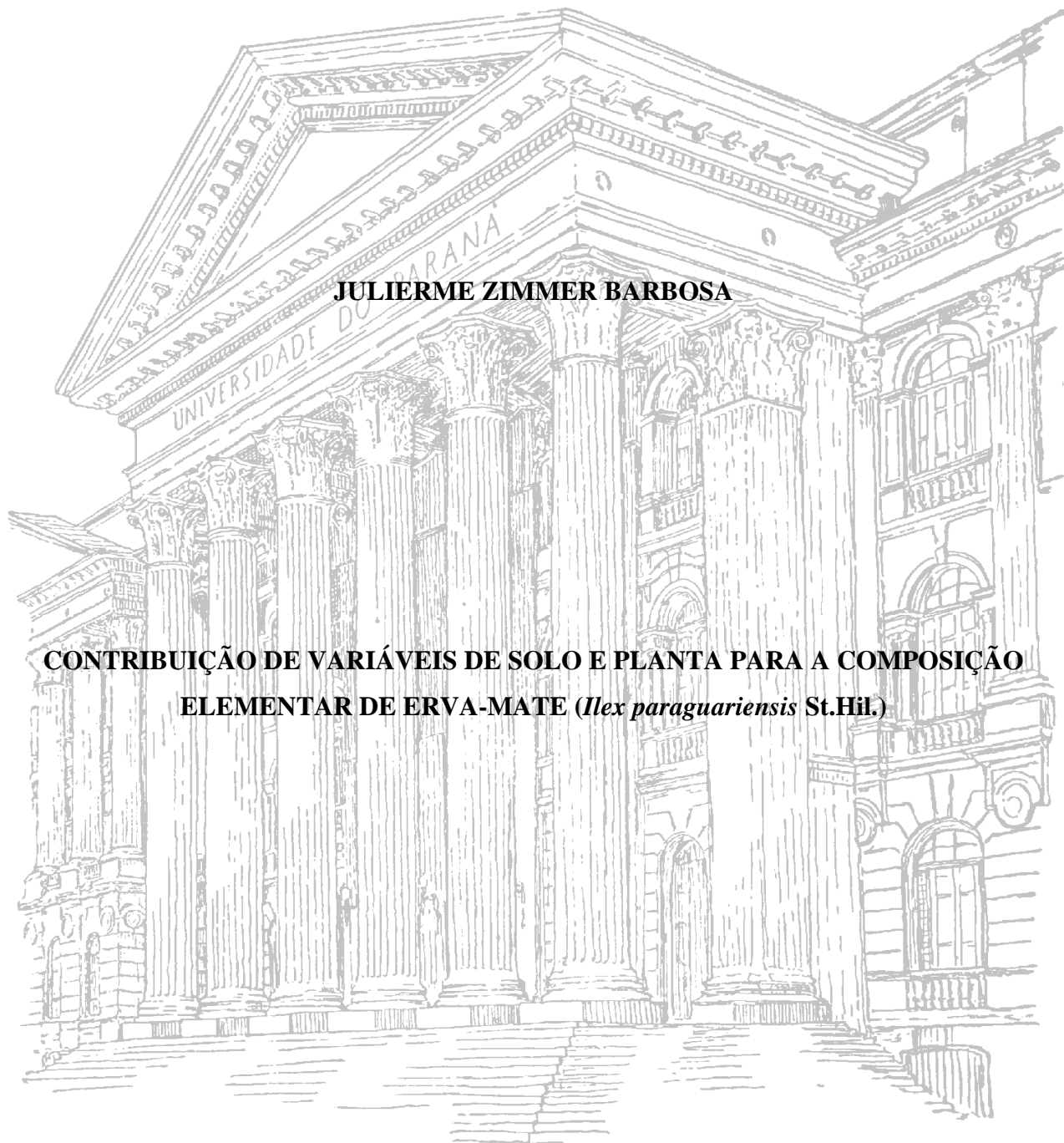


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

JULIERME ZIMMER BARBOSA

**CONTRIBUIÇÃO DE VARIÁVEIS DE SOLO E PLANTA PARA A COMPOSIÇÃO
ELEMENTAR DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.)**



CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

JULIERME ZIMMER BARBOSA

**CONTRIBUIÇÃO DE VARIÁVEIS DE SOLO E PLANTA PARA A COMPOSIÇÃO
ELEMENTAR DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração Solo e Ambiente, do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Antônio Carlos Vargas Motta

CURITIBA

2017

Barbosa, Julierme Zimmer
B238 Contribuição de variáveis de solo e planta para a composição
elementar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) / Julierme
Zimmer Barbosa. - Curitiba, 2017.
xi, 94 f.; il.

Orientador: Antônio Carlos Vargas Motta
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo.

1. Erva-mate - Cultivo. 2. Erva-mate - Composição. 3. Plantas e
solo. I. Motta, Antônio Carlos Vargas. II. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Ciência do Solo. III. Título.

CDU 633.77



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO
Mestrado e Doutorado



ATA DA SESSÃO PÚBLICA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SOLO E AMBIENTE, EM 10 DE MARÇO DE 2017.

Aos dez dias do mês de março do ano de dois mil e dezessete, às treze horas e trinta minutos, na Sala de Seminário do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, assim constituída: **Prof. Dr. Antônio Carlos Vargas Motta**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFPR/PR, Presidente da banca; 1º. Examinador, **Prof. Dra. Alice Teresa Valduga**, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões/Erechim, 2º. Examinador, **Dr. Charles Carneiro**, da Unidade de Tratamento de Esgoto para Curitiba e Região Metropolitana/Curitiba, 3º. Examinador, **Dr. Sérgio Gaiad**, da EMBRAPA Florestas/Colombo e 4º. Examinador, **Dr. Delmar Santin**, Consultor autônomo em Manejo de erva-mate, com a finalidade de julgar a Tese de Doutorado: "**Contribuição de variáveis de solo e planta para a composição elementar de erva-mate**", para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo – Área de Concentração: Solo e Ambiente, apresentada pelo candidato **Julierme Zimmer Barbosa**, Engenheiro Agrônomo, graduado em 2006, pela Universidade do Oeste de Santa Catarina. Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passou a palavra à(ao) candidata(o) para que efetuasse a apresentação oral de sua tese. A seguir, foram feitas as arguições pelos membros da banca. Encerrada essa etapa, a Comissão Examinadora emitiu parecer pela "**APROVAÇÃO**" da tese, esta que é a 13ª (décima terceira) do Programa. A Comissão Examinadora estabeleceu que as recomendações por ela sugeridas farão parte da versão final da Dissertação. O(a) candidato(a) atende assim um dos requisitos para a obtenção do título de **Doutor em Ciência do Solo - Área de Concentração Solo e Ambiente**. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão de defesa, da qual, eu, Antônio Carlos Vargas Motta, Presidente da Banca, lavrei a presente ata, que assinarei conjuntamente com os Membros da Comissão Examinadora, em Curitiba, 10 de março de 2017.

Prof. Dra. Alice Teresa Valduga, Iº. Examinador

Prof. Dr. Antônio Carlos Vargas Motta, Presidente

Dr. Charles Carneiro, IIº. Examinador

Dr. Sérgio Gaiad, IIIº. Examinador

Dr. Delmar Santin, IVº. Examinador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar este trabalho e a CAPES e Fundação Araucária, pela concessão das bolsas de estudo.

Ao meu orientador de pós-graduação, Prof^o Antonio Carlos Vargas Motta pela orientação, ajuda no trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos professores do Programa com os quais tive o privilégio de aprender e pelo auxílio em alguma etapa deste trabalho, principalmente aos Professores Volnei Pauletti, Fabiane Vezzani, Carlos Bruno Reissmann e Vander de Freitas Melo.

Aos membros da banca de qualificação (Daniel Lammel, Danilo Rozane) e de defesa de tese (Charles Carneiro, Delmar Santin, Alice Valduga e Sérgio Gaiad), que tanto puderam contribuir com a finalização deste trabalho.

Aos empresários Alfeu Schneider e Márcio Pereira pela colaboração na realização dos experimentos em Itaiópolis e Três Barras, a UDESC – SC e Embrapa Floresta de Colombo - PR, que juntas, possibilitaram a realização deste trabalho. Aos pesquisadores Martin Broadley e Scott Young, da Universidade de Nottingham, pelas análises de ICP-MS. Ao professor Hudson W. P. de Carvalho pelas microanálises por XRF.

Ao meu amigo e colega de doutorado Rangel Consalter, que muito me ajudou nos experimentos. A todos os meus colegas e amigos que colaboraram diretamente para a realização de alguma fase dessa tese: Anne Sass, Caio Domingues, Guilherme Quaresma, Leandro Zambon, Luciano Roza, Reinaldo Brevilieri.

Aos laboratoristas Roberto, Josianne, Maria e Fabiana do Departamento de Solos e aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelo auxílio nas análises. Ainda, a Denise da secretaria da pós-graduação e a Marla da secretaria do Departamento de Solos e ao pessoal da vigilância do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

Aos meus familiares, em especial minha mãe Elaine e minha avó Gervazia pelo suporte e incentivo.

E a Giovana Clarice Poggere pela companhia, ajuda e apoio incondicionais.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA.....	4
CAPÍTULO 1. ADUBAÇÃO FOSFATADA EM SOLOS ÁCIDOS AFETA O CRESCIMENTO DA PLANTA E A COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE FOLHAS DE CLONES DE ERVA-MATE	5
RESUMO	5
CHAPTER 1. PHOSPHATE FERTILIZATION IN ACID SOILS AFFECTS PLANT GROWTH AND ELEMENTAL COMPOSITION OF LEAVES OF YERBA MATE CLONES	6
ABSTRACT.....	6
1.1. INTRODUÇÃO	7
1.2. MATERIAL E MÉTODOS	8
1.2.1. EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO.....	8
1.2.2. EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CAMPO	11
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
1.3.1. EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO.....	14
1.3.2 EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CAMPO	32
1.4. CONCLUSÕES.....	42
1.5. LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE FOLHAS DE ERVA-MATE USANDO TÉCNICAS DE MICROANÁLISE.....	51
RESUMO	51
ABSTRACT.....	52
2.1. INTRODUÇÃO	53
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	54

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
2.4. CONCLUSÕES.....	70
2.5. LITERATURA CITADA.....	70
CONCLUSÃO GERAL	78
LITERATURA CITADA.....	79
APÊNDICE 1. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS SOLOS.....	93
APÊNDICE 2. TEORES DE Cd E Pb EM FOLHAS DE ERVA-MATE CONSIDERANDO OS DADOS DO PRESENTE ESTUDO E OS DADOS REPORTADOS POR BARBOSA et al. (2015).	94

CONTRIBUIÇÃO DE VARIÁVEIS DE SOLO E PLANTA PARA A COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.)¹

Autor: Julierme Zimmer Barbosa

Orientador: Prof., Antonio Carlos Vargas Motta

RESUMO GERAL

A infusão feita a partir das folhas processadas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.,Hil.,) consiste em bebida não alcoólica tradicionalmente consumida na América do Sul. Outros usos para as folhas de erva-mate são produtos nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos, fármacos e produtos de limpeza. São incipientes as pesquisas com fertilidade do solo e variação genotípica que estudem uma ampla gama de elementos químicos na erva-mate. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi determinar a contribuição de variáveis de solo, fertilização e genótipos para a composição elementar de erva-mate. Foram idealizados três estudos com este propósito: 1) em casa de vegetação, para estudar efeito do solo, adubação com P e clone de erva-mate; 2) a nível de campo, para estudar efeito do clone e adubação com P; 3) avaliando a composição e distribuição espacial de nutrientes e outros elementos no tecido foliar em erval nativo. Em casa-de-vegetação foram cultivadas mudas de dois clones de erva-mate, cada clone em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (P - sem e com *versus* quatro solos ácidos). Foi determinado o crescimento de plantas e a os teores totais (C e N via analisador elementar; P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo, Co, As, Cd, Pb, Ba, Cr e V via espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ICP-OES) nas folhas e usando microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (C, O, Ca, Mg, K, P, Mn, Al, Si, Na). Em condição de campo, em dois municípios (Itaiópolis e Três Barras) em Santa Catarina, Brasil, foram realizados experimentos envolvendo adubação fosfatada (cinco doses de P) e clones de erva-mate (dois clones). Foi determinada a composição elementar de folhas (Al, B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V e Zn via espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente ICP-MS). Em folhas coletadas em erval nativo no município de Cruz

¹ Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, (94 f.) Março, 2017.

Machado (Paraná, Brasil), foram analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS) e espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF) para a realização de microanálises; além disso, os teores totais de elementos (K via espectrometria de emissão por chama; Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Si, Al, Ba, Pb e Cd usando ICP-OES). Na condição de casa-de-vegetação a adubação fosfatada mostrou grande efeito positivo sobre o crescimento da erva-mate, embora o incremento no crescimento diminui em solo com maior disponibilidade inicial de P ou com alguma limitação nutricional. A adubação fosfatada altera os teores de elementos nutrientes e elementos potencialmente tóxicos das folhas de erva-mate, o que é dependente do tipo de solo e clone, sendo que o tipo de solo e o clone também afetam isoladamente alguns elementos. Porém, resultados contrastantes entre o estudo em casa-de-vegetação e no campo, como, por exemplo, para os teores de Pb, que apresenta aumento ou decréscimo com a adubação fosfatada, impossibilita que generalizações sejam feitas. O fator solo teve grande contribuição para a acumulação de Mn acima de 1000 mg kg⁻¹ nas folhas, que é dependente da elevada acidez do solo e, da disponibilidade desse elemento no solo, associada com teores de Mn-disponível, Mn-baixa cristalinidade e Mn-cristalino. A variação genotípica indica potencial de uso para fins de segurança alimentar, embora para o Se, seria necessário suplementação via fertilizantes ou fortificação dos produtos a base de erva-mate. Com base nas avaliações de microanálise, pode-se dizer que ocorre acúmulo de Si e O, entre a parede celular e a cutícula na face externa da epiderme superior das folhas e, a formação de precipitados com Ca, O e C, sobretudo na nervura central. Também podem ocorrer precipitados com Al, Si e O em estômatos da folha e acumulação de Mn, Ba, Ca e P na estrutura de um possível líquen encontrado na superfície da epiderme superior da folha. O presente estudo contribui para incrementar o conhecimento acerca da composição elementar da erva-mate, sobretudo pela análise em solos, adubação, condições ambientais, tecidos vegetais e materiais genéticos contrastantes, com destaque para elementos pouco conhecidos nessa espécie, como Ba, Cd, Cr, Cs, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti e V. Ao utilizar técnicas de microanálise, demonstrou-se que vários enfoques podem ser dados no estudo da composição elementar nas folhas de erva-mate. Com isso, tem-se a possibilidade de ampliar o debate acerca dos teores de nutrientes e elementos indesejáveis na erva-mate.

Palavras-chave: Solos ácidos. Adubação fosfatada. Variação genotípica. Elementos-traço. Microscopia eletrônica.

CONTRIBUTION OF SOIL AND PLANT VARIABLES TO ELEMENTAL COMPOSITION OF YERBA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.)²

Author: Julierme Zimmer Barbosa

Advisor: Prof. Antonio Carlos Vargas Motta

GENERAL ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St., Hil.) is a plant known for its health benefits. The infusion prepared from the processed leaves of this plant is a non-alcoholic beverage traditionally consumed in South America. Other uses for yerba mate leaves are in the form of food products, other beverages, cosmetics, pharmaceuticals, and cleaning products. Research on soil fertility and genotypic variation that focuses on a wide range of chemical elements in yerba mate is incipient. Thus, the aim of this study was to determine the contribution of soil variables, fertilization, and genotypes to the elemental composition of yerba mate. Three experiments were designed for this study: 1) in a greenhouse, the effect of soil, fertilization with P and, clone of yerba mate was evaluated; 2) at the field sites, to study the effect of the clone and fertilization with P; and 3) evaluation of the composition and spatial distribution of nutrients and other elements in leaf tissues under wild-grown plants. In the greenhouse experiments, two clones of yerba mate were cultivated, each in a completely randomized design in a 2×4 factorial scheme (without and with P versus four acid soils). We measured plant growth and total elemental content: C and N via elemental analyzer; P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo, Co, As, Cd, Pb, Ba, Cr, and V via inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), and C, O, Ca, Mg, K, P, Mn, Al, Si, and Na using scanning electron microscopy with dispersive energy spectroscopy (SEM-EDS). Under field conditions, experiments involving phosphate fertilization (five P rates) and two yerba mate clones were carried out in two municipalities (Itaiópolis and Três Barras) in Santa Catarina, Brazil. The elemental composition of leaves (Al, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V, and Zn) was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Leaves collected from wild-grown plants in the city of Cruz

² Doctoral Thesis in Soil Science. Postgraduate Program in Soil Science. Sector of Agrarian Sciences. Federal University of Paraná. Curitiba, (94 f.) March 2017.

Machado (Paraná, Brazil) were analyzed using SEM-EDS and X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) was used to perform microanalysis. In addition, the total elemental content was determined using flame emission spectrometry (for K) and ICP-OES (for Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Si, Al, Ba, Pb, and Cd). Under greenhouse conditions, phosphate fertilization had a large positive effect on yerba mate growth, although growth increment decreased in soil with higher initial availability of P or with some nutritional limitation. Phosphate fertilization led to changes in the nutrient content and potentially toxic elements of yerba mate leaves, which were dependent on the soil and clone type. Soil type and clone also affected some elements in isolation. However, contrasting results between greenhouse and field experiments—such as those for Pb contents, which increased or decreased with phosphate fertilization—renders it impossible to draw conclusions. Soil type contributed greatly to the accumulation of Mn (above 1000 mg kg⁻¹) in the leaves; this was dependent on the high acidity of the soil and availability of Mn in the soil (associated with Mn-available, Mn-low crystallinity and Mn-crystalline forms). Genotypic variation indicated potential use for food safety purposes, although for Se, supplementation via fertilizers or fortification of yerba mate products would be necessary. Based on microanalysis evaluations, accumulation of Si and O occurs between the cell wall and the cuticle on the external surface of the upper epidermis of the leaves. Additionally, formation of Ca, O, and C precipitates occurs in the central vein. Aluminum, Si, and O precipitates may also occur in the leaf stomata, while accumulation of Mn, Ba, Ca, and P occurs in the structure of a possible lichen found on the surface of the upper epidermis of the leaf. The present study contributes to an increased knowledge about the elemental composition of yerba mate, mainly by the analysis of soil, fertilization, environmental conditions, plant tissues, and contrasting genetic material, especially for elements not well known in this species, such as Ba, Cd, Cr, Cs, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, and V). By using several microanalysis techniques, we showed that various approaches can be used in the study of the elemental composition of yerba mate leaves. This research may help to broaden the debate about the contents of nutrients and undesirable elements in yerba mate.

Keywords: Acid soils. Phosphate fertilization. Genotype variation. Trace elements. Electron microscopy.

INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St, Hill) é uma espécie de árvore com ocorrência endêmica, ou seja, foi encontrada na forma silvestre apenas no sul da América. A principal área de concentração dessa espécie foi nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, na província de Misiones na Argentina e no leste do Paraguai. Na condição nativa a erva-mate se desenvolvia predominantemente em solos com acidez variando entre alta e média (FIGURA 1), onde formava o sub-bosque da floresta, abaixo de espécies como o pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* Bertol. O. Kuntze), a imbuia (*Ocotea porosa*, Nees), o cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e a canela-lageana (*Ocotea pulchella*, Mart.) (Gerhardt, 2013).



FIGURA 1. Principal área de ocorrência de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) e pH do solo na América Meridional (área delimitada pela linha preta). Mapa de IGBP-DIS (1998) usando informações de Gerhardt (2013) para a área de ocorrência endêmica da erva-mate.

As folhas de erva-mate têm sido utilizadas desde os indígenas (no período pré-europeu) até atualmente, tendo expressiva relevância cultural e econômica na região austral da América do Sul. A principal forma de uso da erva-mate é através do consumo de chimarrão (infusão com água quente) e tererê (infusão com água fria). No Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai o consumo de chimarrão e tererê ocorre em larga escala, similar ao consumo de chá (*Camellia sinensis*) na Ásia e Europa e, do café (*Coffea ssp.*) na Europa e América do Norte. Recentemente, bebidas industrializadas, suplementos alimentares, fármacos e cosméticos também têm sido elaborados a partir de folhas da planta, seja nos países de origem ou em outros países (Cardozo Junior & Morand, 2016).

Com força motriz econômico-cultural determinada pelo potencial biológico da erva-mate, nos últimos anos as pesquisas com a espécie têm aumentado consideravelmente, como pode ser observado na FIGURA 2. A maior parte das pesquisas está relacionada com medicina, ciências agrárias, química e tecnologia de alimentos. Embora existam, é relativamente menor o número de pesquisas abrangendo fertilidade do solo e nutrição de plantas com erva-mate.

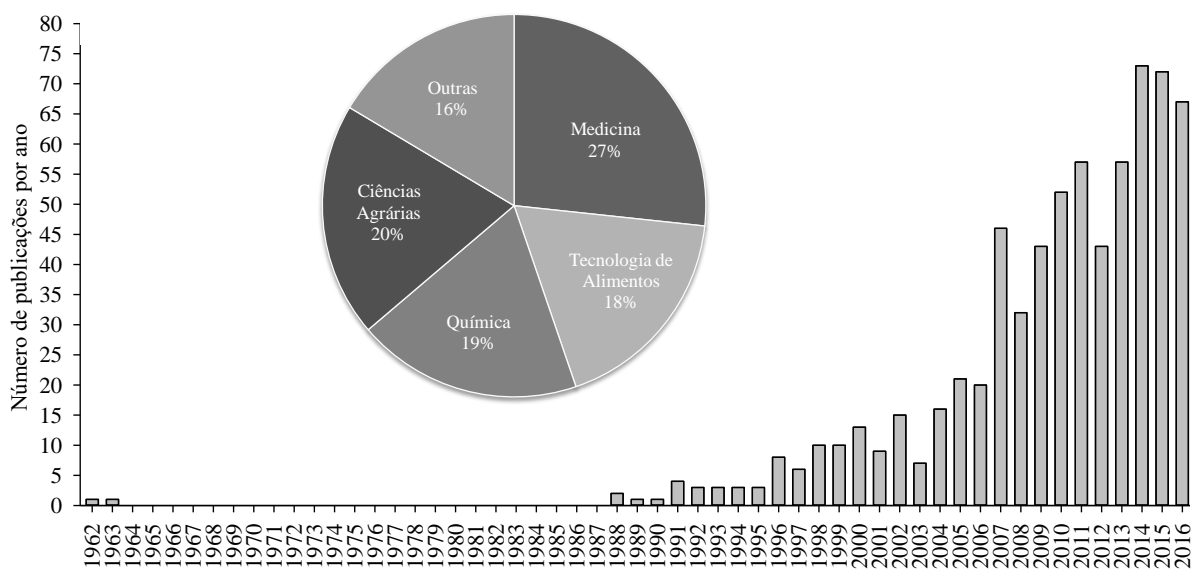


FIGURA 2. Número de publicações por ano e percentagem de publicações por área obtidos a partir de pesquisa na base de dados Web of Science® utilizando o nome científico da erva-mate “*Ilex paraguariensis*” (Pesquisa em: 02/02/2017).

O conhecimento acerca dos elementos químicos que compõem as folhas da erva-mate é importante para fins de fertilidade do solo e nutrição de plantas, haja vista que: 17 elementos químicos são essenciais para as plantas (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cl, B e Mo); no mínimo outros cinco elementos (Na, Si, Co, Se e Al) são considerados benéficos em determinadas espécies; alguns elementos essenciais possuem elementos análogos quimicamente (Ba e Sr são análogos de Ca e Mg; Rb é análogo de K; Cd é análogo de Zn; Se é análogo de S) (Marschner, 2012) e; vários elementos (Al, As, Cd, Cr, Hg, Pb, Se) podem ter efeito de hormese nas plantas (Poschenrieder et al., 2013). A nutrição humana é outra área cujo interesse pela composição elementar da erva-mate é elevado, já que produtos à base de erva-mate fazem parte da dieta de milhares de consumidores. Assim, a fertilidade do solo, a nutrição de plantas e a nutrição humana acabam se entrelaçando. Além disso, a análise da composição elementar também pode ter aplicações envolvendo outras áreas de pesquisa, como, por exemplo, botânica, ecologia, farmacognosia, medicina, tecnologia de alimentos e segurança alimentar. Vale destacar que existe legislação específica para estabelecer os níveis permitidos de três elementos potencialmente tóxicos (As, Cd e Pb) nas folhas de erva-mate.

Por ocorrer em solos ácidos, a erva-mate pode apresentar teores elevados de Al e Mn (acima de 1000 mg kg^{-1}) (Reissmann et al., 1999), sendo normalmente superiores aos teores dos micronutrientes Fe, Zn, Cu, Ni, B e Mo (Oliva et al., 2014; Maiocchi et al., 2016). Para Mn muitas vezes seus teores são similares aos teores dos macronutrientes Mg e P (Reissmann et al., 1999). Outro elemento que indica que a erva-mate é bem adaptada às condições de solos ácidos é o P, que com frequência é registrado em teores foliares abaixo de 1 g kg^{-1} . Valores próximos ou superiores a 100 mg kg^{-1} têm sido observados para Zn, sugerindo que erva-mate pode ter alta capacidade de aquisição e/ou transporte. Por outro lado, é interessante notar que a literatura sobre os teores de As, Ba, Cd, Cs, Cr, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti e V nas folhas de erva-mate é incipiente. O mesmo é válido para o conhecimento acerca da importância de variações de solo e planta para a composição multielementar da erva-mate, mais especificamente com relação à composição do solo, a adubação, a variação genotípica e o tecido da planta ou, a interação entre esses fatores. Para tanto são necessárias análises de uma ampla gama de elementos químicos, seja o teor total ou em microanálises para diferentes tecidos da planta.

LITERATURA CITADA

Cardozo Junior EL, Morand C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A, St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. *Journal Functional Foods*, 2016; 21:440-454.

Gerhardt, M. História ambiental da erva-mate. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. 290f. 2013.

IGBP-DIS. SoilData: pH soil. A program for creating global soil-property databases, IGBP Global Soils Data Task, France. 1998.

Marschner, P. Marschner's Mineral nutrition mineral nutrition of higher plants. 3.ed. London; 2012.

Maiocchi MG, Vitto LA, Petenatti ME, Marchevsky EJ, Avanza MV, Pellerano RG, Petenatti EM. Multielemental composition and nutritional value of “dumosa” (*Ilex dumosa*), “yerba mate” (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UnCuyo*, 2016; 48(1): 145-159.

Oliva EV, Reissmann CB, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Composição nutricional de procedências e progênes de erva-mate (*ilex paraguariensis* St.Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho distroférico. *Ciência Florestal*, 2014;24(4):793-805.

Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*, 2013. 212:15-25.

Reissmann, CB, Radomski MI, Quadros RMB. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St, Hil, under different management conditions in seven localities of Paraná state, Brazilian. *Archives of Biology and Technology*, 1999; 42:187-194.

CAPÍTULO 1. ADUBAÇÃO FOSFATADA EM SOLOS ÁCIDOS AFETA O CRESCIMENTO DA PLANTA E A COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE FOLHAS DE CLONES DE ERVA-MATE

RESUMO

A erva-mate responde a adubação fosfatada em algumas condições, embora pouco se conheça sobre o grau de influência de fatores genéticos e de solo na composição da planta. O objetivo do estudo foi avaliar crescimento da planta, nutrientes e elementos potencialmente tóxicos em folhas de clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada em solos ácidos. Em casa-de-vegetação, foram cultivadas mudas de dois clones de erva-mate, cada clone em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (P – sem e com *versus* quatro solos ácidos). Foram determinados o crescimento vegetal e a composição elementar das folhas [teor total (20 elementos); em escala microscópica (10 elementos) para condição com acúmulo de Mn nas folhas]. Em condição de campo, em dois locais foram realizados experimentos envolvendo adubação fosfatada (cinco doses de P) e dois clones de erva-mate, com determinação dos teores totais de 20 elementos nas folhas. Adubação fosfatada propicia efeito positivo no crescimento da erva-mate cultivada em casa-de-vegetação (incremento de 34 % a 1000 % na matéria seca da parte aérea). A adubação fosfatada altera a composição elementar (nutrientes e elementos potencialmente tóxicos) das folhas de erva-mate. O efeito da adubação varia entre solos e clones. Assim, a resposta da erva-mate a adubação fosfatada é afetada por fatores edáficos e de planta, o que pode trazer impactos na nutrição vegetal e, na qualidade das folhas de erva-mate com relação à presença de nutrientes e elementos indesejáveis para humanos.

Palavras-chave: Fertilidade do solo. análise multielementar. Segurança alimentar. Potencial biológico. Propagação clonal.

CHAPTER 1. PHOSPHATE FERTILIZATION IN ACID SOILS AFFECTS PLANT GROWTH AND ELEMENTAL COMPOSITION OF LEAVES OF YERBA MATE CLONES

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St., Hil.) responds to phosphate fertilization under certain conditions, although little is known about the degree of influence of genetic and soil factors on elemental composition of this plant. The main objective of this study was to evaluate plant growth and content of nutrients and potentially toxic elements in the leaves of yerba mate clones in response to phosphate fertilization in acid soils. Under greenhouse conditions, seedlings of two yerba mate clones were grown, each in a completely randomized design in a factorial scheme (without and with P versus four acid soils). Plant growth and elemental composition of leaves were determined [total content (20 elements); in microscopic scale (10 elements) under conditions of Mn accumulation in the leaves]. Under field conditions, two experiments were carried out involving phosphate fertilization (five P doses) and two yerba mate clones, to determine total content of 20 elements in the leaves. Phosphate fertilization had a positive effect on the growth of yerba mate cultivated in the greenhouse (34–1000% increase in dry matter of the aerial part of the plant). Phosphate fertilization also altered elemental composition (nutrients and potentially toxic elements) of yerba mate leaves. The effects of fertilization varied between soils and clones. Thus, the response of yerba mate to phosphate fertilization was affected by edaphic and plant factors. Phosphate fertilization may have an impact on plant nutrition and quality of yerba mate leaves with respect to the presence of nutrients and other elements that are undesirable for human consumption.

Keywords: Soil fertility. Multielemental analysis. Food security. Biological potential. Clonal propagation.

1.1. INTRODUÇÃO

A erva-mate é uma árvore nativa da região austral da América do Sul, sendo encontrada no Brasil, Argentina e no Paraguai. Tradicionalmente o consumo da erva-mate nos países de origem é na forma de chimarrão (infusão com água quente) e tererê (infusão com água fria). Além disso, bebidas industrializadas, suplementos alimentares, fármacos e cosméticos também têm sido elaborados a partir de folhas da planta (Cardozo Junior & Morand, 2016).

Os solos onde a erva-mate é encontrada chamam a atenção devido a elevada acidez (pH-CaCl₂ 3,6 até 5,1) e os altos teores disponíveis de Al (forma trocável, Al³⁺; 0,1 até 7,0 cmol_c dm⁻³) e Mn (8 até 150 mg kg⁻¹), indicando que a espécie é tolerante a essa condição extrema (Fossati, 1997; Reissmann et al, 1999; Pandolfo et al., 2003; Oliva et al., 2014), que é incomum para a maioria das espécies cultivadas. Assim, a erva-mate e o globalmente consumido chá (*Camellia sinensis*) são similares, devido a ocorrência na forma nativa em solos ácidos (Chen et al., 2008). Por outro lado, o baixo pH dos solos ácidos pode afetar a dinâmica de diversos outros elementos no solo, com destaque para a maior disponibilidade de Cu, Fe, Ni, Zn, Pb e Cd e, a menor disponibilidade de Mo e P (Kabata-Pendias, 2011). Contudo, a disponibilidade de elementos em solos ácidos também é influenciada por outros fatores, como, material de origem, mineralogia, matéria orgânica e textura (Motta & Melo, 2009; Kabata-Pendias, 2011; Gérard, 2016).

Em caso de baixa disponibilidade de P no solo as plantas podem ativar mecanismos próprios ou associados com outros organismos para tentar obter esse nutriente do solo. A exsudação de determinadas moléculas (enzimas, ácidos orgânicos e flavonoides) que solubilizam formas menos disponíveis de P no solo é um desses mecanismos, muito embora também possam solubilizar outros nutrientes ou elementos potencialmente tóxicos. Por outro lado, a adição de P favorece o metabolismo das plantas; em consequência a exsudação radicular total de moléculas pode aumentar, embora sem a mesma quantidade de moléculas específicas para solubilizar P (Vance et al., 2003; Lin et al., 2011). Todavia, a interação da planta com o solo na aquisição de P e outros elementos, provavelmente é influenciada pelo genótipo da planta e pelo tipo de solo. Além disso, outro complicador é que isso não significa necessariamente aumento nos teores foliares, haja vista que isso depende de maior transporte

das raízes para a parte aérea, bem como de fatores de crescimento e de fisiologia da planta (Marschner, 2012).

Por apresentar baixos teores de P nas folhas (Reissmann et al., 1999), a erva-mate poderia ser considerada uma espécie pouco exigente em P. Em contraste, têm sido registrados incrementos no crescimento da espécie em resposta a adubação fosfatada, inclusive com doses elevadas, indicando que a erva-mate é exigente em P (Ceconi et al., 2007; Santin et al., 2008; Santin et al., 2013). No entanto, poucos estudos têm determinado os efeitos sobre a composição elementar das folhas. Nesse sentido, avaliando a influência da adubação fosfatada na composição elementar de folhas de mudas de erva-mate, Zampier (2001) verificou alterações nos teores de K e Fe, enquanto que Santin et al. (2013) verificaram alterações nos teores de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu e Zn. Em condições de campo, Pandolfo et al. (2003) verificaram apenas alteração nos teores de P devido a adubação fosfatada. Adicionalmente, também são incipientes na literatura pesquisas considerando os efeitos da adubação fosfatada nos teores de nutrientes, elementos benéficos ou elementos potencialmente tóxicos nas folhas de diferentes materiais genéticos de erva-mate. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento e a composição elementar de folhas de clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada em solos ácidos.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

Foram coletadas amostras da camada superficial (0-20 cm) de quatro solos ácidos (LV, Latossolo Vermelho, CX1, CX2, CX3, Cambissolo Háplico 1, 2 e 3, respectivamente), em Jaguariaíva-PR, Pinhais-PR, São Mateus do Sul-PR e Rio dos Cedros-SC. Posteriormente as amostras foram secas ao ar e passadas por peneira com 4 mm de abertura. Para caracterização das amostras de solo foram realizadas análises químicas e físicas, com os resultados apresentados na TABELA 1 e APÊNDICE 1. Além disso, é importante destacar que o material de origem de cada solo (LV, CX1, CX2 e CX3) foi o arenito, argilito esmectítico, xisto e argilito/siltito, respectivamente.

TABELA 1. Resultado da análise granulométrica e química dos quatro solos utilizados no experimento

Solo	Areia	Silte	Argila	pH-CaCl ₂	H+Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	CTC	m	
	----- g kg ⁻¹ -----				----- cmol _c dm ⁻³ -----							%
LV	850	25	125	3,80	5,00	1,60	0,20	0,10	0,02	5,32	83	
CX1	475	212	313	3,90	15,20	4,70	1,10	0,35	0,09	16,74	75	
CX2	337	238	425	3,70	16,30	8,00	1,80	1,00	0,26	19,36	72	
CX3	275	225	500	3,50	15,20	14,00	0,50	0,70	0,14	16,54	91	
	P	Fe	Mn	Cu	Zn	Ni	B	Ba	Co	Cr	Pb	
	----- mg dm ⁻³ -----											
LV	3,00	170	2,00	1,00	0,30	0,04	0,68	1,00	0,070	0,27	1,50	
CX1	2,20	38	3,00	0,25	4,40	0,08	0,43	2,00	0,004	0,16	0,72	
CX2	6,20	120	48,70	1,70	1,80	0,18	0,57	3,34	0,050	0,09	0,39	
CX3	2,50	267	2,10	1,00	1,70	0,16	0,59	3,41	0,170	0,37	0,46	
	As	V	Mo	Cd	Bc-Al ₂ O ₃	Bc-Fe ₂ O ₃	Bc-MnO ₂	C-Al ₂ O ₃	C-Fe ₂ O ₃	C-MnO ₂	CO	
	mg dm ⁻³		µg dm ⁻³		----- g kg ⁻¹ -----						g dm ⁻³	
LV	0,15	0,99	2,19	4,15	1,52	1,54	0,001	7,07	3,53	nd	15,0	
CX1	0,09	0,10	17,00	8,90	4,27	7,14	0,015	9,56	23,77	nd	30,0	
CX2	0,16	0,06	5,00	10,00	2,35	2,96	0,175	7,66	21,23	0,10	32,0	
CX3	0,06	0,20	2,80	11,00	2,73	4,75	0,005	6,92	22,66	nd	20,0	

LV, Latossolo Vermelho, CX1, CX2, CX3, Cambissolo Háplico 1, 2 e 3, respectivamente. As amostras de LV, CX1, CX2 e CX3 apresentam textura arenosa, média, argilosa e argilosa, respectivamente. pH (CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹); Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ (extraído com KCl 1 mol L⁻¹); H + Al³⁺ (extração com acetato de Ca 0,5 mol L⁻¹); carbono orgânico (CO) (método volumétrico dicromato de potássio); K⁺, P, Mn, Fe, Cu, Zn (extrator Mehlich-1; relação solo:solução 1:10); As, Ba, Co, Co, Cr, Ni, B, Pb, V, Cd, Mo (extrator Mehlich-1; relação solo:solução 1:5); areia, silte, argila (método do densímetro); Bc e C, respectivamente, indicam formas de baixa cristalinidade e formas cristalinas; CTC = capacidade de troca de cátions a pH 7,0; m = saturação por Al³⁺. nd = não detectado.

Em dezembro de 2013 foram instalados, em casa de vegetação, em Curitiba (PR), dois experimentos, sendo o primeiro com mudas de erva-mate do clone 1 (BRS 408) e o segundo com mudas do clone 2 (BRS BLD Aupaba). As plantas foram selecionadas em um teste de procedências e progênies implantado em 1997, em Ponta Grossa, PR, propagados por miniestaquia, conforme metodologia descrita em Wendling e Brondani (2015). Em ambos os experimentos se utilizou delineamento inteiramente casualizado com arranjo dos tratamentos em esquema fatorial 2 x 4 (dois níveis de adubação fosfatada x quatro solos) com seis repetições. Cada unidade experimental constou de um vaso de plástico (volume de 8 L) contendo 6.5 kg de solo e uma muda de erva-mate.

Os tratamentos de P constaram de: ausência de P (controle) e; 250 mg kg⁻¹ de P, metade aplicada na forma de NH₄H₂PO₄ e a outra metade na forma de KH₂PO₄ (PA).

Adicionalmente, em todos os tratamentos, foram aplicados 200 mg kg⁻¹ de K (fonte KCl) e 100 mg kg⁻¹ de N [fonte (NH₂)₂CO]. Dois e quatro meses após a instalação dos experimentos foi aplicado 50 mg kg⁻¹ de N, usando como fonte sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] e ureia [(NH₂)₂CO], respectivamente.

Na casa de vegetação o controle de temperatura foi realizado por extratores de ar e sistema de umedecimento do ar. Quando a temperatura atingia 28 °C o sistema de ventilação-umedecimento era ativado automaticamente, sendo que este permanecia ligado até que a temperatura fosse inferior a 28 °C. As plantas de erva-mate foram cultivadas em condição parcialmente sombreada (aluminet 50 %). A irrigação foi efetuada com água deionizada conforme a necessidade da cultura. Aproximadamente a cada duas semanas os vasos foram aleatorizados, sendo que estes permaneceram sobre estrados (80 cm de altura).

Transcorridos 210 dias foi determinada a altura das plantas (do colo até o meristema principal) e foram coletadas folhas expandidas na região do segundo quartil (da base para o ápice) das plantas. As folhas foram lavadas com água deionizada, secas em estufa (48 h a 65 °C), pesadas em balança digital (0,001 g), moídas em moinho de facas tipo Willey e passadas em peneira com 1 mm de abertura. Em seguida, as plantas foram cortadas 5 cm acima da superfície do solo, sendo a parte aérea seca em estufa (48 h a 65 °C) e pesada em balança digital (0,001 g).

Os teores de C e N das folhas foram determinados por combustão via seca, com analisador de elementos não-metals (Elementar, Vario EL III), utilizando cerca de 20 mg de folhas. Para análise dos demais elementos foi utilizada metodologia adaptada de Martins e Reissmann (2007). Cerca de 2 g de folhas foram incinerados em cadinhos de porcelana em mufla à 500 °C por 4 horas. Após resfriamento dos cadinhos, as cinzas foram solubilizadas com HCl 3 mol L⁻¹ e novamente os cadinhos ficaram em mufla à 500 °C por 4 horas. Então foram adicionados 10 mL de HCl 3 mol L⁻¹ e os cadinhos permaneceram por 10 minutos em chapa de aquecimento a 70 °C. Transcorrido esse período as soluções de digestão foram filtradas em papel filtro (diâmetro de poros 8 µm) e os extratos coletados em balões volumétricos de 50 mL. Para aferir os balões volumétricos se utilizou água deionizada. Nos extratos obtidos foram determinados: P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo, Co, As, Cd, Pb, Ba, Cr e V com espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Varian, 720-ES). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Plantas, no Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR

Em adição, folhas da mesma região coletada para análise elementar (para os dois clones no solo CX2 com adubação fosfatada) foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura [(MEV) (FEI, Quanta 450 FEG)] combinada com espectroscopia por dispersão de energia [(EDS) (EDAX, Apollo XL SDD)]. Secções da região central das folhas foram fixadas a 4 °C no escuro dentro de ependorf de 3 ml contendo solução FAA (5 % [v/v] formalina, 5 % [v/v] ácido acético glacial e 70 % [v/v] etanol) e posteriormente armazenadas em álcool 70 %. As secções foram então submetidas à desidratação em série etílica de 80, 90, 95 e 100 %, à desidratação ao ponto crítico com CO₂ líquido, montadas em suportes (stubs) de alumínio recoberto com fita dupla-face de cobre e analisadas em MEV-EDS. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Para explorar de maneira geral o perfil elementar dos clones de erva-mate, os dados dos dois experimentos foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) seguindo delineamento completamente casualizado com dois tratamentos (Clone 1 x Clone 2), com 48 repetições. Adicionalmente, as interações entre os elementos foram analisadas através de correlações de Pearson e análise de componentes principais (ACP).

1.2.2. EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

O estudo foi realizado em áreas experimentais localizadas nos municípios de Itaiópolis (26°25'44" S e 49°55'45" O) e Três Barras (26°11'35" S e 50°13'55" O), no estado de Santa Catarina (Figura 1). Nesses locais foram instalados experimentos para avaliar a resposta da erva-mate a adubação fosfatada. Em Itaiópolis o clima é Cfb e está a 812 m de altitude, sendo que a temperatura média anual é 17,1 °C e a precipitação média anual é 1626 mm. Em Três Barras o clima é Cfb e está a 799 m de altitude, sendo que a temperatura média anual é 17,4 °C e a precipitação média anual é 1564 mm (Alvares et al., 2013).

O solo coletado nos locais dos experimentos, segundo (Embrapa, 2013), é Cambissolo húmico (CH), textura argilosa (Itainópolis) e Latossolo Vermelho (LV), textura muito argilosa (Três Barras), cujas principais características (camada 0 até 20 cm) estão apresentadas na TABELA 2. O histórico das áreas (obtido junto aos produtores) revela que anteriormente aos experimentos, em Três Barras o solo foi cultivado com culturas agrícolas anuais e, em Itaiópolis, com reflorestamento de pinus.

As mudas foram produzidas pela Baldo S.A. (São Mateus do Sul-PR) e Embrapa Florestas (Colombo-PR). A propagação das mudas foi efetuada por miniestaquia a partir de clones resgatados via enxertia e estaquia, conforme Wendling et al. (2007). As mudas foram transplantadas para o campo após passarem pelas fases de enraizamento, aclimatação, rustificação e ao atingirem altura média de 12 cm. As mudas foram de dois clones fêmeas (F1-BRS BLD Aupaba e F2-ainda sem registro).

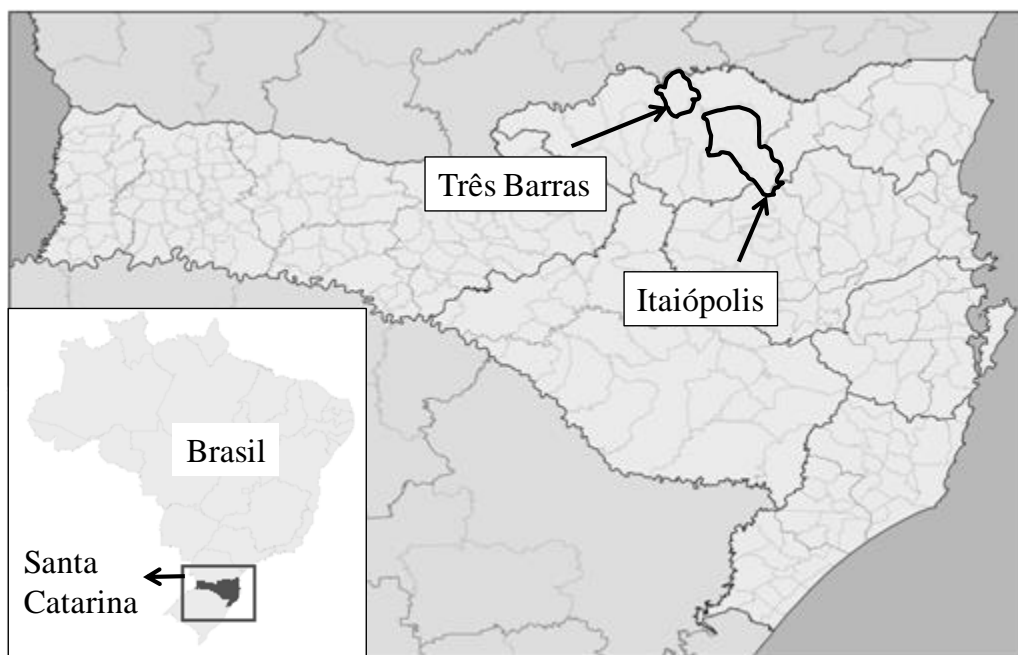


FIGURA 1. Localização dos dois municípios onde foram realizados os experimentos com adubação fosfatada em clones de erva-mate, no estado de Santa Catarina, Brasil.

TABELA 2. Teor de argila e propriedades químicas do solo na camada de 0 a 20 cm de profundidade nos locais dos experimentos.

Local	pH	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H+Al ³⁺	CTC	V	m	Argila	CO	P	K
	H ₂ O	----- cmol. dm ⁻³ -----					----- % -----			g dm ⁻³	mg dm ⁻³	
Três Barras	5,2	6,45	1,73	1,31	6,2	15,22	59,28	12,68	64	27,8	8,6	251
Itaiópolis	4,9	2,39	0,51	4,71	13,7	17,12	20,00	57,90	51	23,8	8,2	204

Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ (extraído com KCl 1 mol L⁻¹); H + Al³⁺ (extração com acetato de Ca 0,5 mol L⁻¹); carbono orgânico (CO) (método volumétrico dicromato de potássio); K⁺ e P (extrator Mehlich-1; relação solo:solução 1:10); argila (método do densímetro); CTC = capacidade de troca de cátions a pH 7,0; m = saturação por Al³⁺.

O preparo de solo consistiu da subsolagem com uma haste na linha de plantio a 40 cm de profundidade. O espaçamento de plantio foi de 2 x 2,5 m, sendo que em Itaiópolis a unidade experimental foi composta de 12 plantas e em Três Barras composta de seis plantas de erva-mate.

O plantio foi realizado em setembro de 2013 e foram testadas as doses 0, 2,3, 4,5, 6,8 e 9,0 g planta⁻¹ ano⁻¹ de P₂O₅, sendo a fonte o superfosfato triplo (42 %). Com base no trabalho de Santin et al. (2013) utilizou-se doses de 7,5 e 4,8 g planta⁻¹ ano⁻¹ de N, e K₂O, respectivamente, nas fontes de ureia (45 % de N), e cloreto de potássio (60 % de K₂O). Para o plantio, aplicou-se 50 % da dose de cada adubo, sendo todos homogeneizados a 15 dm⁻³ de solo. Para isso, retirava-se o solo da cova e aferia-se seu volume em um balde e, na sequência, o solo e adubos eram acondicionados em um saco plástico onde eram homogeneizados. Ao final, o solo já adubado retornava à cova, quando na sequência eram plantadas as mudas de erva-mate. Para a adubação de N, P e K pós-plantio parcelou-se a dose anual em duas vezes iguais, aplicadas nos meses de janeiro e setembro. As adubações pós-plantio foram realizadas em janeiro e setembro de 2014 e janeiro de 2015, aos 04, 12 e 16 meses após o plantio das mudas, respectivamente. A adubação pós-plantio foi aplicada superficialmente na área de projeção da copa, mantendo uma distância de 20 cm de raio da planta sem aplicar adubo. Para a área experimental de Itaiópolis, devido o teor de Ca e Mg no solo estar em menor disponibilidade que o de Três Barras (TABELA 2), aplicou-se superficialmente, 3,5 t ha⁻¹ de calcário dolomítico (CaO e MgO, respectivamente, de 31,6 e 20,3 %).

As áreas experimentais foram sempre mantidas com cobertura verde, com sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*) no verão e aveia-preta (*Avena strigosa*) no inverno e, no final do ciclo de cada cobertura verde foi efetuada a roçada na área.

Em agosto de 2015 (23 meses após o plantio), realizou-se a primeira colheita, com poda drástica, que consistiu no corte do tronco a uma altura entre 10 a 15 cm acima do solo, permanecendo somente os brotos basais laterais. Esse tipo de poda serve para forçar o surgimento de vários brotos basais que favorecem a futura formação da copa adequada.

No momento da colheita a biomassa colhida foi separada em erva-mate comercial (ECOM= folha mais galho fino com diâmetro máximo de 7 mm, aproximadamente) e galho grosso (GG= todo o galho que sobra da colheita com diâmetro a partir de 7 mm, aproximadamente). No momento da colheita coletou-se uma amostra representativa de ECOM

(± 500 g), retirada na metade da altura da copa (~3 ramos de cada uma das plantas da unidade experimental), onde foram separadas as folhas e os galhos finos.

Em laboratório, as amostras de folhas foram secas em estufa a 65 °C até peso constante e, trituradas em moinho tipo Wiley. As amostras (~200 mg) foram submetidas a digestão usando sistema fechado de digestão por microondas (Ethos 1, Milestone SrL) com solução nitro-peróxida (2 mL HNO₃, 1 mL de água 18,2 MΩ cm e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30 %). Os elementos Al, B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V e Zn foram determinados usando espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS; Agilent 7500ce). Essas análises foram realizadas na *University of Nottingham* (Reino Unido).

Para estimar a contribuição da ingestão da infusão de folhas de erva-mate nos dois clones avaliados foram utilizados dados de Barbosa et al. (2015). Especificamente, foi considerada a solubilidade de determinado elemento em água quente e a contribuição para índices de ingestão de elementos (ingestão diária recomendada, IDR; ingestão diária tolerada, IDT) para estimar a contribuição das folhas dos clones de erva-mate e os locais em que os experimentos foram realizados.

Para cada local (Itaiópolis e Três Barras) os tratamentos (doses e clones) foram arrançados em esquema de parcela subdividida, com cinco doses de P e dois clones, sendo na parcela as doses de P e na subparcela os clones de erva-mate. Os dados foram submetidos a análise de variância (p<0,05) e quando necessário comparando clones pelo teste t (p<0,05) e as doses de P por regressão. Para comparar os locais, foi considerada a média de todos os tratamentos em cada local e comparados pela análise de variância e se necessário pelo teste t. Foram analisadas as correlações de Pearson entre as concentrações dos elementos nas folhas de cada clone de erva-mate.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO

Os resultados apresentados na FIGURA 2 indicam variação no grau de resposta a adubação fosfatada entre clones e solos utilizados. Em geral, as plantas apresentaram maior crescimento no solo CX2 na ausência de P e menor resposta a adubação fosfatada. O clone 2

mostrou ser menos produtivo na ausência de P e mais responsivo à aplicação de P: incremento de 57 % a 500 % e 34 % a 1000 % na matéria seca para Clone 1 e Clone 2, respectivamente. O baixo potencial explicativo do efeito da adubação fosfatada nos valores de altura decorre da intensa ramificação lateral que ocorreu nas plantas, comprometendo o crescimento do caule principal. Em outros estudos com erva-mate em condições de vasos têm sido verificado efeito positivo da adubação fosfatada na altura e na produção de matéria seca das plantas, com máximo incremento até doses de 450 mg P kg⁻¹ (Ceconi et al., 2007; Santin et al., 2008; Santin et al., 2013).

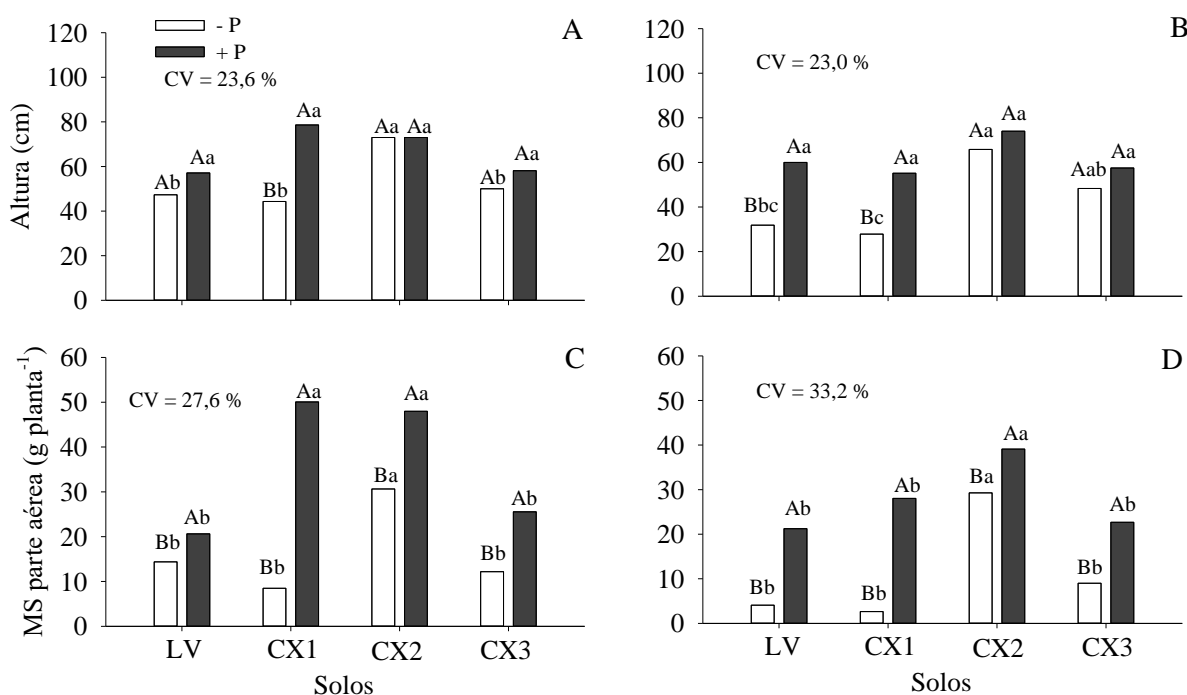


FIGURA 2. Altura (A e B) e matéria seca (MS) da parte aérea (C e D) de clones de erva-mate aos 210 dias após a instalação dos experimentos em resposta a adubação fosfatada conduzido em diferentes solos (LV= Latossolo Vermelho; CX1= Cambissolo Háplico 1; CX2= Cambissolo Háplico 2; CX3= Cambissolo Háplico 3). Clone 1 = A e C; Clone 2 = B e D; Médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre doses de P e médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem entre solos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). CV significa coeficiente de variação.

Os teores de P nas folhas na ausência de adubação foram valores menores que 1 g kg⁻¹ (TABELA 3). A adubação fosfatada proporcionou acréscimo duas vezes superior no teor de

P nas folhas dos dois clones de erva-mate nos solos LV, CX1 e CX3 (FIGURA 2). Acréscimo tão expressivo normalmente só é observado em condição de carência de P, confirmando o observado para crescimento. Para o solo CX2, menores acréscimos nos teores de P nas folhas são compatíveis com o maior teor de P disponível desse solo (TABELA 1) e menores acréscimos na produção de matéria seca em resposta a adubação fosfatada (FIGURA 2). Em estudo com vasos, Santin et al. (2013) reportam aumento dos teores de P em folhas (0,8 até 1,7 g kg⁻¹) e raízes (1,4 até 2,5 g kg⁻¹) de erva-mate ajustado em um modelo quadrático. Em folhas de plantas de chá (*Camellia sinensis*) cultivadas em solução nutritiva com diferentes níveis de P, Lin et al. (2009) verificaram efeito similar. Ou seja, na medida em que aumenta a disponibilidade de P no solo as alterações dos teores das folhas são menores. Assim, isso pode explicar por que não ocorreu efeito significativo da adubação fosfatada nos teores de P das folhas de erva-mate cultivadas no solo com maior disponibilidade inicial de P (CX2) (FIGURA 2).

Com relação às variações proporcionadas pelos solos verificou-se que, com exceção do Clone 2 na ausência de adubação fosfatada, os maiores teores de P nas folhas não ocorreram no solo com maior disponibilidade inicial de P (CX2). Mas, os aumentos de crescimento confirmam a importância da fosfatagem com P na fase inicial de crescimento, o que sugere a possibilidade de ser um dos motivos dos baixos índices de produtividade da cultura em sistemas sem uso de adubação.

Houve efeito positivo da fosfatagem no teor de C para a maioria das condições (TABELA 3). Nesse sentido, avaliando o chá, Lin et al. (2009) verificaram que plantas com carência de P apresentaram menor capacidade de transporte de elétrons, o que reduziu os teores de ATP e prejudicou a enzima rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) e, em consequência, houve limitação a assimilação de CO₂. Além desses fatores fisiológicos, alterações na anatomia das folhas (proporção entre limbo foliar e nervuras; espessura da folha) podem ter contribuído para os resultados encontrados, o que merece atenção em estudos futuros. A variação nos teores de C nas folhas dos clones de erva-mate foi baixa, corroborando com Barbosa et al. (2015), que avaliaram folhas e frutos de plantas adultas de quatro procedências de erva-mate.

A adubação fosfatada diminuiu os teores foliares de N para plantas cultivadas em três solos no Clone 1 (solos LV, CX1 e CX3) e um solo para o Clone 2 (solo CX1) (TABELA 3).

TABELA 3. Relação C/N e teores (g kg⁻¹) de C, N, K, Ca, Mg e P em folhas de clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada, aos 210 dias após a instalação dos experimentos¹

		Clone 1					Clone 2				
		LV	CX1	CX2	CX3	Média	LV	CX1	CX2	CX3	Média
C/N	- P	14,3Bb	12,9Bb	18,6Aa	13,9Bb	14,9	17,1Aab	11,0Bc	19,6Aa	16,5Ab	16,0
	+ P	18,8Ab	21,8Aa	20,7Aab	18,6Ab	19,7	18,0Ab	19,0Aab	21,2Aa	18,6Aab	19,1
	Média	16,3	17,3	19,6	16,0		17,4	15,0	20,4	17,5	
	CV	11,6					10,7				
C	- P	424Bab	416Bb	435Aa	423Bab	425	434	417	435	427	428B
	+ P	441Aa	448Aa	435Aa	442Aa	441	436	433	435	432	434 A
	Média	432	432	435	433		435	425	435	430	
	CV	3,1					1,8				
N	- P	29,9Aa	33,0Aa	23,5Ab	30,6Aa	29,2	25,4Ab	38,1Aa	22,2Ab	26,3Ab	28,0
	+ P	23,8Ba	20,7Ba	21,3Aa	22,4Ba	22,1	24,5Aa	23,9Ba	21,8Aa	23,5Aa	23,4
	Média	26,9	26,8	22,4	26,5		24,9	31,0	22,0	24,9	
	CV	12,6					11,3				
K	- P	12,5	11,9	12,6	12,6	12,4A	9,6Ab	10,9Aab	11,9Aab	14,3Aa	11,7
	+ P	10,1	8,4	9,3	8,8	9,2B	10,8Aa	9,4Aa	7,8Ba	8,3Ba	9,1
	Média	11,3	10,2	10,9	10,7		10,2	10,1	9,9	11,3	
	CV	29,5					25,6				
Ca	- P	1,9	3,7	5,0	3,7	3,6	2,2Ab	2,5Ab	4,2Ba	2,8Bb	2,9
	+ P	2,2	3,6	4,5	4,7	3,7	2,4Ac	2,5Ac	6,0Aa	4,0Ab	3,8
	Média	2,0b	3,6a	4,7a	4,2a		2,3	2,5	5,1	3,4	
	CV	29,9					22,3				
Mg	- P	1,5Ab	2,6Aa	1,7Ab	2,1Aab	1,9	1,6	2,1	1,8	1,8	1,9A
	+ P	1,9Aa	1,3Bb	1,6Aab	1,9Aa	1,7	1,6	1,5	1,6	1,8	1,6B
	Média	1,7	1,9	1,7	1,9		1,6	1,8	1,7	1,8	
	CV	19,6					19,8				
P	- P	0,6Ba	0,4BA	0,8Aa	0,6Ba	0,6	0,7Bab	0,3Bb	0,8Aa	0,6Bab	0,6
	+ P	1,3Aab	1,1Aab	0,9Ab	1,6Aa	1,2	1,8Aa	0,7Ac	1,0Abc	1,3Ab	1,2
	Média	0,9	0,9	0,7	0,8	1,1	1,3	0,5	0,9	0,9	
	CV	42,6					35,8				

¹ LV= Latossolo Vermelho; CX1= Cambissolo Háplico 1; CX2= Cambissolo Háplico 2; CX3= Cambissolo Háplico 3. Médias seguidas por letras maiúsculas (efeito de P) diferentes e, médias seguidas por letras minúsculas (efeito de solo) diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05). Médias sem letras indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos. Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

Santin et al. (2013) verificaram elevação dos teores de N nas folhas de erva-mate em resposta a adubação fosfatada. Essa variação entre os estudos pode ter relação com a idade das plantas (presente estudo, plantas com 210 de cultivo; Santin e colaboradores, plantas com 120 dias de cultivo), variação na dose de N, entre outros. Em condições de campo, Pandolfo et al. (2003) não constataram influência da adubação fosfatada nos teores de N de folhas de erva-mate. Como reflexo do decréscimo de N combinado ou não com acréscimo de C,

constatou-se aumento da relação C/N das folhas (TABELA 3). Ainda, relação inversa entre crescimento e a relação C/N foi constatada, sendo que plantas que apresentaram maior (com adubação fosfatada nos solos CX1 e CX2) e menor crescimento (sem adubação fosfatada nos solos LV e CX1), a relação C/N média foi 20,6 e 13,8, respectivamente.

Similar ao observado para N, ocorreu diminuição dos teores de K nas folhas do Clone 1 e do Clone 2 (apenas nos solos CX2 e CX3) com a adubação fosfatada (TABELA 3), corroborando com os resultados registrados por Zampier (2001) e Santin et al. (2013). Porém, os resultados também indicam que esse efeito da adubação fosfatada tem variação que depende da interação entre os tratamentos de clones e solos. Em contraste, no presente estudo os teores de K nas folhas dos clones de erva-mate (7,8 até 14,3 g kg⁻¹) apresentaram valores abaixo da faixa encontrada por Zampier (2001) e por Santin et al. (2013), respectivamente, com plantas de 360 dias (8,6 até 21,2 g kg⁻¹) e com plantas de 120 dias (9 até 22,5 g kg⁻¹).

Os clones diferiram quanto à resposta ao uso de P sobre os teores foliares de Ca (TABELA 3). De maneira geral, os menores teores de Ca nas folhas dos clones de erva-mate ocorreram para o solo LV, acompanhando a baixa disponibilidade no solo (TABELA 1). No Clone 2 o solo LV não diferiu dos solos CX1 e CX3 (ausência de adubação fosfatada) (TABELA 3), indicando variações entre os clones. Contudo, os baixos teores de Ca para o solo LV podem ter limitado a resposta dos clones de erva-mate à adubação fosfatada nesse solo (FIGURA 2). Por outro lado, a adubação fosfatada afetou apenas os teores de Ca nas folhas do Clone 2 (CX2 e CX3), onde se verificou elevação dos teores. Zampier (2001) e Pandolfo et al. (2003) não verificaram alterações nos teores de Ca nas folhas de erva-mate em resposta a adubação fosfatada, enquanto Santin et al. (2013) verificaram diminuição.

Similar ao Ca, Mg foliar diferiu devido a aplicação de P (TABELA 3). Mas, diferente do Ca, baixos teores de Mg disponível no solo não determinaram baixos teores nas folhas dos clones de erva-mate cultivados no LV. A adubação fosfatada causou decréscimo nos teores de Mg nas folhas dos clones de erva-mate (Clone 1 no solo CX1; Clone 2 na média dos solos), sendo que no Clone 1 a queda nos teores foi tão pronunciada que inverteu a diferença do solo CX1 em relação aos demais: maior teor sem adubação; menor teor com adubação (TABELA 3). Avaliando a composição elementar de erva-mate em resposta adubação fosfatada, Santin et al. (2013) também verificaram decréscimo nos teores de Mg devido a adubação. Em condições de campo, Pandolfo et al. (2003) verificaram decréscimo nos teores de Mg nas folhas de erva-mate em resposta a adubação com cama de aviário, ou

seja, mesmo com a aplicação de Mg. Isso pode ser um indicativo de que as variações nos teores de Mg nas folhas ocorrem devido o incremento da produção, que dilui os teores do nutriente. Contudo, o efeito da adubação fosfata sobre os teores de Mg nas folhas provavelmente depende do tipo de solo e do material genético de erva-mate (TABELA 3), tendo em vista que no Clone 1 para três solos (LV, CX2, CX3) não houve variação dos teores do nutriente (TABELA 1).

Para os micronutrientes avaliados foi observado grande variação entre os clones (TABELA 4), sendo que para o Clone 1: não houve efeito dos tratamentos para Fe e Mo; efeito do solo sobre Zn, Cu e Ni; efeito da adubação fosfatada sobre Mn; e da interação apenas sobre B. Já para o Clone 2, predominou a interação entre solo e a adubação fosfatada, influenciando Fe, Zn, Cu, Ni e B; ainda, efeito do solo sobre Mn e, adubação fosfatada sobre Mo.

No solo CX2 a adubação fosfatada elevou o teor de Fe nas folhas (61 para 105 mg kg⁻¹) do Clone 2, enquanto que nas demais condições não ocorreu nenhuma alteração (TABELA 4). Em oposição, Santin et al. (2013) verificaram menores teores de Fe em folhas de erva-mate devido à adubação fosfatada. A adubação fosfatada poderia reduzir os teores de Fe nas folhas devido à formação de complexos com o P (FePO₄.nH₂O; Fe₃(PO₄).2H₂O), embora isso seja dificultado quando o Fe é complexado primeiro por compostos orgânicos (Kabata-Pendias, 2011). Porém, as plantas cultivadas no solo com maior disponibilidade inicial de P (CX2) não apresentaram baixos teores de Fe nas folhas em relação aos demais solos. Assim, a relação entre P e Fe na erva-mate parece variar com interação entre a dose de P, o material genético (diferenças de aquisição e transporte de Fe) e o solo (formas de Fe e microflora).

A adubação fosfatada diminuiu o teor de Mn nas folhas da erva-mate apenas para o Clone 1 (TABELA 4). Contudo, a adubação fosfatada e os clones não superaram a contribuição do solo para os teores de Mn no solo CX2, onde os teores foliares ultrapassaram 1000 mg kg⁻¹ (Clone 1 = 1249 mg kg⁻¹; Clone 2 = 1033 mg kg⁻¹). Esse resultado deve-se a alta disponibilidade de Mn no solo CX2 (TABELA 1). Em análise de folhas de erva-mate provenientes de diferentes regiões do Paraná, Reissmann et al, (1999) reportam teores de Mn nas folhas variando de 346 até 3330 mg kg⁻¹, embora não tenha sido determinado o Mn no solo.

TABELA 4. Teores (mg kg^{-1}) de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B e Mo em folhas de clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada, aos 210 dias após a instalação dos experimentos¹

		Clone 1					Clone 2				
		LV	CX1	CX2	CX3	Média	LV	CX1	CX2	CX3	Média
Fe	- P	64	82	72	75	73	63Aa	83Aa	61Ba	78Aa	71
	+ P	68	77	74	75	74	76Aab	55Ab	105Aa	78Aab	74
	Média	66	79	73	75		61	68	83	77	
	CV	25					34				
Mn	- P	130	521	1329	477	614A	145	418	1141	443	536
	+ P	162	273	1169	339	485B	129	347	926	349	437
	Média	145c	346b	1249 a a ^a	408b		136b	382b	1033a	395b	
	CV	24					66				
Zn	- P	27	81	29	57	48	46Aa	76Ba	46Aa	79Aa	61
	+ P	29	83	22	26	40	64Ab	133Aa	50Ab	46Bb	73
	Média	28b	82a	25b	41b		55	104	48	62	
	CV	48					36				
Cu	- P	4,1	3,5	4,5	6,3	4,6	3,0Ab	2,9Ab	4,9Ab	7,1Aa	4,5
	+ P	3,5	2,5	5,3	4,8	4,0	4,1Aa	2,1Ab	4,7Aa	4,4Ba	3,8
	Média	3,8bc	3,0c	4,9ab	5,5 a		3,6	2,4	4,8	5,7	
	CV	29					31				
Ni	- P	1,2	0,4	0,9	1,1	0,9	0,5Ab	0,3Ab	0,9Aab	1,5Aa	0,8
	+ P	1,2	0,4	0,9	1,0	0,9	0,7Aab	0,3Ab	1,1Aa	0,9Ba	0,7
	Média	1,2a	0,4b	0,9ab	1,1ab		0,5	0,3	1,0	1,2	
	CV	75					51				
B	- P	48Aa	66Aa	19Ab	10Ab	36	43Ab	67Aa	29Ac	13Ad	38
	+ P	34Ba	34Ba	15Ab	8Ab	22	36Aa	39Ba	21Ab	11Ab	27
	Média	41	50	17	9		39	53	25	12	
	CV	21					21				
Mo	- P	0,10	0,17	0,35	0,29	0,23	0,10	0,37	0,26	0,09	0,20A
	+ P	0,12	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10	0,15	0,08	0,09	0,10B
	Média	0,11	0,13	0,22	0,19		0,10	0,26	0,17	0,09	
	CV	129					110				

¹ LV= Latossolo Vermelho; CX1= Cambissolo Háplico 1; CX2= Cambissolo Háplico 2; CX3= Cambissolo Háplico 3. Médias seguidas por letras maiúsculas (efeito de P) diferentes e, médias seguidas por letras minúsculas (efeito de solo) diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias sem letras indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos. Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

Guimarães et al. (2014) verificaram relações significantes entre os teores de Mn em folhas de progênies de erva-mate e os teores disponíveis desse elemento no solo (extraídos por Mehlich-1 ou EDTA). Todavia, vale destacar que apesar dos altos teores de Mn nas folhas da erva-mate (árvores adultas e mudas) não ocorrem sintomas de toxidez, indicando que a planta possui mecanismos de tolerância, sendo que um desses mecanismos pode ser a acumulação de Mn na epiderme superior das folhas (FIGURA 3). Resultados similares foram

reportados para a distribuição de Mn em folhas de plantas de chá (*Camellia sinensis* L.) (Memon et al., 1981). As células da epiderme das folhas têm sido apontadas como um dos principais sítios para a compartimentalização de metais em folhas de plantas acumuladoras, evitando que o excesso de metais prejudique as funções metabólicas (Leitenmaier & Küpper, 2013).

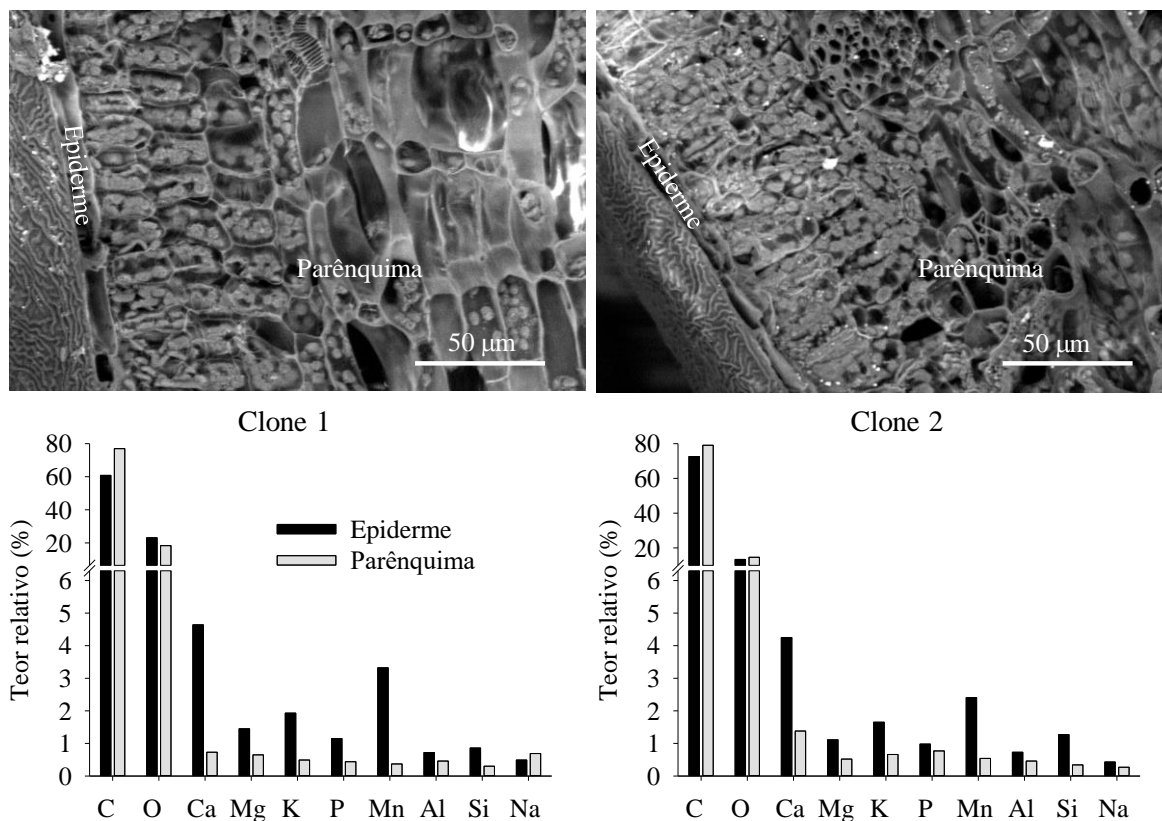


FIGURA 3. Teor relativo (%) de elementos na epiderme e parênquima de folhas de clones de erva-mate cultivadas no Cambissolo Háplico 2 (CX2) com adubação fosfatada (P - 250 mg kg⁻¹) obtidos com MEV-EDS. O teor de cada elemento é relativo à soma de todos os elementos (100 %).

O solo de maneira isolada ou em conjunto com aplicação de P, teve grande influência sobre o teor de Zn foliar (TABELA 4). Mas, o teor foliar pode ser considerado normal a alto, mesmo no cultivo de solo com baixo nível, como o LV (TABELA 1). Isso indica alta capacidade de extração de Zn pela planta, sendo que os teores corroboram com valores encontrados em folhas (Zampier, 2001) e no produto final (Giulian et al., 2009),

respectivamente. O esperado decréscimo no teor de Zn em resposta a adubação fosfatada não ocorreu, sendo obtidos resultados contrastantes: sem efeito na maioria dos casos; acréscimo (solo CX1) e decréscimo (solo CX3) nos teores de Zn nas folhas do Clone 2 (TABELA 4). Santin et al. (2013) verificaram diminuição nos teores de Zn nas folhas de erva-mate em decorrência da adubação fosfatada, enquanto Zampier (2001) constatou efeito nulo. Para diversas espécies vegetais tem sido relatado que o P pode interferir na absorção e transporte do Zn (Kabata-Pendias, 2011). Contudo, com base no presente estudo pode-se dizer que essa interferência do P na aquisição de Zn pode ser menos comum na erva-mate. Em contraste, o incremento nos teores de Zn nas folhas do Clone 2 (TABELA 4) com a adubação fosfatada indica que para um solo com alta disponibilidade de Zn (CX1) o benefício do P no crescimento das plantas pode ter estimulado a absorção ou transporte de Zn.

O efeito da adubação fosfatada sobre os teores de Cu e Ni foi restrito para um solo e um clone (Clone 2 no solo CX3), similar ao observado para Zn (TABELA 4). Santin et al. (2013) reportam menores teores de Cu nas folhas de plantas cultivadas sob doses de P. Em geral, o cultivo no solo CX1 proporcionou os menores teores de Cu e Ni nas folhas dos clones de erva-mate, inverso ao que foi verificado para os teores de Zn. Isso provavelmente decorre da similaridade nas rotas de absorção e transporte desses micronutrientes metálicos, sendo que a alta disponibilidade de Zn pode ter tido antagonismo com Cu e Ni (Kabata-Pendias, 2011). Porém, as interações entre esses micronutrientes metálicos dependem da espécie. Por outro lado, com plantas jovens de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), Wood (2010) não verificou relação direta com a absorção de Zn, Cu e Ni, mas Zn e Cu reduziram a disponibilidade fisiológica do Ni nas folhas, talvez por inibição competitiva ou sequestro.

Com relação ao B, verificou-se que os teores nas folhas foram superiores para as plantas cultivadas nos solos LV e CX1, justamente os dois únicos solos em que os teores de B nas folhas diminuíram com a adubação fosfatada (Clone 1 nos solos LV e CX1; Clone 2 no solo CX1) (TABELA 4). Esses resultados são inconsistentes com os teores disponíveis de B nos solos avaliados (TABELA 1). Por outro lado, apesar dos menores teores de B nas folhas da erva-mate ter sido constatados para as plantas cultivadas nos solos CX2 (15 até 29 mg B kg⁻¹) e CX3 (8 até 13 mg B kg⁻¹), apenas no CX3 ocorreu baixo crescimento (FIGURA 2). Assim, considerando que em CX2 ocorreu alto crescimento, é possível que para as plantas cultivadas no solo CX3 o B tenha sido um fator limitante ao crescimento das plantas de erva-mate. Reissmann et al. (1999) reportam teores de B em folhas de erva-mate variando de 11 até

79 mg kg⁻¹, sendo que em plantas com até um ano os teores variaram de 20 até 23 mg kg⁻¹. De maneira geral, teores foliares de B abaixo de 15 mg kg⁻¹ podem ser considerados baixos (Malavolta et al., 1997).

A adubação fosfatada diminuiu os teores de Mo apenas nas folhas do Clone 2 (TABELA 4). De maneira geral, é conhecido que o S apresenta grande interferência na absorção de Mo, sendo que no caso do P têm sido constatados resultados variados (Kaiser et al., 2005). Porém, em solos com elevada acidez a disponibilidade de Mo é extremamente baixa, como verificado no presente estudo (TABELA 1), o que pode ter favorecido o efeito antagônico da adubação fosfatada nos teores foliares de Mo. Adicionalmente, esse efeito deve ser somado ao fato do P ter elevado significativamente o crescimento da erva-mate (FIGURA 2), favorecendo a diluição dos teores de Mo nas folhas do Clone 2.

Para os elementos Al, Ba, Pb, Cd, Cr e V o fator solo proporcionou influência nos teores desses elementos nas folhas. Já o efeito da adubação fosfatada resultou em mudança do Al no Clone 1, V no Clone 2, e via interação para Ba, Pb e Cd em ambos os clones (TABELA 5).

Embora os solos utilizados no presente estudo apresentassem variação de até nove vezes entre o menor e o maior valor de Al no solo (TABELA 1), as diferenças nos teores de Al nas folhas dos dois clones de erva-mate (TABELA 5) não acompanharam a magnitude de variação do solo. Além disso, o solo com maiores teores de Al no solo (solo CX3) não propiciou que ocorressem os maiores teores de Al nas folhas e foi registrada relação entre os teores de Al no solo e nas folhas apenas para o clone 1 (FIGURA 4) que, embora tenha sido significante estatisticamente, teve baixo coeficiente de regressão. No caso do solo CX3 os resultados podem ser decorrentes da limitada nutrição em B nas plantas cultivadas nesse solo; tendo em vista que Benedetti (2012), em experimento com clone de erva-mate cultivado em solução nutritiva, registrou que ocorrem maiores teores de Al foliar em plantas bem nutridas em B e que ocorre incremento dos teores de Al foliar com a adição de doses crescentes Al em solução nutritiva. Por outro lado, o clone 2 no solo CX1 teve teores de Al foliar que prejudicaram a relação solo-planta para esse elemento, principalmente na adição de P. Ou seja, isso indica que outros fatores (por exemplo, nutrição da planta, variação genotípica) podem interferir na relação do Al no solo e na planta, inviabilizando o uso do Al trocável no solo via KCl para análise de solos ácidos com o objetivo de predizer os teores foliares. Fossati

(1997) e Reissmann et al. (1999) não verificaram relação entre Al no solo e nas folhas de erva-mate em condições de campo.

TABELA 5. Teores (mg kg⁻¹) de Al, Ba, Pb, Cd, Cr e V em folhas de clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada, aos 210 dias após a instalação dos experimentos¹

		Clone 1					Clone 2				
		LV	CX1	CX2	CX3	Média	LV	CX1	CX2	CX3	Média
Al	- P	453	478	589	495	503A	376	371	483	382	403
	+ P	374	408	532	451	441B	402	270	456	416	386
	Média	413b	443b	560 a	473b		389ab	320b	470 a	399ab	
	CV	21					25				
Ba	- P	17Ac	31Bbc	47Aa	33Bab	32	23Aab	19Ab	31Ba	21Bab	23
	+ P	27Ac	43Ab	52Aab	61Aa	46	13Bb	21Ab	49Aa	43Aa	32
	Média	22	37	49	46		18	20	40	32	
	CV	24					25				
Pb	- P	0,23Ab	0,69Aa	0,64Aa	0,64Aa	0,54	0,38Aab	0,47Aa	0,50Aa	0,26Bb	0,40
	+ P	0,41Aab	0,32Bb	0,64Aa	0,40Bab	0,44	0,22Bb	0,35Ab	0,56Aa	0,42Aab	0,38
	Média	0,31	0,50	0,64	0,51		0,30	0,41	0,53	0,33	
	CV	40					33				
Cd	- P	0,07Ac	0,36Aa	0,21Ab	0,37Aa	0,25	0,11Ab	0,28Aa	0,20Aab	0,24Aa	0,20
	+ P	0,09Ab	0,11Bb	0,18Aab	0,24Ba	0,15	0,07Ac	0,10Bbc	0,20Aab	0,23Aa	0,15
	Média	0,08	0,23	0,20	0,30		0,09	0,19	0,20	0,23	
	CV	32					40				
Cr	- P	0,39	0,35	0,73	0,37	0,46	0,35	0,38	0,80	0,59	0,53
	+ P	0,34	0,30	0,66	0,39	0,42	0,31	0,32	0,72	0,47	0,45
	Média	0,36b	0,32b	0,69a	0,38b		0,33b	0,35b	0,76a	0,53ab	
	CV	36					56				
V	- P	0,08	0,12	0,07	0,10	0,09	0,13Aa	0,14Aa	0,07Ba	0,10Aa	0,11
	+ P	0,10	0,10	0,07	0,07	0,09	0,11Aab	0,08Aab	0,16Aa	0,07Ab	0,10
	Média	0,09ab	0,11a	0,07b	0,08ab		0,12	0,12	0,12	0,8	
	CV	29					54				

¹ LV= Latossolo Vermelho; CX1= Cambissolo Háplico 1; CX2= Cambissolo Háplico 2; CX3= Cambissolo Háplico 3. Médias seguidas por letras maiúsculas (efeito de P) diferentes e, médias seguidas por letras minúsculas (efeito de solo) diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05). Médias sem letras indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos. Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

A ausência de efeito da adubação fosfatada nos teores de Al nas folhas do Clone 2 (TABELA 5) corroboram com os resultados reportados por Santin et al. (2013). Porém, o decréscimo dos teores de Al nas folhas do clone 1 em resposta a adubação fosfatada (TABELA 5) reforça que ocorrem importantes variações genotípicas. Um fator que pode ter contribuído para esses resultados é que para o clone 1 ocorreram os maiores teores de Al nas

folhas. Tais diferenças entre genótipos provavelmente têm relação com a capacidade de aquisição de Al do solo e de seu transporte das raízes até às folhas. Oliva et al. (2014) reportam variações (entre 550 e 832 mg kg⁻¹) nos teores de Al para dez progênes de erva-mate. Avaliando oito cultivares de chá, Chen et al. (2009) também constataram ampla variação genotípica, com teores de Al variando entre 2033 e 3321 mg kg⁻¹.

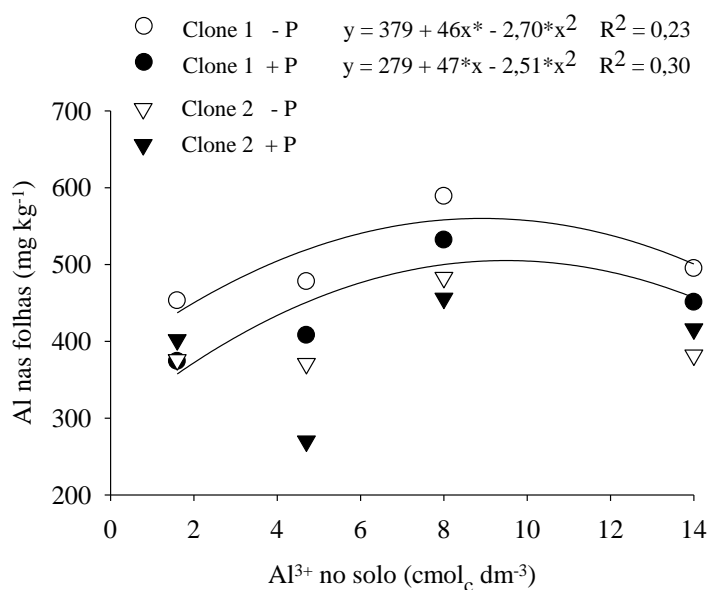


FIGURA 4. Relação entre os teores de Al nas folhas de clones de erva-mate e os teores de Al disponível (Al³⁺) no solo com e sem adubação fosfatada. Cada triângulo e círculo representa o teor médio de seis repetições. * indica significância a 5 %.

Com relação aos teores de Al registrados na erva-mate (270 até 589 mg kg⁻¹), pode-se dizer que são altos em comparação a maioria das plantas cultivadas sensíveis a toxidez por Al, embora na erva-mate sejam comumente relatados (Reissmann et al., 1999; Giulian et al., 2009; Oliva et al., 2014), inclusive com teores de até 1272 mg kg⁻¹ (Fossati, 1997). No presente estudo, o maior crescimento foi obtido na planta com maior teor de Al nas folhas (TABELA 5), indicando, assim como Mn (TABELA 4), que o alto teor observado não teve relação com alguma limitação ao crescimento da planta de erva-mate. Especificamente com relação ao Al, Benedetti (2012) constatou efeito positivo de sua adição na solução nutritiva sobre o crescimento de plantas de erva-mate. Resultados similares também foram reportados

para plantas de chá que, assim como a erva-mate, é uma espécie nativa de solos ácidos (Hajiboland et al., 2015).

O aumento dos teores de Ba nas folhas dos clones de erva-mate em resposta a adubação fosfatada (Clone 1, solos CX1 e CX3; Clone 2, solos CX2 e CX3) (TABELA 5) indica que o estímulo ao crescimento provocado pelo P nessas condições, pode ter favorecido a aquisição de Ba. Além do Ba, o único elemento alcalino terroso que teve seus teores elevados nas folhas da erva-mate pela adubação fosfatada (Clone 2, solos CX2 e CX3) foi o Ca (TABELA 3), provavelmente em decorrência da semelhança de características físico-químicas e de transporte nas plantas, como discutido por White (2001). Contudo, para o solo LV os teores de Ba nas folhas do Clone 2 tiveram decréscimo com a adubação fosfatada (TABELA 5), o que pode ter ocorrido pela baixa disponibilidade de Ba nesse solo. Para as diferenças entre solos, na ausência de adubação fosfatada os teores de Ba nas folhas dos clones foram superiores nas plantas cultivadas no solo CX2 e, com adubação fosfatada, os teores foram maiores nas plantas cultivadas no solo CX3 (Clone 1) e, para os solos CX2 e CX3 (Clone 2) (TABELA 5), ambos solos com maior disponibilidade de Ba que os demais solos (TABELA 1).

Como apresentado anteriormente, os teores de Pb nas folhas da erva-mate variaram com o solo e a adubação fosfatada, em metade das condições avaliadas. Das quatro condições onde a adubação com P resultou em mudança, em três houve decréscimo e uma acréscimo no teor. Ainda, os teores de Pb nas folhas também variaram entre clones, por exemplo: para CX3 a aplicação resultou em decréscimo e acréscimo para o clone 1 e 2, respectivamente. Em função disso, não é possível fazer uma generalização quanto a resposta a adubação fosfatada. Para os solos CX1 e CX3 o efeito da adubação fosfatada possibilitou que os teores de Pb nas folhas do Clone 1 ficassem abaixo do nível de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, ao contrário do que se verificou na ausência da adubação fosfatada (TABELA 5). Por outro lado, no Clone 2 a adubação fosfatada reduziu os teores de Pb nas folhas para um solo (LV) e aumentou em outro (CX3), embora em nenhuma dessas condições o nível de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ tenha sido ultrapassado. O valor de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ é adotado como valor máximo permitido pela legislação para comercialização de erva-mate e chá (Anvisa, 2013). Mas, todos os valores obtidos estão muito abaixo comparados ao limite (5 mg kg^{-1}) estabelecido para o chá na China (GB 2762-2012, 2012). Ainda, na ausência de adubação fosfatada os maiores teores de Pb nas folhas do Clone 1 (CX1, CX2 e CX3) e do Clone 2 (CX1 e CX2) ocorreram no solo de textura média e nos

solos argilosos, enquanto que com adubação fosfatada os maiores teores de Pb nas folhas dos clones ocorreram no solo CX2, solo com maior fertilidade inicial (TABELA 1) e maior crescimento (FIGURA 2). Mas, os teores de Pb nas folhas não variaram de acordo com os teores de Pb extraídas do solo pela solução Mehlich 1.

Em três (Clone 1 nos solos CX1 e CX3; Clone 2 no solo CX1) das oito condições testadas, o uso de P determinou decréscimo no teor de Cd nas folhas, ou seja, a adubação fosfatada foi benéfica (TABELA 5). Contudo, é importante considerar que no presente estudo a fonte de P utilizada foi produto puro analítico, certamente com baixo teor de Cd, visto que a adubação com fertilizantes feitos de rocha fosfática, tem resultado em alguns casos acréscimo de Cd no tecido foliar (Kabata-Pendias, 2011). Na ausência de adubação fosfatada os maiores teores de Cd nas folhas dos clones de erva-mate ocorreram nos solos CX1 e CX3, sendo que para esses solos as plantas com menor matéria seca apresentaram teores de Cd superiores. Em oposição, na presença de adubação fosfatada os teores de Cd nas folhas dos clones de erva-mate seguiram a mesma sequência decrescente que foi verificada para a disponibilidade de Cd no solo: CX3, CX2, CX1 e LV (TABELA 1; TABELA 5). Ou seja, solo muito intemperizado e com material de origem pobre, como LV, certamente tem menor disponibilidade de Cd. Para erva-mate são escassos na literatura trabalhos analisando a relação do Cd no solo e nas folhas. Entretanto, no chá tem se constatado que o aumento na disponibilidade desse metal no solo eleva os teores na planta (Shi et al., 2008). Em tempo, todos os teores médios de Cd ficaram abaixo de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$, valor máximo permitido pela legislação para comercialização de erva-mate e chá (Anvisa, 2013).

Os teores de Cr nas folhas dos clones de erva-mate foram superiores nas plantas cultivadas no solo CX2 (solo com menor disponibilidade do elemento) (TABELA 5). O uso do extrator Mehlich-1 para avaliar a disponibilidade do Cr no solo não foi eficiente devido a influência de reações de oxi-redução que regulam as formas químicas do Cr e, assim, a disponibilidade para as plantas. Nos solos a transformação de Cr(III) (baixa mobilidade nas plantas) para Cr(VI) (alta mobilidade nas plantas) é promovida pela presença de óxidos de Mn, que atuam como agentes oxidantes do Cr (Oliveira, 2012). O solo CX2 apresentou teores de Mn-baixa cristalinidade ($0,175 \text{ g kg}^{-1}$) de 11 até 175 vezes superiores aos demais solos e foi o único solo em que foram detectados compostos cristalinos associados ao Mn ($0,10 \text{ g kg}^{-1}$), indicando maior presença de óxidos de Mn. No solo CX2 as plantas de erva-mate também apresentaram maior crescimento. Porém, esse fator não deve ter sido importante para a

absorção e transporte do Cr, tendo em vista que não ocorreu alteração devido à adubação fosfatada, que promoveu o crescimento das plantas em todos os solos.

De forma similar ao Fe, os teores de V nas folhas de erva-mate foram elevados pela adubação fosfatada apenas para o Clone 2 no solo CX2 (TABELA 5). Em contraste, embora tenham ocorrido variações entre os solos, não foram dependentes da disponibilidade inicial de V no solo (TABELA 1). Na solução do solo o V é encontrado tanto na forma aniônica e catiônica. Na forma aniônica, como vanadato, o V é considerado como um análogo do P. Contudo, em solos ácidos ocorre o predomínio de V na forma de vanadil (VO^{2+}), íon que é similar ao Fe^{2+} (Kabata-Pendias, 2011). Ambos, Fe e V são retidos no sistema radicular, sendo que apenas uma pequena parte desses elementos é transportada para a parte aérea (Tian et al., 2014; Akoumianaki-Ioannidou et al., 2016). Conforme Lin et al. (2013) genes que regulam a absorção de Fe também podem regular a absorção de V. O transporte de Fe das raízes para a parte aérea ocorre em formas complexadas, principalmente com citrato (Koabayashi & Nishizawa, 2012). É conhecido que V forma complexos com citrato e, V e Fe tem afinidade em sítios específicos de outras moléculas orgânicas, o que permite usar o V como prova para estudar os sítios de ligação do Fe (Crans et al. 2004). Assim, é possível que Fe e V tenham similaridade em uma ou mais rotas de transporte das raízes para parte aérea.

Os elementos As e Co foram detectados em apenas 42 % e 57 % das amostras, respectivamente. Considerando as amostras com leitura, o As variou entre 0,003 e 0,0250 mg kg^{-1} , enquanto o Co variou entre 0,001 e 0,180 mg kg^{-1} . Segundo legislação, na erva-mate comercial os teores de As devem ser inferiores a 0,6 mg kg^{-1} (Anvisa, 2013). Por outro lado, os teores de Co não são usados para fins legislativos. Os teores foliares de Co registrados no presente estudo são similares aos valores (média de 0,164 mg kg^{-1}) reportados por Pozebon et al. (2015) e abaixo dos valores (média de 0,630 mg kg^{-1}) relatados por Maiocchi et al. (2016).

Os resultados de correlação entre os atributos de crescimento e a composição elementar são apresentados na FIGURA 5. Os teores de P apresentaram baixa correlação com a matéria seca, provavelmente devido a divergência de resultados entre os solos (FIGURA 2; TABELA 3). Tal fato confirma a dificuldade de considerar apenas P para avaliação do estado nutricional de P. Ocorreu relação inversa entre matéria seca e altura com teor de N, dado em parte ao efeito diluição, haja vista a ampla variação de crescimento de plantas devido as variações de solo e adubação fosfatada. Além disso, com base nas correlações negativas entre C x N nas folhas dos clones de erva-mate (FIGURA 5), é possível que o aumento dos teores

de C nas folhas devido a adubação fosfatada (TABELA 3) tenha contribuído para o efeito de diluição dos teores de N. Em geral, quando ocorre maior fixação de CO₂ no processo de fotossíntese ocorre diluição de vários nutrientes em tecidos vegetais, sobretudo nos teores de N (Loladze, 2014).

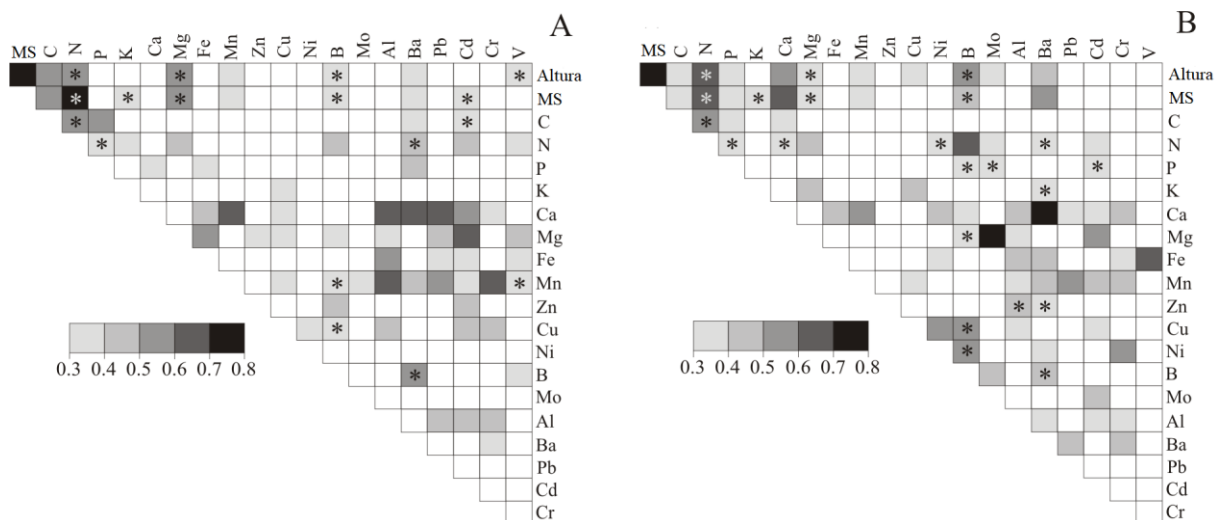


FIGURA 5. Correlogramas de atributos de crescimento e elementos em folhas de clones de erva-mate (A = Clone 1; B = Clone 2). Onde: MS = matéria seca da parte aérea. Quadrados com cores indicam valores de coeficiente de correlação (r) significativo ($p < 0,05$), enquanto os brancos indicam que não ocorreram correlações significantes. Asteriscos indicam correlações negativas.

Considerando apenas os elementos, as correlações positivas entre Fe x V, Ni x Cu, C x P, Ca x Ba e Mn x Cr (FIGURA 5), confirmam alguns dos resultados discutidos anteriormente. Também se constataram correlações positivas entre diversos outros metais, por exemplo, entre os elementos não essenciais Al, Ba e Cd e, os nutrientes Ca, Mg, Fe e Mn. As correlações entre esses metais indicam resposta similar para a interação entre as características dos solos e a fisiologia dos clones de erva-mate. Isso provavelmente tem relação com o fato de que alguns transportadores de metais nas plantas podem interagir com mais de um elemento. Nesse sentido, diversos estudos com outras espécies vegetais apontam para o efeito de transportadores de Zn, Fe e Mn também influenciaram o transporte de Cd, como, por exemplo, os transportadores das famílias NRAMP, IRT e ZIP. Ainda, dentro da mesma família de transportadores existe variação, sendo que alguns transportadores interagem com vários metais enquanto outros são específicos para apenas um elemento. Além disso,

canais de Ca na membrana também podem ter relação com a entrada de Cd na planta (Clemens, 2006; Ishimaru et al., 2012; Gao et al., 2016). Os teores de Pb também se correlacionaram com os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Al e Ba para um ou os dois clones de erva-mate, porém, não teve relação com os teores de Cd (FIGURA 5), indicando que a aquisição seria diferenciada entre Cd e Pb, embora o Pb também possa ser absorvido através de canais iônicos (por exemplo, canais iônicos para Ca) e até mesmo proteínas transportadoras (Pourrut et al., 2011).

Apesar de que algumas correlações ocorreram apenas em um clone, nos dois clones elementos essenciais apresentam correlações positivas com elementos indesejáveis (FIGURA 5). Por outro lado, os clones variaram mais quando se consideram as correlações negativas, haja vista que o clone 1 e o clone 2 tiveram, respectivamente, oito e 15 correlações negativas. Em termos qualitativos, ainda vale destacar que o clone 1 e o clone 2 apresentaram quatro (Ba x N; Ba x B; C x Cd; Mn x V) e seis correlações negativas (Al x Zn; Cd x P; Ba x N; Ba x K; Ba x Zn; Ba x B) entre elementos essenciais e elementos não essenciais ou indejáveis.

De acordo com a ACP, ocorreu distinção das amostras entre os quatro solos ácidos, com CP1 e CP2 de 40,8 % e 31,1 % para o Clone 1 e, 38,8 % e 31,8 % para o Clone 2 (FIGURA 6). Os resultados revelam que o Mn teve os teores nas folhas dos dois clones altamente relacionados com a maior disponibilidade do elemento no solo, devido aos materiais cristalinos e amorfos no solo CX2. Tal fato ficou evidente no solo CX2, onde os teores foliares ultrapassaram 1000 mg kg^{-1} (Clone 1 = 1249 mg kg^{-1} ; Clone 2 = 1033 mg kg^{-1}) (TABELA 4), devido ao alto teor do Mn nesse solo, tanto na forma disponível (Mn disponível por Mehlich-1 = $48,7 \text{ mg dm}^{-3}$), como em frações associadas com materiais de baixa cristalinidade (Bc-MnO₂ = $0,175 \text{ g kg}^{-1}$) e cristalinos (C-MnO₂ = $0,10 \text{ g kg}^{-1}$) (TABELA 1). Assim, considerando que em amostras de folhas e produtos industrializados de erva-mate têm sido verificados valores similares ou maiores de Mn (Reissmann et al., 1999; Giulian et al., 2009), os resultados indicam que a maioria da erva-mate ocorre em solos ácidos com alta disponibilidade de Mn.

Considerando a matéria seca da parte aérea e os 19 elementos detectados em todas as amostras (C, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo, Al, Ba, Pb, Cd e Cr), verificou-se que apenas os teores de quatro elementos nas folhas variaram significativamente entre os dois clones de erva-mate avaliados no presente estudo (TABELA 6). No Clone 1 foram registrados teores de Ba, Pb e Al superiores em 40 %, 26 % e 20 % em comparação ao Clone 2, enquanto

que os teores de Zn foram inferiores 33 %, respectivamente. Isso indica a importância de análises multielementares em folhas de erva-mate, pois pode ser útil no sentido de escolher materiais genéticos com qualidade nutricional das folhas, além dos aspectos normalmente avaliados, como produção e resistência ao ataque de insetos e patógenos.

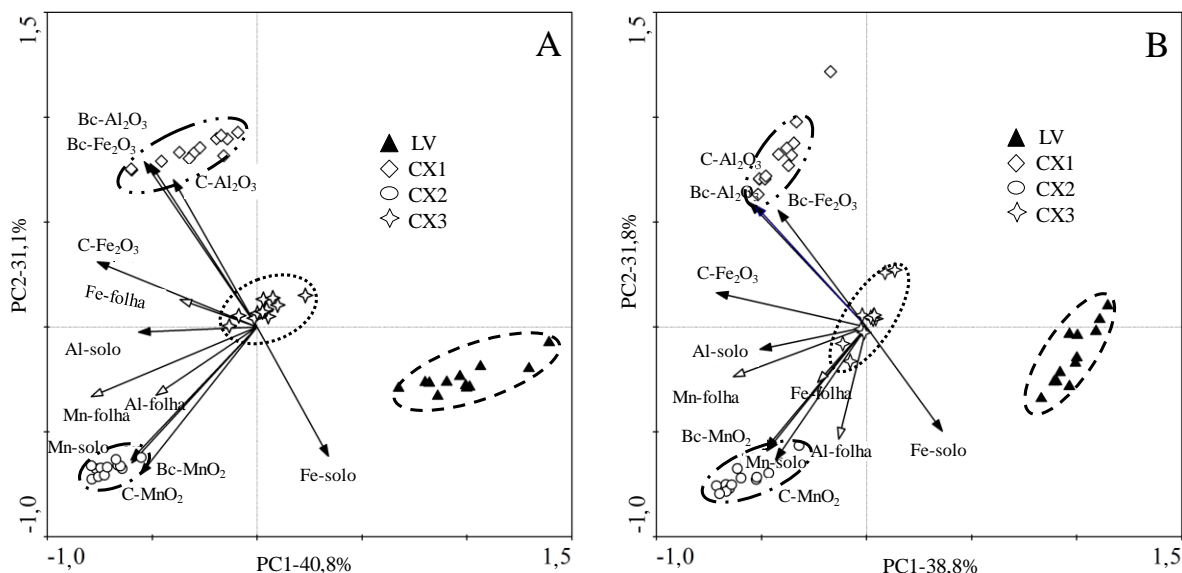


FIGURA 6. Análise de componentes principais dos teores de Mn, Fe e Al nas folhas de clones (A: Clone 1; B: Clone 2) de erva-mate e os teores de Mn, Fe e Al (solo: disponível; Bc: baixa cristalinidade; C: cristalino) em quatro solos ácidos. LV: Latossolo Vermelho; CX1, CX2 e CX3, Cambissolo Háplico 1, 2 e 3. PC: principal componente.

TABELA 6. Teores de Ba, Pb, Al e Zn nas folhas do Clone 1 e do Clone 2 de erva-mate¹

Fonte de variação	Ba	Pb	Al	Zn
Clone 1	39	0,50	472	44
Clone 2	27	0,39	395	67
CV	45	47	25	60

¹ Para cada elemento as diferenças entre clones são significantes pelo teste F ($p < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

Assim, as folhas do Clone 2 seriam mais interessantes em termos de nutrição humana, pois tiveram maiores teores do nutriente (Zn) e menores teores de elementos não essenciais. Com base nas estimativas de valor nutricional de folhas de erva-mate realizadas por Barbosa et al. (2015), no presente estudo a ingestão de infusão preparada com folhas do

Clone 2 contribuiria com até 11,5% das necessidades diárias de Zn (em adultos), enquanto que no Clone 1 a contribuição seria de 7,6%. Esses resultados indicam que a análise multielementar de folhas de erva-mate pode ser útil em estudos para selecionar genótipos com maior qualidade nutricional ou predisposição para biofortificação.

1.3.2 EXPERIMENTO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

A análise de variância revelou que não houve interação entre os fatores estudados (TABELA 7) sobre os teores de elementos nas folhas de erva-mate. Porém, ocorreram efeitos diversos para os fatores de variação de forma isolada: Itaiópolis - clones diferiram para Al, Fe, Mg, Pb, Se, Ti, V e Zn nas folhas, enquanto que a adubação fosfatada não teve nenhum efeito significativo; Três Barras - clones diferiram apenas para o nutriente Mo e; efeito de doses de P₂O₅ para Ba, Ca, Mg, Pb, Se, Sr e Ti nas folhas. Analisando os dados comparativos entre os dois experimentos (Itaiópolis *versus* Três Barras) verificou-se que os locais diferiram para B, Ca, Cs, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V e Zn nas folhas de erva-mate (TABELA 8).

As folhas de erva-mate do experimento de Itaiópolis apresentaram maiores teores para seis elementos (Ca, Fe, Mg, Mn, Ti e V), enquanto que as folhas provenientes do experimento de Três Barras ocorreram maiores teores totais para nove elementos (B, Cs, Cu, K, Mo, Ni, Pb, Sr e Zn) (TABELA 9). O solo de cada área experimental teve diferenças não apenas nos componentes da acidez e disponibilidade de elementos (TABELA 2), mas também com relação aos teores totais de pelo menos 17 elementos (Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, V e Zn) (TABELA 9). Contudo, apenas os teores de sete elementos (Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr e Zn) nas folhas da erva-mate tiveram relação com maiores teores totais dos elementos no solo. Isso indica que a maioria dos elementos não teve relação com o teor total do elemento no solo, que em parte tem influência do fator de disponibilidade do elemento no solo e, da absorção radicular, traposte para a parte aérea e, alocação nas folhas. Porém, para os elementos que tiveram maiores valores, pode-se destacar o caso do Pb, pois no experimento anterior (TABELA 1; TABELA 5) os maiores teores de Pb disponíveis no solo não propiciaram maiores teores foliares. Ou seja, o Pb no solo deve estar em formas menos disponíveis, mas que na rizosfera podem ser liberadas parcialmente para a solução do solo. Nesse sentido, é possível que o teor total de Pb seja mais interessante para

predizer a disponibilidade desse elemento, o que também deve ser mais estudado para Mg, Mn, Mo, Ni, Sr e Zn.

TABELA 7. Valores de p do resultado do teste F e coeficiente de variação (CV) para os teores de Al, B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V e Zn em folhas de clones de erva-mate com adubação fosfatada em dois locais de Santa Catarina, Brasil

Fonte de variação	Al ¹	B	Ba	Ca	Cd	Cs	Cu
Itaiópolis (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,3503	0,4457	0,5262	0,1483	0,8583	0,8058	0,3100
Clone	<u>0,0260</u>	0,5749	0,4380	0,0596	0,0680	0,2606	0,8295
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,0510	0,7301	0,4665	0,1017	0,3353	0,5009	0,9419
CV 1	17,52	23,11	29,47	10,33	21,42	34,25	37,09
CV 2	14,40	38,32	33,51	9,94	35,10	18,98	23,03
Três Barras (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,1096	0,2857	<u>0,0015</u>	<u>0,0171</u>	0,3142	0,3672	0,1840
Clone	0,0792	0,0840	0,3492	0,3994	0,1127	0,1211	0,6889
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,1872	0,4248	0,7722	0,7551	0,7300	0,8866	0,5704
CV 1	27,73	21,42	21,58	26,24	45,33	105,38	19,09
CV 2	18,36	28,63	27,54	17,24	32,55	82,02	17,87
Fonte de variação	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Ni	Pb
Itaiópolis (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,8488	0,8365	0,6642	0,5108	0,5954	0,2280	0,1868
Clone	<u>0,0246</u>	0,2456	<u>0,0346</u>	0,8439	<u>0,0148</u>	0,8839	<u>0,0024</u>
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,5085	0,4598	0,1050	0,0521	0,7030	0,8031	0,2856
CV 1	13,02	15,26	11,54	26,7	77,46	40,10	44,10
CV 2	14,62	15,51	12,47	23,9	81,69	93,20	52,30
Três Barras (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,4122	0,1240	<u>0,0359</u>	0,0708	0,1020	0,4591	<u>0,0099</u>
Clone	0,4991	0,7321	0,7919	0,2868	<u>0,0185</u>	0,0534	0,3786
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,4656	0,6225	0,2679	0,6284	0,1735	0,8431	0,6944
CV 1	22,15	19,92	37,56	58,90	37,50	60,54	38,36
CV 2	17,44	12,66	15,57	36,83	35,17	50,03	50,03
Fonte de variação	Rb	S	Se	Sr	Ti	V	Zn
Itaiópolis (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,7371	0,9485	0,2399	0,1052	0,0815	0,5571	0,2617
Clone	0,9364	0,1333	<u>0,0004</u>	0,0759	<u>0,0079</u>	<u>0,0064</u>	<u>0,0374</u>
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,8199	0,8574	0,1956	0,9206	0,0929	0,6075	0,3231
CV 1	23,63	12,56	29,17	33,77	8,21	18,90	54,01
CV 2	21,40	14,88	31	44,97	12,62	26,50	41,55
Três Barras (n = 40 amostras)							
Doses de P ₂ O ₅	0,4374	0,6600	0,0023	<u>0,0145</u>	<u>0,0091</u>	0,8444	0,3353
Clone	0,7731	0,2950	0,1853	0,7393	0,6518	0,9877	0,6999
Doses de P ₂ O ₅ * Clone	0,4862	0,1291	0,9544	0,7417	0,9363	0,8591	0,2080
CV 1	74,55	13,61	20,10	34,91	18,33	32,02	52,37
CV 2	33,23	7,29	24,09	20,43	16,13	26,09	37,03

¹ Valores sublinhados indicam valores de p significantes ($p < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

TABELA 8. Valores de p do resultado do teste F e coeficiente de variação (CV) para os teores de Al, B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V e Zn em folhas de erva-mate em dois locais de Santa Catarina, Brasil

Fonte de variação	Al ¹	B	Ba	Ca	Cd	Cs	Cu
Itaiópolis versus Três Barras (n = 80 amostras)							
Local	0,4730	<u>0,0001</u>	0,9880	<u>0,0001</u>	0,9007	<u>0,002</u>	<u>0,0001</u>
CV	24,17	28,75	34,31	20,74	38,15	127,09	23,75
Fonte de variação	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Ni	Pb
Itaiópolis versus Três Barras (n = 80 amostras)							
Local	<u>0,0001</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,0002</u>	<u>0,0116</u>	<u>0,0002</u>	<u>0,0001</u>
CV	22,53	18,51	26,97	40,59	67,05	68,01	60,21
Fonte de variação	Rb	S	Se	Sr	Ti	V	Zn
Itaiópolis versus Três Barras (n = 80 amostras)							
Local	0,4788	0,4493	0,7379	<u>0,0004</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,0021</u>
CV	49,64	11,72	34,30	42,97	17,67	34,89	52,41

¹ Valores sublinhados indicam valores de p significantes ($p < 0,05$), Coeficiente de variação (CV) é dado em porcentagem.

Os maiores teores de Pb nas folhas da erva-mate cultivada em Três Barras se aproximaram do limite máximo permitido na erva-mate ($0,60 \text{ mg kg}^{-1}$) (Anvisa, 2013) e teriam influência de 1,5 % de diferença na contribuição para a estimativa da ingestão diária tolerada (IDT) na dieta humana (FIGURA 7). Ou seja, esses valores podem ser considerados baixos, não tendo efeito adverso para o consumo humano. Embora não existam limites estabelecidos para os teores dos demais elementos, vale destacar que houve grande diferença entre os locais com relação ao Mn (Itaiópolis - 2153 mg kg^{-1} ; Três Barras - 1593 mg kg^{-1}), o que teria implicações com relação aos valores de contribuição para a dieta humana (Barbosa et al., 2015). No mesmo sentido, Maiocchi et al. (2016) também encontraram elevada contribuição do consumo da infusão de erva-mate e *Ilex dumosa* para os valores de ingestão diária recomendada (IDR) de Mn. Hope et al. (2006) reportam resultados semelhantes em estimativas feitas com chá.

TABELA 9. Teores totais de Al, B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti, V e Zn no solo e em folhas de clones de erva-mate (na média das doses de P) em dois locais de Santa Catarina, Brasil

FV ¹	Al	B	Ba	Ca	Cd	Cs	Cu
Teor total no solo antes do plantio (mg kg ⁻¹)							
IT	50921	-	134	568	0,039	9,477	9,42
TB	89263	-	92	741	0,097	5,963	74,48
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹)							
IT	327	29b	47	7441 a	0,242	0,026b	4,53
TB	340	47a	47	6174b	0,249	0,069a	5,70
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Itaiópolis							
F1	345a	28	45	7203	0,211	0,026	4,48
F2	308b	30	49	7680	0,261	0,024	4,57
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Três Barras							
F1	321	43	45	6028	0,210	0,072	6,33
F2	358	51	49	6320	0,260	0,111	6,19
FV	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Ni	Pb
Teor total no solo antes do plantio (mg kg ⁻¹)							
IT	23613	9102	3423	294	0,48	8,41	14,96
TB	86325	1636	939	249	8,30	28,98	41,50
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹)							
IT	78a	15783b	8243a	2153a	0,18b	0,59b	0,35b
TB	59b	21762a	5403b	1593b	0,27a	1,01a	0,55a
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Itaiópolis							
F1	82a	15315	7865b	2137	0,12b	0,60	0,46a
F2	73b	16251	8620a	2169	0,24a	0,57	0,24b
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Três Barras							
F1	50	21914	5367	1220	0,31a	1,02	0,75
F2	52	21610	5439	1387	0,23b	1,43	0,65
FV	Rb	S	Se	Sr	Ti	V	Zn
Teor total no solo antes do plantio (mg kg ⁻¹)							
IT	112	-	0,350	14	876,8	51	37
TB	11	-	1,286	21	4561,0	289	99
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹)							
IT	12	1757	0,021	20b	2,6a	0,126a	34b
TB	11	1792	0,020	29a	2,1b	0,076b	46a
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Itaiópolis							
F1	11	1691	0,026a	17	2,9a	0,142a	29b
F2	11	1822	0,016b	23	2,5b	0,109b	39a
Teor nas folhas (mg kg ⁻¹) - Três Barras							
F1	10	1770	0,019	29	2,1	0,076	48
F2	11	1309	0,022	29	2,1	0,076	51

¹ IT: Itaiópolis; TB: Três Barras; F1: Clone F1; F2: Clone F2. Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem pelo teste t ($p < 0,05$) para diferença entre locais e pelo teste F para clones. Amostras de solo e folhas foram analisadas por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

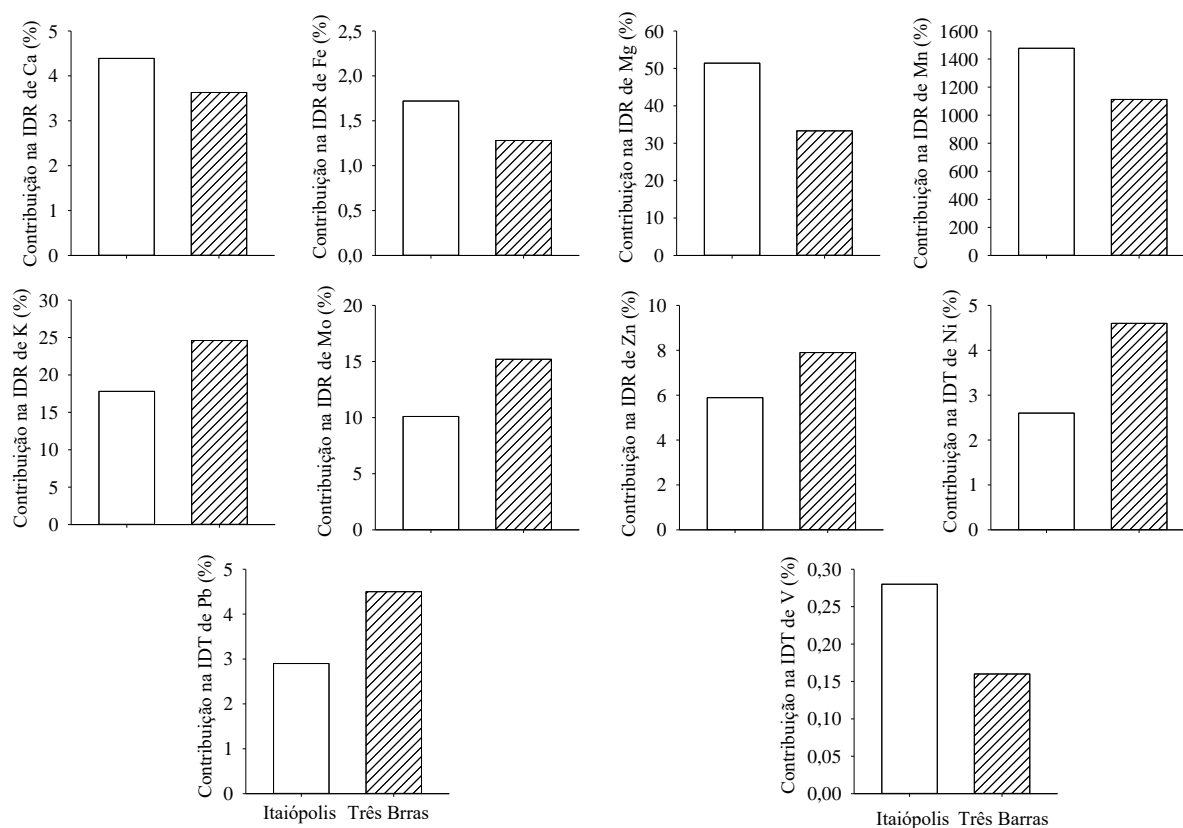


FIGURA 7. Estimativa da contribuição da ingestão da infusão de folhas de erva-mate cultivadas em dois locais (Itaiópolis e Três Barras) para os valores de ingestão diária recomendada (IDR) de Ca, Fe, Mg, Mn, Mo, K, Mo e Zn e, ingestão diária tolerada (IDT) de Ni, Pb e V. Os valores foram obtidos a partir dos resultados encontrados por Barbosa et al. (2015) com folhas de procedências de erva-mate.

Entre os clones de erva-mate foram registradas diferenças para: experimento de Itaiópolis - o Clone F1 teve maiores teores de Al, Fe, Pb, Se, Ti e V, enquanto que o Clone F2 teve maiores teores de Mg, Mo e Zn; experimento de Três Barras - o Clone F1 teve maiores teores foliares de Mo (TABELA 9). Tais resultados revelam a diversidade de composição elementar entre genótipos de erva-mate, corroborando com outros estudos com a mesma espécie (Guimarães et al., 2014; Oliva et al., 2014). Porém, revelam mais, pois se verificou que as diferenças entre clones não ocorreram para os dois locais avaliados (TABELA 9). Em termos práticos, considerando os valores da estimativa de contribuição da infusão de folhas de erva-mate para a dieta reportados por Barbosa et al. (2015), as variações entre as folhas dos clones de erva-mate em Itaiópolis teriam maior contribuição de Mo para a ingestão diária recomendada (IDR) e de Pb para a ingestão diária tolerada (IDT) (FIGURA 8). Nesse sentido

o clone F2 seria interessante devido sua contribuição para maiores valores de Mo e menores de Pb para a dieta. Todavia, é importante destacar a baixa contribuição para a ingestão de Pb. Por outro lado, analisando folhas de oito clones de chá (*Camellia sinensis*) em condições de campo, Chen et al. (2009) reportam ampla variação nos teores de Pb entre os clones (5,61 até 2,28 mg kg⁻¹), com implicações para os valores permitidos para comercialização, tanto no Brasil (Anvisa, 2013) como na China (GB 2762, 2012).

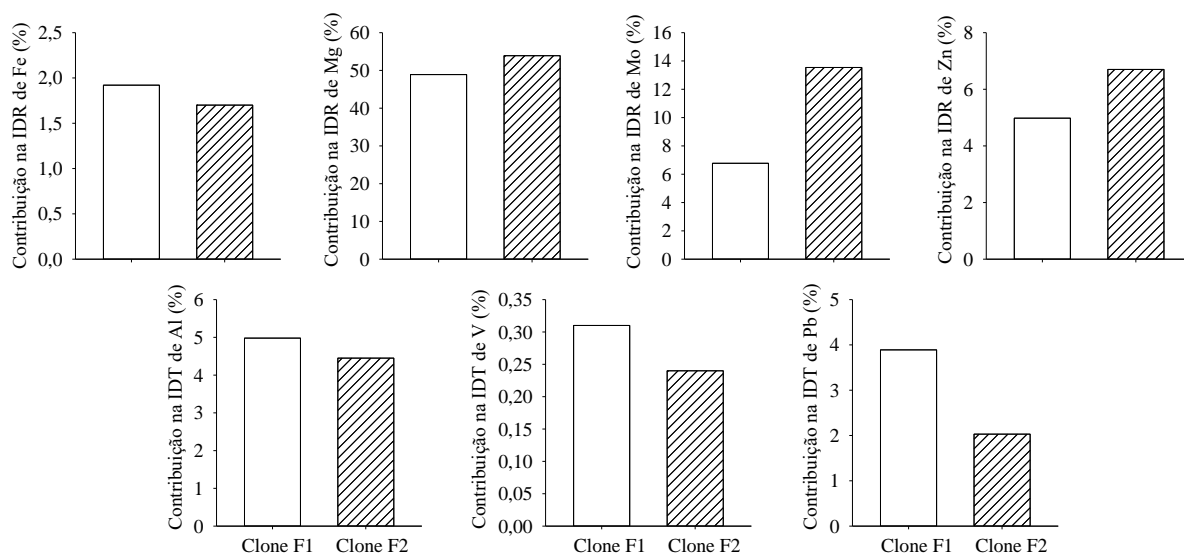


FIGURA 8. Estimativa da contribuição da ingestão da infusão de folhas de clones (F1 e F2) de erva-mate cultivada em Itaiópolis para os valores de ingestão diária recomendada (IDR) de Fe, Mg, Mo e Zn e, ingestão diária tolerada (IDT) de Al, V e Pb. Os valores foram obtidos a partir dos resultados reportados por Barbosa et al. (2015) com folhas de procedências de erva-mate.

A adubação fosfatada promoveu o aumento linear dos teores de Pb e Se e, efeito quadrático nos teores de Ba, Ca, Mg, Sr e Ti nas folhas de erva-mate cultivada em Três Barras, enquanto que em Itaiópolis não houve alteração significativa (FIGURA 9).

O efeito da adubação fosfatada nos teores de Pb nas folhas da erva-mate em Três Barras teve implicações para a adequação aos teores de referência (0,60 mg kg⁻¹), pois a partir da dose de 4,5 g dm⁻³ ano⁻¹ de P₂O₅ os teores de Pb nas folhas atingiram em média 0,86 mg kg⁻¹. A primeira informação que deve ser lembrada é que o solo de Três Barras apresentava maiores teores totais de Pb (TABELA 9). Nessa condição a adubação fosfatada pode ter favorecido a nutrição da planta de erva-mate e assim ter direta ou indiretamente repercutido

em maior aquisição de Pb. Contudo, com relação aos locais, o Pb foliar foi similar ao Ni e ao Zn, ambos associados com os maiores teores totais no solo de Três Barras, uma vez que para ambos os maiores teores do solo implicaram em maiores teores nas folhas (TABELA 9), indicando alguma similaridade de absorção e transporte. Assim, o efeito da adubação fosfatada nos teores de Pb das folhas da erva-mate pode ter afetado por vias mais específicas de absorção e transporte ou, ainda, variações específicas do solo, já que não afetou os teores de Ni e Zn.

O aumento dos teores de Se devido à adubação fosfatada já foi verificado em estudos com outras espécies cultivadas, como, por exemplo, alfafa (Carter et al., 1972), azevém (He et al., 1994) e arroz (Liu et al., 2004). Possíveis explicações para esse aumento de Se foliar são a melhoria no metabolismo da planta e a dessorção de Se do solo devido a competição com o P pelos sítios de adsorção. No caso da erva-mate, os resultados foram dependentes do solo, já que o aumento de Se foliar devido à aplicação de P foi verificado apenas no experimento de Três Barras (FIGURA 9), cujo solo tem teor total de Se superior ao do solo da área experimental em Itaiópolis (TABELA 9).

Embora tenha sido detectada influência da adubação fosfatada (FIGURA 9) e do material genético (TABELA 9) nos teores do Se nas folhas de erva-mate com ICP-MS, os teores foram baixos (entre 0,019 e 0,026 mg kg⁻¹). Existem poucos estudos sobre os teores de Se nas folhas da erva-mate. Analisando amostras de preparado de erva-mate para chimarrão provenientes do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai com ICP-MS e ICP-OES, Pozebon et al. (2015) reportam resultados para 26 elementos, mas o Se não foi detectado nas amostras. Recentemente, usando ICP-OES, Maiocchi et al. (2016) verificaram teores de Se de 0,79 e 0,64 mg kg⁻¹, respectivamente, em erva-mate e *Ilex dumosa* (Reissek). Em folhas de chá os teores de Se também são baixos (Hu et al., 2003), sendo que já são utilizadas estratégias de fortificação e biofortificação para a obtenção de produtos enriquecidos com Se (Liang et al., 2014), uma vez que este elemento é essencial para humanos e tem sido apontado como um elemento importante na prevenção contra o câncer e combate de radicais livres (Rayman, 2012). Por exemplo, a aplicação via solo de fertilizantes contendo Se (Hu et al., 2003) pode promover elevação dos teores de Se nas folhas do chá, partindo de 0,033 para 10,610 mg kg⁻¹.

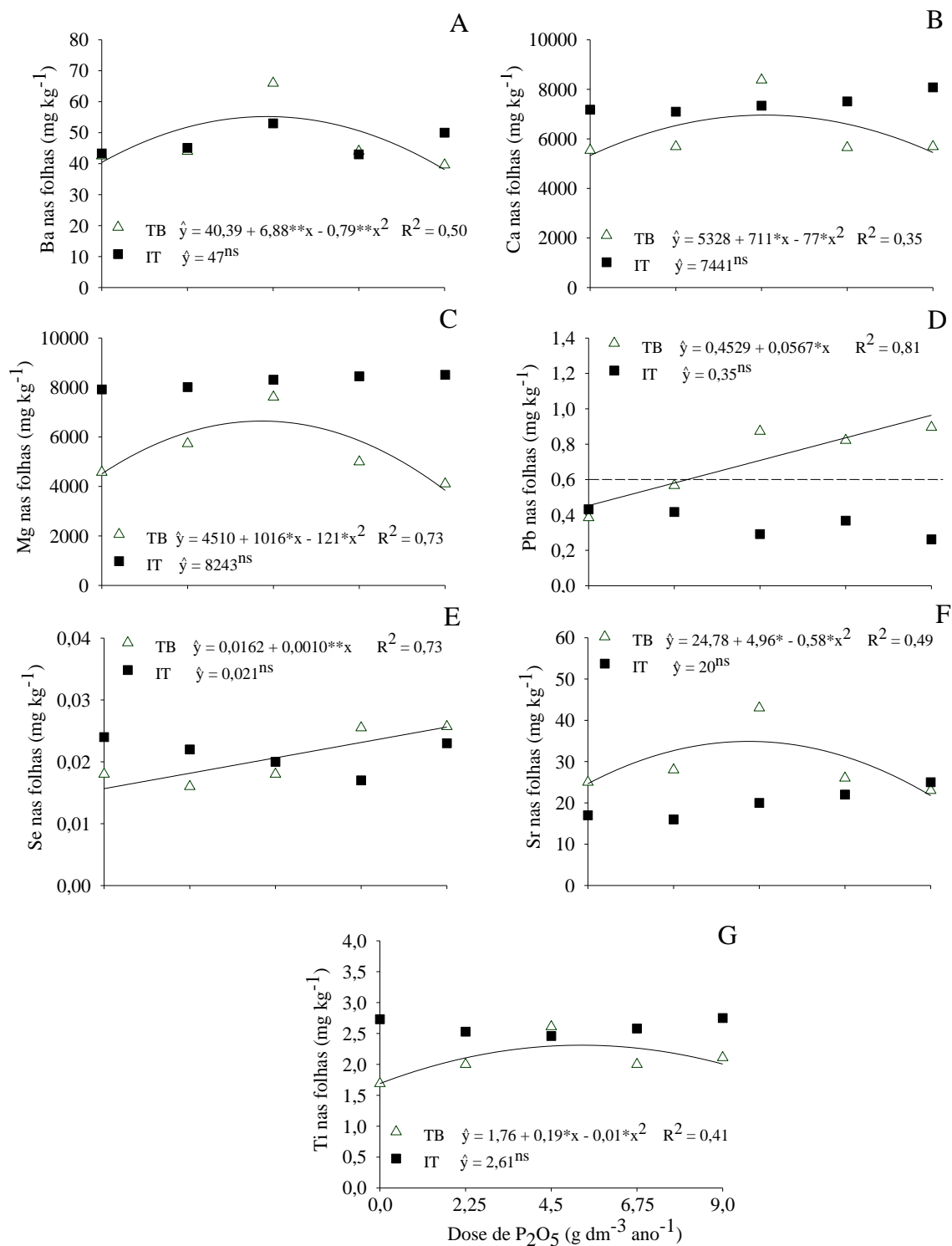


FIGURA 9. Teores totais de Ba (A), Ca (B), Mg (C), Pb (D), Se (E), Sr (F) e Ti (G) em folhas de erva-mate de erva-mate com adubação fosfatada em Itaipópolis (IT) e Três Barras (TB), Santa Catarina, Brasil, *, ** e ^{ns}, respectivamente, significativo a 5 %, 1 % e não significativo pelo teste F. Na FIGURA D, a linha tracejada indica o nível permitido (Pb - 0,60 mg kg^{-1}) de Pb na erva-mate, conforme Anvisa (2013).

A similaridade do efeito da adubação fosfatada sobre os teores de Ba, Ca, Mg e Sr nas folhas da erva-mate em Três Barras (FIGURA 9) provavelmente ocorreu devido o Ba e o Sr ser os elementos não essenciais análogos aos elementos essenciais Ca e Mg. Conforme White (2001), embora esses elementos possam competir pela absorção radicular, não se observa competição pelo transporte para a parte aérea, que ocorre principalmente via apoplasto. Além disso, vale lembrar que o adubo fosfatado utilizado foi o superfosfato triplo, que contém Ca (~14 %) e Mg (~0,5 %). Paralelamente, o efeito da adubação fosfatada nos teores foliares de Ti foi similar ao efeito para os teores de Ba, Ca, Mg e Sr no experimento de Três Barras (FIGURA 9), embora esses não sejam considerados análogos nas plantas. Contudo, esses elementos foram alterados pela adubação fosfatada independentemente dos maiores ou menores totais no solo, sugerindo que ocorrem complexas variações dependentes de relações solo, planta e ambiente. Em tempo, é preciso dizer que, o supracitado aumento nos teores foliares de Ba, Sr e Ti, não é expressivo à ponto de prejudicar a qualidade nutricional das folhas em relação ao consumo humano (Hamilton & Minski, 1973; Scher, 2012; Maiocchi et al., 2016).

Como visto anteriormente, os clones de erva-mate apresentaram diferenças com relação aos teores de alguns elementos. Tais resultados são reforçados ao considerar às correlações entre elementos: 17 correlações positivas e uma correlação negativa foram registradas exclusivamente para o clone F1; 10 correlações positivas e 6 correlações negativas foram registradas exclusivamente para o clone F2; 17 correlações positivas e 4 correlações negativas foram compartilhadas pelos clones.

Considerando as correlações com elementos determinados apenas nesse experimento (em condições de campo), verificou-se correlações entre Ca, Mg e Ti, sendo que ambos se correlacionaram de forma negativa com o K (FIGURA 10). As relações entre Ca, Mg e K são conhecidas de longa data (Marschner, 2012). Porém, as relações com Ti são menos conhecidas, sobretudo por que poucos estudos apresentam os teores de Ti nas folhas. Estudos indicam que o Ti pode ter efeitos benéficos para as plantas (Tlustoš et al., 2005; Kleiber & Markiewicz, 2013).

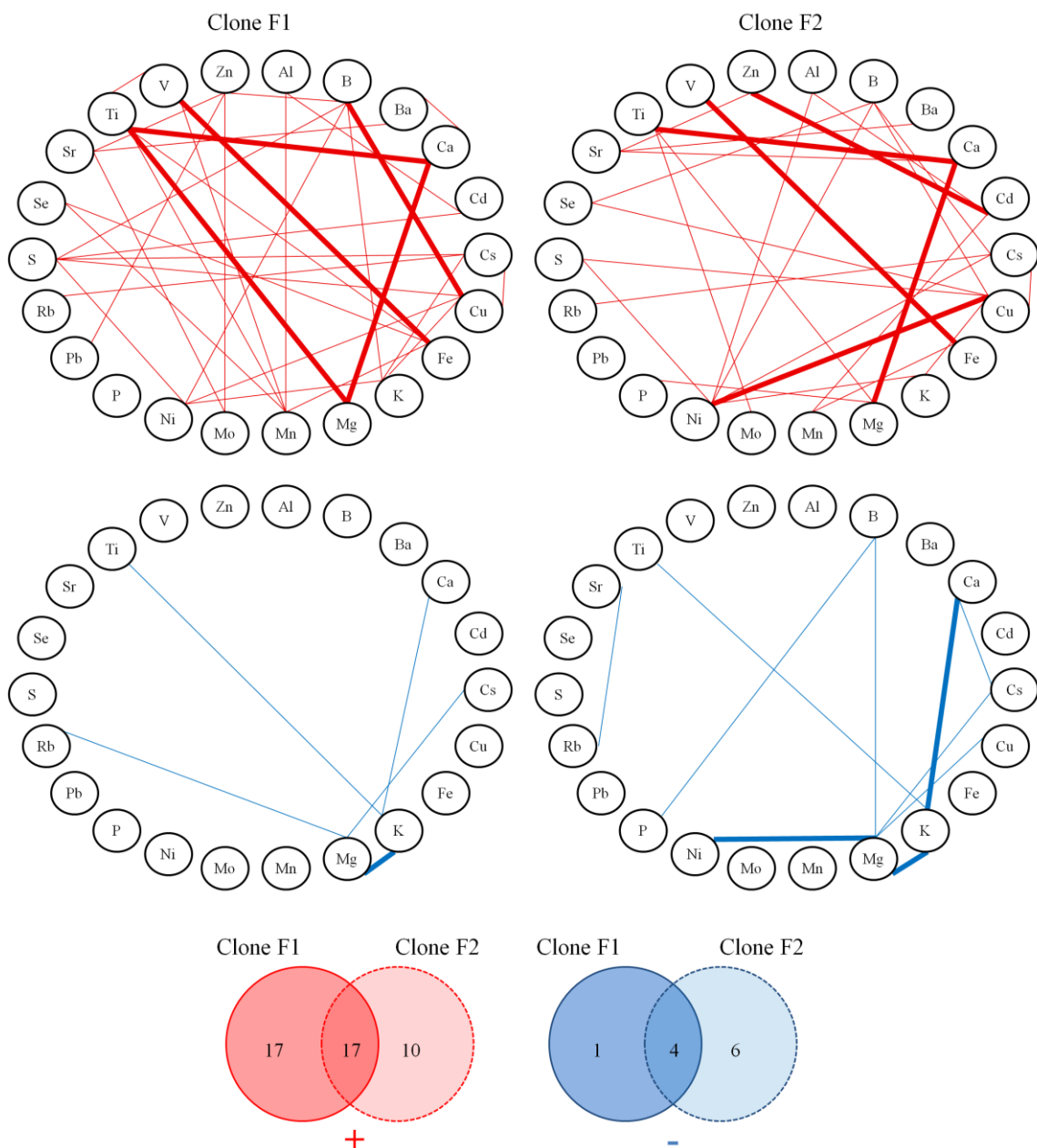


FIGURA 10. Correlações entre elementos determinados em folhas de clones (F1 e F2) de erva-mate. Em quatro correlogramas circulares, as linhas estreitas e linhas largas que ligam os elementos indicam, respectivamente, coeficiente de correlação (r) entre 0,50 e 0,70 e, acima de 0,70; linhas vermelhas e linhas azuis indicam, respectivamente, correlações positivas e negativas; foram consideradas apenas correlações significantes ($p < 0,05$). Na parte inferior da figura diagramas contém o número de correlações (r acima de 0,50; $p < 0,05$) positivas (vermelho) e negativas (azul) registradas em cada clone ou de ocorrência nos dois clones (área compartilhada entre círculos).

Já as correlações positivas entre os teores de Cs e Rb pode ser devido ao fato de que esses dois elementos fazem parte do grupo dos elementos alcalinos terrosos, assim como as correlações positivas entre Sr e Ba. Apesar de ser do mesmo grupo de elementos, o Cs teve correlação negativa com Mg e Ca (FIGURA 10). Grande parte da aquisição de Ca ocorre através de rotas apoplásticas e via canais iônicos (White, 2001), sendo verossímil que alguma dessas vias também interfira diretamente na aquisição e/ou transporte de outros elementos alcalinos terrosos. Por outro lado, algumas correlações entre elementos nas folhas da erva-mate que foram registradas no experimento em casa-de-vegetação (FIGURA 5) ocorreram novamente no experimento realizado no campo (FIGURA 10), com destaque para aquelas que foram independentes do clone ou da condição experimental: Fe x V; Cu x Ni; Cu x K; Al x Cd (todas positivas). Outras duas similaridades foram: os teores de Pb e Cd que não estiveram correlacionados em nenhum experimento; o Cd esteve envolvido em maior número de correlações com outros elementos.

1.4. CONCLUSÕES

Adubação fosfatada teve grande efeito positivo sobre o crescimento da erva-mate cultivada em casa-de-vegetação. Isso ajuda a explicar a baixa produtividade geralmente obtida em sistema extrativista de erva-mate sem uso de adubos. Contudo, o incremento no crescimento diminui em solo com maior disponibilidade inicial de P ou com alguma limitação nutricional.

A adubação fosfatada altera a composição elementar das folhas de erva-mate, contudo, o efeito da adubação fosfatada varia em função de tipo de solo e clone. De maneira geral, na condição de casa-de-vegetação o efeito é mais expressivo, com: diminuição (N, K, Mg, Mn, Cu, Ni, B, Mo, Al, Cd); aumento (relação C/N, P, C, Ca, Fe, V); aumento ou diminuição (Zn, Ba, Pb) e; nulo (Cr). Na condição de campo a adubação fosfatada promove o aumento linear dos teores de Pb e Se e, efeito quadrático nos teores de Ba, Ca, Mg, Sr e Ti nas folhas de erva-mate cultivada em Três Barras, enquanto que em Itaiópolis não ocorre alteração significativa.

Resultados contrastantes entre o estudo em casa-de-vegetação e no campo, como, por exemplo, para os teores de Pb, que apresentam aumento ou decréscimo com a adubação fosfatada, impossibilitam que generalizações sejam feitas.

O efeito de maior expressividade para o Mn no experimento de casa-de-vegetação é devido ao fator solo que, em comparação a adubação fosfatada e aos clones, contribui mais para determinar se o Mn tem acumulação acima de 1000 mg kg⁻¹ nas folhas. Verifica-se que, além da elevada acidez do solo, o acúmulo de Mn nas folhas é dependente da disponibilidade desse elemento no solo, associada com teores de Mn-disponível, Mn-baixa cristalinidade e Mn-cristalino. Na condição de campo verifica-se que os teores totais de alguns elementos (Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr e Zn) no solo tem relação com maiores teores nas folhas de erva-mate.

A influência da variação genotípica da erva-mate pode ser explorada para fins de segurança alimentar, tendo em vista que os clones variam com relação aos teores de Pb, Ba, Al e Zn nas folhas para o experimento em casa-de-vegetação e, Fe, Mg, Mo, Zn, Al, V e Pb nas folhas para o experimento em condições de campo.

1.5. LITERATURA CITADA

Akoumianaki-Ioannidou A, Barouchas PE, Iliá E, Kyramariou A, Moustakas NK. Effect of vanadium on dry matter and nutrient concentration in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Australian Journal of Crop Science, 2016; 10(2):199-206.

Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial Da União. Resolução - RDC nº- 42, de 29 de agosto de 2013.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G, Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, 2013; 22(6): 711-728.

Barbosa JZ, Zambon LM, Motta ACV, Wendling I. Composition, hot-water solubility of elements and nutritional value of fruits and leaves of yerba-mate. Ciência e Agrotecnologia, 2015; 39(6): 593-603.

Benedetti EL. Tolerância da erva mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) ao alumínio. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa. 72f. 2012.

Cardozo Junior EL, Morand C, Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A, St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. Journal Functional Foods, 2016; 21:440-454.

Carter DL, Robbins CW, Brown MJ. Effect of phosphorus fertilization on the selenium concentration in alfafa (*Medicago sativa*). Soil Science Society of America Proceedings, 1972; 36(4): 624-628.

Ceconi DE, Poletto I, Lovato T, Muniz MFB. Exigência nutricional de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.) à adubação fosfatada. Ciência Florestal, 2007; 17(1): 25-32.

Chen RF, Shen RF, Gu P, Wang HY, Xu HX. Investigation of aluminum tolerant species in acid soils of south China. Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 39: 1493-1506, 2008.

Chen Y, Yu M, Xu J, Chen X, Shi J. Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. Journal of the Science of Food and Agriculture 2009; 89(14): 2350-2355.

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie, 2006; 88: 1707-1719.

Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. Chemical Reviews, 2004; 104(2): 849-902.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília; 2013. 353 p.

Fossati LC. Avaliação do estado nutricional e da produtividade de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) em função do sítio e da dioicia. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. 113 f. 1997.

Gao L, Chang J, Chen R, Li H, Lu H, Tao L, Xiong J. Comparison on cellular mechanisms of iron and cadmium accumulation in rice: prospects for cultivating Fe-riche but Cd-free rice. *Rice*, 2016; 9:39.

GB 2762-2012. National Standards of the People's Republic of China. Maximum levels of contaminants in foods. 2012.

Gérard F. Clays minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils - A myth revisited. *Geoderma*, 2016; 262: 213-226.

Giulian R, Santos CEI, Shubeita SM, Silva LM, Yoneama ML, Dias JF. The study of the influence of industrial processing on the Elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. *LWT - Food Science and Technology*, 2009; 42:74-80.

Guimarães JC, Reissmann CB, Motta ACV, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Relação de Zn, Fe, Cu e Mn entre solo e progênies de erva-mate. *Cerne*, 2014; 20(2):285-292, 2014.

Hamilton EI, Minski MJ. Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. *Science of the Total Environment*, 1973; 1(4):375-394.

Hajiboland R, Bastani S, Bahrami-Rad S, Poschenrieder C. Interactions between aluminum and boron in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Acta Physiology Plantarum*, 2015; 37:54.

He Z, Yang X, Zhu Z, Zhang Q, Xia W, Tan J. Effect of phosphate on the sorption, desorption and plant-availability of selenium in soil. *Fertilizer Research*, 1994; 39: 189.

Hope SJ, Daniel K, Gleason KL, Comber S, Nelson M, Powell JJ. Influence of tea drinking on manganese intake, manganese status and leucocyte expression of MnSOD and cytosolic aminopeptidase P. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006; 60(1):1-8.

Hu Q, Xu J, Pang G. Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51:3379-3381.

Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific Reports*, 2012; 2:286.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants, 4th ed. London, New York: Taylor & Francis. 2011. 505 p.

Kaiser BN, Gridley KL, Brady JN, Phillips T, Tyerman SD. The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany*, 2005; 96: 745-754.

Kleiber T, Markiewicz B. Application of “Tytanit” in greenhouse tomato growing. *Acta Scientiarum Polonorum*, 2013; 12(3): 117-126.

Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2012; 63:131-152.

Leitenmaier B, Küpper H. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in Plant Science*, 2013; 4: article 374. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3778397/>. Acesso em: 03 abril 2017.

Liang J, Puligundla P, Ko S, Wan XC. A review on selenium-enriched green tea: Fortification methods, biological activities and application prospect. *Sains Malaysiana*, 2014; 43(11): 1685-1692.

Lin CY, Trinh NN, Lin CW, Huang HJ. Transcriptome analysis of phytohormone, transporters and signaling pathways in response to vanadium stress in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013; 66:98-104.

Lin ZH, Chen LS, Chen RB, Zhang FZ, Jiang HX, Tang N. CO₂ assimilation, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport

probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology*, 2009; 9:43.

Lin ZH, Chen LS, Chen RB, Zhang FZ, Jiang HX, Tang N, Smith BR. Root release and metabolism of organic acids in tea plants in response to phosphorus supply. *Journal of Plant Physiology*, 2011; 168:644-652.

Liu Q, Wang DJ, Jiang XJ, Cao ZH. Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Geochemistry and Health*, 2004; 26(2-3):325-30.

Loladze I. Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO₂ depletes minerals at the base of human nutrition. *eLife*, 2014; 3:e02245. DOI: 10.7554/eLife.02245

Maiocchi MG, Vitto LA, Petenatti ME, Marchevsky EJ, Avanza MV, Pellerano RG, Petenatti EM. Multielemental composition and nutritional value of “dumosa” (*Ilex dumosa*), “yerba mate” (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UnCuyo*, 2016; 48(1): 145-159.

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319p.

Marschner, P. Marschner's Mineral nutrition mineral nutrition of higher plants. 3.ed. London; 2012.

Martins APL, Reissmann CB. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químicos analíticos. *Scientia Agraria*, 2007; 8:1-17.

Memon AR, Chino M, Hidaka H, Hara K, Yatazawa M. Manganese toxicity in field grown tea plants and the microdistribution of manganese in the leaf tissues as revealed by electron probe X-ray micrography. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1981; 27: 317-328.

Motta ACV, Melo VF. Química dos solos ácidos. In: Melo VF, Alleoni LRF. (eds). Química e mineralogia do solo, parte 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 313-380, 2009.

Oliva EV, Reissmann CB, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Composição nutricional de procedências e progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho distroférico. *Ciência Florestal*, 2014;24(4):793-805.

Oliveira H. Chromium as an environmental pollutant: Insights on induced plant toxicity. *Journal of Botany*, 2012; article ID 375843. doi:10.1155/2012/375843

Pandolfo CM, Floss PA, Croce DM, Dittrich RC. Resposta da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) à adubação mineral e orgânica em um Latossolo Vermelho Aluminoférrico. *Ciência Florestal*, 2003; 13(2): 37-45.

Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011; 213:113-136.

Pozebon D, Dressler VL, Marcelo MCA, Oliveira TC, Ferrão MF. Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2015; 8(3): 215-220.

Rayman M, Selenium and human health. *Lancet*, 2012; 379(9822): 1256-1268.

Reissmann CB, Radomski MI, Quadros RMB. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Under different management conditions in seven localities of Paraná state. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1999; 42:187-194.

Santin D, Benedetti EL, Brondani GE, Reissmann CB, Orrutéa AG, Roveda LF. Nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento de mudas de erva-mate. *Scientia Agraria*, 2008; 9(1): 59-66.

Santin D, Benedetti EL, Bastos MC, Kaseker JF, Reissmann CB, Brondani GE, Barros NF. Crescimento e nutrição de erva-mate influenciados pela adubação nitrogenada, fosfatada e potássica. *Ciência Rural*, 2013; 23(2): 365-377.

Scher - Scientific Committee on Health and Environmental Risks. Assessment of the tolerable daily intake of barium. European Commission: Brussels, 2012, p. 13.

Shi YZ, Ruan JY, Ma LF, Han WY, Wang F. Accumulation and distribution of arsenic and cadmium by tea plants. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008; 9(3): 265-270.

Tian L, Yang J, Alewell C, Huang JH. Speciation of vanadium in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) and soils in response to different levels of vanadium in soils and cabbage growth. *Chemosphere*, 2014; 111: 89-95.

Tlustoš P, Cígler P, Hrubý M, Kuzel S, Száková J, Balík J. The role of titanium in biomass production and its influence on essential elements contents in field growing crops. *Plant, Soil and Environment*, 2005; 51(1): 19-25.

Tóth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, 2016; 88: 299-309.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 2003; 157:423- 447.

Zampier AC. Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). Dissertação Mestrado (Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná. 94f. 2001.

Wendling I, Brondani G. Produção de mudas de erva-mate. In: Ivar Wendling; Delmar Santin. (Org.). Propagação e nutrição de erva-mate. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015, v. 1, p. 11-98.

Wendling I, Dutra LF, Grossi F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 2007; 42(2): 289-292.

White PJ. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 2001; 52: 891-899.

Wood BW. Nickel deficiency symptoms are influenced by foliar Zn:Ni and Cu:Ni concentration ratio. *Acta Horticulturae*, 2010; 868:163–169.

Zoffoli HJO, Do Amaral-Sobrinho NMB, Zonta E, Luisi MV, Marcon G, Tolón-Becerra A. Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. *Environmental, Monitoring and Assessment*, 2013; 185(3): 2423-2437.

CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE FOLHAS DE ERVA-MATE USANDO TÉCNICAS DE MICROANÁLISE

RESUMO

A composição de elementos de erva-mate em escala microscópica ainda é pouco conhecida. Assim, o objetivo do presente estudo foi utilizar técnicas de microanálise para ter uma compreensão inicial da acumulação elementar em folhas de erva-mate. Folhas de erva-mate coletadas em erval nativo foram analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva e espectroscopia de fluorescência de raios X. Os teores totais de elementos foram determinados utilizando espectrômetro de emissão por chama (K) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Si, Al, Ba, Pb e Cd). Os teores totais de elementos foram similares aos reportados na literatura. Nas paredes celulares predominaram C e O. Ocorreu compartimentalização de Si na face externa da epiderme superior, entre a parede celular e a cutícula das folhas, mas sem a presença de precipitados. A precipitação de Ca, O e C ocorreu em maior quantidade na nervura central que no limbo, sendo o principal sítio de acumulação o parênquima e o parênquima paliçádico, respectivamente. Esses precipitados também continham outros elementos (K, Mg, S, Mn, Na, Si, Al, Ba). Foram registrados precipitados com O, Al, Si, Ca e Mg em estômatos da folha (origem desconhecida; contaminante ou biológico) e, acumulação de Mn, Ca e P na estrutura de um possível líquen na superfície da epiderme superior. As microanálises revelaram que existe diversidade de mecanismos de acumulação de elementos nas folhas de erva-mate.

Palavras-Chave: Acumulação de metais. Contaminantes. Oxalato de cálcio. Sílica amorfa. Significado ecológico.

CHAPTER 2. DETERMINATION OF ELEMENTAL COMPOSITION OF YERBA-MATE LEAVES USING MICROANALYSIS TECHNIQUES

ABSTRACT

The elemental composition of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St., Hil.) leaves on a microscopic scale remains unknown. Thus, the aim of the present study was to use microanalysis techniques to generate an initial understanding of elemental accumulation in yerba mate leaves. Microanalysis of yerba mate leaves from wild-grown conditions were performed using scanning electron microscopy with dispersive energy spectroscopy and X-ray fluorescence spectroscopy. Total elemental content was determined using a flame emission spectrometer (for K) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (for Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Si, Al, Ba, Pb, and Cd). Total elemental content obtained in this study was similar to that reported in the literature. Cell walls were predominantly composed of C and O. Compartmentalization of Si occurred on the external surface of the upper epidermis between the cell wall and the cuticle of the leaves, but precipitates were absent. Precipitation of Ca, O, and C was higher in the central rib than in the blade leaf, with the parenchyma and the palisade parenchyma being the main accumulation sites, respectively. These precipitates also contained other elements (K, Mg, S, Mn, Na, Si, Al, and Ba). Oxygen, Al, Si, Ca, and Mg precipitates were observed in the leaf stomata (as contaminants or of biological origin) and accumulation of Mn, Ca, and P occurred in the structure of a possible lichen on the surface of the upper epidermis. Microanalysis revealed that several mechanisms were responsible for the accumulation of elements in yerba mate leaves.

Keywords: Metal accumulation. Contaminants. Calcium oxalate. Amorphous silica. Ecological significance.

2.1. INTRODUÇÃO

A infusão feita a partir das folhas da árvore *Ilex paraguariensis* é uma bebida não alcoólica tradicionalmente consumida na América do Sul. Além disso, as folhas de erva-mate têm sido utilizadas na fabricação de diversos produtos nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos (Cardozo Junior & Morand, 2016). Muitos metabólitos secundários encontrados nas folhas de erva-mate são interessantes para a saúde humana, como fenóis, xantinas e saponinas. Por outro lado, as folhas contêm elementos essenciais e antinutricionais para a saúde humana (Barbosa et al., 2015; Maiocchi et al., 2016), que também são usados para estudar a nutrição da erva-mate (Benedetti, 2012; Trautenmüller et al., 2016).

A composição elementar de erva-mate pode variar entre muitos fatores, como, por exemplo: diferença entre plantas masculinas e plantas femininas (Fossati, 1997); procedência de erva-mate e diferença entre folhas e frutos (Barbosa et al., 2015); posição e orientação geográfica da copa (Souza et al., 2008); danos provocados por herbívoros (Borsoi & Costa, 2001); época do ano (Ribeiro et al., 2008); adubação e calagem (Reissmann & Carneiro, 2004; Santin et al., 2013); cultivo consorciado ou solteiro (Caron et al., 2014). De maneira geral, o método mais utilizado para avaliar a composição elementar das plantas é através da determinação do teor total de elementos no tecido vegetal. Contudo, os tipos de tecidos que compõem as folhas têm funções diferentes, conseqüentemente, a composição elementar também pode ser diferente (Beck, 2005; Conn & Gilliam, 2010; Regvar et al., 2013). Assim, embora a análise do teor total de elementos nas folhas tenha grande utilidade prática, não permite o estudo detalhado da acumulação de elementos nas folhas.

Técnicas avançadas de microscopia e espectroscopia têm sido úteis para microanálise elementar em plantas, pois possibilitam uma visão abrangente da acumulação de elementos nas plantas. Entre essas técnicas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) combinada com espectroscopia por dispersão de energia (EDS) (Dinh et al., 2015; Barbosa et al., 2017) e microanálise por espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF) (Zhao et al., 2014; Campos et al., 2015) têm sido utilizadas na microanálise de elementos em folhas. Porém, com relação ao estudo da composição elementar de erva-mate em escala microscópica pode-se dizer que as informações são escassas, embora possam trazer conhecimento para diversas áreas. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi utilizar técnicas de microanálise para ter uma compreensão inicial da acumulação elementar em folhas de erva-mate.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de erva-mate analisadas no presente estudo foram obtidas de plantas em condição nativa, em área localizada na zona rural do município de Cruz Machado, estado do Paraná, Brasil (FIGURA 1). O clima do local é Cfb (subtropical úmido; clima oceânico sem estação seca e com verão temperado) na classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). O solo é argiloso e com elevada acidez (TABELA 1), sendo que seu material de origem é o basalto.

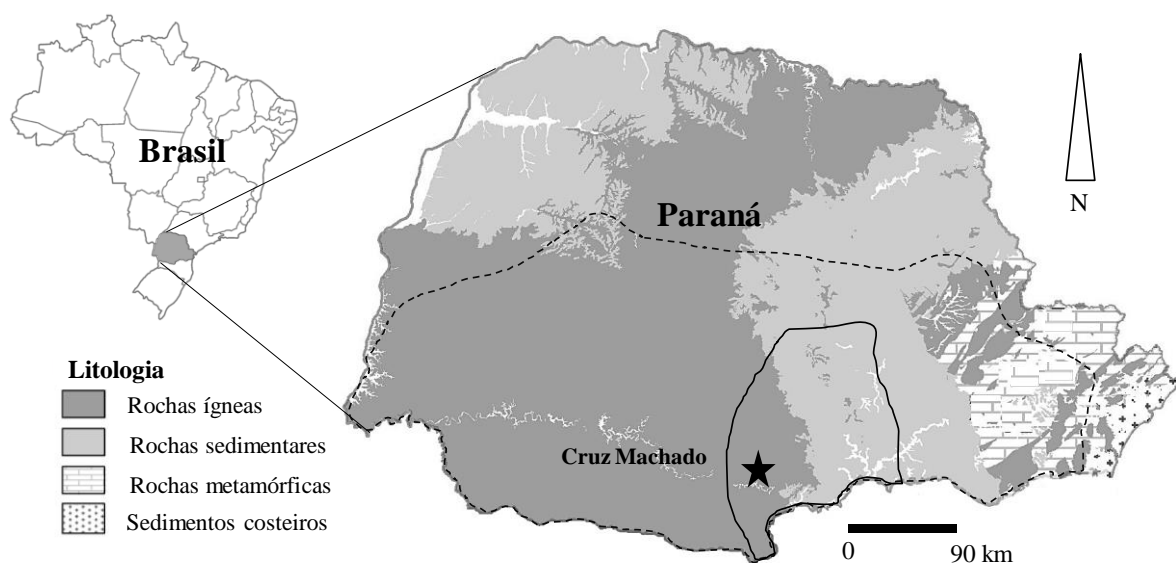


FIGURA 1. Localização da cidade onde foram coletadas as folhas de erva-mate, Cruz Machado, estado do Paraná, Brasil. Linha: Principal área de produção de erva-mate. Linha tracejada: Área de produção de erva-mate.

TABELA 1. Atributos químicos e granulometria do solo (camada de 0–20 cm) com erva-mate em condição nativa, em Cruz Machado, Paraná, Brasil

pH CaCl ₂	Al ³⁺	H + Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	CTC	P	Cu	Mn	Fe	Zn	C	Argila	Silte	Areia
----- cmol _c dm ⁻³ -----						----- mg dm ⁻³ -----					g dm ⁻³	----- g kg ⁻¹ -----			
4,0	5,0	16,6	1,3	0,7	0,2	18,8	5,0	8,4	65	151	3,1	40	637	283	81

pH (CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹); Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ (extraídos com KCl 1mol L⁻¹); H+Al³⁺ (estimado pelo pH-SMP); carbono orgânico (CO) (método volumétrico dicromato de potássio); K⁺, P, Mn, Fe, Cu, Zn (extrator Mehlich-1; relação solo:solução 1:10); areia, silte, argila (método do densímetro); CTC = capacidade de troca de cátions a pH 7,0.

Em julho de 2016 foram coletados ramos na parte central externa da copa de plantas adultas de erva-mate. Os ramos foram transportados até o laboratório dentro de recipiente com água. No laboratório foram coletadas folhas maduras da região central dos ramos, sendo imediatamente limpas com água deionizada e divididas em três partes para diferentes análises posteriores: microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS); microanálise por espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF); teores totais de elementos. Para microanálise por MEV-EDS foram obtidas seções transversais da nervura central e do limbo de folhas frescas de erva-mate. Folhas foram dispostas em placa de vidro e cortadas com lâmina de aço inoxidável. Seções (~2 mm) da região central das folhas foram fixadas a 4 °C no escuro dentro de ependorf de 3 ml contendo solução de fixação FAA (5 % [v/v] formalina, 5 % [v/v] ácido acético glacial e 70 % [v/v] etanol) por 48 h. Transcorrido o período de fixação as amostras foram armazenadas em ependorf de 3 ml contendo etanol 70 %. Posteriormente, as seções foram submetidas à desidratação em série etílica de 80, 90, 95 e 100 % por 20 minutos em cada etapa. Essas análises foram realizadas no laboratório de Nutrição de Plantas do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação ao ponto crítico com CO₂ líquido. As amostras foram montadas em suportes de alumínio recoberto com fita dupla-face de cobre. As microfotografias foram obtidas utilizando um MEV (Vega3 LM, Tescan) e a detecção de elementos em microescala foi obtida com EDS (X-Max^N 80 mm², Oxford). Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Para a microanálise via XRF folhas frescas de erva-mate foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas a secagem em estufa com ventilação forçada de ar por 48 h à 65 °C. A superfície superior das folhas foi analisada em equipamento Orbis (EDAX), do laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA. Para a análise dos teores totais de elementos as folhas frescas foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas a secagem em estufa com ventilação forçada de ar por 48 h à 65 °C. Transcorrido esse período, as folhas foram moídas em moinho Willey e passadas em peneira com malha de 1 mm. Na digestão da amostra (~200 mg; em triplicata) foi empregado 6 ml de solução ácido nítrico+água (relação 2:1; v/v) e 2 ml de peróxido de hidrogênio (30 %), em sistema fechado de aquecimento por microondas (MARS, CEM Microwave Technology Ltd). Adicionalmente, três brancos analíticos foram submetidos ao mesmo processo de digestão. Após digestão, os extratos foram transferidos para tubos de plástico e foram diluídos pela adição de água até atingir 25 ml. Os tubos de plástico foram fechados com

tampa e mantidos em ambiente de laboratório. Em todas as etapas foi utilizado água ultrapura (Millipore Milli-Q Academic). Na determinação das concentrações de elementos nos extratos foi utilizado espectrômetro de emissão por chama (DM-62, Digimed) para K, enquanto os demais elementos (Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Si, Al, Ba, Pb, Cd) foram determinados utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (720-ES, Varian). Essas análises foram realizadas no laboratório de Nutrição de Plantas do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR. As concentrações médias de elementos registrados nos brancos analíticos foram subtraídas das concentrações registrados nas soluções de digestão das amostras de tecido vegetal.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por ICP-OES revelou (TABELA 2) que as folhas de erva-mate apresentaram teores totais similares aos reportados na literatura para a maioria dos elementos analisados, sendo: K com teores superiores aos de Ca, Mg, P e S; os teores de P e S são semelhantes; o micronutriente Mn apresentou teor superior aos verificados para os micronutrientes Fe, Zn, Cu, Ni e B; teor de B acima de 40 mg kg⁻¹; teores superiores de Al e Si em comparação com micronutrientes (exceto Mn); Ni com teor superior a 1 mg kg⁻¹; Ba com teores similares aos de Zn; teores de Pb e Cd abaixo dos valores máximos permitidos na erva-mate (Pb – 0,60 mg kg⁻¹; Cd – 0,40 mg kg⁻¹) (Anvisa, 2013).

TABELA 2. Teores médios (mg kg⁻¹) de elementos em folhas de erva-mate em condição nativa, em Cruz Machado, Paraná, Brasil (presente estudo) e valores médios obtidos em outros estudos com erva-mate em condições de campo¹

	K	Ca	Mg	S	P	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	B	Si	Al	Ba	Pb	Cd
A	9828	5869	3432	1100	830	38	1668	30	11,1	2,5	48	708	357	36	0,22	0,14
B	17000	4660	4850	-	1390	107	1287	35	13,2	-	44	-	409	-	-	-
C	15599	6785	5025	1035	1404	254	1315	72	14,0	-	-	547	413	-	-	-
D	18500	4900	8000	-	1100	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	12100	9500	4300	-	1450	92	2053	15	9,7	-	127	-	710	-	-	-
F	8120	6390	2730	-	1775	51	169	35	7,7	1,3	-	-	319	38	0,52	0,12
G	11352	7688	6988	-	1371	124	685	38	8,7	4,9	-	333	643	85	2,90	-

¹ A - Presente estudo; B - Reissmann et al. (1999); C - Giulium et al. (2007); D - Caron et al. (2014); E - Oliva et al. (2014); F - Barbosa et al. (2015); G - Maiocchi et al. (2016).

Avaliando a nervura central das folhas de erva-mate por MEV-EDS verificou-se que ocorreu diferenciação para Ca, C e O (FIGURA 2; FIGURA 3). Esses três elementos fazem parte precipitados visualizados nas folhas de erva-mate, sobretudo, no parênquima. A composição indica que provavelmente os precipitados são cristais de oxalato de Ca, pois precipitados de carbonato de Ca não resistem ao processo de fixação das amostras quando o fixador contém ácido acético (Lersten e Horner, 2011), como no presente estudo (ver “Material e métodos”). Em avaliações com microscopia de luz, Libardoni et al. (2007) registraram aumento da formação de cristais em nervuras de folhas de erva-mate com o aumento da disponibilidade de Ca no solo. Dessa forma, indicando que a erva-mate pode ser uma planta oxálica com relação à nutrição de Ca (White, 2005), similarmente ao que foi reportado por Barbosa et al. (2017) para *Araucaria angustifolia*, árvore nativa da mesma região que a erva-mate.

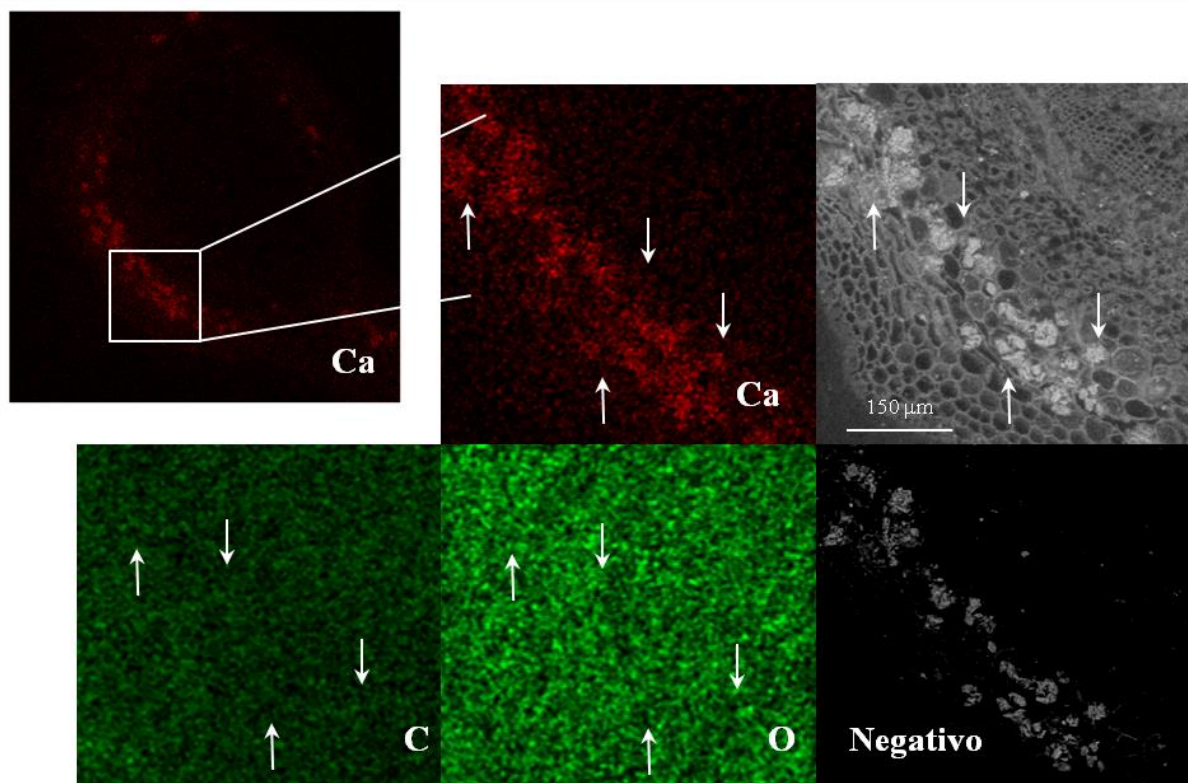


FIGURA 2. Distribuição de Ca na nervura central de folha de erva-mate em secção transversal e detalhe com mapa de Ca, C e O e, negativo usando MEV-EDS.

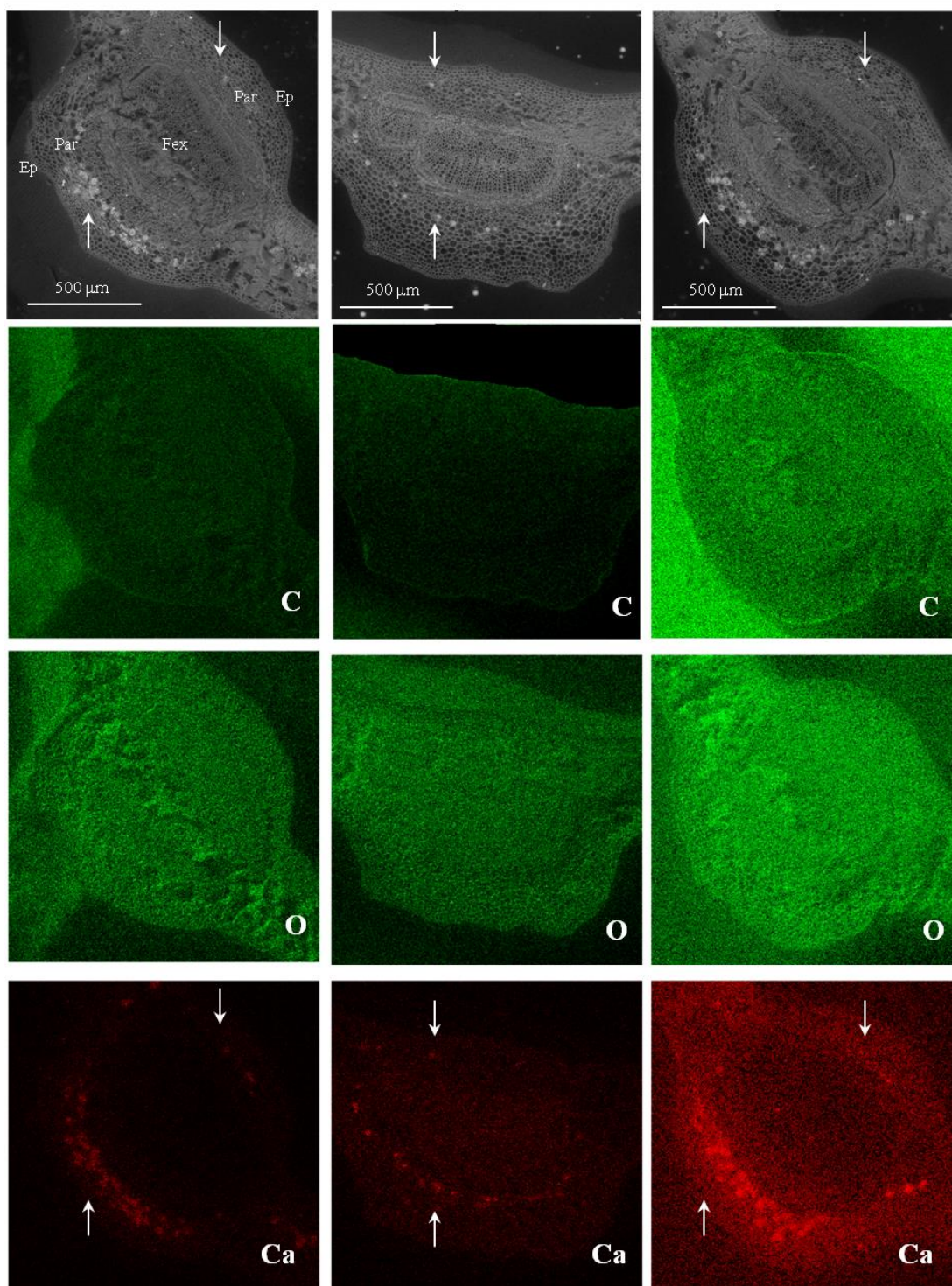


FIGURA 3. Distribuição de C, O e Ca na nervura central de folhas de erva-mate em secções transversais usando MEV-EDSI. Epi: Epiderme; Par: Parênquima; Fex: Feixe vascular.

Estudos com plantas arbóreas indicam que a maior parte do Ca foliar está associada com oxalato (Fink, 1991; Krieger et al., 2017). A formação de cristais de oxalato de Ca é comum nos vegetais, sendo que têm sido propostas diversas funções além da regulação da disponibilidade de Ca nas células, como: desintoxicação de ácido oxálico; desintoxicação de metais potencialmente tóxicos; regulação da luz; efeito anti-herbívoros; polinização; efeito na fotossíntese; suporte e rigidez do tecido vegetal e; nos ciclos biogeoquímicos (FIGURA 4). Em termos quantitativos, é interessante notar que Krieger et al. (2017) verificaram que os cristais de oxalato de Ca (na forma de whewelita) corresponderam por 0,7 % (1069 kg ha⁻¹) e 3,1 % (98 kg ha⁻¹) da quantidade total de matéria da parte aérea e das folhas de espécies da floresta decidual de Montiers, na França, respectivamente. Todavia, excesso desses cristais em plantas alimentares ou medicinais pode ser um fator indesejável (Scardelato et al., 2013).

Foram obtidos mapas de distribuição para C, O, Ca e Si usando o MEV-EDS para analisar o limbo foliar de erva-mate (FIGURA 5). Com base nos mapas de C e O em secção transversal do limbo foliar da erva-mate constatou-se que esses elementos estiveram associados às paredes celulares, o que fica mais evidente nas células da epiderme superior (FIGURA 5). Resultados similares foram constatados por Regvar et al. (2013), em folhas de *Noccaea praecox* usando microanálises por fluorescência de raios-X de baixa energia com fonte de radiação síncrotron. Isso decorre do fato de que as paredes celulares são constituídas de macromoléculas, principalmente celulose (15 até 30 % da matéria seca), que por sua vez são constituídas majoritariamente de C, O e H (White, 2012).

Embora outros estudos tenham detectado variações com relação à distribuição de Ca entre epiderme e parênquima (Storey & Leigh, 2004; Rios et al., 2012), nas folhas de erva-mate não foi possível estabelecer tal relação (FIGURA 5). Contudo, verificou-se claramente que ocorreu acúmulo de Ca em precipitados no parênquima paliçádico da folha (FIGURA 5; FIGURA 6). Similarmente, Navarro et al. (2007) registraram cristais de oxalato de Ca no parênquima paliçádico de folhas de erva-mate usando microscopia de luz polarizada. A homeostase de Ca nas células vegetais é de suma importância para o adequado funcionamento celular, que decorre da função de sinalizador que esse nutriente tem em processos fisiológicos da planta (Taiz et al., 2015). Assim, o sequestro de Ca em precipitados provavelmente seja um mecanismo que contribui para manter o balanço iônico no meio celular, sobretudo no parênquima paliçádico das folhas de erva-mate.

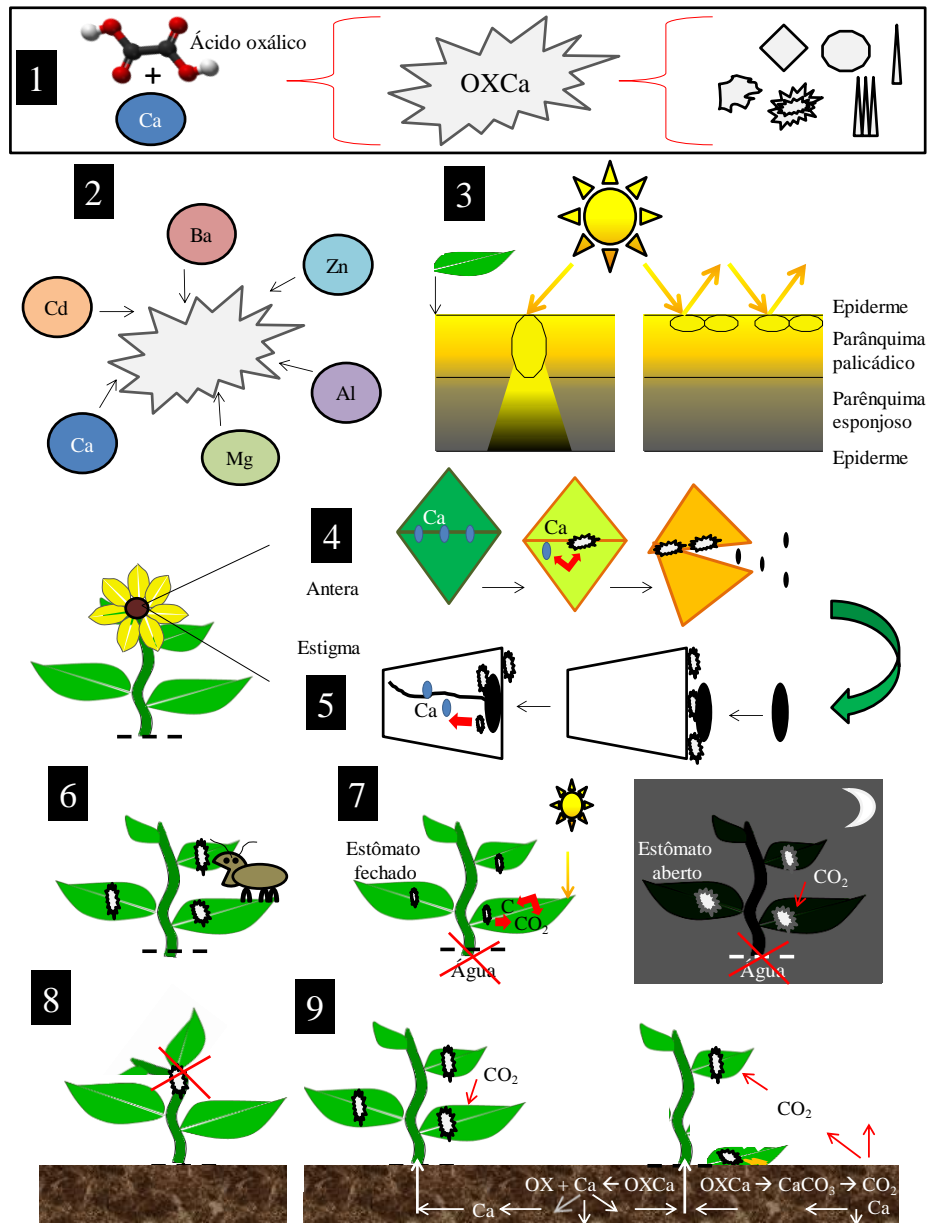


FIGURA 4. Cristais de oxalato de Ca em plantas. (1) Formação de cristais de oxalato de Ca a partir de ácido oxálico e Ca; (2) regulação de ácido oxálico e Ca nas células e, sequestro de outros elementos; (3) manipulação – aproveitamento ou reflexão – de luz; (4) liberação de grãos de pólen; (5) fixação de grãos de pólen no estigma e fonte de Ca para o crescimento do tubo polínico; (6) limitação da palatabilidade do tecido vegetal em herbívoros; (7) fonte interna de CO_2 em condições de fechamento de estômatos durante o dia; (8) suporte e rigidez do tecido; (9) impacto nos ciclos biogeoquímicos de C e Ca. OXCa – precipitado de oxalato de cálcio. Elaborado com base em He et al. (2014), Tooulakou et al. (2016), Barbosa et al. (2017), Pierontani et al. (2017).

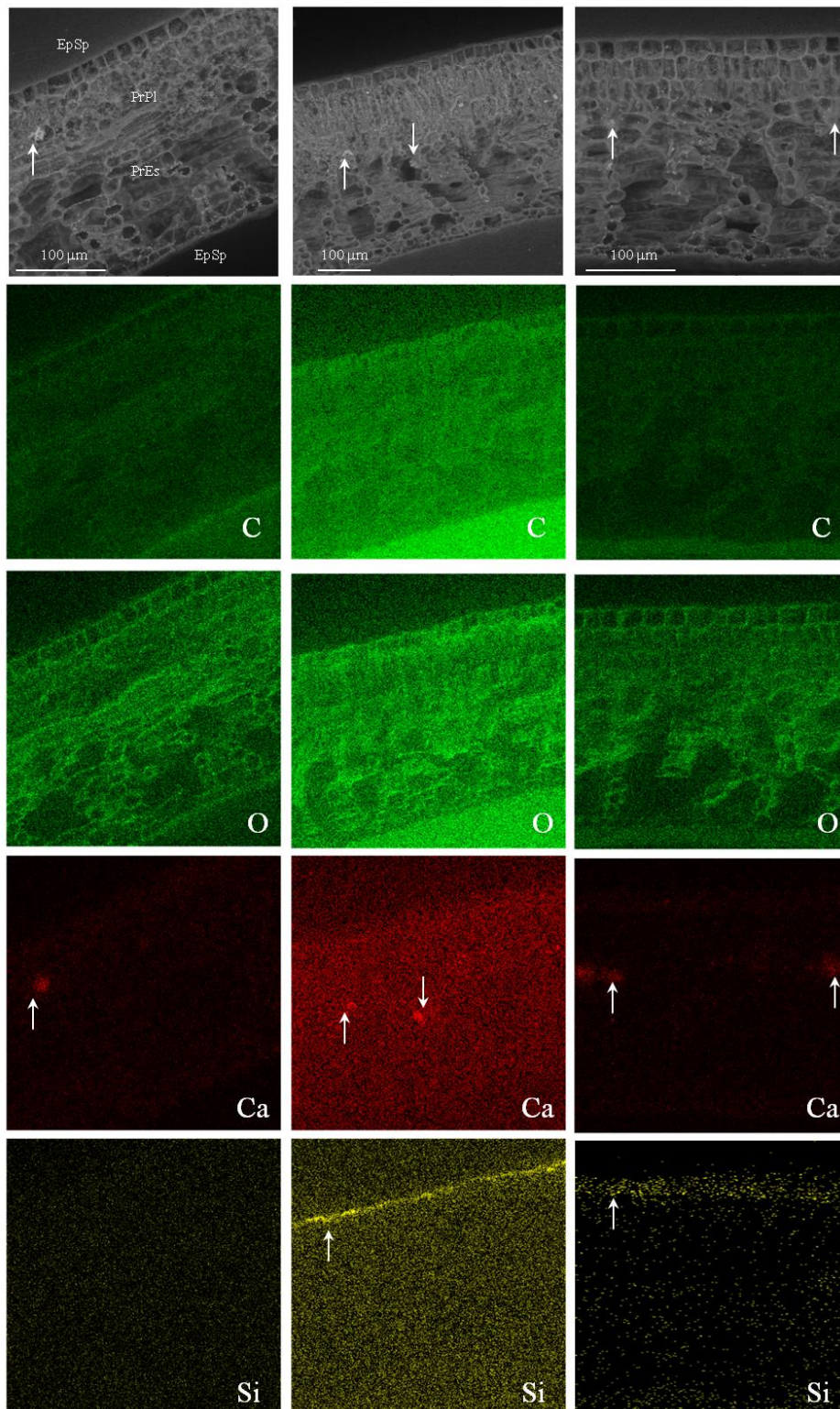


FIGURA 5. Distribuição de Ca, O, Ca e O no limbo de folhas de erva-mate em secções transversais usando MEV-EDS. EpSp: Epiderme superior; PrPl: Parênquima paliçádico; PrEs: Parênquima esponjoso; EpIf: Epiderme inferior.

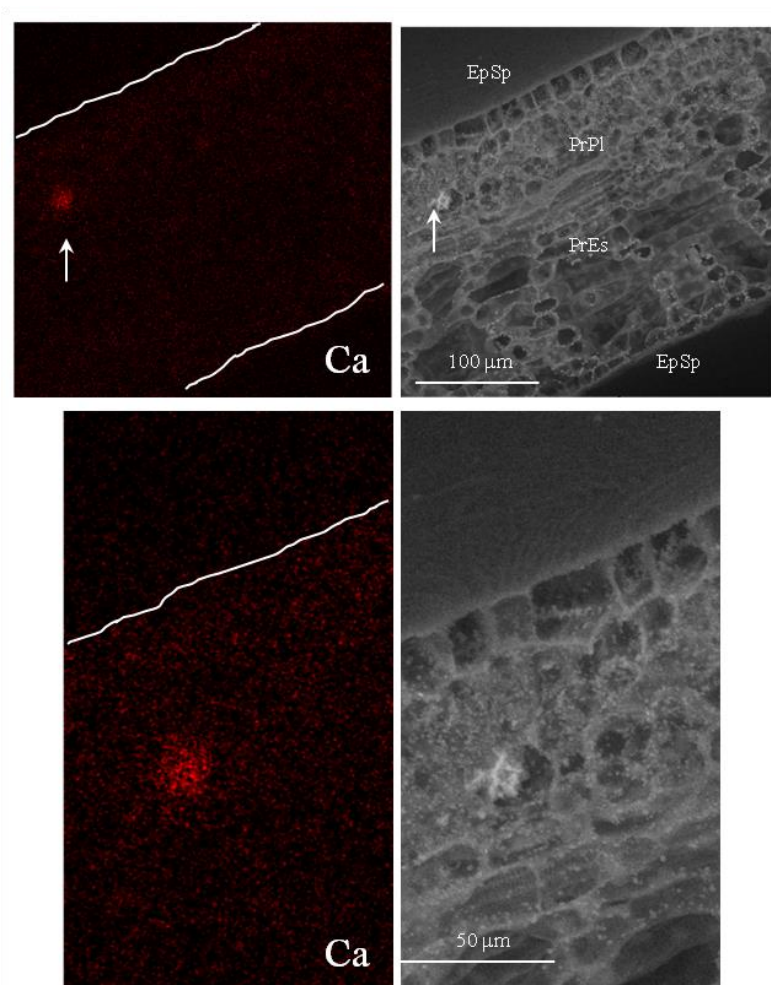


FIGURA 6. Distribuição de Ca e Si em secção transversal do limbo de folha de erva-mate usando MEV-EDS. EpSp: Epiderme superior; PrPl: Parênquima paliádico; PrEs: Parênquima esponjoso; EpIf: Epiderme inferior.

Por outro lado, em espécies onde os precipitados estão associados ao aproveitamento de luz em ambientes de baixa intensidade luminosa ou proteção contra excesso de luz normalmente ocorrem precipitados maiores e que estão mais próximos da superfície da folha (He et al., 2014; Pierontani et al., 2017). Todavia, para o aprofundamento nessa questão são necessários estudos específicos com folhas de erva-mate em condições contrastantes de luminosidade e Ca, já que a disponibilidade do elemento no solo afeta formação de precipitados (Libardoni et al., 2007). Além disso, seria interessante avaliar diferentes clones de erva-mate, haja vista que variações genótípicas podem influenciar essa distribuição e ter relação com diferentes características das folhas de clones. Para a visualização rápida, sem

necessidade de análise de composição, estudos com microscopia de luz polarizada podem ser empregados de forma a analisar grande número de amostras de folhas.

A acumulação de Si na face externa da epiderme superior (FIGURA 5; FIGURA 7) provavelmente está associado com o elemento apresentar alta mobilidade no xilema e ter seu transporte dependente do fluxo transpiratório. Assim, após evaporação da água o Si é depositado na forma de Si na face externa de células da epiderme ou até mesmo, eliminado via gutação (Broadley et al., 2012; Guerriero et al., 2016). Isso também é confirmado pela ausência de acumulação de Si na epiderme da nervura, onde não ocorre fluxo de água como ocorre na epiderme do limbo foliar. Contudo, no presente estudo não foram detectados precipitados contendo altos teores de Si nas secções transversais do limbo foliar (FIGURA 5; FIGURA 7), ao contrário do relatado para algumas plantas, como, por exemplo, espécies da família Poaceae (gramíneas) e espécies arbóreas (Motomura et al., 2006; Cacique et al., 2013; Krieger et al., 2017).

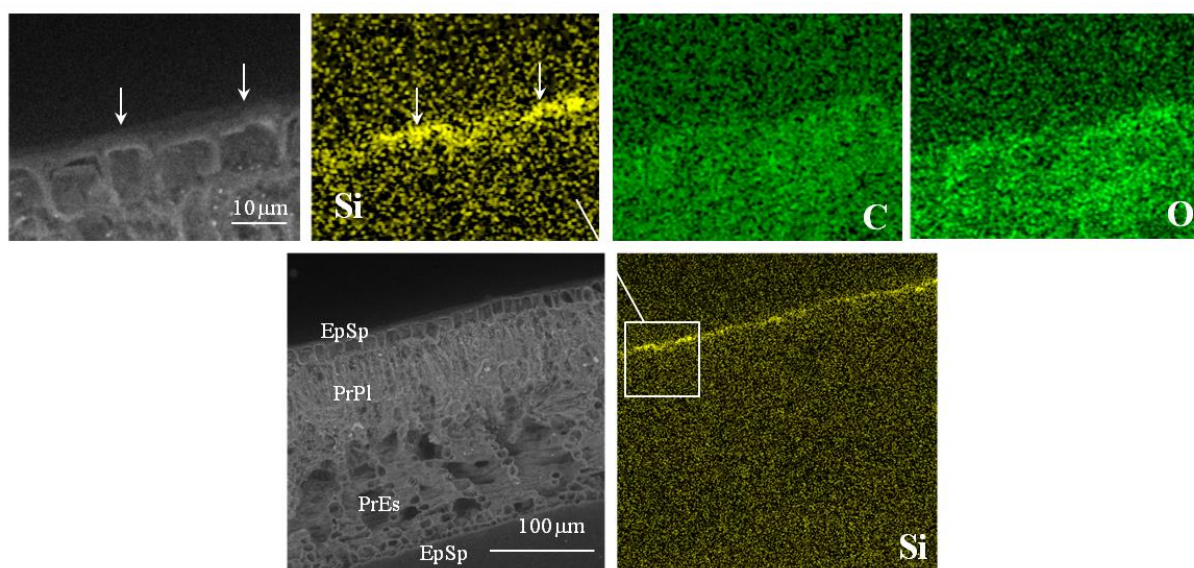


FIGURA 7. Distribuição de Si no limbo de folha de erva-mate em secção transversal usando MEV-EDS e detalhe com a distribuição de Si, C e O. EpSp: Epiderme superior; PrPl: Parênquima paliçádico; PrEs: Parênquima esponjoso; EpIf: Epiderme inferior.

Ocorreu maior quantidade de precipitados na nervura central em comparação ao limbo foliar da erva-mate, sendo que na nervura central o principal sítio de formação foi o parênquima (FIGURA 2; FIGURA 5). Duarte & Golambiuk (2008) encontraram precipitados no parênquima da nervura da folha de erva-mate por meio de microscopia de luz. Utilizando

microscopia de luz polarizada para estudar a erva-mate, Navarro et al. (2007) encontraram: entre os órgãos vegetativos aéreos (caule, limbo e pecíolo da folha) ocorreu maior quantidade de precipitados no parênquima do pecíolo; grande quantidade de precipitados de oxalato de Ca foram visualizados na flor pistilada. Embora no referido estudo não tenha sido analisada a nervura central, o tecido do pecíolo é anatomicamente similar à nervura central. Essa variação de distribuição de precipitados indica que na erva-mate a maior formação de cristais ocorre em células de preenchimento e reserva no entorno do feixe vascular da nervura central comparativamente às células fotossintetizantes do limbo foliar (Beck, 2005).

No parênquima da nervura central a formação de precipitados ocorre dentro das células e nas paredes celulares (FIGURA 8A), que foi destacada pela alteração cromática da imagem (FIGURA 8B). Como mostrado por Barbosa et al. (2017), a alteração cromática para fotomicrografia obtida com MEV em baixo vácuo facilita a visualização das regiões onde ocorre acumulação de cristais de oxalato de Ca, devido ao contraste natural que ocorre entre os cristais e o tecido foliar. Embora os cristais ocorram dentro e fora das células, os maiores cristais foram encontrados dentro das células. É provável que isso esteja associado à acumulação de Ca metabólico não utilizado nas células, mais especificamente, em vacúolos (Taiz et al., 2015). Assim, uma grande quantidade de Ca no vacúolo pode favorecer, a partir de um dado momento, a formação de cristais de oxalato de Ca dentro das células (Franceschi e Nakata, 2005).

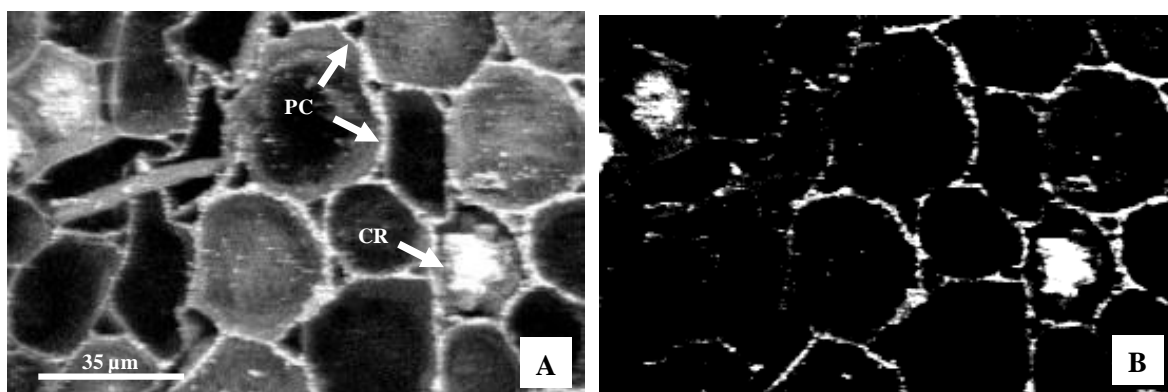


FIGURA 8. Região com acumulação de precipitados ou cristais de oxalato de Ca no parênquima da nervura central de folhas de erva-mate. Fotomicrografia (A) e fotomicrografia negative (B). PC: parede celular; PR: precipitado.

Além da diferença na quantidade de precipitados formados na nervura central e limbo foliar da erva-mate, registrou-se que a composição dos precipitados também foi contrastante para três elementos: nervura central – precipitados contendo mais Ca; limbo – maior concentração relativa de Al e S nos precipitados (TABELA 3). No total foram detectados dez elementos (C, O, K, Ca, Mg, S, Mn, Na Si e Al) em praticamente todos os precipitados encontrados tanto no limbo como na nervura central. Na nervura central (n = 2) e no limbo foliar (n = 3) também foram encontrados outros precipitados onde foi detectado Ba (0,01 até 0,09 %).

TABELA 3. Teor relativo de elementos em precipitados no limbo e na nervura central de folhas de erva-mate através de microscopia eletrônica de varredura combinada com espectroscopia por dispersão de energia¹

	C	O	Ca	Al	Mg	S	Na	Si	K	Mn
----- Limbo (n = 8) -----										
Média	69,88	28,6	1,31	0,049	0,018	0,034	0,023	0,030	0,013	0,009
DP ²	2,87	2,8	0,13	0,013	0,004	0,005	0,004	0,011	0,005	0,002
Máximo	75,23	31,8	1,59	0,070	0,020	0,040	0,030	0,050	0,023	0,010
Mínimo	66,61	23,3	1,16	0,040	0,010	0,030	0,020	0,020	0,010	0,005
----- Nervura (n = 8) -----										
Média	68,13	29,8	1,82	0,014	0,025	0,021	0,027	0,015	0,016	0,014
DP	2,65	2,4	0,11	0,004	0,005	0,003	0,006	0,005	0,004	0,007
Máximo	70,93	33,6	2,00	0,020	0,030	0,030	0,040	0,020	0,020	0,030
Mínimo	64,35	27,0	1,56	0,010	0,020	0,020	0,020	0,010	0,010	0,010

¹O teor de cada elemento é relativo a soma de todos os elementos detectados (100 %); ²DP = desvio padrão.

Os cristais com maior teor relativo de Ca ocorreram justamente no tecido em que ocorreu maior formação desses cristais, ou seja, na nervura central das folhas da erva-mate. Em termos práticos, a baixa hidrossolubilidade de Ca das folhas (Barbosa et al., 2015) ou produto (Pozebon et al., 2015) de erva-mate pode ser devido a fixação do elemento nas paredes celulares, especificamente na forma de pectatos de Ca e, em grande parte, devido a formação de cristais de oxalato de Ca na nervura e no limbo. Isso pode ser considerado tendo em vista que: na parede celular o Ca é encontrado em formas estruturais de baixa solubilidade (Taiz et al., 2015); a dissolução dos cristais de oxalato de Ca é efetuada com ácidos fortes, como o HCl (Fink, 1991), ao contrário dos cristais de carbonato de Ca, que são dissolvidos com baixa concentração de ácido fraco (Lersten & Horner, 2011). Assim, é possível que os cristais de oxalato de Ca sejam pouco alterados após a infusão de produtos contendo folhas de erva-mate. Apesar de não ter sido detectado em todos os precipitados o Ba foi elemento que

teve teor relativo máximo (0,09 %) mais alto entre os demais elementos (excluindo o Ca), sendo acima do maior valor para Al (0,07 %), embora baixo se comparado ao Ca. Esse resultado pode ser devido ao Ba ser um elemento não essencial análogo químico do Ca, sendo que ambos apresentam aspectos similares de absorção e transporte (White, 2001). Contudo, como não foram encontrados em todos os precipitados, são necessários mais estudos para conhecer a importância disso para a acumulação de Ba nas folhas de erva-mate. He et al. (2014) também encontraram cristais de oxalato de Ca contendo Ba, Sr (outro análogo químico do Ca) em folhas de espécies de *Acacia*. A erva-mate tolera elevados teores de Al nas folhas (1000 mg kg⁻¹) por ser adaptada às condições de solos ácidos (Fossati, 1997; Reissmann et al., 1999). Apesar disso, os mecanismos de tolerância ao Al na erva-mate ainda são pouco explorados. Dessa forma, a presença de mais Al nos precipitados analisados no limbo foliar da erva-mate (TABELA 3) pode ser benéfica através da inativação de parte do Al contido na folha. Em termos fisiológicos, a precipitação de Al no limbo foliar seria interessante por que nesse local ocorre produção de estruturas primárias de C na fotossíntese, processo que pode ser prejudicado pelo excesso de Al (Chen et al., 2010). Similarmente, Barbosa et al. (2017) também não detectaram outros elementos tóxicos além do Al em cristais encontrados em folhas de plantas jovens de *Araucaria angustifolia*, espécie que ocorre frequentemente associada com erva-mate. Por outro lado, estudos reportam a presença de outros elementos tóxicos ou não essenciais (V, Ti, Cd, Pb) em cristais encontrados em folhas de plantas (He et al., 2014; He et al., 2015).

As principais implicações da acumulação de Ca e Si estão relacionadas com a fisiologia da planta e com aspectos ecológicos (FIGURA 9). Como já mencionado, em termos fisiológicos, a formação de cristais de oxalato de Ca em folhas de erva-mate (FIGURAS 2, 3, 5, 6 e 8) indica que este mecanismo está associado à homeostase de Ca nas células e também tem efeito em outros elementos (TABELA 3), embora com menos expressividade. Em relação aos aspectos ecológicos, a formação de cristais de oxalato de Ca deve ser considerada no ciclo biogeoquímico de Ca e C, pois, para que esses elementos voltem ao solo (Ca) ou à atmosfera (na forma de CO₂), é necessário que a decomposição de cristais ocorra no solo. A acumulação de Si na face mais externa da epiderme das folhas pode representar uma verdadeira barreira contra o ataque de insetos e patógenos, que é um dos motivos que torna o Si um elemento benéfico (Broadley et al., 2012; Pozza et al., 2015). No caso da erva-mate (FIGURA 7), considerando os baixos teores de Si nas folhas (TABELA 2) e a falta de precipitados de Si na

epiderme, é esperado menor influência da acumulação de Si na face mais externa da epiderme sobre o ataque de herbívoros. Contudo, é provável que essa acumulação seja suficiente para limitar a infecção por diversos tipos de fungos, por que a camada de Si na epiderme torna-se um impedimento mecânico à penetração das hifas dos fungos (FIGURA 9). Esse pode ser um dos motivos de existir poucas doenças fúngicas que se manifestam em folhas totalmente expandidas de erva-mate. Contudo, o número de doenças fúngicas que se manifestam em folhas novas em condições de viveiro e de campo é relativamente maior (Grigoletti Júnior & Auer, 2000), sendo que folhas jovens a formação da barreira mecânica pelo Si é menor (Broadley et al., 2012; Pozza et al., 2015). Assim, em termos práticos, é possível que a aplicação de Si possa ser utilizada como estratégia para diminuir o efeito de doenças em folhas jovens, hipótese que deve ser avaliada em estudos específicos.

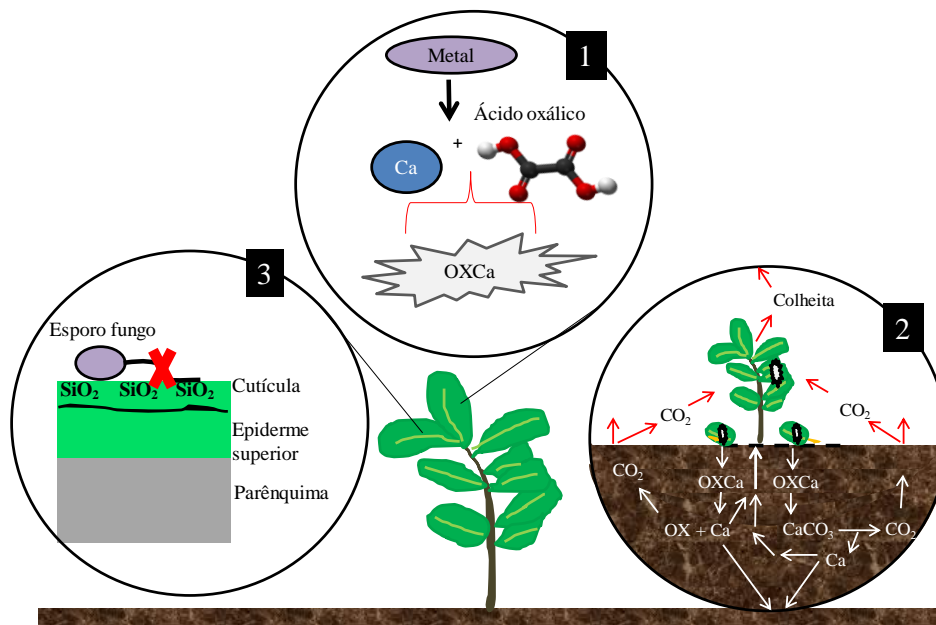


FIGURA 9. Esquema com implicações detacadas pela relação com os resultados obtidos no presente estudo. 1 – O ácido oxálico produzido pela erva-mate liga-se ao Ca (também com outros metais em quantidades muito baixas) e precipita sob a forma de cristais de oxalato de Ca. 2 – Os ciclos biogeoquímicos C e Ca; a decomposição dos cristais de oxalato de Ca no solo pode ocorrer através da via do carbonato de Ca (CaCO_3) ou pela via do oxalato. Na erva-mate, é necessário adicionar a colheita, tanto no sentido da retirada de nutrientes do sistema como dos efeitos sobre a qualidade do produto. 3 – O silício pode se acumular na superfície externa da epiderme superior; isso talvez limite a infecção das folhas por alguns fungos.

Avaliando a superfície abaxial das folhas de erva-mate foram encontradas partículas entre as células-guarda dos estômatos: i – partículas compostas principalmente de O, Si e Al; ii – partículas compostas principalmente de O, Si, Al e Ca (FIGURA 10). Ainda, nas folhas de erva-mate as partículas foram encontradas em estômatos isolados, não se caracterizando como um fenômeno generalizado à primeira vista.

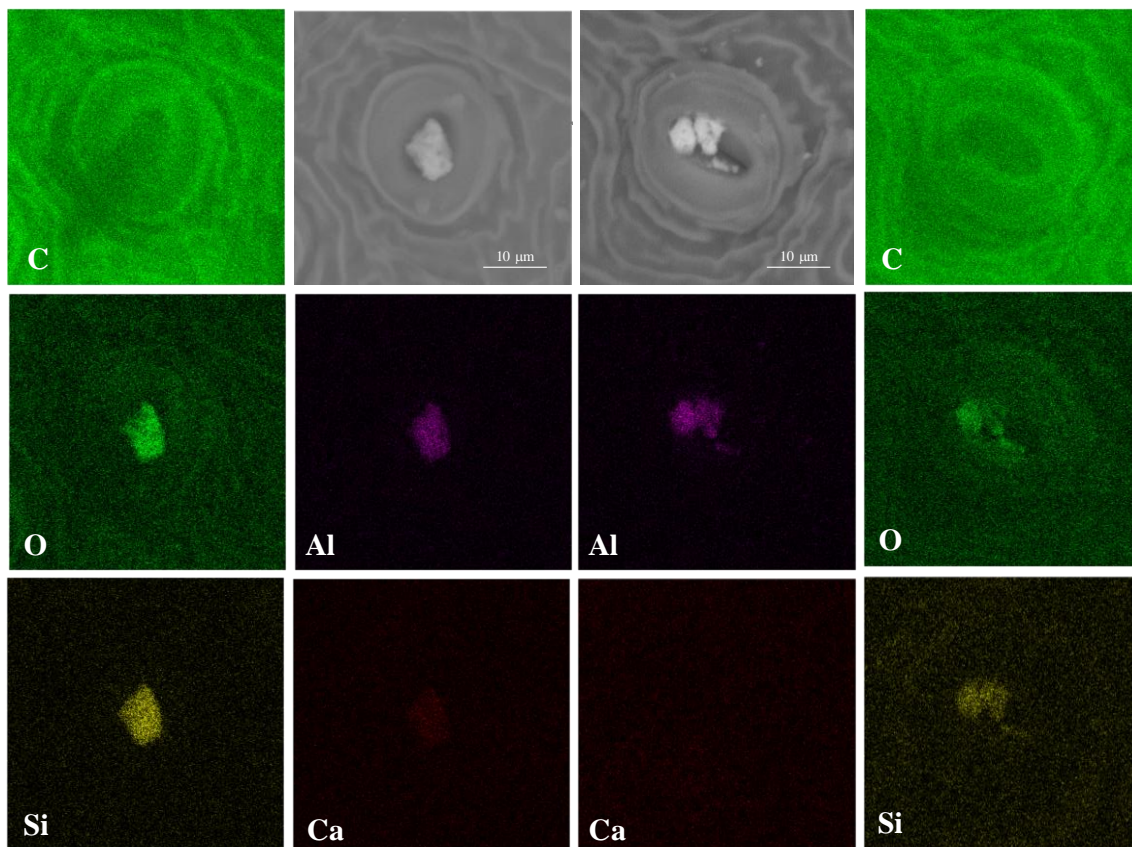


FIGURA 10. Distribuição de C, Al, Si, O e Ca em estômatos da superfície adaxial de folhas de erva-mate usando microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva.

Embora não seja conhecida a origem das partículas encontradas nos estômatos é possível hipotetizar que: No caso de contaminação externa, a poeira contendo partículas de solo ou outros contaminantes (através do ar ou pela ação de outros organismos) seriam possíveis fontes (Barbagli, 1995; Simon et al., 2014), sobretudo o solo, que têm partículas de aluminossilicatos (Silva et al., 2008; Khomo et al., 2017). Nesse caso as partículas teriam ficado presas nos estômatos impossibilitando que fossem retiradas facilmente apenas com a

passagem de água deionizada após a coleta das folhas. No caso de formação decorrente do metabolismo da planta, vale destacar a presença de Si na constituição das partículas (FIGURA 10), que é um elemento com transporte associado ao fluxo transpiratório (Guerriero et al., 2016). Assim, a precipitação de Si no ponto final da rota transpiratória pode ocorrer, como reportado por Otang et al. (2014). Adicionalmente, a co-precipitação de elementos potencialmente tóxicos (Al) com o Si teria relação com mais um dos efeitos pelos quais o Si é considerado um elemento benéfico (Broadley et al., 2012). Todavia, em plantas que ocorre a formação de precipitados de Si nos estômatos os teores do elemento geralmente são mais altos, o que não foi constatado no presente estudo (TABELA 2).

Na microanálise por XRF foi detectado um ponto de acumulação de Mn na epiderme superior de erva-mate. Após aproximação e análise constatou-se que o ponto com acumulação de Mn pode se tratar de um líquen (FIGURA 11). Ainda, verificou-se que na estrutura ocorreu acúmulo de Mn na parte central e, acúmulo de P e Ca nas extremidades e, baixo acúmulo de K e S. Existem líquens que são conhecidos pela capacidade de acumular metais em elevadas quantidades em seus tecidos, inclusive líquens que crescem na epiderme de folhas de plantas (Alirzayeva et al., 2006; Bjerke et al., 2006). O acúmulo de Mn no líquen pode estar associado com os altos teores totais de Mn na folha (TABELA 2) ou outro efeito

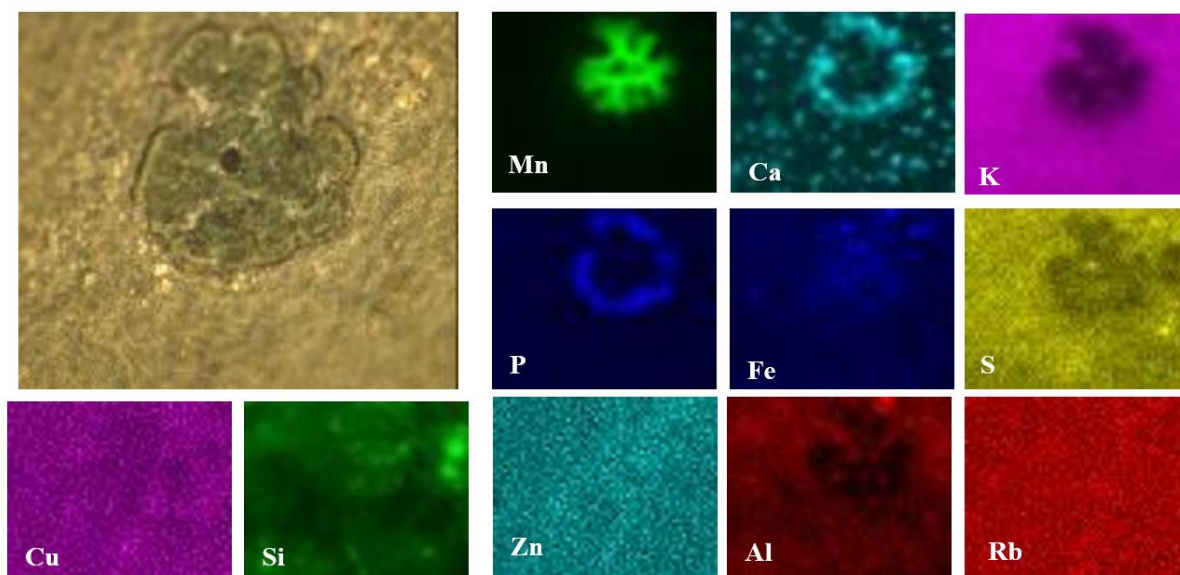


FIGURA 11. Distribuição de Mn, P, Ca, K, S, Al, Fe, Zn, Cu, Si, Rb e Mg em líquen sob a epiderme inferior de folhas de erva-mate usando microanálise por espectroscopia de fluorescência de raios X.

2.4. CONCLUSÕES

A precipitação de Ca, O e C em cristais de oxalato de Ca ocorre na nervura central e no limbo foliar, sobretudo no parênquima e no parênquima paliçádico, respectivamente. Esses cristais também apresentam outros elementos (K, Mg, S, Mn, Na, Si, Al e Ba), embora com teores bem abaixo dos verificados para Ca.

A ocorrência de precipitados com O, Al, Si e em menor proporção, Ca e Mg, em estômatos da epiderme inferior da folha foi registrada. Porém, sem conhecimento de causa-efeito, o que deve fomentar novos estudos, pois pode ser útil no sentido de explorar possíveis fontes de contaminantes nas folhas (no caso de ter não ter origem biológica).

Ocorre a compartimentalização de Si e O na face externa da epiderme superior, entre a parede celular e a cutícula das folhas, embora sem a presença de precipitados, enquanto que nas paredes celulares predominaram C e O. A acumulação de Mn, Ca e P na estrutura de um possível líquen encontrado na superfície da epiderme superior da folha indica tolerância ao excesso de Mn.

As análises da composição elementar em microescala revelam a diversidade de mecanismos da acumulação de elementos nas folhas de erva-mate. A partir disso, mais microanálises que contemplem tal diversidade poderão verificar se ocorrem padrões de acumulação elementar em condições genéticas e ambientais contrastantes, a fim de conhecer a funcionalidade vegetal ou ecossistêmica de determinado mecanismo de acumulação de elementos na erva-mate.

2.5. LITERATURA CITADA

Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial Da União. Resolução - RDC nº- 42, de 29 de agosto de 2013.

Alirzayeva EG, Shirvani TS, Yazici A, Alverdiyeva SM, Shukurov ES, Ozturk L, Ali-Zade VM, Cakmak I. Heavy metal accumulation in *Artemisia* and foliaceous lichen species from the Azerbaijan flora. For Snow Landsc Res, 2006; 80(3):339-348.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G, Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 2013; 22(6): 711-728.

Barbosa JZ, Constantino V, Zanette F, Motta ACV, Prior SA. Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: A microanalytical study. *Cerne*, 2017; 23(2): 257-266.

Barbosa JZ, Zambon LM, Motta ACV, Wendling I. Composition, hot-water solubility of elements and nutritional value of fruits and leaves of yerba-mate. *Ciência e Agrotecnologia*, 2015; 39: 593-603.

Bargagli R. The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. *Science of the Total Environment*, 1995; 176(1-3):121-128.

Beck CB. An introduction to plant structure and development: Plant Anatomy for the Twenty-First Century. Cambridge University Press. 2005. 459 p.

Bjerke JW, Tommervik H, Fine TE, Jensen H, Lukina N, Bakkestuen V. Comparative study of metal accumulation in lichens and tree leaves in order to use them as bioindicators. *Boreal Environment Research*, 2006; 11:441-450.

Benedetti EL. Tolerância da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ao alumínio. 2012; 72 p (Doctoral dissertation, Tese).

Borsoi GA, Costa EC. Avaliação nutricional de plantas de erva-mate atacadas e não-atacadas pelo *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825). *Ciência Florestal*, 2001; 11(2): 131-142.

Cacique IS, Domiciano GP, Moreira WR, Rodrigues FÁ, Cruz MFA, Serra NS, Català AB. Effect of root and leaf applications of soluble silicon on blast development in rice. *Bragantia*, 2013; 72(3):304-309.

Campos NV, Guerra MBB, Mello JWV, Schaefer CEG, Krug FJ, Alves EE, Azevedo AA. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015; 30(12), 2375-2383.

Cardozo Junior EL, Morand C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. *Journal Functional Foods*, 2016; 21:440-454.

Caron BO, Santos DRD, Schmidt D, Basso CJ, Behling A, Eloy E, Bamberg R. Biomass and accumulation of nutrients in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Ciência Florestal*, 2014; 24(2): 267-276.

Chen LS, Qi YP, Jiang HX, Yang LT, Yang GH. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(54): 9237-9247.

Conn S, Gilliam M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany*, 2010; 105:1081-1102.

Dinh N, Vu DT, Mulligan D, Nguyen AV. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Nocca caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, 2015; 110:85-95.

Duarte MR, Golambiuk G. Ilustração de caracteres microscópicos de drogas vegetais para o controle de qualidade farmacognóstico. iii. erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., Aquifoliaceae). *Visão Acadêmica*, 2008; 9(1).

Fink S. The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *New Phytologist*, 1991; 119(1): 33-40.

Fossati LC. Avaliação do estado nutricional e da produtividade de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) em função do sítio e da dioiccia. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. 113 f. 1997.

Grigoletti Júnior A, Auer CG. Doenças da erva-mate. In: Grigoletti Júnior A, Auer CG, Iede ET, Soares CMS. Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa: Colombo. 2000. 17-22 p.

Guerriero G, Hausman JF, Legay S. Silicon and the plant extracellular matrix. *Frontiers in plant science*, 2016. 7.

He H, Veneklaas EJ, Kuo J, Lambers H. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends in Plant Science*, 2014; 19:166-174.

He H, Kirilak Y, Kuo J, Lambers H. Accumulation and precipitation of magnesium, calcium, and sulfur in two *Acacia* (Leguminosae; Mimosoideae) species grown in different substrates proposed for mine-site rehabilitation. *American Journal of Botany*, 2015; 102:290-301.

Khomo L, Trumbore S, Bern CR, Chadwick OA. Timescales of carbon turnover in soils with mixed crystalline mineralogies. *Soil*, 2017; 3(1): 17.

Krieger C, Calvaruso C, Morlot C, Uroz S, Salsi L, Turpault, M. P. Identification, distribution, and quantification of biominerals in a deciduous forest. *Geobiology*, 2017; 15:296-310.

Lersten NR, Horner HT. Unique calcium oxalate “duplex” and “concretion” idioblasts in leaves of tribe Naucleeae (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 2011; 98(1): 1-11.

Libardoni JB, Adamski JM, Fernandes SV, Coelho GC. Crescimento Inicial e Abundância de Cristais de Oxalato em Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob Efeito de Diferentes Métodos de Calagem e Fertilização. *Revista brasileira de Biociencias*, 2007; 5(S2):390-392.

Maiocchi MG, Vitto LA, Petenatti ME, Marchevsky EJ, Avanza MV, Pellerano RG, Petenatti EM. Multielemental composition and nutritional value of “dumosa” (*Ilex dumosa*), “yerba mate” (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UnCuyo*, 2016; 48(1): 145-159.

Motomura H, Fujii T, Suzuki M. Silica deposition in abaxial epidermis before the opening of leaf blades of *Pleioblastus chino* (Poaceae, Bambusoideae). *Annals of Botany*, 2006. 97(4), 513-519.

Navarro LA, Duarte L, Klein RC, Heuser ED. Caracterização dos cristais de oxalato de cálcio nas partes reprodutivas e vegetativas aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 2007; 5(s1): 762-764.

Oliva EV, Reissmann CB, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Composição nutricional de procedências e progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho distroférico. *Ciência Florestal*, 2014; 24(4):793-805.

Otang WM, Grierson DS, Ndip R. Foliar micro-morphology of *Gasteria bicolor* haw (Asphodelaceae) from South Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2014; 11(4): 71-76.

Pierrantoni M, Tenne R, Brumfeld V, Kiss V, Oron D, Addadi L, Weiner S. Plants and light manipulation: The integrated mineral system in okra leaves. *Advanced Science*, 2017. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.201600416/full>. Acesso em: 03 março 2017.

Pozza EA, Pozza AAA, Botelho DMS. Silicon in plant disease control. *Revista Ceres*, 2015; 62(3):.323-331.

Pozebon D, Dressler VL, Marcelo MCA, Oliveira TC, Ferrão MF. Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2015; 8(3): 215-220.

Regvar M, Eichert D, Kaulich B, Gianoncelli A, Pongrac P, Vogel-Mikuš K. Biochemical characterization of cell types within leaves of metal-hyperaccumulating *Noccaea praecox* (Brassicaceae). *Plant and Soil*, 2013; 373:157-171.

Reissmann CB, Radomski MI, Quadros RMB. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Under different management conditions in seven localities of Paraná state. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1999; 42:187-194.

Reissmann CB; Carneiro C. Crescimento e composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de calagem. *Floresta*, 2004; 34 (3):381-386.

Ribeiro MM, Reissmann CB, Corrêa DR. Nutrição da erva-mate com sulfato de amônio. *Cerne*, 2008;14(3):204-211.

Rios JJ, Lochlainn SÓ, Devonshire J, Graham NS, Hammond JP, King GJ, White PJ, Kurup S, Broadley MR. Distribution of Ca (Ca) and magnesium (Mg) in the leaves of *Brassica rapa* under varying exogenous Ca and Mg supply. *Annals of Botany*, 2012; 109:1081-1989.

Santin D, Benedetti EL, Bastos MC, Kaseker JF, Reissmann CB, Brondani GE, Barros NF. Crescimento e nutrição de erva-mate influenciados pela adubação nitrogenada, fosfatada e potássica. *Ciência Florestal*, 2013; 23:365-377.

Scardelato JA, Legramandi VHP, Sacramento LVS. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento da nefrolitíase: paradoxo? *Revista de Ciências Básica e Aplicada*, 2013. 34(2): 161-168.

Silva VD, Motta ACV, Melo VF, Lima VC. Variáveis de acidez em função da mineralogia da fração argila do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2008; 32: 551-559.

Simon E, Baranyai E, Braun M, Cserháti C, Fábíán I, Tóthmérész, B. Elemental concentrations in deposited dust on leaves along an urbanization gradient. *Science of the Total Environment*, 2014; 490, 514-520.

Souza JLM, De Araujo MA, Reissmann CB, Júnior AM, Wolf CS. Teores de nutrientes foliares em plantas de erva-mate em função da posição e orientação geográfica da copa, em Guarapuava-pr. *Scientia Agraria*, 2008; 9(1), 49-58.

Storey R, Leigh RA. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves. An investigation using X-ray microanalysis with strontium as a tracer. *Plant Physiology*, 2004;136:838–3848.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Plant physiology and development*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Incorporated, 2015. 761p.

Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoula MG, Kontoyannis CG, Fasseas C, Liakopoulos G, Klapa MI, Karabourniotis G. Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants. *Plant Physiology*, 2016; 171(4): 2577-2585.

Trautenmüller JW, Borella J, Lambrecht FR, Valerius J, Junior SC, Leschewitz R. Influência de composto orgânico no desenvolvimento de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. *Advances in Forestry Science*, 2016; 3(4):55-58.

White PJ. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 2001; 52: 891-899.

White PJ. Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport. In: Marschner P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Ed. 3. Elsevier, 2012, p. 7-47.

White PJ. Calcium. In: Broadley MR, White PJ. *Plant Nutritional Genomics*. Blackwell: Oxford, 2005; p. 66–86.

Zhao FJ, Moore KL, Lombi E, Zhu YG. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends in Plant Science*, 2014; 19(3), 183-192.

CONCLUSÃO GERAL

Foram determinados 28 elementos (C, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo, Si, Na, Co, Se, Cr, V, Al, As, Cd, Pb, Ag, Ba, Rb, Cs) na composição elementar das folhas de erva-mate, considerando todos os tipos de análises, ou seja, a determinação do teor total dos elementos e nas avaliações em microescala. Buscando entender como fatores de solo e planta podem afetar a composição elementar da erva-mate verificou-se que a composição do solo, a adubação fosfatada, a variação genotípica e o tecido da planta afetam sobremaneira a composição elementar da erva-mate, seja de forma isolada ou pela interação desses fatores. Foi evidenciado que ocorre relação entre diversos elementos, com destaque para metais essenciais e não-essenciais para as plantas ou para os humanos e para um maior número de relações positivas. Tais variações na composição elementar indicam que pode ocorrer implicações tanto para questões relacionadas com diversas áreas do conhecimento (fertilidade do solo, nutrição de plantas, biofortificação, botânica, ecologia, farmacognosia, medicina, tecnologia de alimentos) como para questões relacionadas com a legislação da comercialização de produtos à base de erva-mate. Adicionalmente, ao utilizar técnicas de microanálise para avaliar a distribuição de elementos, demonstra-se que vários enfoques podem ser dados no estudo da composição elementar nas folhas de erva-mate. Assim, o presente estudo contribui para: (1) incrementar o conhecimento acerca da composição elementar da erva-mate, com destaque para elementos pouco conhecidos nessa espécie, como os elementos-traços Cd, Cr, Cs, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti e V; (2) ampliar o debate acerca dos teores e dos mecanismos de acumulação de nutrientes e elementos indesejáveis na erva-mate. Em tempo, vale destacar que estudos futuros devem utilizar simultaneamente análises multielementares de teores totais, teores hidrossolúveis e utilizando microscopia eletrônica associada com microanálise elementar para avaliar de forma detalhada a composição elementar e suas implicações diretas ou indiretas para a produção, comercialização e consumo de erva-mate.

LITERATURA CITADA

Akoumianaki-Ioannidou A, Barouchas PE, Iliá E, Kyramariou A, Moustakas NK. Effect of vanadium on dry matter and nutrient concentration in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Australian Journal of Crop Science, 2016; 10(2):199-206.

Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial Da União. Resolução - RDC nº- 42, de 29 de agosto de 2013.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G, Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, 2013; 22(6): 711-728.

Alirzayeva EG, Shirvani TS, Yazici A, Alverdiyeva SM, Shukurov ES, Ozturk L, Ali-Zade VM, Cakmak I. Heavy metal accumulation in *Artemisia* and foliaceous lichen species from the Azerbaijan flora. For Snow Landsc Res, 2006; 80(3):339-348.

Bargagli R. The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. Science of the Total Environment, 1995; 176(1-3):121-128.

Barbosa JZ, Constantino V, Zanette F, Motta ACV, Prior SA. Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: A microanalytical study. Cerne, 2017; 23(2): 257-266.

Barbosa JZ, Zambon LM, Motta ACV, Wendling I. Composition, hot-water solubility of elements and nutritional value of fruits and leaves of yerba-mate. Ciência e Agrotecnologia, 2015; 39(6): 593-603.

Beck CB. An introduction to plant structure and development: Plant Anatomy for the Twenty-First Century. Cambridge University Press. 2005. 459 p.

Bjerke JW, Tommervik H, Fine TE, Jensen H, Lukina N, Bakkestuen V. Comparative study of metal accumulation in lichens and tree leaves in order to use them as bioindicators. *Boreal Environment Research*, 2006; 11:441-450.

Benedetti EL. Tolerância da erva mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) ao alumínio. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa. 72f. 2012.

Borsoi GA, Costa EC. Avaliação nutricional de plantas de erva-mate atacadas e não-atacadas pelo *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825). *Ciência Florestal*, 2001; 11(2): 131-142.

Cacique IS, Domiciano GP, Moreira WR, Rodrigues FÁ, Cruz MFA, Serra NS, Català AB. Effect of root and leaf applications of soluble silicon on blast development in rice. *Bragantia*, 2013; 72(3):304-309.

Campos NV, Guerra MBB, Mello JWV, Schaefer CEG, Krug FJ, Alves EE, Azevedo AA. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015; 30(12), 2375-2383.

Cardozo Junior EL, Morand C, Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A, St,-Hil,) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. *Journal Functional Foods*, 2016; 21:440-454.

Caron BO, Santos DRD, Schmidt D, Basso CJ, Behling A, Eloy E, Bamberg R. Biomass and accumulation of nutrients in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Ciência Florestal*, 2014; 24(2): 267-276.

Carter DL, Robbins CW, Brown MJ. Effect of phosphorus fertilization on the selenium concentration in alfafa (*Medicago sativa*). *Soil Science Society of America Proceedings*, 1972; 36(4): 624-628.

Ceconi DE, Poletto I, Lovato T, Muniz MFB. Exigência nutricional de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.) à adubação fosfatada. *Ciência Florestal*, 2007; 17(1): 25-32.

Chen LS, Qi YP, Jiang HX, Yang LT, Yang GH. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(54): 9237-9247.

Chen RF, Shen RF, Gu P, Wang HY, Xu HX. Investigation of aluminum tolerant species in acid soils of south China. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 39: 1493-1506, 2008.

Chen Y, Yu M, Xu J, Chen X, Shi J. Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2009; 89(14): 2350-2355.

Conn S, Gilliam M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany*, 2010; 105:1081-1102.

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 2006; 88: 1707-1719.

Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*, 2004; 104(2): 849-902.

Dinh N, Vu DT, Mulligan D, Nguyen AV. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Nocca caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, 2015; 110:85-95.

Duarte MR, Golambiuk G. Ilustração de caracteres microscópicos de drogas vegetais para o controle de qualidade farmacognóstico. iii. erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., Aquifoliaceae). *Visão Acadêmica*, 2008; 9(1).

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília; 2013. 353 p.

Fink S. The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *New Phytologist*, 1991; 119(1): 33-40.

Fossati LC. Avaliação do estado nutricional e da produtividade de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) em função do sítio e da dioiccia. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. 113 f. 1997.

Gao L, Chang J, Chen R, Li H, Lu H, Tao L, Xiong J. Comparison on cellular mechanisms of iron and cadmium accumulation in rice: prospects for cultivating Fe-riche but Cd-free rice. *Rice*, 2016; 9:39.

GB 2762-2012. National Standards of the People's Republic of China. Maximum levels of contaminants in foods. 2012.

Gérard F. Clays minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils - A myth revisited. *Geoderma*, 2016; 262: 213-226.

Gerhardt, M. História ambiental da erva-mate. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. 290f. 2013.

Giulian R, Santos CEI, Shubeita SM, Silva LM, Yoneama ML, Dias JF. The study of the influence of industrial processing on the Elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. *LWT - Food Science and Technology*, 2009; 42:74-80.

Grigoletti Júnior A, Auer CG. Doenças da erva-mate. In: Grigoletti Júnior A, Auer CG, Iede ET, Soares CMS. Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa: Colombo. 2000. 17-22 p.

Guerriero G, Hausman JF, Legay S. Silicon and the plant extracellular matrix. *Frontiers in plant science*, 2016. 7.

Guimarães JC, Reissmann CB, Motta ACV, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Relação de Zn, Fe, Cu e Mn entre solo e progênies de erva-mate. *Cerne*, 2014; 20(2):285-292, 2014.

Hamilton EI, Minski MJ. Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. *Science of the Total Environment*, 1973; 1(4):375-394.

Hajiboland R, Bastani S, Bahrami-Rad S, Poschenrieder C. Interactions between aluminum and boron in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Acta Physiologia Plantarum*, 2015; 37:54.

He Z, Yang X, Zhu Z, Zhang Q, Xia W, Tan J. Effect of phosphate on the sorption, desorption and plant-availability of selenium in soil. *Fertilizer Research*, 1994; 39: 189.

He H, Veneklaas EJ, Kuo J, Lambers H. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends in Plant Science*, 2014; 19:166-174.

He H, Kirilak Y, Kuo J, Lambers H. Accumulation and precipitation of magnesium, calcium, and sulfur in two *Acacia* (*Leguminosae*; *Mimosoideae*) species grown in different substrates proposed for mine-site rehabilitation. *American Journal of Botany*, 2015; 102:290-301.

Hope SJ, Daniel K, Gleason KL, Comber S, Nelson M, Powell JJ. Influence of tea drinking on manganese intake, manganese status and leucocyte expression of MnSOD and cytosolic aminopeptidase P. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006; 60(1):1-8.

Hu Q, Xu J, Pang G. Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51:3379-3381.

IGBP-DIS. SoilData: pH soil. A program for creating global soil-property databases, IGBP Global Soils Data Task, France. 1998.

Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific Reports*, 2012; 2:286.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants, 4th ed. London, New York: Taylor & Francis. 2011. 505 p.

Kaiser BN, Gridley KL, Brady JN, Phillips T, Tyerman SD. The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany*, 2005; 96: 745-754.

Kleiber T, Markiewicz B. Application of “Tytanit” in greenhouse tomato growing. *Acta Scientiarum Polonorum*, 2013; 12(3): 117-126.

Khomo L, Trumbore S, Bern CR, Chadwick OA. Timescales of carbon turnover in soils with mixed crystalline mineralogies. *Soil*, 2017; 3(1): 17.

Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2012; 63:131-152.

Krieger C, Calvaruso C, Morlot C, Uroz S, Salsi L, Turpault, M. P. Identification, distribution, and quantification of biominerals in a deciduous forest. *Geobiology*, 2017; 15:296-310.

Leitenmaier B, Küpper H. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in Plant Science*, 2013; 4: article 374. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3778397/>. Acesso em: 03 abril 2017.

Lersten NR, Horner HT. Unique calcium oxalate “duplex” and “concretion” idioblasts in leaves of tribe Naucleae (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 2011; 98(1): 1-11.

Liang J, Puligundla P, Ko S, Wan XC. A review on selenium-enriched green tea: Fortification methods, biological activities and application prospect. *Sains Malaysiana*, 2014; 43(11): 1685-1692.

Libardoni JB, Adamski JM, Fernandes SV, Coelho GC. Crescimento Inicial e Abundância de Cristais de Oxalato em Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob Efeito de Diferentes Métodos de Calagem e Fertilização. *Revista brasileira de Biociencias*, 2007; 5(S2):390-392.

Lin CY, Trinh NN, Lin CW, Huang HJ. Transcriptome analysis of phytohormone, transporters and signaling pathways in response to vanadium stress in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013; 66:98-104.

Lin ZH, Chen LS, Chen RB, Zhang FZ, Jiang HX, Tang N. CO₂ assimilation, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology*, 2009; 9:43.

Lin ZH, Chen LS, Chen RB, Zhang FZ, Jiang HX, Tang N, Smith BR. Root release and metabolism of organic acids in tea plants in response to phosphorus supply. *Journal of Plant Physiology*, 2011; 168:644-652.

Liu Q, Wang DJ, Jiang XJ, Cao ZH. Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Geochemistry and Health*, 2004; 26(2-3):325-30.

Loladze I. Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO₂ depletes minerals at the base of human nutrition. *eLife*, 2014; 3:e02245. DOI: 10.7554/eLife.02245

Maiocchi MG, Vitto LA, Petenatti ME, Marchevsky EJ, Avanza MV, Pellerano RG, Petenatti EM. Multielemental composition and nutritional value of “dumosa” (*Ilex dumosa*), “yerba mate” (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UnCuyo*, 2016; 48(1): 145-159.

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319p.

Marschner, P. Marschner's Mineral nutrition mineral nutrition of higher plants. 3.ed. London; 2012.

Martins APL, Reissmann CB. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químicos analíticos. *Scientia Agraria*, 2007; 8:1-17.

Memon AR, Chino M, Hidaka H, Hara K, Yatazawa M. Manganese toxicity in field grown tea plants and the microdistribution of manganese in the leaf tissues as revealed by electron probe X-ray micrography. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1981; 27: 317-328.

Motta ACV, Melo VF. Química dos solos ácidos. In: Melo VF, Alleoni LRF. (eds). Química e mineralogia do solo, parte 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 313-380, 2009.

Motomura H, Fujii T, Suzuki M. Silica deposition in abaxial epidermis before the opening of leaf blades of *Pleioblastus chino* (Poaceae, Bambusoideae). *Annals of Botany*, 2006. 97(4), 513-519.

Navarro LA, Duarte L, Klein RC, Heuser ED. Caracterização dos cristais de oxalato de cálcio nas partes reprodutivas e vegetativas aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 2007; 5(s1): 762-764.

Oliva EV, Reissmann CB, Gaiad S, Oliveira EB, Sturion JA. Composição nutricional de procedências e progênes de erva-mate (*ilex paraguariensis* St.Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho distroférico. *Ciência Florestal*, 2014;24(4):793-805.

Oliveira H. Chromium as an environmental pollutant: Insights on induced plant toxicity. *Journal of Botany*, 2012; article ID 375843. doi:10.1155/2012/375843

Otang WM, Grierson DS, Ndip R. Foliar micro-morphology of *Gasteria bicolor* Haw (Asphodelaceae) from South Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2014; 11(4): 71-76.

Pandolfo CM, Floss PA, Croce DM, Dittrich RC. Resposta da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) à adubação mineral e orgânica em um Latossolo Vermelho Aluminoférrico. *Ciência Florestal*, 2003; 13(2): 37-45.

Pierrantoni M, Tenne R, Brumfeld V, Kiss V, Oron D, Addadi L, Weiner S. Plants and light manipulation: The integrated mineral system in okra leaves. *Advanced Science*, 2017. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.201600416/full>. Acesso em: 03 março 2017.

Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*, 2013. 212:15-25.

Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011; 213:113-136.

Pozza EA, Pozza AAA, Botelho DMS. Silicon in plant disease control. *Revista Ceres*, 2015; 62(3):323-331.

Pozebon D, Dressler VL, Marcelo MCA, Oliveira TC, Ferrão MF. Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2015; 8(3): 215-220.

Rayman M, Selenium and human health. *Lancet*, 2012; 379(9822): 1256-1268.

Regvar M, Eichert D, Kaulich B, Gianoncelli A, Pongrac P, Vogel-Mikuš K. Biochemical characterization of cell types within leaves of metal-hyperaccumulating *Noccaea praecox* (Brassicaceae). *Plant and Soil*, 2013; 373:157-171.

Reissmann CB, Radomski MI, Quadros RMB. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Under different management conditions in seven localities of Paraná state. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1999; 42:187-194.

Reissmann CB; Carneiro C. Crescimento e composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de calagem. *Floresta*, 2004; 34 (3):381-386.

Ribeiro MM, Reissmann CB, Corrêa DR. Nutrição da erva-mate com sulfato de amônio. *Cerne*, 2008;14(3):204-211.

Rios JJ, Lochlainn SÓ, Devonshire J, Graham NS, Hammond JP, King GJ, White PJ, Kurup S, Broadley MR. Distribution of Ca (Ca) and magnesium (Mg) in the leaves of *Brassica rapa* under varying exogenous Ca and Mg supply. *Annals of Botany*, 2012; 109:1081-1989.

Santin D, Benedetti EL, Brondani GE, Reissmann CB, Orrutêa AG, Roveda LF. Nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento de mudas de erva-mate. *Scientia Agraria*, 2008; 9(1): 59-66.

Santin D, Benedetti EL, Bastos MC, Kaseker JF, Reissmann CB, Brondani GE, Barros NF. Crescimento e nutrição de erva-mate influenciados pela adubação nitrogenada, fosfatada e potássica. *Ciência Rural*, 2013; 23(2): 365-377.

Scardelato JA, Legramandi VHP, Sacramento LVS. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento da nefrolitíase: paradoxo? *Revista de Ciências Básica e Aplicada*, 2013. 34(2): 161-168.

Scher - Scientific Committee on Health and Environmental Risks. Assessment of the tolerable daily intake of barium. European Commission: Brussels, 2012, p. 13.

Shi YZ, Ruan JY, Ma LF, Han WY, Wang F. Accumulation and distribution of arsenic and cadmium by tea plants. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008; 9(3): 265-270.

Silva VD, Motta ACV, Melo VF, Lima VC. Variáveis de acidez em função da mineralogia da fração argila do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2008; 32: 551-559.

Simon E, Baranyai E, Braun M, Cserhádi C, Fábíán I, Tóthmérész, B. Elemental concentrations in deposited dust on leaves along an urbanization gradient. *Science of the Total Environment*, 2014; 490, 514-520.

Souza JLM, De Araujo MA, Reissmann CB, Júnior AM, Wolf CS. Teores de nutrientes foliares em plantas de erva-mate em função da posição e orientação geográfica da copa, em Guarapuava-pr. *Scientia Agraria*, 2008; 9(1), 49-58.

Storey R, Leigh RA. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves. An investigation using X-ray microanalysis with strontium as a tracer. *Plant Physiology*, 2004;136:838–3848.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Plant physiology and development*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Incorporated, 2015. 761p.

Tian L, Yang J, Alewell C, Huang JH. Speciation of vanadium in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) and soils in response to different levels of vanadium in soils and cabbage growth. *Chemosphere*, 2014; 111: 89-95.

Tlustoš P, Cígler P, Hrubý M, Kuzel S, Száková J, Balík J. The role of titanium in biomass production and its influence on essential elements contents in field growing crops. *Plant, Soil and Environment*, 2005; 51(1): 19-25.

Tóth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, 2016; 88: 299-309.

Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoula MG, Kontoyannis CG, Fasseas C, Liakopoulos G, Klapa MI, Karabourniotis G. Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants. *Plant Physiology*, 2016; 171(4): 2577-2585.

Trautenmüller JW, Borella J, Lambrecht FR, Valerius J, Junior SC, Leschewitz R. Influência de composto orgânico no desenvolvimento de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. *Advances in Forestry Science*, 2016; 3(4):55-58.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 2003; 157:423- 447.

Zampier AC. Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). Dissertação Mestrado (Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná. 94f. 2001.

Wendling I, Brondani G. Produção de mudas de erva-mate. In: Ivar Wendling; Delmar Santin. (Org.). Propagação e nutrição de erva-mate. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015, v. 1, p. 11-98.

Wendling I, Dutra LF, Grossi F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 2007; 42(2): 289-292.

White PJ. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 2001; 52: 891-899.

White PJ. Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport. In: Marschner P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Ed. 3. Elsevier, 2012, p. 7-47.

White PJ. Calcium. In: Broadley MR, White PJ. *Plant Nutritional Genomics*. Blackwell: Oxford, 2005; p. 66–86.

Wood BW. Nickel deficiency symptoms are influenced by foliar Zn:Ni and Cu:Ni concentration ratio. *Acta Horticulturae*, 2010; 868:163–169.

Zhao FJ, Moore KL, Lombi E, Zhu YG. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends in Plant Science*, 2014; 19(3), 183-192.

Zoffoli HJO, Do Amaral-Sobrinho NMB, Zonta E, Luisi MV, Marcon G, Tolón-Becerra A. Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. *Environmental, Monitoring and Assessment*, 2013; 185(3): 2423-2437.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS SOLOS

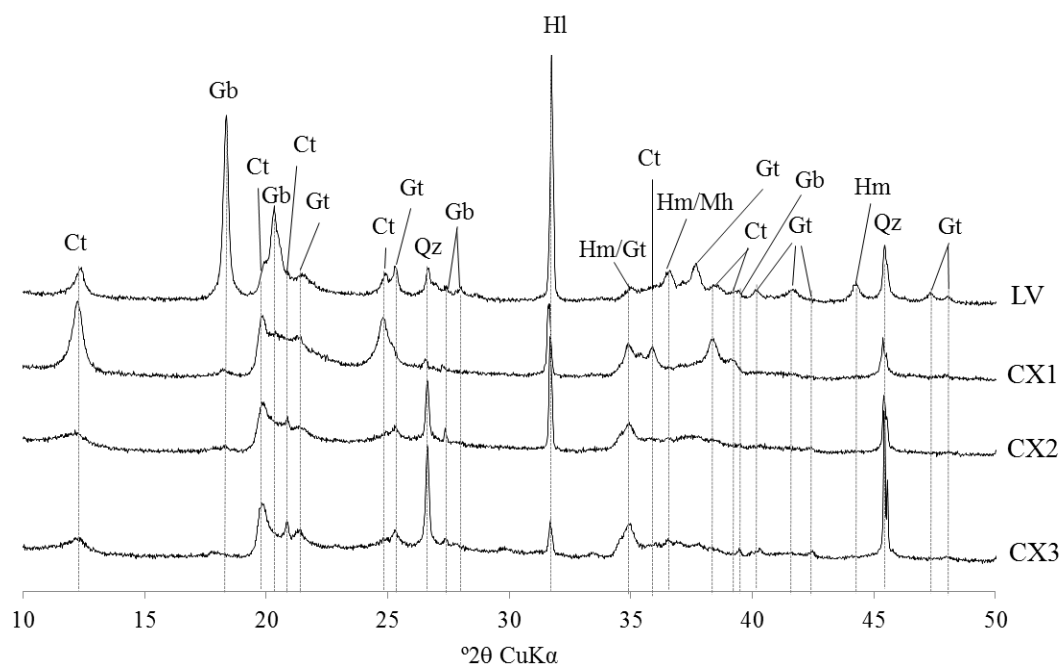


FIGURA Apêndice 1. Difratoogramas de raios-X da fração argila dos solos do experimento de casa-de-vegetação (LV – Latossolo Vermelho; CX1, CX2 e CX3 – Cambissolos Háplicos) obtidos pelo método do pó. Ct: caulinita; Gb: gibbsita; Qz: quartzo; Hm: hematita; Mh: maghemita; HI: halita (padrão interno).

APÊNDICE 2. TEORES DE Cd E Pb EM FOLHAS DE ERVA-MATE CONSIDERANDO OS DADOS DO PRESENTE ESTUDO E OS DADOS REPORTADOS POR BARBOSA et al. (2015).

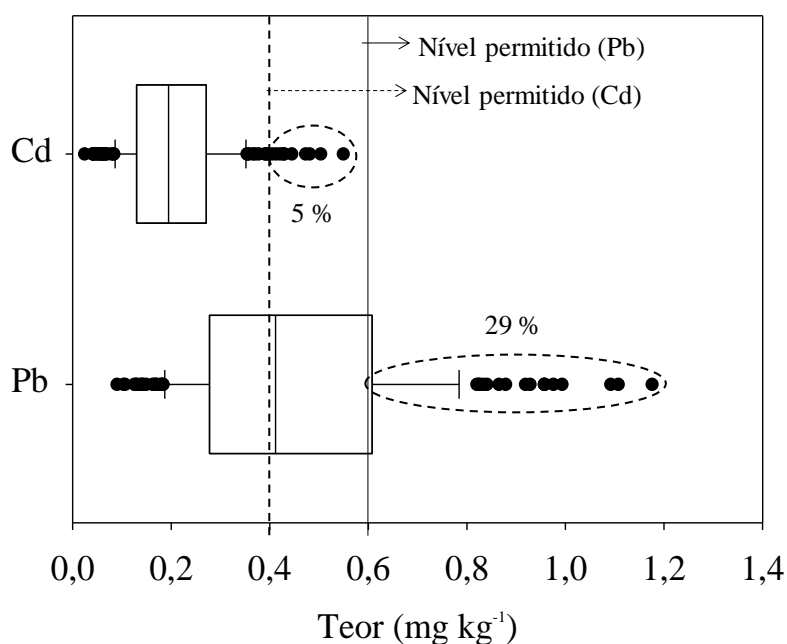


FIGURA Apêndice 2. Teores de Pb e Cd das amostras de folhas de erva-mate provenientes do capítulo 1 e 2 e, do artigo de Barbosa et al. (2015). O limite inferior (esquerda) da caixa indica o percentil 25 e o limite superior (direita) o percentil 75. As barras acima e abaixo da caixa indicam os percentis 5 e 95. Os pontos indicam valores externos. Linha dentro da caixa indica a média. Os valores em porcentagem indicam amostras que ficaram acima dos níveis críticos permitidos para erva-mate (Anvisa, 2013).

Literatura citada

Anvisa-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial Da União. Resolução - RDC nº- 42, de 29 de agosto de 2013.

Barbosa JZ, Zambon LM, Motta ACV, Wendling I. Composition, hot-water solubility of elements and nutritional value of fruits and leaves of yerba-mate. *Ciência e Agrotecnologia*, 2015; 39: 593-603.