

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CRESCIMENTO, BIOFORTIFICAÇÃO E QUALIDADE DE
ALFACE HIDROPÔNICO EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES
DE FERRO E ZINCO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Vitor Borges da Silva

Engenheiro Agrônomo

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CRESCIMENTO, BIOFORTIFICAÇÃO E QUALIDADE DA
ALFACE EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE FERRO E
ZINCO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Vitor Borges da Silva

Orientador: Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho

Coorientador: Dr. Hilário Júnior de Almeida

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)**

2023

S586c	Silva, Vitor Borges da Crescimento, biofortificação e qualidade de alface hidropônico em função de concentrações de ferro e zinco na solução nutritiva / Vitor Borges da Silva. -- Jaboticabal, 2023 48 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Arthur Bernardes Cecilio Filho Coorientador: Hilário Júnior de Almeida 1. Elementos traços na nutrição de plantas. 2. Desnutrição. 3. Micronutrientes. 4. Hortaliças. 5. Hidroponia. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CRESCIMENTO, BIOFORTIFICAÇÃO E QUALIDADE DA ALFACE EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE FERRO E ZINCO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA

AUTOR: VITOR BORGES DA SILVA

ORIENTADOR: ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO

COORIENTADOR: HILÁRIO JÚNIOR DE ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Ciencias da Producao Agricola / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. JUAN WALDIR MENDOZA CORTEZ (Participação Virtual)
Department of Plant Production / Universidad Nacional Agraria La Molina - Lima/Peru

Dr. MARCOS DONIZETI REVOREDO (Participação Virtual)
Alltech Crop Science - Improcrop do Brasil Ltda / Jaboticabal/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO
Data: 28/08/2023 17:33:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Firmado digitalmente por
**Juan Waldir
Mendoza
Cortez**
Juan Waldir
Mendoza Cortez
Fecha: 2023.08.28
23:08:25 -05'00'

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS DONIZETI REVOREDO
Data: 28/08/2023 18:10:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 28 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VITOR BORGES DA SILVA – Nasceu em 21 de Outubro de 1996 em Igarapava, São Paulo, Brasil. Filho de Carlos Humberto da Silva e Maria Aparecida Borges da Silva. No ano de 2016 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp) - Câmpus de Jaboticabal – SP. Durante a graduação foi bolsista do programa de extensão Projeto Hortaliças. Em fevereiro de 2021 obteve o título de Engenheiro Agrônomo e em agosto do mesmo ano deu início ao curso de mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp) - Câmpus de Jaboticabal – SP.

Para todos que trabalham por um mundo sem fome.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda proteção, iluminação e presença em toda esta caminhada, sempre junto a mim.

Aos meus pais, Carlos e Maria, e irmão Igor, que sempre me ampararam e estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivaram e acreditaram em mim, permitindo atingir horizontes que nem mesmo eu acreditava ser capaz. Eu amo vocês!

À minha noiva Bruna, que sempre acreditou e me incentivou, que se fez presente e topou todos desafios comigo. Eu te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arthur Bernardes, pela oportunidade, conhecimento compartilhado, ensinamentos e amizade, sendo essencial na minha formação tanto profissional quanto pessoal.

Ao meu coorientador, Dr. Hilário Almeida, pelos ensinamentos e auxílio em todas etapas durante o mestrado, e pela amizade desenvolvida.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Franciele Mendes, Julia Mercês, Laura Ribera, Maria Medelo, Wellington Missiano, pela amizade, experiências compartilhadas e contribuições para o experimento.

Aos funcionários do setor de Olericultura, Inauro, Reinaldo e Silvio, por toda ajuda durante a condução do experimento.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela oportunidade proporcionada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A todos que me ajudaram e permitiram chegar até aqui.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A cultura da alface	4
2.2 Ferro e zinco na planta	5
2.3 Biofortificação agrônômica com ferro e zinco.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Caracterização e localização da área experimental	13
3.2 Tratamentos e delineamento experimental	14
3.3 Instalação e condução do experimento	14
3.4 Características avaliadas	15
3.5 Análise estatística	16
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	26
7 REFERÊNCIAS	26

CRESCIMENTO, BIOFORTIFICAÇÃO E QUALIDADE DA ALFACE EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE FERRO E ZINCO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA

RESUMO – O ferro (Fe) e o zinco (Zn) são elementos essenciais para a saúde humana e suas deficiências causam redução da capacidade de trabalho, distúrbios fisiológicos e no sistema imunológico, anemia e até a morte, sendo consideradas problemas primários de saúde pública global. A biofortificação agrônômica visa aumentar a concentração destes nutrientes na parte comestível da planta e, conseqüentemente, aumentar a ingestão humana destes nutrientes. O objetivo do estudo foi avaliar concentrações de Fe e Zn no crescimento, biofortificação e qualidade da alface em hidroponia. Foram avaliados seis tratamentos correspondentes às combinações das concentrações de Zn (0,06 e 0,24 mg L⁻¹) e Fe (2, 4 e 8 mg L⁻¹). O aumento de Zn na solução nutritiva influenciou positivamente somente os teores foliares de Zn aos 18 dias após o transplante das mudas e ácido ascórbico na colheita. Por outro lado, o aumento da concentração de Fe influenciou positivamente os teores de pigmentos fotossintéticos, ácido ascórbico e Fe; entretanto, afetou negativamente o teor foliar de Zn, área foliar e massa seca de folhas da alface. Foi observada maior biofortificação da alface para Fe com a concentração de 8 mg L⁻¹ de Fe na solução.

Palavras-chaves: Alimento biofortificado, Cultivo sem solo, Deficiência de nutrientes, Fome oculta, *Lactuca sativa* L.

GROWTH, BIOFORTIFICATION AND QUALITY OF LETTUCE AS A FUNCTION OF IRON AND ZINC CONCENTRATIONS IN THE NUTRIENT SOLUTION

ABSTRACT – Iron (Fe) and zinc (Zn) are essential elements for human health, and their deficiencies lead to reduced work capacity, physiological disturbances, compromised immune system, anemia, and even death, making them significant global public health issues. Agronomic biofortification aims to increase the concentration of these nutrients in the edible part of the plant, consequently enhancing human intake of these nutrients. The study's objective was to assess Fe and Zn concentrations in the growth, biofortification, and quality of hydroponically grown lettuce. Six treatments were evaluated, corresponding to combinations of Zn concentrations (0.06 and 0.24 mg L⁻¹) and Fe concentrations (2, 4, and 8 mg L⁻¹). Increasing Zn in the nutrient solution positively influenced only the leaf Zn content at 18 days after transplanting the seedlings and ascorbic acid at harvest. On the other hand, increasing Fe concentration positively influenced the levels of photosynthetic pigments, ascorbic acid, and Fe; however, it negatively affected the leaf Zn content, leaf area, and dry mass of lettuce leaves. Greater biofortification of lettuce for Fe was observed with an 8 mg L⁻¹ Fe concentration in the solution.

Keywords: Biofortified food, Soilless cultivation, Nutrient deficiency, Hidden hunger, *Lactuca sativa* L.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 2 bilhões de pessoas sofrem de fome oculta (Gödecke et al., 2018), fenômeno em que há deficiência de um ou mais micronutrientes, mas com ausência de sintomas (Ruel-Bergeron et al., 2015). Entre as deficiências nutricionais, ferro (Fe) e zinco (Zn) são casos rotineiros na população, as quais são consideradas epidemias silenciosas, que enfraquecem o sistema imunológico, prejudicam o crescimento físico e intelectual, podendo levar à morte (Majumder et al., 2019).

No organismo humano, o Fe está relacionado à síntese de hemoglobina e mioglobina, se mostrando essencial para a transferência de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Além disso, o Fe é muito importante para os processos metabólicos que ocorrem no organismo, uma vez que, muitas enzimas são dependentes do nutriente (Zoroddu et al., 2019), o que leva à uma ingestão diária recomendada de 8 e 18 mg para homens e mulheres, respectivamente (Wishart, 2017). O Zn executa função-chave na síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Também, atua em funções imunológicas e bioquímicas no organismo humano, por estar envolvido na atividade de mais de 100 enzimas (Hacisalihoglu, 2020), e devido sua importância no organismo humano, a ingestão diária recomendada, para adultos, varia entre 9 e 14 mg (Buturi et al., 2021).

Uma das estratégias para combate à fome oculta é a biofortificação agrônômica de alimentos, técnica que objetiva aumentar a concentração e biodisponibilidade dos nutrientes nas partes comestíveis das plantas (Almeida et al., 2020), por meio de práticas agrícolas como a fertilização, rotação de culturas e irrigação (Rengel et al., 1999). Além disso, é uma ferramenta mais barata, acessível e de implementação instantânea quando comparada à biofortificação genética (Loureiro et al., 2018; Singh et al., 2022).

O Fe é essencial para o crescimento e desenvolvimento de plantas. Por ser cofator de diversas enzimas e proteínas que desempenham funções vitais em processos fisiológicos, tais como fotossíntese, síntese de proteínas, metabolismo do nitrogênio e respiração (Kaya et al., 2019; Mahawar et al., 2023). O Zn também está envolvido em várias funções fisiológicas nas plantas, como estrutura de membrana, fotossíntese, atividade fitohormonal, metabolismo de lipídios e ácidos nucleicos, expressão e

regulação gênica e síntese de proteínas. Ainda, como cofator, é ativador da auxina, que é hormônio essencial para crescimento e desenvolvimento vegetal (Noulas, et al., 2018).

A nutrição de plantas com Fe e Zn em solo é dificultada por diversos fatores. Por estar predominantemente presente nos solos na forma férrica ou não-heme (Fe^{3+}), o nutriente se torna pouco disponível para absorção pelas plantas, uma vez que esta forma é pouco solúvel (Lucena et al., 2007; Jones, 2020). O Zn é deficiente em cerca de 49% de áreas agricultáveis no mundo, causando deficiência do nutriente para as plantas (Alloway, 2009; Carmona et al., 2019). Ainda, no cultivo em solo há interação do nutriente com os atributos físicos, químicos e biológicos do solo, que comprometem a absorção do nutriente pela planta e, conseqüentemente, alimentos mais pobres para a população (Rouphael e Kyriacou, 2018). Diferentemente, o cultivo hidropônico proporciona vantagens em relação ao cultivo em solo quando se tem condições limitantes para uso do solo, como solos contaminados, pedregosos, falta de espaço, recursos hídricos escassos, entre outros (Raviv e Lieth, 2007; Orsini et al., 2013; Bonasia et al., 2017; Di Gioia et al., 2019; Buturi et al., 2022). Diversos estudos têm mostrado ser o cultivo hidropônico um sistema mais eficiente na produção de alimentos de qualidade e nutritivos, principalmente de hortaliças folhosas. Adicionalmente, sistemas de cultivo hidropônicos mostram-se eficientes e eficazes na biofortificação de plantas, pois permitem maior controle do fornecimento dos nutrientes, o que permite melhor padronização no processo de biofortificação, e qualidade do alimento (Tomasi et al., 2014; Di Gioia et al., 2018; Rouphael e Kyriacou, 2018; Di Gioia et al., 2019; Petropoulos et al., 2019).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil e pode ser utilizada para aumentar a ingestão de Fe e Zn pela população. Apresenta altos teores de fibra, vitaminas A, C e K, folato (vitamina B9) e compostos bioativos (Mampholo et al., 2016; Camejo et al., 2020). No Brasil, em 2021, a produção foi de 1,5 milhão de toneladas (Vieira et al., 2022) e seu cultivo em hidroponia, no sistema *nutrient film technique* (NFT), tem crescido. Neste ambiente de cultivo, o aumento da concentração de nutriente-alvo na solução nutritiva pode ser mais eficiente para biofortificar o alimento, pois não apresenta perdas do nutriente existentes quando a aplicação acontece via solo (Di Gioia

et al., 2019; Giordano et al., 2019; Smolen et al., 2019) e foliar, dada as condições específicas de temperatura, umidade relativa do ar, ausência de chuva e vento para maior sucesso na absorção do nutriente (Alshaal e El-Ramady, 2017).

A biofortificação da hortaliça por meio da solução nutritiva enriquecida tem comprovado sucesso, conforme constatado para rúcula com ferro, selênio e zinco (Di Gioia et al., 2019; Rugeles-Reyes et al., 2019; Smolen et al., 2019; Santiago et al., 2020), couve com ferro (Mercês et al., 2022), repolho com ferro, selênio e zinco (Di Gioia et al., 2019; Almeida et al., 2022), mostarda com ferro, iodo, selênio e zinco (Golubkina et al., 2018; Di Gioia et al., 2019) e alface com ferro, iodo, selênio, zinco (Krzepilko et al., 2016; Giordano et al., 2019; Santiago et al., 2020; Buturi et al., 2022). No caso da alface, foram estudados a biofortificação com aumento de somente um nutriente na solução nutritiva, diferentemente do presente estudo que objetiva avaliar a interação do Fe e Zn na biofortificação e qualidade da hortaliça.

Os micronutrientes apresentam interações que afetam tanto absorção quanto a biodisponibilidade dos mesmos às plantas, tais interações podem levar à efeitos sinérgicos ou antagônicos (Lanquar et al., 2010). O efeito antagônico entre Fe e Zn são frequentemente relatados, uma vez que os nutrientes possuem similaridade química e compartilham os mesmos transportadores, indicando competição na absorção e transporte (Saenchai et al., 2016; Oliveira et al., 2023). Esta divergência de resultados evidencia a necessidade de mais investigações sobre a interação entre Fe e Zn e seus efeitos na biofortificação agrônômica.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, biofortificação e qualidade da alface, em cultivo hidropônico, quanto à concentração de Fe e Zn na solução nutritiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da alface

A alface é uma hortaliça folhosa de grande importância na agricultura nacional e internacional. O cultivo e demanda mundial de alface tem aumentado mundialmente devido à sua alta qualidade dietética (Amoozgar et al., 2017; Wang et al., 2018) e excelentes características produtivas que permitem o cultivo tanto em ambientes controlados quanto em campo, com ciclo curto, rápido crescimento, baixa demanda energética de produção e altos valores nutricionais (Yan et al., 2019; Chen et al., 2021). No Brasil, a produção da alface foi de aproximadamente 1,5 milhão de toneladas, produzidas em 90 mil hectares, correspondendo à uma produtividade de 16,66 t ha⁻¹ (Vieira et al., 2022).

A alface é a principal hortaliça utilizada na fabricação de saladas minimamente processadas. Isto se deve ao seu alto teor de antioxidantes, como a vitamina C e E, e fitoquímicos, como vitaminas B9, C, E, carotenoides e polifenóis (Kim et al., 2016; Malejane et al., 2018; Lafarga et al., 2020). Ainda, a hortaliça é rica em terpenoides, sais minerais, vitaminas A, B1, B2 e K, sais minerais e apresenta baixo valor calórico (Coria-Cayupán et al., 2009; Giordano et al., 2019; Pereira et al., 2019; Camejo et al., 2020).

O consumo de 100 g de folhas de alface fornece cerca de 10% da ingestão diária recomendada de fibras para adultos, que varia de 21 a 38 g dia (Kim et al., 2016). Assim, o consumo da hortaliça desempenha papel relevante na saúde humana, uma vez que o consumo de fibras pode reduzir risco de doenças cardiovasculares, devido a redução do colesterol de baixa densidade lipoproteica (LDL), também pode reduzir o risco de diabetes por melhorar o metabolismo de glicose, além de reduzir risco de câncer de cólon (Yao et al., 2012; Kim et al., 2016).

Estudos epidemiológicos sugeriram que o consumo a longo prazo de dietas ricas em polifenóis e antioxidantes derivados de dietas à base de plantas, oferece proteção contra o desenvolvimento de doenças associadas à síndrome metabólica, diferentes tipos

de câncer, osteoporose e doenças neurodegenerativas (Pandey e Rizvi, 2009; Lafarga et al., 2020).

Os compostos fenólicos apresentam diversos benefícios ao organismo humano, como efeito antidiabético, antimicrobiano e anti-inflamatório (Kumar e Goel, 2019; Kumar et al., 2015). Enquanto os carotenoides apresentam efeito hepatoprotetor, antibacteriano, anticancerígeno, antiviral, protetor cardiovascular e antiobesidade (Dwyer et al., 2001; Cushnie e Lamb, 2005; Tapas et al., 2008; Rokkaku et al., 2013) e a clorofila apresenta efeito antioxidante, anticancerígeno, estimula o sistema imunológico e normaliza a pressão sanguínea (Ferruzzi et al., 2007; Pareek et al., 2017; Shi et al., 2022). Além disso, vários pesquisadores descobriram que a alface cultivada em hidroponia pode curar doenças como dano oxidativo, câncer, doença de Alzheimer e diabetes (Bahbah et al., 2021; Kabir et al., 2021; Naseem e Ismail, 2022).

Assim, a alface se tornou a hortaliça folhosa mais cultivada e consumida mundialmente (Medina-Lozano et al., 2021). Seu consumo vem crescendo anualmente e se deve ao fato de consumidores se conscientizarem dos valores nutricionais e, principalmente, funcionais do alimento (Kris-Etherton et al., 2002; Soetan et al., 2010; Martinez-Ispizua et al., 2022).

2.2 Ferro e zinco na planta

Em plantas, o Fe é um nutriente com funções em diversos processos, como na catálise de reações enzimáticas nas células, na redução do nitrato e do sulfato, e na produção de energia das plantas, além de ser o principal constituinte de várias enzimas e pigmentos (Hossain e Bezbaruah, 2021). A eficiência fotossintética, a estrutura e a função do aparato fotossintético são fortemente dependentes de Fe, diretamente ou indiretamente, por meio da via de biossíntese de porfirina que leva à síntese de clorofila, a partir da protoporfirina IX, que é seu precursor (Briat et al., 2015).

Avaliar a influência do Fe na cultura da alface é essencial para a criação de programas de biofortificação e para a elucidação da influência do nutriente na cultura. Buturi et al. (2022) constataram que a concentração de 113,12 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva reduziu significativamente a massa seca total da planta, entretanto, houve

aumento do teor de, clorofila, fenóis totais, antocianinas, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico e a atividade antioxidante, quando comparada à concentração de 1,12 mg L⁻¹ de Fe. Os mesmos autores ainda encontraram melhora nas concentrações de outros nutrientes, como N, P, K Ca, Mg, Fe, S, Zn e B na maior concentração de Fe na solução nutritiva.

Giordano et al. (2019) relataram que concentrações acima de 0,84 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva reduziram significativamente a área foliar, massa fresca, massa seca e eficiência do uso da radiação pelas plantas. Ainda, os mesmos autores constataram que concentrações de 56 e 112 mg L⁻¹ de Fe provocaram aumento nos teores de nitrato, ácido ascórbico e P, enquanto houve redução de K, Ca e Mg.

Com o passar dos anos, os sistemas agrícolas baseados em uso do solo têm enfrentado diversos desafios, como baixa fertilidade do solo devido ao cultivo contínuo ao longo dos anos e declínio dos níveis das águas subterrâneas devido à má gestão dos recursos hídricos (Lambin e Meyfroidt, 2011; Lehman et al., 2015; Bhanja et al., 2018; Majid et al., 2021). Desta maneira, o cultivo de alimentos em hidroponia e ambiente fechado, surge como alternativa para tais adversidades, uma vez que neste sistema não há uso de nutrientes e água acima do requerido pelas plantas, gerando mais eficiência do uso destes recursos naturais (Rouphael et al., 2004; Tomasi et al., 2014; Majid et al., 2021).

Estudos comparativos entre sistemas hidropônicos e sistemas convencionais são escassos, entretanto, os estudos realizados indicam maior produção de massa fresca da alface em sistemas hidropônicos (Barbosa et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Majid et al., 2021). Barbosa et al. (2015) constataram que alface hidropônica apresentou produtividade 11 vezes maior com demanda 13 vezes menor de consumo de água quando comparada à alface convencional. Os mesmos autores atribuem maiores produções ao uso de sistemas hidropônicos em casas de vegetação, o que permite maior controle das condições climáticas e, conseqüentemente, redução do número de dias do ciclo da alface, o que permite múltiplas colheitas por ano.

Estudos que avaliam a concentração de Fe na solução nutritiva são escassos. Furlani et al. (1999) recomendam, para alface e hortaliças folhosas, 2 mg L⁻¹ do nutriente.

Entretanto, essa recomendação visa garantir o bom crescimento e desenvolvimento da alface, mas, não se relaciona com a biofortificação, evidenciando a importância de mais estudos.

Para o adequado crescimento e desenvolvimento de alface, o teor foliar de Fe deve estar entre 50 e 150 mg kg⁻¹ (Trani et al., 2018). O principal sintoma de deficiência de Fe é a clorose internerval, em folhas mais jovens, entretanto, se a deficiência for extrema, as nervuras se tornam também cloróticas, uma vez que o Fe é necessário para síntese de alguns complexos constituídos por clorofila e proteína no cloroplasto (Taiz et al., 2017), reduzindo a produtividade e qualidade da alface. Bronzeamento e redução do crescimento são os principais sintomas de toxicidade por Fe que podem evoluir para manchas foliares necróticas e escurecimento da raiz (Jucoski et al., 2016). O bronzeamento ocorre devido o estresse oxidativo secundário ou ao antagonismo entre Mg e Fe na formação do grupo porfirina clorofila (De Dorlodot et al., 2005). Também, Delias et al. (2021) constataram que a toxicidade de Fe prejudicou a troca gasosa foliar e o acúmulo de biomassa na planta, aumentou a atividade do sistema antioxidante e promoveu o desbalanço nutricional.

Quanto ao Zn, é o elemento que desempenha grande importância enzimática. O nutriente é componente de poucas enzimas de plantas superiores, como álcool desidrogenase, anidrase carbônica, super oxidase dismutase e RNA polimerase (Kirkby e Romheld, 2007). O mesmo tem grande impacto na função e estrutura de biomembranas (Alloway, 2008), é ativador de diversas enzimas e sua insuficiência faz com que cerca de 100 enzimas impeçam o correto funcionamento do metabolismo dos organismos (Singh et al., 2005).

O nutriente é importante na produção de auxinas e, principalmente, do ácido indolacético, uma vez que participa da síntese do triptofano, que é precursor do ácido, o que impacta diretamente no crescimento e altura das plantas (Krikby e Romheld, 2007; Younas et al., 2022).

Para alface cultivado em hidroponia, Furlani et al. (1999) recomendam a concentração de 0,06 mg L⁻¹ de Zn, e o teor foliar do nutriente deve estar entre 30 e 100 mg kg⁻¹ de massa seca, para que a planta apresente adequado crescimento e

desenvolvimento (Trani et al., 2018). Entretanto, esta recomendação não proporciona biofortificação para Zn.

Estudos avaliando a resposta da cultura da alface ao Zn, em diferentes sistemas de cultivo, têm sido realizados. Almeida et al. (2020), em cultivo de alface no solo, avaliando doses de 0, 5, 10, 20 e 30 mg kg⁻¹ de Zn, constataram que a alface variedade 'Grand Rapids' apresentou aumento de crescimento até a dose 15,6 mg kg⁻¹ de Zn, enquanto as variedades 'Regina de Verão' e 'Delícia', apresentaram redução na massa seca da parte aérea de 91% e 42%, respectivamente, quando a dose aumentou de 0 para 30 mg kg⁻¹. Os mesmos autores ainda constataram que houve aumento linear no teor foliar de Zn em ambas variedades, indicando a responsividade da cultura para biofortificação com Zn. Lima et al. (2023), avaliando as concentrações de 0,3, 1,0, 1,7 e 2,4 mg L⁻¹ de Zn na solução nutritiva, na cultura da alface, não constataram efeito da concentração de Zn no crescimento das plantas, porém, foi observado aumento de 76% no teor foliar de Zn, quando a concentração aumentou de 0,3 para 2,4 mg L⁻¹.

A deficiência de Zn pode causar grandes impactos negativos nas plantas, inibindo a produção de ácido indolacético, o que prejudica o desenvolvimento de folhas e inter-ramos (Havlin et al., 2017); pode aumentar a produção da síntese de ácido abscísico, promovendo queda prematura de folhas e flores (Brown et al., 1993; Alloway, 2008).

Por ser um micronutriente e requerido em pequenas quantidades pelas plantas, os sintomas de deficiência de Zn pode ser oculto, e evidenciando apenas quando em grave e severa deficiência do nutriente, podendo gerar redução da produção em até 50% (Katyal, 1972). Quando presente, os principais sintomas de deficiência ocorrem com o surgimento de manchas cloróticas nas folhas mais velhas, caso não haja correção nutricional, com a evolução do tempo, estas manchas se tornam em amarelas, verde claro e por fim brancas; ocorre também o surgimento de listras amarelas e cloróticas e a deformação das folhas mais jovens (Younas et al., 2022).

O desequilíbrio nutricional de Zn, seja déficit ou excesso, pode causar diminuição dos teores de clorofila, reduzindo fotossíntese, produção e biodisponibilidade de outros micronutrientes (Kaya e Higgs, 2001; Anwaar et al., 2015; Roosta et al., 2017).

2.3 Biofortificação agrônômica com ferro e zinco

A deficiência de micronutrientes, também chamada de fome oculta, é um problema de saúde pública mundial, atingindo desde países em desenvolvimento, devido a dificuldade de acesso a recursos e crescimento populacional (Monika et al., 2023), até países desenvolvidos, devido ao aumento de dietas a base de vegetais (Beleggia et al., 2018). Atualmente, cerca de 2 bilhões de pessoas sofrem de fome oculta no mundo (Van der Straeten et al., 2020), com isto, o impacto negativo não ocorre somente na saúde da população, mas também na economia. Estima-se que a deficiência de macro e micronutrientes custa cerca de 2 trilhões de dólares anualmente (Monika et al., 2023).

Os micronutrientes são essenciais para o correto funcionamento do organismo humano, desempenhando um papel importante no metabolismo do corpo, no funcionamento dos tecidos e imunidade, atuando como cofator para diversas enzimas (Younas et al., 2022). Dentre os micronutrientes, destacam-se o Fe e Zn, que são mais requeridos no corpo humano e sua deficiência é mais severa do que outros micronutrientes (Younas et al., 2022). Assim, a biofortificação surge como estratégia para combater este fenômeno, uma vez que esta técnica é excelente para o aumento de vitaminas, minerais e micronutrientes nos alimentos (Moghissi et al., 2016).

O Fe é considerado essencial para humanos, por estar envolvido em vários processos metabólicos, como transporte de oxigênio, síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), transporte de elétrons, produção de energia e com a síntese de mioglobina e hemoglobina (Abbaspour et al., 2014; Buturi et al., 2021). No organismo humano, o Fe é encontrado em dois tipos: Fe heme e Fe não-heme. O Fe heme é componente da hemoglobina e mioglobina, e está presente em alimentos de origem animal. O mesmo contribui entre 10 e 15% do Fe total absorvido por carnívoros, mas por apresentar absorção maior e mais uniforme (15 – 35%) e ser pouco influenciado por fatores dietéticos, pode ser responsável por até 40% da ingestão total de Fe (Hurrell e Egli, 2010). O Fe não-heme é a forma mais consumida, que é derivado de alimentos de origem vegetal, possui baixa biodisponibilidade (2 – 20%), uma vez que sua absorção é fortemente influenciada por fatores dietéticos e dependente da solubilização do Fe ingerido no estômago e redução à forma ferrosa no intestino (Bortolini e Fisberg, 2010;

Abbaspour et al., 2014). Assim, biofortificar alimentos de origem vegetal se mostra muito relevante para o aumento do consumo do Fe não-heme, além dos benefícios do consumo de vegetais, como o alto teor de fibras da alface, por exemplo.

A deficiência pode causar anemia, que, por sua vez, pode causar danos ao crescimento, sistema imunológico, desenvolvimento cognitivo e da linguagem, perda de apetite e redução da disposição e da produtividade (Loureiro et al., 2018). Para que não haja deficiência de Fe, a ingestão diária recomendada para homens e mulheres está em torno de 8 e 18 mg dia⁻¹, respectivamente, enquanto para gestantes a quantidade aumenta para 27 mg dia⁻¹ (Wishart, 2017).

O Zn é o segundo micronutriente mais abundante no corpo humano, atrás apenas do Fe, e o mais abundante dentro de células, sendo componente de, aproximadamente, 300 metaloenzimas (Livingstone, 2015). Sua abundância se deve ao fato de ser elemento-chave em grande parte de reações químicas para o correto funcionamento do metabolismo mamífero, sendo responsável pela estabilidade e atividade catalítica de até 10% das proteínas do corpo humano (Kachinski et al., 2022).

O Zn é um nutriente que atua na manutenção da estrutura e atividade enzimática, desempenha papel fundamental na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, atua na diferenciação celular, no uso de glicose e secreção de insulina (Buturi et al., 2021). Está, portanto, relacionado ao funcionamento do sistema imunológico, função sensorial, desenvolvimento neurocomportamental, saúde reprodutiva, crescimento e desenvolvimento físico (Graciano et al., 2020).

A ingestão recomendada de Zn, em adultos, está na faixa entre 9 e 14 mg dia⁻¹ (Buturi et al., 2021), assim, quando há ingestão adequada do nutriente há redução da incidência de câncer, desordens neurológicas e doenças autoimunes (Chasapis et al., 2012).

Estima-se que cerca de 1,8 bilhão de pessoas apresentam déficit de Zn (Sahin, 2020). Tal deficiência pode afetar negativamente a fertilidade e reprodução humana, causar doenças crônicas e complicações durante a gestação, como nascimento prematuro, fetos com tamanho e peso abaixo do peso ideal (Levenson e Morris 2011;

Gibson, 2012; Ota et al., 2015; Carducci et al., 2021), além de retardar o crescimento, causar anorexia e hipogeusia em crianças (Brown et al., 2002).

Estudos sobre biofortificação agrônômica de plantas têm crescido em sistemas hidropônicos devido às suas vantagens, pois proporcionam o manejo do estado nutricional da planta durante seu crescimento, devido à maior eficiência no uso de água e nutrientes, proporcionando maior rendimento e melhor qualidade das hortaliças (Mercês et al., 2022; Sambo et al., 2019).

A biofortificação via cultivo hidropônico pode ser mais eficiente do que o método de biofortificação via solo, pois a constante exposição do sistema radicular à solução nutritiva fortificada e a ausência de interação do elemento com os atributos físicos, químicos e biológicos do solo maximizam a absorção, translocação e acúmulo do nutriente nas partes comestíveis das plantas (Wiesner-Reinhold et al., 2017; Rouphael e Kyriacou, 2018). Ainda, o cultivo hidropônico permite maior eficiência, segurança e eficácia do que método de biofortificação via aplicação foliar de nutrientes, devido à ausência de deriva, chuva e calibração de equipamentos, e pode ser um método mais econômico devido à menor dose necessária para biofortificação, uma vez que as raízes permanecem continuamente em contato com a solução nutritiva. (Winkel et al., 2015; Tzortzakis et al., 2020; Nascimento et al., 2022).

A biofortificação é a técnica que visa aumentar a concentração e biodisponibilidade de determinado nutriente na parte comestível de alimentos, seja pela biofortificação genética, que visa o melhoramento genético de novas cultivares, seja pela biofortificação agrônômica, principalmente realizada por fertilização (Almeida et al., 2020; Lata-Tenesaca et al., 2023; Kachinski et al., 2022).

A biofortificação agrônômica tem sido uma ferramenta eficaz para o combate à fome oculta por micronutrientes em diferentes espécies. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para uma correta recomendação de biofortificação, uma vez que a mesma varia com a espécie, o desenvolvimento da planta, as formas de aplicação do elemento e o clima (Naveed et al., 2020; Burak e Aydin, 2022; Lata-Tenesaca et al., 2022).

Estudos com biofortificação agrônômica com Fe têm sido realizados em diversas culturas. Giordano et al. (2019) constataram que, para alface, a adição de Fe na solução

nutritiva aumentou a concentração foliar do nutriente em 20,5% e 53,7%, para os tratamentos de 56 mg L⁻¹ e 112 mg L⁻¹, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle de 0,84 mg L⁻¹. Di Gioia et al. (2019) observaram que 20 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva de microvegetais de repolho roxo, rúcula e mostarda vermelha incrementaram o teor foliar do nutriente em até três vezes, quando comparado ao tratamento sem incremento de Fe na solução nutritiva. Lata-Tenesaca et al. (2023) relataram incremento de cerca de 50% da concentração de Fe em grãos de quinoa, quando adicionados 5 mg L⁻¹ na solução nutritiva.

Dentre os parâmetros para avaliar a ingestão de um elemento, destaca-se a biodisponibilidade. É definida como a fração de um elemento, em determinado alimento ou dieta, que está disponível ao corpo para função fisiológica após ingestão (La Frano et al., 2014). A biodisponibilidade é importante para estratégias de fortificação e suplementação de elementos, uma vez que a absorção dos mesmos está associada à dosagem, forma química, etc. (Zhang et al., 2020).

Um fator que pode afetar a biodisponibilidade de Zn e Fe é a presença de potencializadores ou inibidores da absorção (Olivares et al., 2013). Dentre os potencializadores da absorção de Fe destaca-se o ácido ascórbico. Seu efeito se dá, em grande parte, devido à capacidade de reduzir o ácido férrico em ferroso, e seu potencial para quelatizar o Fe (Hurrell e Egli, 2010). Assim, o efeito potencializador do ácido ascórbico na absorção do Fe está relacionado principalmente ao seu poder redutor, sendo limitada a possibilidade de obtenção de efeito semelhante na absorção de Zn (Jovani et al., 2000). Giordano et al. (2019) observaram que o conteúdo de ácido ascórbico, em alface verde, aumentou em 62,7% na maior concentração de Fe da solução nutritiva, enquanto Przybysz et al. (2016) observaram aumento de 150% e 80% em alface e brócolis, respectivamente, como aumento da concentração de Fe na solução nutritiva, indicando aumento da biodisponibilidade do nutriente, dadas as características promotoras de absorção do ácido ascórbico. Os antinutricionais são compostos que podem reduzir a biodisponibilidade dos mesmos nas plantas. Dentre estes fatores, destaca-se o ácido fítico, que possui fortes propriedades de ligação de minerais, proteínas e amido, formando complexos insolúveis (Ramírez-Cárdenas et al., 2008.;

Mohan et al., 2016). Embora, quando em baixa concentração, o ácido fítico pode apresentar papel benéfico na dieta humana, agindo como anticarcinogênico e diminuindo risco de doenças cardiovasculares ou diabetes (Bouis e Welch, 2010), não há estudos que comprovem o balanço entre os benefícios e os malefícios do ácido fítico nos organismos.

Segundo Ebbs e Uchil (2008), altas doses de Zn induzem a deficiência de Fe, o que, conseqüentemente, reduziu os teores de clorofila. Di Gioia et al. (2019), avaliando concentrações de Zn na solução nutritiva, constataram que houve maior teor de Fe na folha na menor concentração de Zn na solução nutritiva, e o aumento de Zn reduziu o teor foliar de Fe. Os mesmos autores, estudando concentrações de Fe na solução nutritiva, constataram que as maiores concentrações de Zn na folha foram observadas quando houve maior concentração de Fe (40 mg L⁻¹), onde o aumento foi de 228,6%, 690,6% e 452%, para rúcula, repolho roxo e mostarda vermelha, respectivamente.

Assim, dada a importância de ambos os nutrientes e a importância da cultura da alface na alimentação mundial, estudos que avaliem a biofortificação simultânea com estes elementos na cultura, para o combate à fome oculta, devem ser realizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização e localização da área experimental

O experimento foi conduzido entre 13 de setembro e 4 de novembro de 2022, em sistema hidropônico *nutrient film technique* (NFT), com recirculação da solução nutritiva, em casa de vegetação, com medidas de 51 m de comprimento, 12,80 m de largura e pé-direito de 3,0 m, na UNESP – câmpus de Jaboticabal, SP (21°15'22" S, 48°18'58" O e a 575 metros de altitude).

Os dados meteorológicos durante o período experimental foram 23,2 °C, 30,9 °C, 17,3°C e 62,8% para temperaturas média, média da máxima e média da mínima e umidade relativa, respectivamente. Os dados foram extraídos do acervo da área de

Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas da Estação Agroclimatológica do Câmpus de Jaboticabal, SP.

3.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foram avaliados seis tratamentos, em delineamento experimental de blocos casualizados, esquema fatorial 2×3 , com quatro repetições, correspondentes às combinações das concentrações de Zn (0,06 e 0,24 mg L⁻¹) e Fe (2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹). As menores concentrações são as recomendadas por Furlani et al. (1999) para cada micronutrientes. Foram utilizadas as fontes Rexene® Ferro Q48 (Fe-EDDHA 6%) e sulfato de zinco.

A unidade experimental contou com 20 plantas, em espaçamento de 0,2 x 0,2 m, cultivadas em canais de 1,2 m de comprimento, 0,1 m diâmetro e 5% de declividade.

3.3 Instalação e condução do experimento

A alface 'Vanda', do grupo das alfaces de folha crespa e que não formam cabeça foi semeada em espuma fenólica, com células de 2 x 2 x 2 cm (Green up®), previamente lavada em água corrente de modo a eliminar qualquer tipo de resíduo presente. Durante o período de germinação e crescimento inicial da plântula, as placas permaneceram por oito dias em casa de vegetação com irrigação por aspersão, utilizando apenas água. Este período foi denominado Fase I.

Aos oito dias após a semeadura (DAS), quando as plantas apresentaram os cotilédones expandidos, as células da espuma fenólica foram individualizadas e transferidas para canais de polipropileno, com 5 cm de largura, em hidroponia, sistema NFT, com 5% de declividade. Neste período, denominado Fase II, que antecedeu o transplante para os canais definitivos, o espaçamento entre plantas foi 0,05 x 0,05 m. Utilizou-se a solução nutritiva para alface proposta por Furlani et al. (1999). As concentrações dos nutrientes foram: 24; 174; 39; 183; 142; 38; 52; 0,3; 0,02; 2,0; 0,40; 0,06 e 0,06 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn,

respectivamente. A solução nutritiva foi fornecida entre os horários de 6h00 e 18h30 de forma contínua, por meio de bomba Power Head CX-300, com vazão de 1000 L h⁻¹.

O transplante para o local definitivo (Fase III) ocorreu aos 24 DAS, quando as plantas apresentaram quatro folhas. Nesta fase, também entre 6 e 18h30, houve circulação continuada da mesma solução utilizada na Fase II, com exceção para Fe e Zn que tiveram suas concentrações correspondentes aos tratamentos. No reservatório, adotou-se a proporção de 1,5 L de solução nutritiva por planta. As soluções nutritivas receberam aeração constante. Diariamente, o volume inicial da solução nutritiva foi recomposto com adição de água. O pH foi mantido entre 5,5 a 6,5 e a solução foi trocada quando a CE atingiu 0,8 mS cm⁻¹, que representa 40% da CE inicial.

3.4 Características avaliadas

Aos 13 dias após transplante (DAT) para a Fase III, foram avaliados os teores de pigmentos clorofila *a* + *b* e carotenoides, conforme proposto por Lichtenthaler (1987). Para tanto, foram coletados 0,025 a 0,030 g de disco foliares de folhas intermediárias e transferidos para eppendorfs contendo 1,5 ml de acetona a 80%, em ausência de luz. Após 48 horas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro à 663 nm (Clorofila *a*), 647 nm (Clorofila *b*) e 470 nm (Carotenoides). Os teores dos pigmentos foram expressos em µg g⁻¹.

Quando a planta completou 18 DAT para a Fase III, foi realizada a avaliação do estado nutricional da alface para Fe e Zn (mg kg⁻¹). De cada planta da área útil da parcela, coletou-se uma folha intermediária (recém-desenvolvida) (Trani et al., 2018). As folhas foram lavadas em água deionizada, colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65°C. Obtida a massa seca de folhas, os teores de Fe e Zn foram determinados, conforme proposto por Miyazawa et al. (2009).

Aos 28 DAT para a Fase III (52 DAS), foi realizada a colheita e avaliados: a) Sintomas visuais de toxicidade de Fe e Zn; b) Área foliar (cm² por planta): foi determinada utilizando o aparelho LICOR®, modelo LI 3100; c) Massa seca das folhas (g por planta): as folhas foram lavadas em água corrente, seguido por água deionizada e colocados

separadamente em sacos de papel. Posteriormente, foram levados para estufa de circulação forçada de ar a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ até atingirem peso constante e, em seguida, pesados; d) Biofortificação da alface com Fe e Zn (mg kg^{-1}): na colheita, todas as folhas da alface foram lavadas e secas conforme descrito na avaliação do estado nutricional da planta. Os teores de Fe e de Zn foram avaliados nesta massa seca de folhas, representativa de toda a parte aérea, utilizando das mesmas metodologias descritas por Miyazawa et al. (2009); e) Teor de ácido ascórbico: foi determinado pesando-se 2 g de folha fresca de alface e adicionado 10 mL de solução de ácido oxálico gelado à 0,5%. Em seguida, essa mistura foi filtrada. Foram transferidos 1 mL do extrato filtrado e 4 mL de ácido oxálico 0,5% para erlenmeyer, misturados e titulados com 2,6 diclorofenol indofenol (0,02%) até o ponto de viragem, conforme descrito por Strohecker e Henning (1967). Os resultados são expressos em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015). Para todas as características, foi realizado teste Tukey para concentrações de Zn e estudo de regressão polinomial para concentrações de Fe na solução nutritiva e escolhidas as equações com ajuste significativo ($p < 0,05$) e maior coeficiente de determinação.

4 RESULTADOS

Conforme resultados da análise de variância apresentados na Tabela 1, não foi observada interação dos nutrientes nas características avaliadas. Área foliar e massa seca de folhas não foram influenciadas pelos dois micronutrientes. Concentrações de Fe influenciaram as demais características, exceto o teor de Zn foliar aos 18 dias e ácido ascórbico, os quais foram influenciados somente pelo Zn (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das análises de variância, do estudo de regressão para concentrações de Fe e do teste t para concentrações de Zn para teores de clorofila *a+b* (CHLOR) e carotenoides (CAR), avaliação do estado nutricional para ferro (EN-Fe) e para zinco (EN-Zn), área foliar (AF), massa seca de folhas (MSF), biofortificação para ferro (B-Fe) e para zinco (B-Zn) e teor de ácido ascórbico (AA).

Fonte Var.	CHLOR	CAR	EN-Fe	EN-Zn	AF	MSF	B-Fe	B-Zn	AA
Valores de F									
Fe	13,93**	12,87**	11,23**	2,27 ^{ns}	3,38 ^{ns}	2,80 ^{ns}	9,76**	8,23**	19,41**
Zn	0,00 ^{ns}	0,50 ^{ns}	3,10 ^{ns}	7,28*	0,00 ^{ns}	0,18 ^{ns}	4,11 ^{ns}	2,10 ^{ns}	6,08*
Fe x Zn	0,00 ^{ns}	0,13 ^{ns}	1,66 ^{ns}	1,92 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}	1,41 ^{ns}	2,07 ^{ns}	0,22 ^{ns}
CV (%)	15,51	15,74	21,29	9,86	15,43	12,34	11,82	13,36	20,73
Regressão Polinomial para Fe									
Eq. 1º grau	**	**	**	ns	*	*	**	**	**
Eq. 2º grau	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*
mg L ⁻¹	Teste Tukey para Zn								
0,06	0,13 ^a	0,13 ^a	133,4 ^a	79,7 ^b	1667,8 ^a	20,6 ^a	147,9 ^a	87,4 ^a	5,9 ^b
0,24	0,12 ^a	0,12 ^a	114,4 ^a	88,8 ^a	1669,9 ^a	20,1 ^a	134,2 ^a	94,6 ^a	7,3 ^a

CV = Coeficiente de variação; *, **, ^{ns} = significativo a 5%, 1% e não significativo pelo teste F, respectivamente. Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Os teores de clorofila total (Figura 1A) e carotenoides (Figura 1B) responderam positivamente ao aumento de Fe na solução nutritiva, com máximos de 0,1505 e 0,1475 $\mu\text{g g}^{-1}$ de clorofila total e carotenoides, respectivamente, na concentração de 8 mg L⁻¹.

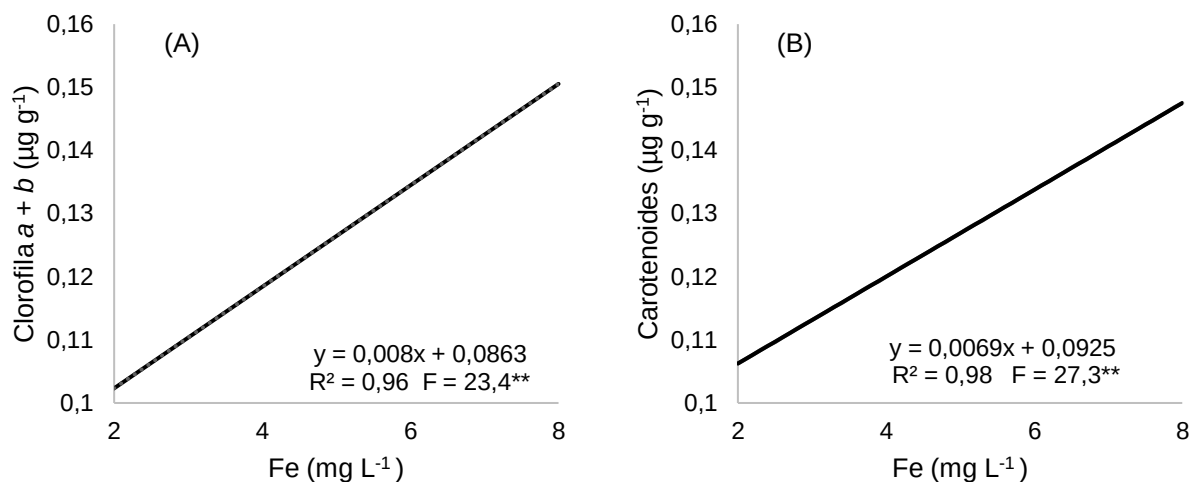


Figura 1. Teores foliares de clorofilas *a* + *b* (A) e carotenoides (B) em função da concentração de ferro (Fe) na solução nutritiva. ****** $p < 0,01$.

Aos 18 DAT para a Fase III, o teor foliar de Fe aumentou linearmente com o incremento das concentrações de Fe na solução nutritiva (Figura 2) e não foi influenciado pelas concentrações de Zn na solução nutritiva. Quanto ao Zn, o teor foliar de Zn, constatou-se aumento de 79,7 para 88,8 mg kg⁻¹ Zn quando a concentração passou de 0,06 para 0,24 mg L⁻¹ (Tabela 1).

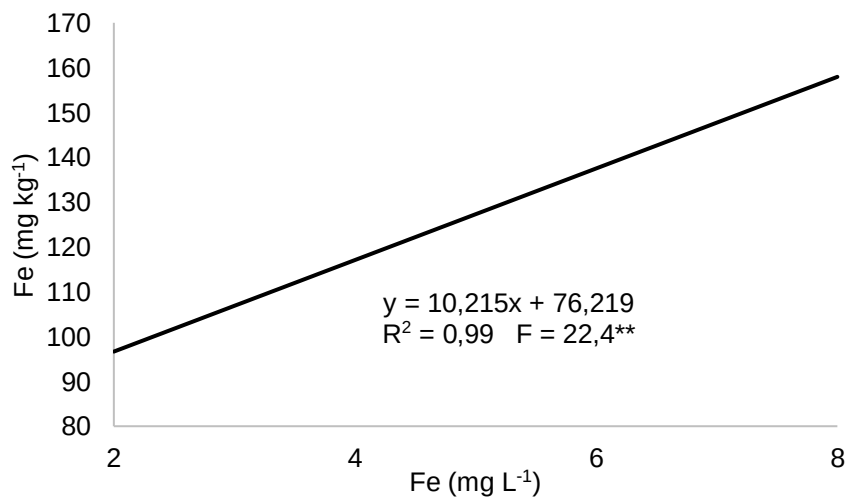


Figura 2. Teores foliares de ferro (Fe) na alface, aos 18 dias após o transplante para a fase III, em função da concentração de ferro na solução nutritiva. ****** $p < 0,01$

Embora não tenham sido constatados efeitos significativos dos fatores na análise de variância para algumas características, houve ajustes de equação polinomial para todas, exceto para teor de Zn na folha aos 18 DAT para a Fase III. Para área foliar (Figura 3A) e da massa seca de folhas (Figura 3B) da alface, na colheita, houve redução com o aumento da concentração de Fe na solução nutritiva. Quando a concentração de Fe aumentou para 4 e 8 mg L⁻¹, houve redução de 4,4 e 13,3% em relação à massa seca de folhas obtida com 2 mg L⁻¹. Ainda que tenham sido constatados os efeitos negativos do Fe nas características que expressam crescimento, não foi observado sintoma de toxicidade de Fe nas plantas de alface.

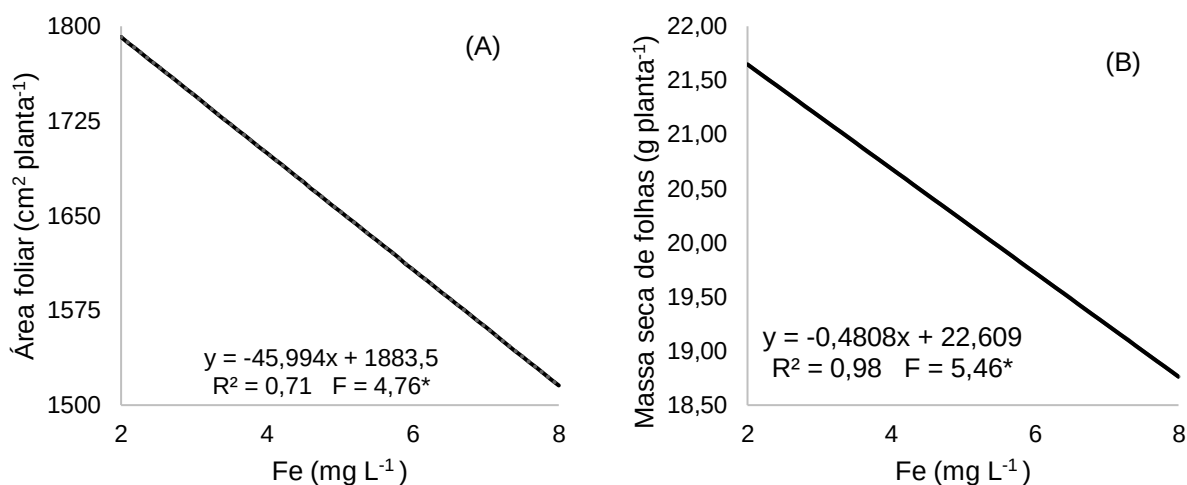


Figura 3. Área foliar (A) e massa seca de folhas (B) da alface em função da concentração de ferro (Fe) na solução nutritiva. * $p < 0,05$

Na colheita, verificou-se aumento linear do teor de Fe na massa seca de folhas da alface com o aumento da concentração de Fe na solução nutritiva, o que caracterizou a biofortificação da alface. Quanto ao Zn, o teor foliar reduziu até a concentração de 4,0 mg L⁻¹ e permaneceu estável até 8,0 mg L⁻¹ de Fe (Figura 4, Tabela 1).

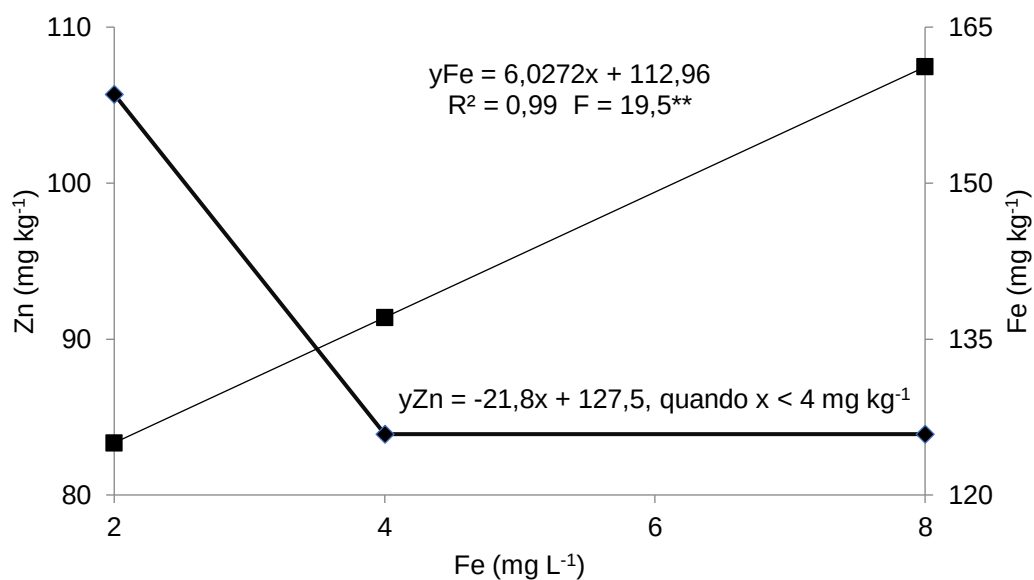


Figura 4. Teores de ferro (Fe) e de zinco (Zn) na massa seca de folhas de alface em função da concentração de ferro (Fe) na solução nutritiva. ** $p < 0,01$.

O teor de ácido ascórbico aumentou até a concentração de 4 mg L⁻¹ Fe na solução nutritiva (Figura 5), enquanto na maior concentração de Zn o teor de ácido ascórbico foi 7,32 mg 100 g⁻¹ de massa fresca, 23,2% maior que na menor concentração de Zn na solução nutritiva (Tabela 1).

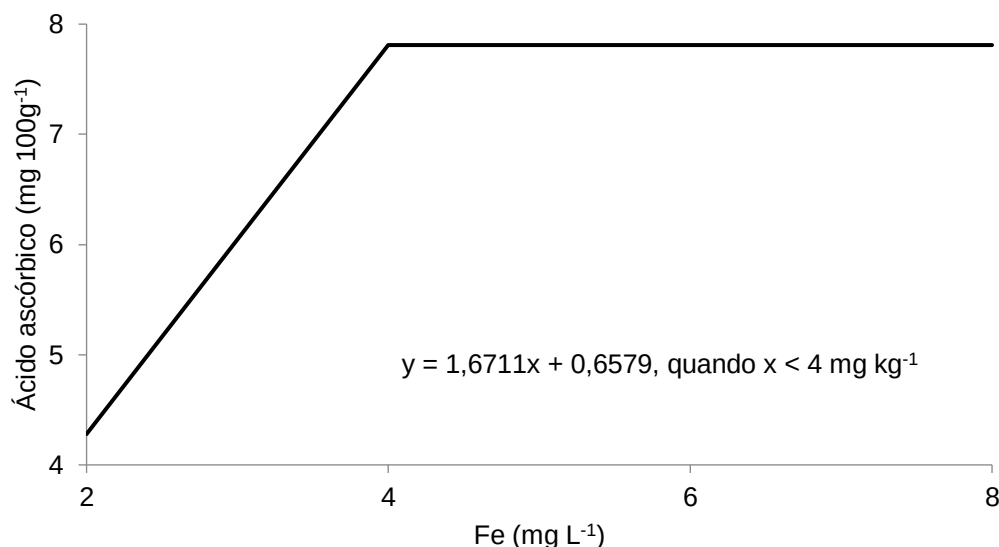


Figura 5 - Teor de ácido ascórbico na massa fresca (MF) de folhas da alface em função da concentração de ferro (Fe) na solução nutritiva.

5 DISCUSSÃO

Os pigmentos fotossintéticos foram influenciados pelas concentrações de Fe na solução nutritiva. As maiores concentrações de Fe acarretaram em aumento de 147,1 e 138,8% nos teores de clorofilas e carotenoides, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, Buturi et al. (2022) constataram aumento linear no teor de pigmentos, com aumento de Fe na solução nutritiva, ainda, Giordano et al. (2019) constataram aumento no teor de carotenoides com o aumento de Fe na solução nutritiva. Estes resultados são explicados pelo fato de o Fe ter grande participação na síntese da clorofila e no tamanho dos cloroplastos, que são as organelas que mais acumulam Fe nas plantas (Marschner et al., 2011; Broadley et al., 2012; Briat et al., 2015).

Quando em excesso, o Fe pode favorecer o aumento de espécies reativas de oxigênio, o que reduziria os pigmentos (Monteiro e Winterbourn, 1988), e apresentaria sintomas como bronzeamento, manchas foliares necróticas e escurecimento da raiz (Jucoski et al., 2016), sintomas que não foram observados.

Foi observado que os teores foliares de Zn aos 18 DAT para a fase III, 79,7 e 88,8 mg kg⁻¹ obtidos com 0,06 e 0,24 mg L⁻¹ de Zn, respectivamente, situaram-se na faixa de 30 a 100 mg kg⁻¹, considerada adequada por Trani et al. (2018). Os teores foliares de Fe aos 18 DAT situaram-se dentro da faixa de 50 e 150 mg kg⁻¹, considerada adequada por Trani et al. (2018), apenas nos tratamentos 2 e 4 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva, nas quais foram observados teores de 96,6 e 117,1 mg kg⁻¹, respectivamente. Com 8 mg L⁻¹ de Fe foi constatado teor foliar de 157,9 mg kg⁻¹. Independente do tratamento, o teor foliar de Fe foi maior do que o encontrado por Giordano et al. (2019), no qual foi observado teor foliar de 75,5 e 93,0 mg kg⁻¹ de Fe para alface verde e vermelha, respectivamente, quando o fornecimento de Fe na solução nutritiva foi de 112 mg L⁻¹.

Houve redução de 15,4% da área foliar de plantas cultivadas com 8 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva, quando comparada às plantas cultivadas com 2 mg L⁻¹. Este resultado é semelhante ao observado por Giordano et al. (2019), que observaram redução na área foliar, de alface cultivada em hidroponia, quando houve aumento de Fe na solução nutritiva. Quanto à massa seca de folhas, também houve redução linear com o aumento da concentração de Fe de 2 para 8 mg L⁻¹, atingindo redução 13,3% neste intervalo. Resultados semelhantes têm sido observados na literatura, nos quais diversos autores constataram influência negativa do aumento de Fe na produção de massa seca em diferentes culturas (Cecilio Filho et al., 2015; Di Gioia et al., 2019). Giordano et al. (2019) observaram redução de 9,7 e 18,1% da massa seca foliar para alface verde e alface vermelha, respectivamente, quando o Fe na solução nutritiva aumentou de 0,84 para 112 mg L⁻¹, enquanto Buturi et al. (2022) observaram redução de 18% quando o fornecimento de Fe aumentou de 1,12 para 57,12 e 113,12 mg L⁻¹, independente da variedade de alface.

O Fe²⁺ é um metal imóvel que se acumula nos vacúolos das células vegetais. Quando em excesso, o fluxo constante do metal nos vasos condutores pode ser forte o suficiente para que haja redução do crescimento foliar em área e quantidade, e devido à incapacidade do metal se redistribuir, pode haver senescência prematura das folhas, reduzindo o crescimento e produção das plantas (Audebert, 2006; Peña-Olmos et al. 2014; Zahra et al., 2021).

Ainda, a redução no crescimento das plantas, quando há incremento do fornecimento de Fe pode estar relacionado com o envolvimento do Fe na reação de Fenton, que leva à superprodução de espécies reativas de oxigênio, que pode levar à destruição celular, uma vez que reagem com ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e ácidos nucleicos (De Dordolot et al., 2005; Briat e Dubos, 2015; Przybysz et al., 2016; Giordano et al., 2019). Ainda, tal redução no crescimento, pode estar ligada a um suposto mecanismo, quando há exposição excessiva ao Fe, que aumenta a produção de peróxido de hidrogênio, causando superprodução de espécies reativas de oxigênio, o que pode acarretar na oxidação irreversível da membrana, prejudicando a estrutura celular, danificando DNA e proteínas (Nagajyoti et al., 2010; Kobayashi e Nishizawa., 2012; Giordano et al., 2019). Portanto, ainda que não tenham sido visualizados sintomas de toxicidade de Fe que pudessem prejudicar o aspecto comercial da alface, a redução de crescimento é sinal de toxicidade do nutriente.

A concentração que melhor proporcionou biofortificação foi 8 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva, entretanto, houve redução de 13,3% no crescimento da alface, o que não é aceito comercialmente e pode causar rejeição por parte de produtores à biofortificação. Assim, em termos comerciais e produtivos, a recomendação de 2 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva, proposta por Trani et al. (2018), se mostra a mais eficaz.

Na colheita, que se deu aos 28 DAT para a Fase III, foi possível observar que os tratamentos 4 e 8 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva apresentaram aumento no teor foliar de Fe de 9,7 e 28,9%, respectivamente, em relação à solução nutritiva com 2 mg L⁻¹, indicando que os tratamentos proporcionaram biofortificação. Assim, uma porção de 50 g de alface biofortificada com 4 e 8 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva proporcionaria ingestão de 6,85 e 8 mg de Fe, respectivamente. O maior teor foliar de Fe esteve acima da faixa de 50 e 150 mg kg⁻¹, recomendada por Trani et al. (2018) para o crescimento e desenvolvimento adequado da alface.

Giordano et al. (2019), avaliando a resposta de alface vermelha e alface verde em relação às concentrações de Fe na solução nutritiva (0,84; 28; 56 e 112 mg L⁻¹), constataram que, na colheita, houve aumento no teor foliar de Fe de 40,6 para 75,5 mg kg⁻¹ para alface do grupo verde e teor de 66,0 para 93,0 mg kg⁻¹ para alface vermelha.

Os mesmos autores constataram que, independente da cultivar, a adição de 28 e 112 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva proporcionou aumento de 20,5% e 53,7%, respectivamente, no teor foliar de Fe.

Entretanto, é desejável que no processo de biofortificação não ocorra redução do crescimento das plantas, o que foi presenciado no presente trabalho pela redução na massa seca de folhas. Os tratamentos 4 e 8 g L⁻¹ de Fe na solução nutritiva apresentaram redução de 4,4 e 13,3% na produção de massa seca de folhas. Visando uma boa relação entre produção e biofortificação, a concentração de 4 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva apresentou melhor relação se comparada ao tratamento 8 mg L⁻¹, assim, considerando o teor médio de massa seca da parte aérea da alface (5%) e o teor de Fe da alface na solução de 4 mg L⁻¹ de Fe (137,07 mg kg⁻¹) tem-se 6,85 mg de Fe por quilograma de alface fresca. Assim, considerando a ingestão recomendada de 8 e 18 mg dia⁻¹ de Fe para homens e mulheres, respectivamente, uma porção de 50 gramas de alface por refeição, pode fornecer 4,25 e 1,89% da demanda diária de Fe, respectivamente. Para atender a 20% da ingestão diária recomendada para homens e mulheres, deveriam ser consumidas durante o dia porções de 233,6 e 525,55 gramas de alface.

O teor foliar de Zn foi influenciado pelas concentrações de Fe na solução nutritiva, entretanto, não houve resposta significativa às concentrações de Zn na mesma, evidenciando a influência de um micronutriente sobre o outro. Houve ajuste platô da equação e o teor máximo foliar de Zn foi de 105,08 mg kg⁻¹ na concentração 2 mg L⁻¹ de Fe na solução nutritiva, observando-se que maiores concentrações de Fe reduziram a disponibilidade do Zn para as plantas.

A interação antagônica entre Fe e Zn pode ser explicada por três possíveis mecanismos (Zhao et al., 2011): a competição entre Zn²⁺ e Fe²⁺ durante a absorção (Kabata-Pendias, 2010); uma interferência no processo de quelatização durante a absorção e translocação do Fe (Kabata-Pendias, 2010) e pela competição inibitória entre Fe e Zn durante o descarregamento no xilema (Alloway, 2008). Tewari et al. (2008) relataram que devido as semelhanças nos raios iônicos, os transportadores de Zn e Fe possuem afinidade, indicando competição na absorção quando houve aumento da concentração de Fe. Esta interação entre Fe e Zn pode afetar negativamente a absorção

dos mesmos em plantas quando presentes na mesma solução (La Frano et al., 2014). Isto ocorre devido a semelhança química e o compartilhamento de transportadores, fazendo com o que ambos disputem absorção e transporte (Saenchai et al., 2016; Oliveira et al., 2023).

A relação entre Fe e Zn tem apresentado diferentes resultados na literatura. Di Gioia et al. (2019) constataram crescimento linear do teor foliar de Zn em microgreens de rúcula, repolho roxo e mostarda vermelha quando houve aumento de Fe na solução nutritiva, assim como, Buturi et al. (2022) encontrou resultado semelhante para alface em hidroponia. Entretanto, Przybysz et al. (2016) não observaram resposta para broto de brócolis e de feijão.

Mercês et al. (2022) encontraram resultados semelhantes ao presente estudo enquanto estudavam concentrações de Fe na solução nutritiva, em couve. Os mesmos autores constataram que o teor foliar de Zn diminuiu de 250,8 para 195,2 mg kg⁻¹, quando o Fe na solução nutritiva aumentou de 2 para 10 mg L⁻¹, representando redução de 22,16% do teor foliar de Zn.

O teor de ácido ascórbico (AA) foi influenciado pelas concentrações de Fe na solução nutritiva. Giordano et al. (2019) encontraram resultados semelhantes para alface vermelha, onde houve ajuste quadrático de equação, com incremento de cerca de quatro vezes. Para alface verde, os mesmos autores encontraram resultado linear crescente, com aumento de 62,7%, assim como os resultados encontrados por Buturi et al. (2022) que constataram incremento de 60% no teor de AA na alface romana.

O ácido ascórbico é o mais eficiente potencializador da absorção de Fe, podendo superar todos possíveis efeitos de inibidores de absorção de Fe na dieta (Abbaspour et al., 2014; Ems et al., 2022; Buturi 2022).

Assim, como o teor de ácido ascórbico aumentou com o incremento dos nutrientes, é possível afirmar que a biofortificação e biodisponibilidade são viáveis com estes tratamentos.

Mesmo o AA não apresentar efeito potencializador na absorção de Zn, a concentração de Zn na solução nutritiva influenciou positivamente no teor de AA, apresentando incremento de 23,2%, enquanto Guevara et al. (2021) não observaram

alteração do teor de AA quando realizada injeção de sulfato de Zn no pseudocaule de bananeiras. Entretanto, estudos que avaliem a concentração de Zn na produção de AA são escassos e devem ser investigados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo indicaram que a biofortificação de alface hidropônica, com Fe é viável, enquanto, o Zn não apresenta mesmo resultado.

A biofortificação simultânea com os dois nutrientes na mesma solução nutritiva não é praticável.

Para a qualidade da alface, apenas o Fe apresenta resultado positivo, enquanto o Zn é indiferente para tal parâmetro.

A biofortificação se mostrou incompatível para o crescimento e produção da cultura, visto que houve redução significativa para os mesmos.

7 REFERÊNCIAS

Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R (2014) Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences** 19: 164-174.

Alloway BJ (2008) **Zinc in Soils and Crop Nutrition**. Bruxelas: International Zinc Association. 139p.

Alloway BJ (2009) Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environmental Geochemical Health**. 31:537 – 548.

Alloway BJ (2009) Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environmental Geochemical Health**. 31:537 – 548.

Almeida HJ, Carmona VMV, Inocêncio MF, Furtini Neto AE, Cecilio Filho AB, Mauad M (2020) Soil Type and Zinc Doses in Agronomic Biofortification of Lettuce Genotypes. **Agronomy** 10:2-10.

Almeida HJ, Carmona VV, Dutra AF, Cecílio Filho AB (2022) Growth and physiological responses of cabbage cultivars biofortified with inorganic selenium fertilizers. **Scientia Horticulturae** 302:111154.

Alshaal T, El-Ramady H (2017) Foliar Application: from Plant Nutrition to Biofortification. **Environment, Biodiversity & Soil Security** 1:71-83.

Amoozgar A, Mohammadi A, Sabzalian MR (2017) Impact of light-emitting diode irradiation on the photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. **Photosynthetica** 55:1-11.

Anwaar AS, Ali S, Ishaque W, Farooq MA, Najeeb U, Abbas F, Sharif M (2015) Silicon (Si) alleviates cotton (*Gossypium hirsutum* L.) from zinc (Zn) toxicity stress by limiting Zn uptake and oxidative damage. **Environmental Science and Pollution Research** 22:3441-3450.

Audebert A (2006) Iron partitioning as a mechanism for Fe toxicity tolerance in lowland rice. In: Audebert, A., Narteh, L.T., Kiepe, P., Millar, D. & Beks, B. (Eds.) **Iron toxicity in rice-based systems in West Africa**. Cotonou: WARDA [Africa Rice Center], pp. 34–46.

Bahbah ET. et al. (2021) Molecular Mechanisms of Astaxanthin as a Potential Neurotherapeutic Agent. **Marine Drugs**. 19: 201.

Barbosa JC, Maldonado Júnior W (Eds) (2015) Experimentação Agronômica e Agroestat – Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 396p.

Barbosa GL, Gadelha FDA, Kublik N, Proctor A, Reichelm L, Weissinger E, Wohlleb GM, Halden RU (2015) Comparison of Land, Water, and Energy Requirements of Lettuce Grown Using Hydroponic vs. Conventional Agricultural Methods. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 12:6879-6891.

Beleggia R, Fragasso M, Miglietta F, Cattivelli L, Menga V, Nigro F, Pecchioni N, Fares C (2018) Mineral composition of durum wheat grain and pasta under increasing atmospheric CO₂ concentrations. **Food Chemistry**. 242:53–61.

Bhanja SN, Mukherjee A, Rodell M. (2018). Groundwater Storage Variations in India. In: Mukherjee A. (Ed) **Groundwater of South Asia**. Cingapura: Springer Hydrogeology, p. 49-59.

Bonasia A, Lazzizzera C, Elia A, Conversa G (2017) Nutritional, biophysical and physiological characteristics of wild rocket genotypes as affected by soilless cultivation system, salinity level of nutrient solution and growing period. **Frontiers in Plant Science**. 8:15.

Bouis HE, Welch RM (2010) Biofortification – A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. **Crop Science** 50: 20-32.

Bortolini GA, Fisberg M (2010) Orientação nutricional do paciente com deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 32: 105-113.

Briat JF, Dubos C, Gaymard F (2015) Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. **Trends in Plant Science** 20:33-40.

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F (2012) Function of nutrients: Micronutrients. In: Marschner P (Ed) **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Londres: Academic Press, p. 191-248.

Brown PH, Cakmak I, Zhang Q (1993) Forms and function of zinc in plants. In: Robson AD (Ed.) Zinc in Soils and Plants. Holanda: Springer. p. 93 – 106.

Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH (2002) Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: A meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition** 75: 1062-1071.

Burak M, Aydin T (2022) Iron biofortification of wheat grains by foliar application of nano zero-valent iron (nZVI) and other iron sources with urea. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 22: 4642-4652.

Buturi CV, Mauro RP, Fogliano V, Leonardi C, Giuffrida F (2021) Mineral Biofortification of Vegetables as a Tool to Improve Human Diet. **Foods** 10:1-23.

Buturi CV, Sabatino L, Mauro RP, Navarro-León E, Blasco B, Leonardi C, Giuffrida F (2022) Iron Biofortification of Greenhouse Soilless Lettuce: Na Effective Agronomic Tool to Improve the Dietary Mineral Intake. **Agronomy** 8:1793.

Camejo D, Frutos A, Mestre TC, Piñero MC, Rivero RM, Martínez V (2020) Artificial light impacts the physical and nutritional quality of lettuce plants. **Horticulture, Environment and biotechnology** 61:69-82.

Carducci B, Keats EC, Bhutta ZA (2021) Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 3.

Carmona VMV, Cecílio Filho AB, Almeida HJ, Grato PL (2019) Fortification and bioavailability of zinc in potato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 99:3525–3529.

Cecilio Filho AB, Cortez JWM, Sordi D, Urrestarazu M (2015) Common Chicory Performance as Influenced by Iron Concentration in the Nutrient Solution. **Journal of Plant Nutrition** 38:1489-1494.

Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME (2012) Zinc and human health: An update. **Archives of toxicology** 86:521-534.

Chen Z, Jahan MS, Mao P, Wang M, Liu X, Guo S (2021) Functional growth, photosynthesis and nutritional property analyses of lettuce grown under different temperature and light intensity. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 96:53-61.

Coria-Cayupán YS, Pinto, MALS, Nazareno MNA (2009). Variations in bioactive substance contents and crop yields of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in soils with different fertilization treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57:10122–10129.

Cushnie TPT, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 26: 343 – 356.

De Dorlodot S, Lutts S, Bertin P (2005) Effects of Ferrous Iron Toxicity on the Growth and Mineral Composition of an Interspecific Rice. **Journal of Plant Nutrition** 28:1-20.

Delias DS, Silva CJ, Martins AC, Oliveira DSC, Amarante L (2021) Iron toxicity increases oxidative stress and impairs mineral accumulation and leaf gas exchange in soybean during hypoxia. **Environmental Science and Pollution Research** 29:22427-22438.

Dwyer JH. Et al. (2001) Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis. **The Los Angeles Atherosclerosis Study**. 103: 2922 – 2927.

Ebbs S, Uchil S (2008) Cadmium and Zinc induced chlorosis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern) involves preferential loss of chlorophyll b. **Photosynthetica** 46:49-55.

Ems T, Lucia KS, Huecker MR (2022) Biochemistry, Iron Absorption. **StatPearls** 1:1-3.

Di Gioia F, Petropoulos SA, Ozores-Hampton M, Morgan K, Roskopf EM (2019) Zinc and Iron Agronomic Biofortification of Brassicaceae Microgreens. **Agronomy** 9:1-20.

Furlani PR, Silveira LCP, Bolonhesi D, Faquin V (1999) Cultivo Hidropônico de plantas. **Campinas: Instituto Agrônômico**, 30p (Documentos IAC, 180).

Gibson R (2012) Zinc deficiency and human health: Etiology, health consequences, and future solutions. **Plant and Soil** 361:291-299.

Giordano M, El-Nakhel C, Pannico A, Kyriacou MC, Stazi SR, De Pascale S, Rouphael Y (2019) Iron Biofortification of Red and Green Pigmented Lettuce in Closed Soilless Cultivation Impacts Crop Performance and Modulates Mineral and Bioactive Composition. **Agronomy** 9(6):290.

Gödecke T, Stein AJ, Qaim M (2018) The global burden of chronic and hidden hunger: Trend and determinants. **Global Food Security** 18:21-29.

Golubikna N, Kekina H, Caruso G (2018) Yield, Quality and Antioxidant Properties of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in Response to Foliar Biofortification with Selenium and Iodine. **Plants** 7:80

Graciano PD, Jacinto ACP, Silveira AJ, Castoldi R, Lima TM, Charlo HCO, Silva IG, Marin MV (2020) Agronomic biofortification with zinc in curly lettuce cultivars. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 15:1-9.

Guevara JEM, Sanches AG, Pedrosa VMD, Cruz MCP, Silva JAA, Teixeira GHA (2021) The injection of zinc sulfate into banana tree pseudostem can triple the zinc content and it is an effective method for fruit biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis** 102:104020.

Hacisalihoglu G (2020). Zinc (Zn): The Last Nutrient in the Alphabet and Shedding Light on Zn Efficiency for the Future of Crop Production under Suboptimal Zn. **Plants** 1471:1-9.

Havlin JL, Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD (2017) **Soil Fertility and Fertilizers**. Uttar Pradesh:Pearson. 529 p.

Hossain ME, Bezbaruah A (2021) Nano- and microscale for Fe fortification in *Spinacia oleracea*. **Nanotechnology for Environmental Engineering** 6(61):1-12.

Hurrell R, Egli I (2010) Iron bioavailability and dietary reference values. **American journal of Clinical Nutrition** 91:1461-1467.

Jones, J.D (2020) Iron Availability and Management Considerations: A 4R Approach. **Crops Soils**. 53: 32 – 37.

Jovani M, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ, Clemente G (2000) Effect of proteins, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. **Nahrung** 44:114-117.

Jucoski GO, Cambraia J, Ribeiro C, Oliveira JA (2016) Excess iron on growth and mineral composition in *Eugenia uniflora* L. **Ciência Agronômica** 47: 720-728.

Kabata-Pendias A (2010) **Trace elements in soils and plants**. CRC Press: Boca Raton. p. 548.

Kabir T, Uddin S, Jeandet P, Emran TB, Mitra S, Albadrani GM, Sayed AA, Abdel-Daim MM, Simal-Gandara J (2021) Anti-Alzheimer's Molecules Derived from Marine Life: Understanding Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. **Marine Drugs**. 19: 251.

Kachinski WD, Ávila FW, Reis AR, Muller MML, Mendes MC, Petranski PH (2022) Agronomic biofortification increases concentrations of zinc and storage proteins in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grains. **Food Research International** 155:1-11.

Katyál JC (1972) Study of Zinc Equilibria in Flooded Soils and Amelioration of Zinc Deficient Soils of Agusan del Norte. **International Rice Research Institute** 58: 3-4.

Kaya C, Higgs D (2001) Inter-relationship between zinc nutrition, growth parameters, and nutrient physiology in a hydroponically grown tomato cultivar. **Journal of Plant Nutrition** 24:1491-1503.

Kaya C, Akram NA, Ashraf M (2019) Influence of exogenously applied nitric oxide on strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants grown under iron deficiency and/or saline stress. **Physiologia Plantarum**. 165: 247 – 263.

Kim MJ, Moon Y, Tou JC, Mou B, Waterland NL (2016) Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**. 49:19–34.

Kirkby EA, Römheld V (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações Agronômicas** 118:12-15.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**. 113:71-88.

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

Krzepilko A, Zych-Wezyk I, Swiecilo A, Jolanta M, Skwarylo-Bednarz B (2016) Effect of iodine biofortification of lettuce seedlings on their mineral composition and biological quality. **Journal of Elementology** 21:1071-1080.

Kumar N, Goel N (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic application. **Biotechnology Reports**. 24: e00370.

Kumar N, Pruthi V, Goel N (2015) Structural, thermal and quantum chemical studies of p-coumaric and caffeic acids. **Journal of Molecular Structure**. 1085: 242-248.

Lafarga T, Villaró S, Rivera A, Bobo G, Aguiló-Aguayo I (2020) Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of fresh or minimally processed modern or traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. **Journal of Food Science and Technology**. 57:754 – 763.

La Frano MR, Moura FF, Boy E, Lönnnerdal B, Burri BJ (2014) Bioavailability of iron, zinc and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Reviews** 72:289-307.

Lambin EF, Meyfroidt P (2011) Global land use change, economic globalization, and the looming land scarcity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 108:3465–3472.

Lanquar V, Ramos MS, Levièvre, F, Barbier-Brygoo H, Krieger-Liszkay A, Kramer U, Thomine S (2010) Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency. **Plant Physiology**. 152:1986-1999.

Lata-Tenesaca LF, Prado RM, Piccolo MC, Silva DL, Silva JLF, Ajila-Celi GE (2022) Forms of application of silicon in quinoa and benefits involved in the association between productivity with grain biofortification. **Scientific Reports** 12, 12732.

Lata-Tenesaca LF, Prado RM, Ajila-Celi GE, Silva DL, Junior JSP, Mattiuz BH (2023) Iron biofortification in quinoa: Effect of iron application methods on nutritional quality, anti-nutrient composition, and grain productivity. **Food Chemistry** 404, 134573.

Lehman et al. (2015) Understanding and Enhancing Soil Biological Health: The Solution for Reversing Soil Degradation. **Sustainability**. 7:988-1027.

Levenson CW, Morris D (2011) Zinc and neurogenesis: Making new neurons from development to adulthood. **American Society of Nutrition** 2: 96-100.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148:350-382.

Lima FS, Nascimento CWA, Sousa CS (2015) Zinc fertilization as an alternative to increase the concentration of micronutrients in edible parts of vegetables. **Ciências Agrárias** 10:403-408.

Lima BM, Noboa CS, Lima FM, Mello SC, Purquerio LFV, Sala FC (2023) Agronomic biofortification with zinc in hydroponically cultivated lettuce. **Australian Journal of Crop Science**. 17:198-205.

Livingstone C (2015) Zinc: Physiology, deficiency, and parenteral nutrition. **Nutrition in Clinical Practice** 30: 371-382.

Loureiro MP, Cunha LR, Nastaro BT, Pereira KYS, Nepomoceno ML (2018) Biofortificação de alimentos: problema ou solução? **Segurança alimentar e nutricional** 25:66-84.

Lucena C, Romera FJ, Rojas CL, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. (2007) Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of strategy I plants. **Functional Plant Biology**. 34: 1002–1009

Mahawar L, Ramasamy KP, Pandey A, Prasad SM (2023) Iron deficiency in plants: an update on homeostasis and its regulation by nitric oxide and phytohormones. **Plant Growth Regulation**. 100: 283–299.

Majid M, Khan JN, Shah QMA (2021) Evaluation of hydroponic systems for the cultivation of Lettuce (*Lactuca sativa* L., var. Longifolia) and comparison with protected soil-based cultivation. **Agricultural Water Management**. 245:106572.

Majumder S, Datta K, Datta SK (2019) Rice biofortification: High iron, zinc, and Vitamin-A to fight against “hidden hunger”. **Agronomy** 9:1-22.

Mampholo BM, Maboko MM, Soundy P, Sivakumar D (2016). Phytochemicals and overall quality of leafy lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties grown in closed hydroponic system. **Journal of Food Quality** 39:805-815.

Malejane DN, Tinyani P, Soundy P, Sultanbawa Y, Sivakumar D (2018) Deficit irrigation improves phenolic content and antioxidant activity in leafy lettuce varieties. **Food Science and Nutrition**. 6:334–341.

Marschner P, Crowley D, Rengel Z (2011) Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry** 43:883-894.

Martinez-Ispizua E, Calatayud A, Marsal JI, Cannata C, Basile F, Abdelkhalik A, Soler S, Valcárcel JV, Martínez-Cuenca MR (2022) The Nutritional Quality Potential of Microgreens, Baby Leaves, and Adult Lettuce: An Underexploited Nutraceutical Source. **Foods**. 11: 423.

Mercês JKR, Medelo MJY, Cecílio Filho AB (2022) Biofortification and Quality of Collard Greens as a Function of Iron Concentration in Nutrient Solution. **Agronomy** 12: 2493.

Mohan VR, Tresina PS, Daffodil ED (2016) Antinutritional Factors in Legume Seeds: Characteristics and Determination. In: Caballero B. et al. (Eds). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, p. 211–220.

Monteiro HP, Winterbourn CC (1988) The superoxide – dependant transfer of iron from ferritin to transferrin and lactoferrin. **Biochemistry Journal** 256:923-928.

Miyazawa M, Pavan MA, Muraoka T, Carmo CAFS, Melo WJ (2009) Análises químicas de tecido vegetal. In: Silva FC (Ed.) **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília:Embrapa, p. 107-184.

Moghissi AA, Pei S, Liu Y (2016) Golden rice: scientific, regulatory and public information processes of a genetically modified organism. **Critical Reviews in Biotechnology**. 36:535–541.

Monika G, Kim SRM, Kumar PS, Gayathri KV, Rangasamy G, Saravanan A (2023) Biofortification: A long-term solution to improve global health- a review. (**Chemosphere**. 314: 137713.

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals: Occurrence and toxicity for plants: A review. **Environmental Chemistry Letters** 8: 199-216.

Nascimento CS, Nascimento CS, Lopes G, Carrasco G, Grato PL, Cecílio Filho AB (2018) Biofortified Rocket (*Eruca sativa*) with selenium by Using the Nutrient Film Technique. **Horticulturae** 8: 1088.

Naseem S, Ismail H (2022) In vitro and in vivo evaluations of antioxidative, anti-Alzheimer, antidiabetic and anticancer potentials of hydroponically and soil grown *Lactuca sativa*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. 22: 30.

Naveed M, Khalid H, Ayub MA, Rehman MZ, Rizwan M, Rasul A, Haq MA (2020) Biofortification of cereals with zinc and iron: Recent advances and future perspectives. In: Kumar RS, Meena RS, Jhariya MK (Eds.) **Resources Use Efficiency in Agriculture**. Singapura: Springer. p. 615-646.

Niyigaba E, Twizerimana A, Mugenzi I, Ngnadong WA, Ye YP, Wu BM, Hai JB (2019) Winter Wheat Grain Quality, Zinc and Iron Concentration Affected by a Combined Foliar Spray of Zinc and Iron Fertilizers. **Agronomy** 9:1-18.

Noulas C, Tziouvalekas M, Karyotis T (2018) Zinc in soils, water and food crops. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 49: 252 – 260.

Olivares M, Castro C, Pizarro F, Romaña DL (2013) Effect of Increasing Levels of Zinc Fortificant on the Iron Absorption of Bread Co-Fortified with Iron and Zinc Consumed with a Black Tea. **Biological Trace Element Research** 154: 321-325.

Oliveira NT, Namorato FA, Rao S, Cardoso AAS, Rezende PM, Guilherme LRG, Liu J, Li L (2023) Iron counteracts zinc-induced toxicity in soybeans. **Plant Physiology and Biochemistry** 194: 335-344.

Orsini F, Kahane R, Nono-Womdim R, Gianquinto G (2013) Urban agriculture in the developing world: A review. **Agronomy for Sustainable Development**. 33: 695 – 720

Ota E, Mori R, Middleton P, Tobe-Gai R, Mahomed K, Miyazaki C, Bhutta ZA (2015) Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 2.

Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2:270–278.

Peña-Olmos, J.E., Casierra-Posada, F. & Olmos-Cubides, M.A. (2014) The effect of high Fe doses (Fe^{2+}) on the growth of broccoli plants (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Agronomía Colombiana**. 32: 22–28.

Pereira PRG, Puiatti M, Fontes PR (2019) Cultura da Alface. In: Fontes PCR, Nick C (Eds.) **Olericultura: Teoria e Prática**. Viçosa:UFV, p. 385-406.

Petropoulos SA, Chatzieustratiou E, Constantopoulou E, Kapotis G (2016) Yield and Quality of Lettuce and Rocket Grown in Floating Culture System. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. 44:603–612.

Petropoulos S, Di Gioia F, Ntatsi G (2017) Vegetable Organosulfur Compounds and their Health Promoting Effects. **Current Pharmaceutical Design**. 23: 2850–2875.

Przybyzys A, Wrochna M, Malecka-Przybysz M, Gawronska H, Gawronski SW (2016) Vegetable sprouts enriched with iron: Effects on yield, ROS generation and antioxidative system. **Scientia Horticulturae**. 2013: 110-117.

Ramírez-Cárdenas L, Leonel AJ, Costa NMB (2008) Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 28; 200-213.

Raviv M, Lieth JH (2007) Significance of Soilless Culture in Agriculture. In Raviv M, Lieth JH (Eds.) **Soilless Culture Theory and Practice**. Elsevier: Amsterdam, p. 1–11.

Rengel Z, Batten GD, Crowley DE (1999) Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. **Field Crops Research** 60:27-40.

Rokkaku T, Kimura R, Ishikawa C, Yasumoto T, Senba M, Kanaya F, Mori N (2013) Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. **International Journal of Oncology**.

Roosta HR, Estaji A, Niknam F (2017) Effect of iron, zinc and manganese shortage induced change on photosynthetic pigments, some osmoregulators and chlorophyll fluorescence parameters in lettuce. **Photosynthetica** 55:1-10.

Rouphael Y, Colla G, Battistelli A, moscatello S, Poietti S, Rea E (2004) Yield, water requirement, nutrient uptake and fruit quality of zucchini squash grown in soil and closed soilless culture. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. 79:723-730.

Rouphael Y, Kyriacou MC (2018) Enhancing Quality of Fresh Vegetables Through Salinity Eustress and Biofortification Applications Facilitated by Soilless Cultivation. **Frontiers in Plant Science** 9: 1254.

Ruel-Bergeron JC, Stevens GA, Sugimoto JD, Roos FF, Ezzati M, Black RE, Kraemer K (2015) Global Update and Trends of Hidden Hunger, 1995-2011: The hidden Hunger Index. **PLoS ONE** 10:1-13.

Rugeles-Reyes SM, Cecílio Filho AB, Aguilar MAL, Silva PHS (2019) Foliar application of zinc in the agronomic biofortification of arugula. **Food Science and Technology** 39:1011–1017.

Saenchai C, Bouain N, Kisko M, Prom-U-Thai C, Doumas P, Rouached H (2016) The involvement of OsPHO1;1 in the regulation of iron transport through integration of phosphate and zinc deficiency signaling. **Frontiers in Plant Science** 7:396

Sahin O (2020) Combined biofortification of soilless grown lettuce with iodine, selenium and zinc and its effect on essential and non-essential elemental composition. **Journal of Plant Nutrition** 44:676-678.

Sambo P. et al. (2019) Hydroponic solutions for Soilless Production systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. **Frontiers in Plant Science** 10: 923.

Santiago FEM, Silva MLS, Cardoso AAS, Duan Y, Guilher LRG, Liu J, Li L (2020) Biochemical basis of differential selenium tolerance in arugula (*Eruca sativa* Mill.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology and Biochemistry** 157:328-338.

Singh B, Natesan SKA, Singh BK, Usha K (2005) Improving zinc efficiency of cereals under zinc deficiency. **Current Science** 88:36-44.

Singh B, Goutam U, Kukreja S, Siddappa S, Sood S, Sharma J, Bhardwaj V (2022) Biofortification Strategies to Improve Iron Concentrations in Potato Tubers: Lessons and Future Opportunities. **Potato Research** 65:51-54.

Smolen S, Kowalska I, Kovacik P, Halka M, Sady W (2019) Biofortification of Six Varieties of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) With Iodine and Selenium in Combination With the Application of Salicylic Acid. **Frontiers in Plant Science** 10:143.

Soetan KO, Olaiya CO, Oyewole OE (2010) The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants – A review. **African Journal of Food Science**. 4:200-222.

Strohecker RL, Henning HM (1967). **Analisis de Vitaminas: Metodos Comprobados**. Paz Montalvo, Madrid.

Taiz L. et al. (2017) Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. Porto Alegre:Artmed. 888 p.

Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB (2008) Flavonoids and Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 7:1089 – 1099.

Tewari RK, Kumar P, Sharma PN (2008) Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science** 171:286–294.

Trani PE, Raij B, Cantarella H, Figueiredo GJB (2018) Composição química e diagnose foliar In: Trani PE, Raij B, Cantarella H, Figueiredo GJB (Eds) Hortaliças: Recomendações de calagem e adubação para o estado de São Paulo. Campinas:CATI. p. 8-13.

Tomasi N, Pinton R, Dalla Costa L, Cortella G, Terzano R, Mimmo T, Scampicchio M, Cesco S (2014) New “solutions” for floating cultivation system of ready-to-eat salad: A review. **Trends in Food Science. Technology**. 46: 267–276.

Tzortzakis N, Nicola S, Savvas D, Voogt W (2020) Editorial: Soiless Cultivarion Through an Intensive Crop Production Scheme. Management Strategies, Challenges and Future Directions. **Frontiers in Plant Science** 11: 363.

Van der Straeten D et al. (2020) Multiplying the efficiency and impact of biofortification through metabolic engineering. **Nature Communications**. 11:1-10.

Vieira RV, Ferreira APG, Martins GA (2022) Hortaliças Folhosas. In: Oliveira ML (Ed.) **Anuário HF 2022**. Uberlândia:Campo&Negócios, p. 58-61.

Wang MM, Xu ZG, Song JH, Liu XY, Jiao XL (2018) Effects of different mowing treatments and stuble heights on the compensatory growth and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) **Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 93:537-544.

Wiesner-Reinhold M, Schreiner M, Baldermann S, Schwarz D, Hanschen FS, Kipp AP, Rowan DD, Bentley-Hewitt KL, Mckenzie MJ (2017) Mechanisms of selenium enrichment and measurement in brassicaceous vegetables, and their application to human health. **Frontiers in Plant Science** 8, 1365.

Winkel L, Vriens B, Jones G, Schneider L, Pilon-Smits E, Bañuelos G (2015) Selenium Cycling across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. **Nutrients** 7: 4199.

Wishart K (2017) Increased Micronutrient Requirements during Physiologically Demanding Situations: Review of the Current Evidence. **Vitamins & Minerals** 6: 1000166.

Yan Z, he D, Niu G, Zhai H (2019) Evaluation of growth and quality of hydroponic lettuce at harvest as affected by the light intensity, photoperiod and light quality at seedling stage. **Scientia Horticulturae** 248:138-144.

Yao B, Fang H, Xu W, Yan Y, Xu H, Liu Y, Mo M, Zhang H, Zhao Y (2014) Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose-response analysis of prospective studies. **European Journal of Epidemiology**. 29:79-88.

Younas N, Fatima I, Ahmad IA, Ayyaz MK (2022) Alleviation of zinc deficiency in plants and humans through an effective technique; biofortification: A detailed review. **Acta Ecologica Sinica**.

Zahra N, Hafeez MB, Shaukat K, Wahid A, Hasanuzzaman M (2021) Fe toxicity in plants: Impacts and remediation. **Physiologia Plantarum**. 173: 201-222.

Zhao AQ, Bao QL, Tian XH, Lu XC, William JG (2011) Combined effect of iron and zinc on micronutrient levels in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Environmental Biology**. 32: 235-239.

Zhang YY, Stockmann R, NG K, Ajlouni S (2020) Opportunities for plant-derived enhancers for iron, zinc, and calcium bioavailability: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 20:652-685.

Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM (2019). The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry** 195:120-129.