | 1,3±0,1 | 5,5±2,4 | <0,1 | 13,0±1,6 | 33,2±14,5 | 21,4±3,2 | 0,6±0,3 | 5,0±0,9 |
| | 600 | 1,3±0,2 | 14,6±0,5 | 2,1±0,6 | 1,7±0,1 | 1,7±0,1 | 8,2±1,1 | <0,1 | 15,2±1,8 | 102,2±86,7 | 24,6±3,4 | 0,5±0,4 | 6,3±0,3 |

Tabela 5 – Resultado da composição mineral da infusão da bebida

| Metal | Aplicado g planta ⁻¹ | P | K | Ca | Mg | S | B | Cd | Cu | Fe | Mn | Ni | Zn |
|-------|------------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------|---------------|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | | ----- mg L ⁻¹ ----- | | | | | | | | | | | |
| | Controle | 231±13 | 2795±97 | 78±18 | 228±17 | 78±5 | 3,7±1,0 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,6±0,9 | <0,1 | <0,15 |
| Cd | 15 | 231±14 | 2821±182 | 81±11 | 241±15 | 84±2 | 3,4±0,1 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,8±0,4 | <0,1 | <0,15 |
| | 45 | 184±11 | 2835±10 | 62±8 | 190±11 | 87±3 | 4,6±1,1 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 1,3±0,1 | <0,1 | <0,15 |
| | 90 | 158±27 | 3120±311 | 53±7 | 204 ± 5 | 129±50 | 4,4±1,3 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 1,2±0,2 | <0,1 | <0,15 |
| Ni | 35 | 207±19 | 2995±110 | 85±7 | 236±10 | 77±6 | 3,4±0,5 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,5±0,4 | <0,1 | <0,15 |
| | 105 | 199±49 | 2835±125 | 76±24 | 217±37 | 76±5 | 4,3±0,9 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,1±1,3 | <0,1 | <0,15 |
| | 210 | 199±16 | 2821±60 | 84±7 | 223±9 | 77±3 | 4,0±0,9 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 1,9±0,3 | <0,1 | <0,15 |
| Zn | 100 | 219±17 | 2835±1 | 83±6 | 217±3 | 69±8 | 3,1±0,2 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,2±0,1 | <0,1 | <0,15 |
| | 300 | 222±5 | 2817±72 | 86±1 | 233±4 | 78±1 | 4,3±0,9 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,1±0,2 | <0,1 | <0,15 |
| | 600 | 202±17 | 2678±46 | 100±7 | 234±2 | 81±7 | 4,9±0,1 | <0,02 | <0,03 | <1,75 | 2,1±0,2 | <0,1 | <0,15 |

De acordo com os teores de proteína total solúvel nos grãos (Figura 3), não houve variações acentuadas em razão da aplicação das doses dos metais Cd e Zn, enquanto que para o Ni, observou um aumento no teor de proteína, da ordem de 17,5% em relação ao controle na dose de 35 g planta⁻¹ desse elemento. É sabido que o Ni é constituinte da enzima urease (GERENDÁS; SATTELMACHER; 1997), a qual catalisa a hidrólise da uréia para formar amônio e CO₂ (DIXON et al., 1975). O amônio é catalisado pela glutamina sintetase e assimilado em aminoácidos e proteínas (LEA; BLACKWELL; JOY, 1992).

As espécies reativas de oxigênio (EAOs) reagem com ácidos graxos insaturados e causam a peroxidação de lipídeos nas membranas, indicada como aumento no conteúdo de MDA. Na figura 4, são apresentados os dados do conteúdo de MDA nos grãos de cafeeiros expostos ao Zn, Ni e Cd. Curiosamente, com o aumento da aplicação de Ni e Zn houve redução no conteúdo de MDA. No entanto, a mesma tendência não foi constatada para o Cd, em que o conteúdo nos grãos de MDA não variou em relação ao controle. A redução do MDA nos grãos pode ser explicada pela maior atuação de enzimas do metabolismo antioxidativo (GRATÃO et al., 2005) e compostos não enzimáticos que protegem as células contra estresse oxidativo nesse órgão, como beta-carotenos, vitamina E, entre outros (ROSATI et al., 2000; GRATÃO et al., 2005).

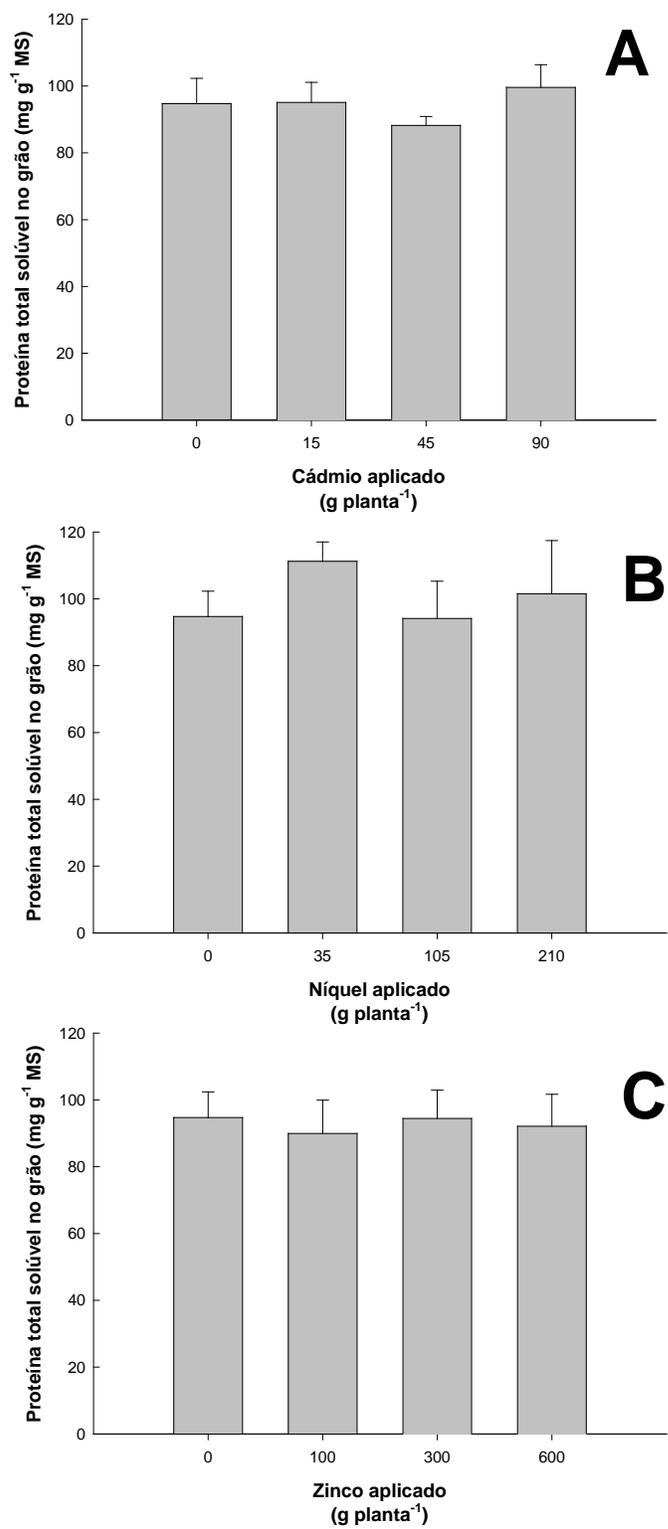


Figura 3 - Teor de proteína total solúvel em grãos de cafeeiro nos tratamentos Cd (A), Ni (B) e Zn (C)

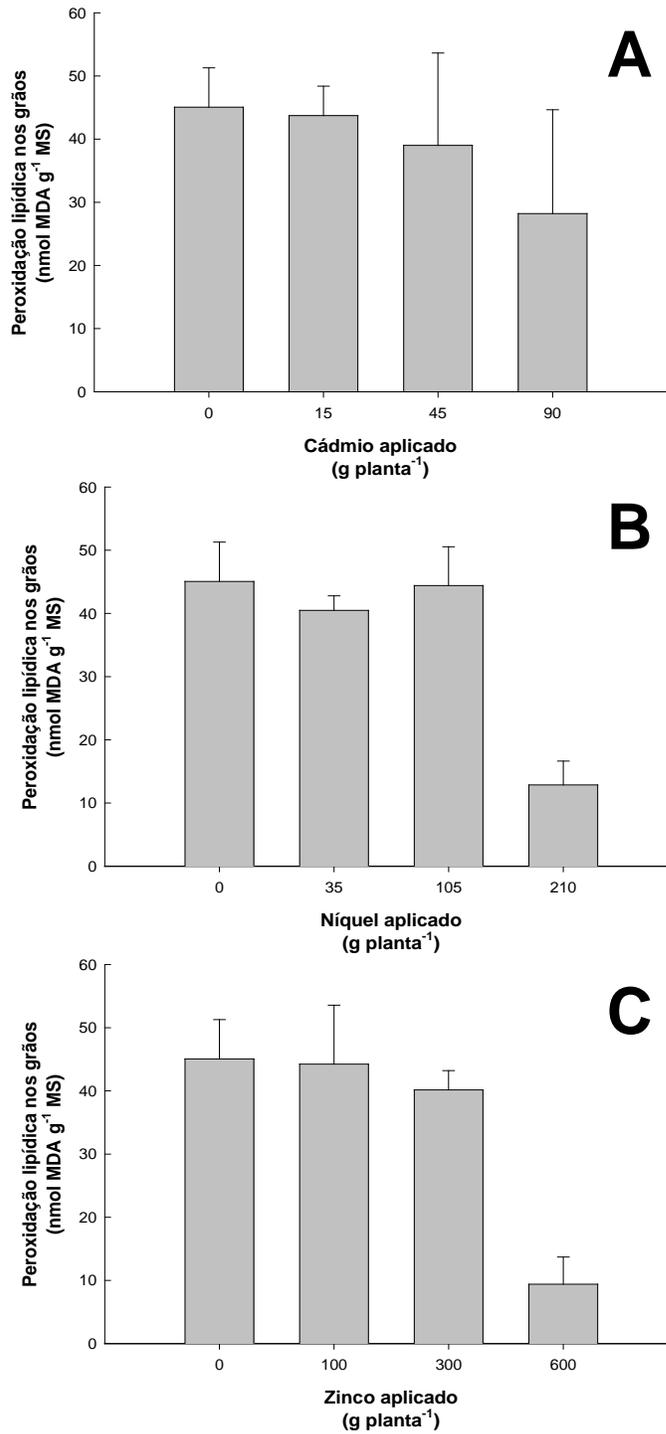


Figura 4 – Conteúdo de MDA em frutos de cafeeiro (2008) expostos aos metais Cd (A), Ni (B) e Zn (C).

Com a aplicação das doses de Ni e Zn nos cafeeiros, observou redução do teor de aminoácido total solúvel comparativamente àquele obtido no controle, sem haver alteração pela aplicação de Cd (Tabela 6). Como não foi observado alteração no teor de proteína, possivelmente o metabolismo de aminoácidos foi comprometido com a aplicação de Ni e Zn.

O conteúdo de sacarose reduziu com o fornecimento das doses de Cd e Ni, em que a menor quantidade de sacarose foi constatada nos grãos provenientes das plantas que receberam 90 g planta⁻¹ de Cd. Nas plantas em que aplicou o Zn não observou variação no conteúdo de sacarose (Tabela 6). Com relação ao conteúdo de glicose e frutose, nenhuma alteração foi observada em decorrência da aplicação das doses de Cd, Ni e Zn, conforme apresentado na Tabela 6.

Os resultados de cafeína e ácido clorogênico na aplicação de 90 g planta⁻¹ de Cd foram maiores que o controle em 32,4% e 75,4%, respectivamente. Nas doses de 15 g planta⁻¹ de Cd e 45 g planta⁻¹ de Cd, bem como no fornecimento de Zn (100, 300 e 600 g planta⁻¹) e Ni (35, 105 e 210 g planta⁻¹) não houve variação nos teores desses atributos químicos (Tabela 6).

Tabela 6 – Teores de aminoácidos, sacarose, glicose, frutose, cafeína e ácido clorogênico (5-CQA) em grãos de cafeeiro expostos ao Cd, Ni e Zn

| Metal | Aplicado | Aminoácidos | Sacarose | Glicose | Frutose | Cafeína | 5-CQA |
|-------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | g planta ⁻¹ | | mg g ⁻¹ MS | | | % | |
| | Controle | 0,89 ± 0,16 | 72,9 ± 6,74 | 2,33 ± 0,30 | 4,94 ± 0,30 | 1,08 ± 0,06 | 3,33 ± 0,20 |
| Cd | 15 | 0,96 ± 0,15 | 70,8 ± 7,31 | 2,48 ± 0,19 | 5,25 ± 0,13 | 1,06 ± 0,10 | 4,29 ± 0,17 |
| | 45 | 0,53 ± 0,10 | 70,5 ± 9,10 | 2,16 ± 0,20 | 3,27 ± 0,71 | 1,14 ± 0,07 | 3,63 ± 0,21 |
| | 90 | 1,57 ± 0,89 | 18,5 ± 2,34 | 1,81 ± 1,11 | 4,43 ± 0,37 | 1,43 ± 0,12 | 5,84 ± 0,23 |
| Ni | 35 | 0,95 ± 0,08 | 72,8 ± 5,67 | 2,45 ± 0,45 | 4,30 ± 0,12 | 1,16 ± 0,05 | 5,00 ± 0,44 |
| | 105 | 0,60 ± 0,07 | 61,1 ± 3,40 | 1,95 ± 1,24 | 4,72 ± 0,45 | 1,02 ± 0,05 | 4,48 ± 0,17 |
| | 210 | 0,65 ± 0,04 | 58,6 ± 3,31 | 2,15 ± 1,23 | 4,64 ± 0,29 | 1,00 ± 0,07 | 4,15 ± 0,71 |
| Zn | 100 | 0,92 ± 0,14 | 66,13 ± 13,04 | 2,73 ± 0,41 | 6,35 ± 0,19 | 1,01 ± 0,05 | 4,24 ± 0,54 |
| | 300 | 0,86 ± 0,08 | 78,06 ± 6,40 | 2,20 ± 0,36 | 3,21 ± 0,66 | 1,02 ± 0,02 | 3,98 ± 0,40 |
| | 600 | 0,63 ± 0,04 | 74,82 ± 6,45 | 2,41 ± 0,33 | 4,67 ± 1,24 | 1,04 ± 0,05 | 4,07 ± 0,52 |

Em plantas submetidas a estresses bióticos (pragas e doenças) tem sido observado aumento desses atributos (cafeína e 5-CQA) (GURREIRO FILHO; MAZZAFERA, 2000). Entretanto, em relação à estresses abiótico, como no presente caso, não tem sido constatado relatos na literatura.

A qualidade dos grãos colhidos, em relação ao aspecto visual, tais como tamanho, uniformidade dos grãos e presença de defeitos foi prejudicada pela exposição do cafeeiro à aplicação de Cd (Tabela 5). Já a qualidade da bebida, avaliada pela prova de xícara, foi classificada como bebida dura independentemente do metal aplicado. Por sua vez, nas maiores doses de Cd (90 g planta^{-1}) e Ni ($210 \text{ g planta}^{-1}$), apesar da mesma classificação da bebida (dura), estes metais conferiram gosto metálico à bebida do café (Tabela 5). A associação entre estresses com o aumento do conteúdo de compostos fenólicos, em particular com o ácido clorogênico são relatados na literatura (DIXON; PAIVA, 1995). Por outro lado, isômeros de ácido clorogênico também têm sido relacionados à qualidade de bebida (MENEZES, 1994).

Tabela 7 – Dados sobre a qualidade da bebida da fração cereja de cafeeiros tratados com Zn, Ni e Cd

| Aplicado | Aspecto | Bebida | Conclusão |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Controle | Bom | Duro | Adstringente/imaturo leve/ acidez alta |
| | Regular | Duro | Amargo/verde/áspero/adstringente |
| | Bom | Duro | Limpo/acidez cítrica |
| | Bom | Duro | Limpo/acidez cítrica |
| | BOM | DURO | ADSTRINGENTE/ÁCIDO |
| 15 g planta ⁻¹ Cd | Bom | Duro | Adstringente |
| | Regular | Duro | Adstringente/fundo sujo |
| | Bom | Duro | Acidez alta/retrogosto metálico leve/adstringente |
| | Bom | Duro | Adstringente/imaturo |
| | BOM | DURO | Imaturo/adstringente/retrogosto levemente sujo ADSTRINGENTE |
| 45 g planta ⁻¹ Cd | Regular | Duro | Acidez alta/levemente adstringente |
| | Regular | Duro | Adstringente/final avinagrado |
| | Regular | Duro | Adstringente/final avinagrado |
| | Regular | Duro | Adstringente/verde/imaturo |
| | REGULAR | DURO | Sujo/adstringente ADSTRINGENTE/AVINAGRADO |
| 90 g planta ⁻¹ Cd | Ruim | Duro | Verde/adstringente/sujo – gosto de fumaça |
| | Ruim | Duro | Adstringente/imaturo/retrogosto salgado/sujo |
| | - | - | - |
| | - | - | - |
| | RUIM | DURO | Final levemente adstringente ADSTRINGENTE/ÁCIDO/METÁLICO |
| 35 g planta ⁻¹ Ni | Bom | Duro | Avinagrado/fermentado |
| | Regular | Duro | Adstringente |
| | Regular | Duro | Sujo/verde/adstringente |
| | Regular | Duro | Limpo/doura mediana |
| | REGULAR | Duro p/ melhor DURO | Acidez alta/doura elevada ÁCIDO |
| 105 g planta ⁻¹ Ni | Regular | Duro | Leve adstringente/doura e acidez média/retrogosto metálico leve |
| | Regular | Duro | Acidez média/corpo médio baixa/levemente adstringente |
| | Bom | Duro p/ melhor | Limpo sem defeitos |
| | Regular | Duro | Adstringente |
| | REGULAR | DURO | Leve adstringente/doura e acidez média/retrogosto metálico leve ADSTRINGENTE/ÁCIDO |
| 210 g planta ⁻¹ Ni | Regular | Duro | Adstringente |
| | Bom | Duro | Corpo/acidez/doura baixa/retrogosto metálico leve |
| | Regular | Duro | Acidez alta/leve adstringência/retrogosto metálico |
| | Bom | Duro | Corpo baixo/adstringência leve/cítrico |
| | REGULAR | DURO | Acidez alta/leve adstringência/retrogosto metálico ADSTRINGENTE/ÁCIDO/METÁLICO |
| 100 g planta ⁻¹ Zn | Regular | Duro | Doura baixa/acidez alta/retrogosto metálico/ leve adstringente |
| | Regular | Duro | Irregular/adstringente/acidez alta |
| | Bom | Duro | Adstringente/doura media-alta |
| | Bom | Duro | Adstringente/verde |
| | BOM | DURO | Adstringente/retrogosto sujo ADSTRINGENTE/ÁCIDO |
| 300 g planta ⁻¹ Zn | Bom | Duro | Levemente adstringente/acidez alta |
| | Bom | Duro | Adstringente/sujo |
| | Regular | Duro | Doura elevada com retrogosto azedo |
| | Regular | Duro | Doura alta/levemente adstringente |
| | REGULAR | DURO | Doura elevada com retrogosto azedo ADSTRINGENTE/AZEDO/DOURA |
| 600 g planta ⁻¹ Zn | Regular | Duro | Verde/adstringente |
| | Regular | Duro | Limpo/com doura leve |
| | Regular | Duro | Verde/adstringente/acidez alta |
| | Regular | Duro | Leve adstringente/corpo baixo/doura baixa/acidez alta |
| | REGULAR | DURO | Adstringente alta/ acidez desagradável ADSTRINGENTE/ÁCIDO |

Nos cortes histológicos de grãos de cafeeiros submetidos ao Cd, Ni e Zn não constataram alterações estruturais (Figura 5).

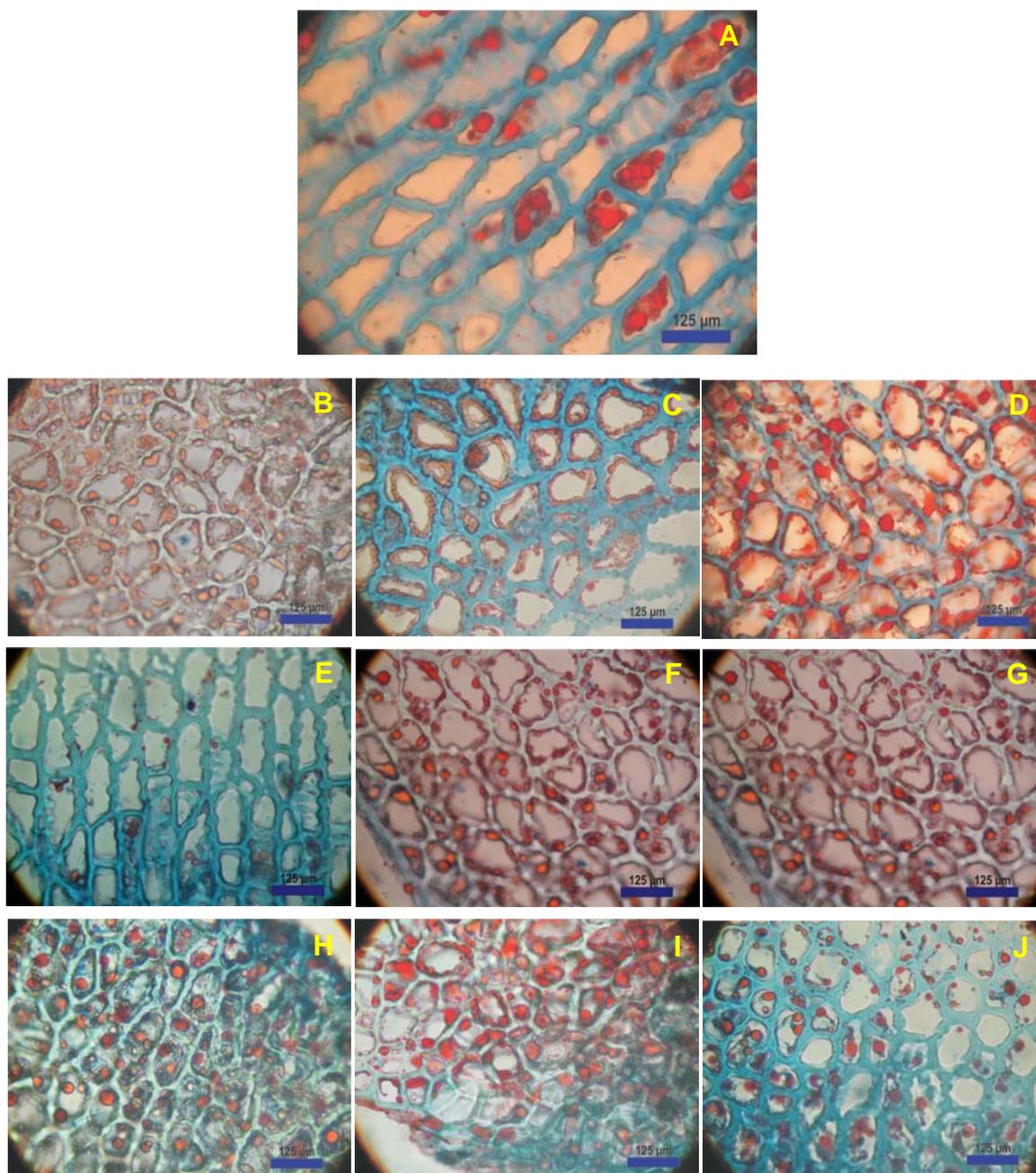


Figura 5 – Corte histológico dos grãos de café. A. Controle; B. 15 g planta⁻¹ Cd; C. 45 g planta⁻¹ Cd; D. 90 g planta⁻¹ Cd; E. 35 g planta⁻¹ Ni; F. 105 g planta⁻¹ Ni; G. 210 g planta⁻¹ Ni; H. 100 g planta⁻¹ Zn; I. 300 g planta⁻¹ Zn; J. 600 g planta⁻¹ Zn

Apesar dos grãos quando coletados apresentarem visualmente alterações, em relação à cor, formato e tamanho, após a reidratação dos mesmos, não foi percebida nenhuma diferença aparente para estes atributos.

Nos cortes histológicos observou que as paredes celulares, compostas principalmente de hemiceluloses, arabinogalactanos e mananos, que são reservas para os grãos, não apresentaram grandes diferenças comparativamente ao controle. Também evidenciou que as gotas de lipídeos em vermelho, visualmente não parecem terem sido alteradas, em razão da aplicação dos metais. Entretanto, no tratamento com a maior dose de Cd (90 g planta^{-1}) houve uma pequena redução da espessura das paredes.

4.4 Conclusões

A taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos não é prejudicada pela aplicação de Cd e Ni, exceto pelo Zn na maior dose ($600 \text{ g planta}^{-1}$); enquanto a menor área foliar ocorre na maior dose de Ni ($210 \text{ g planta}^{-1}$).

A fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática diminuem nas maiores doses de Cd (45 e 90 g planta^{-1}), e na maior dose de Zn ($600 \text{ g planta}^{-1}$) para a fotossíntese líquida e condutância estomática, sem influência da aplicação de Ni nestas variáveis.

A concentração de clorofilas e carotenóides não é detectada nas maiores doses de Cd (45 e 90 g planta^{-1}). A maior dose de Zn ($600 \text{ g planta}^{-1}$) prejudica a concentração destas variáveis (clorofila a, b, total e carotenóides), sem alteração pelo fornecimento de Ni.

A proteína total solúvel foliar aumenta com a dose de Ni e não altera com aplicação de Cd e Zn. A peroxidação lipídica na folhas aumenta com a dose de Cd; e não altera com a aplicação de Ni e Zn no cafeeiro.

A composição mineral dos grãos não é afetada pela aplicação dos metais. Em relação a infusão não são detectados metais pesados, exceto para o Mn, cuja concentração reduz com a aplicação de Cd, Ni e Zn.

A prova de xícara da bebida do café apresenta gosto metálico pela aplicação das maiores doses de Cd e Ni.

Referências

AKCAY, U.C.; ERCAN, O.; KAVAS, M.; YILDIZ, L.; YILMAZ, C.; OKTEM, H.A.; YUCEL, M. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v. 61, p. 21-28, 2010.

ANDREWS, R.K.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Urea and urease. **Advances in Inorganic Biochemistry**, New York, v. 6, p. 245-283, 1984.

ANVISA. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.html>. Acesso em: 24 nov. 2010.

BACHIR, D.M.L.; WU, F.B.; ZHANG, G.P.; WU, H.X. Genotypic difference in effect of cadmium on the development and mineral concentrations of cotton. **Communications in soil science and plant analysis**, New York, v. 35, p. 285-299, 2004.

BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 14, p. 89-97, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.

BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants: Transley review. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, p. 677-702, 2007.

BROWN, P.H.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 501-803, 1987.

CHANEY, R.L. Zinc phytotoxicity. In: ROBSON, A.D. (ed) **Zinc in Soil and Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993. p. 135-150.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 475-486, 2001.

DART, S.K.; NURSTEN, H.E. Volatile components in coffee. IN: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (ed.) **Chemistry, Vol I**. Elsevier Applied Science, London, pp. 223-265, 1985.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 98, p. 29-36, 1997.

DIXON R.A., PAIVA N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant cell**, Rockville, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). a metalloenzyme. Simple biological role for nickel? **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 97, p. 4131-4133, 1975.

DRAZKIEWICZ, M.; BASZYNSKI, T. Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 1013-1021, 2005.

DURCEKOVA, K.; HUTTOVA, J.; MISTRİK, I.; OLLE, M.; TAMAS, L. Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 290, p. 61-68, 2007.

EKMEKÇI, Y.; TANYOLAÇ, D.; AYHAN, B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, p. 600-611, 2008.

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

GAO, J.M.; XIAO, Q.; DING, L.P.; CHEN, M.J.; YIN, L.; LI, J.Z.; ZHOU, S.Y.; HE, G.Y. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in *Alternanthera phioxeroides* and *Oryza sativa* subjected to drought stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 56, p. 89-95, 2008.

GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth, urease activity and nitrogen metabolites of *Brassica napus* grown with NH_4NO_3 or urea as N source. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, p. 65-71, 1999.

GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 190, p. 153-162, 1997.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; BOTTCHER, A.; POT, D.; PEREIRA, L.F.P.; LEROY, T.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCHINI, P. Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, p. 179-187, 2007.

GOMES-JÚNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Funcional Plant Biology**, Victoria, v. 34, p. 449-456, 2007.

GOMES-JÚNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; GRATAO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 420-429, 2006a.

GOMES-JÚNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATAO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1330-1337, 2006b.

GOULART, P.F.P.; ALVES, J.D.; CASTRO, E.M.; FRIES, D.D.; MAGALHÃES, M.M.; MELO, H.C. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 662-666, 2007.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUERREIRO FILHO, O., MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1447-1464, 2000.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, Dusseldorf, v. 125, p. 2141-2145, 1968.

HEATH, S.M.; SOUTHWORTH, D.; D'ALLURA, J.A. Localization of nickel in epidermal subsidiary cells of leaves of *Thlaspi montanum* var. *siskiyouense* (Brassicaceae) using energy dispersive x-ray microanalysis. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 158, p. 184-188, 1997.

HERNÁNDEZ, L.E.; GÁRATE, A.; CARPENA-RUIZ, R. Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 189, p. 97-106, 1997.

JIN, X.F.; YANG, X.E.; ISLAN, E.; LIU, D.; MAHMOOD, Q.; LI, H.; LI, J. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Plant physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 997-1006, 2008.

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

LEA, J.P.; MOROT-GAUDRY, J.F. **Plant nitrogen**. Berlin: Springer Verlag, 2001. 407 p.
LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; JOY, K.W. Ammonia assimilation in higher plants. In: MENGEL, K.; PILBEAM, D.J. (Ed.). **Nitrogen metabolism of plants**. Oxford: Clarendon, 1992. p. 153. (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 33).

LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* in leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 11, p. 591-592, 1983.

LIU, C.P.; SHEN, Z.G.; LI, X.D. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensi*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, p. 116-120, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba, Potafos, 1997. 319p.

MALIK, J.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; BALIK, J.; KOKOSKA, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 520-525, 2008.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 2nd edn. London: Academic Press, 1995.

MARTINS, D.R.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Qualidade do grão e da bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 115-126, 2005.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 103-110, 1998a.

_____. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, p. 189-196, 1998b.

MEDIOUNI, C.; BENZARTI, O.; TRAY, B.; GHORBELL, M.H.; JEMAL, F. Cadmium and copper toxicity for tomato seedlings. **Agronomical and Sustainable Development**, Paris, v. 26, p. 227-232, 2006.

MENEZES H.C. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and isomers of caffeoylquinic acid. **Food Chemistry**, London, v. 50, p. 293-296, 1994.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S.V.; PRASAD, M.N.V. Phytochelation synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 44, p. 25-37, 2006.

MOBLEY, H.L.T., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 451-480, 1995.

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L.C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **Journal of nutrition**, Philadelphia, v. 138, p. 2309-2315, 2008.

PAPAZOGLU, E.G.; SERELIS, K.G.; BOURANIS, D.L. Impact of high cadmium and nickel soil concentration on selected physiological parameters of *Arundo donax* L. **European journal of soil biology**, Montrouge, v. 43, p. 207-215, 2007.

PARIDA, B.K.; CHHIBBA, I.M.; NAYYAR, V.K. Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, p. 113-119, 2003.

POULIK, Z. The danger of cumulation of nickel in cereals on contaminated soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 63, p. 25-29, 1997.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico/FUNDAG. 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).

RAMALHO, J.C.; CAMPOS, P.S.; TEIXEIRA, M.; NUNES, M.A. Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. **Plant Science**, Limerick, v. 135, p. 115-124, 1998.

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

REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 33, p. 315-324, 2009.

ROSATI, C.; AQUILANI, R.; DHARMAPURI, S.; PALLARA, P.; MARUSIC, C.; TAVAZZA, R.; BOUVIER, F.; CAMARA, B.; GIULIANO, G. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. **The plant Journal**, Oxford, v.24, p. 413-419, 2000.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidant enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

SHARMA, P.N.; TRIPATHIA, A.; BISHT, S.S. Zinc requirement for stomatal opening in cauliflower. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 751-756, 1995.

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. IN: PRASAD, M.N.V. (ed.) **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 84-126, 2004.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. A role for trigonelline during imbibition and germination of coffee seeds. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, p. 605-611, 2000b.

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

TEWARI, R.K.; KUMAR, P.; SHARMA, P.N. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Berlin, v. 171, p. 286-294, 2008.

UTOMO, H.D.; HUNTER, K.A. Particle concentration effect: Adsorption of divalent metal ions on coffee grounds. **Bioresource technology**, Essex, v. 101, p. 1482-1486, 2010a.

_____. Adsorption of divalent copper, zinc, cadmium and lead ions from aqueous solution by waste tea and coffee adsorbents. **Environmental Technology**, London, v. 27, p. 25-32, 2010b.

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 197-204, 2006.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Impact of heavy metal toxicity on plant growth, symbiosis, seed yield and nitrogen and metal uptake in chickpea. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 47, p. 712-720, 2007.

YAKIMOVA, E.T.; KAPCHINA, V.M.; LAARHOVEN, L.J.; HARREN, F.M.; WOLTERING, E.J. Involvement of ethylene and lipid signaling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 581-589, 2006.

YANG, X.E.; LI, T.Q.; YANG, J.C.; HE, Z.L.; LU, L.L.; MENG, F.H. Zinc compartmentation in root, transport into xylem, and absorption into leaf cells in the hyperaccumulating species of *Sedum alfredii* Hance. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 185-195, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Evolução do cafeeiro exposto as doses de 15, 45 e 90 g planta⁻¹ de Cd aos 60, 321 e 660 dias após o início da aplicação

15 g planta⁻¹ de Cd



60dias



321 dias



660 dias

45 g planta⁻¹ de Cd



60dias



321 dias



660 dias

90 g planta⁻¹ de Cd



60dias



321 dias



660 dias

APÊNDICE B – Evolução do cafeeiro exposto as doses de 35, 105 e 210 g planta⁻¹ de Ni aos 60, 321 e 660 dias após o início da aplicação

35 g planta⁻¹ de Ni



60dias



321 dias

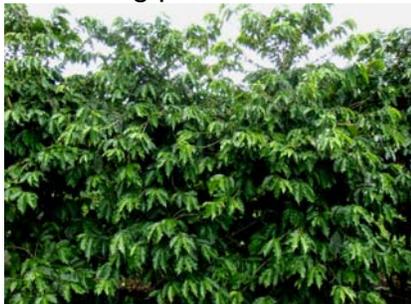


660 dias

105 g planta⁻¹ de Ni



60dias



321 dias



660 dias

210 g planta⁻¹ de Ni



60dias



321 dias



660 dias

APÊNDICE C – Evolução do cafeeiro exposto as doses de 100, 300 e 600 g planta⁻¹ de Zn aos 60, 321 e 660 dias após o início da aplicação

100 g planta⁻¹ de Zn



60dias



321 dias



660 dias

300 g planta⁻¹ de Zn



60dias



321 dias



660 dias

600 g planta⁻¹ de Zn



60dias



321 dias



660 dias