



Mara Rita Pina Palma Mourinho

Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Biofortificação do grão de *Triticum aestivum* L. em zinco

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa,
Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor
Associado com Agregação na Faculdade de Ciências e
Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando Manuel Anjos Henrique
Arguentes: Prof. Doutor José Norberto Prates Coutinho;
Prof. Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Morei
Raymundo

Vogais: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte;
Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon.



Dezembro de 2016



Biofortificação do grão de *Triticum aestivum* L. em zinco

Mara Mourinho

2016



Mara Rita Pina Palma Mourinho

Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Biofortificação do grão de *Triticum aestivum* L. em zinco

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa,
Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor
Associado com Agregação na Faculdade de Ciências e
Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando Manuel Anjos Henrique
Arguentes: Prof. Doutor José Norberto Prates Coutinho;
Prof. Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Morei
Raymundo

Vogais: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte;
Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon.



Dezembro de 2016

Copyright

Copyright © - Todos os direitos reservados. Mara Rita Pina Palma Mourinho.
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

“Biofortificação do grão de *Triticum aestivum* L. em Zinco”

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa tem o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho surge na sequência de um projecto de investigação, na área do melhoramento genético de *Triticum aestivum*, com base na biofortificação de minerais, em particular o zinco. Neste enquadramento, gostaria de agradecer ao grupo de investigação que acompanhou este projecto, nomeadamente os meus orientadores Professora Maria Fernanda Pessoa e Professor Fernando Lidon, assim como aos investigadores Dr^a Paula Scotti, Dr José Cochicho, Isabel Pais, Eng^o Eduardo Leitão e Professor Fernando Reboredo.

Gostaria de agradecer em particular ao Professor Fernando Lidon pela enorme confiança depositada, pela ajuda e partilha de conhecimento, pela amizade, incentivo e força. À Professora Maria Fernanda Pessoa pelo enorme carinho, apoio e amizade e ao Professor Fernando Reboredo pela ajuda e apoio.

Este trabalho também não teria sido possível sem o apoio das amigas e colegas de investigação, Karliana Oliveira e Inês Maria Pataco, a quem deixo o meu agradecimento pela partilha dos momentos bons, angústias, companheirismo e amizade.

Dedico este trabalho à minha família, ao meu namorado e amigos. Aos meus pais, por serem um símbolo de resiliência e por me ensinarem desde sempre a não desistir. Por me mostrarem que nada se consegue sem esforço e a não ter medo dos desafios. Aos meus irmãos e restante família, o meu obrigada pelo incentivo e apoio.

Gostaria de deixar um especial agradecimento ao Miguel, pela compreensão da minha ausência e reduzida disponibilidade em prol deste trabalho, pelo constante apoio e ajuda.

Aos meus amigos, pela força, apoio e compreensão da minha ausência em muitos momentos de convívio. A amizade está sempre presente.

Resumo

A malnutrição mineral tem cada vez maior expressão mundial, em particular nos países em desenvolvimento, com o Zn e o Fe a ocuparem os lugares de destaque entre as populações. Neste contexto, a biofortificação baseada no enriquecimento dos alimentos base em micronutrientes, tem sido apontada como a solução mais promissora, no entanto, deve ser otimizada, de modo a que esse valor nutricional acrescido seja biodisponível para o organismo. O trabalho desenvolvido considerou três vertentes: o crescimento em ambiente controlado com dotação de rega no solo, para visualização da elasticidade metabólica do genótipo; o crescimento em ambiente parcialmente controlado (estufa) mas ainda com dotação de rega no solo, mas agora numa situação sem controlo dos principais factores ambientais (fotoperíodo, intensidade luminosa, humidade relativa, temperatura diurna / nocturna e CO₂); o crescimento em talhões no campo, com adubação de fundo e cobertura, apoiado ainda com adubação foliar, para avaliação do sistema de biofortificação em condições agrícolas. Considerando a importância, como alimento base, da *Triticum aestivum* L. cv Roxo em Portugal, neste estudo utilizaram-se plantas controlo F0 (0,3/0,3) e plantas biofortificadas provenientes da 4ª geração (F4), submetidas a um tratamento similar ao controlo e a uma carga nutricional completa (micro e macronutrientes) 5 vezes superior (F4 (0,3/0,3)) e (F4 (1,5/1,5)), respectivamente. F4 (0,3/0,3) apresentou os melhores resultados em termos de rendimento de grão, nas diferentes condições de ensaio, embora o tratamento controlo tenha apresentado as melhores características tecnológicas para a obtenção de farinha. Em condições de campo, o tratamento controlo apresentou melhor rendimento do grão, embora F4 (0,3/0,3) tenha apresentado os melhores teores de micro e macroelementos. F4 (1,5/1,5) não apresentou bom desempenho no ensaio de “agricultor”.

Em suma, o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou-se como o mais apropriado a uma biofortificação de sucesso, em condições agrícolas, embora com diminuição significativa no rendimento do grão. Contudo, a utilização de fertilizantes agrícolas, de forma adequada, permite um incremento nutricional dos grãos, sem perda significativa de rendimento, sendo a aplicação foliar de Zn, em combinação com a aplicação de Zn no solo, a mais auspiciosa. Adicionalmente, a aplicação foliar de Zn tem maior impacto se for aplicada na fase inicial da formação e enchimento do grão.

Abstract

Micronutrient deficiencies are becoming a worldwide health problem, especially in Zn and Fe, in developing countries. Micronutrients enrichment in staple foods is the most promising solution to make the micronutrients available to the human body. This work considered three experimental designs: plant growth on controlled environment with irrigation in soil, in order to analyse the metabolic genotype elasticity; plant growth in greenhouse with soil irrigation to assess the metabolic genotype in some uncontrolled conditions; sowing in experimental field following current agronomic practices and additional foliar fertilization to evaluate the metabolic genotype without any climatic controlled conditions. Considering the importance of *Triticum aestivum* L. cv Roxo, as a staple food in Portugal, in this study, control F0 (0,3/0,3) and biofortified plants (F4) were used. The biofortified crops were obtained in the 4th primogeniture, from plants submitted to a treatment similar to the control and from a 5 times higher levels of a full nutrient solution (with micro and macronutrients) (F4 (0,3/0,3)) and (F4 (1,5/1,5)), respectively. F4 (0,3/0,3) had the best grain yield in the three different trials conditions, although the F0 (0,3/0,3) had the best technologic features to obtain industrial flour. In the experimental field, F0 (0,3/0,3) had the best grain yield, F4 (0,3/0,3) had the most micro and macroelements and F4 (1,5/1,5) had the worst results.

F4 (0,3/0,3) had the most promising results to improved flour wheat in Zn, in field conditions, even with a little bit less grain yield. On the other hand, zinc foliar fertilization in combination with soil zinc fertilization is the most auspicious solution to enhanced nutritional value of wheat. Furthermore, foliar zinc fertilization has the most efficiency when applied during grain formation and grain filling.

Lista de Abreviaturas

ALE – Aleurona
ANOVA – Analysis Of Variance
Ca - *Circa*
Cf – confira
Chl – Chlorophyll
 C_i – Concentração intercellular de CO_2
CIAT / IFPRI – International Center for Tropical Agriculture / International Food Policy Research Institute
CIE – *Comission Internationale de L'Éclairage*
CPD – Critical Point Dryer
Cv – cultivar
DM – Digital Microscopes
EDXRF – Energy Dispersive X-Ray Fluorescence
EMB – Embrião
END – Endosperma
F0 (0,3/0,3) – Grãos provenientes da 1ª geração de fortificação, com 0,3 vezes a solução de Hoagland.
F4 (0,3/0,3) – Grãos provenientes da 4ª geração de fortificação, com 0,3 vezes a solução de Hoagland
F4(1,5/1,5) – Grãos provenientes da 4ª geração de fortificação, com 1,5 vezes solução de Hoagland
GPC – Grain Protein Content
 g_s – Conductância estomática
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
i.e. – *Id est*
ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy
NIST - National Institute of Standards and Technology
NP – Norma Portuguesa
NPQ – Non Photochemical Quenching
PAR – Photosynthetically Active Radiance
PMG – Peso de Mil Grãos
 P_n – Photosynthetic net rate
PSII – Photosystem II
SDD – Silicon Drift Detector
SDS – Sodiumdodecylsulphate
USA – United States of America
WHO – World Health Organization
 ΔE – Euclidian Distance
 ϕ_e - Estimate of the Quantum Yield of Photosynthetic Noncyclic Electron Transport
ETR – Eletronic transference rate
F0 – Fluorescência mínima basal
 F_v/F_m - Eficiência quântica máxima do PSII
 F_v'/F_m' - Eficiência fotoquímica de conversão de energia do PSII à luz
Y (NPQ) – Yield of regulated quantum energy dissipated in PSII
Y (NO) – Yield of non regulated quantum energy dissipated in PSII
NPQ – Non- photochemical quenching
 q_p – Photochemical extinction coefficient
 q_L – Non-photochemical extinction coefficient
 $P \leq 0,05$ – Nível de confiança de 95 %

Índice de matérias

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract	V
Lista de Abreviaturas.....	VII
1. Capítulo I – Introdução.....	1
2. Capítulo II – Estado da arte	3
2.1. Ingestão de zinco – alguns aspectos relevantes.....	3
2.2. Biofortificação de <i>Triticum aestivum</i> em zinco	4
2.2.1. Sistemas de fertilização	5
2.2.2. Sistemas de absorção, translocação e acumulação do mineral nos tecidos vegetais.....	7
2.3. Caracterização do grão de <i>Triticum aestivum</i>	8
2.3.1. Obtenção de farinha biofortificada	10
3. Capítulo III - Materiais e Métodos	15
3.1. Material Biológico	15
3.1.1 Crescimento em ambiente controlado.....	15
3.1.2 Crescimento em estufa.....	16
3.1.3 Crescimento em cultura de campo.....	16
3.2. Métodos analíticos	18
3.2.1. Determinação do peso seco	18
3.2.2. Elementos minerais.....	18
3.2.2.1. Espectrofluorimetria acoplada com raio X.....	18
3.2.2.2. Espectrofotometria de emissão de plasma.....	19
3.2.2.3. Fluorescência de raios X	20
3.2.3. Microscopia electrónica de varrimento.....	20
3.2.4. Microscopia óptica	21
3.2.5. Trocas gasosas foliares	21
3.2.6. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	21
3.2.7. Fração lipídica total e ácidos gordos.....	22
3.2.8. Glicídios.....	23
3.2.9. Azoto e proteínas	24
3.2.10. Índice de sedimentação SDS	25
3.2.11. Determinação da cor.....	25
3.2.12. Humidade	26
3.2.13. Cinzas.....	26
3.2.14. Peso de mil grãos	27
3.3. Tratamento estatístico	27
4. Capítulo IV - Resultados e Discussão	29
4.1. Biofortificação em ambiente controlado.....	29

4.1.1.	Desenvolvimento fenológico	29
4.1.2.	Produção de biomassa	32
4.1.3.	Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de elementos minerais	42
4.1.3.1.	Micronutrientes	42
4.1.3.1.1	Zinco	42
4.1.3.1.2	Ferro.....	47
4.1.3.1.3	Cobre	52
4.1.3.1.4	Manganês.....	56
4.1.3.2.	Macronutrientes.....	60
4.1.3.2.1	Potássio.....	60
4.1.3.2.2	Fósforo.....	63
4.1.3.2.3	Enxofre	67
4.1.3.2.4	Cálcio.....	70
4.1.3.2.5	Magnésio.....	74
4.1.4.	Cinética de absorção e acumulação.....	79
4.1.4.1.	Micronutrientes	79
4.1.4.1.1.	Zinco	79
4.1.4.1.2.	Ferro.....	82
4.1.4.1.3.	Cobre	84
4.1.4.1.4.	Manganês.....	86
4.1.4.2.	Macronutrientes.....	89
4.1.4.2.1.	Potássio.....	89
4.1.4.2.2.	Fósforo.....	91
4.1.4.2.3.	Enxofre	93
4.1.4.2.4.	Cálcio.....	95
4.1.4.2.5.	Magnésio.....	97
4.1.5.	Cinética de síntese de fotoassimilados	99
4.1.6.	Composição do grão	114
4.1.6.1.	Localização de elementos minerais.....	114
4.1.6.2.	Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos.....	120
4.1.6.3.	Glícidos	122
4.1.6.4.	Proteínas.....	123
4.1.7.	Características tecnológicas.....	125
4.1.7.1.	Índice de SDS.....	125
4.1.7.2.	Teor de cinzas	127
4.1.7.3.	Cor.....	127
4.2.	Biofortificação em estufa.....	128
4.2.1	Desenvolvimento fenológico	128
4.2.2	Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de assimilados	129
4.2.2.1	Micronutrientes	129
4.2.2.1.1	Zinco	129
4.2.2.1.2	Ferro.....	130

4.2.2.1.3	Cobre	131
4.2.2.1.4	Manganês	132
4.2.2.2	Macronutrientes.....	133
4.2.2.2.1	Potássio.....	133
4.2.2.2.2	Fósforo.....	134
4.2.2.2.3	Enxofre	135
4.2.2.2.4	Cálcio.....	136
4.2.2.2.5	Magnésio.....	137
4.2.3	Cinética de absorção e acumulação	138
4.2.3.1	Micronutrientes	138
4.2.3.2	Macronutrientes.....	139
4.2.4	Composição do grão	140
4.2.4.1	Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos.....	140
4.2.4.2	Glícidos	142
4.2.4.3	Proteínas.....	143
4.2.5	Características tecnológicas.....	144
4.2.5.1	Índice SDS	144
4.2.5.2	Teor de cinzas	145
4.2.5.3	Cor.....	146
4.3.	Biofortificação em campo	147
4.3.1	Desenvolvimento fenológico	147
4.3.2	Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de minerais.....	148
4.3.2.1	Micronutrientes	148
4.3.2.1.1	Zinco	148
4.3.2.1.2	Cobre	150
4.3.2.1.3	Manganês.....	151
4.3.2.1.4	Ferro.....	152
4.3.2.2	Macronutrientes.....	153
4.3.2.2.1	Potássio.....	153
4.3.2.2.2	Fósforo.....	154
4.3.2.2.3	Enxofre	155
4.3.2.2.4	Cálcio.....	156
4.3.2.2.5	Magnésio.....	157
4.3.3	Cinética de acumulação de minerais.....	158
4.3.3.1	Micronutrientes	158
4.3.3.2	Macronutrientes.....	160
4.3.4	Composição do grão	161
4.3.4.1	Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos.....	161
4.3.4.2	Glícidos	163
4.3.4.3	Proteínas.....	164
4.3.5	Características tecnológicas.....	166
4.3.5.1	Índice SDS	166

4.3.5.2	Cinzas.....	167
4.3.5.3	Cor.....	168
5.	Capítulo V - Conclusão	169
6.	Referências Bibliográficas.....	171

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Evolução e relação das variedades de trigo e seus genomas (Shewry, 2009).	9
Figura 2.2 – Caracterização do grão de trigo com representação dos seus componentes principais: embrião (EMB), endosperma (END) e aleurona (ALE) (Cakmak <i>et al.</i> , 2010).	10
Figura 3.1 - Sementeira de campo, com divisão dos talhões (A) e cultura desenvolvida (B).	17
Figura 3.2 - Representação esquemática do conceito de detecção de minerais com emissão de raios-X, através de analisadores portáteis <i>Niton Thermal Scientific, modelo Xlt</i>	18
Figura 3.3 - Exemplo de um espectro electromagnético na gama dos raios-X realizado numa amostra moída de trigo mole.	19
Figura 3.4 - Exemplo de um registo espectral relativo à separação de ácidos gordos, obtido de acordo com o procedimento adoptado para separação e quantificação de ácidos gordos.	23
Figura 3.5 - Exemplo de um registo espectral relativo a padrões de glicídios, de acordo com o procedimento adoptado para separação e quantificação de ácidos gordos.	24
Figura 3.6 - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIELab, em que L* representa a escala de cor entre o preto (0) e o branco (100), a* varia entre o verde (-) e o vermelho (+), e b* varia entre o azul (-) e o amarelo(+).	26
Figura 4.1 - Desenvolvimento fenológico do trigo mole (dias) submetido aos diferentes tratamentos (Adaptado de Dias e Lidon, 2009).	29
Figura 4.2 - Visualização de alguns aspectos do ciclo de vida do trigo mole (A) – Sementeira; (B) – Estados iniciais de desenvolvimento; (C) – Afilhamento; (D) – Folha-bandeira; (E) – Emborrachamento; (F) – Ântese; (G) – Enchimento do grão; (H) – Grão maduro.	30
Figura 4.3 - Visualização do estado das plantas desenvolvidas sobre o tratamento F0 (0,3/0,3) (A), F4 (0,3/0,3) (B) e F4 (1,5/1,5) (C).	30
Figura 4.4 - Peso seco médio na raíz (g) e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das planta.	33
Figura 4.5 - Peso seco médio (g) da parte aérea e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, ao longo do ciclo de vida das plantas.	34
Figura 4.6 - Peso seco médio da espiga e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	35
Figura 4.7 – Ilustração dos grãos maduros, provenientes de cada tratamento.	36
Figura 4.8 - Razão relativa aos valores médios do peso seco da raíz e parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das planta.	37
Figura 4.9 - Razão relativa aos valores médios do peso fresco da raíz e parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	37
Figura 4.10 - Peso seco (média percentual e respectivo erro padrão) para os diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	38
Figura 4.11 - Teor médio de matéria orgânica e inorgânica (%) na raíz, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	39
Figura 4.12 - Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) na parte aérea, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	40
Figura 4.13 - Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) na espiga, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	41
Figura 4.14 – Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) no grão maduro, entre os tratamentos.	41
Figura 4.15 - Conteúdo de Zn (mg kg ⁻¹ m.s.) ao longo do ciclo de vida das plantas (média e erro padrão; n=3), nos diferentes tratamentos de fertilização.	42
Figura 4.16 - Teor de Zn (mg kg ⁻¹ m.s.) na raíz (média e erro padrão; n = 3), durante o ciclo de vida da planta com diferentes tratamentos de fertilização.	44
Figura 4.17 - Teor de Zn (mg kg ⁻¹ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão (n=3), durante o ciclo de vida das plantas, com diferentes tratamentos de fertilização.	45
Figura 4.18 - Teor de Zn (mg kg ⁻¹ m.s.) nas espigas e no grão (canto superior direito), e respectivo erro padrão (n=3), durante o desenvolvimento da planta e no final da maturação, respectivamente.	47
Figura 4.19 - Teor médio de Fe (mg kg ⁻¹ m.s.) na raíz e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	49
Figura 4.20 – Teor médio de Fe (mg kg ⁻¹ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	50
Figura 4.21 – Teor médio de Fe (mg kg ⁻¹ m.s.) na espiga e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	51

Figura 4.22 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	52
Figura 4.23 - Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) na raíz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	53
Figura 4.24 – Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	54
Figura 4.25 – Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	55
Figura 4.26 – Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	56
Figura 4.27 - Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) na raíz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	57
Figura 4.28 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	58
Figura 4.29 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	59
Figura 4.30 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.	60
Figura 4.31 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raíz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	61
Figura 4.32 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	62
Figura 4.33 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão, na espiga e no grão (canto superior direito) nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	63
Figura 4.34 - Teor médio de P (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raíz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	64
Figura 4.35 - Teor médio de P (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	66
Figura 4.36 - Teor médio de P (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na espiga e no grão (canto superior direito), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	67
Figura 4.37 - Teor médio de S (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raíz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	68
Figura 4.38 - Teor médio de S (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	69
Figura 4.39 - Teor médio de enxofre (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão, na espiga e no grão (canto superior direito), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.	70
Figura 4.40 - Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na raíz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	71
Figura 4.41 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	72
Figura 4.42 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	73
Figura 4.43 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) no grão e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.	74
Figura 4.44 - Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na raíz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	76
Figura 4.45 – Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	77
Figura 4.46 – Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.	78
Figura 4.47 – Teor médio de Mg nos grãos e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos. .	79
Figura 4.48 - Acumulação de Zn (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	81
Figura 4.49 - Absorção média diária de Zn (mg), durante o ciclo de vida da planta.	82
Figura 4.50 - Acumulação de Fe (μg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	84
Figura 4.51 - Absorção média diária de Fe (μg), durante o ciclo de vida da planta.	84
Figura 4.52 - Acumulação de Cu (μg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	86
Figura 4.53 - Absorção média diária de Cu (μg), durante o ciclo de vida da planta.	86
Figura 4.54 - Acumulação de Mn (μg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	88
Figura 4.55 - Absorção média diária de Mn (μg), durante o ciclo de vida da planta.	89
Figura 4.56 - Acumulação de K (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	90

Figura 4.57 - Absorção média diária de K (mg), durante o ciclo de vida da planta.	91
Figura 4.58 - Acumulação de P (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.	92
Figura 4.59 - Absorção total diária de P (mg), durante o ciclo de vida da planta.....	93
Figura 4.60 - Acumulação de S (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.	94
Figura 4.61 - Absorção total média diária de S (mg), durante o ciclo de vida da planta.	95
Figura 4.62 - Acumulação de Ca (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.	97
Figura 4.63 - Absorção total média diária de Ca (mg), durante o ciclo de vida da planta.....	97
Figura 4.64 - Acumulação de Mg (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.	99
Figura 4.65 - Absorção total média diária de Mg (mg), durante o ciclo de vida da planta.....	99
Figura 4.66 - Taxa fotossintética líquida ($\text{mmol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), média e erro padrão (n=4), nos diferentes tratamentos, na fase inicial do ciclo vegetativo, imediatamente após ântese e enchimento do grão (22, 73 e 102 dias após germinação, respectivamente).....	100
Figura 4.67 - Condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), entre os tratamentos, ao longo do ciclo de vida das plantas.	101
Figura 4.68 - Identificação de estomas nas páginas superiores das folhas de trigo mole, nos tratamentos controlo (A), F4 (0,3/0,3) (B) e F4 (1,5/1,5) (C), com ampliação de 100x.	102
Figura 4.69 - Média do número de estomas e respectivo erro padrão (n=3) nas duas faces das folhas e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do número de estomas, com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> correspondem às diferenças entre os tratamentos, em cada face individualizada.....	103
Figura 4.70 - Concentração intercelular de CO_2 (mL L^{-1})entre tratamentos, em diferentes períodos do ciclo de vida da planta.	104
Figura 4.71 - F_0 dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.	105
Figura 4.72 - F_v/F_m dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	106
Figura 4.73 - F_v'/F_m' dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	107
Figura 4.74 - ϕ_e dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.	108
Figura 4.75 - ETR dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	109
Figura 4.76 - Y(NPQ) dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	110
Figura 4.77 - Y(NO) dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	111
Figura 4.78 - NPQ dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.....	112
Figura 4.79 - q_p dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.	113
Figura 4.80 - q_L dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respetivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.	113
Figura 4.81 - Descrição dos componentes principais do grão: embrião (A), endosperma (B) e região apical terminal (C), através de microscopia electrónica de varrimento.	115
Figura 4.82 - Localização, com recurso a fluorescência de raios X (sistema μ -EDXRF), da acumulação dos micronutrientes na semente, no tratamento controlo (F0 (0,3/0,3) e tratamento de maior concentração de nutrientes na solução nutritiva (F4 (1,5/1,5)): A - Zn; B - Cu; C - Mn; D - Fe.....	116
Figura 4.83 - Localização, com recurso a fluorescência de raios X (sistema μ -EDXRF), da acumulação dos macronutrientes na semente, no tratamento controlo (F0 (0,3/0,3)) e tratamento de maior concentração de nutrientes na solução nutritiva (F4 (1,5/1,5)): A - K; B - P; C -S; D - Ca.....	117
Figura 4.84 - Fracção mássica (W%) referente aos elementos considerados, com recurso a microscopia electrónica de varrimento acoplada a microanálise de raios X, nomeadamente Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn, sendo o somatório de 100%, no embrião (A), endosperma (B) e extremidade (C) do grão.	118
Figura 4.85 - Microscopia electrónica de varrimento acoplada a microanálise de raios X e localização de elementos minerais na semente, particularmente no embrião (A), endosperma (B) e região apical terminal (C) para os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5).	119
Figura 4.86 - Teor total de lípidos ($\text{mg g}^{-1}\text{m.s.}$) (média e erro padrão, n=3), nos grãos em cada tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam diferenças significativas ($P\leq 0,05\%$) entre os tratamentos.	121
Figura 4.87 - Teor de ácidos gordos (C16:0, C18:1, C18:2, C18:0, C18:3, C20:0, C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C16:1, C14:1, C15:0, C20:1, C20:2, C22:0) (média e erro padrão; n=3) nos grãos de cada tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam diferenças significativas ($P\leq 0,05\%$) entre os tratamentos.	121

Figura 4.88 - Teor de açúcares (Estaquinose, Rafinose, Sacarose, Glucose, Frutose, Manitose e Galactose) (média e erro padrão; n=3) nos grãos, nos diferentes tratamentos. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos, relativamente ao teor de açúcares.	123
Figura 4.89 - Teor de proteína ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) nos grãos maduros, nos diferentes tratamentos.	125
Figura 4.90 - Média da capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3).	126
Figura 4.91 - Teor (%) de cinzas nos grãos, nos diferentes tratamentos.	127
Figura 4.92 - Teor médio de Zn (mg kg^{-1} m.s.) no grão e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	130
Figura 4.93 - Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	131
Figura 4.94 - Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	132
Figura 4.95 - Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	133
Figura 4.96 - Teor de K (mg kg^{-1} m.s.) no grão dos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão (n=3).	134
Figura 4.97 - Teor de P (mg.g^{-1} m.s.) no grão, nos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão (n=3).	135
Figura 4.98 - Teor de S (mg.g^{-1} m.s.) no grão, nos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão (n=3).	136
Figura 4.99 - Teor médio de Ca ($\text{g.}100\text{g}^{-1}$ m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	137
Figura 4.100 - Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	138
Figura 4.101 - Acumulação de micronutrientes (μg) nos grãos dos diferentes tratamentos.	139
Figura 4.102 - Acumulação de macronutrientes (μg) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	140
Figura 4.103 - Teor de lípidos totais (mg g^{-1} m.s.) dos grãos (média e erro padrão; n=3) , nos diferentes tratamentos.	141
Figura 4.104 - Teor de ácidos gordos dos grãos (média e erro padrão; n=3) nos diferentes tratamentos.	142
Figura 4.105 - Teor de glicídios ($\text{mg } 100 \text{mg}^{-1}$ m.s.) nos grãos (média e erro padrão; n=3) nos diferentes tratamentos.	143
Figura 4.106 - Teor de proteína nos grãos, nos diferentes tratamentos.	143
Figura 4.107 - Média da capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	145
Figura 4.108 - Teor de cinzas (%) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	146
Figura 4.109 - Peso seco de 1000 grãos (g), nos diferentes tratamentos.	148
Figura 4.110 - Teor médio de Zn (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos nos diferentes tratamentos.	150
Figura 4.111 - Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos nos diferentes tratamentos.	151
Figura 4.112 - Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos, nos diferentes tratamentos.	152
Figura 4.113 - Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos nos diferentes tratamentos.	153
Figura 4.114 - Teor médio de K (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9) nos grãos maduros, nos diferentes tratamentos.	154
Figura 4.115 - Teor médio de P (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	155
Figura 4.116 - Teor médio de S (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	156
Figura 4.117 - Teor médio de absorção de Ca (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos, nos diferentes tratamentos de fertilização.	157
Figura 4.118 - Teor médio de magnésio ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos, nos diferentes tratamentos.	158
Figura 4.119 - Acumulação de micronutrientes nos grãos (μg), nos diferentes tratamentos de fertilização.	159
Figura 4.120 - Acumulação de macronutrientes nos grãos (mg), nos diferentes tratamentos de fertilização.	160

Figura 4.121 - Teores médios e respectivo erro padrão (n=3) da fracção lípidica total (mg peso seco ⁻¹) nos grãos, nos diferentes tratamentos.	161
Figura 4.122 – Teor médio de ácidos gordos e respectivo erro padrão (n=3), juntamente com a análise de variância ($\alpha=0,05\%$), entre os tratamentos, para cada ácido gordo. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam as diferenças significativas entre os tratamentos.	162
Figura 4.123 - Teor médio de ácidos gordos e respectivos erros padrões (n=3), nos diferentes tratamentos.	162
Figura 4.124 – Teor de glícidos (mg 100mg ⁻¹ m.s.) nos grãos (média e erro padrão, n=3), nos diferentes tratamentos.	164
Figura 4.125 - Teor médio de proteínas (%) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	165
Figura 4.126 - Média de capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	166
Figura 4.127 - Média do teor de cinzas (%) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.	167

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Efeito das diferentes aplicações de Zn, na concentração do mineral na parte aérea e no grão, assim como no rendimento de <i>Triticum aestivum</i> L. (adaptado de Cakmak, 2008).	7
Tabela 4.1 - Média e respectivo erro padrão (n=9) dos parâmetros colorimétricos da parte aérea das plantas e análise de variância ($\alpha=0,05\%$), com a variável tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam as diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r</i> , <i>s</i> e <i>t</i> representam as diferenças significativas entre os períodos experimentais, relativamente a cada parâmetro colorimétrico individualizado.	31
Tabela 4.2 - Diferença de cor entre os tratamentos (ΔE), nos diferentes períodos experimentais: 45, 104 e 112 dias após germinação.	32
Tabela 4.3 - Média de peso seco na raiz (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da raiz, com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.	34
Tabela 4.4 - Média de peso seco na parte aérea (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da parte aérea, com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> e <i>t</i> indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.	34
Tabela 4.5 - Média de peso seco na espiga (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da espiga, com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> , indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.	35
Tabela 4.6 - Descrição produtiva de plantas, espigas e grãos, em termos de rendimento, para cada tratamento.	36
Tabela 4.7 - Média do teor de Zn na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos de amostras.	44
Tabela 4.8 - Média do teor de Zn na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> correspondem às diferenças significativas entre os períodos de amostras.	46
Tabela 4.9 - Média do teor de Zn na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	47
Tabela 4.10 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	47
Tabela 4.11 - Média do teor de Fe na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t, e u</i> correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	49
Tabela 4.12 - Média do teor de Fe na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	50
Tabela 4.13 - Média do teor de Fe na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	51
Tabela 4.14 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	52
Tabela 4.15 - Média do teor de Cu na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t e u</i> correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	53

Tabela 4.32 - Média do teor de S na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> , mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	69
Tabela 4.33 - Média do teor de S na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s</i> , mostram as diferenças significativas existentes entre os períodos de colheita de amostras.	70
Tabela 4.34 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> , indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos.	70
Tabela 4.35 - Média do teor de Ca na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b</i> e <i>c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> e <i>u</i> mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	72
Tabela 4.36 - Média do teor de Ca na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	73
Tabela 4.37 - Média do teor de Ca na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras <i>a, b, c</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras <i>r, s, t</i> , mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.	74
Tabela 4.38 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos.	74
Tabela 4.39 - Média do teor de Mg na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta.	76
Tabela 4.40 - Média do teor de Mg na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta.	77
Tabela 4.41 - Média do teor de Mg na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta.	78
Tabela 4.42 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	79
Tabela 4.43 - Cinética de Zn (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	81
Tabela 4.44 - Cinética de Fe (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	83
Tabela 4.45 - Cinética de Cu (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	85
Tabela 4.46 - Cinética de Mn (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	88
Tabela 4.47 - Cinética de K (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	90
Tabela 4.48 - Cinética de P (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	92
Tabela 4.49 - Cinética de S (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).	94

Tabela 4.50 - Cinética de Ca (mg) ao longo do ciclo de vida da planta planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).....	96
Tabela 4.51 - Cinética de Mg (mg) ao longo do ciclo de vida da planta planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).....	98
Tabela 4.52 - Média da taxa fotossintética líquida ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da taxa fotossintética líquida da planta, em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra <i>r</i> aponta a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.	100
Tabela 4.53 - Média da condutância estomática, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da condutância estomática, com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre as fases fenológicas e as letras <i>r, s</i> revelam as diferenças significativas entre os tratamentos.	102
Tabela 4.54 - Média da concentração intercelular de CO_2 , respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da concentração intercelular de CO_2 , com a variável de tratamento. As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre as fases fenológicas e as letras <i>r, s</i> correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos.	104
Tabela 4.55 - Média de F_0 , respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F_0 em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r,s</i> indicam a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	105
Tabela 4.56 - Média de F_v/F_m , respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F_v/F_m em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	106
Tabela 4.57 - Média de F_v/F_m , respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F_v/F_m em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra <i>r</i> indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.....	107
Tabela 4.58 - Média de ϕ_e respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de ϕ_e em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> e <i>c</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r</i> e <i>s</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	108
Tabela 4.59 - Média de ETR, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de ETR em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> e <i>c</i> , correspondem às diferenças estatísticas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r</i> e <i>s</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	109
Tabela 4.60 - Média de Y(NPQ), respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de Y(NPQ) em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r, s</i> revelam diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	110
Tabela 4.61 - Média de Y(NO), respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de Y(NO) em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças estatísticas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r,s</i> indicam as diferenças estatísticas entre os tratamentos, em cada período experimental.	111
Tabela 4.62 - Média de NPQ, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de NPQ em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras <i>r,s</i> indicam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	112
Tabela 4.63 - Média de q_p , respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de q_p em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra <i>r</i> indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.....	113
Tabela 4.64 - Média de q_L , respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de q_L em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras <i>a, b</i> , correspondem às diferenças entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra <i>r</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.	114

Tabela 4.65 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> correspondem às diferenças significativas ($P\leq 0,05\%$) entre os tratamentos.	126
Tabela 4.66 - Média e respectivo erro padrão (n=3) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.	128
Tabela 4.67 - Diferença de cor entre os tratamentos.	128
Tabela 4.68 - Características do desenvolvimento fenológico da planta em estufa, em cada tratamento.	129
Tabela 4.69 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	130
Tabela 4.70 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> , correspondem a diferenças significativas existentes entre os tratamentos.	131
Tabela 4.71 - Média do teor de Cu no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos.	132
Tabela 4.72 - Média do teor de Mn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> , correspondem a diferenças significativas existentes entre os tratamentos realizados.	133
Tabela 4.73 - Média do teor de K no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	134
Tabela 4.74 - Média do teor de P no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	135
Tabela 4.75 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos.	136
Tabela 4.76 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos.	137
Tabela 4.77 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> , indicam diferenças significativas entre os tratamentos efectuados.	138
Tabela 4.78 - Índice médio de duplas ligações e respectivo erro padrão (n=3), na fracção lipídica dos grãos dos diferentes tratamentos. A letra <i>a</i> indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	142
Tabela 4.79 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	145
Tabela 4.80 - Média e respectivo erro padrão (n=3) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.	146
Tabela 4.81 - Diferença de cor entre as amostras.	147
Tabela 4.82 - Média do peso seco de 1000 grãos, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	148
Tabela 4.83 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.	150
Tabela 4.84 - Média do teor de Cu no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	151
Tabela 4.85 - Média do teor de Mn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	152

Tabela 4.86 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	153
Tabela 4.87 - Média do teor de K no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	154
Tabela 4.88 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	155
Tabela 4.89 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	156
Tabela 4.90 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	157
Tabela 4.91 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	158
Tabela 4.92 - Índice médio de duplas ligações e respectivo erro padrão (n=3), na fração lipídica dos grãos dos diferentes tratamentos. As letras <i>a</i> e <i>b</i> correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos.	163
Tabela 4.93 - Média e erro padrão (n=3) do teor proteico (%) nos grãos, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de proteínas, com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	165
Tabela 4.94 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	166
Tabela 4.95 - Média e erro padrão (n=3) do teor de cinzas, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de cinzas (%), com a variável de tratamento. A letra <i>a</i> corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.	167
Tabela 4.96 - Média e respectivo erro padrão (n=3) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras <i>a</i> e <i>b</i> representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.	168
Tabela 4.97 - Diferença de cor entre as amostras.	168

1. Capítulo I – Introdução

Estima-se que actualmente cerca de três mil milhões de indivíduos possuem carências em micronutrientes, prevendo-se ainda um progressivo aumento nos próximos anos (Welch e Graham, 2004). E cerca de dois terços da mortalidade infantil (*i.e.*, anualmente cinco milhões) decorrem de má nutrição envolvendo deficiência em micronutrientes (Welch e Graham, 2004; Bouis e Welch, 2010).

A nível internacional a malnutrição é preocupante, possuindo maior impacte nos países em desenvolvimento, onde a agricultura é a principal fonte de nutrientes e da qual resultam outros produtos transformados (Welch e Graham, 2004). De facto, se os sistemas agrícolas não assegurarem a ausência de carências nutricionais nas matérias-primas poderá ficar, directa ou indirectamente, em causa a saúde pública nas sociedades humanas (Welch e Graham, 2004; Bouis e Welch, 2010).

No plano fisiológico, o organismo humano necessita de, pelo menos, 22 elementos minerais, os quais devem ser fornecidos através de uma dieta equilibrada. No entanto, a nível mundial verificam-se acentuadas deficiências em Fe, Zn, I, Se, Mg, Ca e Cu na população humana (White e Broadley, 2009). No caso particular dos micronutrientes, as respectivas carências contribuem para a mortalidade, deficiente desenvolvimento físico e psíquico infantil, elevados custos para a manutenção da saúde pública e desenvolvimento socioeconómico reduzido (Welch e Graham, 2004; Bouis e Welch, 2010). A insuficiente ingestão / biodisponibilidade de Zn nas dietas tradicionais da população com baixo poder económico, quando associada a uma maior necessidade deste nutriente em determinadas fases da vida (infância, adolescência e envelhecimento), promove uma deficiência fisiológica deste elemento (WHO, 2007). Um défice deste nutriente provoca atrasos no crescimento, hipogonadismo masculino, alterações neuro-sensoriais, cria funções imunes anormais e afeta as funções cognitivas (Prasad, 1993). Adicionalmente, o Zn funciona como antioxidante e dessa forma contribui para a estabilização das membranas celulares (Brown *et al.*, 1998).

Em diferentes culturas, a biofortificação tem sido considerada uma inovação agrícola, baseada no enriquecimento em micronutrientes de grãos, raízes e tubérculos (CIAT/IFPRI, 2004; Bouis, 2002; Bouis *et al.*, 2000). Neste enquadramento, de entre os alimentos base, destaca-se o trigo como um alvo importante para a biofortificação em Zn (Bouis *et al.*, 2000).

O consumo médio de trigo em Portugal e na Europa atinge 129 e 90 Kg/pessoa/ano, respetivamente (Galinha *et al.*, 2013). A União Europeia é o segundo maior produtor de trigo (em média 90 milhões de toneladas/ano, correspondendo a 16% da produção mundial) e um dos maiores consumidores (algumas estimativas apontam para cerca de 76 milhões de toneladas) (Shewry, 2009).

O presente trabalho apresenta-se como uma extensão natural do trabalho integrado no projecto da Acção COST FA0905 - “Mineral-improved crop production for healthy food and feed”. Neste âmbito, assumiu-se como objectivo, produzir farinha de trigo fortificada em Zn, mediante

biofortificação agronómica de grãos de *Triticum aestivum* L. cv Roxo, já com memória de biofortificação no mineral. Neste enquadramento, mediante aplicação de diferentes sistemas de fertilização nas plantas em ambiente controlado, estufa e ensaios de campo, pretendeu-se avaliar a correlação entre a taxa de absorção e translocação de nutrientes e a respectiva deposição nos órgãos da planta, e assim analisar a ampliação de relações sinérgicas e antagónicas entre nutrientes com implicações na produção de biomassa verde e conseqüente impacte na produção e mobilização de fotoassimilados para o grão biofortificado. Considerou-se, também, como objectivo, caracterizar a produção de grão, equacionando a deposição de elementos minerais a nível tecidual do grão, por se entender determinante, a nível industrial, o tipo de farinha biofortificada passível de obtenção (integral e/ou refinada). Considerando o itinerário técnico associado à produção de farinha biofortificada, a caracterização do respectivo perfil nutricional foi ainda outro objectivo.

Com este projeto assume-se, a par da transferência de conhecimentos do sistema tecnológico e científico nacional para o sector produtivo, o desenvolvimento e consolidação científica de conhecimentos apontados no “Memorando de Entendimento” da Acção COST FA0905 “Mineral-improved crop production for healthy food and feed” e da Acção COST TD1304.

2. Capítulo II – Estado da arte

2.1. Ingestão de zinco – alguns aspectos relevantes

O Zinco (Zn) é um mineral essencial à vida dos seres vivos, traduzindo o respectivo défice nos solos agrícolas uma deficiência na dieta que é responsável pela quinta maior indução de patologias e mortalidade nos países em desenvolvimento (Hussain *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). A deficiência em Zn afecta em particular mulheres e crianças, atingindo mais de três mil milhões de indivíduos (Zhang *et al.*, 2010). Acresce ainda que, cerca de 50% da população mundial apresenta risco de deficiência em Zn, em particular nos países asiáticos e africanos (Hussain *et al.*, 2010). No Paquistão, uma em cada três crianças, e cerca de 40% das mulheres em fase de aleitação, são deficientes em Zn (Hussain *et al.*, 2010). Também na população da República Popular da China mais de 100 milhões de indivíduos detêm carências neste mineral (Zhang *et al.*, 2010).

O Zn é um micronutriente particularmente abundante no meio intracelular, com reconhecido envolvimento na estabilidade genética (Ho, 2004). Participa ainda nos processos celulares, nomeadamente, em processos mitóticos, reprodução e mecanismos de defesa contra formas reactivas de oxigénio (Bruno *et al.*, 2007; Ho, 2004). É um elemento fundamental para o sistema enzimático antioxidante (Song *et al.*, 2010), principalmente para a dismutase do superóxido contendo Cu e Zn (CuZnSOD), apresentando um carácter estrutural (Bruno *et al.*, 2007; Ho, 2004). Assim, uma deficiência em Zn pode favorecer o *stress* oxidativo, com possíveis danos no ácido desoxirribonucleico (Song *et al.*, 2010; Ho, 2004) e, consequentemente, possíveis doenças degenerativas como o cancro, sendo o carcinoma da próstata o de maior incidência (Song *et al.*, 2010; Franklin e Costello, 2007; Ho, 2004). Acresce ainda que, este elemento mineral detém uma acção auxiliar nas funções de muitas proteínas (Takeda e Tamano, 2009).

O Zn está ainda directamente relacionado com a diferenciação celular, detendo uma importante participação no crescimento e manutenção do organismo, assim como no desenvolvimento e funcionamento neurocerebral (Takeda e Tamano, 2009; Ho, 2004).

Uma deficiência em Zn causa uma rápida interrupção da homeostase cerebral e, em caso de deficiência crónica, induz uma redução drástica nos níveis de Zn no hipocampo, afectando a capacidade de aprendizagem, memória e reconhecimento (Takeda e Tamano, 2009). Situações extremas de baixa ingestão de Zn também podem originar dermatites, perda de cabelo, hipotensão, hipotermia (Ho, 2004), anorexia, disfunções sensoriais (Takeda e Tamano, 2009) e forte diminuição do sistema imunitário durante a gravidez (da Costa *et al.*, 2013).

Populações com baixa ingestão do nutriente e dietas com elevadas concentrações de quelantes, como por exemplo o ácido fítico, assim como em regiões cujos solos apresentem deficiência em Zn, estão maioritariamente predispostas a uma carência nutricional (Hussain *et al.*, 2013; Velu *et al.*, 2013; Ho,

2004). O consumo de ácido fítico diminui consideravelmente a biodisponibilidade de Zn ingerido, devido aos complexos insolúveis que esse ácido forma com o elemento, tornando-o indisponível para absorção no tracto gastrointestinal (Song *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os alimentos vegetais, como as leguminosas e cereais são boas fontes de Zn, no entanto apresentam elevadas concentrações de ácido fítico, tornando esse nutriente menos biodisponível do que outras fontes animais, como a carne vermelha e o marisco (Bruno *et al.*, 2007; Ho, 2004). Desta forma, a população com dieta vegetariana, ou de baixos recursos económicos (de países em desenvolvimento), apresenta elevado risco de deficiência em Zn (Song *et al.*, 2010; Ho, 2004), assim como, recém-nascidos e crianças, cujas necessidades de Zn são maiores; ou idosos cuja absorção do mineral é dificultada e o seu consumo tende a diminuir (Ho, 2004).

Note-se que o nosso organismo contém, em média, 2-3 g de Zn (da Costa *et al.*, 2013), maioritariamente ligado a albuminas, pelo que a ingestão de Zn através da dieta parece constituir a melhor opção para superar as necessidades deste elemento, requeridas pelo organismo. A dose recomendada para ingestão diária apresenta alguma controvérsia entre autores, sendo recomendada como 11 mg dia⁻¹ para os homens e 8 mg dia⁻¹ para as mulheres (da Costa *et al.*, 2013). No entanto, estas dosagens são de difícil determinação e consenso, uma vez que se tem verificado uma diminuição da função imune em algumas células, aquando da administração de doses muito elevadas de Zn (da Costa *et al.*, 2013). Por outro lado, os monócitos reagem positivamente a elevadas concentrações. Assim, a administração de Zn deve ser recomendada com base nas necessidades de cada indivíduo (da Costa *et al.*, 2013).

2.2. Biofortificação de *Triticum aestivum* em zinco

O enriquecimento de Zn nos alimentos-base pode incrementar o valor nutricional destas fontes, contudo, a biodisponibilidade desse micronutriente deve ser efectiva (Bouis e Welch, 2010).

O aumento da concentração de micronutrientes nos grãos de cereais pode ser atingido através de uma agricultura sustentada em técnicas de fortificação nutricional, na suplementação dos produtos (Velu *et al.*, 2013; Velu *et al.*, 2011; Bouis e Welch, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Welch e Graham, 2004) ou na redução dos níveis de ácido fítico no grão (Hussain *et al.*, 2013). Contudo, a suplementação é um processo demasiado caro e de difícil aplicação em grande escala, nomeadamente em áreas predominantemente rurais (Cakmak *et al.*, 2004). Por oposição, o enriquecimento das culturas, mediante recurso à variação genética, visa o melhoramento vegetativo, num processo denominado biofortificação (Velu *et al.*, 2013; Bouis e Welch, 2010; Cakmak, 2008; Cakmak *et al.*, 2004; Welch e Graham, 2004) e representa uma solução sustentável às deficiências de micronutrientes, por apresentar um baixo custo de execução (Bouis e Welch, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Welch e Graham, 2004; Cakmak *et al.*, 2004). A biofortificação da cultura em micronutrientes passa pela selecção de genótipos, aplicação de fertilizantes e manipulação genética, sem perder de vista o rendimento da cultura (Hussain *et al.*, 2010). Atente-se

contudo que o sucesso da biofortificação depende tanto do aumento dos micronutrientes na parte edível das plantas, como da biodisponibilidade dos micronutrientes no organismo (Bouis e Welch, 2010; White e Broadley, 2009). Acresce ainda que, para determinar o nível de fortificação apropriado é necessário estimar a quantidade de alimento consumido pelas diferentes populações (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010).

A biofortificação com base na agricultura constitui uma solução rápida para correcção das deficiências de minerais no solo, com recurso à aplicação de fertilizantes (Hussain *et al.*, 2010; Bouis e Welch, 2010; Cakmak, 2008), embora a respectiva aplicação pelos agricultores não seja tão frequente como desejado, por ser inacessível à maioria, principalmente nos países em desenvolvimento, devido a factores económicos, mas também à ausência de conhecimento das vantagens da sua aplicação (Hussain *et al.*, 2010).

A aplicação de fertilizantes permite superar a deficiência de Zn nos solos, resultando numa maior produção da parte aérea e rendimento do grão (com aumentos entre 11-109 % e 9-256 %, respectivamente) e maior concentração de Zn nos grãos (9-912 %) (Hussain *et al.*, 2010). No entanto, a tolerância aos níveis de Zn no solo varia significativamente entre os genótipos, sendo a quantidade óptima para acumulação nos grãos, superior à exigida para o crescimento da planta. Por outro lado, os níveis de toxicidade ganham maior importância com o aumento da taxa de aplicação, pois embora não se verifique uma atenuação do crescimento, foi demonstrada uma forte diminuição da concentração de Zn, nas plantas, para níveis de 7 mg kg⁻¹ no solo (Hussain *et al.*, 2010).

O aumento da concentração de micronutrientes nas culturas de cereais, através de manipulação genética, envolve a supressão dos genes de compostos anti-nutrientes (Bouis e Welch, 2010; Hussain *et al.*, 2010), diminuindo a razão molar entre o ácido fítico e o Zn (Hussain *et al.*, 2010). No entanto, alguns compostos anti-nutrientes possuem uma função relevante na dieta humana, funcionando como anticarcinogénicos ou promotores de saúde, diminuindo o risco de doenças cardíacas ou diabetes (Bouis e Welch, 2010). Por outro lado, a expressão dos genes responsáveis pela ferritina manifesta um efectivo aumento da concentração de Zn nos grãos (Cakmak, 2008). De facto, Uauy *et al.* (2006) demonstraram que o gene GPC-B1, de *Triticum dicoides*, codifica um factor de transcrição NAC (NAM-B1), que leva a um aumento dos níveis de Zn nos grãos (*cf* Velu *et al.*, 2011), possivelmente por estimular a senescência da folha e dessa forma incrementar a remobilização do elemento para as sementes, a partir da folha-bandeira (Cakmak, 2008).

2.2.1. Aplicação de fertilizantes

A biofortificação mediante aplicação de técnicas agrícolas tem sido descrita como uma boa estratégia para incrementar os teores de elementos minerais nos alimentos base. Dependendo do tipo de fertilizante aplicado, os níveis de Zn podem ser melhorados de forma significativa (Cakmak, 2008). O Zn pode ser directamente aplicado no solo através de compostos orgânicos e inorgânicos (Cakmak, 2008).

Neste enquadramento, os fertilizantes inorgânicos são utilizados sob a forma de óxidos, nitratos e sulfatos, sendo o sulfato de zinco, o mais utilizado por ser substancialmente menos dispendioso e apresentar uma elevada solubilidade (Hussain *et al.*, 2010; White e Broadley, 2009; Cakmak, 2008). Note-se que um mineral deve ter uma solubilidade de cerca de 40% para que o fertilizante possa ser eficiente (Hussain *et al.*, 2010). A aplicação de Zn sob a forma de sulfato apresenta melhores resultados na acumulação nos grãos de trigo que o óxido de zinco ou o zinco quelado pelo EDTA (White e Broadley, 2009; Cakmak, 2008). Os fertilizantes com quelantes de Zn permitem relativa mobilidade ao mineral no solo, no entanto são relativamente dispendiosos para utilização nos países em desenvolvimento (Hussain *et al.*, 2010).

A aplicação de fertilizantes tem demonstrado bons resultados no aumento dos níveis de Zn e ainda sem efeitos adversos no rendimento da cultura (Zou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010). A utilização de fertilizantes no solo, em simultâneo com a aplicação foliar, tem permitido em ensaios de campo, aumentos de concentração de Zn até 3,5 vezes (Cakmak, 2008). Para obter excelentes resultados no rendimento da cultura é também recomendado a aplicação de fertilizantes no solos (*i.e.*, adubação de fundo e de cobertura) ou o desenvolvimento de culturas através de sementes biofortificadas em Zn e aplicação foliar adicional (Zou *et al.*, 2012; Cakmak *et al.*, 2010; Cakmak, 2008). Este último método tem demonstrado ser o mais eficaz no aumento da concentração de Zn no grão, no entanto o seu sucesso é variável ao longo do ciclo de crescimento da planta. O último estágio de crescimento apresenta os melhores resultados para a acumulação de Zn, uma vez que neste período a absorção radicular é limitada (Cakmak *et al.*, 2010; White e Broadley, 2009; Cakmak, 2008;).

Os resultados conseguidos através da aplicação de fertilizantes devem-se ao efeito positivo que este método manifesta na remobilização de Zn da parte vegetativa para os grãos (Zhang *et al.*, 2010). A tabela 2.1 (adaptada de Cakmak, 2008) apresenta diferentes níveis de Zn resultantes de diferentes aplicações de fertilizantes em *Triticum aestivum* L.

Adicionalmente existem factores ambientais, como as propriedades dos solos, disponibilidade de água e tipos de fertilizantes e suas aplicações, que apresentam um enorme impacto nos factores genéticos e, por sua vez, na concentração mineral da planta (Bouis e Welch, 2010; White e Broadley, 2009; Cakmak *et al.*, 2004). O pH do solo também apresenta uma forte responsabilidade na solubilidade dos micronutrientes, a qual revela uma relação inversa: quando o pH do solo é elevado, a solubilidade diminui e vice-versa (Velu *et al.*, 2013; Cakmak, 2008). Assim, os solos alcalinos com elevados teores de carbonato de cálcio, salinidade, elevados níveis de fosfato e grandes períodos de seca, apresentam acentuadas deficiências em Zn, assim como os solos com reduzida capacidade de drenagem de água (Hussain *et al.*, 2010; Cakmak, 2008).

Tabela 2.1 - Efeito das diferentes aplicações de Zn, na concentração do mineral na parte aérea e no grão, assim como no rendimento de *Triticum aestivum* L. (adaptado de Cakmak, 2008).

Aplicação de Zn	Teores de Zn (mg Kg ⁻¹)		Aumento de rendimento (%)	
	Parte aérea	Grão	Parte aérea	Grão
Controlo	10	10	--	--
Sementes biofortificadas	12	10	79	204
Solo	19	18	109	265
Foliar	60	27	40	124
Semente + foliar	73	29	83	268
Solo + foliar	69	35	92	250

2.2.2. Sistemas de absorção, translocação e acumulação do mineral nos tecidos vegetais

Os processos fisiológicos e a eficiência da acumulação dos micronutrientes na parte edível das plantas possuem uma elevada complexidade (Welch e Graham, 2004). A concentração dos elementos minerais na parte aérea das plantas requer um conjunto de ações na componente vegetativa, que se inicia pela absorção dos minerais pelas raízes, translocação para os afillamentos, mobilização para os tecidos vegetativos e deposição nos grãos, sob formas biodisponíveis, ou não, para o organismo humano (Bouis e Welch, 2010). Todo este processo é influenciado pela variação genética e pela interacção genótipo *versus* ambiente, sendo que os factores ambientais (nomeadamente propriedades do solo, disponibilidade da água e temperatura) têm maior impacte na concentração dos micronutrientes, pois condicionam a expressão do material genético (Bouis e Welch, 2010; White e Broadley, 2009; Cakmak *et al.*, 2004).

Para permitir uma maior absorção de micronutrientes pelas raízes, a respectiva concentração deve ser incrementada na rizosfera, para favorecer a sua disponibilidade. A absorção dos micronutrientes pode também ser melhorada, através da modificação da morfologia das raízes ou alterando a solubilidade e movimentação dos elementos metálicos (Welch e Graham, 2004), uma vez que, o transporte de minerais para a rizosfera ocorre predominantemente por difusão, onde a humidade do solo possui um papel muito importante (Velu *et al.*, 2013; Lidon *et al.*, 2013; Cakmak, 2008). Acresce ainda, que os micronutrientes apresentam maior fitodisponibilidade para serem absorvidos pelas raízes sob a forma catiónica (White e Broadley, 2009).

Os mecanismos de absorção, que incluem transportadores de iões, encontram-se nas membranas plasmáticas das células radiculares e devem ser suficientemente activos para permitirem a entrada dos elementos metálicos no apoplasma (Lidon *et al.*, 2013; White e Broadley, 2009; Welch e Graham, 2004). Uma vez nas células, o transporte dos micronutrientes até à parte edível é feito através da seiva no floema (Lidon *et al.*, 2013; Welch e Graham, 2004).

A cinética de absorção e acumulação de Zn começa com o transporte de Zn^{2+} biodisponível, ao longo da membrana plasmática (Lidon *et al.*, 2013). A membrana transportadora de Zn^{2+} parece ser dominada por um canal de iões, onde as proteínas são formadas, e onde o gradiente electroquímico é estabilizado e controlado ao longo das células da membrana plasmática, situação que eventualmente também pode envolver os canais proteicos (Lidon *et al.*, 2013). A taxa de translocação de Zn das raízes até à parte aérea depende da acessibilidade e mobilização do metal para ser sequestrado nos vacúolos das raízes (Gramlich *et al.*, 2013; Lidon *et al.*, 2013).

O transporte de Zn no xilema ocorre, maioritariamente (80%), sob a forma de Zn^{2+} (Lidon *et al.*, 2013), o que favorece a formação de complexos, preferencialmente com ácidos carboxílicos, como o citrato e malato (Gramlich *et al.*, 2013; Lidon *et al.*, 2013). Adicionalmente, o citrato e a histidina melhoram fortemente a absorção de Zn nas raízes e parte aérea (Gramlich *et al.*, 2013).

Nos grãos de cereais o Zn é armazenado maioritariamente no aleurona e embrião, com baixas concentrações no endosperma (Lidon *et al.*, 2013).

2.3. Caracterização do grão de *Triticum aestivum*

O trigo é o terceiro cereal mais produzido em todo o mundo, com cerca de 600 milhões de toneladas, ficando atrás do arroz (652 milhões de toneladas) e do milho (785 milhões) (Shewry, 2009).

A cultura de trigo terá surgido há 10.000 anos e teve origem no sudoeste da Turquia. As primeiras variedades cultivadas possuíam o genoma AA e AABB, sendo consideradas diplóides e tetraplóides, respectivamente. A partir destas surgiram as variedades hexaplóides (figura 2.1), as quais são destinadas essencialmente para produção de pão (Shewry, 2009).

Os cereais e seus derivados, como o pão e os produtos de padaria, cereais de pequeno-almoço, pastas e outros, representam uma fração significativa da dieta humana (Galinha, *et al.*, 2013). Em Portugal, a espécie mais cultivada para panificação é *Triticum aestivum* L., com maior relevância nas regiões de Trás-os-Montes, Alto e Baixo Alentejo (Galinha *et al.*, 2013). Nos países em desenvolvimento, o trigo representa uma boa fonte de energia, onde a sua ingestão é maioritária (Zou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

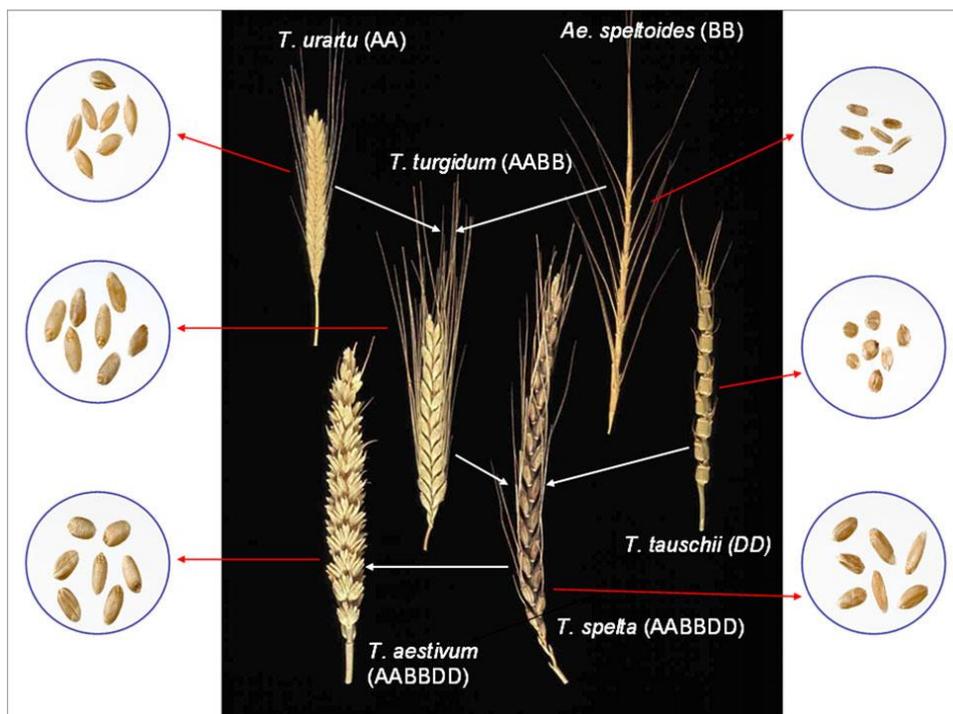


Figura 2.1 - Evolução e relação das variedades de trigo e seus genomas (Shewry, 2009).

O grão de trigo é constituído essencialmente por três estruturas: farelo (aleurona), endosperma e gérmen. O endosperma é o constituinte maioritário (81-84 % do grão), composto por grânulos de amido rodeados por uma matriz proteica. O amido representa 60-70 % da sua composição química (Scheuer *et al.*, 2011; Shewry, 2009) o que corresponde a 65-75 % da constituição da farinha de trigo (Shewry, 2009). O gérmen é a parte reprodutiva do grão, onde se situa o embrião e o escutelo e representa 2-3 % da semente. O farelo contém as camadas exteriores do grão (representa 14-16 %), incluindo a camada de aleurona (Mousia *et al.*, 2004). A figura 2.2 ilustra a estrutura do grão de trigo, indicando os respectivos constituintes.

Adicionalmente, o trigo possui um teor de humidade que oscila em torno de 12-14 %, polissacáridos não amiláceos (2-3 %), lípidos (2 %) e cinzas (1 %) (Shewry, 2009). O teor de humidade dos grãos de trigo tem um papel importante na sua avaliação comercial, uma vez que influencia o respectivo peso (Shewry, 2009).

A composição mineral dos alimentos-base está dependente da composição mineral do solo (Lidon *et al.*, 2013; Galinha *et al.*, 2013; White e Broadley, 2009) e a maioria dos minerais está localizada no grão e aleurona, enquanto que o menor conteúdo é armazenado no endosperma (Hussain *et al.*, 2010). O fósforo (P) é o componente mais abundante nos grãos, representando 16-22 % do total de cinzas (Scheuer *et al.*, 2011). O grão de trigo contém, em média, entre 25-30 μg de $\text{Zn g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ (Hussain *et al.*, 2010; Cakmak, 2008).

O trigo é uma excelente matéria-prima para a produção de farinha e, conseqüentemente, pode originar produtos de panificação, devido ao seu teor proteico (Scheuer *et al.*, 2011; Shewry, 2009).

Apesar do trigo possuir baixo teor proteico (8-16%), comparativamente a outras fontes de alimentos, a sua elevada ingestão, confere ao trigo uma boa fonte nutricional (Scheuer *et al.*, 2011; Shewry, 2009).

A espécie *Triticum aestivum* L. é comumente conhecida como “trigo mole”, sendo utilizada para panificação, por possuir um teor proteico inferior ao do “trigo duro” (*Triticum durum*), que por sua vez possui menos ligações amido-proteína, o que proporciona menor dureza e facilita a sua moagem (El-Porai *et al.*, 2013; Galinha *et al.*, 2013 ; Peck *et al.*, 2008; Greffeuille *et al.*, 2007).

As proteínas de trigo dividem-se em proteínas solúveis (albuminas e globulinas) e proteínas de reserva ou de amido (gliadinas e gluteninas) (Scheuer *et al.*, 2011). A funcionalidade do trigo depende das suas propriedades viscoelásticas, as quais são da responsabilidade das proteínas do glúten. As gliadinas possuem funções de plasticidade, conferindo viscosidade à massa e as gluteninas conferem resistência à ruptura, dando maior elasticidade à massa (Scheuer *et al.*, 2011).

A produção de massa requer diversos passos consoante a qualidade do grão, incluindo a remoção das camadas externas do grão, moagem, purificação, entre outros. A moagem tem por objectivos: reduzir o endosperma a partículas muito finas e remover as camadas externas do grão, principalmente o farelo (Lijuan *et al.*, 2007; Mousia *et al.*, 2004). Nem sempre é possível remover o endosperma do farelo e nalguns casos é necessário refinar a farinha para reduzir os efeitos negativos que o farelo causa na cor desta. Além do efeito negativo na cor, a presença de farelo na farinha afecta também o seu volume, textura e sabor, devido às suas interações com as ligações de amido-glúten, afectando assim as funções reológicas e tecnológicas da massa (Lijuan *et al.*, 2007; Mousia *et al.*, 2004).

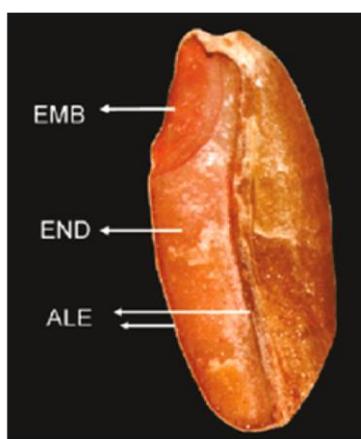


Figura 2.2 – Caracterização do grão de trigo com representação dos seus componentes principais: embrião (EMB), endosperma (END) e aleurona (ALE) (Cakmak *et al.*, 2010).

2.3.1. Obtenção de farinha biofortificada

Embora o trigo possua um baixo teor de Zn (Hussain *et al.*, 2013), em grande parte como consequência da deficiência deste mineral no solo (Lidon *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010), os alimentos-base, podem ser utilizados como veículo de biofortificação (Ahmed *et al.*, 2012).

A biofortificação permite aumentar a concentração de Zn nos grãos e, conseqüentemente, na farinha (Zang *et al.*, 2010), contudo, grande parte dessa concentração é perdida durante a moagem (Hussain *et al.*, 2010; Cakmak *et al.*, 2004), uma vez que a maioria do Zn, tal como a maioria dos minerais e lípidos (Scheuer *et al.*, 2011; Cakmak, 2008; Liu *et al.*, 2008), se localiza no embrião e na camada de aleurona, enquanto a menor concentração se situa no endosperma (Hussain *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Cakmak *et al.*, 2004). Desta forma, é importante avaliar diferentes processos de moagem para encontrar o método que proporcione as menores perdas nutricionais (Hussain *et al.*, 2010; Cakmak *et al.*, 2004).

As técnicas de descascamento permitem remover as camadas externas do grão de forma sequencial, por abrasão e fricção, o que possibilita o aumento proporcional das entidades químicas do pericarpo na farinha e por conseguinte aumentar o conteúdo de minerais (Lijuan *et al.*, 2007). Adicionalmente, o processo de moagem torna-se mais fácil a cada passo de descascamento (Greffeuille *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2008) avaliaram o efeito do processo de descascamento nos níveis de fitato, actividade da fitase e níveis de Fe e Zn durante a moagem, tendo concluído que a farinha resultante de um processo de descascamento prévio tinha níveis mais elevados destes componentes, comparativamente à farinha não processada.

Adicionalmente, a absorção de Zn, mediante consumo de pão biofortificado, com diferentes taxas de extracção nos grãos, por mulheres adultas, foi avaliada por Rosado *et al.* (2009), tendo concluído que a quantidade de Zn absorvida a partir de trigo com 80% de extracção foi similar à quantidade de Zn absorvida a partir de trigo com 95% de extracção, apesar da ingestão de Zn ser maior a partir do trigo com maior extracção. Estes resultados são consequência da forte redução de fitato a partir de uma extracção moderada. A mesma interacção entre a absorção de Zn e o conteúdo de fitato a partir de diferentes taxas de extracção de grão de trigo, foi observada por Sreenivasulu *et al.* (2008), sugerindo um forte efeito inibidor do fitato na absorção de Zn.

Neste enquadramento, a absorção de Zn depende das matrizes e do efeito de diversos ligantes dietéticos (Sreenivasulu *et al.*, 2008). O ácido tânico ou alguns compostos polifenólicos de bebidas, como o chá, ou sumos de uva, revelaram um aumento da absorção de Zn em *Caco-2-cells*, concluindo-se que os alimentos ricos em polifenóis não apresentam efeito adverso na absorção de Zn, em oposição ao verificado com a absorção de Fe (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Contudo, o ácido tânico necessitou de teores mais elevados para aumentar a absorção de Zn em *Caco-2-cells*, a partir de refeições com base em arroz e trigo, o que sugere possíveis interacções entre o ácido tânico e outros componentes da matriz (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Por outro lado, a biodisponibilidade de Zn para humanos e pintos a partir do complexo Zn-metionina era mais elevada do que a partir do sulfato de Zn.

Da mesma forma, a suplementação com o complexo de Zn-metionina mostrou melhores níveis de Zn no plasma, comparativamente ao ZnSO₄, em ratinhos (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Adicionalmente, a

histidina em concentrações mais elevadas mostrou uma redução da absorção de Zn em *Caco-2-cells*, apesar de não ter sido testada em seres humanos ou em animais (Sreenivasulu *et al.*, 2008).

O sucesso da biofortificação depende da estabilidade dos micronutrientes e do alimento ao qual estes são adicionados. A estabilidade dos micronutrientes possui um papel importante durante o processamento dos alimentos, à qual são incluídos factores físico-químicos, assim como do seu armazenamento. Acresce ainda que a fortificação mineral tem mostrado conferir um efeito inibidor no crescimento de fungos, durante o armazenamento da farinha, por um período de 60 dias (Akhtar *et al.*, 2011).

A qualidade do trigo biofortificado para produção de produtos de panificação é avaliada de acordo com as propriedades reológicas da massa e seu valor nutricional (Akhtar *et al.*, 2009). A avaliação do efeito da fortificação em Zn na qualidade da massa e do pão revela-se uma área pouco estudada (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010). Akhtar *et al.* (2009) avaliaram as possíveis alterações na absorção de água, tempo de desenvolvimento da massa, tempo de estabilização da massa e viscosidade máxima, resultante da fortificação mineral com diferentes tratamentos, tendo concluído que os agentes fortificantes de Zn não aparentam induzir qualquer alteração nas características reológicas da massa.

Apesar da fortificação de Zn permitir aumentar o valor nutricional dos produtos alimentares e apresentar diminutas alterações nas propriedades reológicas, este método deve ser aprovado pelos consumidores mediante avaliação das características organolépticas dos géneros alimentícios (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010). Algumas características, como a cor, textura, sabor e aceitação global, de pão proveniente de farinha obtida com diferentes níveis de extracção (87% e 68%) e cinco tratamentos de fortificação, foram avaliadas por um painel treinado de provadores, usando uma escala hedónica, da qual o pão com maior nível de extracção e apenas fortificado em Zn apresentou os melhores resultados em todas as características e não revelou diferenças significativas face ao pão não fortificado, proveniente de farinha com o mesmo nível de extracção. Apenas na textura, o pão fortificado em Zn apresentou significativamente melhores resultados que o pão não fortificado (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010). Acresce ainda, que a aplicação de fertilizantes de Zn no trigo pode comprometer as características sensoriais do alimento final. Embora não tenham sido registadas alterações significativas nos produtos fortificados com Zn, em parte devido ao número limitado de produtos enriquecidos. Walter *et al.* (2002) destacaram a fraca aceitação de alguns produtos fortificados neste elemento (*cf* Akhtar *et al.*, 2011). As baixas classificações hedónicas aos produtos fortificados em Zn, podem dever-se ao tipo de fertilização utilizado. Note-se que o óxido de Zn distingue-se por conferir um sabor amargo e o sulfato de Zn, um sabor adstringente. Para além disso, o óxido de Zn aparenta influenciar negativamente a textura dos produtos fortificados (Akhtar *et al.*, 2011).

Por outro lado, o aumento da concentração de Zn no grão favorece o aumento da concentração de proteína no mesmo, incrementando-se este efeito mediante aplicação de fertilizantes foliares.

Utilizando biomarcadores na aplicação de Zn, observou-se que parte do elemento se acumulou nas proteínas, em particular na glutenina. Este facto deve-se à interacção do Zn com os resíduos de

cisteína nas proteínas. O aumento da concentração de Zn no grão demonstra uma diminuição de gliadina, aumentando a glutenina, sugerindo assim um melhoramento na força das massas. No entanto, são ainda necessários estudos complementares para avaliar o efeito reológico em resposta ao aumento do teor proteico, por incremento dos níveis de Zn no grão (Peck *et al.*, 2008).

Embora fortificações múltiplas de minerais nos alimentos representem uma forma possível de abordar deficiências em dois ou mais micronutrientes, sendo simultaneamente a forma mais barata de o conseguir, é possível que ocorram algumas interações entre os nutrientes de modo a modificar a biodisponibilidade dos mesmos (Ahmed *et al.*, 2012) como se observou no estudo sobre a biodisponibilidade e interações entre Ca, Fe e Zn em ratos albinos (Sprague-Dawley) alimentados por um período de 28 dias com pão produzido a partir de farinha fortificada com 72% de extracção. Ahmed e colaboradores (2012) concluíram que a dieta em Zn em combinação com Ca ou Fe apresentou menor retenção de Zn no plasma e fígado de ratos do que a dieta que continha apenas Zn, a qual apresentou uma capacidade de retenção mais elevada, provavelmente devido à interacção antagónica Ca-Zn, sugerindo que maiores níveis de Ca dietético podem potenciar uma menor absorção de Zn. Apesar do decréscimo da biodisponibilidade, como resultado da interacção entre o Ca, Fe e Zn, a absorção destes elementos foi superior em ratos alimentados com pão fortificado em triplicado do que em ratos alimentados sem qualquer fortificação.

3. Capítulo III - Materiais e Métodos

3.1. Material Biológico

Utilizaram-se sementes certificadas de trigo mole (*Triticum aestivum* L. cv Roxo), inscritas no Catálogo Nacional de Variedades, fornecidas pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas – Elvas, Portugal, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

As sementes controlo provieram de uma geração inicial (F0); as sementes biofortificadas com um teor de Zn 5 vezes superior a F0 foram obtidas na 4ª progenia - F4, obtidas conforme descrito em Lidon *et al.* (2015) e se exemplifica abaixo.



3.1.1 Crescimento em ambiente controlado

Sementes de *Triticum aestivum* cv Roxo foram semeadas em vaso (3 L), para subsequente crescimento numa câmara Walk in – Aralab (10.000 EHF; N° série: 1084), sob condições ambientais controladas, de acordo com Dias e Lidon (2009) e algumas adaptações (80% HR, 500 ppm de CO₂, 22/18 °C dia/noite, 12/12 h, dia/noite, 800 μmolQ m⁻² s⁻¹).

O substrato utilizado possuía as seguintes características: pH 5,5 - 6,5; humidade 50 - 60%; condutividade 0,6 - 1,2 mS cm⁻¹; 70 % de matéria orgânica; 4,618 % Ca; 0,975 % K; 0,425 % P; 0,572 % Mg; 13,28 ppm Cu; 40,33 ppm Zn; 0,181 % Fe.

No início do ensaio semearam-se 22 vasos, cada um com 8 sementes, a uma profundidade de cinco centímetros, com rega de 2 em 2 dias até ao aparecimento da primeira folha. Posteriormente, a rega passou a processar-se diariamente, tendo-se no 16º dia seleccionado 4 plantas por vaso, procedendo-se ao corte das restantes.

Nesta fase, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos de adubação: 3 mL L⁻¹ de uma solução nutritiva completa, em plantas provenientes de sementes controlo (F0 (0,3/0,3)); 3 e 15 mL L⁻¹ da mesma solução nutritiva completa, em plantas provenientes da 4ª geração (F4 (0,3/0,3) e (F4 (1,5/1,5))), respectivamente.

No decurso do ciclo de vida das plantas procedeu-se à recolha de quatro plantas por vaso, aos 31, 84, 107 e 141 dias após a germinação, para análises subsequentes.

Para preparação da solução nutritiva completa efectuou-se uma solução A com 0,09 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1173874), 0,12 g de $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1182), 0,01 g de H_3BO_3 (Merck 10043353), 0,016 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 7446200), 0,08 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck 7758987), 0,16 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich 44943) e 12,00 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck 902). Posteriormente, esta solução foi homogeneizada com 50 mL de H_2SO_4 95-97% (Merck 7664939), sob agitação numa placa (RS Lab 11 NCD). Em paralelo, procedeu-se à preparação de uma solução B (em 700 mL de água, sob agitação numa placa RS Lab 11 NCD) contendo 111 g de NH_4NO_3 (Merck 6484522), 30 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac 122507), 65 g de K_2SO_4 (Scharlau PO02871000), 17 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau CA01941000) e 4,8 g de MgSO_4 (Merck 7487889). Por fim, a solução nutritiva completa foi obtida promovendo-se a mistura das soluções A e B num balão volumétrico e completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

3.1.2 Crescimento em estufa

Sementes de *Triticum aestivum* L. cv Roxo foram semeadas em vaso (3 L) para subsequente crescimento em estufa, em Oeiras (latitude: 38° 41'N; longitude: 9° 18'W; altitude: 25m), entre Dezembro de 2013 e Maio de 2014.

No início do ensaio (11 de Dezembro de 2013) prepararam-se 22 vasos com 6 sementes, tendo-se no 16º dia seleccionado 4 plantas por vaso.

O substrato utilizado possuía as mesmas características do descrito em 3.1.1.

No decurso do ciclo de vida das plantas, com uma duração aproximada de 150 dias, adoptaram-se adubações similares às aplicadas em ambiente controlado.

As condições ambientais para crescimento das plantas foram monitorizadas, utilizando-se, para aferição da temperatura do solo, 5 sensores; da temperatura do ar interior e respectiva humidade, 2 sensores (*Hidroclip 2*, *Airchip Technology*); radiação luminosa fotossinteticamente activa, 2 sensores. Verificou-se que a temperatura do solo oscilou entre 12,1 – 27,1 °C. Na estufa observou-se uma temperatura ambiente mínima e máxima de 12,9 e 28,2 °C, respectivamente. A humidade na estufa variou entre 30,7 - 93,7% e a temperatura exterior à estufa oscilou entre 11,5 - 30,7 °C. A radiação luminosa fotossinteticamente activa sofreu um incremento acentuado variável entre 0,0 (período nocturno) e 1498,0 $\mu\text{molQ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (período diurno).

3.1.3 Crescimento em cultura de campo

Foram utilizadas sementes de *Triticum aestivum* L. cv Roxo. Delinearam-se 9 talhões, cada um com a área de 7,2 m² (6 m x 1,20 m), correspondendo a triplicados de 3 tratamentos diferentes, que

foram distribuídos nas repetições de forma perfeitamente casualizada (figura 3.1). Um talhão não foi biofortificado, o qual foi denominado por controlo ou semente de agricultor (*farmer seed*).

O ensaio foi instalado num campo experimental em Elvas, Herdade da Comenda (latitude: 38° 54'N; longitude: 7° 09'W; altitude: 272m), que possui um aluviossolo moderno com a seguinte composição: textura média; pH 6,0; 1,07% de matéria orgânica; > 200 ppm P; 158 ppm K; > 125 ppm Mg; 64 ppm Fe; > 100 ppm Mn; 3,5 ppm Zn; 1,8 ppm Cu; 0,07% N.

A sementeira, que foi ajustada tendo em conta a percentagem de germinação e o peso de 1000 grãos, visando uma sementeira de 279 grãos viáveis m⁻², ocorreu a 2 de Dezembro de 2013, tendo as plantas completado o respectivo ciclo em Junho de 2014.

A adubação de fundo foi calculada de acordo com a análise de solos, previamente efectuada no terreno onde o ensaio foi instalado, utilizando-se para o efeito o adubo Foskamónio 14-25-8 (200 Kg ha⁻¹) e sulfato de zinco (50 Kg Zn ha⁻¹). A adubação de cobertura foi efectuada em duas vezes, utilizando-se 46% de ureia, 150 kg ha⁻¹ (69 Kg N ha⁻¹) no total. No final da fase de afilamento aplicaram-se 120 kg ha⁻¹ e no espigamento 30 kg ha⁻¹.

Para o tratamento de biofortificação, procedeu-se à aplicação foliar, em 3 fases do ciclo de desenvolvimento da cultura (encanamento, espigamento e grão leitoso), com sulfato de zinco (11 g Zn ha⁻¹) e Fe quelatado por E.D.D.H.A. 4,8% orto-orto, Batlle 1171063009 (200g Fe ha⁻¹).



Figura 3.1 - Sementeira de campo, com divisão dos talhões (A) e cultura desenvolvida (B).

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Determinação do peso seco

A determinação da matéria seca (raíz e parte aérea das plantas) foi analisada ao longo do ciclo da planta, em quatro períodos diferentes. As amostras foram lavadas com água destilada, secas com papel de filtro (Whatman nº4) e após determinação do peso fresco, utilizando uma balança digital METTER, colocadas em estufa a 50°C, entre cinco a sete dias, até definição de um peso constante. No final do período de secagem, as amostras foram retiradas da estufa e, após rápido arrefecimento, pesadas novamente.

3.2.2. Elementos minerais

3.2.2.1. Espectrofluorimetria acoplada com raio X

A análise de Zn, P, K e S foi feita segundo o modelo atómico de Bohr, através da detecção energética de electrões, segundo o espectro electromagnético na gama dos raios-X, com correspondência a uma base de dados, fornecida pelo equipamento (*Niton Thermal Scientific*). A figura 3.2 ilustra a execução do método e funcionamento do equipamento.

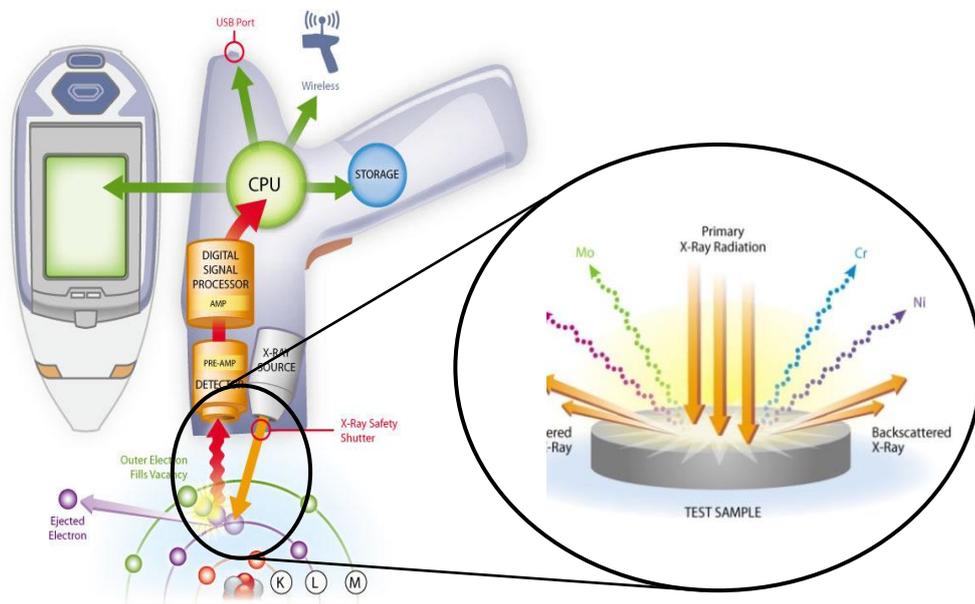


Figura 3.2 - Representação esquemática do conceito de detecção de minerais com emissão de raios-X, através de analisadores portáteis *Niton Thermal Scientific, modelo Xlt*.

A análise foi efectuada através de um analisador portátil de raio-X *Niton Thermal Scientific, modelo Xlt*. As amostras foram moídas e colocadas em cuvetes, cobertas por uma película transparente

para emissão do feixe de raios-X. A leitura ocorreu após emissão de radiação, durante 360 segundos, em atmosfera enriquecida em hélio. Para cada amostra efectuaram-se 3 leituras.

Os resultados (quantificação e análises espectrais – figura 3.3) foram tratados com recurso ao *software NITON Data Transfer – XL 3t-36653*.

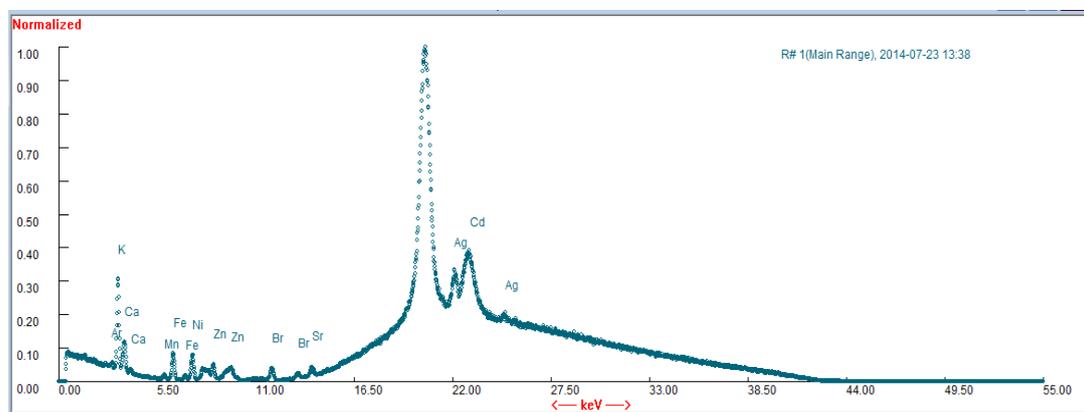


Figura 3.3 - Exemplo de um espectro electromagnético na gama dos raios-X realizado numa amostra moída de trigo mole.

3.2.2.2. Espectrofotometria de emissão de plasma

O doseamento dos elementos metálicos no material vegetal (raiz, parte aérea e grão) foi efectuada após secagem numa estufa com ventilação forçada, a 35 °C, durante 48 h. Após a secagem, as amostras foram moídas e passaram por um crivo de 0,7 mm (Jones Jr., 2001). Os resultados analíticos estão expressos em relação à matéria seca a 105 °C, calculada em sub-amostras. As concentrações dos elementos Fe, Ca, Mg, Mn e Cl, foram determinadas após mineralização por via húmida num digestor *VELP série DKL*, tendo-se efectuado o seguinte procedimento: em cada tubo do digestor colocou-se 0,5 g do material vegetal em barquinha de papel de filtro e adicionou-se 8 mL de ácido nítrico. O ácido ficou em contacto com a amostra durante uma noite. Seguidamente, os tubos foram colocados no digestor a 100 °C, durante uma hora, aumentando-se a temperatura gradualmente até 150 °C e mantendo-se esta temperatura até que cessassem os vapores nitrosos (portanto até terminar a destruição da matéria orgânica da amostra). Após arrefecimento, adicionou-se 2 mL de ácido perclórico e levou-se a 200 °C até os digeridos ficarem incolores. Após arrefecimento, adicionou-se 10 mL de água e levou-se a uma temperatura de 100 °C, durante cerca de 5 minutos, até aparecerem fumos brancos indicativos da expulsão de todo o ácido perclórico. Terminada a digestão, transferiu-se o extracto para balões volumétricos de 25 mL, lavando-se várias vezes o tubo para arrastar todo o soluto até à aferição do balão.

As análises foram efectuadas em triplicado e em cada conjunto de amostras foi incorporada uma amostra de referência, *SRM 1567a*, certificada pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST, USA). O doseamento dos elementos foi efectuado por espectrofotometria de emissão de

plasma com detector óptico (ICP-OES radial simultâneo - *Thermo Scientific, modelo IRIS Interpid II XSP Radial*).

3.2.2.3. Fluorescência de raios X

O sistema μ -EDXRF utilizado no ensaio consiste no M4 Tornado™ (Bruker, Alemanha). Este espectrómetro consiste num tubo de raios X de janela lateral, alimentado por um gerador de alta tensão, de baixa potência e refrigerado. O sistema em causa possui um poli-capilar óptico de raios X, o que permite um feixe na amostra de 25 μ m para radiação incidente com energia da linha Mo K α . O gerador de raios X foi operado a 50 kV e 100 μ A, sem a utilização de filtros com a finalidade de melhorar a ionização de elementos de baixo número atómico. Para uma melhor quantificação dos elementos pesados utilizou-se um conjunto de filtros entre o tubo de raios X e a amostra, composta por três folhas de Al, Ti e Cu com uma espessura de 100, 50 e 25 μ m, respectivamente. Todas as análises com filtros foram realizadas com 600 μ A de corrente.

A detecção de radiação de fluorescência foi realizada por um detector de silício do tipo SDD, XFlash™, com 30 mm² de área e resolução de energia de 142 eV para a linha Mn K α . Com o objectivo de avaliar o mapeamento de distribuição dos elementos minerais, procedeu-se ao corte longitudinal do grão de trigo com uma lâmina cirúrgica de aço inoxidável. As análises foram realizadas sob condições de vácuo (< 20 mbar), directamente sobre os dois lados do grão de trigo, primeiro no modo de mapeamento e de seguida através da análise de pontos em locais de interesse. Estes espectros pontuais foram adquiridos durante 200 segundos. A sua quantificação realizou-se com recurso ao *software* WinAXIL™ (Camberra, Bélgica), utilizando-se três amostras de referência como modo de comparação. Os materiais de referência padrão utilizados neste ensaio foram os SRM1571 (Orchard Leaves), DC73351 (Tea Leaves) e DC73350 (Poplar Leaves).

3.2.3. Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento permite visualizar superfícies com uma resolução variável entre 10 - 100000x, fornecendo imagens de elevada qualidade. Nesta técnica as amostras são bombardeadas com electrões numa câmara de vácuo, produzindo electrões com origem secundária que são capturados e interpretados (Galhano *et al.*, 1999). Neste enquadramento, amostras de sementes de *Triticum aestivum* L cv Roxo foram submetidas a vácuo num sistema *Balzers Union CPD 020* e posteriormente metalizadas (ouro-paládio), recorrendo-se à utilização de um microscópio electrónico de varrimento *JEOL JSMT330A*, acoplado a um micro analisador de raio-X *Tracor Northern Series II*. Os grãos foram cortados transversalmente e longitudinalmente e analisados a 20Kv, usando um *static beam spot*, sob condições standarizadas durante 60 segundos.

3.2.4. Microscopia óptica

A análise de estomas das folhas dos diferentes tratamentos foram efectuadas num microscópio óptico (*Optika DM-25 Microscope, Itália*), com escala milimétrica, com objectiva de 40x e acoplado a um computador *Toshiba Satellite L50-B-1X3*.

A contagem de estomas efectuou-se nas páginas adaxial e abaxial das folhas, adoptando-se, como sistemas de contagem, linhas individuais e contagens totais por unidade de área.

3.2.5. Trocas gasosas foliares

A taxa fotossintética líquida (P_n), condutância estomática (g_s) e a concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram avaliadas em cada tratamento, sob condições de estado fotossintético estacionário, após 2h de exposição à luz, num sistema portátil de análise de gás por infravermelho (*Li-Cor 6400, LiCor, Lincoln, EUA*).

3.2.6. Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* (Chl) foi medida em condições similares às das trocas gasosas, num sistema *PAM-2000 (H. Walz, Effeltrich, Alemanha)*, tal como descrito por Ramalho *et al.* (2013), seguindo fórmulas propostas por Kramer *et al.* (2004), Krause e Jahns (2004) e Schreiber (2004).

De forma sucinta, as medições de fluorescência mínima (F_o) e a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foram realizadas em amostras foliares adaptadas à escuridão durante a noite. F_o indica a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* na fase que antecede a migração de electrões para os centros de reacção e foi determinada utilizando uma luz fraca ($< 0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_v/F_m representa a eficiência fotoquímica potencial/máxima do fotossistema II (PSII), e foi determinado através da utilização de um pulso / *flash* saturante de luz actínica de $7500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com a duração de 0,8 segundos de saturação. Complementarmente foram efectuadas diversas medidas em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, usando uma irradiância de *oscilando em torno de* $485 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica e *flashes* saturantes. Desta forma avaliaram-se: o q_p , q_N (Van Kooten e Snel, 1990), q_L (Kramer *et al.*, 2004), NPQ (Adams *et al.*, 1995), Y_{II} ($= \phi_e$), $Y_{(NPQ)}$, $Y_{(NO)}$ (Klughammer e Schreiber, 2008), F_v'/F_m' (Krupa *et al.*, 1993) e F_s/F_m' (Stirbet e Govindjee, 2011). F_o' , parâmetro necessário para determinação de diversos parâmetros (q_p , q_L , q_N), foi obtido imediatamente após se desligar a luz actínica, anteriormente à primeira fase rápida da cinética de fluorescência de relaxamento no escuro. F_v'/F_m' representa a eficiência na conversão energética no PSII à luz; q_p e q_L estima a proporção de energia capturada e canalizada para os eventos fotoquímicos, com base no conceito de antenas do PSII isoladas (q_p) ou interligados (q_L); NPQ representa o *quenching* não fotoquímico, isto é, a dissipação térmica fotoprotectora; Y_{II} ($= \phi_e$) é a estimativa de rendimento

quântico de transporte fotossintético de electrões não-cíclico; $Y_{(NO)}$ consiste na estimativa do rendimento quântico associado à dissipação de energia não regulada, sob a forma de calor e fluorescência; $Y_{(NPQ)}$ representa o rendimento quântico de dissipação de energia regulada no fotossistema II (Kramer *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011) e F_s/F_m' é um indicador da taxa de inactivação do PSII (Stirbet e Govindjee 2011).

3.2.7. Fracção lipídica total e ácidos gordos

Procedeu-se à extracção dos lípidos totais da farinha, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num *Chopin CD2*, com granulometria inferior a 450 μm , segundo o método de Zayas e Lin (1989), modificado por Ramalho *et al.* (2014). No processamento de cada amostra procedeu-se à adição de 20 mL de hexano a 1 g farinha. Após agitação numa placa de agitação (*Selecta, Agimatic 5*), durante 15 minutos, a 700 rpm e à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (*Centrifuga Heraeus, Biofuge 28RS*) a 4500 g, a 15 °C, durante 10 minutos. Recolheu-se então o sobrenadante (hexano) com uma pipeta de Pasteur, adicionaram-se mais 20 mL de hexano ao precipitado e procedeu-se a nova agitação e centrifugação nas condições anteriormente descritas. Os extractos da primeira e da segunda extracção foram combinados e secos sob fluxo de N em banho-maria (40 °C). O extracto seco foi ressuspenso em 600 μL de etanol:tolueno (1:4). Para cada tratamento foram feitos 3 extractos.

A saponificação e metilação dos lípidos totais foram efectuadas de acordo com o método de Metcalfe *et al.* (1966) com adaptações de Lidon *et al.* (2015), com adição de ácido heptadecanóico (C17:0, padrão interno) e 2mL de metanol - BF₃ em cada tubo. Efectuaram-se 2 metilações para cada extracto. Os ácidos gordos metilados foram analisados num cromatógrafo gás-líquido (*Varian CP-3380, USA*) acoplado a um detector de ionização de chama. Para a separação dos ácidos gordos utilizou-se uma coluna capilar *DB-Wax (J&W Scientific)* 30 m, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura. O injector e o detector foram mantidos a 200 e 250 °C, respectivamente. Utilizou-se hidrogénio como gás de arraste (1 mL min⁻¹) e uma partição de fluxo de 1/50. A identificação dos picos cromatográficos (figura 3.4) ocorreu pela comparação dos tempos de retenção de cada éster metílico de ácido gordo com misturas de padrões (*Sigma, Supelco e Restek*).

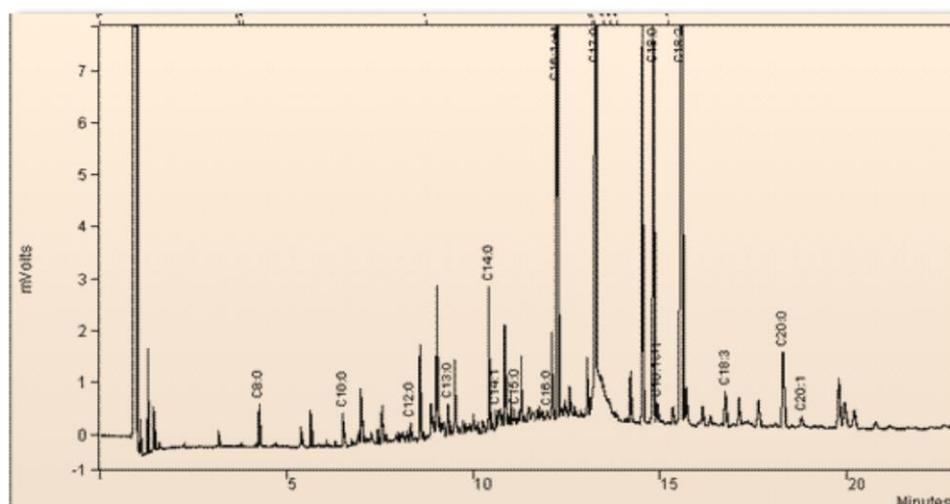


Figura 3.4 - Exemplo de um registro espectral relativo à separação de ácidos gordos, obtido de acordo com o procedimento adoptado para separação e quantificação de ácidos gordos.

3.2.8. Glicídios

Os açúcares solúveis foram extraídos a frio segundo o método de Medlicott e Tompson (1985), com as adaptações de Ribeiro *et al.* (2014). Procedeu-se à adição de 10 mL de água a uma amostra de 400 mg de farinha (após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num *Chopin CD2* com granulometria inferior a 450 μm) num tubo de centrífuga. Os tubos foram colocados num banho de gelo (para inactivação enzimática) sobre uma placa de agitação, durante 30 minutos e, posteriormente, os tubos foram colocados num aparelho de ultrassons durante 5 minutos. Procedeu-se então a uma centrifugação a 15.000g (20 minutos, 4°C). O sobrenadante foi recolhido para um frasco de vidro. Repetiu-se o processo nas mesmas condições, para uma lavagem do precipitado. Juntaram-se os extractos da primeira e segunda extracção e procedeu-se à respectiva filtração (filtros Whatman nº 4) a frio. Submeteu-se então o extracto aquoso a nova filtração (Filtros Millex 0.45 μm) para um tubo *ependorf* de 1,8 mL. Procedeu-se à separação e quantificação dos açúcares por HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*Waters, EUA*), utilizando um detector refractométrico (*Refractive Index Detector, Waters, 2414*), com sistema de solvente (*Bomba 125 NM*), equipado com uma coluna *SugarPak 1 (Waters 6,5 x 300 mm)* em forno a 90 °C e *software Karat 32*, versão 8.0, para aquisição e tratamento de dados. Utilizou-se como solvente, a solução aquosa de EDTA de cálcio a 50 ppm, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Foram feitos 3 extractos para cada tratamento, e efectuaram-se duas injeções de cada extracto. As amostras foram colocadas no injector, com *loop* de 20 μL analisadas em duplicado. Para a identificação dos compostos foi realizada uma análise de padrões de glucose, frutose, sacarose, galactose, rafinose, manose e estaquinose (Sigma-Aldrich). A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas com recurso à curva de calibração e tempo de retenção

dos padrões de concentração conhecida, e a quantificação das áreas dos picos dos cromatogramas (figura 3.5).

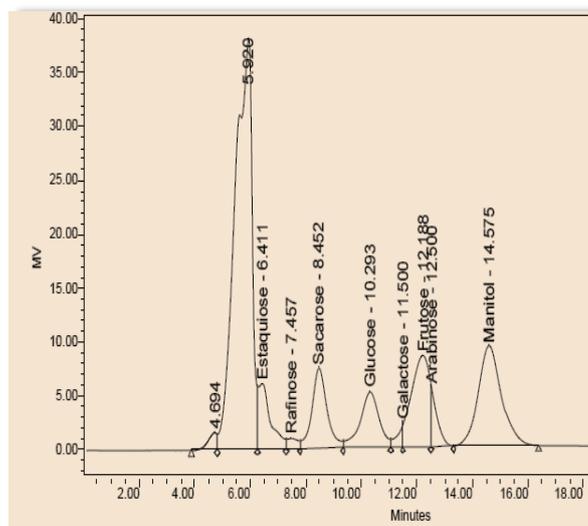


Figura 3.5 - Exemplo de um registro espectral relativo a padrões de glúcidos, de acordo com o procedimento adoptado para separação e quantificação de ácidos gordos.

3.2.9. Azoto e proteínas

O teor proteico total nos grãos maduros, nos diferentes tratamentos, foi determinado após moagem do grão num moinho *Cyclotec 1093 (Tecator, Suécia)*, segundo o método Kjeldhal, de acordo com a ISO 20483:2013, com ligeiras modificações. Numa balança analítica (*Mettler PC 180*) pesou-se $1 \text{ g} \pm 0,001\text{g}$ de amostra. Colocou-se a amostra num tubo de mineralização (Kjeldhal), juntou-se o catalisador (sulfato de K + selénio) (Panreac 131532.1211 + Aldrich 229865) e 12,5 mL de ácido sulfúrico 96% (Sigma-Aldrich, 30743). Homogeneizou-se de forma a assegurar um contacto completo da amostra. Colocou-se o tubo no bloco de mineralização pré-aquecido (*Bicasa Milano, Mod – BE 97*) a $420 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 4 horas de mineralização deixou-se arrefecer. Cada tubo contendo a amostra mineralizada foi posteriormente destilado numa unidade *Kjeltec 2200 - Auto Destillation (Foss, Suécia)*: juntou-se uma solução de hidróxido de sódio (Eka 101516) para neutralizar a quantidade de ácido sulfúrico excedente e vapor de água, levando à formação de amoníaco, o qual foi recolhido num copo previamente preparado com ácido bórico (Pronalab 79) e algumas gotas de indicador vermelho de metilo (Fluka 32654). De seguida, titulou-se (*Titulador Automático Radiometer Tim 850*) a amoníaco com ácido clorídrico 0,1N (Chem-lab CL05.0311.1000) até se atingir o ponto final. Paralelamente, efectuou-se um ensaio em branco (digestão, destilação e titulação) na ausência de amostra. O teor de azoto, N, expresso em percentagem foi calculado pela equação:

$$N (\%) = [(V_1 - V_0) \times T \times 0,014 \times 100] / m$$

Sendo: V_0 - volume de solução de ácido forte gasto no ensaio em branco expresso em mL; V_1 - volume de ácido forte gasto no ensaio com a amostra, expresso em mL; 0,014 valor, em gramas, da quantidade de N equivalente à utilização de 1 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,1N; m- massa, em gramas, da amostra.

O teor de proteína bruta da amostra foi calculado posteriormente multiplicando o valor obtido pelo factor convencional de 5,7.

3.2.10. Índice de sedimentação SDS

Este método, que estima a força do glúten, baseia-se na medição do volume de sedimentação dos grãos de trigo moído após agitação com uma solução de SDS e ácido láctico (Dick e Quick, 1983). As amostras foram moídas num moinho *Cyclotec (Tecator, Suécia)* com o crivo de 1 mm.

Neste enquadramento, para cada tratamento foram preparadas as seguintes soluções:

- A - Solução de azul de bromofenol em água (0,001% p/v)
- B - Solução de ácido láctico (9,5% v/v)
- C - Solução de SDS em água destilada (2% p/v)
- D - Mistura da solução B e da solução C na proporção de 1:28.

A amostra (1 g) foi suspensa com azul de bromofenol (solução A) e sujeita a períodos alternados de agitação (com recurso a um vortex) e repouso. Após a adição da solução D, os tubos foram sujeitos a períodos alternados de agitação e repouso num agitador oscilante (*Brabender OHG Duisburg, Alemanha*). As amostras foram colocadas na posição vertical e ao fim de 10 minutos procedeu-se à leitura da altura de sedimento.

3.2.11. Determinação da cor

Procedeu-se à determinação da cor da farinha, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num *Chopin CD2* com granulometria inferior a 450 μm , utilizando um colorímetro *CR-400 Konica Minolta*. A leitura foi efectuada para o iluminante D65, em triplicado. O equipamento foi previamente calibrado com leitura num padrão anti-reflexo, com as coordenadas $Y=85,50$; $x=0,3185$; $y=0,3356$.

Neste procedimento considerou-se o sistema CIELab. Neste contexto, adoptaram-se as coordenadas cromáticas L^* , a^* e b^* , cujas dimensões no espaço correspondem às cores visíveis ao olho humano e separam a luz ambiente ou luminosidade (L^*) no eixo vertical e a cromaticidade no eixo horizontal xy (figura 3.6).

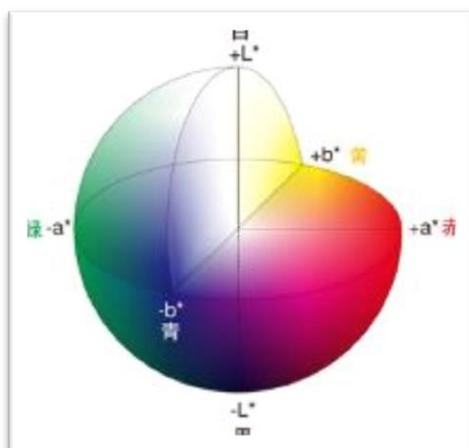


Figura 3.6 - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIELab, em que L* representa a escala de cor entre o preto (0) e o branco (100), a* varia entre o verde (-) e o vermelho (+), e b* varia entre o azul (-) e o amarelo(+).

3.2.12. Humidade

A humidade das amostras da farinha, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num *Chopin CD2* com granulometria inferior a 450 μm , foi determinada segundo a NP 516 (2000). Pesou-se rapidamente todo o produto da moenda ($5 \pm 0,001$ g), na caixa de tara previamente seca e tarada, com a respectiva tampa. De seguida, colocou-se a caixa de tara aberta contendo a toma para análise juntamente com a sua tampa na estufa, durante 90 ± 5 min, a 130 ± 3 °C. Retirou-se rapidamente a caixa de tara da estufa, fechou-se e colocou-se no exsiccador. Após 30 minutos efectuou-se uma pesagem. O teor de água, w , expresso como uma percentagem em massa do produto, foi calculado pela seguinte fórmula:

$$W (\%) = [1 - (m_1/m_0)] \times 100$$

Sendo: m_0 - massa, em gramas, da toma para análise; m_1 - massa, em gramas, da toma para análise após secagem.

3.2.13. Cinzas

A cinza nas amostras da farinha, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num *Chopin CD2* com granulometria inferior a 450 μm , foi determinada de acordo com a NP 519 (1993). Colocou-se a amostra ($5 \pm 0,01$ g) numa cápsula e pesou-se com uma aproximação de 0,0001 g. Colocou-se a cápsula numa mufla a 900 ± 10 °C, até à inflamação do produto, durante 2 horas, para decorrer a combustão total da amostra. Retirou-se então a cápsula da mufla, deixou-se arrefecer durante 1 minuto sobre uma placa de material termorresistente e depois no exsiccador. Após a cápsula

ter atingido a temperatura ambiente pesou-se com aproximação de 0,0001 g. O teor de cinza, expresso em percentagem em massa, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$(m_1/m_0) \times 100$$

Sendo: m_0 - massa, em gramas, da quantidade de amostra; m_1 - massa, em gramas, do resíduo.

3.2.14. Peso de mil grãos

Para cada variedade e tratamento realizou-se a pesagem de mil grãos em triplicado. Nas variedades com menor produção de grãos, o peso de uma amostra menor foi extrapolado para mil grãos.

3.3. Tratamento estatístico

Para avaliação dos resultados experimentais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com uma ou duas variáveis e determinada a significância pelo teste de Fisher, tendo-se usado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para estudo comparativo das médias.

4. Capítulo IV - Resultados e Discussão

4.1. Biofortificação em ambiente controlado

4.1.1. Desenvolvimento fenológico

De acordo com o desenho experimental adoptado, os estados fenológicos das plantas, no decurso do respectivo ciclo de vida, face à carga nutricional utilizada, revelaram diferenças substanciais, nos planos temporal (figura 4.1) e ao nível da biomassa produzida (figura 4.2 a 4.9; tabela 4.1 a 4.4).

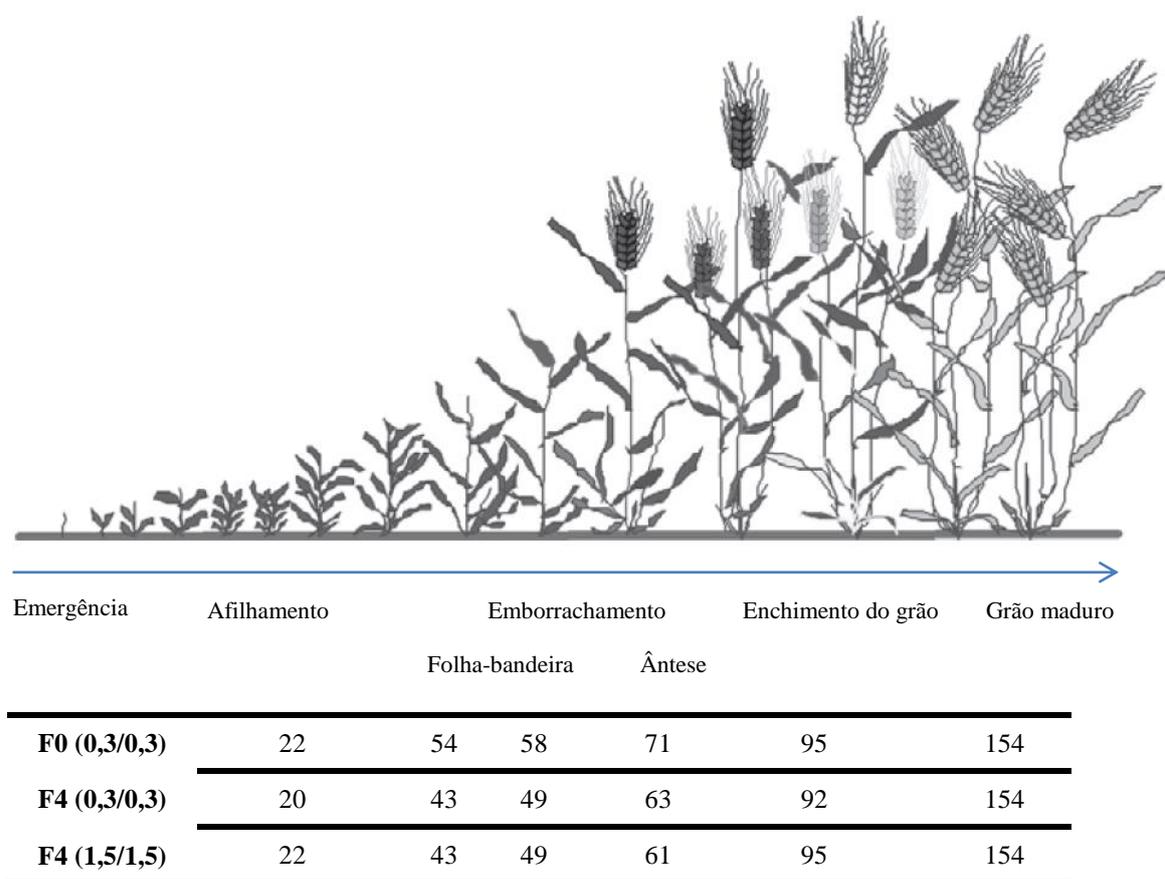


Figura 4.1 - Desenvolvimento fenológico do trigo mole (dias) submetido aos diferentes tratamentos (Adaptado de Dias e Lidon, 2009).

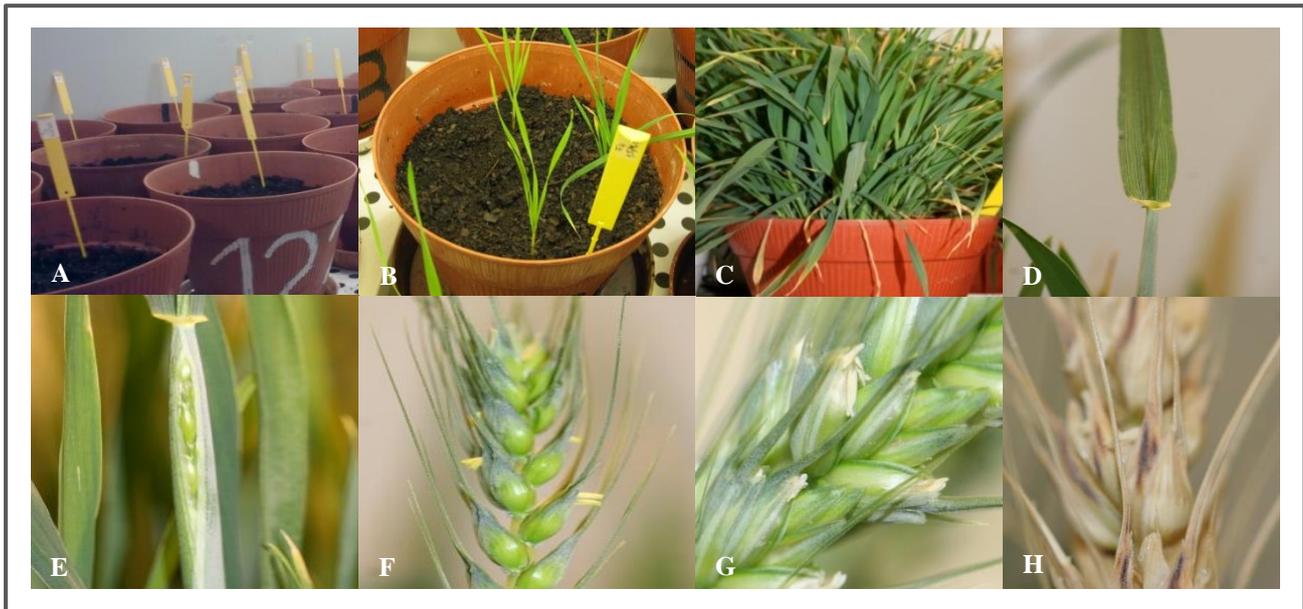


Figura 4.2 - Visualização de alguns aspectos do ciclo de vida do trigo mole (A) – Sementeira; (B) – Estados iniciais de desenvolvimento; (C) – Afilhamento; (D) – Folha-bandeira; (E) – Emborrachamento; (F) – Ântese; (G) – Enchimento do grão; (H) – Grão maduro.

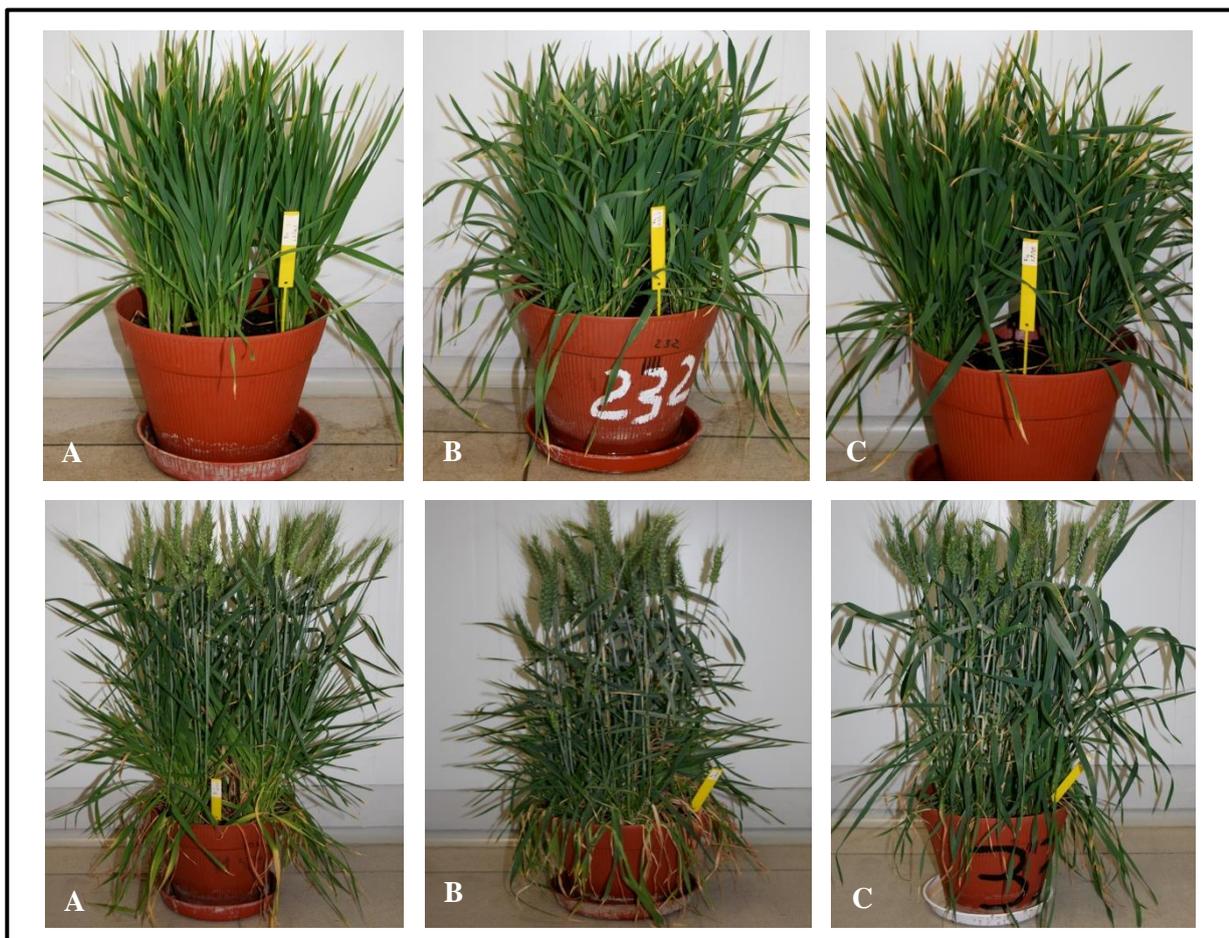


Figura 4.3 - Visualização do estado das plantas desenvolvidas sobre o tratamento F0 (0,3/0,3) (A), F4 (0,3/0,3) (B) e F4 (1,5/1,5) (C).

O estado fenológico da planta relaciona-se com os parâmetros fotossintéticos (Marschner, 1995), pelo que é possível correlacionar o estado nutricional da planta com as componentes de cor das respectivas partes vegetativas. De facto, os parâmetros mensuráveis L^* , a^* e b^* fornecem indicações sobre o tom (H^0) e a saturação (C^*) da cor (Bicho, 2004). Estes dois últimos, juntamente com a luminosidade (L^*) são responsáveis pela percepção da cor ao olho humano (Bicho, 2004).

A luminosidade (L^*) varia entre o preto (0) e o branco (100) e a tonalidade, representada pelo parâmetro H^0 , varia entre o vermelho (0°), o amarelo (90°) e o verde (180°), sendo bastante útil na interpretação de diferenças de cor (Bicho et al., 2012). Desta forma, verifica-se uma maior contribuição do verde ($-a^*$) em relação ao vermelho ($+a^*$), na tonalidade das amostras, assim como uma maior contribuição do amarelo ($+b^*$) em relação ao azul ($-b^*$) (tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Média e respectivo erro padrão ($n=9$) dos parâmetros colorimétricos da parte aérea das plantas e análise de variância ($\alpha=0,05\%$), com a variável tratamento. As letras *a* e *b* representam as diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s* e *t* representam as diferenças significativas entre os períodos experimentais, relativamente a cada parâmetro colorimétrico individualizado.

Dias após germinação		F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
45	L	34,64 ± 1,62 ^{a,r}	36,41 ± 2,26 ^{a,r}	36,68 ± 3,68 ^{a,r}
	a*	-12,64 ± 0,88 ^{a,s}	-12,78 ± 2,23 ^{a,s}	-11,53 ± 1,39 ^{a,s}
	b*	16,34 ± 1,72 ^{a,r}	15,77 ± 2,97 ^{a,r}	13,82 ± 2,22 ^{a,r}
	C*	20,67 ± 1,88 ^{a,r}	20,33 ± 3,55 ^{a,r}	18,01 ± 2,56 ^{a,r}
	H ⁰	128,32 ± 2,66 ^{a,r}	128,51 ± 2,32 ^{a,r}	135,69 ± 15,75 ^{a,r}
104	L	33,61 ± 3,45 ^{a,r,s}	33,38 ± 2,30 ^{a,r,s}	36,09 ± 1,89 ^{a,r}
	a*	-12,50 ± 1,27 ^{a,s}	-10,02 ± 1,11 ^{a,s}	-11,66 ± 1,64 ^{a,s}
	b*	15,54 ± 2,08 ^{a,r}	9,76 ± 1,86 ^{b,s}	13,62 ± 3,17 ^{a,r}
	C*	19,95 ± 2,38 ^{a,r}	14,00 ± 2,09 ^{b,s}	17,95 ± 3,46 ^{a,r}
	H ⁰	129,58 ± 2,91 ^{a,r}	135,20 ± 3,15 ^{a,r}	136,79 ± 15,54 ^{a,r}
112	L	30,20 ± 1,35 ^{a,s}	32,51 ± 2,33 ^{a,s}	33,63 ± 0,91 ^{a,r}
	a*	-7,56 ± 0,67 ^{a,r}	-5,87 ± 0,44 ^{a,r}	-7,14 ± 0,57 ^{a,r}
	b*	7,70 ± 1,07 ^{a,s}	5,16 ± 0,57 ^{a,t}	7,36 ± 0,87 ^{a,s}
	C*	10,80 ± 1,22 ^{a,s}	7,82 ± 0,67 ^{a,t}	10,26 ± 0,99 ^{a,s}
	H ⁰	134,64 ± 1,58 ^{a,r}	138,82 ± 1,87 ^{a,r}	139,07 ± 14,56 ^{a,r}

Adicionalmente, a contribuição do verde vai diminuindo ao longo do ciclo da planta, sendo significativamente diferente ($P \leq 0,05$) no último período experimental (após enchimento do grão), o que resulta da própria senescência da planta. Da mesma forma, verificou-se uma diminuição da luminosidade da parte aérea, no último período, face ao primeiro ensaio experimental, à excepção do tratamento F4 (1,5/1,5), onde este parâmetro não apresenta diferenças significativas (para um nível de

significância de 95%) entre os períodos experimentais (tabela 4.1). Entre os tratamentos, foram apenas verificadas diferenças significativas nos parâmetros colorimétricos ao 104º dia após germinação, onde o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou menor contribuição do amarelo. Verificou-se, ainda, uma maior contribuição do amarelo na cor das plantas obtidas pelo tratamento F0 (0,3/0,3) (tabela 4.1), conforme se observa também na figura 4.3. Em contrapartida, verificou-se também uma forte contribuição do verde nas plantas do tratamento F0 (0,3/0,3), embora não sendo significativamente diferente dos demais tratamentos. Por outro lado, verificou-se um aumento, na tonalidade das plantas, ao longo do ensaio experimental.

Adicionalmente, a diferença entre duas cores possibilita ainda a determinação do valor mínimo que permite ao olho humano detectar diferença entre duas amostras (Bicho, 2004). Os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentam a maior diferença de cor da parte aérea das plantas, sendo essa diferença perceptível ao olho nú, diminuindo ao longo dos períodos experimentais (tabela 4.2). A menor diferença de cor entre as plantas é conferida pelos tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) aos 112 dias após germinação (tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Diferença de cor entre os tratamentos (ΔE), nos diferentes períodos experimentais: 45, 104 e 112 dias após germinação.

Tratamentos	45	104	112
F0 (0,3/0,3) - F4 (0,3/0,3)	1,87	0,82	0,14
F0 (0,3/0,3) – F4 (1,5/1,5)	3,43	0,81	0,30
F4 (0,3/0,3) – F4 (1,5/1,5)	2,33	0,60	0,33

4.1.2. Produção de biomassa

O peso seco de raízes em F0 (0,3/0,3), embora variando entre os períodos experimentais, exibiu valores significativamente mais elevados até à colheita do grão (figura 4.4; tabela 4.3). Acresce ainda que a produção de biomassa nas raízes nos restantes tratamentos seguiu um padrão heterogéneo. Verificou-se que F4 (1,5/1,5) e F0 (0,3/0,3) diminuíram aos 84 dias após a germinação, com subsequente aumento após o dia 107º (figura 4.4; tabela 4.3). Paralelamente, a produção de biomassa em F4 (0,3/0,3) diminuiu de forma continuada até à colheita do grão. Neste enquadramento, verificou-se ainda que o aumento da produção de biomassa na raiz em F0 (0,3/0,3), ao fim de 84 e 141 dias foi, por oposição às variações detectadas nos restantes tratamentos, significativa. A tendência revelada na produção de biomassa radicular em F4 (1,5/1,5) e F0 (0,3/0,3) parece indiciar a existência de requisitos adicionais em água e/ou nutrientes (Lidon *et al.*, 2015).

Em contrapartida, o fornecimento de minerais à planta deve ser racionalizado, de forma a suprimir as necessidades nutricionais da planta e simultaneamente evitar inibição do seu desenvolvimento face a induções de toxicidade (Ashagre *et al.*, 2013). De facto, o crescimento das

raízes e parte aérea pode ser significativamente afectado pelo elevado fornecimento de nutrientes à planta, eventualmente devido à acumulação excessiva na parede celular (os quais afectam e limitam negativamente a elasticidade das células - Ashagre *et al.*, 2013), membrana celular e compartimentos diversos onde se incluem os organitos de membrana simples ou dupla (Lidon e Henriques, 1994, 1997) e produção de formas reactivas de oxigénio (Mourinho *et al.*, 2015). Neste enquadramento, relativamente ao tratamento controlo (F0 (0,3/0,3)), o descréscimo significativo da biomassa nas raízes dos restantes tratamentos, nos 84° e 104° dia após a germinação, sugere uma ligeira toxicidade da planta.

Hussain *et al.* (2012) avaliaram a produção de biomassa dos órgãos vegetativos de diferentes cultivares de trigo, como resposta à biofortificação agronómica com Zn no solo, tendo obtido para as raízes os melhores resultados (aproximadamente 2,2 g de peso seco), para uma concentração de Zn de 10 mg kg⁻¹ de solo, na variedade Shafaq-2006. Verificou-se assim que a aplicação de Zn nesta cultivar de trigo possui um efeito significativo no rendimento da biomassa radicular e o rendimento do grão. Por oposição, no estudo por nós efectuado esta tendência não se verificou, pois o tratamento controlo revelou o maior crescimento da raiz e o maior número de grãos (figura 4.4; tabela 4.6).

O peso seco das raízes no final do ciclo de vida, não correspondeu ao valor máximo encontrado durante o periodo experimental, aspecto que contrasta com os resultados de Mai *et al.* (2011), mas que estes autores justificaram como traduzindo uma deficiência em Zn.

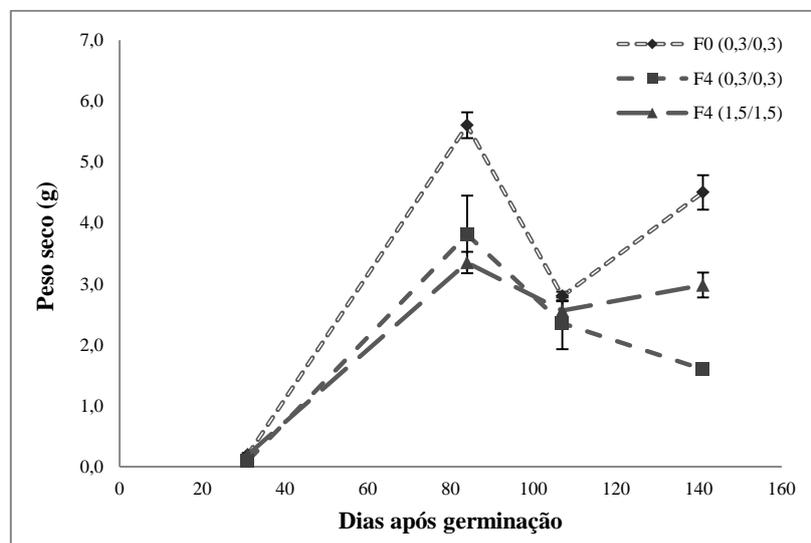


Figura 4.4 - Peso seco médio na raiz (g) e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.3 - Média de peso seco na raiz (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da raiz, com a variável de tratamento. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	0,20 ± 0,014 ^{a,t}	0,10 ± 0,007 ^{a,t}	0,20 ± 0,028 ^{a,s}
84	5,60 ± 0,212 ^{a,r}	3,81 ± 0,636 ^{b,r}	3,35 ± 0,177 ^{b,r}
107	2,80 ± 0,071 ^{a,s}	2,35 ± 0,424 ^{a,r,s}	2,56 ± 0,156 ^{a,r}
141	4,50 ± 0,283 ^{a,r}	1,60 ± 0,042 ^{b,r,s}	2,98 ± 0,205 ^{b,r}

A biomassa seca da parte aérea, 84 dias após a germinação atingiu o seu valor mais elevado no tratamento F4 (1,5/1,5) (figura 4.5; tabela 4.4). Embora não se tenham verificado diferenças significativas entre os tratamentos para os demais períodos experimentais, verificou-se ainda que, tal como nas raízes, o valor máximo do peso seco obtido durante o período experimental, não correspondeu ao final do ensaio. Acresce ainda que, também na parte aérea, as tendências foram contrastantes com a tendência identificada por Mai *et al.* (2011).

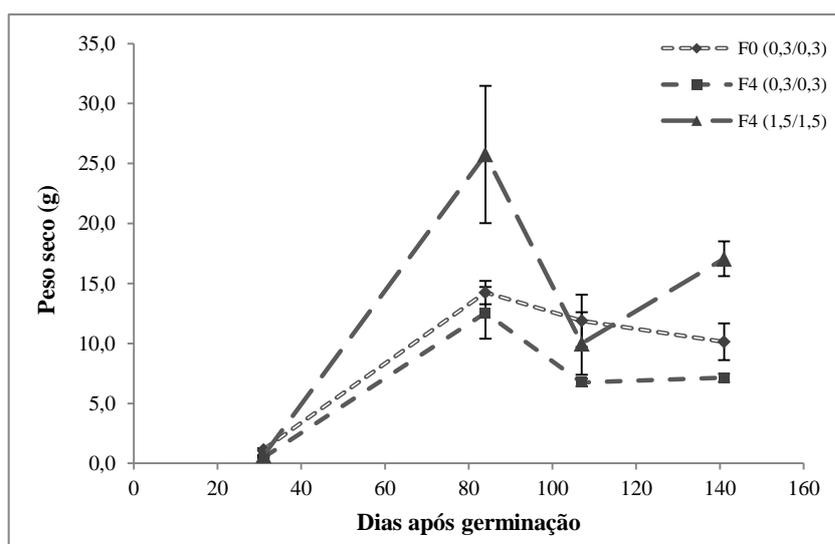


Figura 4.5 - Peso seco médio (g) da parte aérea e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, ao longo do ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.4 - Média de peso seco na parte aérea (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da parte aérea, com a variável de tratamento. As letras *a, b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s e t* indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	1,15 ± 0,106 ^{a,s}	0,50 ± 0,071 ^{a,r}	0,65 ± 0,035 ^{a,t}
84	14,24 ± 0,981 ^{b,r}	12,54 ± 2,164 ^{b,r}	25,77 ± 5,724 ^{a,r}
107	11,89 ± 2,187 ^{a,r,s}	6,75 ± 0,323 ^{a,r}	9,99 ± 2,607 ^{a,r,s}
141	10,14 ± 1,527 ^{a,r,s}	7,14 ± 0,329 ^{a,r}	17,07 ± 1,452 ^{a,r,s}

Verificou-se que, 84 dias após germinação, a biomassa da espiga apresentou, relativamente ao tratamento F0 (0,3/0,3), valores significativamente mais elevados, tendo estes aumentado a partir do 107º dia, onde no final do período experimental, o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou uma maior produção (figura 4.6; tabela 4.5). Além disso, também no último período experimental, se observaram diferenças significativas nos tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), face ao período anterior. A tendência revelada, até ao 84º dia, em F0 (0,3/0,3), sugere uma menor relação inicial *source/sink*. Além disso, durante o desenvolvimento da espiga, a diminuição da biomassa em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) parece indicar uma remobilização de nutrientes para outras partes da planta, tendo ocorrido o oposto em F4 (1,5/1,5).

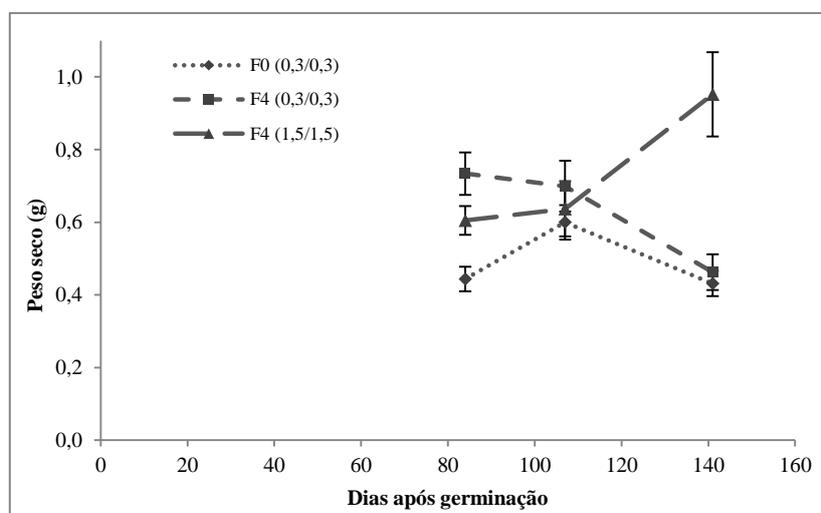


Figura 4.6 - Peso seco médio da espiga e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.5 - Média de peso seco na espiga (g), respectivo erro padrão (n=2) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de biomassa (g) da espiga, com a variável de tratamento. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s*, indicam as diferenças significativas entre os períodos de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	0,444 ± 0,034 ^{b,r}	0,734 ± 0,058 ^{a,r}	0,605 ± 0,039 ^{a,b,s}
107	0,600 ± 0,047 ^{a,r}	0,699 ± 0,070 ^{a,r}	0,637 ± 0,076 ^{a,s}
141	0,431 ± 0,035 ^{b,r}	0,462 ± 0,050 ^{b,s}	0,952 ± 0,116 ^{a,r}

O tratamento F4 (0,3/0,3), produziu o maior número de plantas, embora com menor número médio de espigas e menor número médio de grãos. Contudo, os grãos possuíram o maior peso médio (tabela 4.6). Em contrapartida, as plantas do tratamento F0 (0,3/0,3) produziram maior número de grãos, embora com menor peso médio, o que revelou um baixo rendimento no enchimento do grão (tabela 4.6; figura 4.7), aparentemente por consequência do maior número de espigas. No entanto, o

peso médio dos grãos aponta para variações mínimas (*ca.* 0,7 mg) entre os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3).

Tabela 4.6 - Descrição produtiva de plantas, espigas e grãos, em termos de rendimento, para cada tratamento.

Tratamento	Nº plantas	Nº médio espigas	Nº médio grãos	Peso médio grãos (mg)
F0 (0,3/0,3)	4	19	53	43,30
F4 (0,3/0,3)	5	15	31	50,34
F4 (1,5/1,5)	3	29	42	45,83

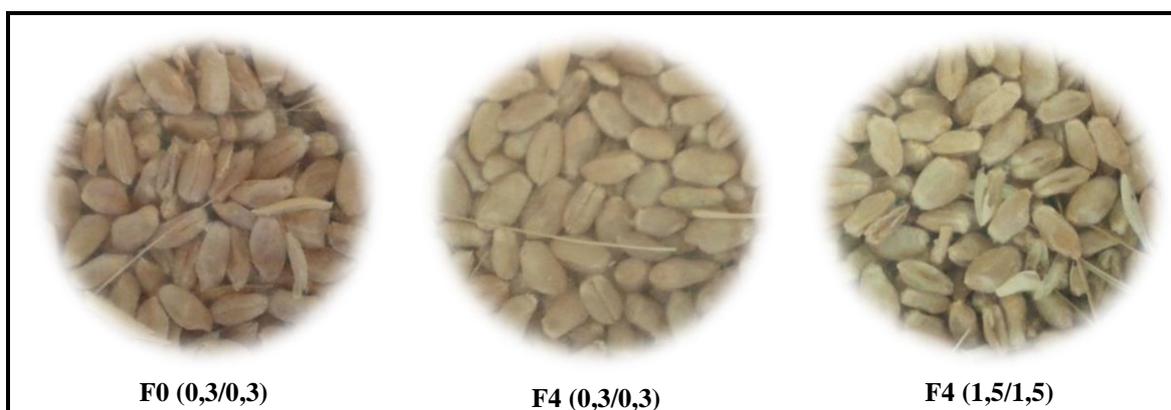


Figura 4.7 – Ilustração dos grãos maduros, provenientes de cada tratamento.

Considerando a biomassa seca da planta durante o respectivo ciclo de vida, verificou-se que a razão raiz / parte aérea, entre os períodos experimentais exibiram tendências antagônicas entre os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) (figura 4.8); F4 (0,3/0,3) aumentou até aos 107 dias após a germinação, diminuindo posteriormente (figura 4.8). O carácter antagónico em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) persistiu, para a razão do peso fresco raiz / parte aérea, 84 dias após germinação (figura 4.9). Verificou-se ainda uma diminuição acentuada entre o 31º e o 84º dia em F4 (1,5/1,5). Estas diferenças demonstram a ocorrência de alterações metabólicas na raiz e/ou no metabolismo da parte aérea em F4 (1,5/1,5), associadas a uma maior disponibilidade nutricional na solução nutritiva (5 vezes mais elevada para todos os nutrientes, relativamente à solução controlo).

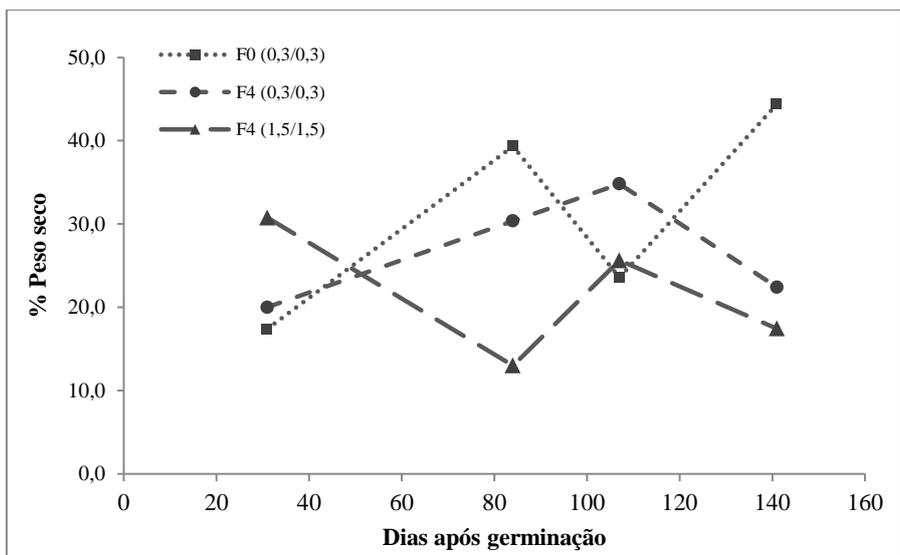


Figura 4.8 - Razão relativa aos valores médios do peso seco da raiz e parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das planta.

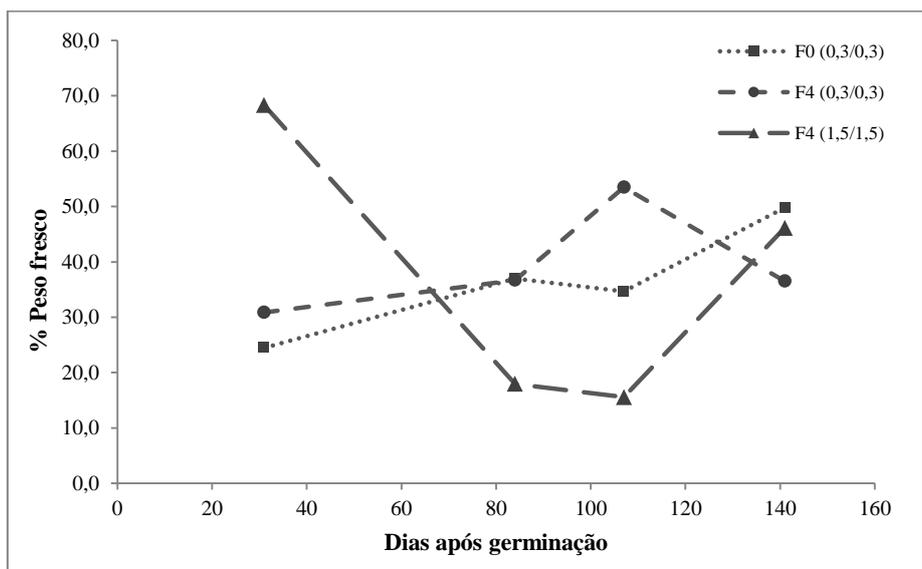


Figura 4.9 - Razão relativa aos valores médios do peso fresco da raiz e parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

A matéria seca na espiga, ao longo do período experimental, em todos os tratamentos, comparativamente à raiz e parte aérea foi proporcionalmente mais elevada (figura 4.10). Acresce ainda que a parte aérea apresentou valores de matéria seca superiores à raiz, em todos os tratamentos, com exceção de F0 (0,3/0,3) nos 84 dias e F4 (1,5/1,5) nos 107 dias após a germinação, períodos em que a raiz apresentou maior percentagem de matéria seca (figura 4.10).

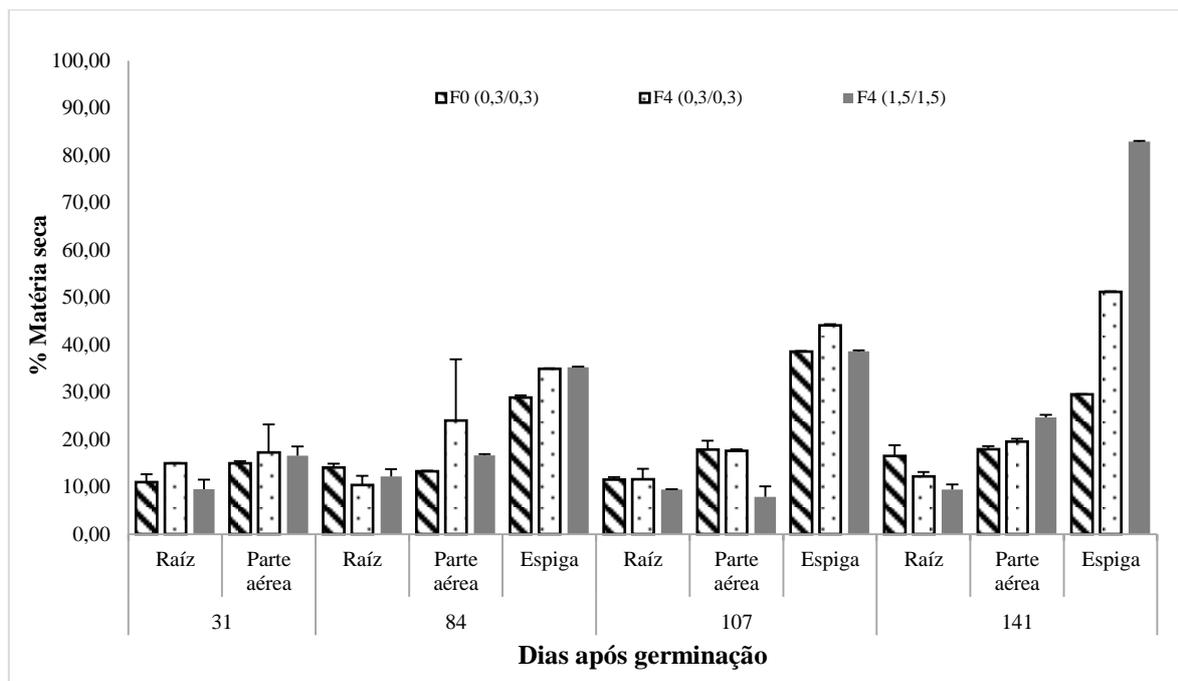


Figura 4.10 - Peso seco (média percentual e respectivo erro padrão) para os diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Equacionando a relação entre os teores de matéria orgânica e inorgânica nos diferentes órgãos das plantas e nos diferentes tratamentos, subsistem ainda variações apreciáveis. Com efeito, na raiz, apesar de prevalecerem teores relativamente semelhantes no início do ciclo vegetativo, emergem posteriormente variações entre os tratamentos, ao longo do ensaio. Neste contexto, em F4 (0,3/0,3) detectaram-se valores superiores de matéria inorgânica, aos 84 e 107 dias após germinação, o que sugere uma maior acumulação de elementos metálicos nestes períodos (figura 4.11). Em contrapartida, o tratamento F0 (0,3/0,3) apresenta maior teor de matéria inorgânica na raiz, no final do ciclo de vida da planta (figura 4.11).

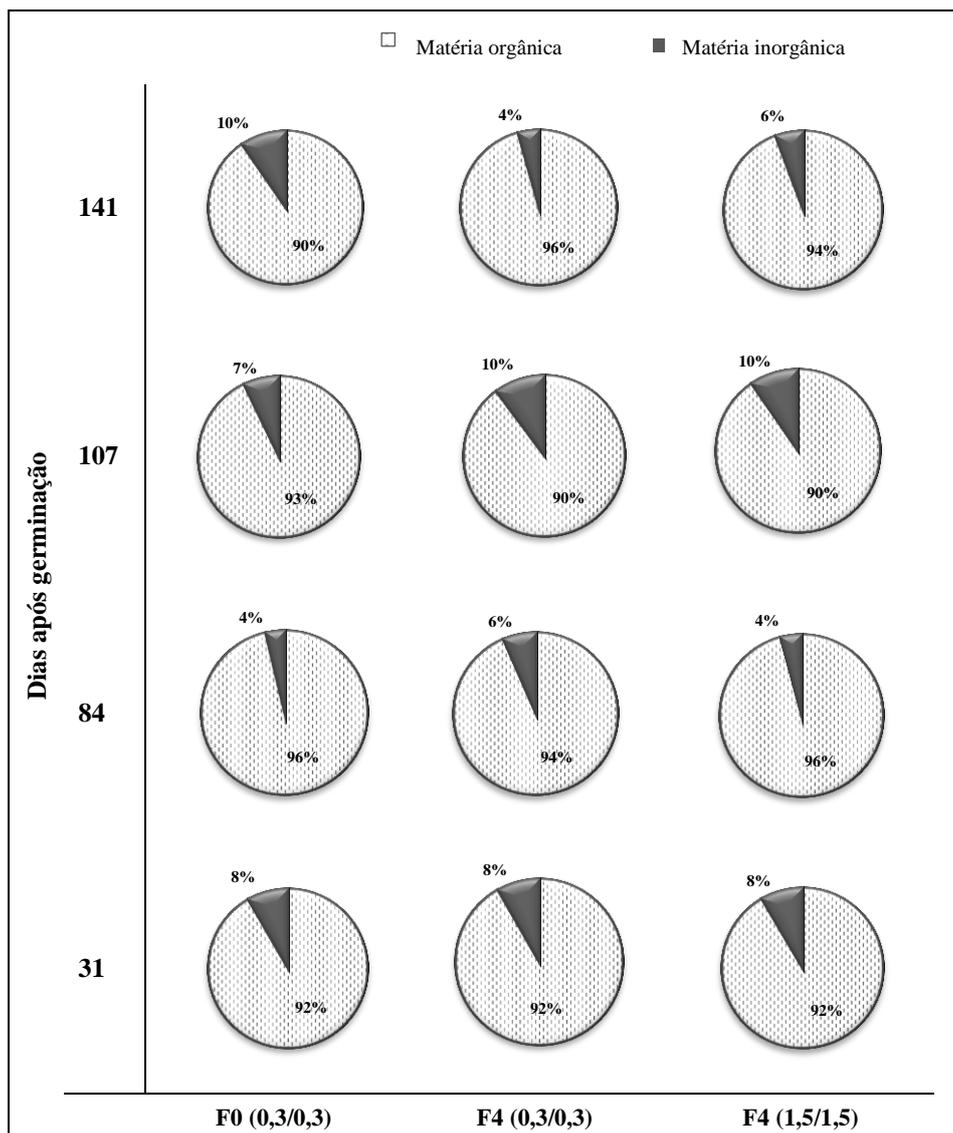


Figura 4.11 - Teor médio de matéria orgânica e inorgânica (%) na raiz, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

O teor de matéria orgânica e inorgânica na parte aérea revelou uma tendência semelhante à da raiz. No início do ciclo de vida da planta, não se verificaram oscilações apreciáveis entre os tratamentos (figura 4.12). Ao 84º dia observou-se um aumento de matéria orgânica face à fracção inorgânica, em todos os tratamentos. No final do ciclo vegetativo, o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou um maior teor de matéria inorgânica relativamente aos outros tratamentos (figura 4.12).

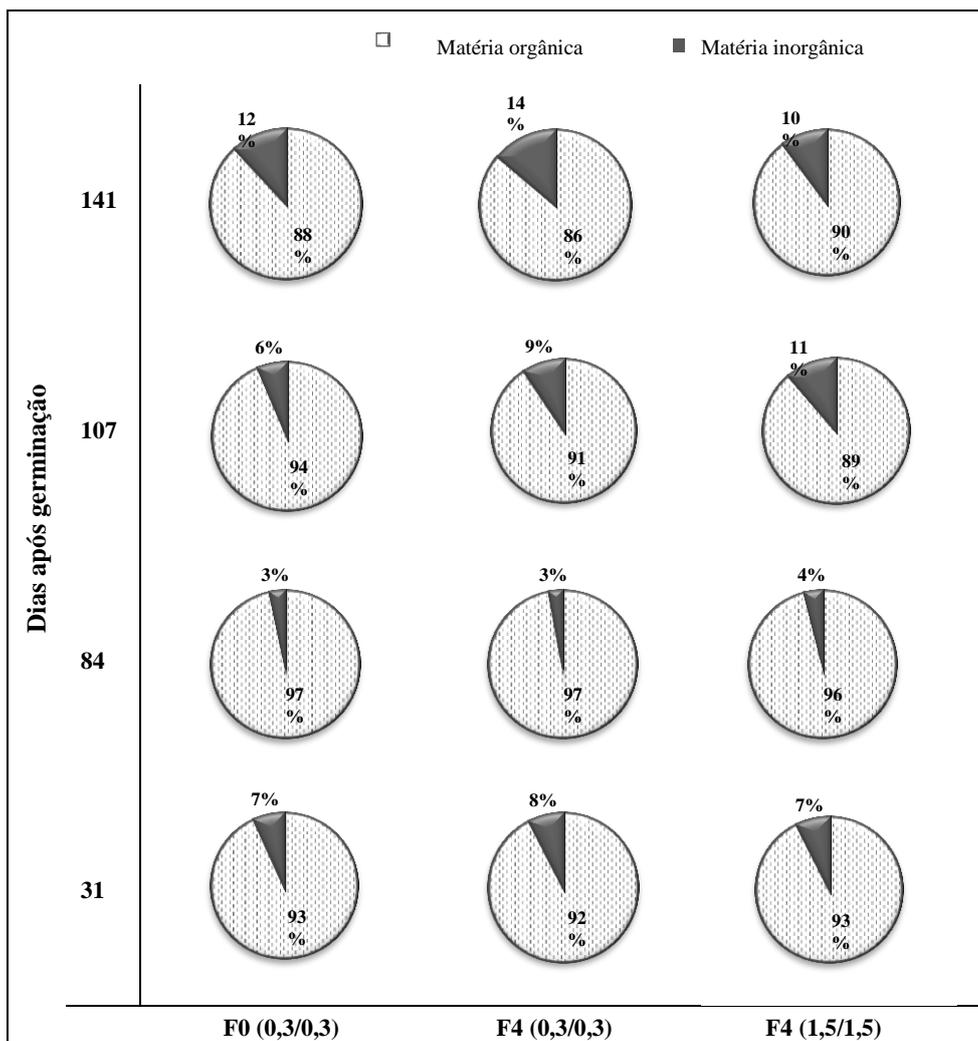


Figura 4.12 - Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) na parte aérea, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Analisando o teor de matéria orgânica e inorgânica na espiga, verificou-se uma relação antagônica, principalmente nos tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5). No primeiro tratamento prevaleceu um efeito crescente no teor de matéria inorgânica face à componente orgânica, ao longo do tempo; no último tratamento detectou-se o efeito inverso (figura 4.13). Esta relação indica que o aumento da carga nutricional na solução nutritiva condiciona a acumulação de elementos metálicos nesta estrutura.

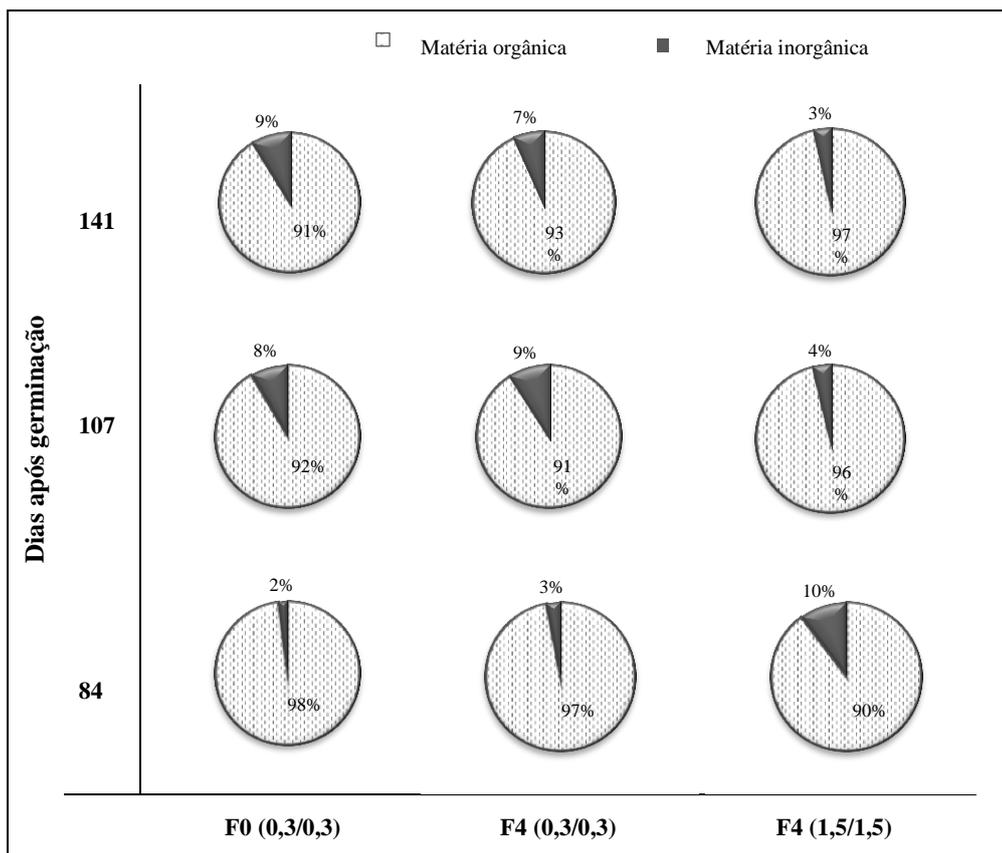


Figura 4.13 - Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) na espiga, entre os tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Relativamente ao grão, verifica-se que o teor de matéria orgânica é muito semelhante entre os tratamentos, não subsistindo assim diferenças significativas, o que aponta para um efeito limitado decorrente do aumento da carga nutricional na solução nutritiva sobre acumulação de elementos metálicos (figura 4.14).

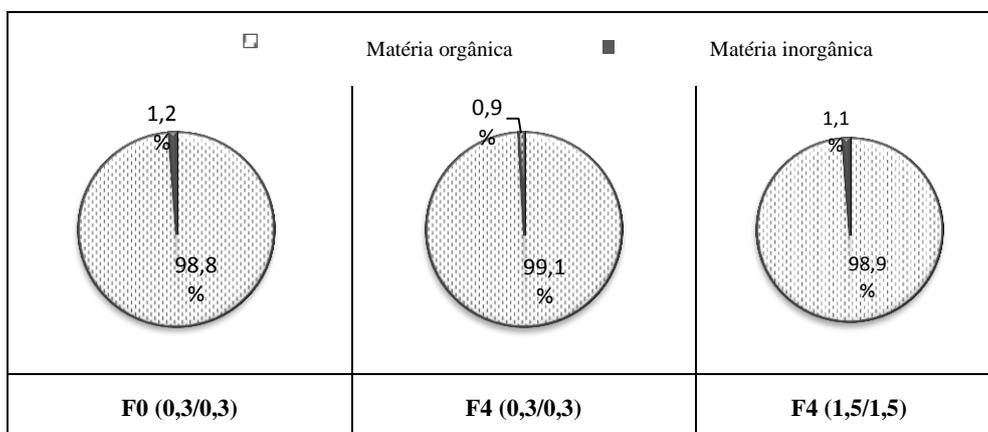


Figura 4.14 – Teor de matéria orgânica e inorgânica (%) no grão maduro, entre os tratamentos.

4.1.3. Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de elementos minerais

4.1.3.1. Micronutrientes

4.1.3.1.1 Zinco

O Zinco (Zn) é um elemento absorvido predominantemente como um cátion divalente (Zn^{2+}), cujas funções metabólicas são baseadas na forte tendência para formar complexos com N-, O- e particularmente S-ligantes, possuindo um carácter funcional e estrutural em reacções enzimáticas diversas (Marschner, 1995). Com pH elevado, é predominantemente absorvido como cátion monovalente ($ZnOH^+$) (Marschner, 1995) e, nesse sentido, a sua absorção a nível radicular, depende, entre outros factores, de interacções entre os iões (principalmente catiões), da geodisponibilidade de nutrientes e das características químicas do solo, assim como da tolerância ao *stress* de alguns genótipos (Lidon *et al.*, 2013).

No âmbito deste estudo, verificou-se em todos os períodos experimentais, e entre os tratamentos, que a acumulação de Zn predominou nas raízes, com excepção de F4 (1,5/1,5), neste último tratamento, a partir do 84º dia após a germinação (figura 4.15).

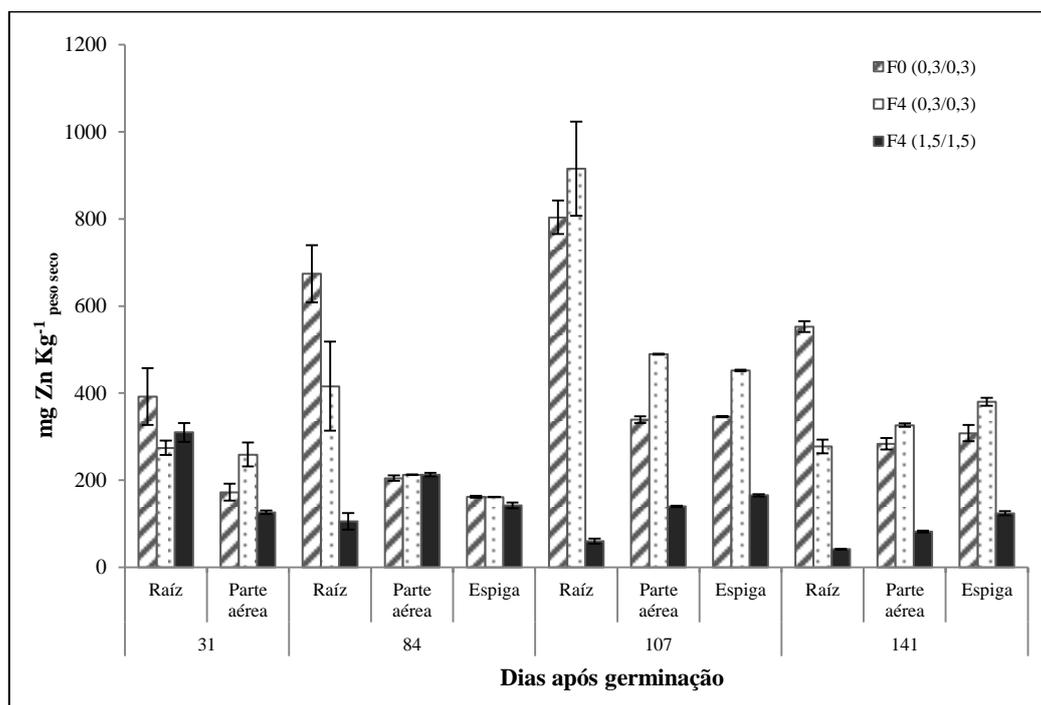


Figura 4.15 - Conteúdo de Zn ($mg\ kg^{-1}\ m.s.$) ao longo do ciclo de vida das plantas (média e erro padrão; $n=3$), nos diferentes tratamentos de fertilização.

O teor médio de Zn nas raízes em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) aumentou significativamente entre o 31° e 107° dia após a germinação (cerca de 2,05 e 3,34 vezes, respectivamente) (figura 4.16; tabela 4.7). No entanto, o teor de Zn absorvido pelas raízes, em relação ao tratamento F0 (0,3/0,3), apenas mostrou uma diferença estatística do 31° ao 84° dia após germinação (tabela 4.7). Relativamente a F4 (0,3/0,3), embora ao 141° dia após a germinação, se tenha verificado um decréscimo do teor de Zn na raiz, este apenas foi significativamente diferente no 107° dia após germinação. F4 (1,5/1,5) apresentou uma diminuição progressiva até ao final do ciclo de vida (*ca.*, 87%), diminuição, essa, apenas com significado estatístico entre o 31° e o 141° dia. Esta tendência, tal como verificado para a produção de biomassa, mostrou que o acréscimo da carga nutricional na solução nutritiva afectou, de forma significativa, a cinética da acumulação de Zn. Adicionalmente, apenas no primeiro período experimental, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas relativamente ao teor de Zn, assim como o tratamento controlo e F4 (0,3/0,3) não foram significativamente diferentes (com 95% de confiança), ao 107° dia após germinação. Nos restantes períodos o teor de Zn foi significativamente diferente entre os tratamentos.

Mai *et al.* (2011) verificaram um aumento na concentração de Zn, progressivamente, e de forma proporcional à aplicação de Zn na planta, ou seja, o valor máximo de concentração de Zn na raiz (aproximadamente 75 mg kg⁻¹) foi obtido com uma concentração de Zn no solo de 18 mg kg⁻¹. Os resultados obtidos neste estudo, apresentaram diferenças relativamente aos dados encontrados por esses autores, pois o maior teor de Zn na raiz foi obtido em F4 (0,3/0,3) ao 107° dia, tendo-se adicionalmente, verificado um decréscimo progressivo no teor de Zn absorvido pelas raízes, no tratamento de maior fertilização de Zn, ou seja, em F4 (1,5/1,5). Acresce ainda que, a concentração de Zn quantificada no nosso estudo foi cerca de 7 vezes superior, à obtida por Hussain *et al.* (2012), com uma concentração de 0,048 mg Zn L⁻¹ na solução nutritiva. Esta discrepância poderá decorrer da forma de fornecimento de Zn, uma vez que a adubação com fertilizantes sólidos está associada a uma menor taxa de absorção radicular, pois a taxa de dissolução do fertilizante é menor, comparativamente ao respectivo fornecimento em solução (Lidon *et al.*, 2013). Além disso, parte do mineral é lixiviada, não ocorrendo uma absorção integral (Lidon *et al.*, 2013). Acresce ainda que o pH do solo e a sua humidade são factores determinantes para uma adequada solubilidade de Zn no solo e, conseqüentemente, para uma correcta absorção pela planta. A humidade do solo permite a difusão do Zn para as raízes ainda que a matéria orgânica do solo possua um papel crítico na solubilidade e transporte do Zn para as raízes (Lidon *et al.*, 2013).

Comparativamente às características do solo utilizado por Hussain *et al.* (2012) (solo com 25% areia, 51% lodo, 24% argila, 6,2 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 0,44 mg Zn kg⁻¹_{solo} e 3,34 mg Fe kg⁻¹_{solo}, pH 7,81, e condutividade eléctrica de 2,47 dS m⁻¹), o solo do nosso ensaio apresentou condições mais favoráveis à dissolução e absorção do mineral às plantas, contribuindo para o aumento significativo dos resultados obtidos.

Reconhece-se que a maioria das plantas é tolerante a elevados teores de Zn, ainda que o limite tóxico para este mineral dependa do genótipo e do estágio de crescimento (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Têm sido reportados valores de 300 mg Zn kg⁻¹ peso seco com efeito tóxico em cevada, 400 mg Zn kg⁻¹ peso seco em aveia durante a fase de afilamento, e em muitas outras espécies vegetais entre 100 - 500 mg Zn kg⁻¹ peso seco (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Marschner, 1995). Estes dados sugerem que o tratamento controlo e F4 (0,3/0,3) possam estar numa zona limite de toxicidade para o Zn, cujos sintomas se equiparam aos de uma deficiência em Fe e Mg (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Marschner, 1995; Bergmann, 1992).

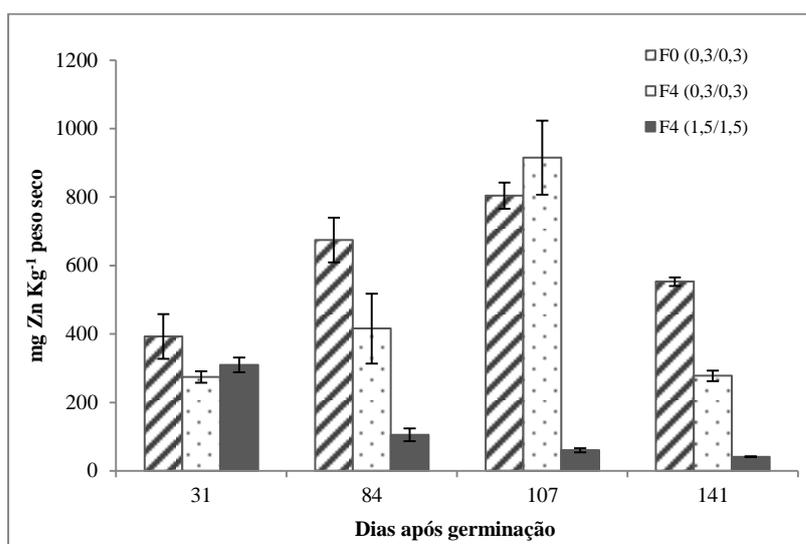


Figura 4.16 - Teor de Zn (mg kg⁻¹ m.s.) na raiz (média e erro padrão; n = 3), durante o ciclo de vida da planta com diferentes tratamentos de fertilização.

Tabela 4.7 - Média do teor de Zn na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg⁻¹) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	392,387 ± 65,235 ^{a,s}	274,437 ± 16,577 ^{a,s}	309,770 ± 21,731 ^{a,r}
84	674,173 ± 65,498 ^{a,r}	415,677 ± 102,286 ^{b,s}	105,287 ± 18,999 ^{c,r,s}
107	803,873 ± 38,373 ^{a,r}	915,540 ± 108,266 ^{a,r}	60,120 ± 5,868 ^{b,r,s}
141	552,890 ± 12,566 ^{a,r,s}	277,477 ± 15,738 ^{b,s}	41,380 ± 0,437 ^{c,s}

Na parte aérea observaram-se oscilações no teor de Zn, ao longo do ensaio experimental. F4 (0,3/0,3), no 31º dia após germinação, apresentou um teor de Zn significativamente diferente dos restantes tratamentos, sendo o mais elevado (figura 4.17). Acresce ainda que embora o teor de Zn na parte aérea não tenha apresentado diferenças significativas entre os tratamentos, no período seguinte (84 dia), F4 (0,3/0,3) apresentou um decréscimo (cerca de 18%) no teor deste elemento, ainda que sem

efeito estatístico entre os tratamentos, neste período experimental (tabela 4.8). F4 (1,5/1,5), no 84º dia após germinação, apresentou um teor máximo de Zn, decrescendo 160 % nos períodos seguintes (aproximando-se, assim, do valor inicial). Por oposição, F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) aumentaram o teor de Zn (em 64% relativamente ao primeiro, desde o 31º dia até ao 141º dia, e 130% relativamente ao segundo, do 84º dia até ao 107º dia) apresentando ambos, neste período, diferenças significativas em relação aos ensaios anteriores e entre si (tabela 4.8). Embora no último período experimental se tenha verificado uma diminuição no teor de Zn, esta tendência de F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) não foi significativa entre si, neste período e, no caso do primeiro ainda face ao período anterior (tabela 4.8). Note-se ainda que nalgumas espécies se podem evidenciar alguns sintomas de deficiência em Zn, resultante da diminuição do conteúdo deste elemento na parte aérea, eventualmente associada a um elevado fornecimento de P (Marschner, 1995). Este efeito parece, nalguns genótipos, incrementar ainda a produção de biomassa da parte aérea (Marschner, 1995). No entanto, nalgumas espécies vegetais, elevados teores de P também aparentam induzir um efeito inibitório na translocação de Zn para a parte aérea (Bergmann, 1992).

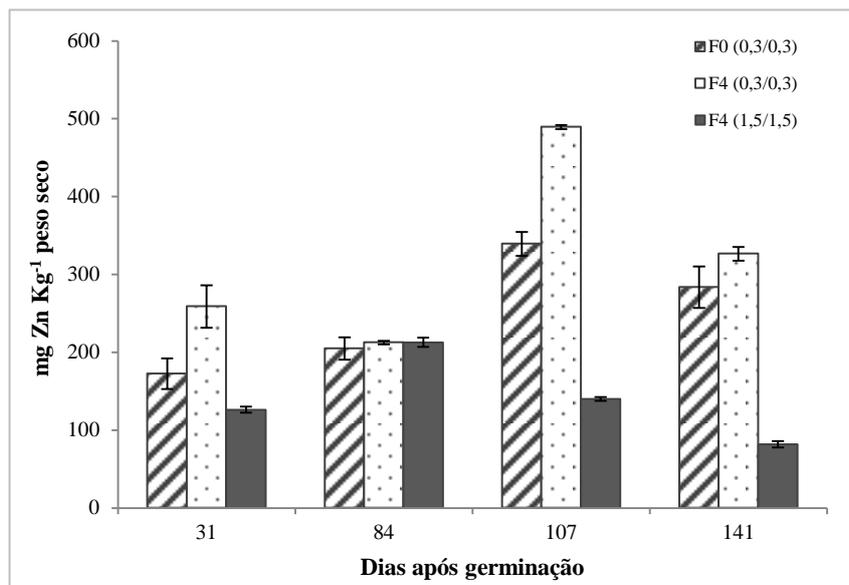


Figura 4.17 - Teor de Zn (mg kg^{-1} m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), durante o ciclo de vida das plantas, com diferentes tratamentos de fertilização.

Tabela 4.8 - Média do teor de Zn na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	172,503 \pm 19,757 ^{b,t}	258,940 \pm 27,291 ^{a,s,t}	126,287 \pm 3,964 ^{b,s}
84	204,697 \pm 14,369 ^{a,s}	212,460 \pm 2,334 ^{a,t}	212,717 \pm 5,975 ^{a,r}
107	339,177 \pm 15,235 ^{b,r}	489,397 \pm 2,600 ^{a,r}	140,140 \pm 2,381 ^{c,s}
141	283,597 \pm 26,798 ^{a,r}	326,500 \pm 8,917 ^{a,s}	81,827 \pm 4,007 ^{b,s}

A acumulação de Zn nas espigas apresentou, em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), um aumento significativo entre o 84° e o 107° dias após germinação (figura 4.18; tabela 4.9). Atente-se ainda que embora em ambos os tratamentos se observe um decréscimo, ao 141° dia após germinação, esta diferença não é significativa (tabela 4.9). Relativamente ao teor de Zn no grão, verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 4.10). Os resultados obtidos revelaram uma tendência semelhante à encontrada por outros autores. De facto, Hussain *et al.* (2012) verificaram um aumento no teor de Zn nos grãos da variedade Shafaq-2006, em resposta ao aumento de Zn à planta, revelando teores de 55 mg Kg^{-1} peso seco (com aplicação de 18 mg Zn kg^{-1} solo), face a um teor de Zn de 19 mg Kg^{-1} peso seco, nos grãos das plantas controlo (sem aplicação de Zn adicional no solo). Adicionalmente, a variedade Auqab-2000 apresentou, nas mesmas condições, teores de Zn nos grãos de 18 mg Kg^{-1} peso seco nas plantas controlo e 62 mg Kg^{-1} peso seco com aplicação de 18 mg Zn kg^{-1} solo, representando um aumento de cerca de 240 %. Estes resultados revelam efeitos significativos entre a aplicação de Zn e a cultivar de trigo, com acentuado impacto nas partes vegetativas e reprodutivas da planta (Hussain *et al.*, 2012). Estes autores verificaram ainda que o rendimento produtivo do grão responde favoravelmente ao incremento de Zn à planta, até concentrações de aproximadamente 11 mg Kg^{-1} , utilizando a variedade Shafaq-2006.

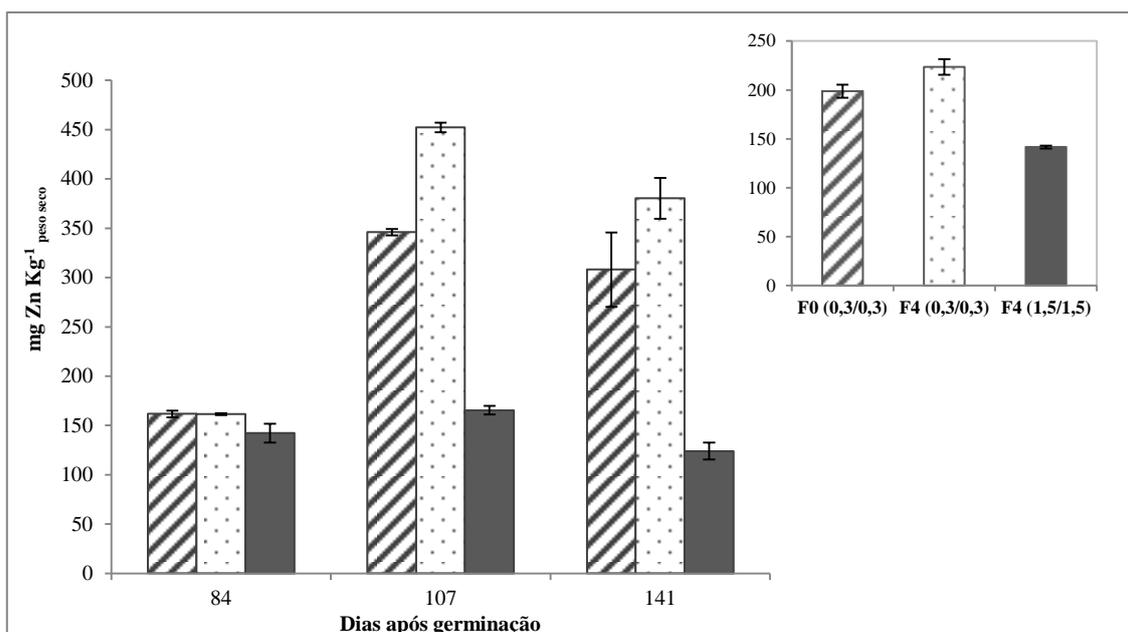


Figura 4.18 - Teor de Zn (mg kg^{-1} m.s.) nas espigas e no grão (canto superior direito), e respectivo erro padrão ($n=3$), durante o desenvolvimento da planta e no final da maturação, respectivamente.

Tabela 4.9 - Média do teor de Zn na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	161,783 ± 3,391 ^{a,s}	161,447 ± 0,891 ^{a,s}	142,220 ± 9,428 ^{a,r}
107	345,977 ± 3,166 ^{b,r}	452,140 ± 4,818 ^{a,r}	165,450 ± 4,378 ^{c,r}
141	308,050 ± 37,657 ^{a,r}	380,307 ± 20,643 ^{a,r}	124,040 ± 8,643 ^{b,r}

Tabela 4.10 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn (mg Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
198,703 ± 6,531 ^a	223,500 ± 8,083 ^a	141,680 ± 1,416 ^b

4.1.3.1.2 Ferro

O Ferro (Fe) compreende aproximadamente 5% da litosfera, estando concentrado principalmente nas rochas magmáticas (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). A mobilização e fixação de Fe nos sistemas biológicos dependem de condições oxidantes e alcalinas, as quais podem induzir a respectiva precipitação (Kabata-Pendias e Pendias, 1992).

No solo, o Fe encontra-se principalmente sob a forma de óxidos e hidróxidos ou ainda associado a outros elementos minerais (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). O teor de Fe solúvel no solo (Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, Fe^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})^-$ e $\text{Fe}(\text{OH})_4^{2-}$) é muito inferior ao teor total de Fe no solo (Kabata-Pendias e Pendias, 1992).

O conteúdo de Fe nas plantas varia geralmente entre 50 - 200 mg Fe kg^{-1} peso seco (Bergmann, 1992) e pode ser armazenado nas células vegetais sob a forma de fitoferritina (Marschner, 1995). Quando as plantas desenvolvem o respectivo ciclo vegetativo em ambiente natural, a eficiência do Fe nas plantas é fortemente influenciada por factores externos (Bergmann, 1992).

Ao longo do ensaio experimental verificou-se um aumento progressivo do teor de Fe nas raízes da planta em todos os tratamentos efectuados, à excepção do tratamento F4 (1,5/1,5), no qual se verificou uma diminuição do 107º ao 141º dia (figura 4.19). A partir do 84º dia após germinação, F4 (1,5/1,5) apresentou diferenças significativas na absorção de Fe, face aos demais tratamentos, com um incremento no teor do mineral nas raízes, ao longo do ciclo vegetativo, que atingiu 159 %, sendo este aumento significativo a partir do 107º dia após germinação (tabela 4.11). Embora F4 (1,5/1,5) tenha apresentado em todos os períodos experimentais, o maior teor de Fe nas raízes, à excepção do 141º dia após germinação, foi o tratamento F4 (0,3/0,3) que apresentou o maior incremento - 207 % (tabela 4.11). Com o aumento quase exponencial da absorção de Fe, ao longo do ciclo de vida da planta, verificaram-se diferenças significativas entre os períodos experimentais, em cada tratamento (tabela 4.11). Adicionalmente, o tratamento controlo apresentou um interessante incremento no teor de Fe nas raízes, de 202 %, embora com teores significativamente inferiores aos demais tratamentos, em todos os períodos (tabela 4.11). Acresce ainda que, as características do substrato utilizado na sementeira do presente ensaio, reforçam a regra geral que rege a mobilização e fixação de Fe, de que condições oxidantes e alcalinas promovem a precipitação de Fe, enquanto condições ácidas e redutoras promovem a solução de compostos férricos (Bergmann, 1992). Tendo em conta o pH ligeiramente ácido do substrato e os valores de Fe obtidos nas raízes das plantas, os resultados apontam para um eficiente controlo da absorção de Fe.

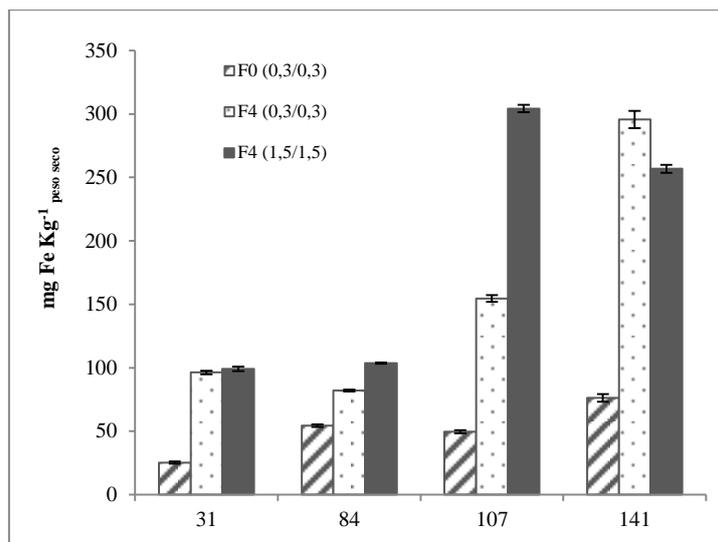


Figura 4.19 - Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) na raiz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.11 - Média do teor de Fe na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t, e u* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	25,250 ± 0,906 ^{b,t}	96,267 ± 1,415 ^{a,t}	99,190 ± 1,759 ^{a,t}
84	54,407 ± 0,933 ^{c,s}	82,023 ± 0,791 ^{b,u}	103,620 ± 0,513 ^{a,t}
107	49,667 ± 1,236 ^{c,s}	154,573 ± 2,604 ^{b,s}	304,283 ± 2,857 ^{a,r}
141	76,290 ± 2,936 ^{c,r}	295,640 ± 6,704 ^{a,r}	256,857 ± 3,118 ^{b,s}

O desenvolvimento de plantas sob condições controladas leva a que cerca de 80% do Fe fornecido esteja localizado nos cloroplastos das folhas com crescimento muito rápido, independentemente do estado nutricional da planta (Marschner, 1995). O Fe possui um importante papel na síntese de proteínas, desenvolvimento de cloroplastos e crescimento da planta, com participação na fotossíntese (Marschner, 1995).

O teor de Fe acumulado na parte aérea não apresentou diferenças significativas ao longo do ciclo de vida da planta, em F4 (0,3/0,3) e F0 (0,3/0,3), nos 31º e 84º dia após germinação. Por oposição, F4 (1,5/1,5) revelou variações significativas em todos os períodos experimentais (figura 4.20; tabela 4.12). Atente-se ainda que F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) não apresentaram diferenças significativas na acumulação de Fe na parte aérea, durante os 31º e 84º dia após germinação, tendo ocorrido uma alteração na tendência de acumulação, onde F0 (0,3/0,3) foi estatisticamente diferente nos dois últimos períodos experimentais (figura 4.20; tabela 4.12).

Acresce ainda que, uma deficiência em Fe, nas folhas, conduz a uma situação crítica (Marschner, 1995), para intervalos entre 50 a 150 mg Fe kg^{-1} peso seco, pelo que os resultados do

nosso estudo parecem indicar défices na acumulação deste elemento. Esta tendência poderá dever-se às interações antagónicas que o Fe apresenta com outros elementos metálicos, em particular o S e P, os quais apresentaram elevados níveis de absorção, assim como Mn e Zn (Kabata-Pendias e Pendias, 1992).

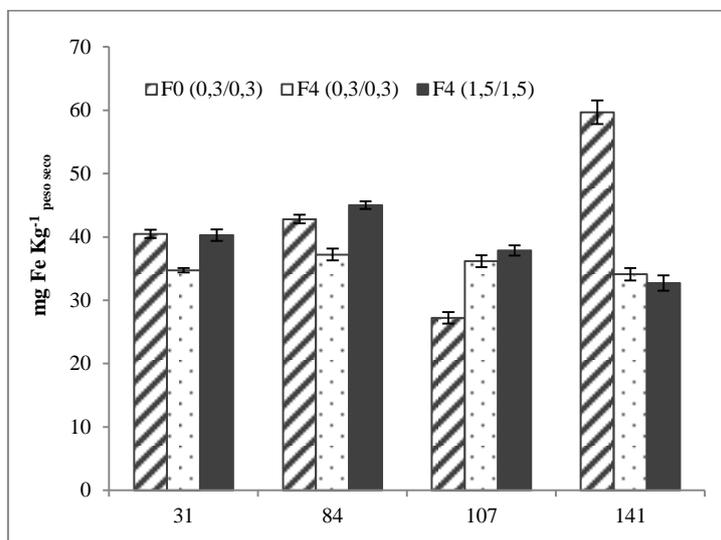


Figura 4.20 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.12 - Média do teor de Fe na parte aérea, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	40,477 ± 0,641 ^{a,s}	34,723 ± 0,357 ^{b,r}	40,290 ± 0,897 ^{a,s}
84	42,820 ± 0,690 ^{a,s}	37,210 ± 0,933 ^{b,r}	45,020 ± 0,593 ^{a,r}
107	27,243 ± 0,908 ^{b,t}	36,187 ± 0,922 ^{a,r}	37,870 ± 0,818 ^{a,s}
141	59,667 ± 1,864 ^{a,r}	34,117 ± 0,979 ^{b,r}	32,720 ± 1,189 ^{b,t}

No 84º dia após germinação, a acumulação de Fe, na espiga, também não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, revelando posteriormente um aumento significativo, estabilizando até ao final do ensaio experimental (figura 4.21; tabela 4.13). F4 (1,5/1,5) apresentou o maior aumento no teor de Fe, cerca de 88%, comparativamente a F0 (0,3/0,3), com um aumento de 57%. Estes dados sugerem uma boa resposta da planta à mobilização do mineral, quando sujeita a um incremento nutricional em Fe (figura 4.21; tabela 4.13).

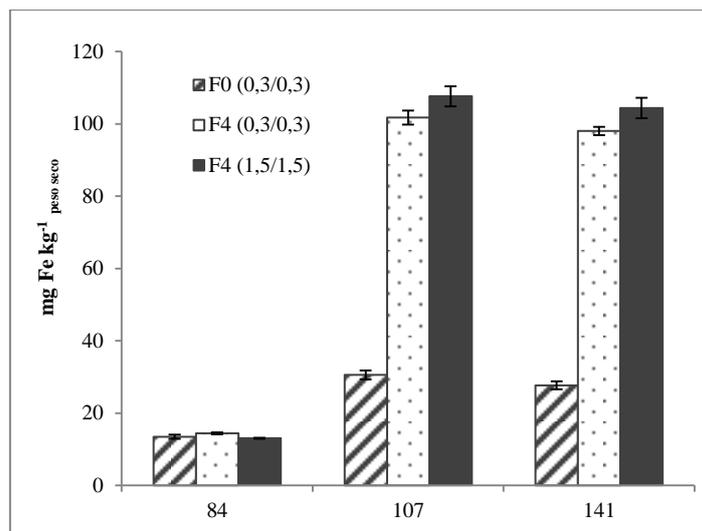


Figura 4.21 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) na espiga e respectivo erro padrão, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.13 - Média do teor de Fe na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	$13,480 \pm 0,593^{a,s}$	$14,447 \pm 0,249^{a,s}$	$13,073 \pm 0,146^{a,s}$
107	$30,557 \pm 1,236^{b,r}$	$101,740 \pm 1,935^{a,r}$	$107,623 \pm 2,802^{a,r}$
141	$27,707 \pm 1,084^{b,r}$	$98,003 \pm 1,150^{a,r}$	$104,370 \pm 2,831^{a,r}$

A translocação de Fe para os grãos não apresentou diferenças entre F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), os quais se distinguem significativamente de F0 (0,3/0,3) (figura 4.22; tabela 4.14). Comparativamente aos valores obtidos para os demais micronutrientes absorvidos pelos grãos, o Fe é, após o Zn, o elemento metálico com maior teor mobilizado.

Um aspecto interessante prende-se com a capacidade de absorção do mineral, entre os tratamentos. Note-se que F0 (0,3/0,3) teve uma absorção de Fe correspondente a cerca de 25% do teor absorvido por F4 (1,5/1,5), o que representou $\frac{1}{4}$ da capacidade de absorção deste último, sugerindo um efeito benéfico na capacidade de absorção mineral, causada pelo incremento nutricional.

Considerando o valor comumente encontrado nos grãos de cereais, entre 25 - 80 mg Fe kg^{-1} peso seco (Kabata-Pendias e Pendias, 1992), o tratamento controlo não indicia qualquer deficiência deste elemento.

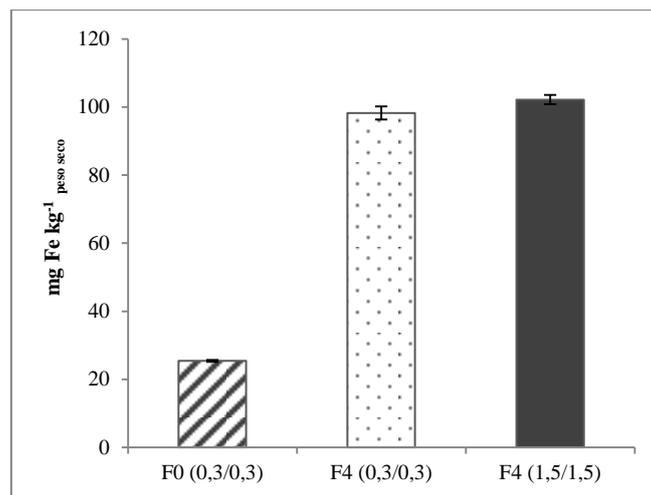


Figura 4.22 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.14 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe (mg Kg^{-1}) com a variável de tratamento. As letras *a, b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
25,433 ± 0,297 ^b	98,220 ± 1,928 ^a	102,180 ± 1,346 ^a

4.1.3.1.3 Cobre

O cobre (Cu) destaca-se entre os metais pesados mais abundantes dos solos agrícolas, reconhecendo-se ainda um elevado contributo no metabolismo celular das plantas (Ashagre *et al.*, 2013). Contudo, em elevadas concentrações, pode tornar-se extremamente tóxico (Ashagre *et al.*, 2013). O crescimento da raiz é mais afectado pelo excesso de metais pesados devido à respectiva interferência na divisão celular (Ashagre *et al.*, 2013). É de notar que o período de menor acumulação de biomassa na raiz (107º dia após germinação) apresentou a maior absorção de Cu, em todos os tratamentos, à excepção de F0 (0,3/0,3), o qual apresentou um aumento progressivo, ao longo do ciclo de vida da planta (figura 4.23). Embora F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) também tenham apresentado um aumento progressivo no teor de Cu, nas raízes, no último período experimental verificou-se um decréscimo no teor do mineral (26% e 14%, respectivamente). Adicionalmente, a tendência crescente no teor de Cu nas raízes, ao longo do ciclo de vida das plantas, apresentou um efeito estatístico, em cada tratamento, à excepção de F4 (0,3/0,3), o qual deteve um teor de Cu, no final do ensaio experimental, idêntico ao obtido ao 84º dia após germinação (tabela 4.15).

Segundo Ashagre *et al.* (2013), o Cu possui um acentuado carácter tóxico no tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), quando presente em concentrações acima de 100 mg kg^{-1} peso seco, com especial efeito no desenvolvimento da biomassa das raízes, inibindo o respectivo crescimento. Os

mesmos resultados foram também obtidos por Sing *et al.* (2007) em plantas de trigo (*cf* Ashagre *et al.* 2013). Note-se, contudo, que as concentrações de Cu utilizadas na solução nutritiva foram bastante inferiores às mencionadas pelos referidos autores, não sendo claro qualquer tipo de efeito inibidor do Cu no desenvolvimento das raízes.

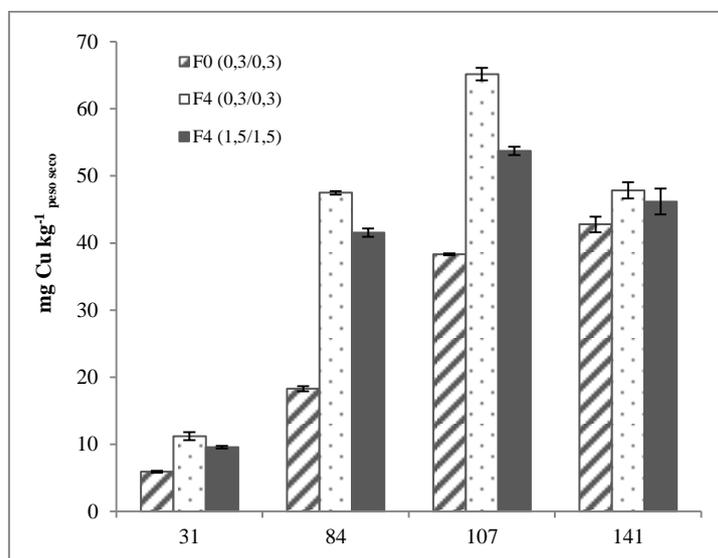


Figura 4.23 - Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) na raiz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.15 - Média do teor de Cu na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t* e *u* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	5,93 ± 0,148 ^{b,u}	11,22 ± 0,580 ^{a,t}	9,58 ± 0,196 ^{a,u}
84	18,28 ± 0,380 ^{c,t}	47,49 ± 0,270 ^{a,s}	41,56 ± 0,599 ^{b,t}
107	38,32 ± 0,156 ^{c,s}	65,17 ± 0,918 ^{a,r}	53,73 ± 0,620 ^{b,r}
141	42,78 ± 1,179 ^{b,r}	47,86 ± 1,233 ^{a,s}	46,18 ± 1,914 ^{a,b,s}

Em todos os tratamentos, a acumulação de Cu na parte aérea foi significativamente mais elevada no primeiro período experimental, com excepção de F4 (0,3/0,3), o qual apresentou ao 84º dia após germinação um valor máximo significativamente diferente do primeiro período experimental e dos demais (figura 4.24; tabela 4.16). Adicionalmente, os tratamentos apresentaram diferenças significativas na acumulação de Cu, ao longo do ciclo de vida da planta (tabela 4.16).

Apesar de alguns genótipos revelarem uma moderada tolerância ao Cu, este elemento provoca sobretudo cloroses, inibição no crescimento das raízes, regressão na taxa de crescimento geral da planta e inibição do transporte de electrões durante o processo de fotossíntese (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Marschner, 1995; Bergmann, 1992). Estes efeitos podem ser observados com níveis de

Cu superiores a 15 - 25 mg kg⁻¹ peso seco (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Bergmann, 1992). Adicionalmente, como os teores de Cu e Fe tendem a apresentar uma relação antagônica (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Marschner, 1995), o teor de Fe significativamente mais baixo, verificado na parte aérea em F4 (0,3/0,3), ao 84º dia após germinação, sugere que para este período, o excesso de Cu teve maior efeito no teor de outros elementos metálicos.

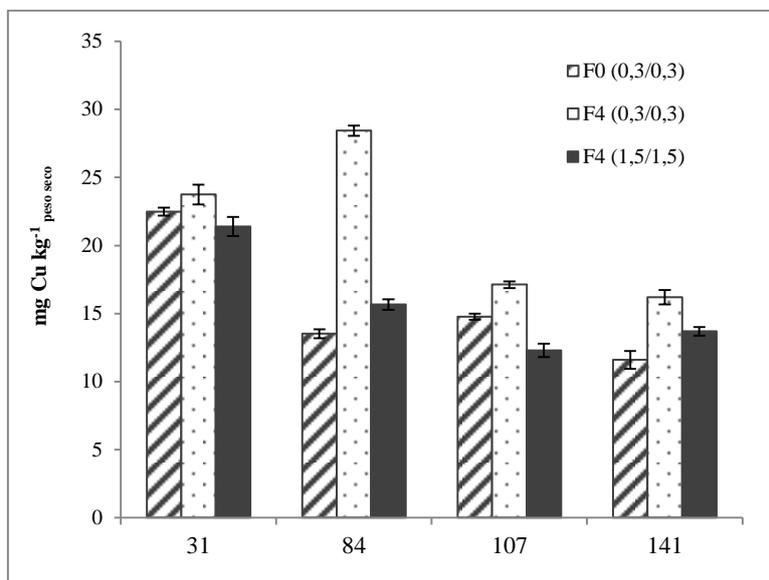


Figura 4.24 – Teor médio de Cu (mg kg⁻¹ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.16 - Média do teor de Cu na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu (mg Kg⁻¹) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	22,483 ± 0,298 ^{b,r}	23,737 ± 0,723 ^{a,s}	21,400 ± 0,699 ^{b,r}
84	13,520 ± 0,334 ^{c,s}	28,440 ± 0,372 ^{a,r}	15,667 ± 0,385 ^{b,s}
107	14,767 ± 0,215 ^{b,s}	17,117 ± 0,249 ^{a,t}	12,300 ± 0,491 ^{c,s}
141	11,593 ± 0,648 ^{c,s}	16,190 ± 0,528 ^{a,t}	13,697 ± 0,312 ^{b,s}

A translocação de Cu na espiga também revelou um aumento significativo do 84º para o 107º dia, após a germinação, mantendo-se aproximadamente estável, em todos os tratamentos, à exceção de F4 (1,5/1,5), cuja acumulação se traduziu num aumento progressivo ao longo dos períodos experimentais (figura 4.25; tabela 4.17).

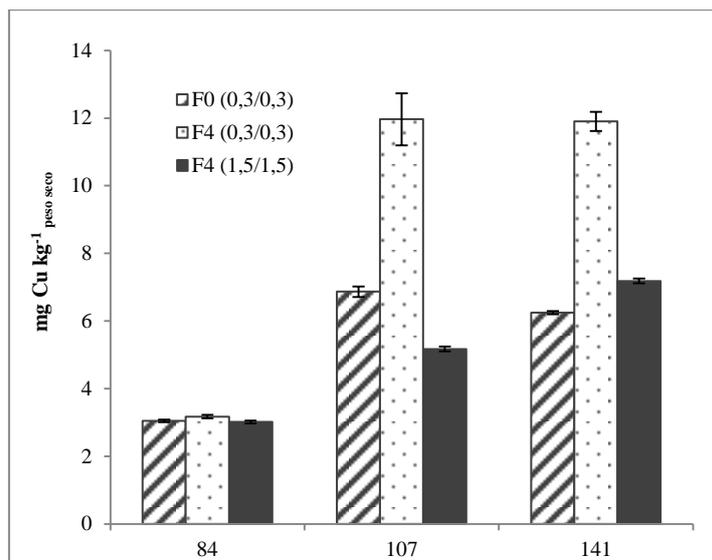


Figura 4.25 – Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.17 - Média do teor de Cu na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	3,047 ± 0,037 ^{a,s}	3,173 ± 0,050 ^{a,s}	3,017 ± 0,043 ^{a,t}
107	6,870 ± 0,156 ^{b,r}	11,963 ± 0,767 ^{a,r}	5,173 ± 0,071 ^{c,s}
141	6,247 ± 0,047 ^{b,r}	11,900 ± 0,283 ^{a,r}	7,187 ± 0,071 ^{b,r}

A translocação de Cu para os grãos seguiu a tendência de translocação para as espigas, ao 141º dia após germinação, onde F4 (0,3/0,3) apresentou o valor significativamente mais elevado face aos demais tratamentos (figura 4.26; tabela 4.18). Contudo, detectou-se uma acentuada diferença no teor de Cu translocado para os grãos, entre F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), tendo este último apresentado um ligeiro aumento face ao observado na espiga (figura 4.26; tabela 4.18).

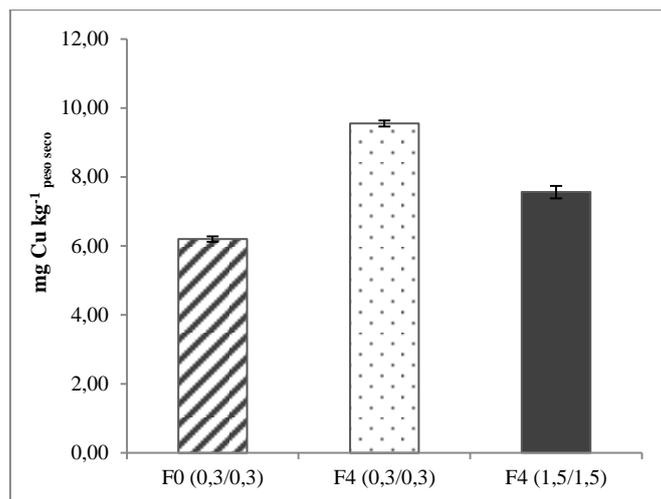


Figura 4.26 – Teor médio de Cu (mg kg⁻¹ m.s.) e respectivo erro padrão (n=3) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.18 - Média do teor de Cu no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu (mg Kg⁻¹), com a variável de tratamento. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
6,200 ± 0,082 ^c	9,550 ± 0,092 ^a	7,563 ± 0,179 ^b

4.1.3.1.4 Manganês

O manganês (Mn) é um elemento presente nos sistemas biológicos em diferentes estados de oxidação, sendo mais comuns o estado II e IV (razoavelmente estáveis) e o estado III instável (Marschner, 1995). Usualmente, é absorvido pelas raízes das plantas sob a forma Mn²⁺, sendo um elemento essencial, principalmente porque está envolvido no controlo das reacções redox no metabolismo de glúcidos e proteínas, afecta a formação de cloroplastos, síntese de clorofila e assim o processo de fotossíntese (Bergmann, 1992; Marschner, 1995; Kabata-Pendias e Pendias, 1992). A solubilidade do Mn é altamente dependente do pH do solo e do seu potencial redox, sendo reduzida em condições oxidantes e com pH alcalino (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Bergmann, 1992).

A absorção de Mn apresentou diferenças significativas entre F0 (0,3/0,3) e os demais tratamentos, ao longo do ciclo de vida da planta, à excepção do 141º dia após germinação, onde se verificou uma diminuição no teor de Mn em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), verificando-se valores semelhantes a F0 (0,3/0,3) (figura 4.27; tabela 4.19).

Por outro lado, F0 (0,3/0,3), manteve-se aproximadamente constante a partir do 84º dia após germinação, contrariamente aos demais tratamentos, os quais apresentaram variações significativas entre os períodos experimentais. Adicionalmente, o tratamento controlo apresentou um incremento na absorção de Mn de 105 %, enquanto F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram no final do ciclo

vegetativo, um decréscimo na absorção de Mn de 24 % e 21 %, respectivamente, apesar de terem apresentado um teor máximo no 84º dia, correspondente a uma aumento de 48 % e 27 %, respectivamente, face ao primeiro ensaio experimental.

O Mn possui um efeito antagonístico com alguns metais pesados, sendo a sua relação com o Fe, a mais evidente (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). De um modo geral, o Fe e o Mn estão interrelacionados em funções metabólicas, e dessa forma um excesso de Mn pode reduzir a absorção de Fe e induzir sintomas de deficiência neste mineral (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). A proporção adequada para o metabolismo da planta sugere um rácio Fe/Mn entre 1,5 e 2,5 (Kabata-Pendias e Pendias, 1992), sendo valores superiores a 2,5 indicadores de uma toxicidade em Fe associado a uma deficiência em Mn. Neste contexto, na raiz, os resultados parecem indiciar um carácter antagonístico do Fe face ao Mn, em todos os tratamentos, a partir do 84º dia após germinação, à excepção do tratamento controlo, ao 141º dia após a germinação (figura 4.27).

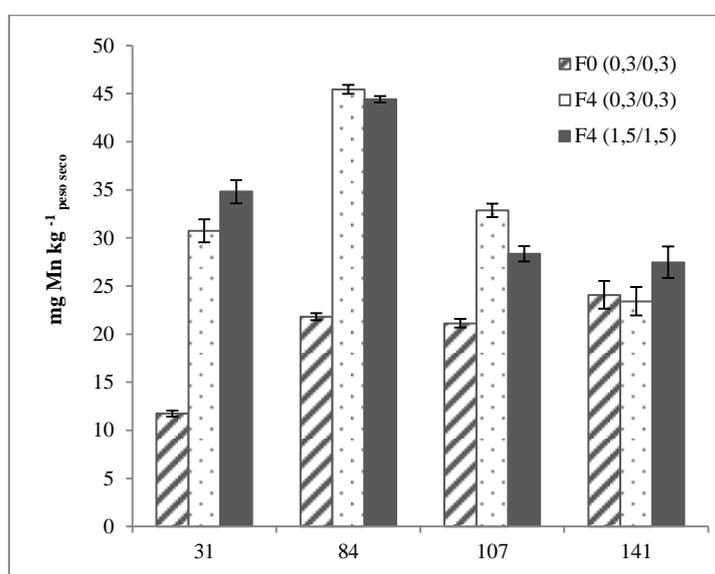


Figura 4.27 - Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) na raiz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.19 - Média do teor de Mn na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn (mg Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	11,74 ± 0,328 ^{b,s}	30,74 ± 1,199 ^{a,s}	34,81 ± 1,208 ^{a,s}
84	21,80 ± 0,363 ^{b,r}	45,44 ± 0,454 ^{a,r}	44,41 ± 0,347 ^{a,r}
107	21,12 ± 0,443 ^{c,r}	32,86 ± 0,692 ^{a,s}	28,35 ± 0,792 ^{b,t}
141	24,08 ± 1,457 ^{a,r}	23,42 ± 1,471 ^{a,t}	27,46 ± 1,634 ^{a,t}

Na parte aérea, o teor de Mn apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, ao longo do ciclo de vida da planta, à exceção dos 31 dias (figura 4.28; tabela 4.20). Adicionalmente, detectaram-se ainda diferenças nos respectivos teores entre os períodos experimentais, em particular entre o 31º e 141º dia, em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3). Acresce ainda que F4 (1,5/1,5) apresentou diferenças significativas em todos os períodos (figura 4.28; tabela 4.20).

Considerando que o conteúdo de Mn representativo de uma carência do mineral pela planta, num acentuado número de espécies varia entre 10-20 mg Mn kg⁻¹ peso seco, (Marschner, 1995), nas folhas os dados do nosso ensaio sugerem a ausência de uma deficiência deste elemento mineral.

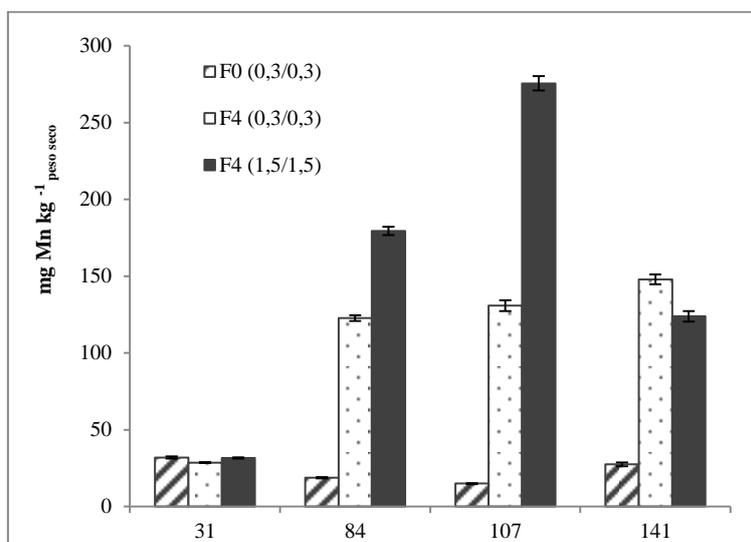


Figura 4.28 – Teor médio de Mn (mg kg⁻¹ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.20 - Média do teor de Mn na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn (mg Kg⁻¹) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t, u* correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	31,890 ± 0,751 ^{a,r}	28,613 ± 0,269 ^{a,t}	31,623 ± 0,465 ^{a,u}
84	18,793 ± 0,445 ^{c,s,t}	122,690 ± 1,825 ^{b,s}	179,400 ± 2,701 ^{a,s}
107	14,957 ± 0,261 ^{c,t}	130,820 ± 3,535 ^{b,s}	275,590 ± 4,684 ^{a,r}
141	27,437 ± 1,241 ^{c,r,s}	147,973 ± 3,135 ^{a,r}	123,893 ± 3,369 ^{b,t}

O teor de Mn na espiga, relativamente à verificada no Cu, apresentou a mesma tendência, revelando um aumento significativo do 84º para o 107º dia após a germinação e mantendo-se estável no final do ciclo de vida da planta (figura 4.29; tabela 4.21). Adicionalmente, todos os tratamentos

apresentaram diferenças significativas na acumulação de Mn na espiga, à excepção do 84º dia (figura 4.29; tabela 4.21).

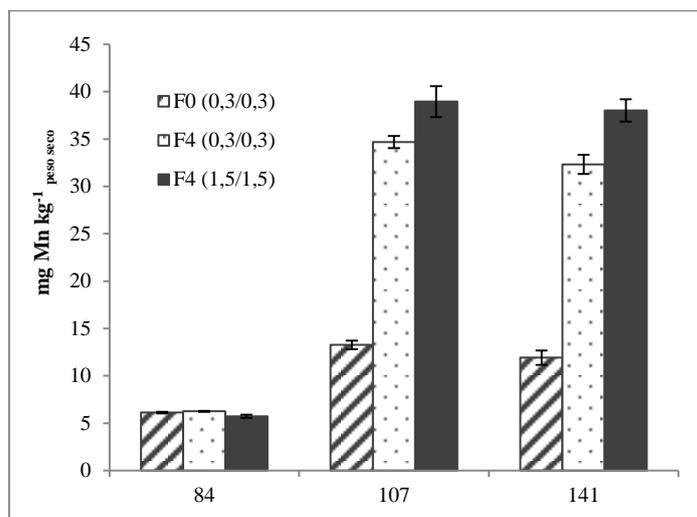


Figura 4.29 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.21 - Média do teor de Mn na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn (mg Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	6,117 ± 0,092 ^{a,s}	6,257 ± 0,040 ^{a,s}	5,740 ± 0,165 ^{a,s}
107	13,267 ± 0,443 ^{c,r}	34,693 ± 0,638 ^{b,r}	38,957 ± 1,632 ^{a,r}
141	11,920 ± 0,750 ^{c,r}	32,333 ± 1,022 ^{b,r}	38,023 ± 1,192 ^{a,r}

Tal como observado para a acumulação de Cu no grão, a mobilização de Mn apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, verificou-se um teor máximo em F4 (1,5/1,5), por oposição ao detectado para o Cu. Note-se, contudo, que os teores de Mn nos grãos de cereais, variam de um modo geral entre 15-80 mg Kg^{-1} peso seco (Kabata-Pendias e Pendias, 1992), o que sugere que eventualmente a mobilização de Mn nas plantas foi afectada, uma vez que os valores obtidos pelo tratamento controlo situam-se abaixo do proposto pela literatura e face ao acréscimo de adubação das plantas, os teores de Mn encontram-se aquém do intervalo superior (figura 4.30; tabela 4.22).

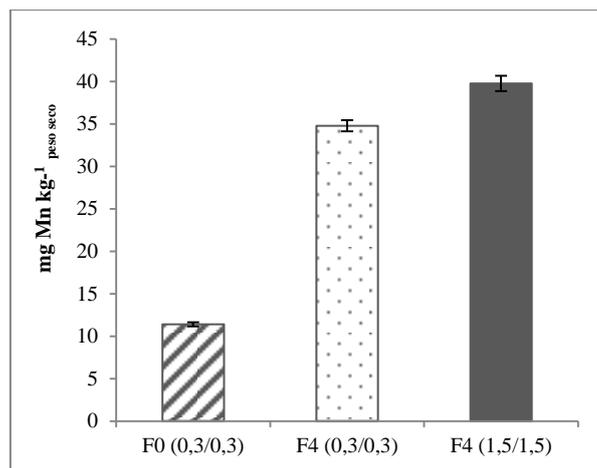


Figura 4.30 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.22 - Média do teor de Mn no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn (mg Kg^{-1}) com a variável de tratamento. As letras *a*, *b*, *c* correspondem às diferenças significativas existentes entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
11,393 ± 0,229 ^c	34,767 ± 0,661 ^b	39,773 ± 0,897 ^a

4.1.3.2. Macronutrientes

4.1.3.2.1 Potássio

Nas espécies vegetais os teores de potássio (K) usualmente oscilam entre 2 - 5% do respectivo peso seco (Marschner, 1995).

A absorção do K na forma catiónica é muito selectiva e estritamente ligada à actividade metabólica da planta (Marschner, 1995). O K^+ é o catião mais abundante no citoplasma estando envolvido na definição do potencial osmótico das células e tecidos das plantas. Participa ainda na regulação do potencial hídrico das plantas e forma complexos fracos que são rapidamente modificados (Marschner, 1995).

Ao longo ciclo de vida da planta, os níveis de K nas raízes, não variaram significativamente em F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) (figura 4.31; tabela 4.23). No tratamento F4 (0,3/0,3), foi no 107º dia, após a germinação, que se detectou uma diferença estatística, entre os diferentes períodos. Neste enquadramento, entre os diferentes tratamentos, não se detectaram variações significativas no 31º e 141º dias; contudo, ao 84º e 107º dias detectaram-se valores mais elevados no tratamento F4 (0,3/0,3) (figura 4.31). Portanto, não ocorreu uma variação significativa, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta, à excepção da fase de enchimento do grão, em F4 (0,3/0,3) (figura 4.31).

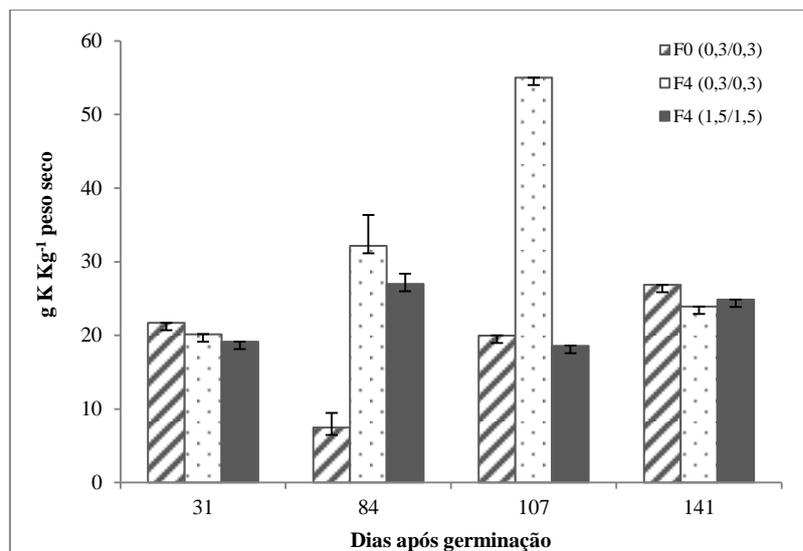


Figura 4.31 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raiz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.23 - Média do teor de K na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K (g kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	21,682 ± 0,033 ^{a,r}	20,146 ± 0,030 ^{a,s}	19,128 ± 0,017 ^{a,r}
84	7,487 ± 1,990 ^{b,r}	32,159 ± 4,187 ^{a,r,s}	26,971 ± 1,388 ^{a,b,r}
107	19,967 ± 0,037 ^{b,r}	54,988 ± 0,008 ^{a,r}	18,588 ± 0,029 ^{b,r}
141	26,865 ± 0,006 ^{a,r}	23,893 ± 0,002 ^{a,s}	24,854 ± 0,001 ^{a,r}

Na parte aérea, os níveis de K não apresentaram variações significativas, nos diferentes tratamentos, até ao 84º dia após germinação. A partir do 107º dia observou-se um aumento significativo do teor de K em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), situação que persistiu até à fase final do ciclo da planta. Em F4 (1,5/1,5) este aumento foi detectado no 107º dia (figura 4.32; tabela 4.24). Em cada período experimental, apenas se verificou um teor mínimo significativo ao 107º dia, no tratamento F4 (0,3/0,3) (tabela 4.24).

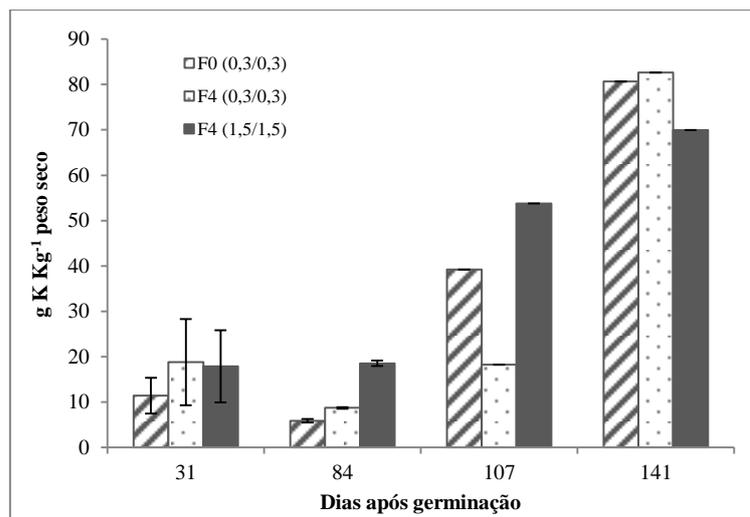


Figura 4.32 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.24 - Média do teor de K na parte aérea, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K (g Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	11,430 ± 3,956 ^{a,t}	18,800 ± 9,508 ^{a,s}	17,902 ± 7,947 ^{a,s}
84	5,869 ± 0,375 ^{a,t}	8,713 ± 0,163 ^{a,s}	18,551 ± 0,577 ^{a,s}
107	39,181 ± 0,005 ^{a,s}	18,258 ± 0,013 ^{b,s}	53,782 ± 0,004 ^{a,r}
141	80,634 ± 0,003 ^{a,r}	82,615 ± 0,003 ^{a,r}	69,986 ± 0,005 ^{a,r}

A acumulação de K na espiga apresentou teores significativamente mais elevados em F0 (0,3/0,3), F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), ao 141º, 107º e 84º dia após germinação, respectivamente (figura 4.33; tabela 4.25). Verificou-se uma acumulação preferencial de K, em F4 (1,5/1,5), mas no tratamento controlo ocorreu maior acumulação de K, durante a maturação.

Adicionalmente, a acumulação de K no grão apresentou menores resultados em F4 (0,3/0,3), com um valor mínimo significativo face aos demais tratamentos (tabela 4.26).

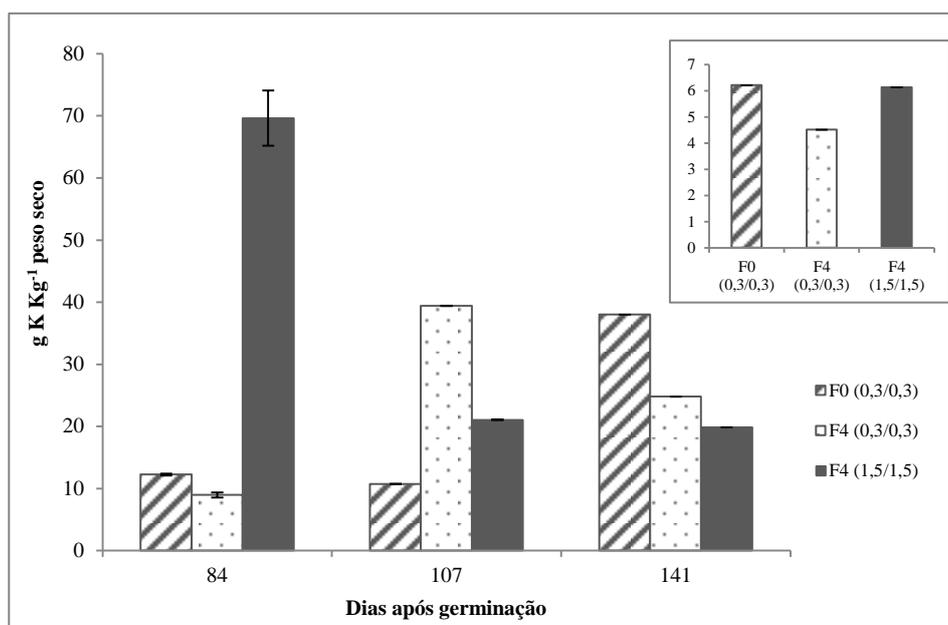


Figura 4.33 - Teor médio de K (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão, na espiga e no grão (canto superior direito) nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.25 - Média do teor de K na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K (g Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	12,243 ± 0,158 ^{b,s}	8,968 ± 0,426 ^{b,t}	69,632 ± 4,431 ^{a,r}
107	10,733 ± 0,015 ^{b,s}	39,416 ± 0,010 ^{a,r}	21,069 ± 0,022 ^{b,s}
141	38,025 ± 0,004 ^{a,r}	24,792 ± 0,003 ^{b,s}	19,850 ± 0,003 ^{b,s}

Tabela 4.26 - Média do teor de K no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K (g Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
6,212 ± 0,001 ^a	4,512 ± 0,001 ^b	6,134 ± 0,001 ^a

4.1.3.2.2 Fósforo

O fósforo (P) é um macronutriente cujas concentrações ótimas, durante a fase vegetativa da planta, usualmente oscilam entre 0,3 - 0,5% de matéria seca, podendo evoluir toxicidades com teores superiores a 1% (Marschner, 1995). O P na sua forma oxidada é um constituinte essencial de alguns componentes celulares como fosfoproteínas e fosfolípidos (Bergmann, 1992). Além disso, os compostos de P incluem moléculas transformadoras e de armazenamento de energia, como o ATP, ADP, NAD, NADH e NADP (Bergmann, 1992).

A absorção de P pelas raízes é determinada pela taxa de alongação das células radiculares e pelo coeficiente de difusão do solo (Bot *et al.*, 1998). Ao longo do ciclo de vida da planta, a acumulação de P na raiz, em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) apresentou variações apreciáveis (figura 4.34), tendo-se detectado um valor máximo significativo ao 141º e 107º dias após germinação, respectivamente (tabela 4.27). Acresce ainda que, os valores máximos de P encontrados em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), corresponderam aos máximos encontrados, entre os tratamentos, nos períodos experimentais atrás mencionados. Adicionalmente, nos mesmos períodos, verificou-se o maior rácio de peso seco raiz / parte aérea, em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) respectivamente, o que significa que no 141º dia após germinação, F0 (0,3/0,3) apresentou uma diminuição da biomassa da parte aérea face à biomassa da raiz, sugerindo que neste período possa ter existido um défice no fornecimento de P, neste tratamento. Acresce ainda que F0 (0,3/0,3) teve uma diminuição na taxa fotossintética líquida ao 102º dia (figura 4.66), momento em que a acumulação de P nas raízes é mínima neste tratamento (figura 4.34).

Neste enquadramento, F4 (0,3/0,3) teve um rácio de peso seco raiz / parte aérea, máximo, no 107º dia após germinação, assim como a sua taxa fotossintética líquida ao 102º dia após germinação representou o valor mais baixo ao longo do ciclo de medições deste parâmetro (figura 4.66). Adicionalmente, o tratamento F4 (1,5/1,5) não apresentou diferenças significativas na acumulação de P, ao longo do ciclo de vida da planta, embora tenha apresentado um valor mínimo no teor das raízes, no final do ensaio experimental (figura 4.34). Note-se contudo que alguns estudos (Marschner, 1995) referem que o P apresenta uma relação antagónica com o Zn, podendo causar um efeito adverso na taxa de crescimento das raízes. Contudo este efeito não se verificou neste estudo.

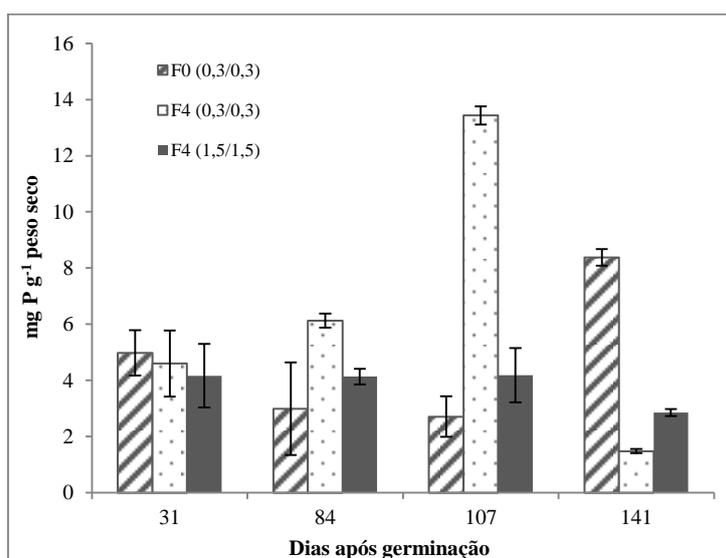


Figura 4.34 - Teor médio de P (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raiz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.27 - Média do teor de P na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P (mg g^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	4,984 ± 0,808 ^{a,r,s}	4,605 ± 1,176 ^{a,s,t}	4,166 ± 1,130 ^{a,r}
84	2,991 ± 1,647 ^{a,s}	6,132 ± 0,250 ^{a,s}	4,137 ± 0,277 ^{a,r}
107	2,713 ± 0,720 ^{b,s}	13,435 ± 0,324 ^{a,r}	4,190 ± 0,966 ^{b,r}
141	8,378 ± 0,294 ^{a,r}	1,486 ± 0,075 ^{b,t}	2,858 ± 0,124 ^{b,r}

Nos 84° e 107° dias após germinação, F4 (1,5/1,5) apresentou elevados teores de P na parte aérea, que foram significativamente diferentes face aos restantes períodos experimentais (figura 4.35; tabela 4.28). Em F0 (0,3/0,3) verificou-se um teor mínimo de P, no início do ciclo vegetativo, significativamente diferente do valor máximo de P detectado no final do ciclo de vida da planta (*ca.* 113%). Esta tendência também se verificou em F4 (0,3/0,3), quantificando-se um aumento de 247%, aproximadamente, e em F4 (1,5/1,5) um aumento máximo de 275%, até o 107° dia após germinação, diminuindo de seguida cerca de 83%. O valor mínimo de P verificado, na parte aérea foi ao 84° dia no tratamento F4 (0,3/0,3) (tabela 4.28).

Uma deficiência em P pode comprometer a produção de biomassa da parte aérea, com efeitos mais marcantes na redução da expansão foliar e área superficial das folhas, assim como uma diminuição do número de folhas (Marschner, 1995). Por outro lado, contrariamente à inibição da expansão foliar como resposta a uma deficiência em P, o teor de proteínas e cloroplastos por unidade de área da folha, não são afectados de forma significativa (Marschner, 1995). Na maioria dos casos, o teor de clorofila aumenta face a uma deficiência em P, e com isso, as folhas apresentam uma coloração mais escura. No entanto, a eficiência fotossintética por unidade de clorofila é muito mais diminuta sob condições de deficiência de P nas folhas (Marschner, 1995). Neste enquadramento, os teores de P nos diferentes tratamentos e períodos experimentais não revelaram, de forma consistente, uma carência ou toxicidade em P.

Adicionalmente, a taxa de crescimento da parte aérea das plantas é drasticamente mais afectada do que a taxa fotossintética, aquando uma deficiência em P (Bergmann, 1992; Marschner, 1995; Le Bot *et al.*, 1998), sugerindo que a mínima produção de biomassa da parte aérea verificada no tratamento F4 (0,3/0,3), seja efeito do menor teor de P obtido neste tratamento (figura 4.35).

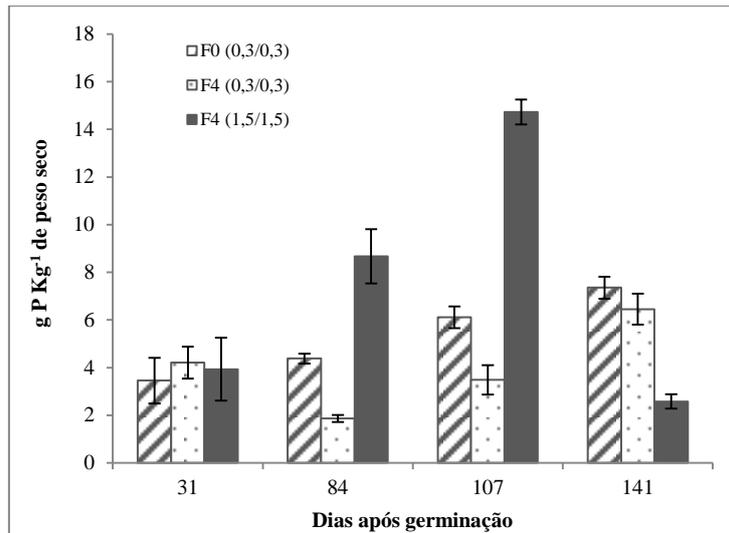


Figura 4.35 - Teor médio de P (mg kg⁻¹ m.s.) e respectivo erro padrão (n=3), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.28 - Média do teor de P na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P (g Kg⁻¹) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	3,456 ± 0,957 ^{a,s}	4,209 ± 0,669 ^{a,r,s}	3,931 ± 1,320 ^{a,t}
84	4,378 ± 0,213 ^{b,r,s}	1,861 ± 0,146 ^{b,s}	8,665 ± 1,139 ^{a,s}
107	6,113 ± 0,450 ^{b,r,s}	3,486 ± 0,614 ^{b,r,s}	14,728 ± 0,521 ^{a,r}
141	7,356 ± 0,461 ^{a,r}	6,452 ± 0,651 ^{a,r}	2,580 ± 0,305 ^{b,t}

A acumulação de P na espiga apresentou diferenças significativas, ao longo do ciclo de vida da planta, no tratamento F4 (1,5/1,5), revelando uma maior acumulação do mineral numa fase inicial do desenvolvimento (figura 4.36; tabela 4.29). Em F0 (0,3/0,3), quantificou-se um valor mínimo significativo de P, ao fim de 107 dias após a germinação, contrariamente ao observado em F4 (0,3/0,3), onde o teor mínimo significativo do mineral foi detectado no início do ciclo vegetativo, aumentando posteriormente cerca de 101% (tabela 4.29). Contudo, em F4 (1,5/1,5) verificou-se um efeito inverso na acumulação de P, tendo ocorrido uma diminuição gradual, ao longo do ciclo de vida, num total de 79% (tabela 4.29), tornando este tratamento significativamente diferente dos demais, nos referidos períodos experimentais (início e fim do ciclo de vida da planta). Neste enquadramento, o tratamento F4 (0,3/0,3) diferenciou-se significativamente dos restantes tratamentos, no seu teor máximo de P, ao 107º dia (tabela 4.29). A mesma tendência verificou-se na acumulação de P no grão, com diferenças significativas entre F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) (tabela 4.30).

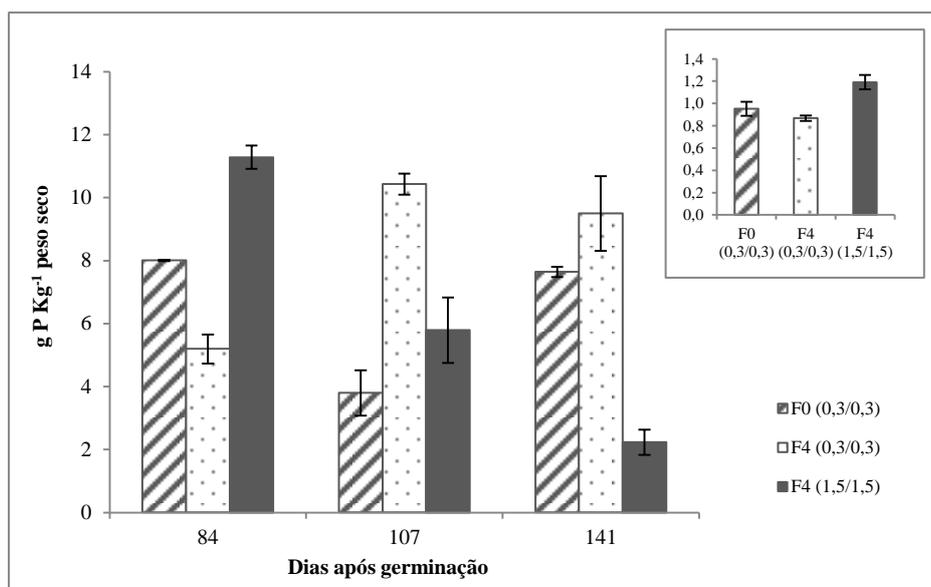


Figura 4.36 - Teor médio de P (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na espiga e no grão (canto superior direito), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.29 - Média do teor de P na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P (g Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s, t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	8,004 ± 0,018 ^{b,r}	5,192 ± 0,459 ^{b,s}	11,285 ± 0,370 ^{a,r}
107	3,799 ± 0,720 ^{b,s}	10,430 ± 0,337 ^{a,r}	5,792 ± 1,040 ^{b,s}
141	7,638 ± 0,164 ^{a,r}	9,496 ± 1,188 ^{a,r}	2,233 ± 0,400 ^{b,t}

Tabela 4.30 - Média do teor de P no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P (g Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. As letras *a e b* correspondem às diferenças significativas existentes entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
0,952 ± 0,062 ^{a,b}	0,868 ± 0,024 ^b	1,191 ± 0,064 ^a

4.1.3.2.3 Enxofre

As necessidades de enxofre (S) para um crescimento óptimo das plantas, variam entre 0,1 – 0,5% do peso seco (Marschner, 1995; Bergmann, 1992). Contudo, uma diminuição em S apresenta maior efeito depressivo no crescimento da parte aérea, relativamente à raiz, levando a um decréscimo da condutividade hídrica neste órgão, abertura estomática e taxa fotossintética líquida (Marschner, 1995). Neste enquadramento, embora o teor de S tenha apresentado variações substanciais, não prevaleceram défices nutricionais passíveis de condicionar o desenvolvimento das plantas. De facto, o teor de S apresentou variações de acumulação na raiz,

ao longo do ciclo de vida da planta, especialmente entre a fase inicial e o final do ciclo vegetativo, (figura 4.37). Contudo, em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), verificou-se uma diminuição do teor de S na raiz, ao longo do ciclo vegetativo da planta, respectivamente 57% e 50% (tabela 4.31). O tratamento F0 (0,3/0,3) mostrou um teor máximo significativo de S, no fim do ciclo de vida da planta, correspondendo a um acréscimo, de cerca de 87% (tabela 4.31). Aponte-se ainda, que o teor máximo de S na raiz, no fim do ciclo de vida da planta, em F0 (0,3/0,3) se distinguiu significativamente dos demais tratamentos (tabela 4.31).

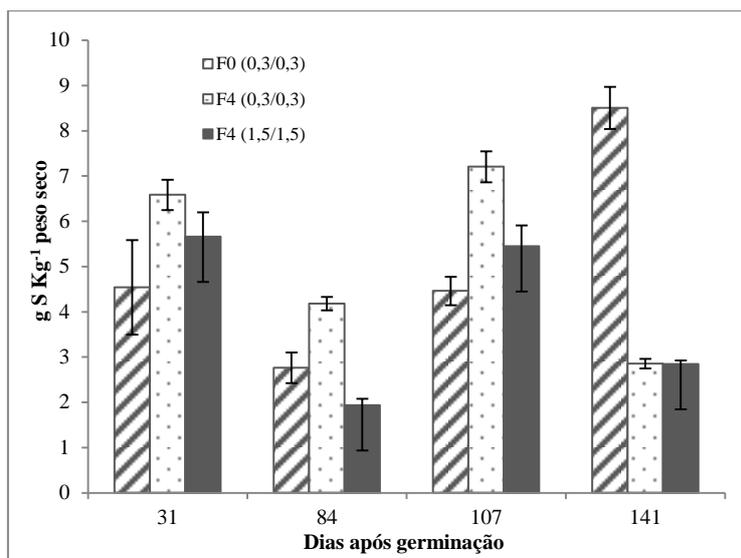


Figura 4.37 - Teor médio de S (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na raiz, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.31 - Média do teor de S na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	4,540 ± 1,042 ^{b,s}	6,585 ± 0,335 ^{a,r}	5,663 ± 0,534 ^{a,b,r}
84	2,761 ± 0,337 ^{a,b,s}	4,180 ± 0,147 ^{a,s}	1,934 ± 0,144 ^{b,s}
107	4,460 ± 0,316 ^{b,s}	7,206 ± 0,341 ^{a,r}	5,448 ± 0,464 ^{a,b,r}
141	8,506 ± 0,464 ^{a,r}	2,854 ± 0,105 ^{b,s}	2,848 ± 0,081 ^{b,s}

A acumulação de S na parte aérea apresentou variações ao longo do ciclo de vida da planta, principalmente no tratamento F4 (0,3/0,3) (figura 4.38).

O tratamento F0 (0,3/0,3) apresentou um teor máximo significativo ao 141º dia após a germinação, enquanto F4 (1,5/1,5) não apresentou oscilações significativas na acumulação de S, durante o ciclo de vida da planta (tabela 4.32).

Analisando a acumulação de S na parte aérea, entre os tratamentos, observaram-se diferenças significativas entre F4 (1,5/1,5) e os restantes tratamentos, os quais apresentaram teores máximos significativos no 141º dia após germinação, correspondendo a acréscimos de 86% e 106%, respectivamente (tabela 4.32).

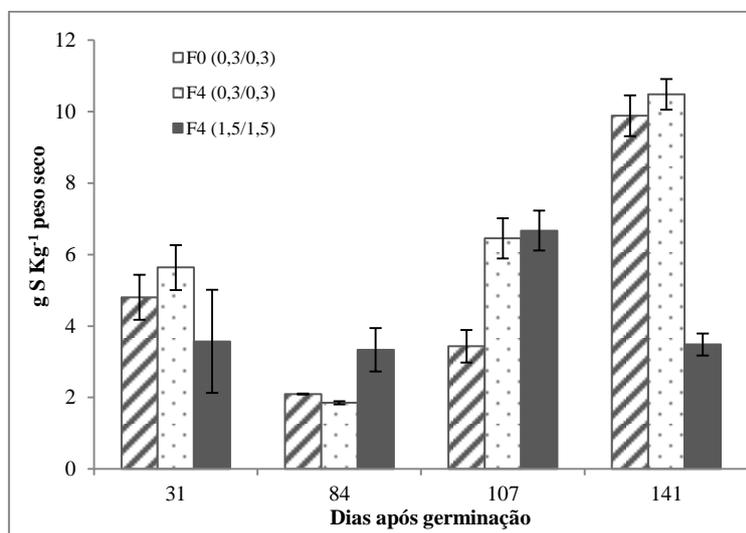


Figura 4.38 - Teor médio de S (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=3$), na parte aérea, nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.32 - Média do teor de S na parte aérea, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. . As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	4,805 ± 0,632 ^{a,s}	5,639 ± 0,629 ^{a,r,s}	3,570 ± 1,441 ^{a,r}
84	2,098 ± 0,014 ^{a,s}	1,854 ± 0,046 ^{a,s}	3,337 ± 0,606 ^{a,r}
107	3,434 ± 0,459 ^{a,s}	6,455 ± 0,563 ^{a,r,s}	6,672 ± 0,555 ^{a,r}
141	9,883 ± 0,569 ^{a,r}	10,485 ± 0,431 ^{a,r}	3,483 ± 0,310 ^{b,r}

Em todos os períodos experimentais o teor de S, na espiga, variou em F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5). No final do ciclo de vida da planta, verificou-se um teor mínimo significativo, correspondendo a uma diminuição de 64% (figura 4.39; tabela 4.33). Analisando o teor de S face à carga nutricional aplicada às plantas, constatou-se ainda um efeito significativo entre os tratamentos de fertilização, ao longo do ciclo de vida planta, à exceção do último período experimental, onde o tratamento de maior aporte nutricional apresentou um decréscimo de 48%, face ao período anterior (107º dia após germinação), o qual correspondeu ao seu teor máximo, e dessa forma se diferenciou estatisticamente dos demais tratamentos (tabela 4.33). Note-se, contudo, que o teor de S nos grãos maduros, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 4.34), sendo inferiores

face aos valores indicados por alguns autores (Marschner, 1995), que apontam para teores de S nos grãos das gramíneas entre 0,18 - 0,19% de peso seco.

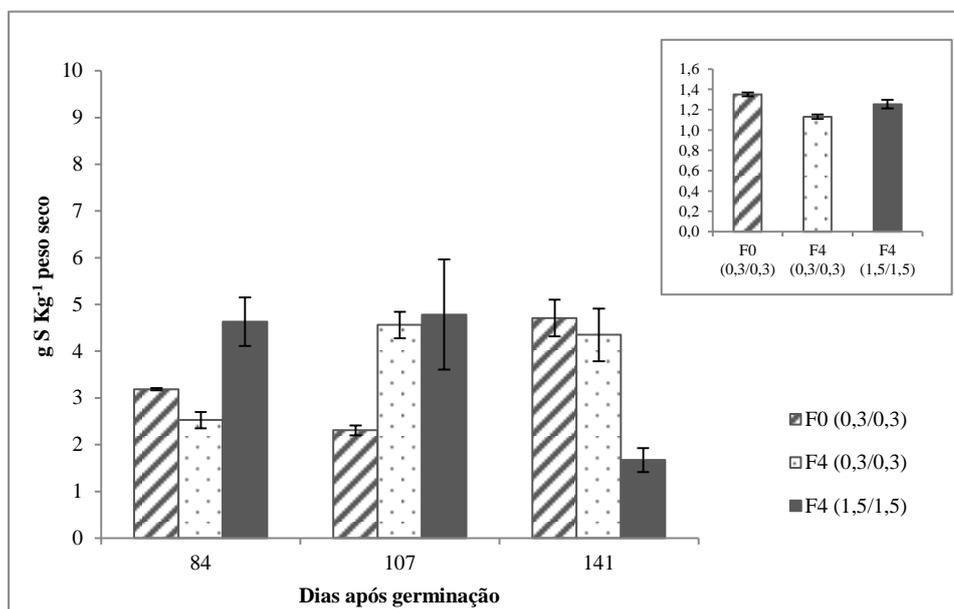


Figura 4.39 - Teor médio de enxofre (g kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão, na espiga e no grão (canto superior direito), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.33 - Média do teor de S na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, mostram as diferenças significativas existentes entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	$3,185 \pm 0,025^{a,r,s}$	$2,524 \pm 0,171^{a,r}$	$4,634 \pm 0,519^{a,r}$
107	$2,305 \pm 0,108^{b,s}$	$4,561 \pm 0,282^{a,r}$	$4,785 \pm 1,181^{a,r}$
141	$4,709 \pm 0,395^{a,r}$	$4,349 \pm 0,562^{a,r}$	$1,671 \pm 0,258^{b,s}$

Tabela 4.34 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S (g Kg^{-1}) no grão, com a variável de tratamento. A letra *a*, indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$1,351 \pm 0,020^a$	$1,131 \pm 0,022^a$	$1,255 \pm 0,042^a$

4.1.3.2.4 Cálcio

Os níveis de cálcio (Ca) na generalidade das espécies vegetais usualmente variam entre 0,1% e mais de 5% do peso seco, dependendo das condições de crescimento, da espécie e dos órgãos da planta (Marschner, 1995).

Um factor determinante no fornecimento de Ca para o óptimo crescimento da planta prende-se com a presença de outros catiões na solução nutritiva (Marschner, 1995). O fornecimento de Ca deve ser muito maior face a acréscimos de metais pesados, como o alumínio, o cloreto de sódio ou ainda protões (Marschner, 1995). Com um baixo pH, a concentração de Ca na solução nutritiva deve ser significativamente mais elevada para contrariar o efeito adverso no alongamento das raízes. O fornecimento de Ca à planta possui ainda um papel imprescindível no desenvolvimento das raízes (Bergmann, 1992). A formação e crescimento das raízes da planta é dependente da absorção de Ca, pois para além de regular o crescimento celular dos tecidos, aumenta a elasticidade e estabilidade das paredes celulares, e estimula a actividade metabólica (Bergmann, 1992).

Neste enquadramento, verificou-se que a acumulação de Ca foi gradual ao longo do desenvolvimento da planta (figura 4.40). O teor de Ca nas raízes apresentou um aumento acentuado e progressivo, em todos os tratamentos, à excepção de F0 (0,3/0,3), cuja acumulação nas raízes não foi significativa até ao 107º dia após germinação. Em contrapartida F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) revelaram uma acumulação de Ca, significativamente crescente em todos os períodos experimentais (figura 4.40; tabela 4.35).

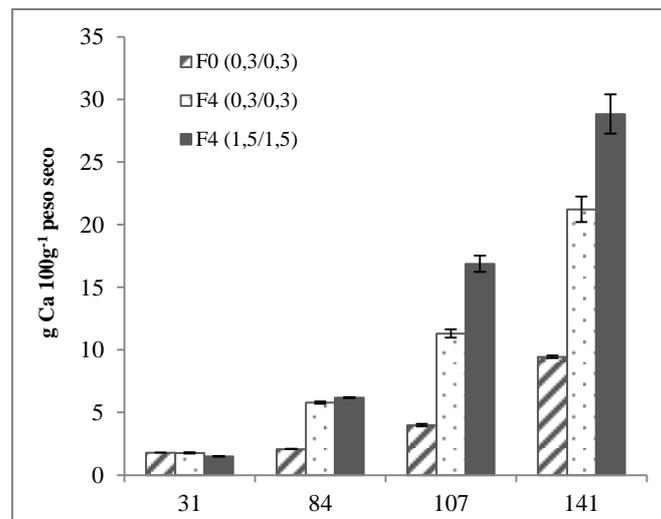


Figura 4.40 - Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na raiz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.35 - Média do teor de Ca na raiz, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b* e *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t* e *u* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	$1,80 \pm 0,012^{a,s}$	$1,76 \pm 0,052^{a,u}$	$1,49 \pm 0,024^{a,u}$
84	$2,09 \pm 0,009^{b,s}$	$5,79 \pm 0,096^{a,t}$	$6,18 \pm 0,024^{a,t}$
107	$3,98 \pm 0,100^{c,s}$	$11,31 \pm 0,339^{b,s}$	$16,88 \pm 0,661^{a,s}$
141	$9,44 \pm 0,099^{c,r}$	$21,22 \pm 1,022^{b,r}$	$28,83 \pm 1,575^{a,r}$

O fornecimento de Ca à planta pode ser feito em elevadas concentrações, podendo atingir-se uma acumulação de até 10% do peso seco das folhas maduras, sem sintomas de toxicidade ou inibições significativas no crescimento (Marschner, 1995). Neste enquadramento, a acumulação de Ca na parte aérea, revelou um aumento progressivo, ao longo do ciclo de vida, em todos os tratamentos, onde F4 (1,5/1,5) atingiu o máximo no final do período experimental, distinguindo-se significativamente dos demais tratamentos, assim como dos restantes períodos (figura 4.41; tabela 4.36). Apenas ao 31º e 84º dias após germinação, o teor em Ca não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e entre os períodos experimentais (tabela 4.36).

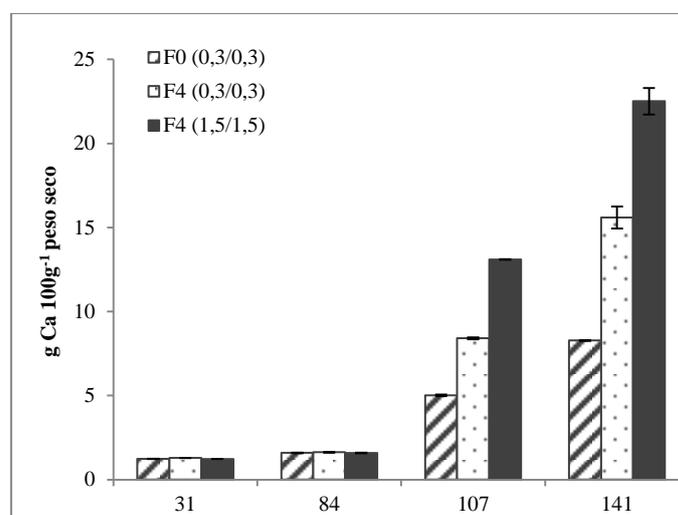


Figura 4.41 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.36 - Média do teor de Ca na parte aérea, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	1,233 \pm 0,007 ^{a,t}	1,290 \pm 0,005 ^{a,t}	1,230 \pm 0,005 ^{a,t}
84	1,593 \pm 0,021 ^{a,t}	1,623 \pm 0,014 ^{a,t}	1,583 \pm 0,021 ^{a,t}
107	5,010 \pm 0,047 ^{c,s}	8,403 \pm 0,056 ^{b,s}	13,103 \pm 0,021 ^{a,s}
141	8,273 \pm 0,027 ^{c,r}	15,590 \pm 0,653 ^{b,r}	22,510 \pm 0,789 ^{a,r}

Com a exceção de F0 (0,3/0,3), verificou-se um aumento nos teores de Ca na espiga, do segundo período experimental para o 107º dia após germinação, tornando-se a acumulação de Ca em todos os tratamentos, significativamente diferente nestes dois períodos (figura 4.42; tabela 4.37).

No último período experimental, F4 (1,5/1,5) teve uma diminuição na acumulação de Ca, revelando um valor médio mínimo significativamente diferente ($P \leq 0.05$) face aos demais tratamentos. O tratamento controlo apresentou uma tendência inversa, aumentando o conteúdo de Ca na espiga, face ao 107º dia, colocando o teor deste elemento próximo do valor inicial observado neste tratamento (tabela 4.37). Embora F4 (0,3/0,3) tenha sofrido uma ligeira diminuição nos teores de Ca, do 107º dia após germinação para o último período experimental, essa diminuição não se revelou significativa (tabela 4.37).

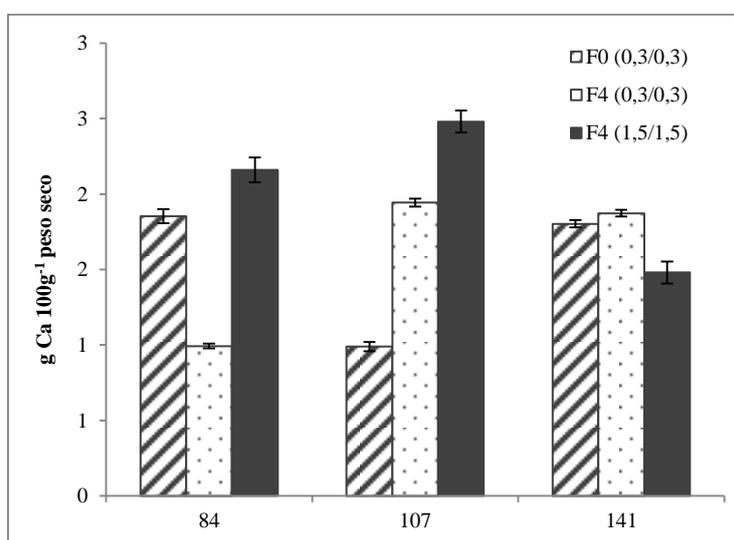


Figura 4.42 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na espiga e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.37 - Média do teor de Ca na espiga, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, *c*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	1,853 \pm 0,047 ^{b,r}	0,993 \pm 0,017 ^{c,s}	2,160 \pm 0,083 ^{a,s}
107	0,990 \pm 0,031 ^{c,s}	1,943 \pm 0,027 ^{b,r}	2,480 \pm 0,073 ^{a,r}
141	1,803 \pm 0,024 ^{a,r}	1,873 \pm 0,021 ^{a,r}	1,480 \pm 0,073 ^{b,t}

A acumulação de Ca nos grãos não apresentou diferenças entre os tratamentos, sugerindo pouca influência da condição nutricional na mobilização deste elemento mineral, face aos tratamentos efectuados (figura 4.43; tabela 4.38).

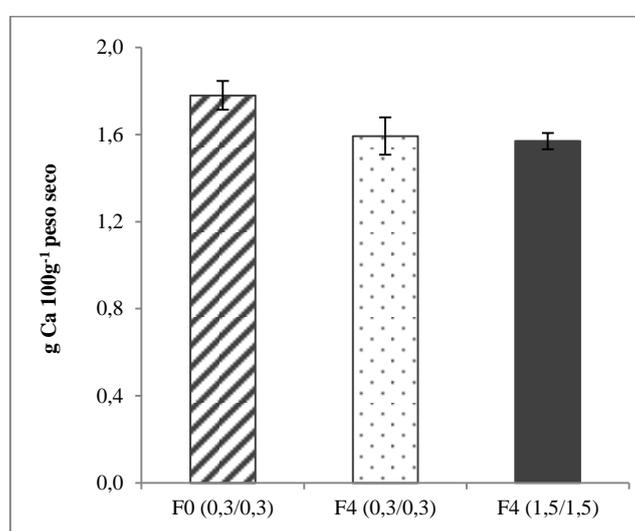


Figura 4.43 – Teor médio de Ca ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) no grão e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.38 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão ($\text{mg } \text{g}^{-1}$), com a variável de tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
1,780 \pm 0,066 ^a	1,593 \pm 0,086 ^a	1,570 \pm 0,038 ^a

4.1.3.2.5 Magnésio

A função do magnésio (Mg) nas plantas está fortemente relacionada com a capacidade de interagir com moléculas nucleofílicas, como os grupos fosforil, através de ligações iónicas, actuando também como um elemento de ligação, o que permite formar complexos de diferentes estabilidades

(Marschner, 1995). A sua concentração óptima nas planta deve situar-se entre 0,15 % e 0,35 % de peso seco dos órgãos vegetativos (Marschner, 1995).

O Mg possui ainda, um papel importante no processo de transferência de energia através da fosforilação fotossintética nas células, assim como na estabilização das membranas celulares e regulação intra e extracelular (Bergmann, 1992).

Analisando os teores de Mg na planta, verificou-se um decréscimo em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), ao longo do ensaio, 26% e 34%, respectivamente. No 107º dia após germinação, verificou-se um valor mínimo no teor de Mg, representando um decréscimo de 76 % e 66 % em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), respectivamente (figura 4.44; tabela 4.39). O tratamento controlo deteve o valor mínimo de Mg, ao 84º dia após germinação, o que representou um decréscimo de 72 % (figura 4.44; tabela 4.39). Esta tendência decorreu da elevada mobilidade do Mg nos solos, a qual depende de diversos factores, tais como, as características do solo, nomeadamente, o respectivo pH, e da espécie / variedade da cultura e do seu sistema radicular (Gransee e Fühns, 2013). A capacidade de trocas catiónicas dos elementos minerais está directamente relacionada com o pH do solo, que no caso do Mg apresenta uma proporcionalidade directa, isto é, será tanto menor, quanto mais baixo o pH (Gransee e Fühns, 2013). Considerando o pH do solo utilizado para a sementeira do nosso ensaio experimental (6,5 – 5,5), verifica-se que nestas condições a mobilidade do Mg foi favorecida, devido à fraca capacidade de ligação do mineral ao solo (White e Broadley, 2009; Gransee e Fühns, 2013). Note-se contudo que a competição dos catiões para absorção radicular na planta pode ser parcialmente inibida face a uma elevada disponibilidade de outros catiões como, Ca, K e Mn (Marschner, 1995; Gransee e Fühns, 2013). Neste enquadramento, comparando os teores dos principais macronutrientes competidores pela absorção radicular, verificou-se um efeito preferencial de absorção do K, seguido do Ca, com absorções por parte da raiz, de 71 % a 91 %, e 89 % a 97 %, superiores à absorção de Mg, respectivamente, ao 107º dia após germinação, período com menor resultado acumulativo de Mg, durante o ensaio experimental (figura 4.44; tabela 4.39). Por outro lado, a inibição verificada na biomassa da planta, sugere uma ligeira deficiência em Mg, visto que uma deficiência neste elemento condiciona a acumulação de glúcidos nas folhas, assim como nas raízes, diminuindo conseqüentemente o respectivo crescimento (Gransee e Fühns, 2013). De facto, verificou-se que no 107º dia após germinação, período em que as raízes apresentaram o menor peso seco, foi também o período de menor absorção de Mg por parte deste órgão vegetativo (figura 4.44; tabela 4.39). Além disso, equacionando os teores de Mg, a produção de biomassa das culturas, segue tipicamente uma curva sigmoideal, com baixa acumulação de biomassa logo após a emergência, seguida de um crescimento vegetativo exponencial e finalmente atinge um máximo durante o crescimento e formação do grão (Gransee e Fühns, 2013). Note-se contudo que neste estudo esta tendência não se verificou, sugerindo a ocorrência de uma deficiência latente em Mg, ao longo do desenvolvimento da planta (White e Broadley, 2009; Gransee e Fühns, 2013). No entanto, esta aparente deficiência em Mg poderá ter

resultado de um excesso de acumulação de outros catiões (White e Broadley, 2009; Gransee e Führs, 2013).

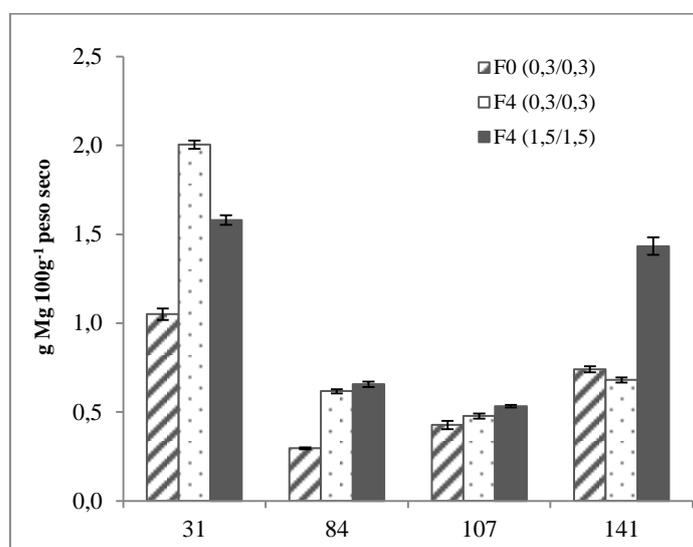


Figura 4.44 - Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na raiz e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.39 - Média do teor de Mg na raiz, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na raiz, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a* e *b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t* e *u* mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	1,050 ± 0,033 ^{b,r}	2,003 ± 0,024 ^{a,r}	1,580 ± 0,026 ^{b,r}
84	0,297 ± 0,005 ^{b,u}	0,617 ± 0,012 ^{a,s}	0,657 ± 0,015 ^{a,t}
107	0,427 ± 0,024 ^{a,t}	0,477 ± 0,014 ^{a,t}	0,533 ± 0,007 ^{a,u}
141	0,740 ± 0,017 ^{b,s}	0,680 ± 0,014 ^{b,s}	1,433 ± 0,050 ^{a,s}

O Mg possui um papel importante nos parênquimas clorofilinos, pois integra a molécula de clorofila (Marschner, 1995; Gransee e Führs, 2013). Assim, um dos principais sintomas de deficiência de Mg é a clorose das folhas. Visto que 6-25% do Mg total está ligado à clorofila, as folhas maduras com deficiência em Mg usualmente apresentam deficiências no teor de clorofila (Marschner, 1995).

No 107º dia após a germinação verificou-se uma diminuição significativa no teor de Mg, em todos os tratamentos. Acresce que 84 dias após a germinação, F0 (0,3/0,3) apresentou um teor mínimo em Mg, distinguindo-se estatisticamente dos demais tratamentos (figura 4.45; tabela 4.40). Da mesma forma F4 (1,5/1,5) revelou o teor máximo de Mg, ao 141º dia após germinação, distinguindo-se significativamente dos demais tratamentos, e entre si nos restantes períodos experimentais (tabela 4.40).

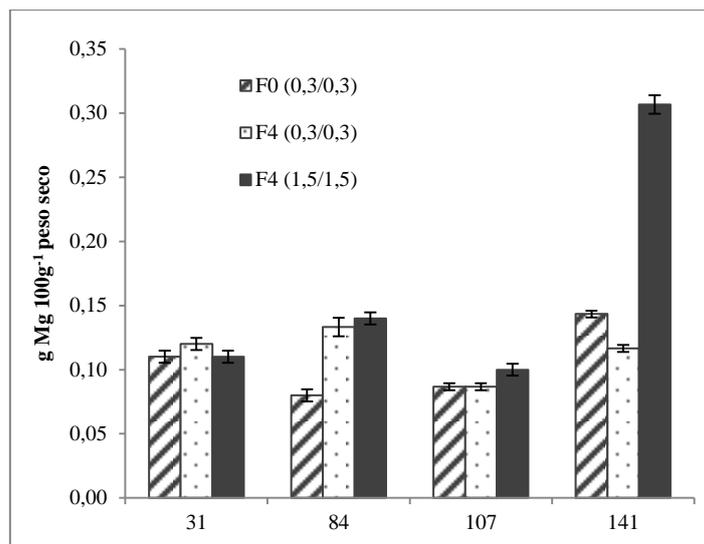


Figura 4.45 – Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na parte aérea e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.40 - Média do teor de Mg na parte aérea, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na parte aérea, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r*, *s*, *t*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
31	0,110 ± 0,005 ^{a,s}	0,120 ± 0,005 ^{a,r}	0,110 ± 0,005 ^{a,t}
84	0,080 ± 0,005 ^{b,t}	0,133 ± 0,007 ^{a,r}	0,140 ± 0,005 ^{a,s}
107	0,087 ± 0,003 ^{a,t}	0,087 ± 0,003 ^{a,s}	0,100 ± 0,005 ^{a,t}
141	0,143 ± 0,003 ^{b,r}	0,117 ± 0,003 ^{b,r}	0,307 ± 0,007 ^{a,r}

Na espiga, o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou teores máximos de acumulação de Mg ao 107° e 141° dias após germinação, revelando um aumento de 70% face ao segundo período experimental (figura 4.46; tabela 4.41).

A acumulação de Mg, considerando ainda a espiga, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, ao longo do ciclo de vida da planta (tabela 4.41). Adicionalmente, F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram valores mínimos de acumulação de Mg no 84° dia após germinação, distinguindo-se significativamente dos restantes períodos experimentais. F0 (0,3/0,3) apresentou o valor mínimo ao 107° dia, significativamente diferente dos demais períodos (figura 4.46; tabela 4.41).

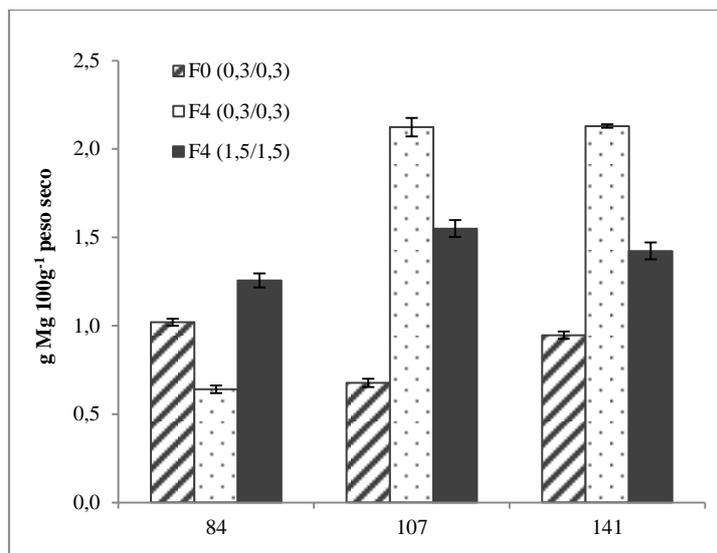


Figura 4.46 – Teor médio de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) na espiga e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos, durante o ciclo de vida da planta.

Tabela 4.41 - Média do teor de Mg na espiga, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) na espiga, com a variável de tratamento, ao longo do ciclo de vida da planta. As letras *a, b, c*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos e as letras *r, s*, mostram as diferenças significativas entre os períodos de colheita de amostras.

Dias após germinação	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
84	1,020 ± 0,021 ^{b,r}	0,640 ± 0,022 ^{c,s}	1,257 ± 0,039 ^{a,s}
107	0,677 ± 0,024 ^{c,s}	2,123 ± 0,052 ^{a,r}	1,550 ± 0,047 ^{b,r}
141	0,947 ± 0,021 ^{c,r}	2,130 ± 0,009 ^{a,r}	1,423 ± 0,047 ^{b,r}

Nos grãos de cereais, o Mg pode apresentar uma função adicional que se prende com a regulação da síntese de amido, através do seu efeito com o P inorgânico e a formação do complexo Mg-K-fitato (Marschner, 1995).

A acumulação em Mg nos grãos apresentou teores mais elevados em F4 (0,3/0,3) (figura 4.47). Por sua vez o tratamento controlo apresentou teores mínimos de Mg (figura 4.47; tabela 4.42).

O efeito de acumulação maioritária de Mg em F4 (0,3/0,3) é concordante com o observado também na espiga, a partir do 107º dia após germinação, revelando o seu potencial de absorção a partir deste período.

Adicionalmente, em condições de deficiência de Mg, os níveis de P nos tecidos vegetativos são mais elevados, embora o oposto possa ocorrer nos grãos (Bergmann, 1992). Neste enquadramento, os níveis de P não apontam para uma deficiência em Mg. Acresce ainda que os teores de Mg nos grãos de cereais situam-se habitualmente entre os 0,12 - 0,18 % de peso seco, pelo que os valores verificados nas amostras não sugerem carência mineral (Bergmann, 1992).

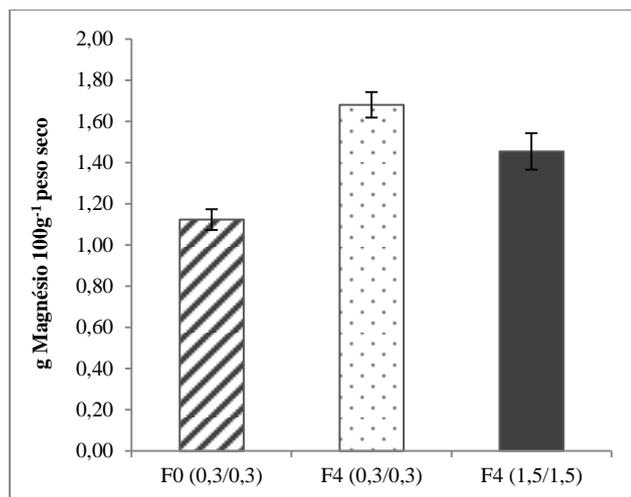


Figura 4.47 – Teor médio de Mg nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.42 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
1,123 ± 0,051 ^b	1,680 ± 0,062 ^a	1,453 ± 0,088 ^{a,b}

4.1.4. Cinética de absorção e acumulação

4.1.4.1. Micronutrientes

4.1.4.1.1. Zinco

A solubilização do zinco (Zn) nos solos é feita de forma mais eficiente sob a forma de compostos iônicos de maior mobilidade como Zn^{2+} , especialmente em ambientes ácidos e oxidantes (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Os mecanismos de absorção de Zn são diferenciados pelas condições do meio, podendo subsistir dois mecanismos distintos: aquando de um meio ácido, e cuja absorção é feita essencialmente por trocas catiónicas; e outro mecanismo aquando de um meio alcalino, cuja absorção é considerada como uma quimiossorção e é altamente influenciada por compostos orgânicos (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). A absorção de Zn^{2+} é tanto mais eficaz quanto menor for o pH, enquanto a $\text{pH} > 7$ subsiste uma tendência para aumento da síntese de compostos orgânicos responsáveis pela solubilidade do mineral (Kabata-Pendias e Pendias, 1992), embora em solos calcários a deficiência de Zn seja comum.

Analisando a cinética de Zn nos diferentes órgãos da planta, verificou-se que ao 31º dia após germinação, subsistiu uma maior acumulação de Zn na parte aérea, comparativamente à raiz, à excepção do tratamento F4 (1,5/1,5), onde as diferenças foram inferiores (tabela 4.43; figura 4.48).

Contudo, embora F0 (0,3/0,3) tivesse apresentado uma maior acumulação de Zn na parte aérea, foi F4 (0,3/0,3) que revelou uma maior taxa de translocação deste elemento para esses tecidos (tabela 4.43; figura 4.48).

O tratamento controlo, ao 84º dia após germinação, apresentou uma maior acumulação de Zn na raiz, ocorrendo assim uma tendência sinérgica com o teor máximo de Zn nestes tecidos, para este tratamento, tal como com a produção de biomassa na raiz. Por outro lado, e embora ao 84º dia não se tenham verificado diferenças significativas no teor de Zn na parte aérea, entre os tratamentos, detectou-se uma maior acumulação em F4 (1,5/1,5), aspecto que se correlaciona com a maior produção de biomassa na parte aérea obtida para este tratamento no respectivo período experimental.

Relativamente à acumulação de Zn pela espiga, apesar, do tratamento F4 (0,3/0,3) ter apresentado em todos os períodos experimentais, o valor mais elevado, à excepção do último período experimental, onde F4 (1,5/1,5) apresentou um valor máximo, a translocação máxima de Zn para a espiga, em F4 (0,3/0,3), só foi conseguida ao 84º dia após germinação, persistindo a partir deste período no tratamento F4 (1,5/1,5) (tabela 4.43; figura 4.48). A tendência de acumulação de Zn na espiga verificada em F4 (0,3/0,3) foi sinérgica com a produção de biomassa dos respectivos tecidos, no referido tratamentos. F4 (0,3/0,3) também apresentou o valor mais elevado na acumulação de Zn nos grãos maduros, onde o teor de Zn e o seu peso seco corresponderam igualmente ao valor mais elevado, seguindo-se o tratamento F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5). Contudo, embora o tratamento F4 (1,5/1,5) tenha apresentado a menor acumulação de Zn nos grãos, a translocação do mineral para este órgão foi equivalente a F4 (0,3/0,3), cuja acumulação do mineral foi máxima (tabela 4.43; figura 4.48). Adicionalmente verificou-se que, apesar do tratamento controlo ter revelado uma maior taxa de absorção diária de Zn em todos os períodos, à excepção do 84º dia após germinação (figura 4.49), resultante da maior acumulação na parte aérea, esta tendência não se reflectiu na espiga ou no grão, sendo F4 (0,3/0,3) que deteve o valor mais elevado (tabela 4.43).

A taxa de remobilização do Zn dos tecidos vegetativos (usualmente cerca de 70% do total acumulado nesses tecidos) para o grão, através do floema, determina a respectiva acumulação nesses tecidos (Cakmak *et al.*, 2010). Contudo, embora F4 (1,5/1,5) tenha apresentado a maior translocação de Zn para o grão, essa translocação não foi reflectida no teor de Zn acumulado neste órgão (tabela 4.43). Acresce ainda que, a solubilidade e disponibilidade do Zn se correlaciona negativamente com a presença de outros elementos metálicos no solo, como o Ca e o P (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Elevadas concentrações de P induzem uma deficiência de Zn nas plantas, assim como de outros catiões divalentes, maioritariamente devido a reacções químicas nas raízes (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Bergmann, 1992; Marschner, 1995). Considerando que elevados níveis de P podem diminuir a solubilidade e mobilidade do Zn no interior das células, até à parte aérea, poderão surgir condições de deficiência de Zn, em detrimento do elevado conteúdo de P (Marschner, 1995).

Tabela 4.43 - Cinética de Zn (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Absorção total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	grão
31	F0 (0,3/0,3)	0,078	0,198	--	--	0,277	71,65		
	F4 (0,3/0,3)	0,027	0,129	--	--	0,157	82,51		
	F4 (1,5/1,5)	0,062	0,082	--	--	0,144	56,99		
84	F0 (0,3/0,3)	3,775	2,891	0,073	--	6,740	42,90	1,09	
	F4 (0,3/0,3)	1,584	2,672	0,118	--	4,373	61,09	2,69	
	F4 (1,5/1,5)	2,258	5,496	0,085	--	7,839	70,11	1,08	
107	F0 (0,3/0,3)	2,251	4,061	0,208	--	6,520	62,29	3,19	
	F4 (0,3/0,3)	2,152	3,302	0,316	--	5,770	57,24	5,47	
	F4 (1,5/1,5)	0,154	1,396	0,106	--	1,656	84,33	6,38	
141	F0 (0,3/0,3)	2,488	3,125	0,133	0,009	5,755	54,31	2,31	0,15
	F4 (0,3/0,3)	0,444	2,316	0,174	0,011	2,946	78,63	5,92	0,38
	F4 (1,5/1,5)	0,123	1,374	0,116	0,006	1,620	84,82	7,17	0,40

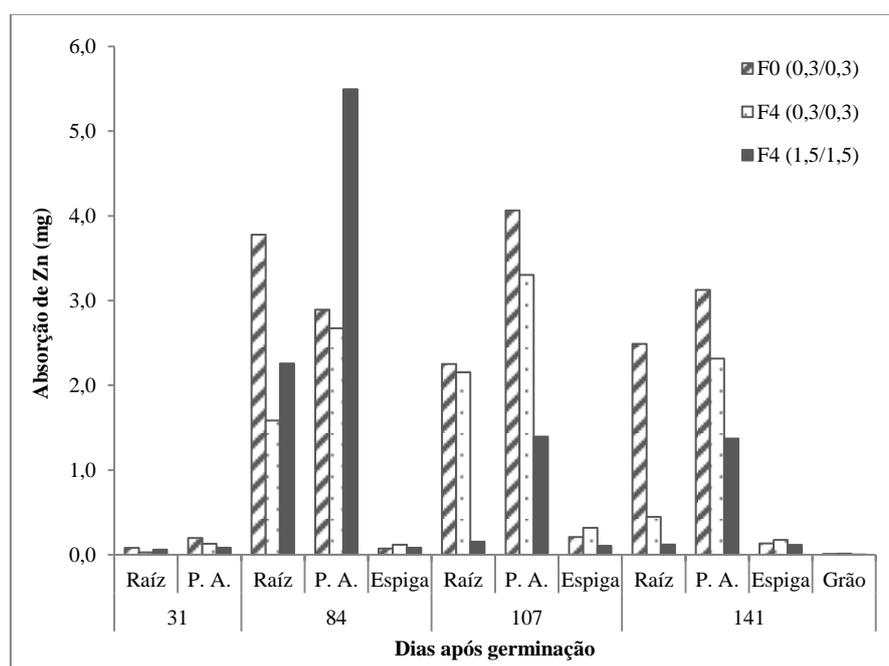


Figura 4.48 - Acumulação de Zn (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

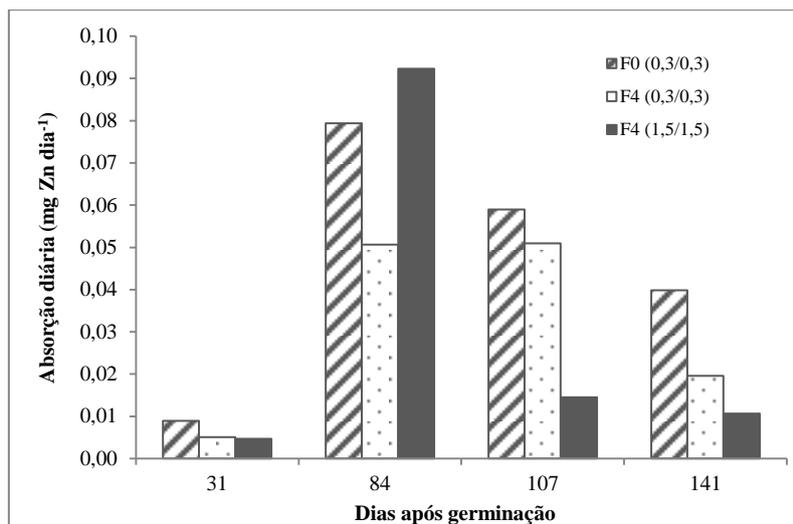


Figura 4.49 - Absorção média diária de Zn (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.1.2. Ferro

Nas espécies vegetais o ferro (Fe) é translocado principalmente quelatado a ácidos hidroxilícos, nomeadamente o ácido málico e cítrico, fenóis, tióis, polissacarídeos e aminoácidos (Bergmann, 1992; Kabata-Pendias e Pendias, 1992). A absorção de Fe pelas plantas é um processo controlado ao nível metabólico, sendo dependente da capacidade redutora das raízes, para formar Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Contudo, no xilema, Fe^{3+} volta a ser oxidado e transportado sob o complexo Fe-ácido cítrico (Bergmann, 1992). Desta forma é feito o transporte de Fe até ao floema, o qual apresenta uma mobilidade relativa (Zhang *et al.*, 2010).

Neste enquadramento, a tendência de absorção revelada pelos demais elementos minerais, também persiste para o Fe, no 31º dia após germinação, onde o tratamento controlo apresentou maior absorção total, com cerca de 90 % de translocação do mineral para a parte aérea, reflectindo-se na maior acumulação de Fe nesses tecidos (tabela 4.44). Estes dados resultam da maior produção de biomassa deste órgão vegetativo, neste tratamento. Apesar de F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) terem apresentado uma translocação de Fe para a parte aérea, muito similar, neste período, a produção de biomassa foi inferior em F4 (1,5/1,5). Por outro lado, a absorção de Fe na raiz, foi pronunciadamente superior em F4 (1,5/1,5), comparativamente aos demais tratamentos, como resultado da produção de biomassa significativamente superior neste tratamento (figura 4.50). Embora a absorção de Fe pelas raízes em F4 (0,3/0,3) tenha sido similar à absorção em F4 (1,5/1,5), a respectiva produção de biomassa foi significativamente inferior.

No 84º dia após germinação verificou-se um efeito inverso na absorção total de Fe, como consequência do aumento da acumulação de Fe na parte aérea em F4 (1,5/1,5), passando este tratamento a apresentar a maior taxa de absorção total (tabela 4.44; figura 4.50). Por sua vez, no

tratamento F4 (0,3/0,3) verificou-se a menor taxa de absorção total e de translocação do mineral para a parte aérea, com cerca de 59 %, no entanto, este tratamento apresentou a maior translocação de Fe para a espiga. O oposto ocorreu em F4 (1,5/1,5), tendo-se verificado uma maior translocação para a parte aérea mas a menor translocação para a espiga. Ao 107º dia após germinação, verificou-se a mesma tendência de absorção, acumulação e translocação de Fe, nas plantas, embora se tenha detectado uma ligeira diminuição na translocação de Fe para a parte aérea, em F4 (1,5/1,5) (tabela 4.44). No entanto, foi em F4 (1,5/1,5) que se verificou a maior taxa de absorção diária de Fe (figura 4.51).

No final do ciclo de vida da planta, verificou-se um efeito antagónico na cinética de Fe, em F0 (0,3/0,3), com uma acentuada diminuição na acumulação deste elemento na espiga, como consequência da diminuição na translocação do mineral (cerca de 44 %) para este órgão (tabela 4.44; figura 4.50). Por sua vez, em F4 (0,3/0,3) verificou-se a maior translocação de Fe para o grão, resultando numa maior acumulação do elemento. Este efeito sugere uma correlação entre o incremento nutricional das plantas e o aumento do rendimento do grão. De facto, F4 (0,3/0,3) foi o tratamento com maior peso seco médio do grão, assim como o tratamento com maior acumulação de elementos metálicos. Estes dados corroboram as conclusões de Velu *et al.* (2013), de que a acumulação de Fe não tem efeito significativo no rendimento do grão.

Contudo, os resultados obtidos para a translocação de Fe para o grão ficam muito aquém dos sugeridos por Zhang *et al.* (2010). Estes autores indicam que 77 % do Fe total da parte aérea de trigo é translocado para o grão maduro.

Tabela 4.44 - Cinética de Fe (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raíz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	5,05	46,55	--	--	51,60	90,21		
	F4 (0,3/0,3)	9,63	17,36	--	--	26,99	64,33		
	F4 (1,5/1,5)	19,84	26,19	--	--	46,03	56,90		
84	F0 (0,3/0,3)	304,68	609,70	5,98	--	920,36	66,25	0,65	
	F4 (0,3/0,3)	312,51	466,76	10,60	--	789,87	59,09	1,34	
	F4 (1,5/1,5)	347,13	1159,94	7,91	--	1514,98	76,56	0,52	
107	F0 (0,3/0,3)	139,07	323,79	18,32	--	481,18	67,29	3,81	
	F4 (0,3/0,3)	363,25	244,30	71,12	--	678,67	36,00	10,48	
	F4 (1,5/1,5)	778,97	378,26	68,53	--	1225,76	30,86	5,59	
141	F0 (0,3/0,3)	343,31	604,84	11,95	1,10	961,20	62,93	1,24	0,11
	F4 (0,3/0,3)	473,02	243,56	45,32	4,94	766,85	31,76	5,91	0,64
	F4 (1,5/1,5)	765,43	558,42	99,39	4,68	1427,92	39,11	6,96	0,33

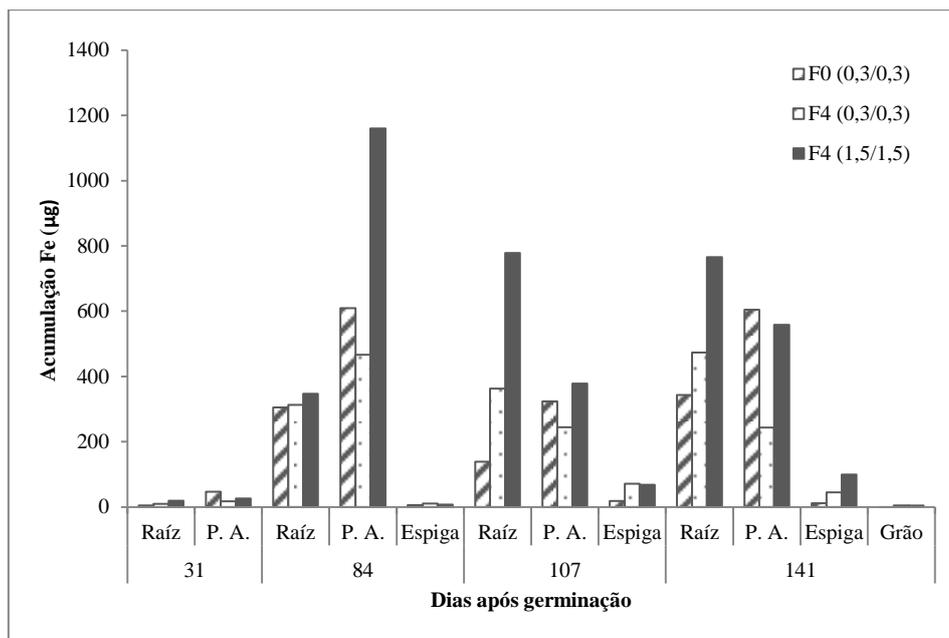


Figura 4.50 - Acumulação de Fe (μg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

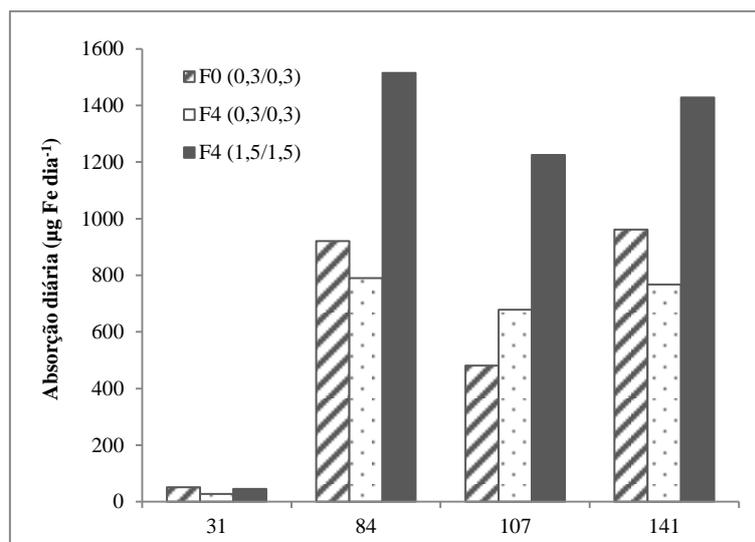


Figura 4.51 - Absorção média diária de Fe (μg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.1.3. Cobre

Embora a absorção de cobre (Cu) seja muito reduzida, comparativamente a outros elementos minerais, (nomeadamente Fe, Mn e Zn), é mais elevada nas folhas do que na raiz, nos primeiros períodos vegetativos (de grande crescimento), como o afilhamento e formação da parte aérea (Bergmann, 1992; Kabata-Pendias e Pendias, 1992), conforme se verificou, ao 31º dia após germinação, uma maior prevalência de Cu na parte aérea, comparativamente à raiz, representando a

maior translocação de Cu para a parte aérea (88 - 96%), em particular em F0 (0,3/0,3) (tabela 4.45; figura 4.52). No 84º dia após germinação, verificou-se a maior absorção total de Cu pela planta, a qual prevaleceu majoritariamente na parte aérea (tabela 4.45; figura 4.52).

Acresce ainda que a menor translocação para a espiga, obtida em F4 (1,5/1,5), corresponde à menor absorção total de Cu pela planta. Adicionalmente, ao 141º dia após a germinação, F4 (0,3/0,3) apresentou a menor acumulação total de Cu, com o menor teor na raiz e parte aérea, como resultado da menor produção de biomassa destes órgãos vegetativos, neste período experimental (figura 4.52). Contudo, este tratamento apresentou o maior teor de Cu no grão, assim como a maior translocação para a espiga e órgão reprodutor (figura 4.52; tabela 4.45).

Adicionalmente, a absorção diária de Cu foi mais pronunciada em F4 (1,5/1,5), aos 84º e 141º dias após germinação (figura 4.53). Por outro lado, o tratamento controle apresentou a menor variação na absorção diária de Cu, ao longo do ensaio, sugerindo uma acentuada estabilidade no metabolismo da planta, relativamente a este tratamento de fertilização. Embora F4 (0,3/0,3) não tenha apresentado uma absorção diária maioritária, em nenhum período de colheita, este tratamento apresentou a maior translocação de Cu para a espiga e por sua vez para o grão, apresentando nestes tecidos a maior acumulação do mineral (figura 4.52; tabela 4.45).

Tabela 4.45 - Cinética de Cu (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	1,19	25,86	--	--	27,04	95,61		
	F4 (0,3/0,3)	1,12	11,87	--	--	12,99	91,37		
	F4 (1,5/1,5)	1,92	13,91	--	--	15,83	87,90		
84	F0 (0,3/0,3)	102,37	192,51	1,35	--	296,23	64,99	0,46	
	F4 (0,3/0,3)	180,95	356,75	2,33	--	540,03	66,06	0,43	
	F4 (1,5/1,5)	139,21	403,65	1,83	--	544,69	74,11	0,34	
107	F0 (0,3/0,3)	107,29	175,50	4,12	--	286,91	61,17	1,44	
	F4 (0,3/0,3)	153,15	115,55	8,36	--	277,07	41,71	3,02	
	F4 (1,5/1,5)	137,56	122,86	3,29	--	263,71	46,59	1,25	
141	F0 (0,3/0,3)	192,50	117,52	2,69	0,27	312,98	37,55	0,86	0,09
	F4 (0,3/0,3)	76,57	115,58	5,50	0,48	198,13	58,33	2,78	0,24
	F4 (1,5/1,5)	137,63	233,75	6,84	0,35	378,57	61,75	1,81	0,09

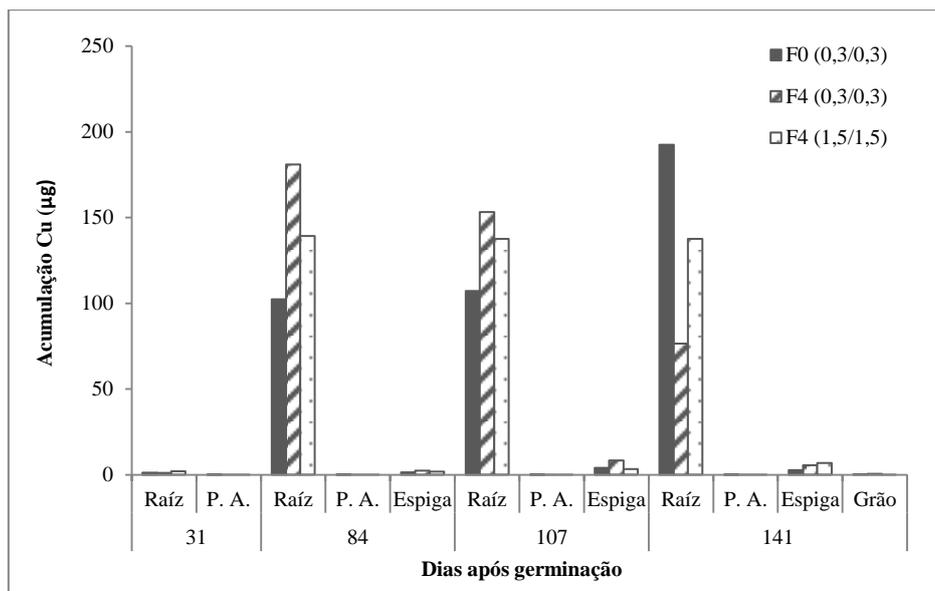


Figura 4.52 - Acumulação de Cu (µg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

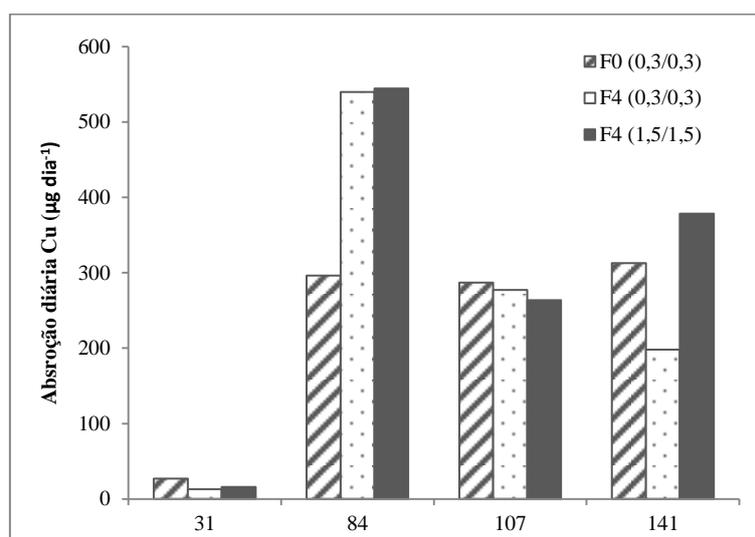


Figura 4.53 - Absorção média diária de Cu (µg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.1.4. Manganês

Nas espécies vegetais, a taxa de acumulação e translocação do manganês (Mn) é fortemente influenciada pelo pH e pela presença de outros elementos metálicos, como o Ca^{2+} (Bergmann, 1992). Adicionalmente, a absorção do Mn pode ser condicionada pela presença de outros cátions como o Mg^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} , assim como o P pode também inibir a absorção de Mn em meios ácidos (Bergmann, 1992).

À semelhança do que se verificou com o Cu, a absorção de Mn apresentou maior prevalência na parte aérea, tendo sido maioritária no tratamento controlo, ao 31º dia após germinação, contudo, a

partir do 84º dia, este tratamento apresentou a menor acumulação de Mn (tabela 4.46; figura 4.54). Acresce ainda que a cumulação total do elemento translocado para a parte aérea, variou de 94 % para 75 %, em F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), respectivamente. Esta variação parece confirmar que a absorção de Mn pelas plantas e a sua distribuição nos tecidos é geralmente elevada, sob a forma de catião livre, aparentemente por não estar ligado a compostos insolúveis, tanto nos tecidos da raiz como no fluido do xilema (Kabata-Pendias e Pendias, 1992).

Ao 84º dia após germinação verificou-se um aumento bastante pronunciado na absorção total de Mn em F4 (1,5/1,5), como reflexo do aumento do teor do mineral na parte aérea, situação que se correlacionou com o acréscimo significativo da produção de biomassa deste órgão (tabela 4.46; figura 4.54). Estes dados resultam de uma maior percentagem de matéria inorgânica na parte aérea das plantas em F4 (1,5/1,5), ao 84º dia (figura 4.12), em particular, com maior teor de P e K, elementos que se reconhece interagirem de forma acentuada no crescimento e desenvolvimento da planta (Le Bot *et al.*, 1998). Em contrapartida, apesar de F4 (1,5/1,5) ter manifestado a maior translocação para a parte aérea (aproximadamente 97 %), foi o tratamento controlo que apresentou maior translocação de Mn para a espiga, 0,69 %. O tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou por sua vez, a menor translocação de Mn para este órgão (tabela 4.46).

Esta tendência persistiu nos períodos experimentais seguintes, embora no final do ciclo de vida da planta, F4 (0,3/0,3) tenha apresentado a mesma capacidade de translocação do mineral para este órgão vegetativo, apesar de se ter verificado maior acumulação do mineral na parte aérea, em F4 (1,5/1,5). Acresce ainda, um aumento do teor de Mn na espiga, em F4 (1,5/1,5), relativamente aos demais tratamentos, reflectindo-se na maior translocação do mineral para estes tecidos. Por outro lado, embora se tenha verificado, em F4 (1,5/1,5), uma maior absorção diária de Mn na planta, tal como a maior acumulação do mineral no grão (figura 4.55; tabela 4.46), foi em F4 (0,3/0,3) que se verificou a maior translocação do mineral para o grão, seguido do tratamento controlo (tabela 4.46).

Tabela 4.46 - Cinética de Mn (μg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	2,35	36,67	--	--	39,02	93,98		
	F4 (0,3/0,3)	3,07	14,31	--	--	17,38	82,32		
	F4 (1,5/1,5)	6,96	20,56	--	--	27,52	74,70		
84	F0 (0,3/0,3)	122,08	267,59	2,72	--	392,39	68,20	0,69	
	F4 (0,3/0,3)	173,11	1539,02	4,59	--	1716,73	89,65	0,27	
	F4 (1,5/1,5)	148,78	4622,24	3,47	--	4774,50	96,81	0,07	
107	F0 (0,3/0,3)	59,15	177,76	7,96	--	244,86	72,60	3,25	
	F4 (0,3/0,3)	77,23	883,17	24,25	--	984,65	89,69	2,46	
	F4 (1,5/1,5)	72,57	2752,73	24,81	--	2850,10	96,58	0,87	
141	F0 (0,3/0,3)	108,38	278,13	5,14	0,49	392,13	70,93	1,31	0,13
	F4 (0,3/0,3)	37,47	1056,38	14,95	1,75	1110,56	95,12	1,35	0,16
	F4 (1,5/1,5)	81,84	2114,43	36,21	1,82	2234,30	94,63	1,62	0,08

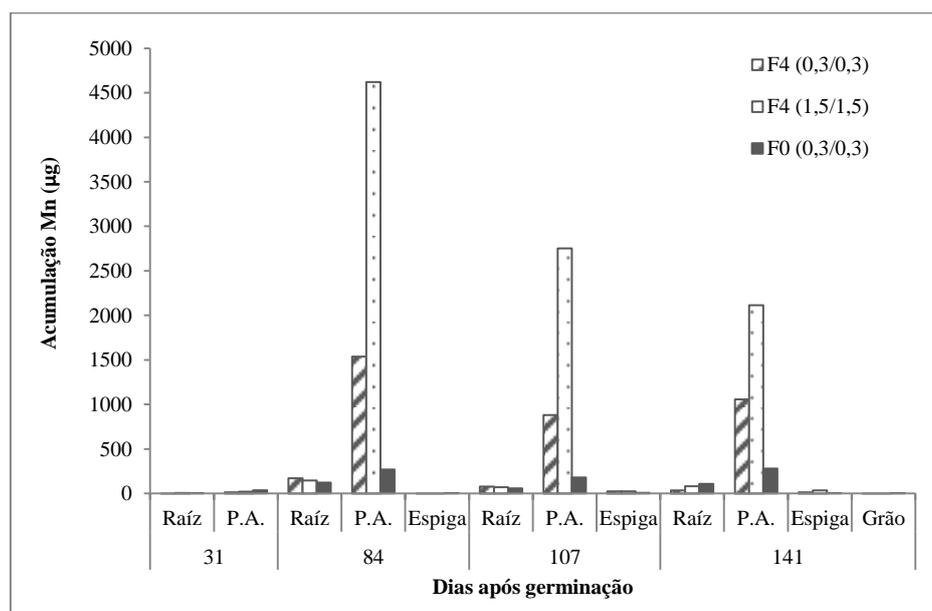


Figura 4.54 - Acumulação de Mn (μg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

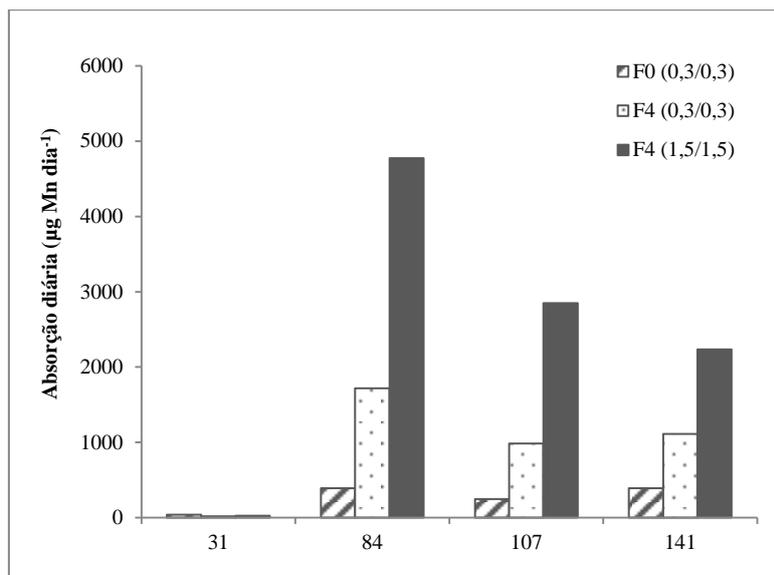


Figura 4.55 - Absorção média diária de Mn (μg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.2. Macronutrientes

4.1.4.2.1. Potássio

A absorção de potássio (K) é fortemente influenciada pelo alongamento e profundidade das raízes, sendo característica das espécies (Bergmann, 1992).

A cinética de K ao longo do ciclo de vida da planta apresentou variações entre os tratamentos (figura 4.56), tendo F4 (0,3/0,3) apresentado ao 31º dia após germinação, uma menor acumulação do mineral nos tecidos (radiculares e foliares), correspondente à menor produção de biomassa, embora a translocação para a parte aérea tenha sido elevada, correspondendo a 82% do total, resultante da elevada mobilidade do mineral e acentuada remobilização para as folhas (Bergmann, 1992).

Nos períodos experimentais seguintes, até ao fim do ciclo vegetativo, F4 (0,3/0,3) apresentou um crescente aumento na acumulação de K na raiz, revelando teores máximos, até ao final do ciclo de vida, onde decresceu acentuadamente, passando a exibir um teor mínimo do mineral, neste órgão (tabela 4.47). Relativamente à parte aérea, F4 (0,3/0,3) apresentou o maior teor de K, no final do ciclo de vida da planta, comparativamente aos outros tratamentos, embora tenha apresentado no mesmo período a menor produção de biomassa, levando conseqüentemente a uma menor acumulação do elemento mineral neste órgão (tabela 4.47; figura 4.56). Juntamente com a baixa acumulação de K na raiz, no final do ciclo de vida da planta, este tratamento apresentou a menor acumulação total do mineral (tabela 4.47). Em contrapartida, F4 (1,5/1,5) apresentou uma maior absorção total de K desde o 84º dia após a germinação até ao final do ciclo de vida da planta, principalmente decorrente da forte

acumulação do mineral na parte aérea, resultado da maior produção de biomassa e / ou da maior acumulação de K nos tecidos.

Analisando a absorção média diária de K (figura 4.57), verificou-se que F4 (1,5/1,5) possuiu uma maior taxa de acumulação deste elemento mineral, ao longo do ciclo de vida da planta, seguido de F0 (0,3/0,3). Contudo a maior translocação de K para o grão, ocorreu em F4 (0,3/0,3), embora este tratamento tenha apresentado o menor teor de K no órgão reprodutor (tabela 4.47).

Tabela 4.47 - Cinética de K (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	4,34	13,15	--	--	17,48	75,19		
	F4 (0,3/0,3)	2,01	9,40	--	--	11,41	82,35		
	F4 (1,5/1,5)	3,83	11,64	--	--	15,46	75,26		
84	F0 (0,3/0,3)	41,93	83,56	5,43	--	130,93	63,82	4,15	
	F4 (0,3/0,3)	122,53	109,30	6,58	--	238,41	45,85	2,76	
	F4 (1,5/1,5)	90,36	477,97	42,13	--	610,46	78,30	6,90	
107	F0 (0,3/0,3)	55,91	465,67	6,44	--	528,01	88,19	1,22	
	F4 (0,3/0,3)	129,22	123,26	27,55	--	280,03	44,01	9,84	
	F4 (1,5/1,5)	47,59	537,20	13,42	--	598,20	89,80	2,24	
141	F0 (0,3/0,3)	120,90	817,39	16,40	0,27	954,96	85,59	1,72	0,03
	F4 (0,3/0,3)	38,23	589,79	11,46	0,23	639,71	92,20	1,79	0,04
	F4 (1,5/1,5)	74,07	1194,42	18,90	0,28	1287,67	92,76	1,47	0,02

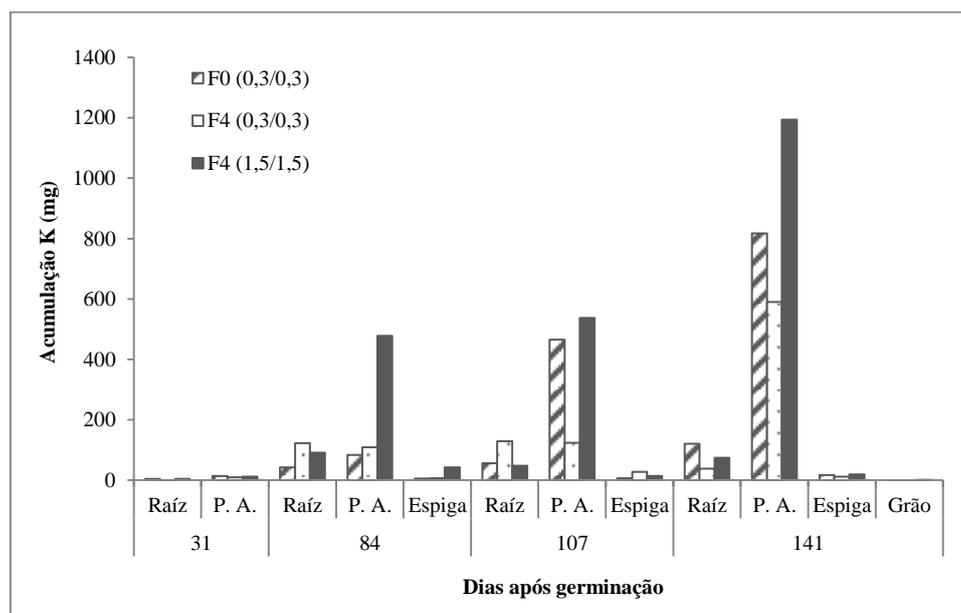


Figura 4.56 - Acumulação de K (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

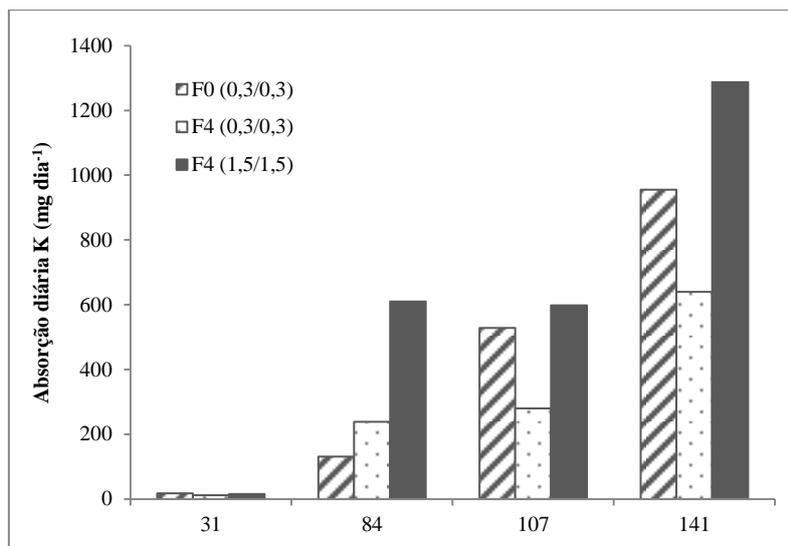


Figura 4.57 - Absorção média diária de K (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.2.2. Fósforo

A acumulação de fósforo (P) na planta prevaleceu na parte aérea, comparativamente à raiz e espiga, durante o ciclo de vida da planta (tabela 4.48; figura 4.58) à exceção do tratamento F4 (0,3/0,3) ao 84º dia (valores muito próximos na raiz e parte aérea) e a o 107º dia, em que se registou, neste último, uma redução. F0 (0,3/0,3) apresentou uma acumulação de P maioritária, relativamente aos outros tratamentos, no início e fim do ciclo de vida da planta, como resultado da maior produção de biomassa na parte aérea e diminuição da acumulação do mineral nos outros tratamentos, respectivamente para os períodos atrás referidos. Adicionalmente, F4 (1,5/1,5) apresentou uma absorção máxima de P ao 84º e 107º dias após germinação, resultante da maior acumulação do elemento mineral na parte aérea, nestes períodos, favorecendo a absorção diária de P (figura 4.59). Apesar de no final do ciclo de vida da planta, F4 (1,5/1,5) ter apresentado uma diminuição da absorção total de P, sendo esta superior a F0 (0,3/0,3), a maior acumulação do mineral no grão, assim como a maior translocação do mineral para o grão, foi notoriamente mais eficiente no primeiro tratamento. Contudo, a translocação de P da raiz para a parte aérea, e desta para a espiga, ocorreu de forma preferencial em F4 (0,3/0,3), para o mesmo período atrás referido. Estes dados são concordantes com a acumulação de P no grão, maioritária em F4 (1,5/1,5), apesar deste tratamento não ter apresentado o maior rendimento de grãos.

Tabela 4.48 - Cinética de P (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	1,00	3,97	--	--	4,97	79,95		
	F4 (0,3/0,3)	0,46	2,10	--	--	2,56	82,05		
	F4 (1,5/1,5)	0,83	2,55	--	--	3,39	75,41		
84	F0 (0,3/0,3)	16,75	62,34	3,55	--	82,64	75,43	4,30	
	F4 (0,3/0,3)	23,36	23,34	3,81	--	50,52	46,21	7,54	
	F4 (1,5/1,5)	13,86	223,26	6,83	--	243,95	91,52	2,80	
107	F0 (0,3/0,3)	7,60	72,65	2,28	--	82,52	88,04	2,76	
	F4 (0,3/0,3)	31,57	23,53	7,29	--	62,40	37,72	11,69	
	F4 (1,5/1,5)	10,73	147,11	3,69	--	161,53	91,08	2,28	
141	F0 (0,3/0,3)	37,70	74,57	3,29	0,04	115,61	64,50	2,85	0,04
	F4 (0,3/0,3)	2,38	46,06	4,39	0,04	52,87	87,11	8,31	0,08
	F4 (1,5/1,5)	8,52	44,03	2,13	0,05	54,73	80,45	3,88	0,10

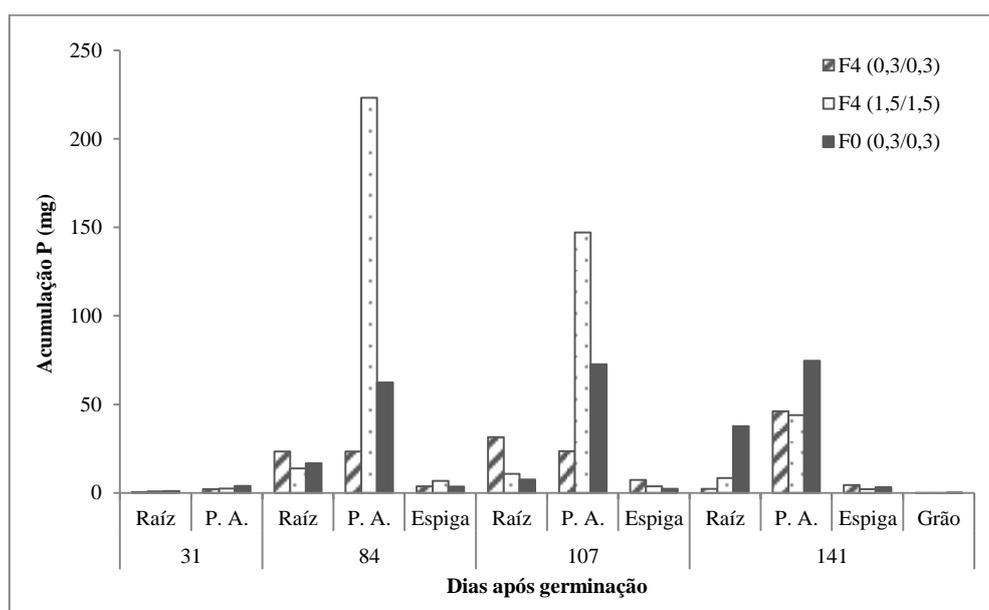


Figura 4.58 - Acumulação de P (mg) pela planta (valores médios) durante o seu ciclo de vida.

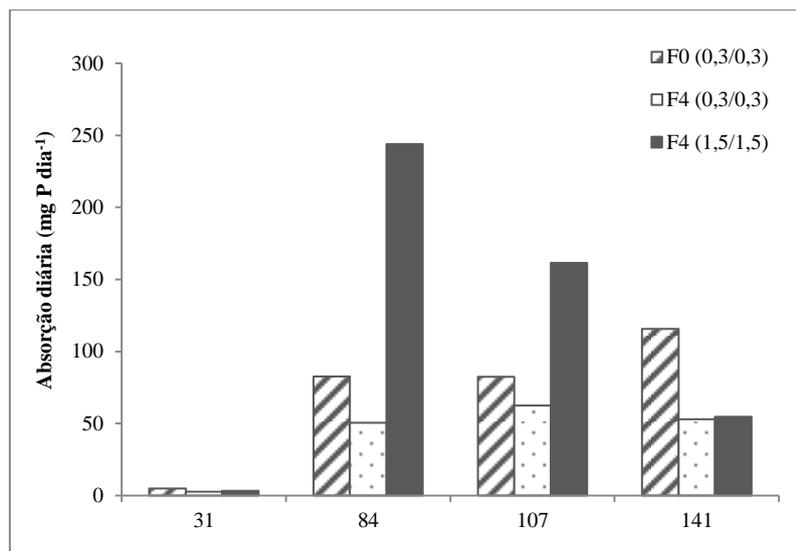


Figura 4.59 - Absorção total diária de P (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.2.3. Enxofre

Na análise da cinética de enxofre (S), a parte aérea apresentou uma acumulação preferencial deste elemento comparativamente à raiz, sendo esta acumulação destacada em F4 (1,5/1,5), com um valor máximo no 84º dia após germinação, decrescendo posteriormente até ao final do ciclo de vida, onde F0 (0,3/0,3) apresentou o teor máximo (tabela 4.49; figura 4.60). Esta tendência também se verificou na absorção total do S, sugerindo que a parte aérea tenha apresentado um efeito mais acentuado neste parâmetro, aspecto que poderá também ter resultado de uma maior produção de biomassa deste órgão. Por outro lado, o S é preferencialmente absorvido pelas plantas sob a forma de iões sulfato, ainda que a respectiva taxa seja relativamente reduzida (Bergmann, 1992). No entanto, os iões sulfato são rapidamente translocados da raiz para os outros órgãos, apresentando uma elevada mobilidade no floema (Bergmann, 1992).

Adicionalmente, F4 (1,5/1,5) apresentou uma maior absorção diária de S pela planta, aos 84º e 107º dias (figura 4.61), tendo a acumulação de S na parte aérea, apresentado uma maior influência neste resultado, consequência também da maior produção de biomassa e maior acumulação do mineral nestes tecidos. Da mesma forma que, F0 (0,3/0,3) apresentou uma absorção total máxima do mineral ao 141º dia após a germinação, porque manteve a sua produção de biomassa proporcional à acumulação de S e em contrapartida, os outros tratamentos apresentaram diminuições quer na produção de biomassa quer na acumulação do mineral, aspectos que potenciaram a diminuição da absorção de S nas plantas.

Contudo, embora a maior translocação de S da parte aérea para a espiga, ao longo do ciclo vegetativo, se tenha verificado em F4 (0,3/0,3), a maior mobilização de S para o grão é dada por F4

(1,5/1,5), embora este tenha apresentado a menor absorção total do mineral, neste órgão, no fim do ciclo vegetativo (tabela 4.49).

Tabela 4.49 - Cinética de S (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte Aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	0,91	5,53	--	--	6,43	85,89		
	F4 (0,3/0,3)	0,66	2,82	--	--	3,48	81,07		
	F4 (1,5/1,5)	1,13	2,32	--	--	3,45	67,20		
84	F0 (0,3/0,3)	15,46	29,87	1,41	--	46,74	63,90	3,02	
	F4 (0,3/0,3)	15,93	23,26	1,85	--	41,04	56,68	4,51	
	F4 (1,5/1,5)	6,48	85,98	2,80	--	95,26	90,26	2,94	
107	F0 (0,3/0,3)	12,49	40,81	1,38	--	54,68	74,63	2,53	
	F4 (0,3/0,3)	16,94	43,58	3,19	--	63,70	68,41	5,01	
	F4 (1,5/1,5)	13,95	66,64	3,05	--	83,64	79,68	3,64	
141	F0 (0,3/0,3)	38,28	100,19	2,03	0,06	140,55	71,23	1,44	0,04
	F4 (0,3/0,3)	4,57	74,86	2,01	0,06	81,49	91,86	2,47	0,07
	F4 (1,5/1,5)	8,49	59,45	1,59	0,06	69,58	85,43	2,29	0,08

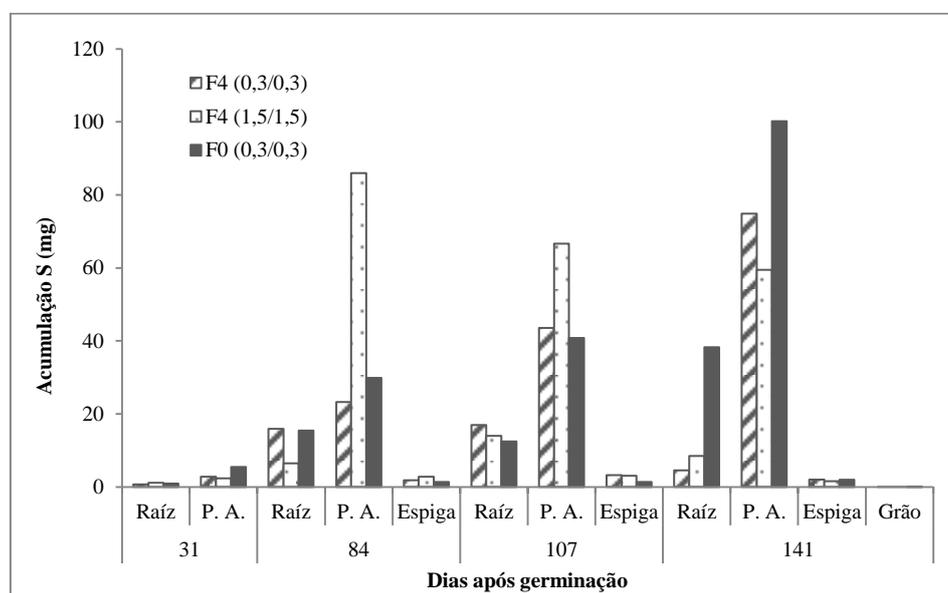


Figura 4.60 - Acumulação de S (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.

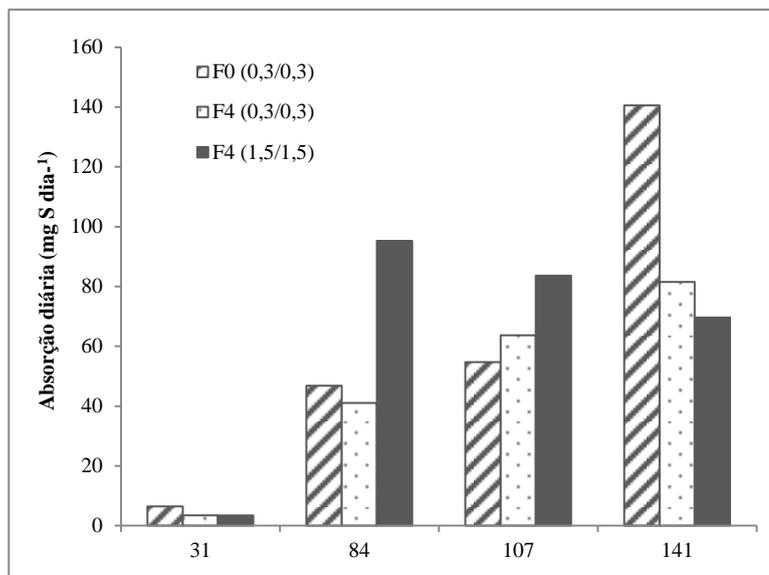


Figura 4.61 - Absorção total média diária de S (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.2.4. Cálcio

Contrariamente a outros nutrientes, como o potássio (K) e o magnésio (Mg), os quais são transportados facilmente pelo floema, o cálcio (Ca) é transportado exclusivamente através dos vasos do tecido xilémico. Acresce ainda que a taxa de transporte de Ca no floema pode considerar-se residual (Bergmann, 1992).

A acumulação de Ca nas plantas revelou-se ligeiramente mais pronunciada na parte aérea, comparativamente à raiz, no início do ciclo de vida, em todos os tratamentos (figura 4.62). O controlo apresentou a maior acumulação de Ca, na planta, tal como a maior translocação de Ca da raiz para a parte aérea, comparativamente aos demais (tabela 4.50; figura 4.62).

Apesar de se ter verificado a menor translocação de Ca em F4 (1,5/1,5), no início do ciclo de vida da planta, ao 84º dia após germinação, este tratamento apresentou a maior absorção total de Ca, neste período (tabela 4.50). Estes dados são reflexo da maior produção de biomassa na parte aérea neste tratamento e neste período experimental.

A acumulação de Ca na espiga também foi superior em F4 (1,5/1,5), embora a produção de biomassa deste órgão reprodutor não tenha sido a mais elevada, entre os tratamentos, foi em F4 (1,5/1,5) que se verificou o maior teor de Ca. Contudo, apesar do tratamento controlo ter apresentado a menor absorção total de Ca, no 84º dia após germinação, a maior translocação do mineral para a espiga foi detectada neste tratamento. Por sua vez, a translocação do mineral, da raiz para a parte aérea, foi muito semelhante entre o controlo e F4 (1,5/1,5) (tabela 4.50).

No 107º dia após germinação, verificou-se um aumento na acumulação de Ca, quer na raiz, quer na parte aérea e espiga, em F4 (1,5/1,5), de 52 %, 69 % e 21 %, respectivamente, resultante do

aumento significativo do teor de Ca nos órgãos da planta. A maior translocação de Ca para a espiga foi verificada em F4 (0,3/0,3), apesar da menor translocação para a parte aérea (tabela 4.50).

Acresce ainda que, no final do ensaio se verificou uma maior tendência de resposta à acumulação de Ca, nos tecidos da planta, sendo a absorção total mais elevada em F4 (1,5/1,5) (tabela 4.50; figura 4.62). Note-se contudo que em F4 (1,5/1,5) a acumulação de Ca no grão foi ligeiramente inferior relativamente aos demais tratamentos, devido a uma menor translocação do mineral para a espiga e posteriormente para o grão. Neste enquadramento aponte-se que usualmente o teor de Ca nos grãos e frutos é menor comparativamente ao teor de Ca nas folhas, devido à potencial inibição da absorção do mineral pelo K e à maior mobilidade do Mg em tecidos mais distantes (Bergmann, 1992). Adicionalmente, o conteúdo de Ca nos órgãos reprodutores e de armazenamento tende a diminuir face a uma inibição da transpiração (Bergmann, 1992; White e Broadley, 2009).

Embora a acumulação de Ca na espiga, em F4 (0,3/0,3) tenha sido ligeiramente superior que no tratamento controlo, ao 141º dia, a translocação para a espiga foi ligeiramente inferior em F4 (0,3/0,3). No entanto, os dois tratamentos apresentaram a mesma taxa de translocação do mineral para o grão (tabela 4.50). Por outro lado, F4 (1,5/1,5) apresentou a maior acumulação de Ca na espiga, no mesmo período, este tratamento teve a menor translocação do mineral para a espiga e consequentemente para o grão, embora F4 (1,5/1,5) tenha tido a maior absorção diária de Ca, ao longo do ciclo de vida da planta (figura 4.63).

Tabela 4.50 - Cinética de Ca (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raíz	Parte aérea	Espiga	Grão	Acumulação total	Translocação (%)		
							Parte aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	3,60	14,18			17,78	79,76		
	F4 (0,3/0,3)	2,09	6,45			8,54	75,53		
	F4 (1,5/1,5)	7,97	8,00			15,96	50,09		
84	F0 (0,3/0,3)	117,04	226,87	8,23		352,14	64,43	2,34	
	F4 (0,3/0,3)	220,60	203,63	7,29		431,52	47,19	1,69	
	F4 (1,5/1,5)	207,14	407,95	13,07		628,16	64,94	2,08	
107	F0 (0,3/0,3)	111,53	595,44	5,94		712,91	83,52	0,83	
	F4 (0,3/0,3)	265,71	567,31	13,59		846,60	67,01	1,60	
	F4 (1,5/1,5)	432,04	1308,83	15,79		1756,66	74,51	0,90	
141	F0 (0,3/0,3)	424,95	838,67	7,78	0,80	1272,20	65,92	0,61	0,06
	F4 (0,3/0,3)	339,47	1112,97	8,66	0,81	1461,91	76,13	0,59	0,06
	F4 (1,5/1,5)	859,13	3841,67	14,09	0,70	4715,60	81,47	0,30	0,01

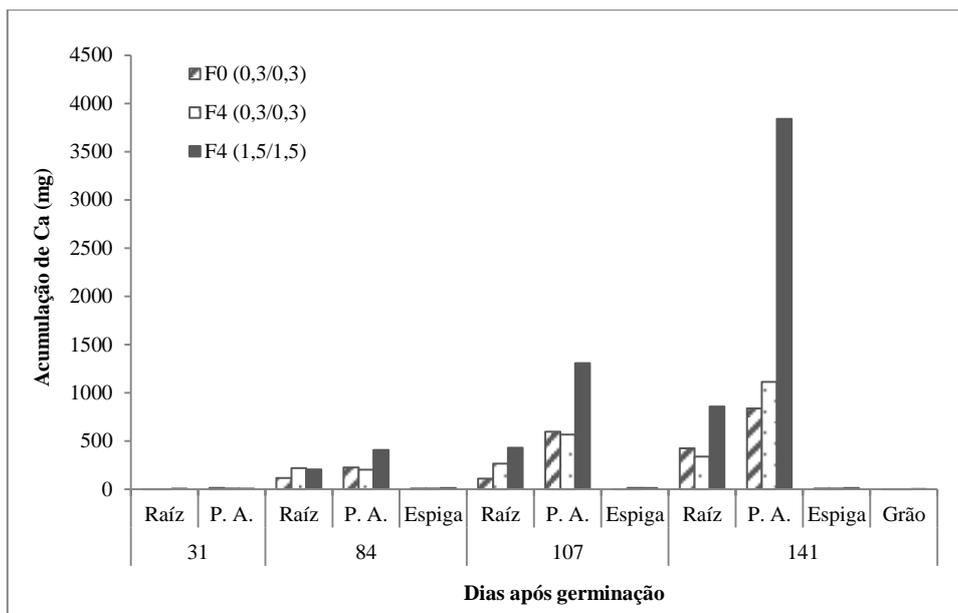


Figura 4.62 - Acumulação de Ca (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.

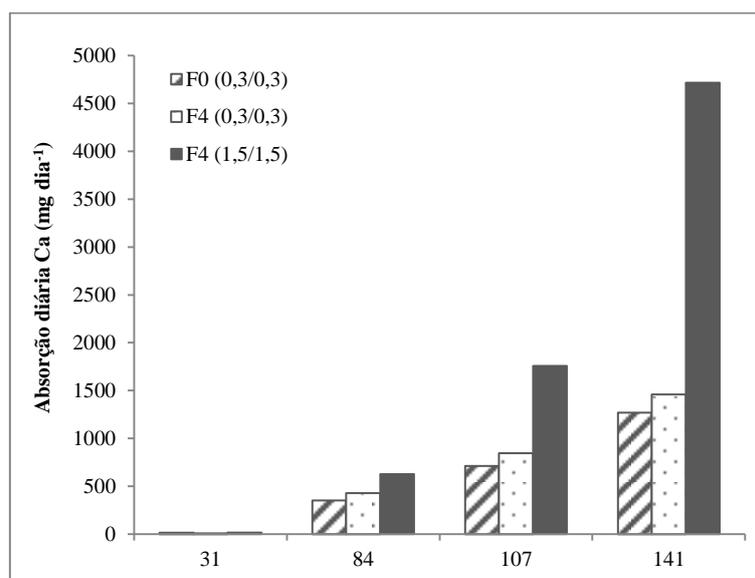


Figura 4.63 - Absorção total média diária de Ca (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.4.2.5. Magnésio

A absorção de magnésio (Mg) seguiu uma tendência crescente ao longo do ciclo de vida da planta, embora de forma não linear. Adicionalmente, verificou-se que a acumulação de Mg ocorreu de forma preferencial na raíz, em relação à parte aérea em todos os tratamentos e períodos de colheita.

Ao 31º dia após germinação, verificou-se em F4 (1,5/1,5) a maior absorção de Mg pela raíz, e uma reduzida translocação e acumulação do mineral na parte aérea, situação que se correlacionou com

uma elevada produção de biomassa na raiz (tabela 4.51). De notar que o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou os menores teores de Mg, entre os tratamentos, à excepção do 84º dia após germinação (tabela 4.51).

Embora tenha ocorrido um aumento significativo de biomassa das raízes no tratamento controlo, a sua absorção não foi superior aos demais tratamentos (tabela 4.51; figura 4.64). Acresce ainda que, a acumulação de Mg na parte aérea em F4 (1,5/1,5), ao 84º e 141º dia após germinação, favoreceu a respectiva acumulação total do mineral (tabela 4.51), refletindo-se também na sua translocação do mineral para este órgão. Contudo, não se verificou uma proporcionalidade na translocação do mineral para a espiga (tabela 4.51), tendo verificado o inverso, isto é, quanto menor a translocação de Mg para a parte aérea, maior a translocação do mineral para a espiga, entre os tratamentos (tabela 4.51).

Acresce ainda que a maior acumulação de Mg na raiz, parte aérea e espiga foi verificada em F4 (1,5/1,5), como resultado da maior produção de biomassa, à excepção da raiz (tabela 4.51; figura 4.64). Contudo, este tratamento apresentou a menor translocação de Mg para o grão (tabela 4.51).

Apesar do tratamento F4 (1,5/1,5) ter apresentado a maior taxa de absorção diária de Mg, durante o ciclo vegetativo, a maior acumulação do mineral no grão foi verificada em F4 (0,3/0,3), como reflexo do maior rendimento do grão.

Tabela 4.51 - Cinética de Mg (mg) ao longo do ciclo de vida da planta (consideram-se os valores médios da raiz, parte aérea, espiga e grão maduro, com indicação da sua absorção total e índices de translocação).

Dias	Tratamento	Raiz	Parte aérea	Espiga	Grão	Absorção total	Translocação (%)		
							Parte Aérea	Espiga	Grão
31	F0 (0,3/0,3)	2,10	1,27			3,37	37,59		
	F4 (0,3/0,3)	2,00	0,60			2,60	23,05		
	F4 (1,5/1,5)	3,16	0,72			3,88	18,45		
84	F0 (0,3/0,3)	16,61	11,39	4,53		32,53	35,01	13,92	
	F4 (0,3/0,3)	23,50	16,73	4,70		44,92	37,24	10,46	
	F4 (1,5/1,5)	22,00	36,07	7,60		65,67	54,92	11,58	
107	F0 (0,3/0,3)	11,95	10,30	4,06		26,30	39,16	15,43	
	F4 (0,3/0,3)	11,20	5,85	14,84		31,90	18,34	46,54	
	F4 (1,5/1,5)	13,65	9,99	9,87		33,51	29,81	29,45	
141	F0 (0,3/0,3)	33,30	14,53	4,08	0,49	52,40	27,73	7,79	0,93
	F4 (0,3/0,3)	10,88	8,33	9,85	0,85	29,90	27,85	32,94	2,83
	F4 (1,5/1,5)	42,71	52,34	13,55	0,67	109,27	47,90	12,40	0,61

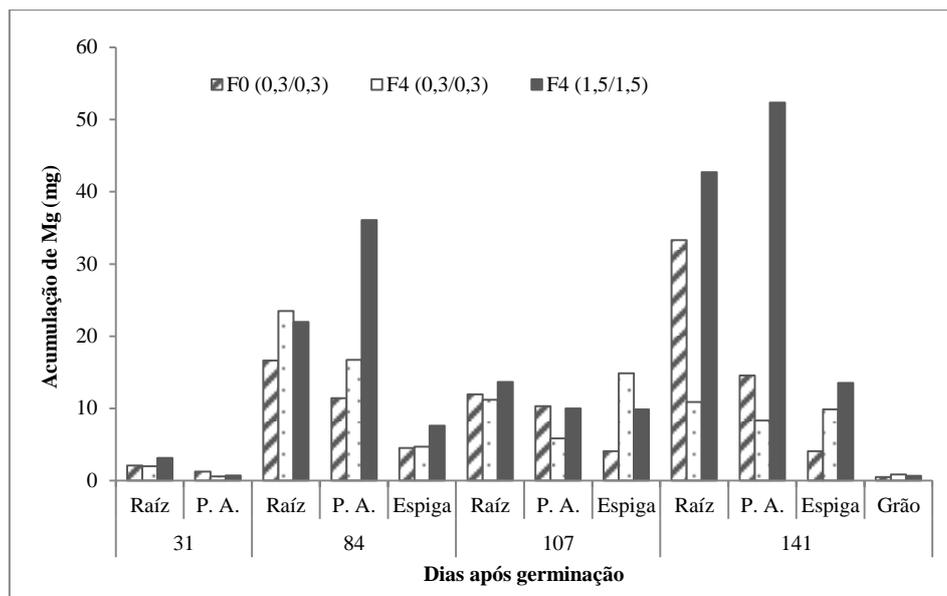


Figura 4.64 - Acumulação de Mg (mg) pela planta (valores médios), durante o seu ciclo de vida.

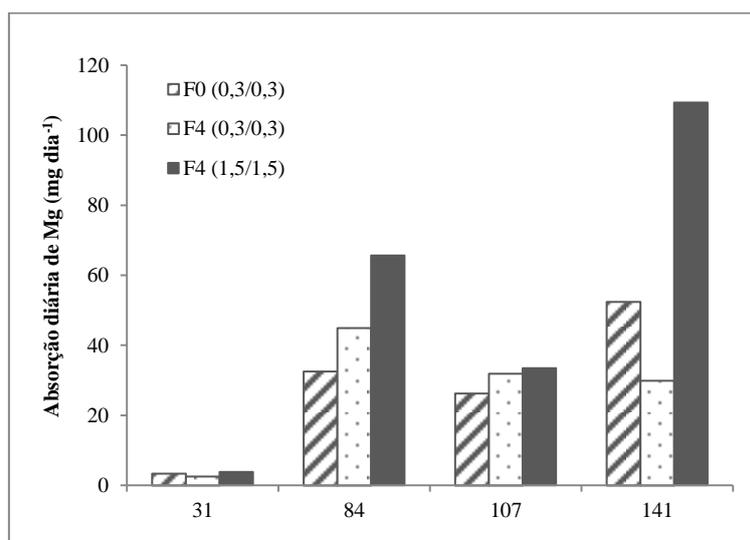


Figura 4.65 - Absorção total média diária de Mg (mg), durante o ciclo de vida da planta.

4.1.5. Cinética de síntese de fotoassimilados

Aproximadamente 90 % do peso seco da maioria das espécies vegetais é constituído por compostos orgânicos, como a celulose, o amido, proteínas e lípidos, cuja síntese se relaciona com a fotossíntese (Marschner, 1995).

O processo fotossintético requer, de uma forma ampla, aquilo que é denominado biologicamente como *source*, e inclui todos os tecidos clorofilinos, e locais de gasto e armazenamento de energia, denominado *sink*, que inclui as raízes, ápices das folhas, sementes e frutos (Marschner,

1995). Assim, o transporte de fotoassimilados da relação *source-sink* possui um papel essencial no crescimento e rendimento da planta (Marschner, 1995).

A relação *source-sink* pode ser avaliada mediante quantificação de parâmetros fotossintéticos e caracteriza o estado da planta à exposição ambiental e nutricional (Marschner, 1995). Neste enquadramento, a taxa fotossintética líquida reflecte a produção líquida de energia acumulável na planta sob a forma de glucose / amido passível de subsequente utilização para o metabolismo da mesma (Marschner, 1995).

No âmbito deste estudo, verificou-se que na fase de enchimento do grão, ocorreu um decréscimo significativo, da taxa fotossintética líquida, em todos os tratamentos (figura 4.66; tabela 4.52). Neste contexto, verificou-se ainda que os diferentes tratamentos não induziram alterações significativas em cada uma das fases analisadas, no entanto, este decréscimo indicia uma diminuição da síntese de fotoassimilados.

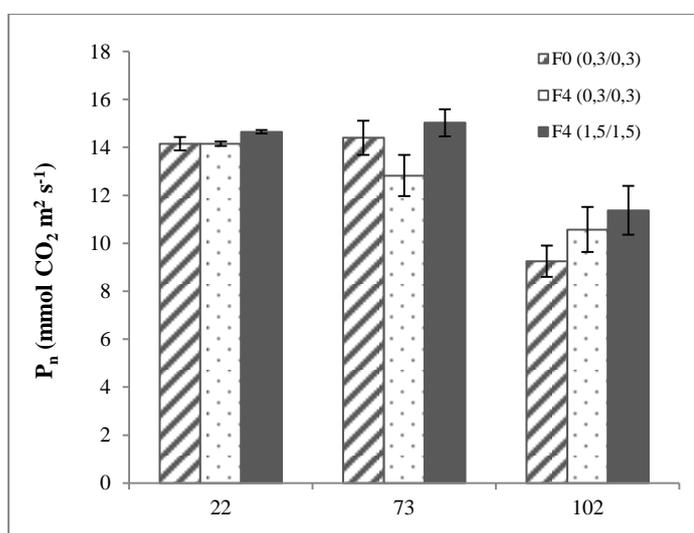


Figura 4.66 - Taxa fotossintética líquida ($\text{mmol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), média e erro padrão ($n=4$), nos diferentes tratamentos, na fase inicial do ciclo vegetativo, imediatamente após ântese e enchimento do grão (22, 73 e 102 dias após germinação, respectivamente).

Tabela 4.52 - Média da taxa fotossintética líquida ($\text{mmol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), respectivo erro padrão ($n=4$) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da taxa fotossintética líquida da planta, em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra *r* aponta a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	14,65 ± 0,075 ^{a,r}	15,03 ± 0,569 ^{a,r}	11,38 ± 1,014 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	14,15 ± 0,089 ^{a,r}	12,83 ± 0,861 ^{a,b,r}	10,58 ± 0,941 ^{b,r}
F0 (0,3/0,3)	14,15 ± 0,281 ^{a,r}	14,40 ± 0,714 ^{a,r}	9,25 ± 0,650 ^{b,r}

A condutância estomática apenas revelou diferenças significativas entre os tratamentos na fase inicial (aos 22 dias), onde F4 (1,5/1,5) apresentou um valor significativamente mais elevado, face aos demais tratamentos (figura 4.67; tabela 4.53).

Analisando a condutância estomática em cada tratamento, ao longo dos diferentes períodos experimentais, foi nos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) ao 73° e 102° dias após germinação, respectivamente, que apresentaram diferenças estatísticas (tabela 4.53). A tendência de diminuição verificada em F4 (1,5/1,5) sugere não ter havido influência na taxa fotossintética líquida (tabela 4.52) e, conseqüentemente, na síntese de assimilados. Contudo, ao 102° dia após germinação, a diminuição da condutância estomática verificada em todos os tratamentos, indica que a partir deste período prevaleceu uma alteração fisiológica independente dos tratamentos nutricionais e que eventualmente poderá ter decorrido da progressiva senescência da planta, característica do fim do ciclo da mesma.

Adicionalmente, a pressão osmótica que se faz sentir nos estomas das folhas, é controlada maioritariamente por iões K, dada a mobilidade dos mesmos (Bergmann, 1992). O fluxo de iões K no sentido do interior das células induz a abertura dos estomas devido ao aumento de pressão osmótica, enquanto o fluxo de iões no sentido de libertação para o exterior das células, conduz ao fecho dos estomas (Bergmann, 1992). Desta forma, o efluxo de iões K favorece a abertura dos estomas e, conseqüentemente, leva a uma rápida perda de água, o que significa que uma deficiência em K conduz a uma elevada taxa de respiração (Bergmann, 1992). Neste enquadramento, a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, não sugere toxicidade das plantas face à solução nutritiva, tal como identificado por Lidon *et al.* (2015).

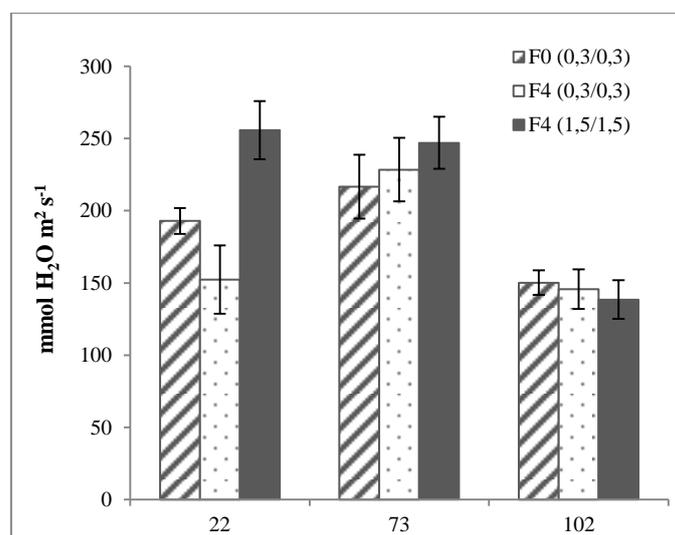


Figura 4.67 - Condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), entre os tratamentos, ao longo do ciclo de vida das plantas.

Tabela 4.53 - Média da condutância estomática, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da condutância estomática, com a variável de tratamento. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre as fases fenológicas e as letras *r*, *s* revelam as diferenças significativas entre os tratamentos.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	255,75 ± 20,092 ^{a,r}	247,00 ± 18,031 ^{a,r}	138,50 ± 13,335 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	152,25 ± 23,657 ^{b,s}	228,50 ± 22,088 ^{a,r}	145,75 ± 13,716 ^{b,r}
F0 (0,3/0,3)	193,00 ± 8,923 ^{a,r,s}	216,75 ± 22,112 ^{a,r}	150,25 ± 8,493 ^{a,r}

Neste enquadramento verificou-se ainda que por unidade de área não ocorreu uma variação significativa no número e dimensão dos estomas entre os tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), mas sim entre F0 (0,3/0,3) e os da geração F4, com o mínimo número de estomas significativo (figura 4.68; figura 4.69). A ausência de variações significativas nestes parâmetros, poderá, entre outros factores, reforçar ainda as tendências detectadas para a condutância estomática e concentração intercelular de CO₂.

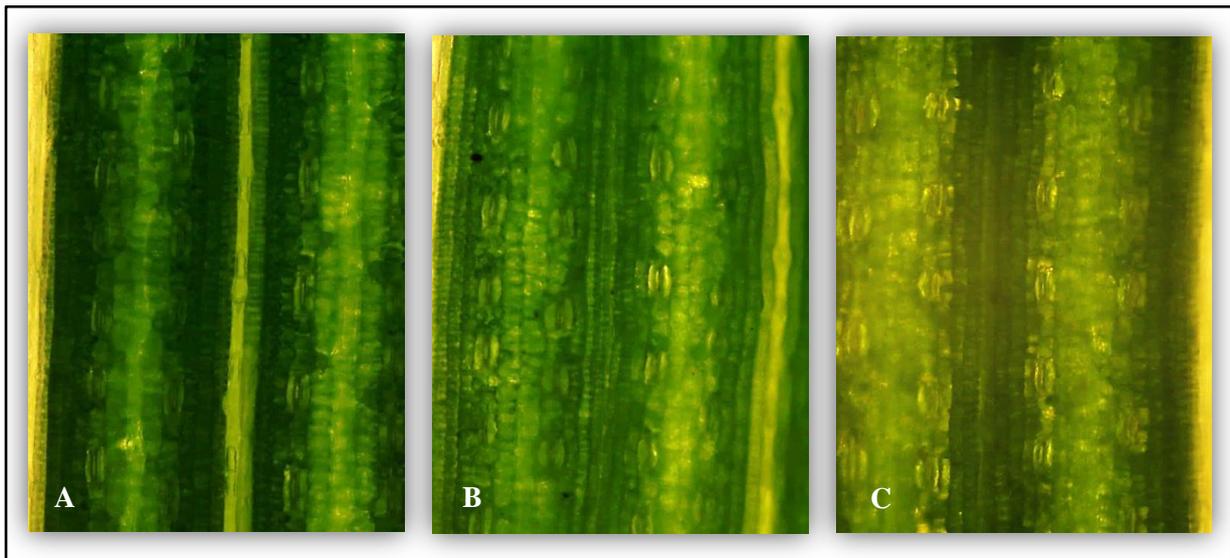


Figura 4.68 - Identificação de estomas nas páginas superiores das folhas de trigo mole, nos tratamentos controlo (A), F4 (0,3/0,3) (B) e F4 (1,5/1,5) (C), com ampliação de 100x.

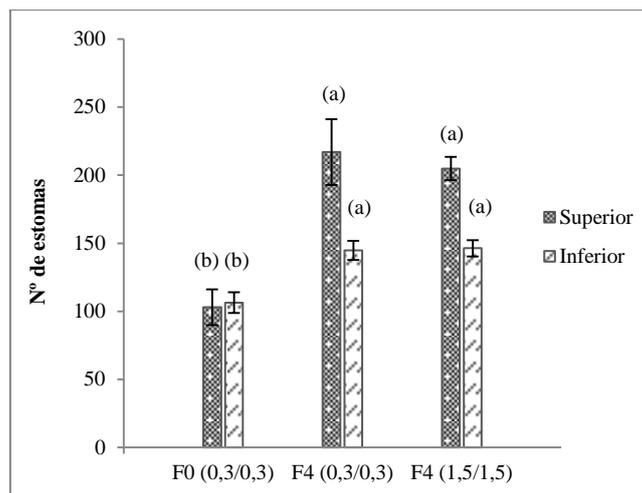


Figura 4.69 - Média do número de estomas e respectivo erro padrão (n=3) nas duas faces das folhas e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do número de estomas, com a variável de tratamento. As letras *a* e *b* correspondem às diferenças entre os tratamentos, em cada face individualizada.

A concentração intercelular de CO_2 deteve, apenas, um valor mínimo significativo ao 22º dia após a germinação referente ao tratamento F4 (0,3/0,3) (figura 4.70; tabela 4.54). Esta tendência é coincidente com o observado na análise da condutância estomática, porém deve destacar-se que estas diminuições não afectaram significativamente a taxa fotossintética líquida.

Note-se que o K possui um papel activo na fixação do CO_2 nos cloroplastos, afectando assim os níveis de fotossíntese (Marschner, 1995). Também o Ca possui um papel activo na fixação de CO_2 no meio nutritivo, resultante do processo de respiração; tal como o Mg desempenha um papel vital nas reacções de fosforilação (Bergmann, 1992). No entanto, o Mg pode ser facilmente substituído por outros iões, como o Zn, Ca, K e Mn, conforme referido por Bergmann (1992). Dessa forma deve existir um equilíbrio entre os minerais fornecidos à planta, para que o seu processo metabólico não seja afectado (Bergmann, 1992).

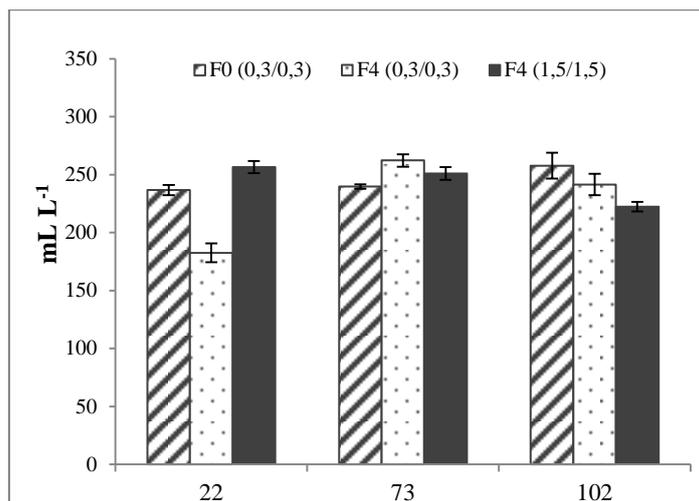


Figura 4.70 - Concentração intercelular de CO₂ (mL L⁻¹) entre tratamentos, em diferentes períodos do ciclo de vida da planta.

Tabela 4.54 - Média da concentração intercelular de CO₂, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) da concentração intercelular de CO₂, com a variável de tratamento. As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre as fases fenológicas e as letras *r*, *s* correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	256,50 ± 5,202 ^{a,r}	251,00 ± 5,420 ^{a,r}	222,25 ± 4,129 ^{a,r}
F4 (0,3/0,3)	182,50 ± 8,147 ^{b,s}	262,25 ± 5,414 ^{a,r}	241,50 ± 9,269 ^{a,r}
F0 (0,3/0,3)	236,75 ± 4,336 ^{a,r}	239,75 ± 1,949 ^{a,r}	257,75 ± 11,030 ^{a,r}

No âmbito da fase fotoquímica da fotossíntese, apenas se verificou que no 102º dia, o nível de F₀ foi significativamente mais elevado em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), o que sugere que embora a taxa fotossintética não seja afectada pela carga nutricional aplicada, a capacidade de utilização do CO₂ pelas células foi ligeiramente diminuída, nesta fase e nestes tratamentos, sugerindo uma menor eficiência das células para o mesmo rendimento (figura 4.71; tabela 4.55). Com excepção do 102º dia após a germinação, estes dados traduzem a ausência de variações induzidas pela carga nutricional fornecida à planta, sobre a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* na fase que antecede a migração de electrões para o centro de reacção do fotossistema II. Por oposição, comparativamente a F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3), o tratamento F4 (1,5/1,5) revela um menor índice de desorganização do efeito por migração por ressonância dos electrões nas antenas associadas ao fotossistema II.

Adicionalmente, considerando os valores de F₀ de cada tratamento ao longo do ciclo vegetativo das plantas, verificou-se que os valores mais elevados subsistiram sempre no 22º dia após a germinação (figura 4.71; tabela 4.55), situação que parece ser característica do genótipo e independente da carga nutricional aplicada na solução nutritiva.

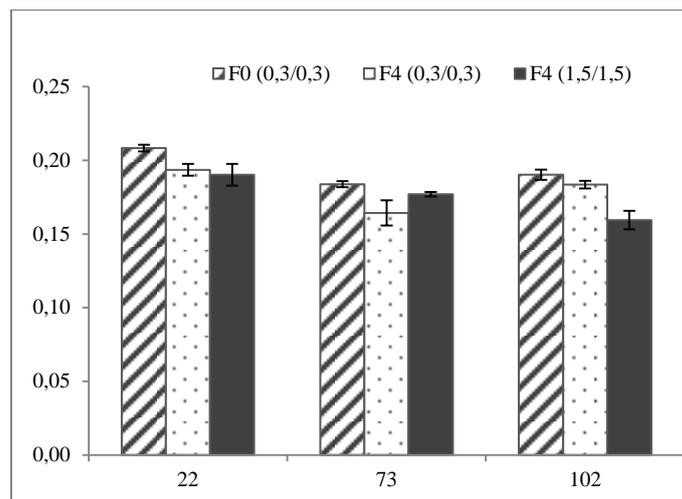


Figura 4.71 - F₀ dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.55 - Média de F₀, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F₀ em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r,s* indicam a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,190 ± 0,007 ^{a,r}	0,177 ± 0,002 ^{a,b,r}	0,160 ± 0,006 ^{b,s}
F4 (0,3/0,3)	0,194 ± 0,004 ^{a,r}	0,164 ± 0,009 ^{b,r}	0,184 ± 0,003 ^{a,b,r}
F0 (0,3/0,3)	0,208 ± 0,002 ^{a,r}	0,184 ± 0,002 ^{b,r}	0,190 ± 0,003 ^{a,b,r}

Em cada período experimental verificou-se que F_v/F_m não variou significativamente nos tratamentos F4, contudo no 102º dia, F0 (0,3/0,3) apresentou valores significativamente mais baixos (figura 4.72; tabela 4.56), aspecto que aponta para a ausência de inibições, induzidas pelas cargas nutricionais aplicadas, sobre a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II até ao último período experimental. Contudo, neste período, o F4 (1,5/1,5) surge com maior eficiência no fotossistema II, aspecto que também parece evidenciar-se em F4 (0,3/0,3). Considerando cada tratamento ao longo do ciclo de vida das plantas, os tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) não apresentaram variações significativas, porém F0 (0,3/0,3) revelou um decréscimo progressivo no 22º dia após germinação (figura 4.72; tabela 4.56).

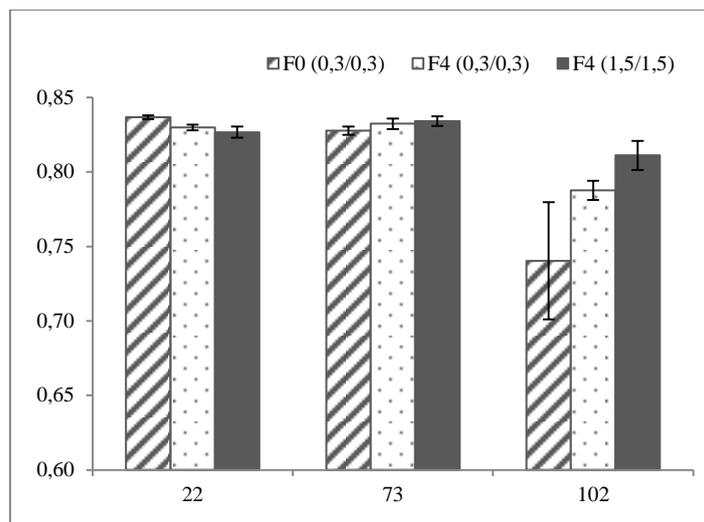


Figura 4.72 - F_v/F_m dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.56 - Média de F_v/F_m , respectivo erro padrão ($n=4$) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F_v/F_m em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	$0,827 \pm 0,004^{a,r}$	$0,834 \pm 0,003^{a,r}$	$0,811 \pm 0,010^{a,r}$
F4 (0,3/0,3)	$0,830 \pm 0,002^{a,r}$	$0,832 \pm 0,004^{a,r}$	$0,788 \pm 0,006^{a,r,s}$
F0 (0,3/0,3)	$0,837 \pm 0,001^{a,r}$	$0,828 \pm 0,003^{a,r}$	$0,740 \pm 0,039^{b,s}$

F_v/F_m , com exceção de F4 (0,3/0,3) ao 73º dia após germinação, não variou significativamente em cada tratamento e ao longo dos diferentes períodos experimentais. Adicionalmente, em cada período experimental, não subsistiram diferenças significativas nos diferentes tratamentos (figura 4.73; tabela 4.57). Estas tendências revelam que, com exceção do caso apontado, variações na carga nutricional não induzem alterações na eficiência de conversão energética no fotossistema II.

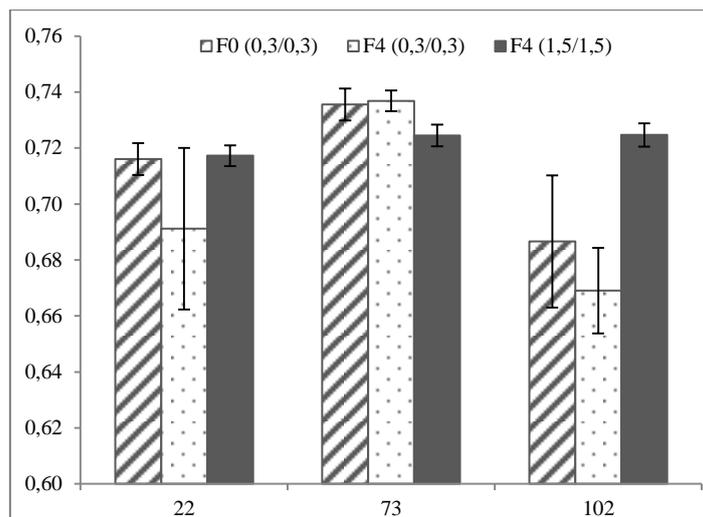


Figura 4.73 - F_v/F_m dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.57 - Média de F_v/F_m , respectivo erro padrão ($n=4$) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de F_v/F_m em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra *r* indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,717 ± 0,004 ^{a,r}	0,725 ± 0,004 ^{a,r}	0,725 ± 0,004 ^{a,r}
F4 (0,3/0,3)	0,691 ± 0,029 ^{a,b,r}	0,737 ± 0,004 ^{a,r}	0,669 ± 0,015 ^{b,r}
F0 (0,3/0,3)	0,716 ± 0,006 ^{a,r}	0,736 ± 0,006 ^{a,r}	0,687 ± 0,024 ^{a,r}

Cada tratamento, apresentou os valores significativamente mais baixos de Φ_e ao 102º dia após a germinação (figura 4.74; tabela 4.58), sugerindo estes dados, nesta fase da evolução natural do ciclo de vida das plantas uma evolução rápida da senescência foliar. Paralelamente, uma análise comparativa entre os tratamentos e em cada período experimental (figura 4.74; tabela 4.58), aponta para diferenças significativas aos 22º e 102º dias após a germinação, com valores mínimos em F4 (0,3/0,3), situação que neste caso parece evidenciar uma menor capacidade de conversão química da carga fotónica absorvida nas antenas do fotossistema II.

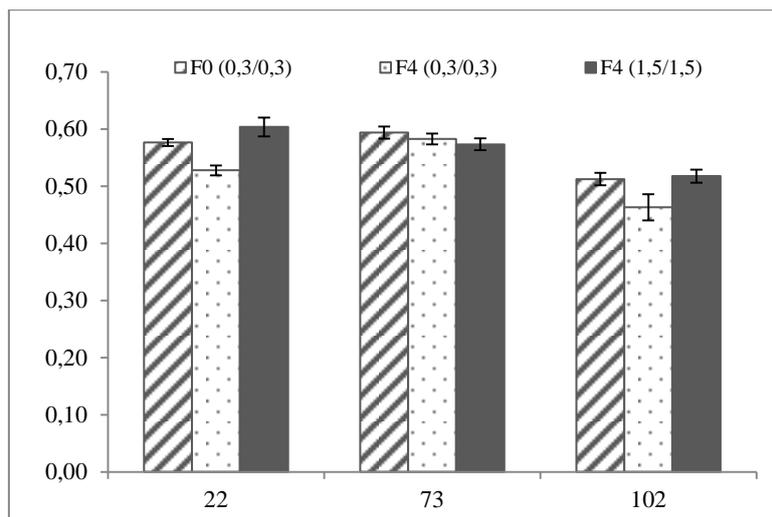


Figura 4.74 - Φ_e dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.58 - Média de Φ_e respectivo erro padrão ($n=4$) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de Φ_e em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b* e *c*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r* e *s* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,604 ± 0,016 ^{a,r}	0,574 ± 0,010 ^{a,r}	0,518 ± 0,012 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	0,528 ± 0,009 ^{b,s}	0,583 ± 0,010 ^{a,r}	0,463 ± 0,023 ^{c,s}
F0 (0,3/0,3)	0,576 ± 0,006 ^{a,r,s}	0,594 ± 0,011 ^{a,r}	0,513 ± 0,011 ^{b,r,s}

Neste enquadramento, analisando a tendência de ETR de cada tratamento, nos diferentes períodos experimentais, detectou-se um comportamento similar ao verificado para Φ_e (figura 4.75; tabela 4.59), aspecto que reforça a hipótese desses valores já traduzirem limitações fotoquímicas na fotossíntese, envolvendo a senescência foliar, característica de uma evolução natural do ciclo de vida da planta. Adicionalmente, o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou em todos os períodos experimentais, à exceção do 73º dia após germinação, os valores de ETR mais baixos (figura 4.75; tabela 4.59). Também neste caso, esta tendência poderá evidenciar uma distorção mínima na eficiência da taxa de transporte de electrões acoplada à fracção de radiação fotossintética activa absorvida e utilizada pelo fotossistema II.

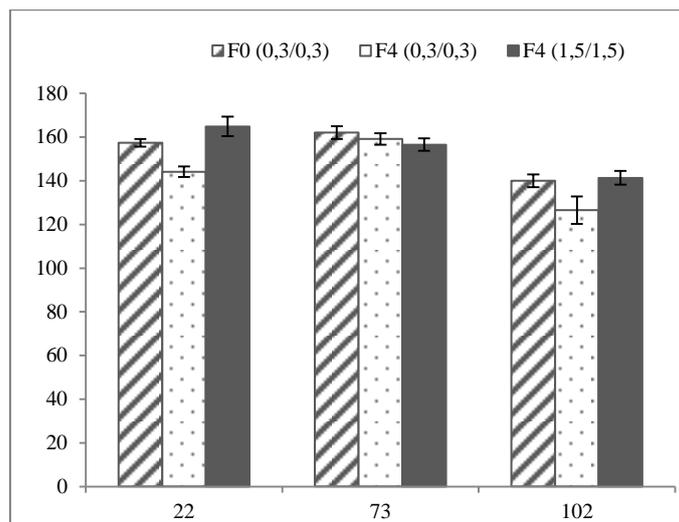


Figura 4.75 - ETR dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.59 - Média de ETR, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de ETR em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b* e *c*, correspondem às diferenças estatísticas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r* e *s* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	164,881 ± 4,504 ^{a,r}	156,575 ± 2,807 ^{a,r}	141,348 ± 3,153 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	144,139 ± 2,369 ^{b,s}	159,072 ± 2,637 ^{a,r}	126,505 ± 6,242 ^{c,s}
F0 (0,3/0,3)	157,381 ± 1,697 ^{a,r,s}	162,112 ± 2,906 ^{a,r}	139,952 ± 2,908 ^{b,r,s}

Relativamente a $Y_{(NPQ)}$, apenas foram verificadas diferenças significativas em F0 (0,3/0,3) no 22º dia após a germinação (figura 4.76; tabela 4.60). Adicionalmente, o controlo apresentou um decréscimo de $Y_{(NPQ)}$ ao longo dos ensaios experimentais, sendo no 102º dia, estatisticamente inferior dos demais tratamentos. Esta tendência sugere que ao longo do ciclo de vida da planta, F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) mantiveram o nível de requerimento de energia para o desenvolvimento da planta, enquanto o tratamento controlo careceu de menor quantidade de energia, sugerindo um rendimento superior. Contudo, o rendimento quântico do fotossistema II, não apresentou variações apreciáveis face ao acréscimo da carga nutricional na solução nutritiva entre F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5). Acresce ainda que apenas na fase de enchimento do grão (102 dias após a germinação), se verificou um maior consumo de energia da planta para produção de fotoassimilados, traduzindo-se em diferenças significativas entre os tratamentos.

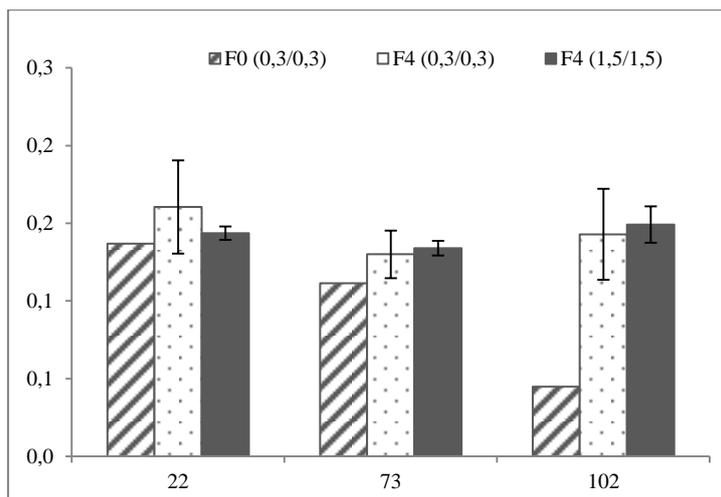


Figura 4.76 - Y(NPQ) dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.60 - Média de Y(NPQ), respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de Y(NPQ) em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r*, *s* revelam diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Treatment	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,144 ± 0,004 ^{a,r}	0,134 ± 0,005 ^{a,r}	0,149 ± 0,012 ^{a,r}
F4 (0,3/0,3)	0,161 ± 0,030 ^{a,r}	0,130 ± 0,015 ^{a,r}	0,143 ± 0,029 ^{a,r}
F0 (0,3/0,3)	0,137 ± 0,003 ^{a,r}	0,111 ± 0,008 ^{a,b,r}	0,045 ± 0,020 ^{b,s}

O rendimento quântico associado à dissipação de energia sob a forma de calor e fluorescência ($Y_{(NO)}$) variou de forma significativa, em todos os tratamentos, tendo sido no 102º dia após a germinação, o período em que o rendimento quântico foi mais elevado (tratamento F0 (0,3/0,3)) (figura 4.77; tabela 4.61). Paralelamente, nesse período experimental, F4 (1,5/1,5) obteve o valor mais baixo. Verificou-se assim uma correlação entre o acréscimo de nutrientes na solução nutritiva das plantas e a minimização do rendimento energético sob a forma de fluorescência e / ou relaxação térmica.

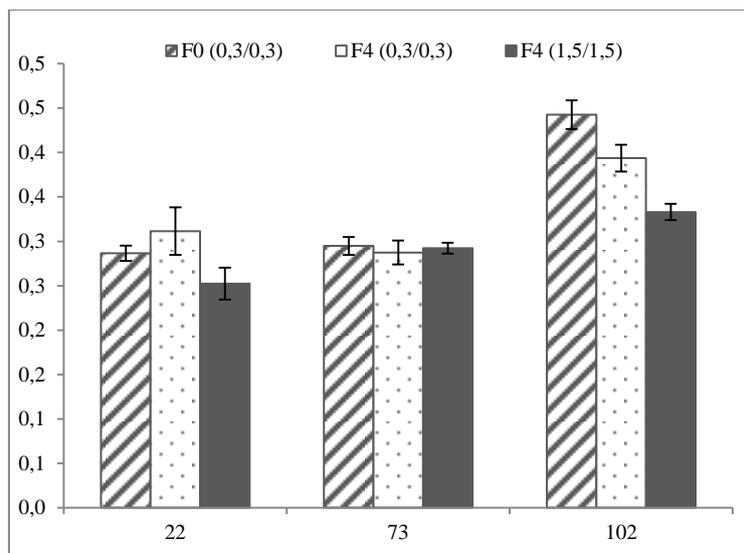


Figura 4.77 - Y(NO) dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.61 - Média de Y(NO), respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de Y(NO) em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a, b*, correspondem às diferenças estatísticas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r, s* indicam as diferenças estatísticas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,252 ± 0,018 ^{b,r}	0,292 ± 0,006 ^{a,b,r}	0,333 ± 0,009 ^{a,s}
F4 (0,3/0,3)	0,311 ± 0,027 ^{b,r}	0,287 ± 0,013 ^{b,r}	0,394 ± 0,015 ^{a,r,s}
F0 (0,3/0,3)	0,287 ± 0,009 ^{b,r}	0,295 ± 0,010 ^{b,r}	0,443 ± 0,016 ^{a,r}

Considerando o *quenching* não fotoquímico relativo ao estado excitado da clorofila *a* (NPQ), ao longo dos diferentes períodos experimentais, apenas em F0 (0,3/0,3), ocorreram valores significativamente diferentes e superiores, no 22º dia após germinação (figura 4.78; tabela 4.62). Adicionalmente, em cada período experimental, apenas ocorreram valores significativamente mais baixos, também no tratamento controlo, no 102º dia após a germinação (figura 4.78; tabela 4.62).

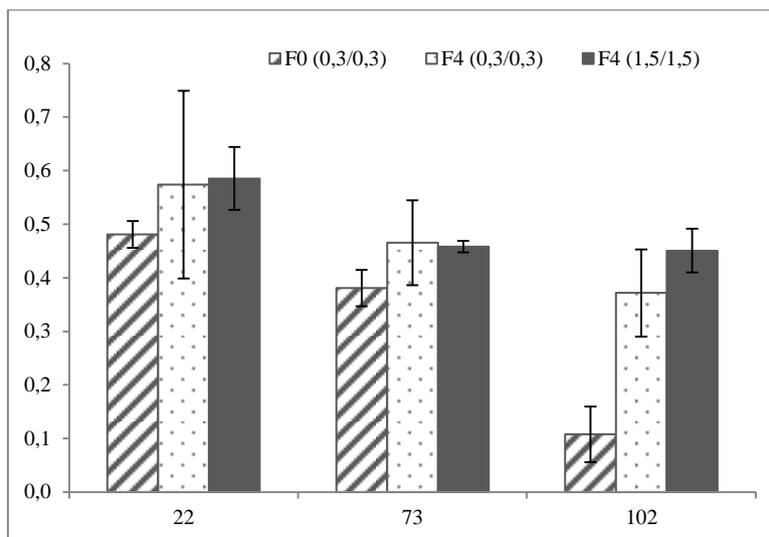


Figura 4.78 - NPQ dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.62 - Média de NPQ, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de NPQ em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a, b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e as letras *r, s* indicam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,585 ± 0,059 ^{a,r}	0,458 ± 0,011 ^{a,r}	0,451 ± 0,041 ^{a,r}
F4 (0,3/0,3)	0,574 ± 0,175 ^{a,r}	0,466 ± 0,079 ^{a,r}	0,372 ± 0,081 ^{a,r,s}
F0 (0,3/0,3)	0,481 ± 0,025 ^{a,r}	0,381 ± 0,034 ^{a,b,r}	0,108 ± 0,052 ^{b,s}

Relativamente à proporção de energia capturada e canalizada para os eventos fotoquímicos (acoplada ou não ao fotossistema II), ao longo dos períodos experimentais, verificou-se que q_p não variou significativamente, enquanto valores máximos significativos foram detectados em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), 73 e 22 dias após germinação, respectivamente. Contudo, em cada período experimental não se detectaram variações significativas entre os tratamentos (figura 4.79; tabela 4.63).

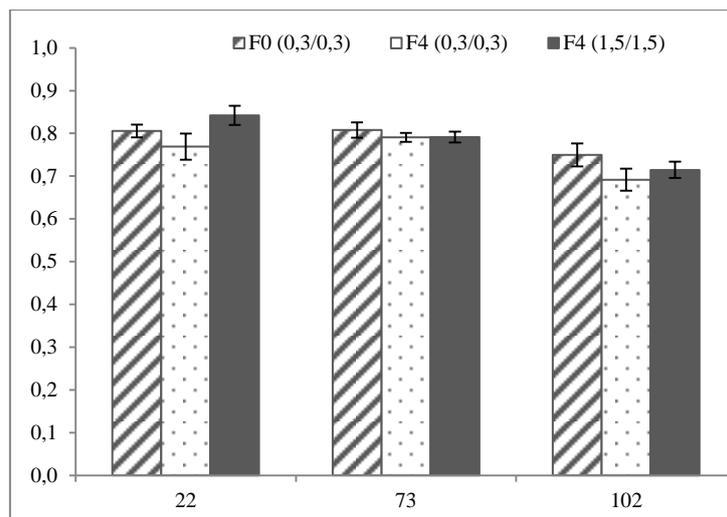


Figura 4.79 - q_p dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.63 - Média de q_p , respectivo erro padrão ($n=4$) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de q_p em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças significativas entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra *r* indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,842 ± 0,022 ^{a,r}	0,792 ± 0,012 ^{a,b,r}	0,715 ± 0,019 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	0,769 ± 0,031 ^{a,b,r}	0,791 ± 0,010 ^{a,r}	0,692 ± 0,026 ^{b,r}
F0 (0,3/0,3)	0,806 ± 0,015 ^{a,r}	0,808 ± 0,018 ^{a,r}	0,750 ± 0,027 ^{a,r}

Relativamente a q_L F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) não variaram significativamente, enquanto F4 (1,5/1,5) revelou uma tendência similar a q_p (figura 4.80; tabela 4.64).

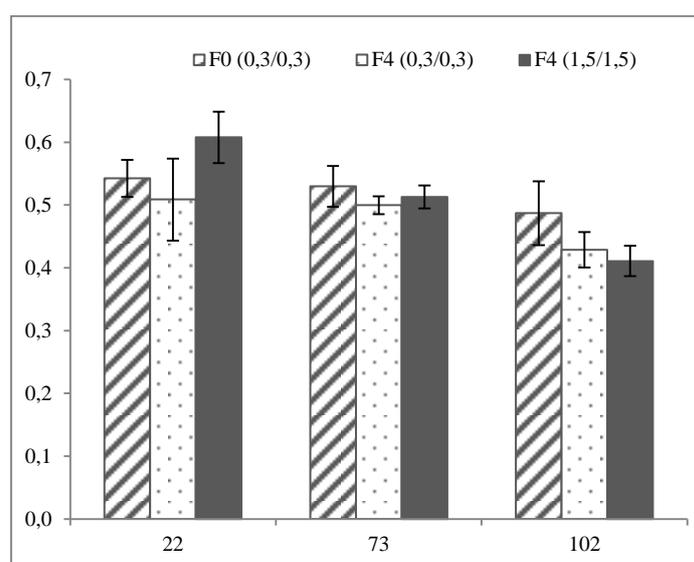


Figura 4.80 - q_L dos diferentes tratamentos, 22, 73 e 102 dias após a germinação, e respectivo erro padrão para cada concentração e dia de ensaio.

Tabela 4.64 - Média de qL, respectivo erro padrão (n=4) e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) de qL em função da carga nutricional e do ciclo de vida das plantas (dias após germinação). As letras *a*, *b*, correspondem às diferenças entre os períodos experimentais de cada tratamento e a letra *r* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período experimental.

Tratamento	22 dias	73 dias	102 dias
F4 (1,5/1,5)	0,608 ± 0,041 ^{a,r}	0,513 ± 0,018 ^{a,b,r}	0,411 ± 0,024 ^{b,r}
F4 (0,3/0,3)	0,509 ± 0,065 ^{a,r}	0,499 ± 0,014 ^{a,r}	0,429 ± 0,028 ^{a,r}
F0 (0,3/0,3)	0,542 ± 0,029 ^{a,r}	0,529 ± 0,033 ^{a,r}	0,487 ± 0,051 ^{a,r}

4.1.6. Composição do grão

4.1.6.1. Localização de elementos minerais

A caracterização do grão, com recurso a microscopia electrónica de varrimento acoplada a uma sonda de raios X permitiu constatar que existe uma acumulação preferencial do Zn e restantes microelementos, no aleurona e embrião (figura 4.81 e 4.82). Embora os macroelementos tenham apresentado a mesma tendência, verificou-se também alguma incidência no endosperma, sendo aparentemente maior no tratamento de maior carga nutricional em particular em (F4 (1,5/1,5)) (figura 4.81. e 4.83).

Relativamente aos macronutrientes, verificou-se que o Mg é o macroelemento de menor fracção mássica (figura 4.84), independentemente do local em análise, sendo ligeiramente inferior no endosperma. Acresce ainda que esta diminuição de acumulação do Mg no endosperma é mais evidente no tratamento de maior carga nutricional, sugerindo uma maior inibição de acumulação de Mg, provavelmente devido a um efeito antagónico entre alguns elementos metálicos e o Mg, conforme discutido no capítulo anterior. Note-se que houve um acréscimo de acumulação de Ca, Fe, Mn e Cu, em F4 (1,5/1,5), no endosperma. Por outro lado, na região terminal do grão, oposta ao embrião, denotou-se um aumento de incidência do Mg, ao mesmo tempo que se verificou um decréscimo de Fe, Ca e Cu (figura 4.83). Adicionalmente, os grãos provenientes do tratamento com maior aporte nutricional (F4 (1,5/1,5)) apresentaram um incremento na acumulação dos microelementos, de forma preferencial na extremidade do grão, comparativamente aos grãos do tratamento controlo, em particular do Zn, Fe, Mn e Cu (figura 4.82 e 4.83). Em contrapartida, verificou-se um decréscimo nos teores dos macroelementos.

Verificou-se ainda, que o P teve uma acumulação constante e proporcional em toda a semente, no tratamento controlo, tal como o K, porém com menor incidência no embrião, e maior incidência no endosperma, embora de forma pouco significativa. Por outro lado, em F4 (1,5/1,5) verificou-se uma tendência decrescente ao longo do grão, (do embrião para a extremidade apical), relativamente à acumulação do P, revelando uma acumulação preferencial no embrião.

Acresce ainda que foi detectada uma maior incidência de Zn no endosperma, face aos demais elementos analisados, no tratamento controlo, juntamente com a menor incidência de Zn no embrião. Contudo, em F4 (1,5/1,5) verificou-se uma acentuada acumulação de micronutrientes na região apical terminal da semente, com maior concentração de Zn que em F0 (0,3/0,3), assim como a menor incidência de Zn face aos demais elementos minerais, no embrião, sugerindo que a farinha obtida a partir dos grãos provenientes do tratamento F4 (1,5/1,5), poderá apresentar menores perdas nutricionais de Zn no processo de refinação da farinha (figura 4.84).

Por outro lado, a fracção mássica de Fe no endosperma dos grãos obtidos com maior aporte nutricional, é significativamente elevada, aproximando os conteúdos de Zn e Fe, tornando a interacção de absorção dos dois elementos minerais, maior, o que não facilita a acumulação de Zn pelo organismo, e poderá tornar a farinha proveniente deste tratamentos, com pouco valor nutricional para o organismo humano.

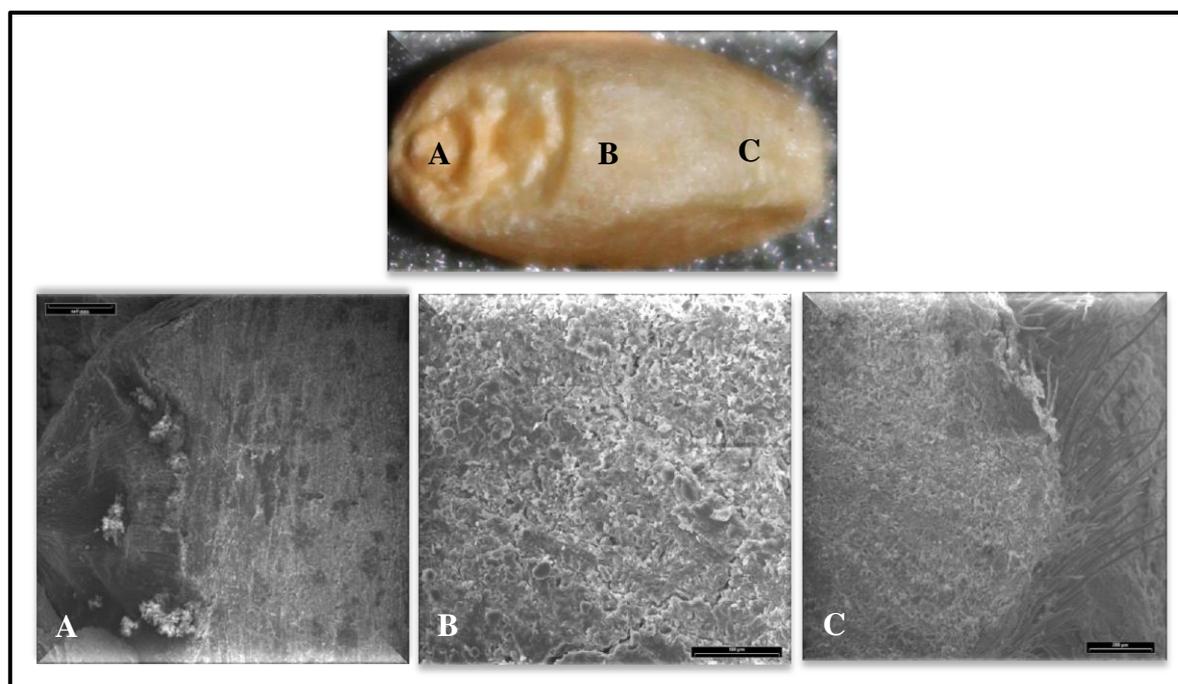


Figura 4.81 - Descrição dos componentes principais do grão: embrião (A), endosperma (B) e região apical terminal (C), através de microscopia electrónica de varrimento.

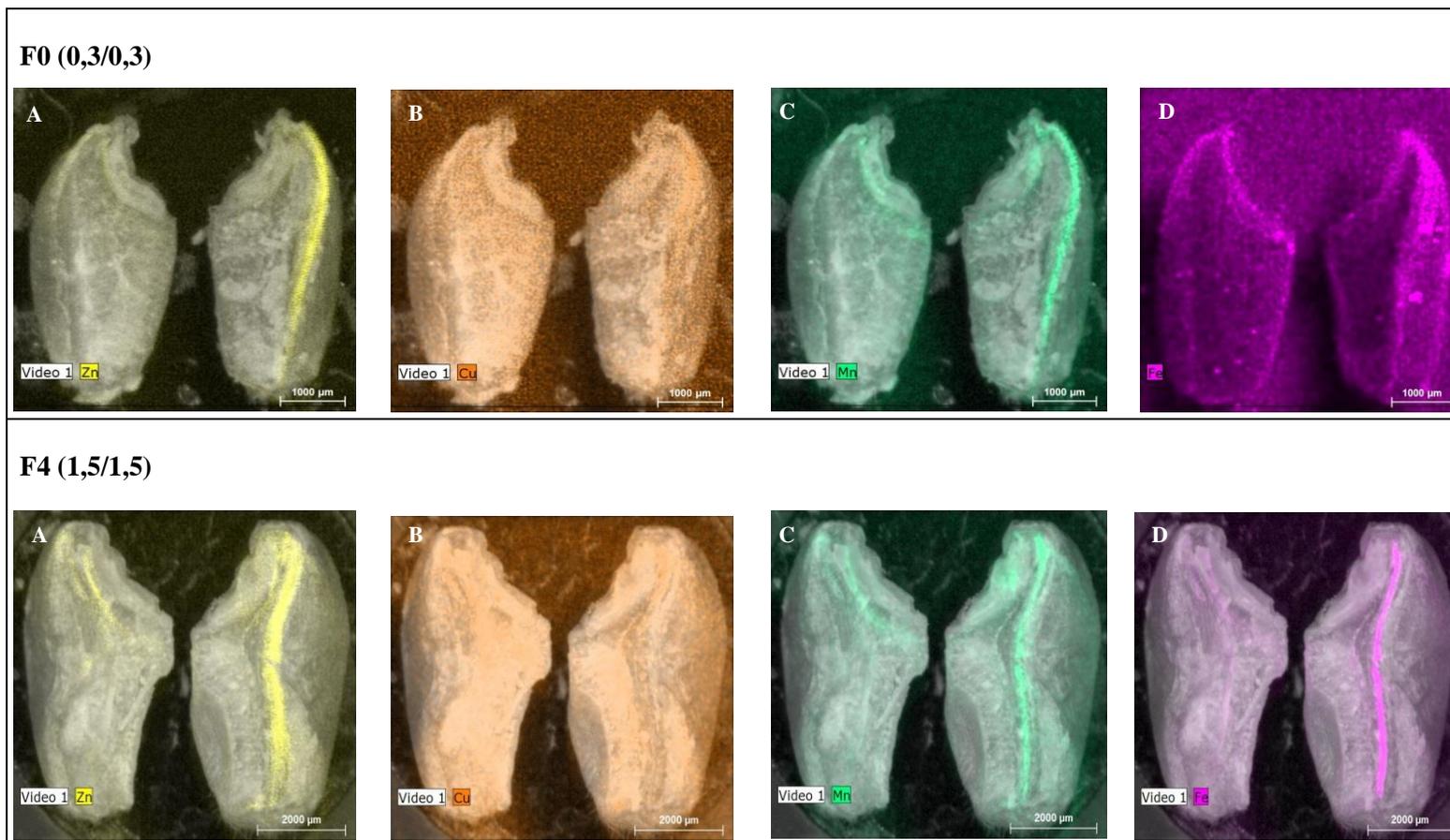
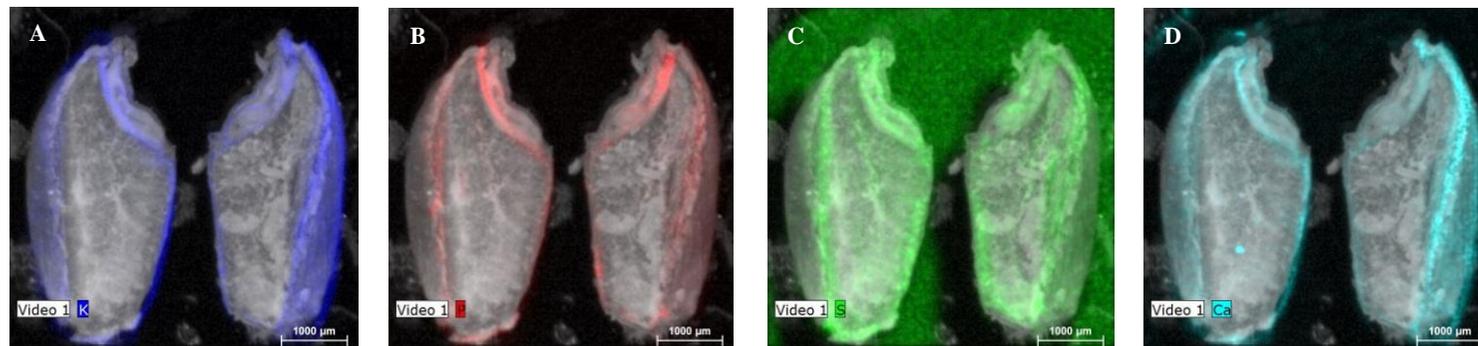


Figura 4.82 – Localização, com recurso a fluorescência de raios X (sistema μ -EDXRF), da acumulação dos micronutrientes na semente, no tratamento controlo (F0 (0,3/0,3) e tratamento de maior concentração de nutrientes na solução nutritiva (F4 (1,5/1,5): A – Zn; B – Cu; C – Mn; D - Fe.

F0 (0,3/0,3)



F4 (1,5/1,5)

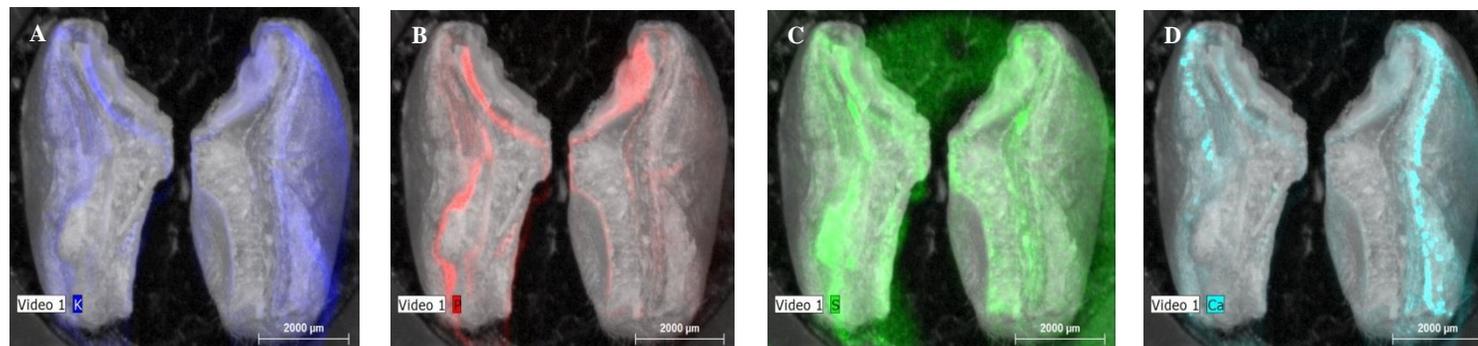


Figura 4.83 - Localização, com recurso a fluorescência de raios X (sistema μ -EDXRF), da acumulação dos macronutrientes na semente, no tratamento controlo (F0 (0,3/0,3)) e tratamento de maior concentração de nutrientes na solução nutritiva (F4 (1,5/1,5)): A – K; B – P; C – S; D – Ca.

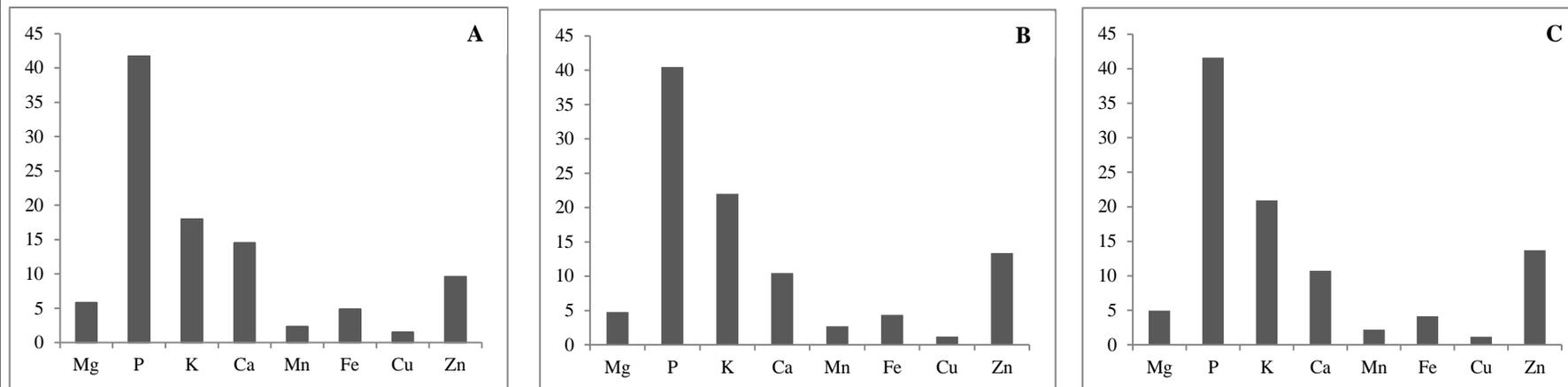
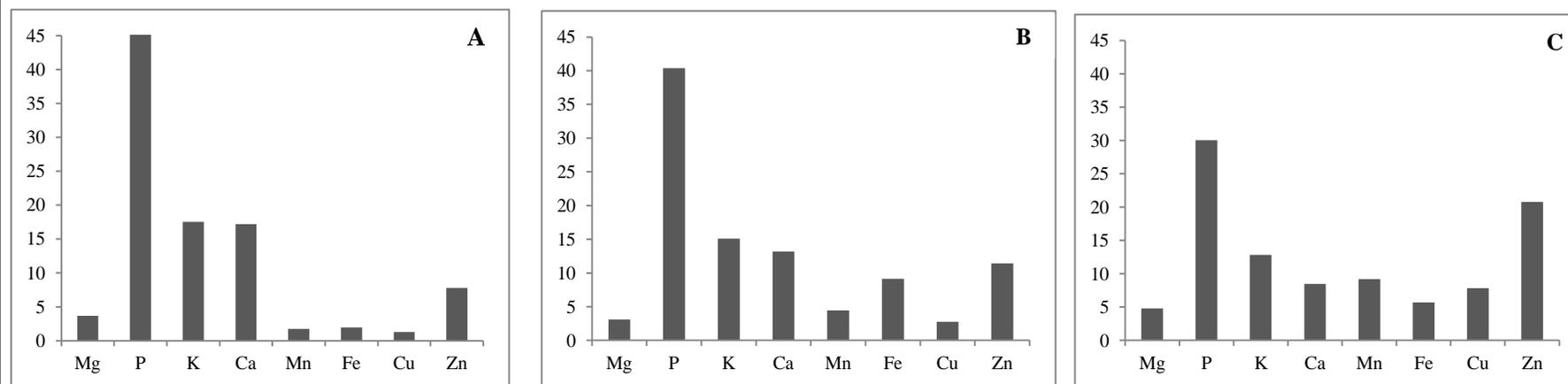
F0 (0,3/0,3)**F4 (1,5/1,5)**

Figura 4.84 - Fração mássica (W%) referente aos elementos considerados, com recurso a microscopia electrónica de varrimento acoplada a microanálise de raios X, nomeadamente Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn, sendo o somatório de 100%, no embrião (A), endosperma (B) e extremidade (C) do grão.

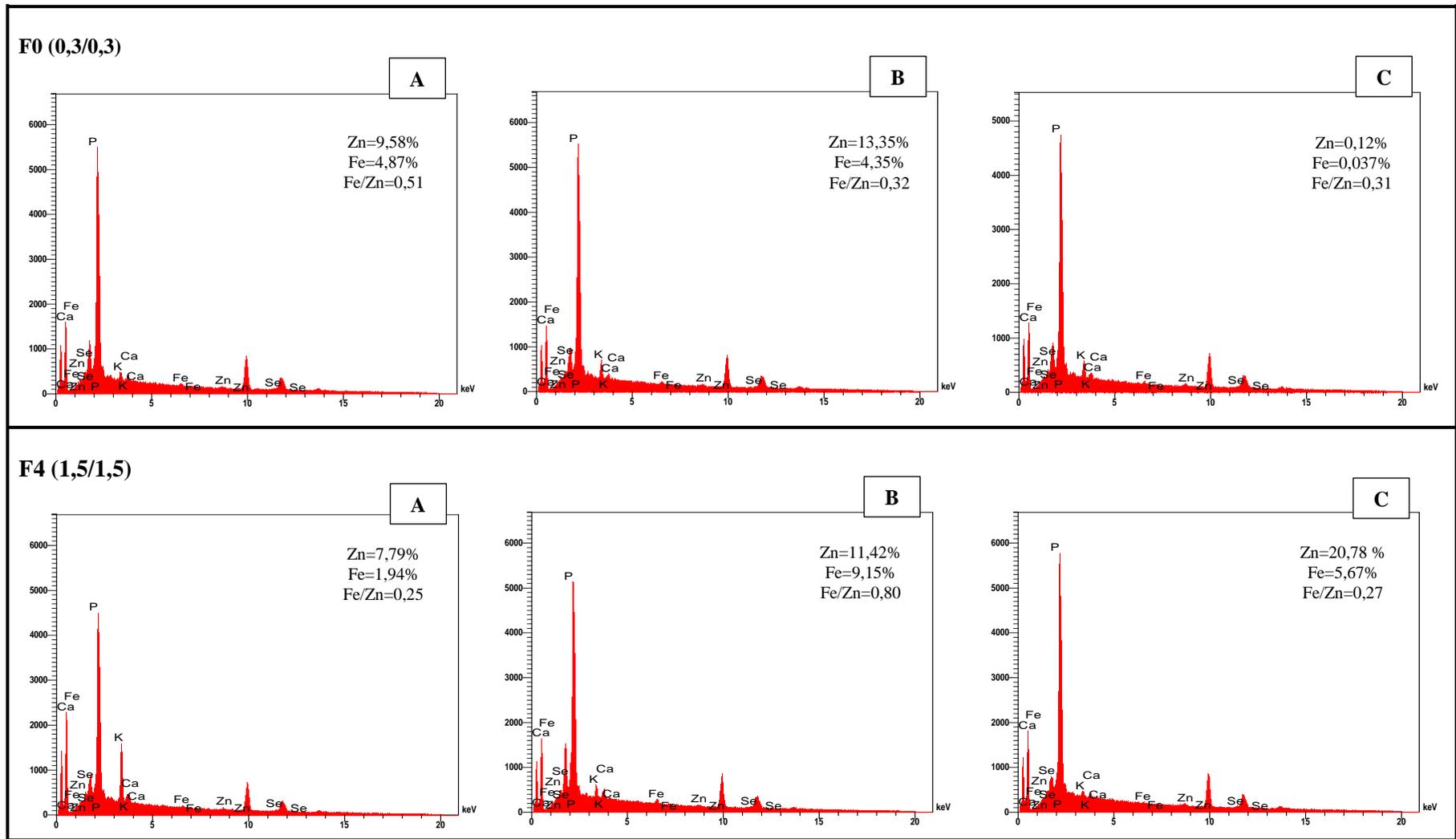


Figura 4.85 - Microscopia electrónica de varrido acoplada a microanálise de raios X e localização de elementos minerais na semente, particularmente no embrião (A), endosperma (B) e região apical terminal (C) para os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5).

4.1.6.2. Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos

Reconhece-se desde há muito que alguns dos elementos metálicos determinados no ensaio têm intervenção na síntese de nutrientes, como glúcidos, proteínas e lípidos (Marschner, 1995; Bergmann, 1992). No caso do Mg, por exemplo, a sua activa participação no processo fotossintético, torna este mineral essencial ao metabolismo da planta e, assim, se o mesmo apresentar reduções drásticas no sistema biológico da planta, a produção de fotoassimilados é igualmente reduzida (Bergmann, 1992). Acresce ainda que o Mn também tem, como já foi referido, um papel relevante na síntese de lípidos uma vez que contribui para a manutenção e estabilidade das membranas dos tilacóides (Marschner, 1995).

O teor total de lípidos presente nos grãos provenientes do tratamento F4 (1,5/1,5), comparativamente aos restantes tratamentos, apresentou um valor significativamente mais elevado (figura 4.86), sendo este tratamento, aquele que possuiu também maior teor de Mn nos grãos, sugerindo assim uma relação directa dos nutrientes, conforme é apontado na literatura (Bergmann, 1992; Marschner, 1995). Além disso, o conteúdo de lípidos e outros nutrientes é também dependente da taxa fotossintética (Marschner, 1995) e nesse sentido, também o teor de lípidos totais é proporcional à taxa fotossintética líquida, tendo o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentado os maiores valores em ambos os casos.

Os ácidos gordos também representam uma importante fracção dos grãos de cereais (3-4%), estando presentes no endosperma das sementes, principalmente como lípidos membranares e de armazenamento (Lidon *et al.*, 2015). Na composição dos ácidos gordos no trigo prevalecem os ácidos linoleico, oleico e palmítico, em proporções mássicas de 50-54%, 25-26% e 14-17%, respectivamente (Hidalgo e Brandolini, 2014). As amostras obtidas continham valores de ácido linoleico superiores aos referidos na literatura, entre 60 - 61,5%, embora o ácido oleico apresentasse valores inferiores (12-14%). Os teores de ácido palmítico foram semelhantes aos referidos anteriormente, entre 18 e 19%. No entanto, o grão de *Triticum aestivum* possui o ácido palmítico em maior abundância que o ácido oleico (Hidalgo e Brandolini, 2014), corroborando os dados obtidos. As diferenças significativas ($P \leq 0,05$) verificadas entre os tratamentos, quanto ao teor total de lípidos, foram igualmente detectadas nalguns dos ácidos gordos essenciais presentes nas amostras, nomeadamente no teor de ácido linoleico, onde o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou valores significativamente superiores (figura 4.87), aspecto que aponta para uma maior qualidade nutricional.

Os valores mínimos de ácido linolénico foram observados em F4 (0,3/0,3), não sendo contudo significativamente diferente ($P \leq 0,05$) dos verificados em F4 (1,5/1,5).

Adicionalmente, o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou um teor mais elevado de ácido pentadecanóico (C15:0) e ácido gadolínico (C20:1), não sendo estatisticamente diferente ($P \leq 0,05$) do tratamento F4 (0,3/0,3), neste último ácido (figura 4.85). Da mesma forma F4 (0,3/0,3) apresentou um teor de ácido eicasanóico (C20:0) significativamente inferior.

À exceção do ácido palmítico (C16:0), em que todos os tratamentos são significativamente diferentes, os restantes ácidos gordos analisados não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 4.87). Neste enquadramento, o tratamento F4 (1,5/1,5) aparenta ser o mais rico nutricionalmente.

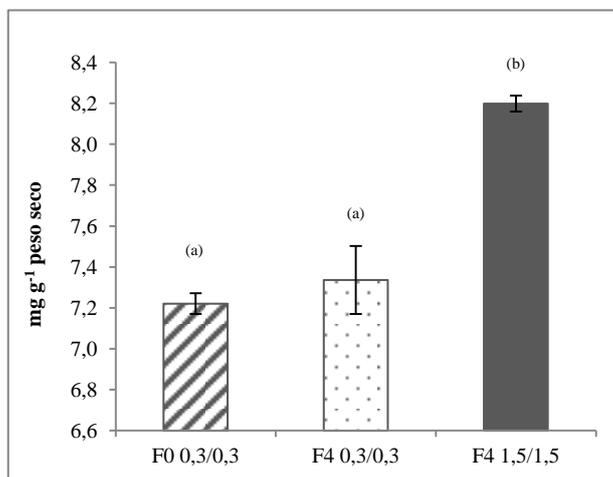


Figura 4.86 - Teor total de lípidos (mg g⁻¹m.s.) (média e erro padrão, n=3), nos grãos em cada tratamento. As letras *a* e *b* representam diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos.

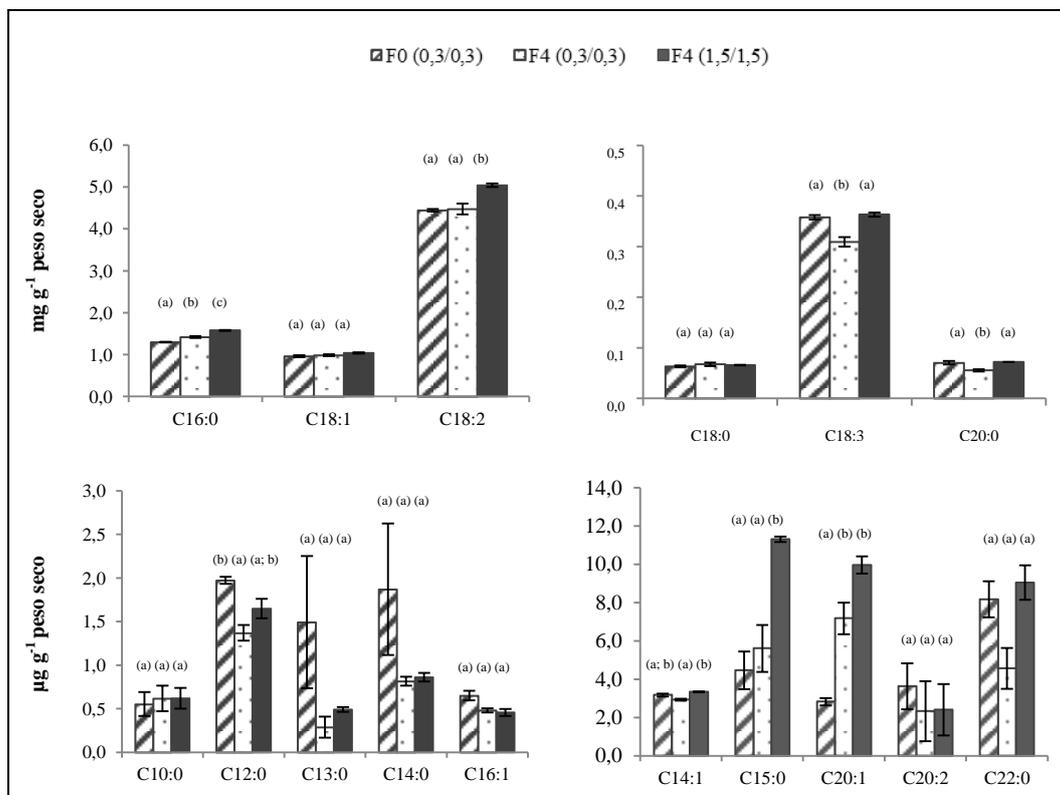


Figura 4.87 - Teor de ácidos gordos (C16:0, C18:1, C18:2, C18:0, C18:3, C20:0, C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C16:1, C14:1, C15:0, C20:1, C20:2, C22:0) (média e erro padrão; n=3) nos grãos de cada tratamento. As letras *a* e *b* representam diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos.

4.1.6.3. Glúcidos

Existem alguns elementos metálicos com papel participativo e interveniente na formação de glúcidos nos tecidos das plantas e órgãos reprodutores, como o Mg, Mn e o K (Bergmann, 1992; Marschner, 1995). O K participa na síntese e acumulação de produtos resultantes da fotossíntese, uma vez que influencia as reacções enzimáticas envolvidas no processo (Bergmann, 1992). Dessa forma, reduzidas quantidades de K nas células, levam a uma diminuição da actividade enzimática envolvida na síntese de polímeros de elevado peso molecular, como o amido, hemicelulose e celulose (Marschner, 1995; Bergmann, 1992). Neste sentido, tem-se verificado que cereais com baixos níveis de K tendem a apresentar pequenas reservas de glúcidos (Bergmann, 1992).

Embora não se verifiquem diferenças significativas entre os tratamentos, nos diferentes açúcares analisados, à excepção da frutose, onde F0 (0,3/0,3) apresentou o teor mais elevado, verificou-se, em quase todos os açúcares, uma tendência para a ocorrência de valores mais elevados em F4 (1,5/1,5). Apenas na glucose, frutose e manitose se observou um decréscimo em F4 (1,5/1,5), apresentando F0 (0,3/0,3) valores mais elevados na frutose e manitose (figura 4.88). Os teores mais elevados de glucose no tratamento F4 (0,3/0,3) poderão correlacionar-se com o teor de K, verificado nos grãos provenientes deste tratamento. O mesmo efeito foi verificado nos valores de galactose e sacarose. Adicionalmente, o menor teor de glúcidos simples, detectado em F0 (0,3/0,3), assim como o maior valor de K obtido nos grãos deste tratamento, não apontam para uma deficiência do mineral no tratamento controlo. Por outro lado, a presença de açúcares redutores é um factor interessante para a utilização da farinha em produtos de padaria e fabrico de pão, uma vez que estes açúcares são responsáveis por atribuírem cor e sabor aos géneros alimentícios, devido à sua interacção com os aminoácidos durante a reacção de Maillard (Hidalgo e Brandolini, 2014). Além disso, a presença de açúcares favorece o amolecimento do pão e preservação da humidade (Trinh *et al.*, 2015). Neste enquadramento, os açúcares redutores (frutose e glucose) com importante função na reacção de Maillard apresentaram concentrações reduzidas, contrariamente à sacarose ou mesmo rafinose. Os resultados obtidos são parcialmente concordantes com os de Hidalgo e Brandolini (2014), os quais encontraram teores de açúcares redutores de $1,2 \text{ g kg}^{-1}$, embora os teores de sacarose tenham sido claramente superiores ($5,6 \text{ g kg}^{-1}$) aos obtidos no presente estudo. Estes dados sugerem que o incremento nutricional fornecido às plantas não contribuiu de forma significativa para o incremento deste nutriente nas amostras.

Adicionalmente, os níveis de glúcidos solúveis encontrados nas amostras, encontram-se dentro do intervalo de valores evidenciado para os grãos de *Triticum aestivum*, entre $16,9 - 32,9 \text{ g kg}^{-1}$ (Hidalgo e Brandolini, 2014), sugerindo uma vez mais, que o teor de glúcidos das amostras não apresentou um incremento significativo, face a amostras não biofortificadas. Por outro lado, Verspreet e colaboradores (2013) encontraram teores de 0,04% de glucose e fructose, em grãos maduros de

Triticum aestivum L.. Estas diferenças podem ser condicionadas pelas condições climáticas e/ou características do solo (Gao *et al.*, 2012).

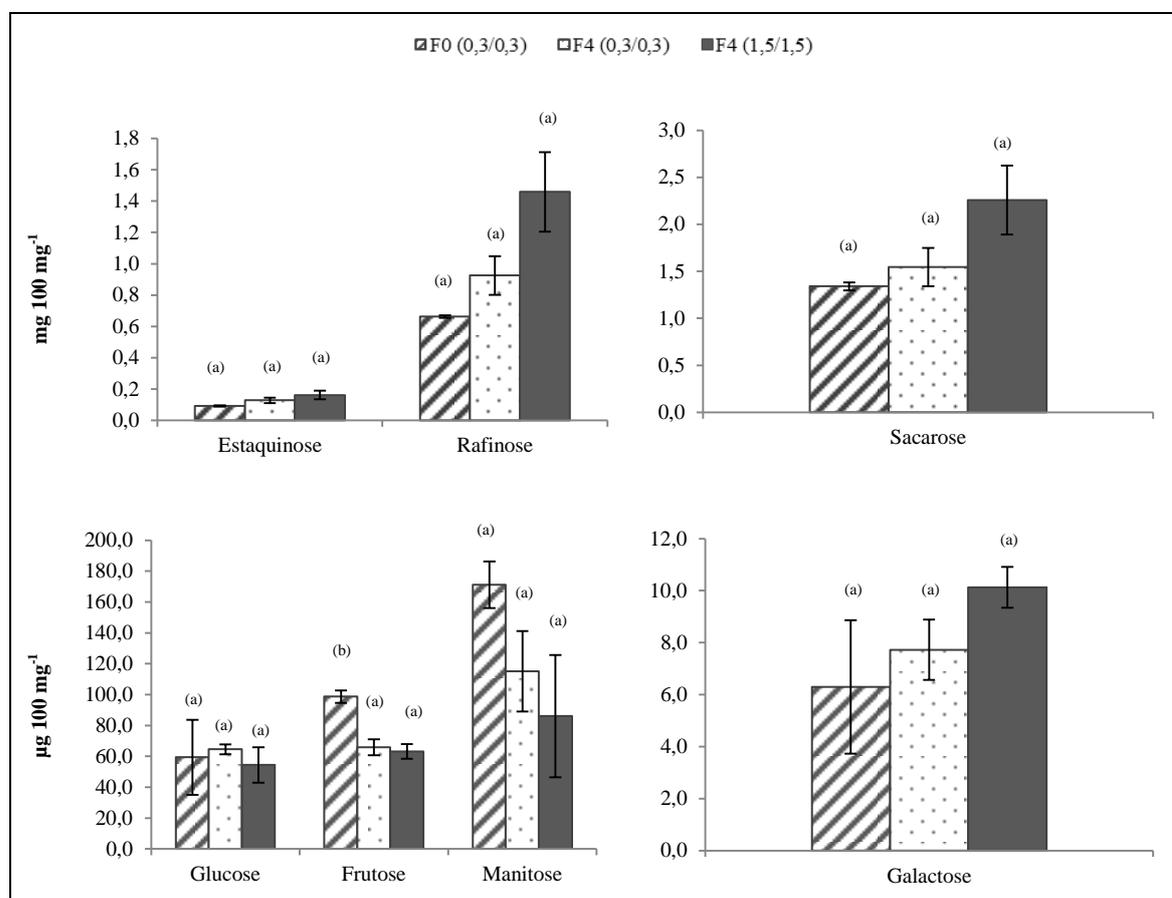


Figura 4.88 - Teor de açúcares (Estaquinose, Rafinose, Sacarose, Glucose, Frutose, Manitose e Galactose) (média e erro padrão; n=3) nos grãos, nos diferentes tratamentos. As letras *a* e *b* representam diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos, relativamente ao teor de açúcares.

4.1.6.4. Proteínas

A concentração proteica e a sua composição são factores críticos para a qualidade da massa destinada ao fabrico de pão e produtos de padaria (Gao *et al.*, 2012). A presença de proteínas do glúten torna a farinha de trigo apropriada à panificação, uma vez que a rede proteica do glúten permite a retenção do CO₂ produzido na fermentação das massas (Scheuer *et al.*, 2011).

Tal como nos glícidos, também a síntese de proteínas conta com a participação específica de alguns elementos minerais, como o Mg, Zn, Mn, N, S e K (Marschner, 1995; White e Broadley, 2009). Contrariamente ao descrito na fracção lipídica, o teor de proteínas nos grãos é negativamente relacionado com o conteúdo de Mn nas folhas, como resultado de uma inibição do rendimento do grão, sob condições de deficiência do mineral (Marschner, 1995). O tratamento F4 (1,5/1,5)

apresentou o teor proteico mais elevado (figura 4.89), embora as diferenças entre os tratamentos sejam ténues.

O teor proteico é altamente dependente do teor de N fornecido à planta, uma vez que cerca de 17% da composição das proteínas são compostos azotados (Gao *et al.*, 2012). Assim, a taxa de absorção e translocação do N, a eficiência de utilização do N, o tempo e método de aplicação, tal como o equilíbrio entre a necessidade de fornecimento e a capacidade de resposta da planta, são factores determinantes na concentração de proteínas (Gao *et al.*, 2012). Se o N estiver disponível à planta numa fase inicial do seu crescimento, o mineral tende a estimular o desenvolvimento vegetativo e incrementar o rendimento da planta, enquanto uma aplicação mais tardia tem um efeito menor no rendimento mas favorece a concentração de proteínas (Gao *et al.*, 2012). Embora o fornecimento de nutrientes às plantas, no nosso ensaio experimental, tenha sido efectuado de modo constante ao longo do ciclo vegetativo, os resultados obtidos corroboram as conclusões de Gao *et al.* (2012), visto que o teor de proteína foi menor no tratamento com maior rendimento de grão, F4 (0,3/0,3) (figura 4.89). Esses autores detectaram ainda concentrações de proteína em grãos de *Triticum aestivum* L., entre 123 - 167 g kg⁻¹.

Os resultados obtidos, apresentam um significativo incremento deste nutriente nos grãos, e por sua vez na farinha, relativamente aos grãos de trigo tradicionais, os quais apresentam teores de proteínas em torno dos 11% (Gao *et al.*, 2012). Adicionalmente, o K também desempenha um papel importante na síntese de proteínas, uma vez que contribui para a acumulação de compostos azotados, como os aminoácidos, potenciando assim a incorporação desses compostos na facção proteica (Marschner, 1995). Por sua vez, o Mg também possui um papel activo na síntese de proteínas, onde aproximadamente 75% do Mg das folhas está associado à síntese proteica, sua estrutura e função ribossomal (White e Broadley, 2009). De igual modo, o S como constituinte dos aminoácidos sulfurados, (cisteína e metionina), e por sua vez, das proteínas, é um constituinte estrutural desses compostos, actuando como grupo funcional, directamente envolvido em reacções metabólicas, o que significa que plantas com deficiência em S, têm um decréscimo na síntese de proteínas (Marschner, 1995). Contudo, o trigo apresenta menor susceptibilidade de decréscimo em proteínas sulfuradas quando submetido a condições deficientes de S, comparativamente a outros cereais (Marschner, 1995). Este efeito na composição de aminoácidos, causado por uma deficiência em S, pode condicionar a qualidade nutricional do alimento, sendo a metionina um aminoácido essencial ao organismo humano (Marschner, 1995). Contudo, o teor proteico poderá apresentar uma proporcionalidade inversa ao teor de Zn, uma vez que este mineral cria fortes ligações com a cisteína e outros aminoácidos contendo enxofre, condicionando assim a polimerização das proteínas (Peck *et al.*, 2008). Adicionalmente, o Zn cria ligações com proteínas solúveis de baixo peso molecular, dificultando a disponibilidade desses nutrientes nos sistemas biológicos (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Acresce ainda que o Zn possui um papel essencial no metabolismo das plantas, sendo um componente importante no sistema enzimático, incluindo na actividade de proteinases e peptidases (Kabata-Pendias e Pendias, 1992).

Assim, o baixo teor de Zn em F4 (1,5/1,5) poderá ter favorecido o elevado teor proteico que se verificou neste tratamento (figura 4.89). Da mesma forma F4 (0,3/0,3) possuiu o menor teor proteico, situação que eventualmente poderá decorrer do acréscimo do teor de Zn deste tratamento.

Acresce ainda que, o teor proteico obtido nas amostras, em qualquer dos tratamentos, foi superior aos valores obtidos por Hidalgo e Brandolini (2014), os quais obtiveram teores médios de 18%, em *Triticum monocuccum*, espécie tradicionalmente com teor proteico superior ao *Triticum aestivum* ou *Triticum durum*, sugerindo um incremento qualitativo nas amostras do presente estudo. Adicionalmente, Gutkoski e colaboradores (2008) detectaram maior teor de proteína em *Triticum aestivum* L., quanto maior a percentagem de extracção da farinha, nomeadamente 11,42 % de proteínas para 61,85 % de extracção e 12,67 % de proteína para 66,23 % de extracção da farinha. Nota-se contudo, que o teor de proteínas encontrado pelos autores é também influenciado pelo genótipo.

Neste enquadramento, o teor de proteína verificado nas amostras é também reflexo do elevado grau de extracção da farinha (100 %).

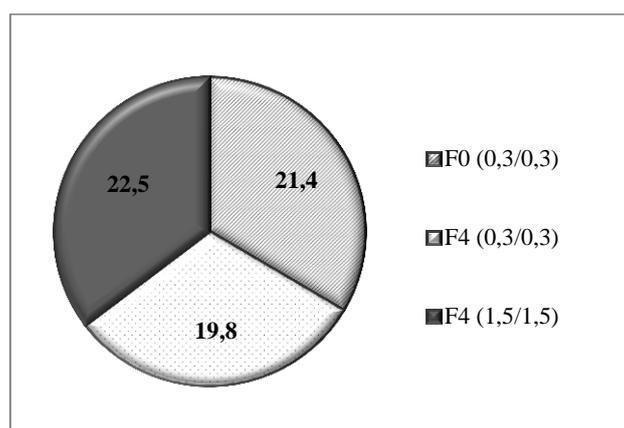


Figura 4.89 - Teor de proteína (g 100g⁻¹) nos grãos maduros, nos diferentes tratamentos.

4.1.7. Características tecnológicas

4.1.7.1. Índice de SDS

A qualidade de uma farinha para panificação é avaliada através de ensaios físicos químicos e reológicos (Noreto *et al.*, 2009). A capacidade de extensão da massa é fortemente dependente do tipo de proteínas existentes nas amostras, estando a concentração deste nutriente relacionada proporcionalmente com o aumento da concentração de Zn, o qual tem acumulação preferencial nas gluteninas, como resultado da sua interacção com os resíduos de cisteína (Peck *et al.*, 2008). Por outro lado, o aumento da concentração de Zn no grão aparenta favorecer uma diminuição de gliadina, aumentando a glutenina, sugerindo um melhoramento na força das massas (Peck *et al.*, 2008). Dessa

forma, a maior capacidade de extensão da massa de F0 (0,3/0,3) sugere que este tratamento, embora não possua o maior teor proteico, possa apresentar uma maior concentração de gluteninas na sua fracção proteica, podendo dever-se ao seu elevado teor de Zn. Por outro lado, embora F4 (0,3/0,3) tenha apresentado o maior teor de Zn entre os tratamentos (figura 4.90; tabela 4.65), apresentou o menor teor proteico, podendo eventualmente este último estar associado ao menor teor de S verificado nos grãos provenientes deste tratamento.

Adicionalmente, uma diminuição do teor de cisteína nos grãos de trigo, causada por uma diminuição do teor de S, reduz a qualidade da farinha para panificação, uma vez que o dissulfito é responsável pela fracção de glutenina, durante a preparação da massa (Marschner, 1995). Dessa forma, verificou-se que o tratamento controlo apresentou um SDS significativamente maior, correspondendo ao maior teor de S verificado nos grãos. Acresce ainda que, a presença de açúcares pode influenciar negativamente a capacidade de extensão da massa, em particular se apresentar uma quantidade de açúcares superiores a 10% do peso seco da farinha, visto que os açúcares competem com o glúten pela disponibilidade de água e dessa forma enfraquecem a rede de glúten (Trinh *et al.*, 2015). Neste enquadramento, o tratamento controlo apresentou a maior capacidade de extensão da massa, sendo também o tratamento que deteve menor teor de açúcares, à excepção da manitose e frutose. De igual modo, o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou a menor capacidade de extensão da massa e simultaneamente o maior teor de açúcares, corroborando os dados descritos na literatura, e sugerindo que a quantidade de açúcares na massa deve ser controlada de modo a não condicionar as suas propriedades tecnológicas.

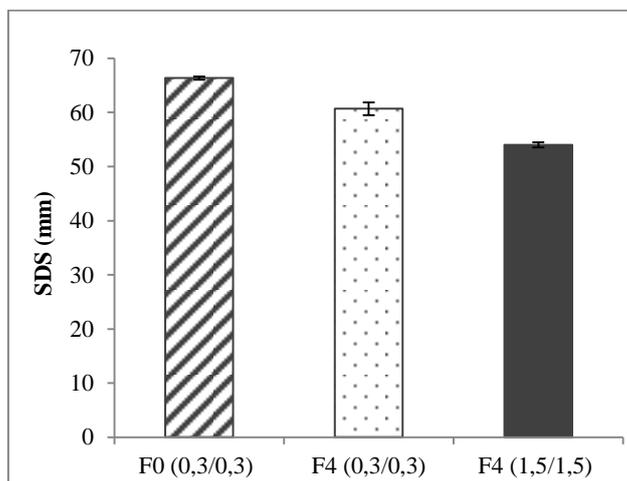


Figura 4.90 - Média da capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3).

Tabela 4.65 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* e *c* correspondem às diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
66 ± 0,272 ^a	61 ± 1,186 ^b	54 ± 0,471 ^c

4.1.7.2. Teor de cinzas

O teor de cinzas determina a quantidade de sais minerais presentes na farinha, fornecendo indicações da sua qualidade tecnológica. Tendo em conta o teor total de minerais presentes nos grãos, verificou-se que F4 (1,5/1,5) continha o valor mais elevado, correspondendo também ao maior teor de cinzas (figura 4.91). Considerando a acumulação de minerais nos grãos, a fracção de cinzas obtida, deve-se em grande parte ao elevado grau de extracção da farinha (farinha integral). Uma farinha com elevado teor de cinzas, sugere uma farinha com elevado grau de extracção, isto é, uma farinha pouco refinada, o que influencia também a respectiva cor. Da Costa e colaboradores (2008) encontraram teores de cinzas em grãos de *Triticum aestivum* provenientes de diferentes regiões, variando entre 1,64-2%, sugerindo que o incremento nutricional fornecido às plantas, acrescido do seu potencial genético para assimilação de Zn, manifestaram um efeito positivo na acumulação mineral, conforme se tinha verificado anteriormente.

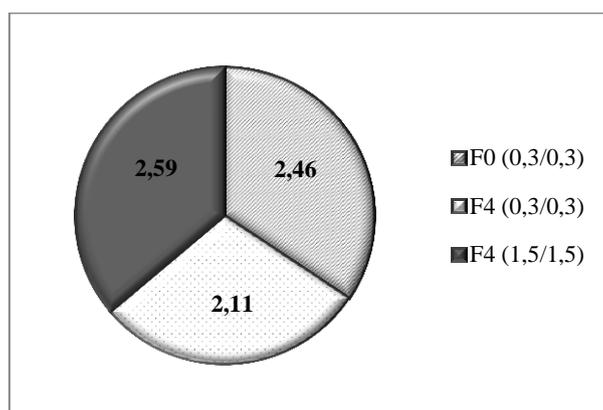


Figura 4.91 - Teor (%) de cinzas nos grãos, nos diferentes tratamentos.

4.1.7.3. Cor

Na análise de cor efectuada às farinhas, verificou-se que F4 (0,3/0,3) apresentou maior luminosidade, indicando assim que a farinha deste tratamento é mais clara que a farinha dos demais, (tabela 4.66), uma vez que os grãos maiores e mais pesados possuem uma maior proporção de endosperma e menor quantidade de aleurona e camadas externas (Hidalgo e Brandolini, 2014).

Adicionalmente, verificou-se uma maior contribuição do vermelho (+a*) em relação ao verde (-a*) na tonalidade das amostras, assim como uma maior contribuição do amarelo (+b*) em relação ao azul (-b*), parâmetros que poderão vir das camadas externas, como aleurona (tabela 4.66).

Contudo, Gutkoski e colaboradores (2008) verificaram uma redução do parâmetro b^* , ao longo do período de maturação dos grãos de *Triticum aestivum* L., encontrando valores entre 8 e 11, nos grãos maduros, indicando grãos menos amarelos que as amostras analisadas no presente estudo.

Tabela 4.66 - Média e respectivo erro padrão ($n=3$) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras *a* e *b* representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.

Parâmetro	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
L^*	$80,72 \pm 0,14^b$	$84,26 \pm 0,20^a$	$83,70 \pm 0,18^a$
a^*	$2,65 \pm 0,06^a$	$1,73 \pm 0,06^b$	$1,84 \pm 0,06^b$
b^*	$12,56 \pm 0,07^b$	$12,45 \pm 0,18^b$	$13,43 \pm 0,16^a$
C^*	$12,84 \pm 0,05^a$	$12,57 \pm 0,19^a$	$13,56 \pm 0,16^a$
H^0	$78,08 \pm 0,33^b$	$82,11 \pm 0,22^a$	$82,22 \pm 0,19^a$

As farinhas obtidas pelos tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram a menor diferença de cor, sendo concordante com a ausência de diferenças significativas que se observaram nestes tratamentos, relativamente aos parâmetros colorimétricos, à excepção do parâmetro b^* (tabela 4.67) Os tratamentos F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) apresentaram a maior diferença de cor, sendo esta detectável pelo olho humano. Esta diferença é igualmente concordante com o efeito estatístico observado nos parâmetros colorimétricos.

Tabela 4.67 - Diferença de cor entre os tratamentos.

Tratamentos	ΔE
F0 (0,3/0,3) - F4 (0,3/0,3)	3,66
F0 (0,3/0,3) - F4 (1,5/1,5)	3,21
F4 (0,3/0,3) - F4 (1,5/1,5)	1,13

4.2. Biofortificação em estufa

4.2.1 Desenvolvimento fenológico

O desenvolvimento das plantas em estufa apresentou ligeiras diferenças comparativamente ao crescimento em ambiente controlado, em especial no tratamento controlo, relativamente ao peso médio dos grãos, tendo sido inferior ao obtido no ensaio em ambiente controlado (tabela 4.68). F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram valores de peso médio dos grãos, muito semelhantes aos obtidos em ambiente controlado, embora se tenha verificado uma diminuição drástica, em particular no

número médio de espigas e no número médio de grãos, verificando-se assim uma inibição na produção dos órgãos vegetativos e reprodutivos, no ambiente em estufa.

Tabela 4.68 - Características do desenvolvimento fenológico da planta em estufa, em cada tratamento.

Tratamento	Nº plantas	Nº médio espigas	Nº médio grãos	Peso médio grãos (mg)
F0 (0,3/0,3)	6	3	22	38,34
F4 (0,3/0,3)	5	3	28	50,94
F4 (1,5/1,5)	5	4	14	44,20

4.2.2 Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de assimilados

4.2.2.1 Micronutrientes

4.2.2.1.1 Zinco

A acumulação de zinco (Zn) nos grãos obtidos a partir de plantas desenvolvidas em estufa, não revelou diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos, apesar de F4 (1,5/1,5) ter apresentado o teor mais elevado (figura 4.92; tabela 4.69). Neste enquadramento, verificou-se uma tendência oposta à obtida pelas plantas de trigo desenvolvidas em condições ambientais controladas (figura 4.18), onde os valores de Zn mais baixos foram detectados em F4 (1,5/1,5).

O tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou o maior decréscimo no teor de Zn, de 63%, entre as amostras produzidas em ambiente controlado e o ensaio em estufa, seguindo-se o tratamento controlo com 57% de diminuição, e o tratamento F4 (1,5/1,5) com 33%. O menor decréscimo de Zn verificado no tratamento F4 (1,5/1,5) sugere uma maior adaptação das plantas às divergentes condições ambientais dos ensaios. Confirma-se assim que as condições ambientais, para além do padrão nutricional aplicado às plantas de trigo, podem modelar a tipologia da acumulação de Zn no grão. Note-se contudo que, tratando-se de uma produção em estufa, estas condições de crescimento não correspondem a uma situação natural do ciclo de vida do trigo.

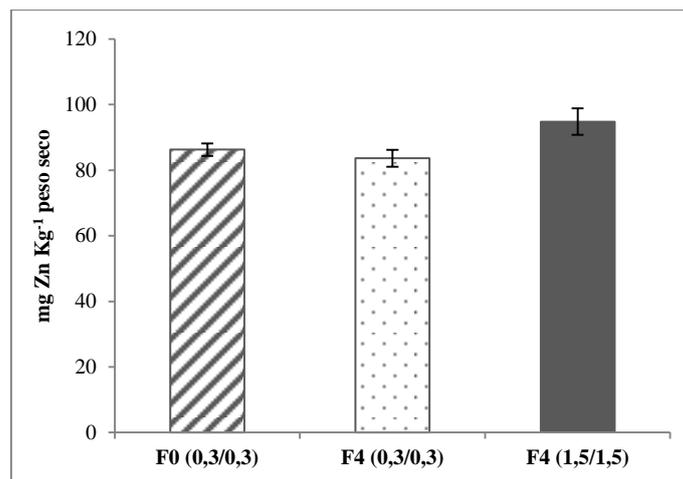


Figura 4.92 - Teor médio de Zn (mg kg^{-1} m.s.) no grão e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.69 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
86,270 ± 1,895 ^a	83,630 ± 2,602 ^a	94,780 ± 4,034 ^a

4.2.2.1.2 Ferro

A tendência para a acumulação de ferro (Fe) foi similar à detectada para o Mn, onde os grãos de F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram valores significativamente superiores a F0 (0,3/0,3). Contudo, o teor de Fe não foi significativamente diferente entre F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) (figura 4.93; tabela 4.70).

Embora se tenham verificado ligeiros decréscimos no teor de Fe, entre as amostras do ensaio em ambiente controlado e o ensaio em estufa (cerca de 11-12%), o tratamento controlo apresentou a menor diminuição de Fe, de 19%, mantendo a mesma tendência de absorção face ao tratamento de maior aporte nutricional, cerca de um quarto (22%) inferior.

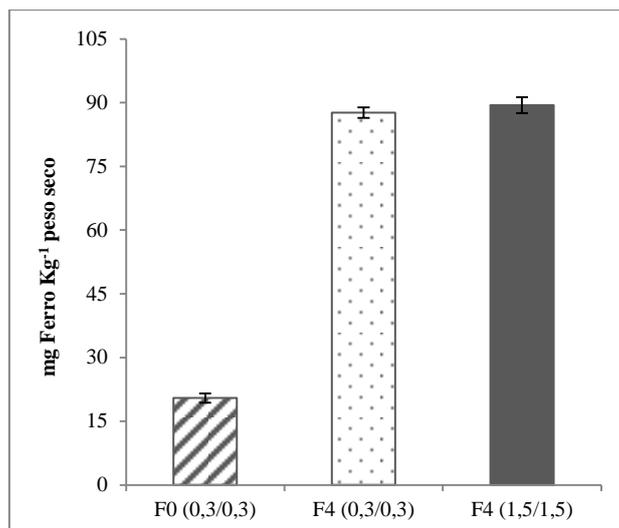


Figura 4.93 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.70 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras *a* e *b*, correspondem a diferenças significativas existentes entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
20,47 ± 1,071 ^b	87,64 ± 1,226 ^a	89,41 ± 1,874 ^a

4.2.2.1.3 Cobre

A acumulação de cobre (Cu) nos grãos de trigo apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, prevalecendo uma maior acumulação total em F4 (0,3/0,3) (figura 4.94; tabela 4.71). O mesmo efeito foi verificado nos grãos desenvolvidos em ambiente controlado, com valores muito semelhantes, apenas com um decréscimo de 3%. Contudo, em F0 (0,3/0,3) verificou-se um decréscimo no teor de Cu de 19%, face às amostras em ambiente controlado. Por outro lado, F4 (1,5/1,5) apresentou um aumento de 4% no teor de Cu, face às amostras desenvolvidas em ambiente controlado.

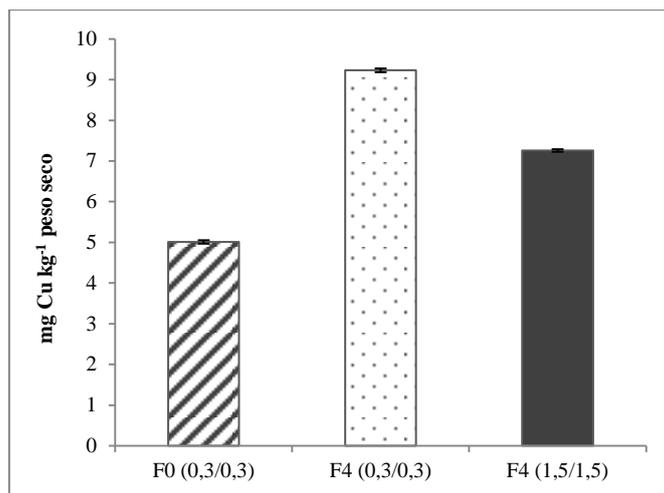


Figura 4.94 – Teor médio de Cu (mg kg⁻¹ m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.71 - Média do teor de Cu no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu no grão (mg Kg⁻¹), com a variável de tratamento. As letra *a*, *b*, *c* correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
5,010 ± 0,042 ^c	9,230 ± 0,048 ^a	7,257 ± 0,031 ^b

4.2.2.1.4 Manganês

O teor de manganês (Mn) apresentou uma tendência semelhante à verificada no ensaio em ambiente controlado, onde F0 (0,3/0,3) apresentou estatisticamente o menor valor. Adicionalmente, este tratamento apresentou um decréscimo no teor de Mn, comparativamente ao ensaio anterior, de 19% (figura 4.95; tabela 4.72).

Contrariamente ao verificado em ambiente controlado, nos tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), o teor de Mn não apresentou diferenças significativas entre os dois tratamentos, embora se tenham verificado decréscimos de 28% e 31% em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), respectivamente (figura 4.95; tabela 4.72).

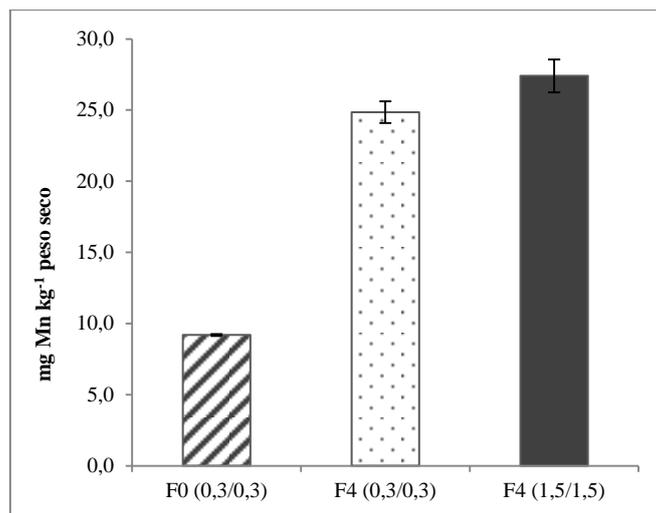


Figura 4.95 – Teor médio de Mn (mg kg^{-1} m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão ($n=3$), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.72 - Média do teor de Mn no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras *a* e *b*, correspondem a diferenças significativas existentes entre os tratamentos realizados.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
9,197 ± 0,072 ^b	24,847 ± 0,759 ^a	27,403 ± 1,162 ^a

4.2.2.2 Macronutrientes

4.2.2.2.1 Potássio

A acumulação de potássio (K) nos grãos maduros dos diferentes tratamentos de trigo, não variaram de forma significativa, contudo foram inferiores aos valores obtidos em ambiente controlado, em F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), tendo-se registado decréscimos de 8% e 4%, respectivamente (figura 4.96; tabela 4.73).

O teor de K em F4 (0,3/0,3) manteve os mesmos valores entre as amostras em ambiente controlado e em estufa, sugerindo ser o tratamento que sofreu menor impacto na acumulação de K, resultante de factores ambientais. Por outro lado, em ambiente controlado, F4 (0,3/0,3) apresentou o valor significativamente mais baixo, enquanto em estufa esta tendência não foi verificada. Acresce que não se detectaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05\%$).

Deste desenho experimental pode assim constatar-se que também a acumulação de K no grão de trigo envolve uma interacção directa entre condições ambientais e o padrão nutricional a que as plantas são submetidas.

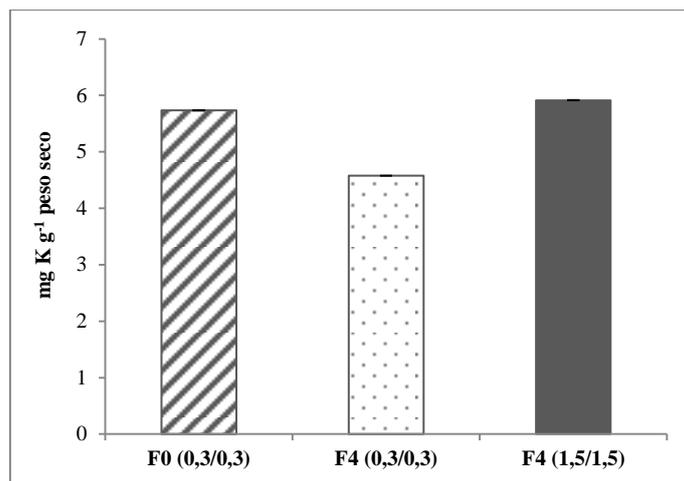


Figura 4.96 - Teor de K (mg kg^{-1} m.s.) no grão dos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão ($n=3$).

Tabela 4.73 - Média do teor de K no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K no grão (mg K g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$5,735 \pm 0,002^a$	$4,578 \pm 0,002^a$	$5,915 \pm 0,002^a$

4.2.2.2 Fósforo

A acumulação de fósforo (P) nos grãos maduros (figura 4.97; tabela 4.74) seguiu a tendência verificada para o K, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo também neste caso que a acumulação no grão de trigo decorre da interação entre condições ambientais e a carga nutricional aplicada às plantas. Adicionalmente, verificaram-se decréscimos na acumulação de P nas sementes provenientes da estufa, face às amostras obtidas em ambiente controlado, com maior impacto no tratamento controlo, com 26%, seguido de F4 (1,5/1,5) com 17% e F4 (0,3/0,3) com 12%. Estes dados reforçam a tendência verificada neste último tratamento para uma maior adaptação aos factores externos. Note-se contudo, que apesar dos grãos provenientes de ambiente controlado terem acumulado maiores níveis de P, nos dois desenhos experimentais F4 (1,5/1,5) apresentou sempre a concentração mais elevada, ainda que não significativamente diferente dos demais tratamentos (figura 4.97; tabela 4.74).

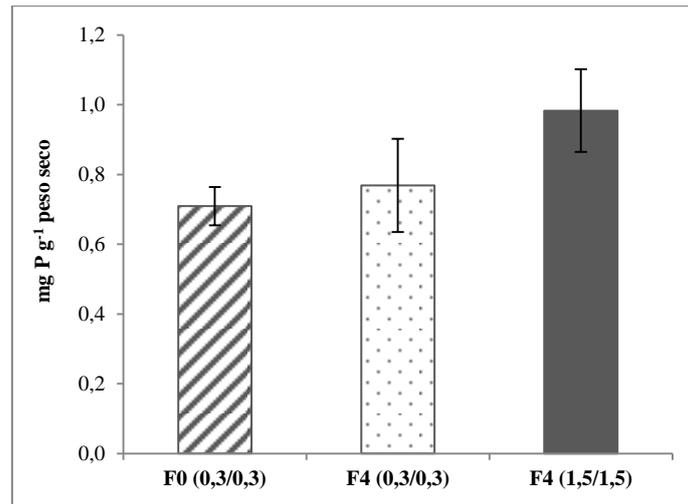


Figura 4.97 - Teor de P ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ m.s.) no grão, nos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão ($n=3$).

Tabela 4.74 - Média do teor de P no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P no grão ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), com a variável de tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$0,709 \pm 0,055^a$	$0,768 \pm 0,134^a$	$0,983 \pm 0,119^a$

4.2.2.2.3 Enxofre

Na acumulação de enxofre (S), também se detectaram decréscimos no neste ensaio, face às amostras provenientes de ambiente controlado (figura 4.98; tabela 4.75). Também aqui F4 (0,3/0,3) apresentou a menor diminuição (8%), e F0 (0,3/0,3) o decréscimo mais drástico (27%), face ao ensaio anterior. F4 (1,5/1,5) apresentou uma diminuição de 13% no teor de S, face às amostras provenientes de ambiente controlado. Contudo, não se detectaram diferenças significativas, entre os tratamentos (tabela 4.75), em concordância com o observado para P e K.

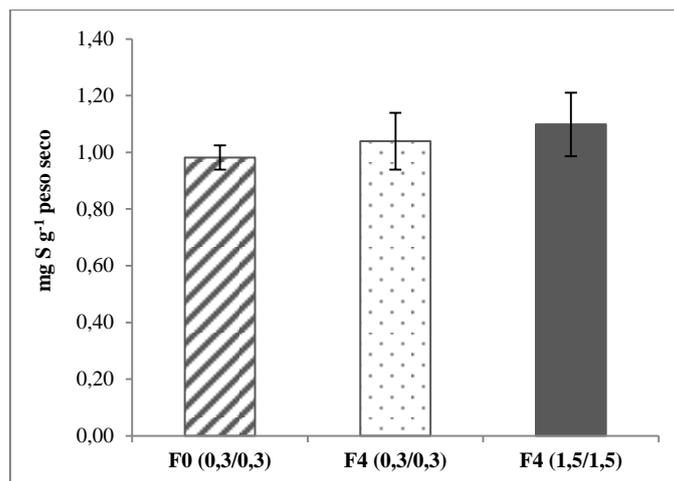


Figura 4.98 - Teor de S (mg.g^{-1} m.s.) no grão, nos diferentes tratamentos e respectivo erro padrão ($n=3$).

Tabela 4.75 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S no grão (mg.g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
0,981 ± 0,043 ^a	1,039 ± 0,100 ^a	1,098 ± 0,113 ^a

4.2.2.2.4 Cálcio

Os grãos obtidos em estufa, não apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$), nos diferentes tratamentos, relativamente ao cálcio (Ca) (tabela 4.76). Contudo, aqui verificou-se uma inversão dos teores máximos, em que F4 (0,3/0,3) foi o tratamento dominante, contrariamente ao obtido em ambiente controlado, onde F0 (0,3/0,3) deteve o valor mais elevado de absorção de Ca. Por sua vez, F4 (1,5/1,5) manteve-se como o tratamento de menor absorção do elemento mineral (figura 4.100). Contudo, e em concordância com os restantes minerais, também na absorção de Ca se verificaram diminuições entre o ambiente controlado e a estufa, onde também F4 (0,3/0,3) apresentou o efeito menos drástico com 19% menos no teor de Ca no grão. F0 (0,3/0,3) apresentou o maior decréscimo (30%), seguido de F4 (1,5/1,5) com 24% menos teor de Ca nos grãos. Adicionalmente, as concentrações de Ca no grão foram significativamente diferentes ($P \leq 0,05\%$), entre os tratamentos.

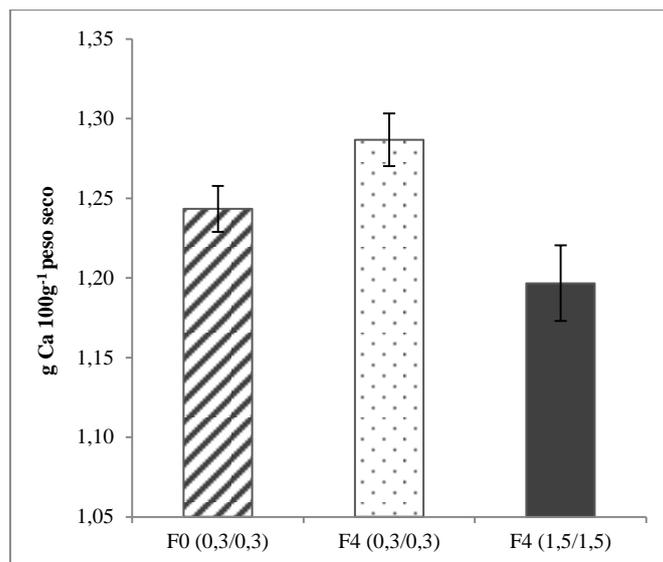


Figura 4.99 – Teor médio de Ca (g.100g⁻¹ m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.76 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca no grão (mg g⁻¹), com a variável de tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
1,243 ± 0,014 ^a	1,287 ± 0,017 ^a	1,197 ± 0,024 ^a

4.2.2.2.5 Magnésio

A acumulação total de magnésio (Mg) apresentou a mesma tendência relativamente ao ensaio anterior, embora com um ligeiro aumento (cerca de 10%) em F4 (0,3/0,3) e uma diminuição de cerca de 25% do teor de Mg acumulado em F0 (0,3/0,3), face aos valores obtidos nos grãos desenvolvidos em ambiente controlado; A concentração média mais elevada de Mg foi observada em F4 (0,3/0,3), sendo significativamente diferente das médias obtidas em F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5). Acresce ainda que, a concentração média mais baixa foi observada em F0 (0,3/0,3), corroborando com os resultados obtidos em ambiente controlado (figura 4.101; tabela 4.77). Tal como verificado na acumulação de Ca, o tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou o melhor rendimento na mobilização do mineral.

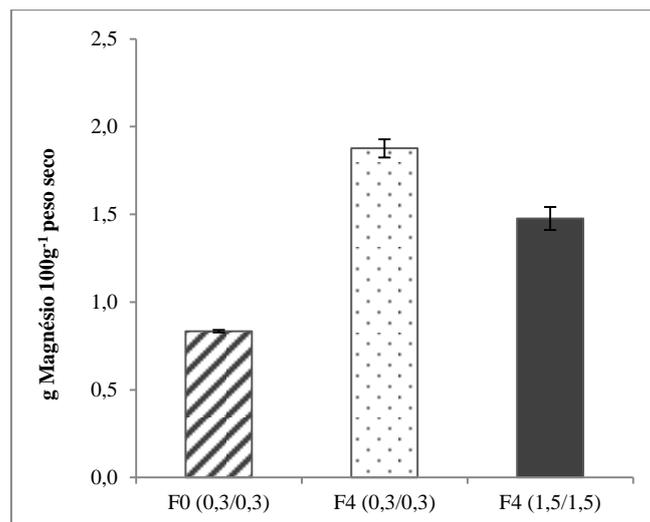


Figura 4.100 – Teor médio de Mg (g 100g⁻¹ m.s.) nos grãos e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.77 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão (g 100g⁻¹), com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* e *c*, indicam diferenças significativas entre os tratamentos efectuados.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
0,833 ± 0,007 ^c	1,877 ± 0,052 ^a	1,477 ± 0,066 ^b

4.2.3 Cinética de absorção e acumulação

4.2.3.1 Micronutrientes

A acumulação de micronutrientes revelou-se significativamente maior em F4 (0,3/0,3) como consequência do maior rendimento de enchimento do grão, com reflexo no seu elevado peso seco (tabela 4.68). Da mesma forma que os grãos obtidos em F0 (0,3/0,3) apresentaram a menor acumulação de micronutrientes (figura 4.102).

Comparativamente às amostras obtidas em ambiente controlado, verificou-se uma diminuição acentuada na acumulação de Zn em F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) (63% e 61%, respectivamente), enquanto F4 (1,5/1,5) diminuiu cerca de 30%, sugerindo uma melhor adaptação das plantas com este tratamento de fertilização, às condições ambientais, face aos demais (figura 4.102).

Por outro lado, F4 (0,3/0,3) apresentou a menor diminuição da acumulação de Fe entre o fitoclima e a estufa (aproximadamente de 10%), verificando-se ser o tratamento com maior teor do mineral. Acresce ainda que F0 (0,3/0,3) apresentou o maior decréscimo na acumulação de Fe, relativamente às amostras deste ensaio, face ao ambiente controlado (cerca de 63%), apresentando o menor teor de Fe, entre os tratamentos (figura 4.102).

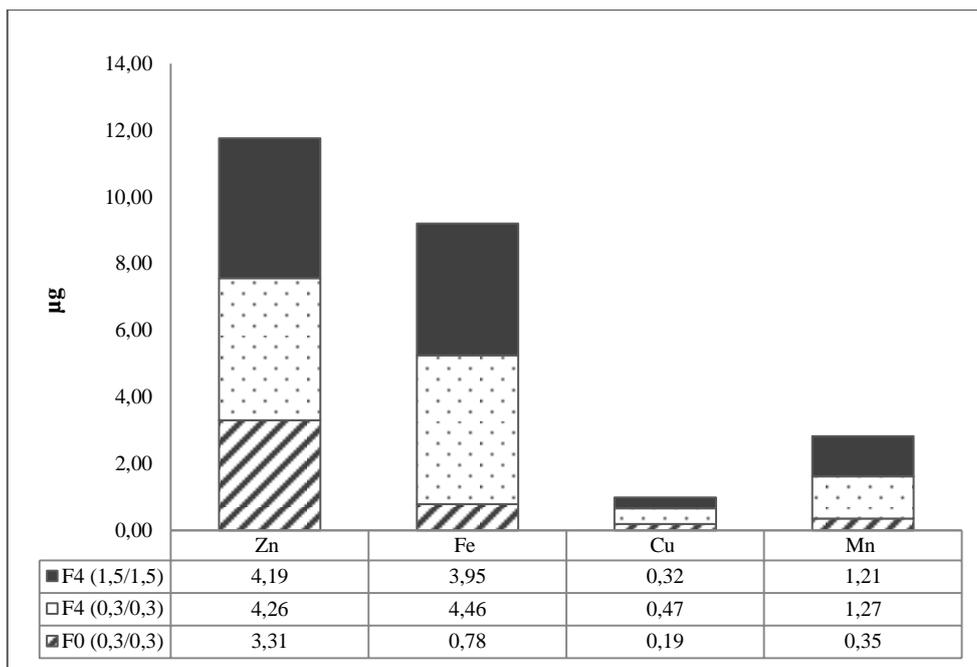


Figura 4.101 – Acumulação de micronutrientes (μg) nos grãos dos diferentes tratamentos.

4.2.3.2 Macronutrientes

Os macronutrientes apresentaram absorção maioritária pelas plantas provenientes de F4 (0,3/0,3), à excepção do P e K, cuja absorção preferencial foi verificado em F4 (1,5/1,5). Esta tendência foi igualmente verificada nos grãos obtidos pelas plantas desenvolvidas em ambiente controlado. Adicionalmente, F0 (0,3/0,3) apresentou a menor acumulação em todos os macronutrientes, embora com valores mais baixos que os observados em ambiente controlado (figura 4.103).

Comparativamente às amostras resultantes do ambiente controlado, verificaram-se decréscimos na acumulação de todos os macroelementos, de forma mais pronunciada no Ca, S e P, onde F0 (0,3/0,3) apresentou os maiores decréscimos (40% e 37%, respectivamente), à excepção do P, onde apresentou a menor diminuição (32%). Adicionalmente, verificou-se a maior diminuição na acumulação de Mg (35%) e K (18,5%), nas amostras de F0 (0,3/0,3), comparativamente ao ensaio em ambiente controlado (figura 4.103).

Acresce ainda que F4 (0,3/0,3) deteve os menores decréscimos na acumulação total dos macroelementos, à excepção do Mg (12,5%) e P (51%).

Esta tendência, sugere o tratamento controlo como o mais vulnerável aos efeitos adversos das condições ambientais, e por sua vez, F4 (0,3/0,3) aparenta ser o mais bem adaptado aos factores externos.

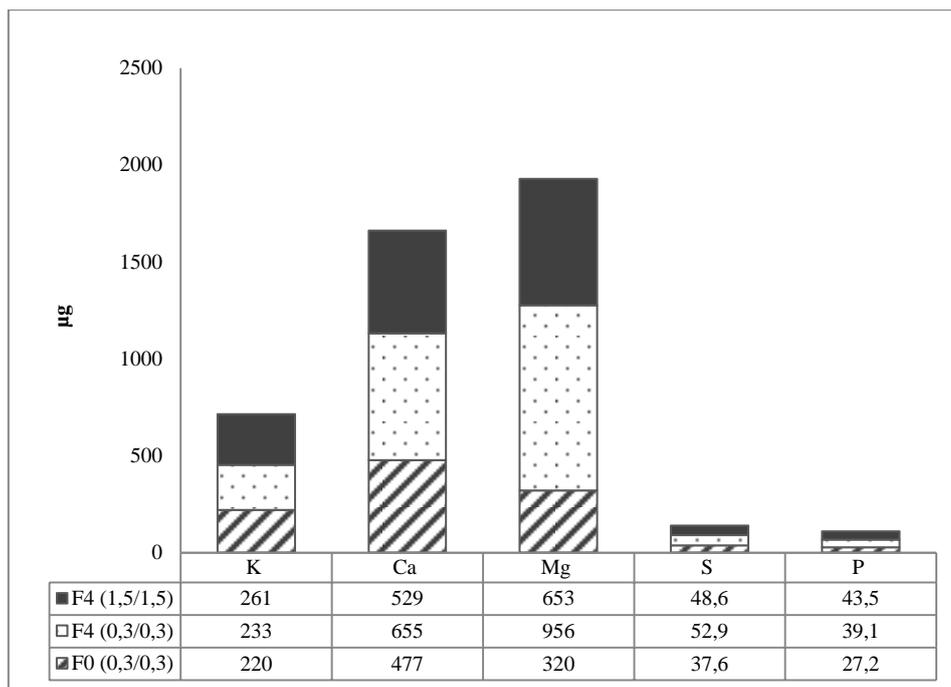


Figura 4.102 – Acumulação de macronutrientes (μg) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

4.2.4 Composição do grão

4.2.4.1 Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos

Tal como evidenciado na análise de minerais, a fracção lipídica também apresentou decréscimos face às amostras desenvolvidas em ambiente controlado. Contudo, verificou-se um efeito antagónico relativamente a F0 (0,3/0,3), o qual sofreu a menor diminuição (1,5%) da fracção lipídica total (figura 4.104). Em contrapartida, a fracção lipídica de F4 (1,5/1,5) e F4 (0,3/0,3) diminuiu 32% e 30%, respectivamente, face ao obtido em ambiente controlado. Contrariamente ao observado na análise de minerais, F4 (0,3/0,3) deteve os menores valores de fracção lipídica. Note-se ainda que o decréscimo verificado em F4 (1,5/1,5) não torna este tratamento significativamente diferente ($P \leq 0,05\%$) dos demais, invertendo a tendência obtida no ensaio anterior (figura 4.104).

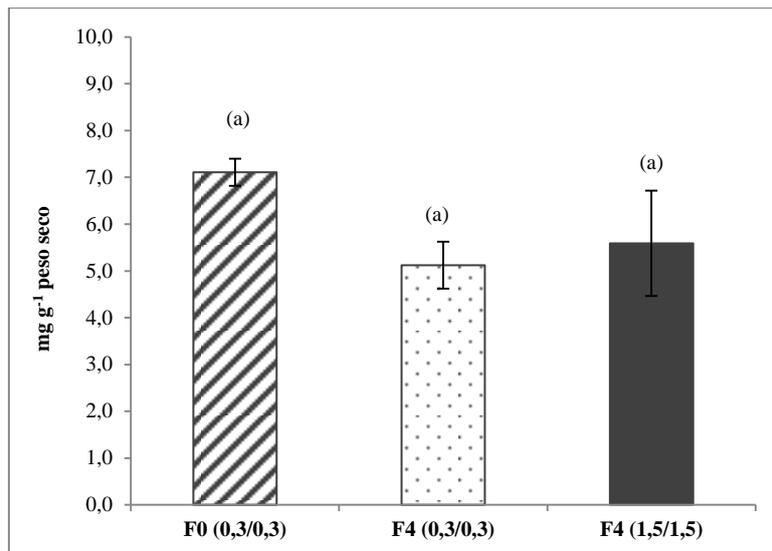


Figura 4.103 - Teor de lípidos totais (mg g^{-1} m.s.) dos grãos (média e erro padrão; $n=3$), nos diferentes tratamentos.

Considerando a composição em ácidos gordos nas amostras, verificou-se que os tratamentos não apresentam diferenças significativas relativamente aos ácidos gordos essenciais e / ou de maior valor biológico, nomeadamente, o ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). De notar o efeito inverso de F0 (0,3/0,3) face às amostras desenvolvidas em ambiente controlado, tendo o controlo apresentado os menores teores dos ácidos gordos essenciais, por oposição ao ensaio em estufa onde este tratamento apresentou os teores mais elevados, ainda que sem efeito significativo face aos demais tratamentos (figura 4.105). Adicionalmente, F0 (0,3/0,3) apresentou valores máximos significativos dos ácidos C16:0, C20:0, C20:1, C22:0. Para os restantes ácidos gordos analisados, verificaram-se diferenças significativas nos seus teores médios, entre os tratamentos, tendo F4 (1,5/1,5) apresentado o teor mais elevado (figura 4.105).

Acresce ainda que, F4 (0,3/0,3) apresentou o maior índice médio de duplas ligações, sugerindo este tratamento como o melhor nutricionalmente, embora o índice médio de duplas ligações não tenha apresentado efeito estatístico entre os tratamentos (tabela 4.78).

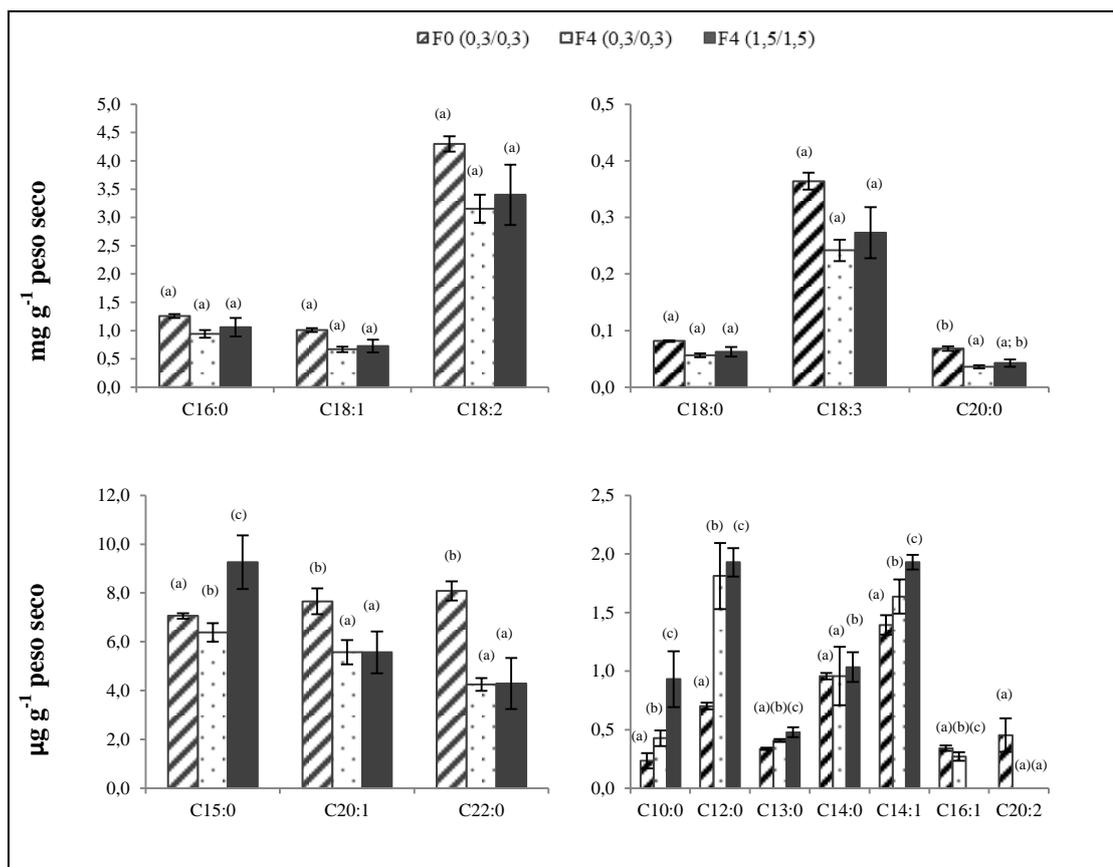


Figura 4.104 - Teor de ácidos gordos dos grãos (média e erro padrão; n=3) nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.78 - Índice médio de duplas ligações e respectivo erro padrão (n=3), na fracção lipídica dos grãos dos diferentes tratamentos. A letra *a* indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 0,3/0,3	F4 0,3/0,3	F4 1,5/1,5
6,81 ± 0,42 ^a	7,34 ± 0,07 ^a	6,97 ± 0,07 ^a

4.2.4.2 Glúcidos

Relativamente ao teor de glúcidos das amostras provenientes da estufa, não existem diferenças significativas ($P \leq 0,05\%$) entre os tratamentos, à excepção de F4 (1,5/1,5) relativamente ao teor de manitose (figura 4.106). Contudo, de um modo abrangente, verificou-se um aumento no teor dos diferentes glúcidos analisados neste ensaio, face às amostras desenvolvidas em ambiente controlado, em particular por F0 (0,3/0,3). F4 (1,5/1,5) apresentou os teores mais elevados de glúcidos, seguido de F0 (0,3/0,3), eventualmente como reflexo dos teores de K no grão, nos respectivos tratamentos.

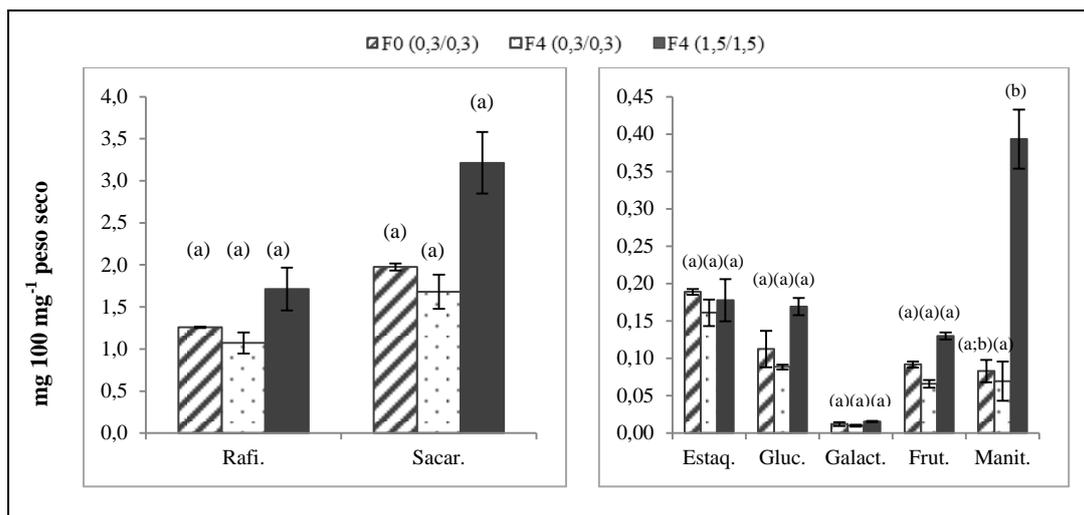


Figura 4.105 - Teor de glúcidos (mg 100 mg⁻¹ m.s.) nos grãos (média e erro padrão; n=3) nos diferentes tratamentos.

4.2.4.3 Proteínas

Tal como verificado no grão obtido em ambiente controlado, o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou o maior teor proteico (figura 4.107), no ensaio em estufa. Adicionalmente, verificou-se um ligeiro incremento (6,7%) no teor proteico neste tratamento, face aos grãos desenvolvidos em ambiente controlado. Acresce ainda que, o maior teor proteico verificado em F4 (1,5/1,5) poderá ser resultado do maior teor de Fe, Mn, K, P e S, uma vez que estes minerais intervêm positivamente na síntese de proteínas (White e Broadley, 2009; Marschner, 1995). Por outro lado, o teor proteico em F0 (0,3/0,3) diminuiu cerca de 10% face ao teor obtido em ambiente controlado, e F4 (0,3/0,3) apresentou o seu valor proteico semelhante ao obtido no ensaio anterior, mantendo a sua qualidade nutricional face às condições externas (figura 4.107).

Acresce ainda que, embora F4 (0,3/0,3) tenha apresentado o maior decréscimo em Zn, este tratamento também teve a menor diminuição de S, o que poderá ter beneficiado a síntese proteica.

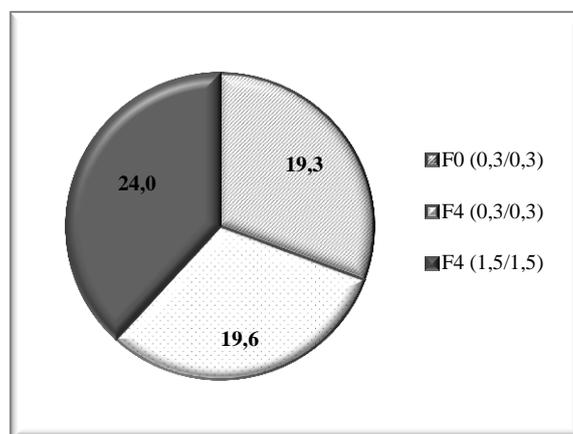


Figura 4.106 – Teor de proteína nos grãos, nos diferentes tratamentos.

4.2.5 Características tecnológicas

4.2.5.1 Índice SDS

A capacidade de extensão das massas nas amostras obtidas a partir dos grãos maduros desenvolvidos em estufa revelou um efeito antagónico com o teor proteico das amostras, onde F4 (1,5/1,5) apresentou a menor extensão significativa (47 mm), apesar de possuir maior fracção proteica (figura 4.108; tabela 4.79). Da mesma forma que F0 (0,3/0,3), com menor teor proteico, apresentou a maior extensão das massas (64 mm), embora sem efeito estatístico face a F4 (0,3/0,3) (tabela 4.79). De acordo com Peck *et al.* (2008), estes resultados sugerem uma interacção limitada entre o metabolismo de Zn e a síntese proteica, aspecto que poderá dever-se a uma menor interacção do Zn com o grupo sulfidrilo e cisteína, permitindo assim uma maior polimerização das proteínas (Peck *et al.*, 2008). Adicionalmente, visto que F4 (1,5/1,5) apresentou maior teor proteico e a menor extensão da massa, sugere-se que no desenvolvimento dos grãos em estufa, tenha ocorrido, igualmente, uma menor intervenção do Zn na formação das gluteninas. Assim, embora F4 (1,5/1,5) tenha apresentado o maior teor proteico, a qualidade tecnológica das amostras relativamente a este nutriente, não aparenta ser a melhor, sugerindo uma má proporcionalidade entre as proteínas fundamentais no processamento de massas, como a glutenina e gliadina.

Por outro lado, o maior valor de extensão da massa observado em F0 (0,3/0,3), embora este tratamento tenha apresentado o menor teor proteico, sugere que a sua qualidade tecnológica esteve directamente envolvida com o processo de biofortificação, potenciando a síntese de gluteninas face às gliadinas. Acresce ainda que, tal como verificado nos demais parâmetros qualitativos analisados, o índice de extensão da massa também apresentou decréscimos face ao obtido em ambiente controlado, onde F4 (1,5/1,5) apresentou a maior diminuição, de 13%, seguido de F0 (0,3/0,3) com 3% menos capacidade de extensão da massa.

O índice de SDS em F4 (0,3/0,3) foi semelhante ao obtido em ambiente controlado, sugerindo que as diferentes condições ambientais afectaram de modo reduzido as características tecnológicas.

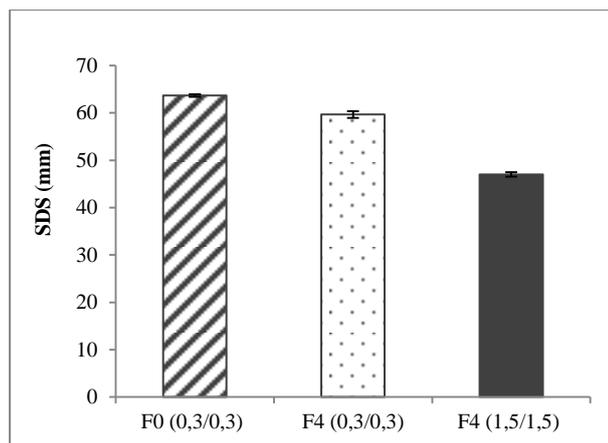


Figura 4.107 – Média da capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.79 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* e *c* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$64 \pm 0,272^a$	$60 \pm 0,720^b$	$47 \pm 0,471^c$

4.2.5.2 Teor de cinzas

Tal como observado no ensaio em ambiente controlado, F4 (1,5/1,5) apresentou o maior teor de cinzas (figura 4.109). Considerando que a acumulação de minerais nos grãos desenvolvidos em estufa segue uma tendência similar à verificada em ambiente controlado (preferencialmente nas extremidades e endosperma), a proporção de cinzas poderá dever-se ao elevado grau de extracção da farinha. Contudo, F0 (0,3/0,3) apresentou o maior decréscimo no teor de cinzas, face às amostras de ambiente controlado (cerca de 15%), e F4 (1,5/1,5) teve um decréscimo de 11%. Tal como verificado no índice SDS, o teor de cinzas em F4 (0,3/0,3) apresentou valores semelhantes aos obtidos em ambiente controlado, sugerindo uma vez mais que as condições ambientais não tiveram um impacte significativo nesta característica.

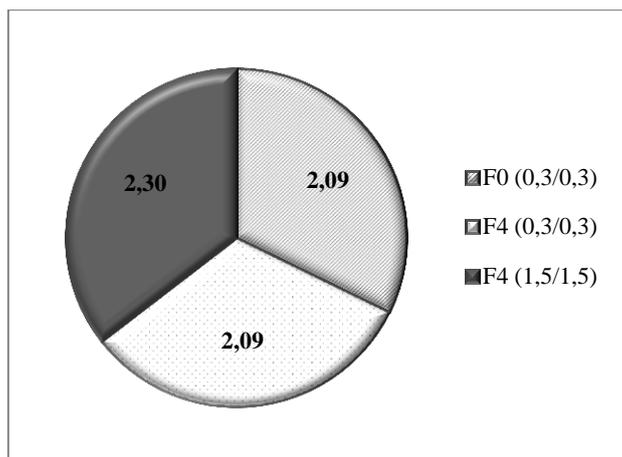


Figura 4.108 – Teor de cinzas (%) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

4.2.5.3 Cor

Contrariamente ao observado no ensaio em ambiente controlado, a cor das amostras provenientes da estufa, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, em particular, no que diz respeito à luminosidade (tabela 4.80).

Comparativamente aos restantes tratamentos, a farinha proveniente de F0 (0,3/0,3) apresentou a luminosidade mais baixa (tabela 4.80), conforme verificado anteriormente nas farinhas provenientes dos grãos desenvolvidos em ambiente controlado. Este resultado poderá dever-se ao baixo peso médio dos grãos neste tratamento (grão com poucas reservas), o que em conjunto com o elevado valor de a^* obtido, aponta para uma maior fracção de camadas exteriores do grão, como aleurona e pericárpio, comparativamente aos demais tratamentos, uma vez que o valor de a^* em F0 (0,3/0,3) é significativamente diferente dos restantes (tabela 4.80).

Relativamente à contribuição do amarelo ($+b^*$) na tonalidade das amostras, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 4.80). Adicionalmente, a tonalidade das amostras seguiu um efeito sinérgico em relação à luminosidade, onde a farinha proveniente de F4 (1,5/1,5) apresentou o valor mais elevado, embora aqui, não seja significativamente diferente de F4 (0,3/0,3) (tabela 4.80).

Tabela 4.80 - Média e respectivo erro padrão ($n=3$) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* e *c* representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.

Parâmetro	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
L^*	$79,28 \pm 0,15^c$	$81,99 \pm 0,72^b$	$83,63 \pm 0,74^a$
a^*	$3,32 \pm 0,09^a$	$2,75 \pm 0,17^b$	$2,34 \pm 0,17^b$
b^*	$14,03 \pm 0,24^a$	$14,90 \pm 0,33^a$	$13,96 \pm 0,17^a$
C^*	$14,41 \pm 0,306^a$	$15,15 \pm 0,344^a$	$14,15 \pm 0,001^a$
H^0	$76,69 \pm 0,761^b$	$79,55 \pm 0,429^a$	$80,50 \pm 0,048^a$

As farinhas obtidas em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram a menor diferença de cor, tornando estes dois tratamentos menos perceptíveis ao olho humano dessa mesma diferença, o que resulta também da ausência de diferenças significativas nos parâmetros colorimétricos entre estes dois tratamentos, à exceção da luminosidade (tabela 4.81). O mesmo não se verificou entre F0 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) cuja diferença de cor entre as farinhas foi maior, resultando também da maior existência de diferenças significativas nos parâmetros colorimétricos, entre estes dois tratamentos, o que permite ao olho humano perceber essa diferença de cor entre as amostras (tabela 4.81).

Tabela 4.81 - Diferença de cor entre as amostras.

Tratamentos	ΔE
F0 (0,3/0,3) - F4 (0,3/0,3)	2,91
F0 (0,3/0,3) – F4 (1,5/1,5)	4,46
F4 (0,3/0,3) – F4 (1,5/1,5)	1,94

4.3. Biofortificação em campo

4.3.1 Desenvolvimento fenológico

O peso seco dos grãos obtidos das plantas desenvolvidas no campo, foi mais elevado ao obtido a partir de ambiente controlado e estufa. Os grãos obtidos por F0 (0,3/0,3) apresentaram o peso seco mais elevado, distinguindo significativamente este tratamento dos demais, e contrariando o observado nos grãos obtidos nos demais ensaios, onde este tratamento apresentou o peso seco mais baixo (figura 4.110; tabela 4.82).

F4 (1,5/1,5) deteve o menor peso médio dos grãos, embora sem efeito estatístico face a F4 (0,3/0,3) (tabela 4.82). Adicionalmente, os grãos obtidos a partir destes tratamentos, tiveram uma diminuição no rendimento dos grãos de 24-25 % comparativamente aos grãos obtidos em ambiente controlado.

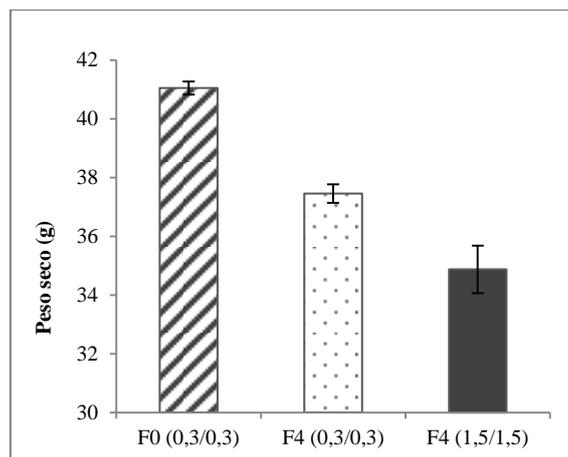


Figura 4.109 - Peso seco de 1000 grãos (g), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.82 - Média do peso seco de 1000 grãos, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$), com a variável de tratamento. As letras *a*, *b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
41,1 ± 0,23 ^a	37,5 ± 0,31 ^b	34,9 ± 0,81 ^b

4.3.2 Acumulação mineral - Mobilização e acumulação de minerais

4.3.2.1 Micronutrientes

4.3.2.1.1 Zinco

A acumulação de zinco (Zn) nos grãos desenvolvidos nos ensaios de campo, sob condições ambientais não controláveis, apresentou uma forte diminuição em F0 (0,3/0,3), tornando-o significativamente diferente dos demais e cujo teor de Zn representou diminuições de 77 % e 48 %, face aos ensaios em ambiente controlado e em estufa, respectivamente (figura 4.111; tabela 4.83).

F4 (1,5/1,5) manifestou também uma diminuição no teor de Zn nos grãos, embora de forma pouco acentuada, correspondendo a um decréscimo de 4% face ao teor de Zn nos grãos obtidos em estufa e 36 % face ao ambiente controlado.

F4 (0,3/0,3) apresentou uma acumulação total de Zn superior aos valores obtidos em estufa, com um aumento de cerca de 14%, colocando F4 (0,3/0,3) com o maior teor do mineral, entre os demais, conforme se obteve em ambiente controlado. Contudo o teor de Zn obtido neste tratamento representou uma diminuição de 56 %, face ao ambiente controlado (figura 4.111). Acresce ainda que F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) não apresentaram efeito estatístico entre si (tabela 4.83).

Não obstante a acentuada diminuição na acumulação de Zn, entre o ambiente controlado e o ensaio de campo, em todos os tratamentos, como consequência das diferentes condições ambientais e

de cultura (composição do solo e aplicação de fertilizantes), a aplicação foliar de Zn, permitiu obter resultados interessantes na acumulação do mineral nos tecidos vegetativos e órgãos reprodutores da planta. Zhang *et al.* (2010) encontraram concentrações de 45 ppm nos grãos de trigo, utilizando como fertilizantes a combinação de citrato férrico com sulfato de Zn, e 39 ppm aplicando todos os nutrientes necessários à planta. Estes dados representaram um aumento de 55 % e 34 %, respectivamente, face ao tratamento controlo (29 ppm de Zn nos grãos). Adicionalmente, os referidos autores encontraram aumentos nos níveis de Zn nos grãos de *Triticum aestivum* L. entre 28-68% através de aplicação foliar do mineral (Zang *et al.*, 2010).

Cakmak *et al.* (2010) avaliaram a acumulação de Zn no grão, considerando diferentes tratamentos de Zn aplicados, em diferentes estádios, face à aplicação adicional de N à planta, tendo concluído que a aplicação de elevados teores de N afecta positivamente a concentração de Zn nos grãos de trigo, assim como, a aplicação foliar de Zn nos estágios tardios de desenvolvimento da planta (surgimento do grão leitoso e enchimento do grão) potenciam o maior aumento dos teores de Zn no grão. Acresce ainda que, a aplicação foliar de Zn, numa fase tardia de desenvolvimento da planta, em combinação com elevados teores de N, potencia um aumento de 139-141 % no teor de Zn nos grãos de *Triticum aestivum*, atingindo os 55 ppm e 29 ppm, nas diferentes localizações estudadas. Adicionalmente, o aumento da concentração de Zn no grão integral de trigo através de aplicação foliar de Zn e/ou no solo reflectiu-se proporcionalmente em todas as fracções do grão (Cakmak *et al.*, 2010).

Gomez-Coronado *et al.* (2015) concluíram que a aplicação foliar de Zn em combinação com a aplicação de N, assim como a fertilização do solo em Zn juntamente com aplicação foliar e N, conferem os maiores teores de Zn nos grãos (52 e 51 ppm, respectivamente), com incrementos de 160 % e 155 %, respectivamente, face à amostra controlo (20 ppm). Os autores sugerem que a aplicação adicional de N favorece a acumulação de Zn de grão, por retardar a senescência da planta e com isso mantém a mesma activa por mais tempo, incluindo na fase de enchimento do grão (Gomez-Coronado *et al.*, 2015). O mesmo efeito foi descrito por Cakmak *et al.* (2010), os quais sugeriram ainda um efeito benéfico na aplicação de N à planta, para aumento da concentração de Zn no endosperma do grão. Este efeito apresentou maiores resultados, quando a fertilização foi aplicada nos estágios inerentes à formação e enchimento do grão, sendo o efeito mais acentuado, quanto maior o teor de N adicionado. Os autores encontraram valores de 20 ppm e 15 ppm de Zn, no endosperma de grãos de *Triticum aestivum*, quando aplicado um tratamento foliar de Zn na fase de brotamento e formação do grão leitoso, juntamente com aplicação de N. Estes dados são ainda similares aos descritos por Ajiboye *et al.* (2015), onde a concentração de Zn no endosperma aumentou, embora em menor quantidade comparativamente à camada de aleurona, através da aplicação foliar de Zn durante a fase de enchimento de grão, sugerindo que nesta fase, o reforço de fertilizantes de Zn por via foliar minimiza as barreiras de transporte do mineral. Acresce ainda que, tais resultados permitiram a obtenção de uma farinha de trigo nutricionalmente mais enriquecida, mesmo removendo as camadas externas do grão onde normalmente se encontra a maior concentração de minerais (Ajiboye *et al.*,

2015). Adicionalmente, o rendimento do grão não aparenta uma relação positiva com os níveis de Zn, tendo Gomez-Coronado *et al.* (2015) sugerido que elevados teores de Zn nos grãos estão normalmente relacionados com baixo rendimento devido ao efeito concentração-diluição. Note-se contudo que Hussain *et al.* (2010), assim como Bouis e Welch (2010), sugerem que é possível obter teores de Zn superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco no grão, sem perda de rendimento. Neste enquadramento os dados obtidos no nosso estudo aparentam um bom incremento nutricional em Zn, embora não tenham superado o objectivo apontado pelos autores.

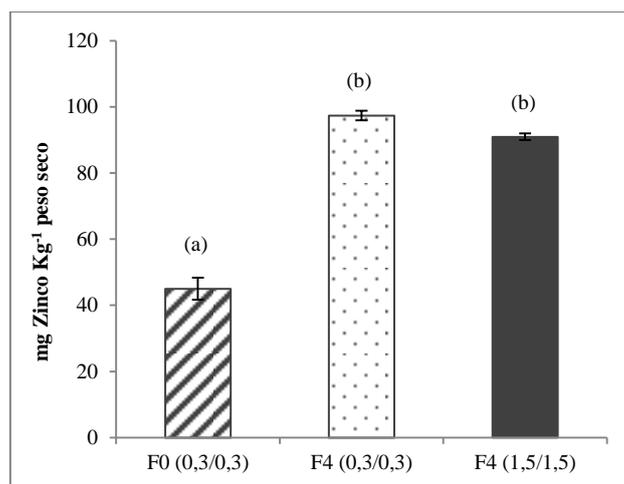


Figura 4.110 – Teor médio de Zn (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$), nos grãos nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.83 - Média do teor de Zn no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Zn no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. As letras *a, b* correspondem às diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$45,02 \pm 3,375^b$	$97,38 \pm 1,449^a$	$90,96 \pm 1,030^a$

4.3.2.1.2 Cobre

Contrariamente ao verificado nos grãos desenvolvidos em estufa, o teor de cobre (Cu) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 4.84). No entanto, verificou-se uma diminuição na acumulação de Cu em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), em 39% e 19%, respectivamente, face às amostras provenientes da estufa. Comparativamente aos grãos desenvolvidos em ambiente controlado, verificou-se uma diminuição no teor do mineral, de 41% em F4 (0,3/0,3) e 22% em F4 (1,5/1,5). F0 (0,3/0,3) revelou o menor decréscimo na absorção de Cu, de 17%, sugerindo que os factores externos possuíram pouco efeito no metabolismo das plantas com este tratamento de fertilização. Embora os teores de Cu não sejam significativamente diferentes entre os tratamentos, F4 (1,5/1,5) deteve o maior valor (figura 4.112).

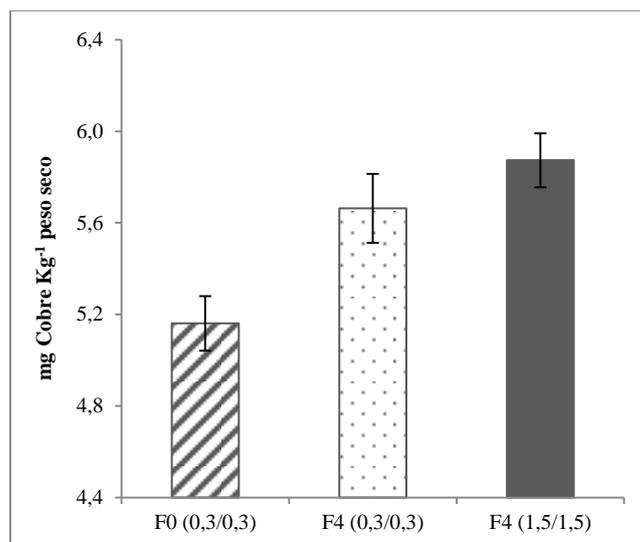


Figura 4.111 – Teor médio de Cu (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$), nos grãos nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.84 - Média do teor de Cu no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Cu no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$5,16 \pm 0,119^a$	$5,66 \pm 0,150^a$	$5,87 \pm 0,118^a$

4.3.2.1.3 Manganês

O teor de manganês (Mn) nos grãos apresentou uma diminuição substancial, em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), comparativamente ao acumulado pelos grãos em ambiente controlado e em estufa, sendo a diminuição mais drástica face às amostras do ensaio em ambiente controlado, onde F4 (1,5/1,5) e F4 (0,3/0,3) apresentaram decréscimos de 77% e 74% na absorção de Mn (figura 4.113). Em contrapartida, F0 (0,3/0,3) apresentou o menor decréscimo, de 25% (tabela 4.85).

Relativamente aos resultados obtidos no ensaio em estufa, também se verificou um decréscimo no teor de Mn no ensaio de campo, mantendo-se F4 (1,5/1,5) com o maior decréscimo, de 67%, seguido por F4 (0,3/0,3) com 64% menos teor de Mn nos grãos. F0 (0,3/0,3) apresentou a menor diminuição no teor de Mn, com menos 7% face ao ensaio em estufa.

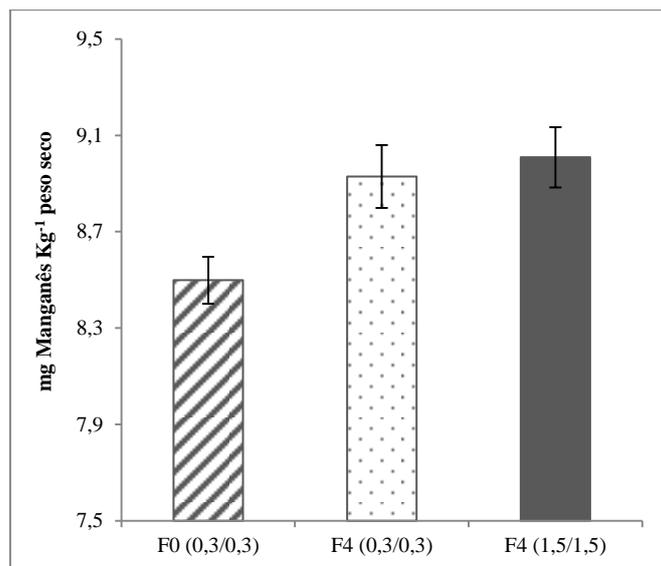


Figura 4.112 – Teor médio de Mn (mg kg⁻¹ m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.85 - Média do teor de Mn no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mn no grão (mg Kg⁻¹), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
8,50 ± 0,098 ^a	8,93 ± 0,130 ^a	9,01 ± 0,125 ^a

4.3.2.1.4 Ferro

A acumulação total de ferro (Fe) apresentou uma acentuada diminuição (cerca de 75%) em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), comparativamente com os grãos em estufa, sendo F0 (0,3/0,3) mais estável. Contudo, a acumulação de Fe nos grãos não variou de forma significativa entre os tratamentos, embora F4 (0,3/0,3) tenha revelado o teor mais elevado (figura 4.114; tabela 4.86).

Amiri *et al.* (2015) analisaram as variações de Fe, Zn e proteínas, em *Triticum aestivum* L., sob condições de *stress* (secura) e encontraram teores de Fe nos grãos, entre 63 e 102 ppm, com um valor médio de 78 ppm. Estes dados são bastante superiores aos resultados obtidos, em condições semelhantes (ensaio de campo). Apenas F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) provenientes de ambiente controlado apresentaram valores semelhantes aos descritos pelos autores. Por outro lado, esses autores concluíram que o rendimento de grão e a concentração de Fe, possuíam uma relação antagônica, a qual pode ser condicionada por factores ambientais e genótipos. Contudo, esta relação negativa deve-se ao efeito de diluição dos minerais devido ao aumento do rendimento do grão. Note-se que a maioria do Fe se armazena no aleurona e gérmen do grão, sendo que a proporção do aleurona e do gérmen no grão inteiro, torna a concentração de Fe negativamente proporcional ao rendimento do grão (Amiri *et al.*, 2015).

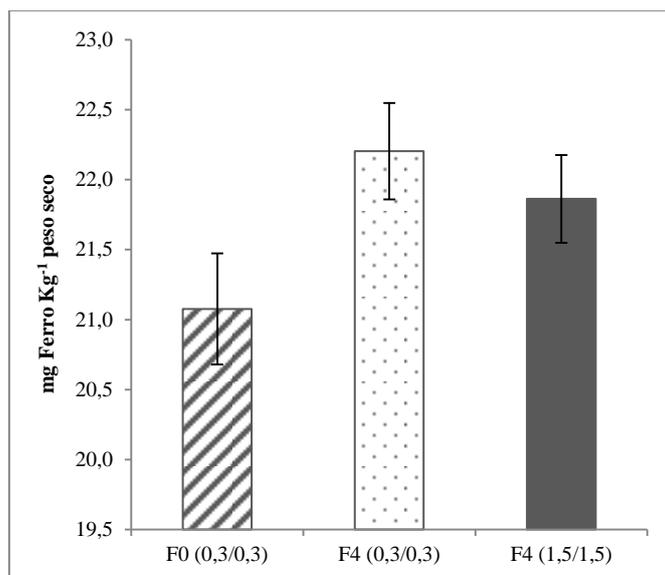


Figura 4.113 – Teor médio de Fe (mg kg^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$), nos grãos nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.86 - Média do teor de Fe no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Fe no grão (mg Kg^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$21,08 \pm 0,397^a$	$22,20 \pm 0,343^a$	$21,86 \pm 0,314^a$

4.3.2.2 Macronutrientes

4.3.2.2.1 Potássio

A absorção de potássio (K) nos grãos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, tal como se observou nos grãos desenvolvidos em estufa (tabela 4.87). De notar que o teor de K foi ligeiramente superior em todos os tratamentos, nos grãos desenvolvidos no campo, face aos grãos obtidos em estufa e em ambiente controlado, com incrementos de 43% e 32%, respectivamente, em F0 (0,3/0,3); de 91% e 93%, respectivamente, em F4 (0,3/0,3), e 54% e 48%, respectivamente no tratamento F4 (1,5/1,5) (figura 4.115; tabela 4.87). Neste enquadramento, verificou-se que o tratamento controlo é aquele que menor variação apresentou nos teores de minerais, entre as diferentes condições dos ensaios. Por outro lado, os incrementos verificados nos teores de K, nos grãos, neste ensaio face aos demais, sugerem que as diferentes fertilizações e períodos de aplicação possam ter tido um efeito positivo na acumulação dos minerais por parte dos órgãos reprodutores das plantas, nomeadamente, pela adição de ureia no solo + fertilização foliar e período de aplicação de fertilização foliar durante o encanamento, espigamento e grão leitoso.

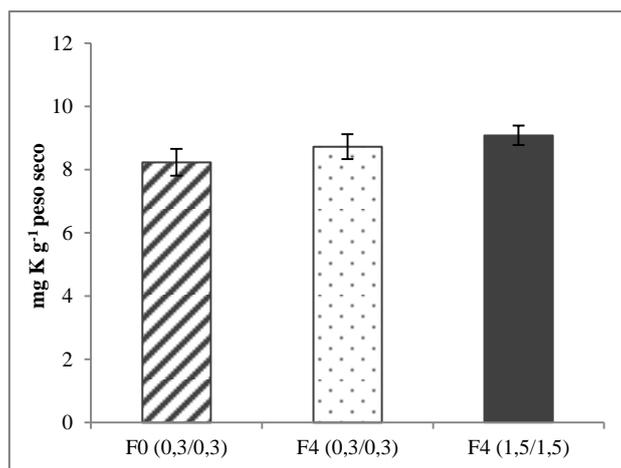


Figura 4.114 – Teor médio de K (mg g⁻¹ m.s.) e respectivo erro padrão (n=9) nos grãos maduros, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.87 - Média do teor de K no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de K no grão (mg Kg⁻¹), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
8,233 ± 0,429 ^a	8,728 ± 0,394 ^a	9,084 ± 0,310 ^a

4.3.2.2.2 Fósforo

A acumulação de fósforo (P) nos grãos obtidos em ensaios de campo aumentou face aos ensaios em ambiente controlado e em estufa, apesar de não existirem diferenças significativas nos teores de P entre os tratamentos de fertilização, conforme se verificou na absorção do mineral em estufa (tabela 4.88). Comparativamente aos ensaios anteriores, verificou-se um incremento bastante pronunciado nos teores de P, em particular no tratamento F0 (0,3/0,3), com aumentos de 726% e 1008%, face ao ambiente controlado e estufa, respectivamente (figura 4.116). F4 (1,5/1,5) apresentou os mais baixos incrementos nos teores de P, comparativamente aos ensaios em ambiente controlado e em estufa, com aumentos de 406% e 513%, respectivamente. Em contrapartida F4 (0,3/0,3) apresentou incrementos de 596% e 686%, face aos ensaios anteriores igualmente descritos, respectivamente (figura 4.116; tabela 4.88). Estes dados poderão sugerir que as condições climáticas e de solo favorecem mais positivamente a acumulação de P.

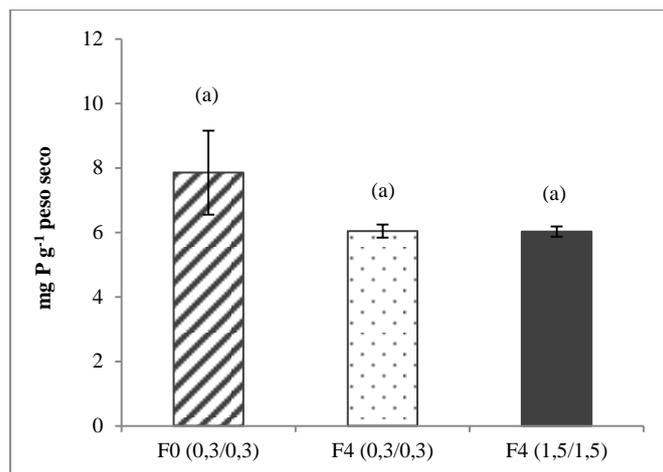


Figura 4.115 – Teor médio de P (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.88 - Média do teor de P no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de P no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$7,86 \pm 1,304^a$	$6,04 \pm 0,205^a$	$6,03 \pm 0,157^a$

4.3.2.2.3 Enxofre

A acumulação de enxofre (S) nos grãos segue a mesma tendência que a verificada nos ambientes de crescimento em estudo, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos de fertilização (figura 4.117; tabela 4.89). Contudo, verificou-se um acréscimo no teor de S nos grãos desenvolvidos no campo, face aos demais ambientes de cultura. F0 (0,3/0,3) manifestou o maior incremento, com 294%, seguido de F4 (0,3/0,3) com 289% e F4 (1,5/1,5) com 254%, face às amostras desenvolvidas em ambiente controlado. Relativamente ao ensaio em estufa, verificou-se a mesma tendência de incremento, tendo F0 (0,3/0,3) apresentado um aumento de 442%, seguido de F4 (0,3/0,3) 324% e F4 (1,5/1,5) com 304%.

O incremento verificado no teor de S, relativamente às diferentes condições de ensaio, poderá ter resultado da diferente fertilização utilizada (adição de ureia no solo + fertilização foliar) e período de aplicação (fertilização foliar durante o encanamento, espigamento e grão leitoso).

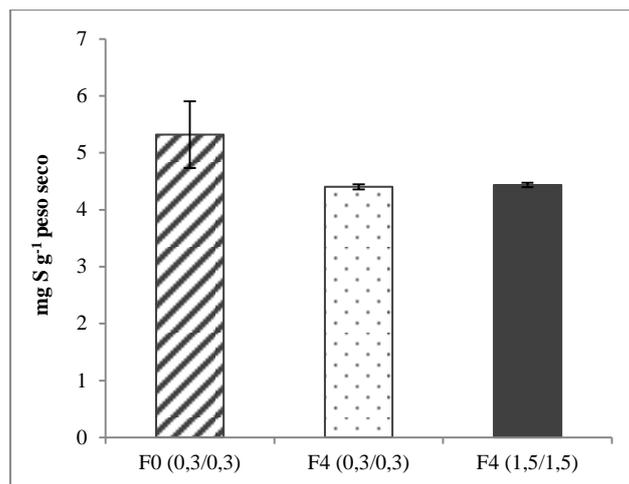


Figura 4.116 – Teor médio de S (mg g^{-1} m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.89 - Média do teor de S no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de S no grão (mg g^{-1}), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
5,32 ± 0,587 ^a	4,40 ± 0,045 ^a	4,44 ± 0,040 ^a

4.3.2.2.4 Cálcio

O teor de cálcio (Ca) nos grãos desenvolvidos no ensaio de campo não apresentou diferenças entre os tratamentos de fertilização, contudo, F4 (1,5/1,5) apresentou o valor mais elevado, conforme verificado no ensaio em estufa, mas contrariamente ao detectado nos grãos desenvolvidos em ambiente controlado (tabela 4.90; figura 4.118). Estes dados são reflexo do maior incremento (16%) de Ca verificado em F4 (1,5/1,5), face ao ensaio em estufa e relativamente aos demais tratamentos. No entanto, face ao ensaio em ambiente controlado, este tratamento apresentou uma diminuição de 10% (tabela 4.90). Em contrapartida, F0 (0,3/0,3) neste ensaio apresentou um decréscimo quer face ao ambiente controlado, quer face ao ensaio em estufa, de 31% e 2%, respectivamente. Adicionalmente, F4 (0,3/0,3) apresentou a mesma tendência face aos teores de Ca, relativamente aos diferentes ensaios realizados, com um decréscimo de 18% face ao ambiente controlado e indicando uma maior proximidade de valores face ao ensaio em estufa, com um aumento de apenas 1% (tabela 4.118). Acresce ainda que F0 (0,3/0,3) teve o menor teor de Ca, quer em estufa quer no ensaio de campo, invertendo a tendência de observada no ensaio em ambiente controlado (tabela 4.118).

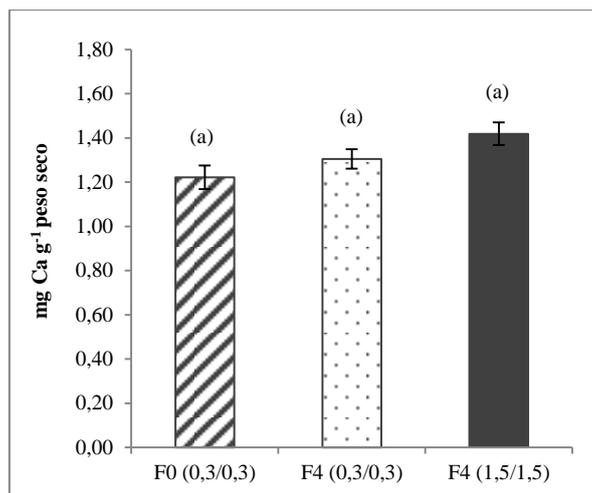


Figura 4.117 – Teor médio de absorção de Ca (mg g⁻¹ m.s.) e respectivo erro padrão (n=9), nos grãos, nos diferentes tratamentos de fertilização.

Tabela 4.90 - Média do teor de Ca no grão, respectivo erro padrão (n=3) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Ca no grão (mg g⁻¹), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
1,22 ± 0,053 ^a	1,30 ± 0,044 ^a	1,42 ± 0,051 ^a

4.3.2.2.5 Magnésio

Os teores de magnésio (Mg) nos grãos diminuíram de forma acentuada (52% e 39%, respectivamente) em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), comparativamente à acumulação deste mineral nos grãos desenvolvidos em estufa (figura 4.119). Contudo, F0 (0,3/0,3) apresentou valores relativamente semelhantes aos obtidos em ambiente semi-controlado, sendo este tratamento estável relativamente à acumulação de Mg, no âmbito das variações das condições ambientais, entre a estufa e a cultura em campo (figura 4.119). Comparativamente aos teores de Mg obtidos em ambiente controlado, os ensaios de campo também revelaram uma tendência semelhante, com 46% e 38% menos teor de Mg em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), respectivamente.

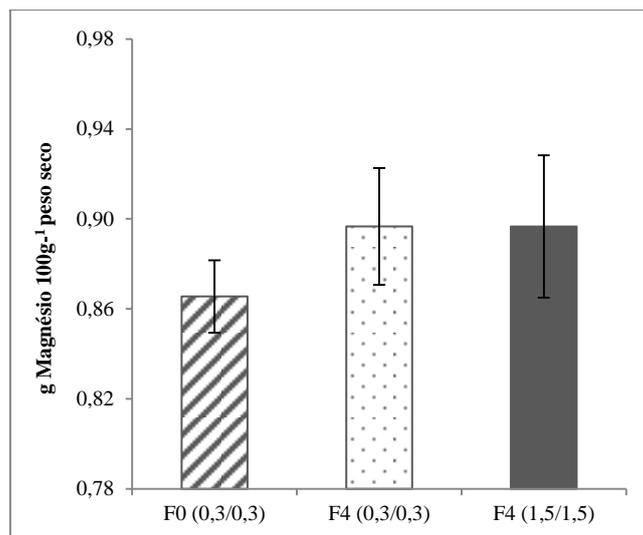


Figura 4.118 – Teor médio de magnésio ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ m.s.) e respectivo erro padrão ($n=9$), nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.91 - Média do teor de Mg no grão, respectivo erro padrão ($n=3$) e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de Mg no grão ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
$0,87 \pm 0,016^a$	$0,90 \pm 0,026^a$	$0,90 \pm 0,032^a$

4.3.3 Cinética de acumulação de minerais

4.3.3.1 Micronutrientes

A mobilização de micronutrientes apresentou diminuições drásticas em todos os elementos, tendo o Zn apresentado os teores mais elevados (figura 4.120). Dos diferentes ensaios realizados, o maior decréscimo no teor de Zn foi obtido entre as amostras desenvolvidas em campo, face ao ambiente controlado, com 96 % menos teor do mineral em F4 (0,3/0,3), apesar deste tratamento ter apresentado o maior teor de Zn relativamente aos demais; adicionalmente, o ensaio em campo, apresentou face ao ensaio em estufa, uma diminuição no teor de Zn, de 91%, igualmente em F4 (0,3/0,3), sugerindo que as condições ambientais adversas, têm forte impacto na acumulação de minerais por parte da planta. O tratamento F4 (0,3/0,3), apesar de ter apresentado os valores mais elevados de Zn, manifestou o maior decréscimo entre os ensaios (figura 4.119).

Relativamente à absorção de Fe nos grãos desenvolvidos no campo, verificou-se um decréscimo de cerca de 98%, em F4 (0,3/0,3), face ao ensaio em ambiente controlado. Acresce ainda que, o tratamento F0 (0,3/0,3) deteve a menor diminuição, entre as amostras do ambiente controlado face ao ensaio no campo, com 92%, comparativamente aos decréscimos verificados em F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), de 98% (figura 4.119). Note-se que se verificou um efeito proporcional inverso entre a

absorção de Zn e a absorção de Fe, onde F0 (0,3/0,3) com menor teor de Zn acumulado apresentou o maior teor de Fe; da mesma forma que F4 (0,3/0,3) apresentou o maior teor de Zn e por sua vez teve a menor acumulação em Fe, corroborando o efeito antagônico entre os dois minerais, na absorção pela planta.

Na acumulação de Cu verificou-se maior diminuição entre os grãos desenvolvidos em campo face ao ambiente controlado, no tratamento F4 (0,3/0,3), com 96% menos teor de Cu. Por sua vez, o tratamento F0 (0,3/0,3) apresentou o menor decréscimo no teor de Cu (92%), relativamente às amostras obtidas em campo, face ao ambiente controlado. No que respeita aos grãos desenvolvidos no campo, comparativamente aos grãos desenvolvidos em estufa, houve uma diminuição na mobilização de Cu de cerca de 89%, no tratamento controlo, representando a menor diminuição do mineral, face aos demais tratamentos. Adicionalmente, F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram a mesma diminuição na mobilização de Cu, entre os ensaios em ambiente controlado e o campo, e entre o campo e a estufa, 96% e 94%, respectivamente.

Acresce ainda que o teor de Mn apresentou diminuições similares, em todos os tratamentos, entre os ensaios de campo e ambiente controlado, e entre os ensaios de campo e a estufa. F0 (0,3/0,3) teve o menor decréscimo (93%) entre o ensaio de campo e o ambiente controlado, e o ensaio de campo e a estufa, assim como F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5), com teores inferiores em 97-98% nas mesmas combinações de ensaios. Neste enquadramento, a nível mais geral verificou-se um acentuado decréscimo na acumulação dos micronutrientes, em particular de Fe, Cu e Mn, entre as amostras de campo e os ensaios em estufa e ambiente controlado.

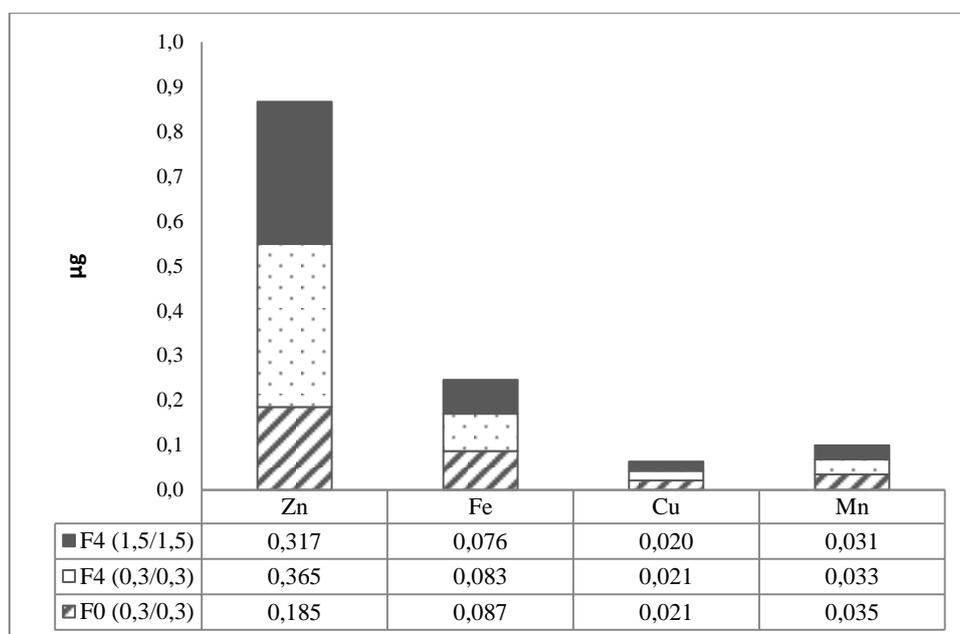


Figura 4.119 – Acumulação de micronutrientes nos grãos (µg), nos diferentes tratamentos de fertilização.

4.3.3.2 Macronutrientes

A acumulação de macronutrientes apresentou um incremento significativo face aos ensaios em ambiente controlado e em estufa, à excepção do Ca (figura 4.120). Adicionalmente, verificou-se um efeito inverso ao observado nos grãos desenvolvidos em estufa, onde F0 (0,3/0,3) deteve os menores teores de todos os elementos. Paralelamente, nas amostras desenvolvidas no campo, este tratamento apresentou os valores mais elevados, aproximando-se da tendência verificada em ambiente controlado (figura 4.120).

Com excepção do Ca e Mg, onde F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram valores idênticos, F4 (1,5/1,5) deteve os menores valores de acumulação de macronutrientes nos grãos desenvolvidos no campo, por oposição aos resultados observados em ambiente controlado, em particular para o K e o P. No entanto, este tratamento apresentou um ligeiro aumento face aos ensaios em ambiente controlado e em estufa (13% e 21%, respectivamente, para o K; 320% e 383%, respectivamente, para o P). Acresce ainda que F0 (0,3/0,3) apresentou os incrementos mais acentuados na acumulação total dos macroelementos, face às amostras do ambiente controlado e F4 (0,3/0,3) apresentou incrementos mais acentuados, face às amostras resultantes do ensaio em estufa.

Neste enquadramento verifica-se que o tipo de fertilizantes utilizados no ensaio de campo e a sua aplicação, combinada com a aplicação foliar na fase de encanamento, afilhamento e grão leitoso, favoreceu a acumulação de nutrientes, à excepção do Ca, entre as amostras de campo e o ambiente controlado, e as amostras de campo e a estufa.

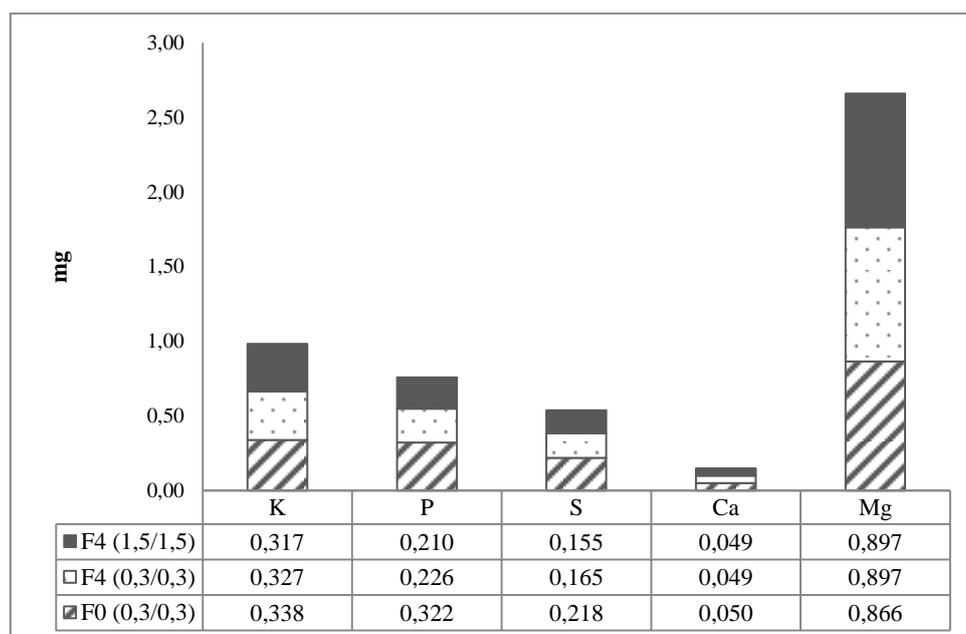


Figura 4.120 – Acumulação de macronutrientes nos grãos (mg), nos diferentes tratamentos de fertilização.

4.3.4 Composição do grão

4.3.4.1 Fracção lipídica total e composição em ácidos gordos

O teor total de lípidos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, embora o controlo tenha apresentado o valor mais elevado, contrariando o observado em ambiente controlado, onde F4 (1,5/1,5) apresentou a fracção lipídica total mais elevada face aos restantes tratamentos e onde F0 (0,3/0,3) não se diferenciou estatisticamente de F4 (0,3/0,3) (figura 4.121). Acresce ainda que F4 (0,3/0,3) manteve os mesmos teores de fracção lipídica que os obtidos em ambiente controlado, apontando assim para um efeito muito limitado da acção de factores ambientais em ambiente não controlado.

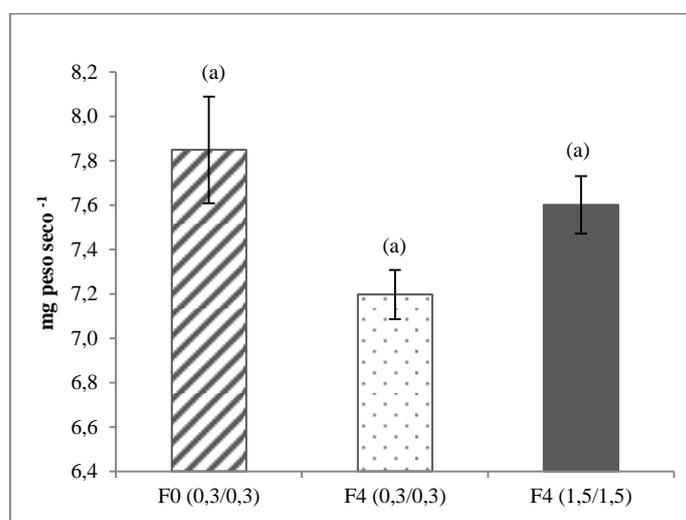


Figura 4.121 - Teores médios e respectivo erro padrão (n=3) da fracção lipídica total (mg peso seco⁻¹) nos grãos, nos diferentes tratamentos.

Em termos qualitativos, verificou-se uma prevalência dos ácidos gordos essenciais nas amostras (figura 4.123), nomeadamente do ácido linoleico (C18:2), à semelhança do evidenciado por Lidon *et al.* (2015). F0 (0,3/0,3) apresentou o teor mais baixo de C18:2, com cerca de 56 % de fracção mássica, no entanto, não se verificou efeito estatístico entre os tratamentos (figura 4.123).

O ácido oleico (C18:1) distinguiu-se como o segundo ácido essencial maioritário na fracção lipídica, com percentagens mássicas em torno dos 18 %, não prevalecendo em nenhum tratamento de forma significativa, embora F0 (0,3/0,3) tenha apresentado o valor mais elevado. Foi também notória a presença do ácido palmítico (C16:0) nas amostras, com uma percentagem mássica da fracção lipídica entre os 8 - 14%, F4 (1,5/1,5) se diferenciou dos demais (figura 4.123). Também o ácido linolénico (C18:3) esteve presente com 3,5 - 4%, enriquecendo a farinha a nível nutricional, uma vez que este ácido possui características antioxidantes de elevado benefício para o consumidor (Lidon *et al.*, 2015). F4 (1,5/1,5) deteve o valor mais elevado, embora sem significado estatístico, contrariando os resultados obtidos por Lidon *et al.* (2015), onde o tratamento controlo deteve os teores máximos. O

ácido esteárico (C18:0), embora seja um ácido saturado, e dessa forma apresenta menor qualidade biológica que os ácidos atrás mencionados, encontra-se maioritariamente presente nas gorduras vegetais, tendo apresentado uma fracção mássica lipídica entre 1,4 - 1,6%. Verificou-se ainda que os tratamentos não se diferenciam quanto ao seu teor (figura 4.123). De acordo com a análise qualitativa dos ácidos gordos presentes nas amostras, verificou-se que F4 (1,5/1,5) possui menor qualidade nutricional, dado ao índice de duplas ligações presentes na fracção lipídica, distinguindo-se significativamente dos restantes tratamentos (tabela 4.92), o que se coaduna com os resultados obtidos por Lidon *et al.* (2015).

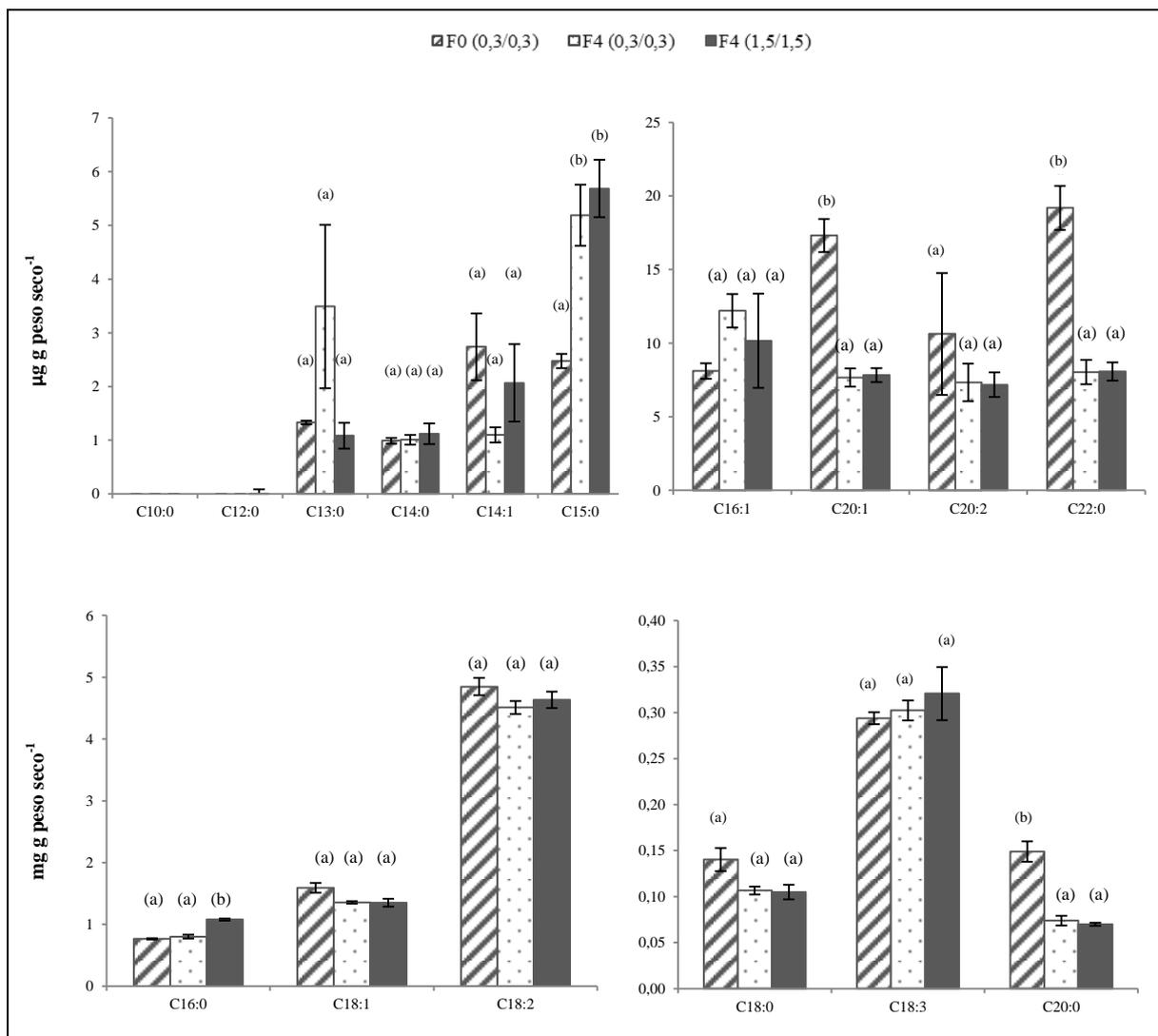


Figura 4.123 - Teor médio de ácidos gordos e respectivos erros padrões (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.92 - Índice médio de duplas ligações e respectivo erro padrão (n=3), na fracção lipídica dos grãos dos diferentes tratamentos. As letras *a* e *b* correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
11,33 ± 0,32 ^a	11,33 ± 0,24 ^a	9,16 ± 0,33 ^b

4.3.4.2 Glícidos

O teor de glícidos nas amostras não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, com excepção da estaquinose, sacarose e frutose, onde o controlo foi significativamente ($P \leq 0,05\%$) diferente de F4 (1,5/1,5), o qual apresentou os teores mais baixos (figura 4.124). De notar o acréscimo verificado nos teores de estaquinose e rafinose, comparativamente aos obtidos nas amostras em ambiente controlado, tendo o tratamento controlo apresentado os maiores incrementos, de 400% e 54%, respectivamente, sugerindo que este tratamento apresentou maior adaptação às condições adversas do ambiente. Também na rafinose, F0 (0,3/0,3) apresentou o maior aumento, face às amostras em ambiente controlado, com 40% de incremento. À excepção da estaquinose, no qual F4 (0,3/0,3) apresentou um aumento de 228% face ao ensaio controlado, F4 (1,5/1,5) apresentou os maiores incrementos de rafinose e sacarose, de 28 – 29%. Comparativamente às amostras provenientes da estufa, as amostras de campo obtiveram em todos os tratamentos, teores mais elevados de estaquinose, galactose e manitose, à excepção de F4 (1,5/1,5), o qual diminui em 38% e 74%, respectivamente, os teores de galactose e manitose. Adicionalmente, F4 (0,3/0,3) foi aquele que apresentou incrementos em todos os açúcares analisados, comparativamente às amostras em estufa (figura 4.124). Esta tendência poderá ser resposta ao aumento no teor de potássio obtido nos grãos desenvolvidos no campo, comparativamente ao ensaio em ambiente controlado e em estufa. Estes dados corroboram a relação sugerida pela literatura (Marschner, 1995; Bergmann, 1992), entre os níveis de potássio e a síntese de polímeros de elevado peso molecular.

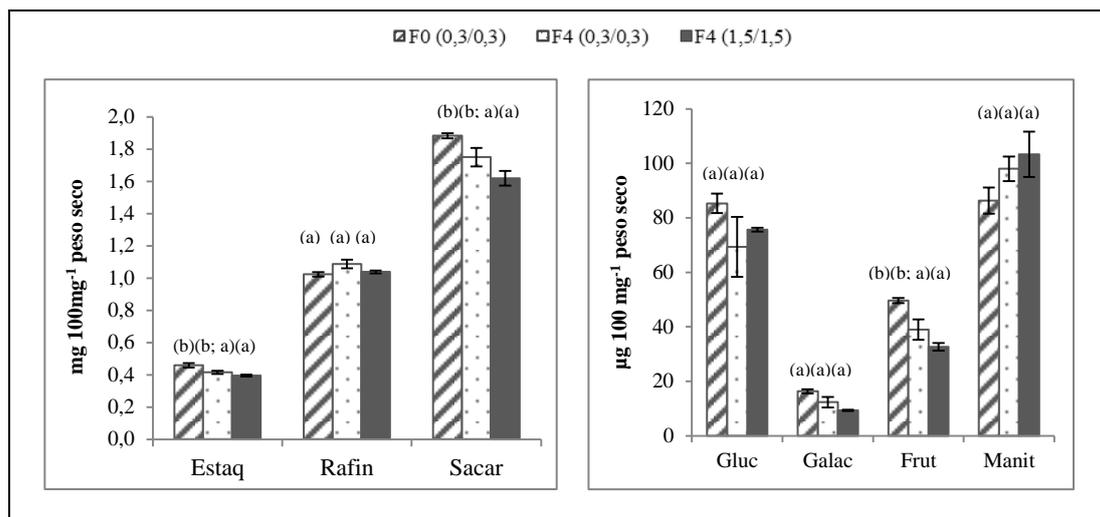


Figura 4.124 – Teor de glúcidos ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1}$ m.s.) nos grãos (média e erro padrão, $n=3$), nos diferentes tratamentos.

4.3.4.3 Proteínas

Os grãos obtidos a partir de plantas desenvolvidas no campo apresentaram um teor proteico consideravelmente mais baixo, comparativamente aos grãos produzidos em ambiente controlado e em estufa (figura 4.125). Embora não existam diferenças significativas entre os tratamentos, verificou-se uma tendência inversa na acumulação deste grupo de nutrientes, comparativamente aos resultados obtidos nas demais condições de crescimento (tabela 4.93). F4 (0,3/0,3) apresentou o menor teor proteico nos grãos obtidos em condições agrícolas, embora sem efeito significativo face aos demais tratamentos, seguindo a mesma tendência em ambiente controlado. Por outro lado, F4 (1,5/1,5) com maior teor proteico obtido em ambiente controlado revelou um decréscimo na acumulação de proteínas nos grãos obtidos no campo de 37 %.

Gomez-Coronado *et al.* (2015) obtiveram o melhor teor proteico no grão de *Triticum aestivum* cultivar Roxo, com aplicação de Zn no solo + foliar, juntamente com aplicação de N, com cerca de 10,8 % de teor proteico. Contudo, contrariamente ao que os autores verificaram e sugeriram, os resultados obtidos no nosso estudo não demonstram uma relação positiva entre o teor proteico e o teor de Zn nos grãos. Este efeito é igualmente defendido por Velu *et al.* (2013). Em oposição, os resultados obtidos apresentaram um efeito antagônico, onde o tratamento de maior teor de Zn (F4 (0,3/0,3)) apresentou o menor teor proteico, de igual modo que o tratamento com menor teor de Zn (F0 (0,3/0,3)) apresentou o maior teor proteico. Estes dados sugerem que a acumulação de Zn no grão poderá interferir na síntese e / ou acumulação de proteínas nestes órgãos. Por outro lado, Cakmak *et al.* (2010) sugeriram que durante a fase inicial do desenvolvimento dos grãos, tanto a acumulação de Zn como a síntese de proteínas são favorecidas no grão através da aplicação de fertilizantes de N. Uma vez que, mais de 10 % das proteínas do sistema biológico requerem Zn para a sua função e integridade

estrutural, os autores defendem que um aumento da acumulação de Zn nos grãos de trigo, potencia igualmente a síntese de proteínas. Contudo, os teores de Zn e proteínas nos grãos sugerem que a aplicação de fertilizantes teve um efeito positivo na acumulação deste nutriente no grão, nomeadamente pela aplicação de N sob a forma de ureia, tendo sido aplicada em quantidade e na fase apropriadas.

Cakmak *et al.* (2010) sugeriram a aplicação foliar de fertilizantes de N após a ântese como a etapa mais promissora para o enriquecimento dos teores de proteína nos grãos. No entanto, os resultados obtidos, com aplicação de N no final do afilhamento e espigamento, foram superiores aos obtidos por Gomez-Coronado *et al.* (2015), os quais utilizaram 4 kg N ha⁻¹ juntamente com os fertilizantes de Zn, na fase de ântese, 100 kg N ha⁻¹ no início do afilhamento e ainda aplicaram 200 kg ha⁻¹ de fertilizante N-P-K, de iguais proporções, antes da sementeira, reforçando a ideia de que a fase de aplicação dos fertilizantes condiciona o efeito dos mesmos na planta, conforme defendido por Cakmak *et al.* (2010). O baixo teor de Zn encontrado nos grãos do tratamento controlo poderá ainda dever-se a um efeito de diluição causado pelo elevado rendimento do grão (Gao *et al.*, 2012; Gomez-Coronado *et al.*, 2015). Note-se que F0 (0,3/0,3) teve um rendimento significativamente superior aos demais tratamentos. De igual modo, o elevado teor proteico verificado no controlo poderá ter resultado do baixo rendimento do grão verificado neste tratamento, tal como sugere Gao *et al.* (2012).

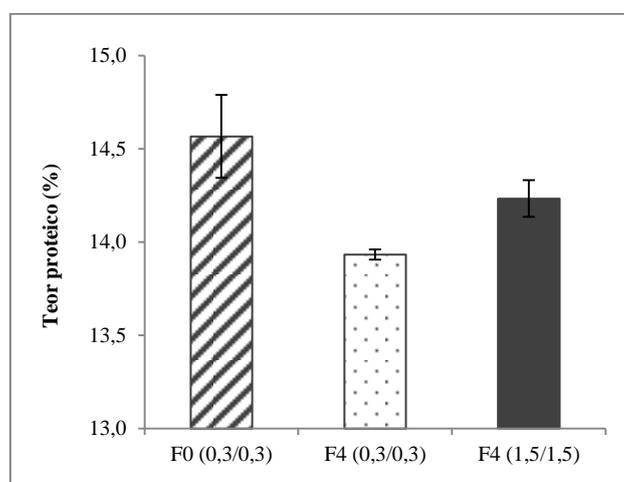


Figura 4.125 - Teor médio de proteínas (%) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.93 - Média e erro padrão (n=3) do teor proteico (%) nos grãos, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de proteínas, com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
14,57 ± 0,22 ^a	13,93 ± 0,03 ^a	14,23 ± 0,10 ^a

4.3.5 Características tecnológicas

4.3.5.1 Índice SDS

A capacidade de extensão das massas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, embora se tenham verificado aumentos no índice SDS, relativamente às amostras dos demais ensaios, à excepção de F0 (0,3/0,3) (tabela 4.94). Adicionalmente, verificou-se o maior incremento no índice SDS, em F4 (1,5/1,5), quer face ao ensaio em estufa (35%), quer em ambiente controlado (18%) (figura 4.126). Esta tendência surge como reflexo do menor valor observado de índice SDS, neste tratamento, nessas condições de ensaio.

Acresce ainda que, o índice SDS verificado em F4 (0,3/0,3) apresentou uma constante de valores, em todos os ensaios realizados, embora com um incremento entre 4-5% face aos demais, sugerindo que os factores externos apresentaram pouca influência nesta característica tecnológica, neste tratamento (figura 4.126). Contudo, a amostra proveniente de F0 (0,3/0,3) apresentou a menor capacidade de extensão das massas, apesar de ter apresentado o teor proteico mais elevado. Tal facto sugere que na sua fracção proteica, poderá existir maior teor de gluteninas face às glutaminas. Verificou-se ainda um efeito antagónico com o observado na capacidade de extensão das massas nos ensaios anteriores, onde F0 (0,3/0,3), que deteve o valor mais elevado deste parâmetro, apresentou agora o valor mais baixo, representando decréscimos de 9% e 6%, face ao ambiente controlado e em estufa, respectivamente (figura 4.126).

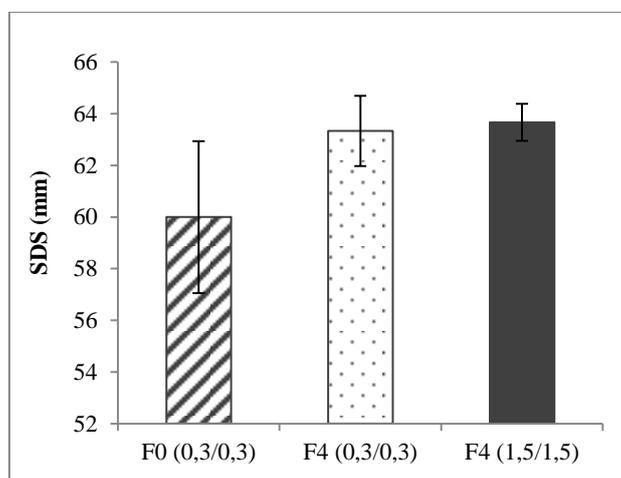


Figura 4.126 - Média de capacidade de extensão da massa (mm) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.94 - Média e erro padrão (n=3) da capacidade de extensão da massa, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) da capacidade de extensão da massa (mm), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
60,00 ± 2,94 ^a	63,33 ± 1,36 ^a	63,67 ± 0,72 ^a

4.3.5.2 Cinzas

Comparativamente aos resultados obtidos nos ensaios em ambiente controlado e em estufa, verificou-se uma diminuição no teor de cinzas das amostras desenvolvidas no campo (figura 4.127), o qual terá resultado da menor acumulação de minerais nos grãos destas plantas. Acresce ainda que, F4 (0,3/0,3) apresentou a menor diminuição do teor de cinzas, comparativamente aos ensaios em ambiente controlado e em estufa, embora com grande proximidade de valores, 15% e 14%, respectivamente. O maior decréscimo foi verificado em F4 (1,5/1,5), com decréscimos de 41% entre as amostras provenientes do ambiente controlado e de campo e 33% face ao ensaio em estufa. Verificou-se também que a acumulação de minerais nos grãos não foi significativamente diferente entre os tratamentos (tabela 4.95). Neste enquadramento aponte-se que Gomez-Coronado *et al.* (2015) obtiveram os maiores teores de cinzas em *Triticum aestivum* cultivar Roxo, aplicando fertilizantes foliares de Zn às plantas juntamente com aplicação de N, com 1,45 %. No entanto, o tratamento utilizado pelos autores com maior teor de cinzas não correspondeu ao tratamento utilizado com maior teor de Zn, sugerindo-se portanto que existem interações inibidoras entre o Zn e outros minerais, fazendo com que o teor total de elementos metálicos não seja proporcional ao teor exclusivo de Zn.

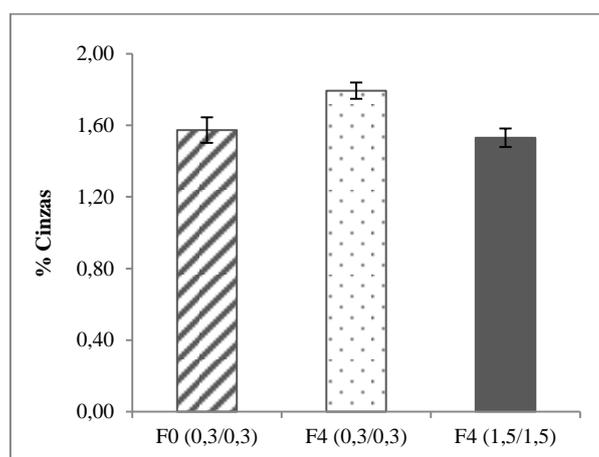


Figura 4.127 - Média do teor de cinzas (%) e respectivo erro padrão (n=3), nos diferentes tratamentos.

Tabela 4.95 - Média e erro padrão (n=3) do teor de cinzas, e análise de variância (com $\alpha=0,05\%$) do teor de cinzas (%), com a variável de tratamento. A letra *a* corresponde à ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

F0 (0,3/0,3)	F4 /0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
1,57 ± 0,07 ^a	1,79 ± 0,05 ^a	1,53 ± 0,05 ^a

4.3.5.3 Cor

Contrariamente ao observado nos ensaios anteriores, as amostras provenientes do campo agrícola não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, relativamente aos parâmetros colorimétricos, à exceção do parâmetro b^* e C^* (tabela 4.96). Contudo, F4 (1,5/1,5) apresentou a maior luminosidade das amostras, embora também o menor rendimento do grão. Adicionalmente, verificou-se uma maior prevalência do vermelho (+a) em relação ao verde (-a), assim como do amarelo (+b) em relação ao azul (-b), em todas as amostras, o que sugere um efeito resultante das camadas externas dos grãos (tabela 4.96). Acresce ainda que F0 (0,3/0,3) apresentou um menor efeito do amarelo (b^*), na cor das amostras, comparativamente aos demais tratamentos, reflectindo-se também na menor saturação da cor (C^*). Contudo, esta tendência não apresentou efeito significativo na tonalidade (H^0) das amostras, entre os tratamentos (tabela 4.96).

Tabela 4.96 - Média e respectivo erro padrão ($n=3$) dos parâmetros colorimétricos da farinha e análise de variância ($\alpha=0,05\%$) com a variável de tratamento. As letras *a* e *b* representam as diferenças significativas entre os tratamentos, em cada parâmetro individualizado.

Parâmetro	F0 (0,3/0,3)	F4 (0,3/0,3)	F4 (1,5/1,5)
L^*	84,93 ± 0,179 ^a	84,60 ± 0,117 ^a	85,94 ± 0,926 ^a
a^*	1,38 ± 0,019 ^a	1,48 ± 0,055 ^a	1,48 ± 0,028 ^a
b^*	12,49 ± 0,131 ^b	13,26 ± 0,158 ^a	13,18 ± 0,074 ^a
C^*	12,57 ± 0,131 ^b	13,34 ± 0,161 ^a	13,26 ± 0,074 ^a
H^0	83,68 ± 0,073 ^a	83,62 ± 0,196 ^a	83,61 ± 0,120 ^a

Por outro lado, F0 (0,3/0,3) e F4 (0,3/0,3) apresentaram a menor diferença de cor, sendo concordante com a ausência de diferenças significativas que se observaram nestes tratamentos, relativamente aos parâmetros colorimétricos, à exceção do parâmetro b^* (tabela 4.97). Os tratamentos F4 (0,3/0,3) e F4 (1,5/1,5) apresentaram a maior diferença de cor. Esta diferença poderá resultar do maior efeito da diferença de luminosidade.

Tabela 4.97 - Diferença de cor entre as amostras.

Tratamentos	ΔE
F0 (0,3/0,3) - F4 (0,3/0,3)	0,83
F0 (0,3/0,3) - F4 (1,5/1,5)	1,23
F4 (0,3/0,3) - F4 (1,5/1,5)	1,34

5. Capítulo V - Conclusão

A biofortificação tem sido considerada uma inovação agrícola, baseada no enriquecimento em micronutrientes dos alimentos base, em particular nos grãos de trigo. O Zn, sendo um elemento essencial aos seres vivos, em especial ao organismo humano, torna-se um microelemento alvo de aplicação do processo de biofortificação, visando o combate à malnutrição humana. Contudo, este processo tecnológico deve ser otimizado, de modo a que esse valor nutricional acrescido, seja biodisponível pelo organismo. Neste contexto, o trabalho desenvolvido considerou três vertentes: o crescimento em ambiente controlado (câmara fitoclimática) com dotação de rega no solo, para visualização da elasticidade metabólica do genótipo; o crescimento em ambiente parcialmente controlado (estufa) mas ainda com dotação de rega no solo, para aferição do efeito desta fertilização sem controlo dos principais factores ambientais (fotoperíodo, intensidade luminosa, humidade relativa, temperatura diurna / nocturna e CO₂); e o crescimento em talhões no campo, com adubação de fundo e cobertura, apoiado ainda com adubação foliar, para visualização do sistema de biofortificação em condições agrícolas.

O crescimento em ambiente controlado permitiu concluir que o tratamento de fertilização F4 (0,3/0,3) desempenhou globalmente os melhores resultados em qualidade mineral, em particular de Zn e Fe e o melhor rendimento do grão. Por sua vez, o tratamento com maior concentração de nutrientes na solução nutritiva (F4 (1,5/1,5)), apresentou o maior teor de cinzas, resultante da acumulação de macroelementos, assim como a maior qualidade nutricional. Porém, a nível tecnológico, o tratamento controlo apresentou-se como o mais promissor à utilização da farinha para processamento.

O crescimento em estufa permitiu concluir que F4 (0,3/0,3) manteve o maior rendimento do grão, assim como os teores mais elevados de Zn e Fe. Nutricionalmente, este tratamento apresentou maior qualidade biológica na fracção lipídica, no entanto, foi F4 (1,5/1,5) que deteve o maior valor nutricional relativamente aos restantes nutrientes. Por outro lado, o tratamento controlo foi igualmente, o melhor tratamento para o processamento da farinha, isto é, com melhores características tecnológicas para a formação da massa.

Quando as condições de crescimento das plantas deixaram de ser controladas, o tratamento controlo teve maior destaque sobre o rendimento do grão e qualidade nutricional da farinha. Acresce ainda que o tratamento F4 (1,5/1,5) apresentou o maior decréscimo destes parâmetros. Por sua vez, os teores de microelementos e macroelementos, apresentaram melhores resultados no tratamento F4 (0,3/0,3), da mesma forma que os parâmetros tecnológicos da farinha expressaram melhores resultados neste tratamento. O tratamento F4 (0,3/0,3) apresentou-se como o mais apropriado a uma biofortificação de sucesso, em condições agrícolas, embora a sua diminuição significativa no rendimento do grão.

Desta forma, a avaliação da correlação entre a taxa de absorção e translocação de nutrientes e a respectiva deposição nos órgãos da planta, levou à conclusão de que as condições edafoclimáticas possuem uma forte influência na capacidade de resposta da planta aos estímulos de fertilização. Por outro lado, a caracterização da produção de grão, equacionando a deposição de elementos minerais a nível tecidual do grão, permitiu concluir que a utilização de fertilizantes agrícolas, de forma adequada, permite um incremento nutricional dos grãos, sem perda significativa de rendimento, sendo a aplicação foliar de Zn, em combinação com a aplicação de Zn no solo, a mais promissora, uma vez que têm, respectivamente, maior impacto na acumulação de Zn nos grãos e maior contribuição no aumento do rendimento da cultura. Adicionalmente, a aplicação foliar de Zn tem maior impacto se for aplicada na fase inicial da formação do grão e enchimento do grão.

Adicionalmente, através da caracterização do respectivo perfil nutricional conclui-se, ainda, que a optimização do incremento nutricional dos grãos de trigo passa pela combinação da intensificação de fertilizantes com a selecção de genótipos resultantes de gerações biofortificadas.

Por forma a dar continuidade aos resultados obtidos, prespectiva-se o futuro da investigação sobre qual a melhor tecnologia para obtenção da farinha a partir de grãos biofortificados, com menor perda nutricional, visto que a maior concentração dos microelementos incide no embrião e gérmen (partes tradicionalmente removidas). Adicionalmente, a fim de avaliar a eficiência do incremento nutricional dos grãos de *Triticum aestivum* cv Roxo, os trabalhos futuros deverão considerar a avaliação da taxa de absorção na mucosa intestinal de Zn, mediante simulação do funcionamento do epitélio intestinal, a qual é afectada pela presença de inibidores ou potenciadores da absorção, a par de aditivos utilizados no fabrico do pão e de outros produtos de padaria.

6. Referências Bibliográficas

- Adams W. W. III, Demmig-Adams B., Verhoeven A. S. e Barker D. H. (1995). “Photoinhibition” during winter stress: Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 261-276.
- Ahmed A., Anjum F. M., Randhawa M. A., Farooq U., Akhtar S. e Sultan M. T. (2012). Effect of multiple fortification on the bioavailability of minerals in wheat meal bread. *Journal of Food Science and Technology*, 49(6): 737-744.
- Ajiboye B., Cakmak I., Paterson D., de Jonge M. D., Howard D. L., Stacey S. P., Torun A. A., Aydin N. e McLaughlin M. J. (2015). X-ray fluorescence microscopy of zinc localization in wheat grains biofortified through foliar zinc applications at different growth stages under field conditions. *Plant Soil*, 392:357-370.
- Akhtar S., Anjum F. M. e Anjum M. A. (2011). Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. *Food Research International*, 44: 652-659.
- Akhtar S., Anjum F. M., Saleem-Ur-Rehman e Sheikh M. A. (2009). Effect of mineral fortification on rheological properties of whole wheat flour. *Journal of Texture Studies*, 40: 51-65.
- Amiri R., Bahraminejad S., Sasani S., Jalali-Honarmand S. e Fakhri R. (2015) Bread wheat genetic variation for grain’s protein, iron and zinc concentrations as uptake by their genetic ability. *European Journal of Agronomy*, 67: 20-26.
- Ashagre H., Almaw D. e Feyisa T. (2013). Effect of copper and Zn in seed germination, phytotoxicity, tolerance and seedling vigor of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cultivar Roma VF). *International Journal of Agricultural Science Research*, 2(11): 312-317.
- Bergmann W. (1992) *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. Gustav Fischer, New York.
- Bicho N.C.C. (2004) *Qualidade e segurança alimentar no café verde e aclimação do género Coffea em condições de stress ambiental*. Dissertação para obtenção ao Grau de Mestre em Tecnologia Alimentar/Qualidade. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Bot J. L., Adamowicz S. e Robin P. (1998). Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae*, 74: 47-82.
- Bouis H. E. e Welch R. M. (2010). Biofortification – A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop Science*, 50: S-20–S-32.
- Bouis H. E. (2002). Plant breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition. *Journal of Nutrition*, 132: 491S-494S.

- Bouis H. E., R.D. Graham e Welch R. M. (2000). The consultative group on international agricultural research (CGIAR) - Micronutrients project: justification and objectives. *Food and Nutrition Bulletin*, 21: 374-381.
- Bruno R. S., Song Y., Leonard S. W., Mustacich D. J., Taylor A. W., Traber M. G. e Ho E. (2007). Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 509-518.
- Cakmak I (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 302: 1-17.
- Cakmak I., Kalayci M., Kaya Y., Torun A. A., Aydin N., Wang Y., Arisoy Z., Erdem H., Yazici A., Gokmen O., Ozturk L. e Horst W. J. (2010). Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9092-9102.
- Cakmak I., Torun A., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E. Braun H. J. e Özkan H. (2004). *Triticum dicoccoides*. An important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7): 1047-1054.
- CIAT/IFPRI (2004). *Biofortified crops for improved human nutrition*. Challenge Program Proposal, International Center for Tropical Agriculture and International Food Policy Research Institute, Washington, DC.
- da Costa M. G., de Souza E. L., Stamford T. L. M. e Andrade S. A. C. (2008). Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 28(1): 220-225.
- da Costa C. M. B., Brazão V., Kuehn C. C., Oliveira L. G. R., Júnior J. C. P., Sala M. A. e Abrahão A. A. C. (2013). Zinc and pregnancy: Marked changes on the immune response following zinc for pregnant females challenged with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical Nutrition*, 32: 592-598.
- Dias A. S. e Lidon F. C. (2009). Evaluation of Grain Filling Rate and Duration in Bread and Durum Wheat, under Heat Stress after Anthesis. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195: 137-147.
- Dick J. W. e Quick, J. S. (1983). A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chemistry*, 60: 315-318.
- EN 15585: 2008. *Cereals and cereal products. Durum wheat (T. durum Desf.). Determination of percentage of vitreous grains and calculation of percentage of vitreous grains*. Pp 14.
- Franklin R. B. e Costello L. C. (2007). Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463: 211-217.
- Galinha C., Freitas M. C. e Pacheco A. M. G. (2013). Elemental characterization of bread and durum wheat by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 297: 221-226.
- Gao X., Lukow O.M. e Grant C.A. (2012). Grain concentration of protein, iron and zinc and bread making quality in spring wheat as affected by seeding date and nitrogen fertilizer management. *Journal of Geochemical Exploration*, 121:36-44.

- Galhano C., Rocha F. e Gomes C. (1999). Geostatistical analysis of the influence of textural, mineralogical and geochemical parameters on the geotechnical behaviour of the 'Argilas de Aveiro' Formation (Portugal). *Clay Minerals*, 34: 109-116.
- Gomez-Coronado F., Poblaciones M. J., Almeida A. S. e Cakmak I. (2015). Zinc (Zn) concentration of bread wheat grown under Mediterranean conditions as affected by genotype and soil/foliar Zn application. *Plant Soil*, 1-16.
- Gramlich A., Tandy S., Frossard E., Eikenberg J. e Schulin R. (2013). Availability of Zinc and the Ligands Citrate and Histidine to Wheat: Does Uptake of Entire Complexes Play a Role? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10409-10417.
- Granssee A. e Führs (2013). Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant Soil*, 368: 5-21.
- Greffeuille V., Abecassis J., Barouh N., Villeneuve P., Mabilhe F., L'Helgouac'h B. e Lullien-Pellerin V. (2007). Analysis of the milling reduction of bread wheat farina: Physical and biochemical characterisation. *Journal of Cereal Science*, 45: 97-105.
- Gutkoski L. C., Durigon A., Mazzutti S., da Silva A. C. T. e Elias M. C. (2008). Efeito do período de maturação de grãos nas propriedades físicas e reológicas de trigo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 28(4): 888-894.
- Hidalgo A., Brandolini A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.), *Journal of Science of Food Agricultural*, 94: 601-612.
- Ho E. 2004. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 572-578.
- Huang W., Zhang, S. B. e Cao K. F. (2011). Cyclic Electron Flow Plays an Important Role in Photoprotection of Tropical Trees Illuminated at Temporal Chilling Temperature. *Plant and Cell Physiology*, 52(2): 297-305.
- Hussain S., Maqsood M. A. e Rahmatullah (2010). Increasing grain zinc and yield of wheat for the developing world: A Review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(5): 326-339.
- Hussain S., Maqsood M. A., Aziz T. e Basra S. M. A. (2013). Zinc bioavailability response curvature in wheat grains under incremental zinc applications. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59: 1001-1016.
- Hussain S., Maqsood M. A., Aziz T. e Basra S. M. A. (2012). Zinc bioavailability response curvature in wheat grains under incremental zinc applications. *Archives of Agronomy and soil Science*, 59, 1001-1016.
- ISO 20483 (2013). *Cereals and pulses — Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content — Kjeldahl method*.
- Jones Jr. J.B. (2001). *Laboratory guide for Conducting soil tests and plant analysis Plant tissue analysis for micronutrients*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 362pp.

- Kabata-Pendias A. e Pendias H. (1992). *Trace elements in soils and plants*. 2nd Edition, CRC Press, Inc., United States of America.
- Khoshgoftarmanesh A. H., Roohani N., Dara A., Kadivar M. e Schulin R. (2010). Some nutritional quality and sensory attributes of wheat flours fortified with iron and zinc. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34: 289-301.
- Klughammer C. e Schreiber U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, 1: 27-35.
- Kramer D. M., Johnson G., Kierats O. e Edwards G. E. (2004). New flux parameters for the determination of QA redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*, 79: 209-218.
- Krause G. H. e Jahns P. (2004). *Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function*. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. The Netherlands: Springer. pp. 463-495.
- Krupa Z., Öquist G. e Huner N.P. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626-630.
- Le Bot J., Adamowicz S. e Robin P. (1998). Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae*, 74: 47-82.
- Lidon F. C., Ramalho J. C., Leitão A. E., Pessoa M. F., da Silva M. M. A. e Reboredo F. H. (2013). Essential key points for zinc biofortification – Uptake, translocation and accumulation mechanisms in higher plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25: 798-804.
- Lidon F. C., Almeida A. S., Costa A. R., Bagulho A. S., Scotti-Campos P., Semedo J. N., Maças B., Coutinho J., Pinheiro N., Gomes C., Leitão A. E., Pais I. P., Silva M. M., Reboredo F. H., Pessoa M. F. e Ramalho J. C. (2015). Sequential zinc and iron biofortification of bread-wheat grains: from controlled to uncontrolled environments. *Journal of Crop and Pasture Science*, 66(11): 1097-1104.
- Lidon F. C. e Henriques F. S (1994). Subcellular localization of copper and partial isolation of copper proteins in roots from rice plants exposed to excess copper. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21/4: 427-436.
- Lidon F. C. e Henriques F. S. (1997). Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation. *Environmental and Experimental Botany*, 39: 197-202.
- Lijuan S., Guiying Z., Guoan Z. e Zaigui L. (2007). Effects of different milling methods on flour quality and performance in steamed breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 45: 18-23.
- Liu Z., Wang H., Wang X.-E., Xu H., Gao D., Zhang G., Chen P. e Liu D. (2008). Effect of wheat pearling on flour phytase activity, phytic acid, iron, and zinc content. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 41: 521-527.

- Mai W., Tian X., Gale W.J., Yang X. e Lu X. (2011). Tolerance to Zn deficiency and P-Zn interaction in wheat seedlings cultured in chelator-buffered solutions. *Journal of Arid Land*, 3: 206-213.
- Medlicott A. P. e Thompson A. K. (1985). Analysis of sugars and organic acids in Ripening Mango Fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Science and Food Agricultural*, 36(7): 561-566.
- Metcalf L. D., Schemitz A. A. e Pelka J. R. (1966). Rapid preparation of fatty-acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytic. Chemistry*, 38: 514-515.
- Mourinho M. P., Pataco I. M., Oliveira K., Santos C., Pelica J., Ramalho J. C., Leitão A. E., Scotti-Campos P., Lidon F. C., Reboredo, F. H. e Pessoa M. F. (2015) Zinc biofortification in *Triticum aestivum* L. – from grains to bakery products. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(2), 164-170.
- Mousia Z., Edherly S., Pandiella S. S. e Webb C. (2004). Effect of wheat pearling on flour quality. *Food Research International*, 37: 449-459.
- Noreto L. M., Paro P. e Ferreira D. T. L. (2009). Correlação entre a cor da farinha de trigo e o teor de minerais. *Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente. UNIOESTE, Panamá, Brasil.*
- NP 1996 (2000). Cereais e leguminosas. Determinação do teor em azoto e cálculo do teor em proteína bruta. Método de Kjeldhal. Instituto Português da Qualidade, 5p
- NP 516 (2000). Cereais e derivados. Determinação do teor de água. Método prático de referência. Instituto Português da Qualidade, 5p
- NP 519 (1993). Cereais e derivados. Determinação do teor de cinza a 900°C. Processo corrente.
- Peck A. W., McDonald G. K. e Graham R. D. (2008). Zinc nutrition influences the protein composition of flour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 47: 266-274.
- Prasad A. S. (1993). *Biochemistry of Zinc*. New York: Plenum, pp 193–218.
- Ramalho J. C., DaMatta F. M., Dias A., Scotti-Campos P., Pais I., Batista-Santos P., Partelli F. L., Ribeiro A., Lidon F. C. e Leitão A. L. (2014). Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. Plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26/1: 5-18.
- Ramalho J. C., Rodrigues A. P., Semedo J. N., Pais I. P. e Martins L. D. (2013). Sustained Photosynthetic Performance of *Coffea* spp. Under Long-Term Enhanced [CO₂]. *PLOS ONE* 8(12): e82712.
- Ribeiro V. S., Leitão A. E., Ramalho J. C. e Lidon F. C. (2014). Chemical characterization and antioxidant properties of a new coffee blend with cocoa, coffee silverskin and green coffee minimally processed. *Food Research International*, 61: 39-47.

- Rosado J. L., Hambidge K. M., Miller L. V., Garcia O. P., Westcott J., Gonzalez K., Conde J., Hotz C., Pfeiffer W., Ortiz-Monasterio I. e Krebs N. F. (2009). The Quantity of Zinc Absorbed from Wheat in Adult Women Is Enhanced by Biofortification. *The Journal of Nutrition*, 1920-1925.
- Scheuer P. M., de Francisco A., de Miranda M. Z. e Limberger V. M. (2011). Trigo: Características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13(2): 211-222.
- Schreiber U. (2004). *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview*. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer. pp. 279-319.
- Shewry P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1537-1553.
- Song Y., Elias V., Loban A., Scrimgeour A. G. e Ho E. (2010). Marginal zinc deficiency increases oxidative DNA damage in the prostate after chronic exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 48: 82-88.
- Sreenivasulu K., Raghu P., Ravinder P. e Nair K. M. (2008). Effect of Dietary Ligands and Food Matrices on Zinc Uptake in Caco-2 Cells: Implications in Assessing Zinc Bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10967-10972.
- Stirbet A. e Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem. Photobiol B: Biol.*, 104: 236-257.
- Takeda A. e Tamano H. (2009). Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Research Reviews*, 62: 33-44.
- Trinh L., Lowe T., Campbell G.M., Withers P.J. e Martin P.J. (2015). Effect of sugar on bread dough aeration during mixing, *Journal of Food Engineering*, 150:9-18.
- Van Kooten O. e Snel J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- Velu G., Ortiz-Monasterio I., Cakmak I., Hao Y. e Singh R. P. (2013). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science*, 1-8.
- Velu G., Singh R., Huerta-Espino J., Peña J. e Ortiz-Monasterio I. (2011). Breeding for enhanced zinc and iron concentration in CIMMYT spring wheat germplasm. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47: S174-S177.
- Verspreet J., Hemdane S., Dornez E., Cuyvers S., Pollet A., Delcour J. A. e Courtin C. M. (2013). Analysis of storage and structural carbohydrates in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains using quantitative analysis and microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 9251-9259.
- Welch R. M. e Graham R. D. (2004). Breeding for micronutrient in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 55(396): 353-364.

- White P. J. e Broadley M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.
- WHO (2007). *The world health report 2007 – A safer future: global public health security in the 21st century*. World health organization.
- Zayas J. F. e Lin C. S. (1989). Water retention of two types of hexane-defatted corn germ proteins and soy protein flour. *Cereal Chemistry*, 66: 51-55.
- Zhang Y., Shi R., Rezaul K. Md., Zhang F. e Zou C. (2010). Iron and Zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 12268-12274.