

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

ANNE CAROLINE DA ROCHA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA E ACÚMULO DE SELÊNIO NA
CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) POR PARÂMETROS QUÍMICOS
E MICROBIOLÓGICOS DE SOLOS DA REGIÃO AMAZÔNICA UTILIZANDO UM
PROGRAMA DE PARTICIPAÇÃO DE COMUNIDADE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANNE CAROLINE DA ROCHA SILVA
Engenheira Agrônoma

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA E ACÚMULO DE SELÊNIO NA
CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) POR PARÂMETROS QUÍMICOS
E MICROBIOLÓGICOS DE SOLOS DA REGIÃO AMAZÔNICA UTILIZANDO UM
PROGRAMA DE PARTICIPAÇÃO DE COMUNIDADE**

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Especialidade
Sistemas de Produção

André Rodrigues dos Reis
Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S586c Silva, Anne Caroline da Rocha.
Caracterização da variação genotípica e acúmulo de selênio na castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) por parâmetros químicos e microbiológicos de solos da região amazônica utilizando um programa de participação de comunidade / Anne Caroline da Rocha Silva. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
124 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2021

Orientador: André Rodrigues dos Reis
Inclui bibliografia

1. *Bertholletia excelsa* L. 2. Bactéria redutora. 3. Selênio. 4. Floresta amazônica.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Setor
Setor Técnico de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CDD2 - 999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA E ACÚMULO DE SELÊNIO NA CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) POR PARÂMETROS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DOS SOLOS DA REGIÃO AMAZÔNICA UTILIZANDO UM PROGRAMA DE PARTICIPAÇÃO DE COMUNIDADE

AUTORA: ANNE CAROLINE DA ROCHA SILVA

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

COORIENTADOR: EDSON LAZARINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in black ink, reading "André Rodrigues dos Reis".

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia de Tupã - UNESP

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. MARCO EUSTAQUIO DE SA (Participação Virtual)
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Dr. FERNANDO SHINTATE GALINDO (Participação Virtual)
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. FERNANDO FERRARI PUTTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia de Tupã - UNESP

Ilha Solteira, 26 de agosto de 2021

DEDICATÓRIA

A Deus a quem dou toda honra e toda glória por tudo o que tenho e tudo o que sou.

Aos meus pais e a meus irmãos por serem à base inabalável que me sustenta todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Joel Severio e Cleuza Rocha, e meu irmão Bruno, minhas irmãs Gabriela e Bruna e à minha tia Eliane Rocha pelo amor, dedicação.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, campus de Ilha Solteira – SP juntamente com o Departamento Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia pela oportunidade de estudos, ensinamentos e experiências que tive nesses 4 anos.

Ao Professor. Dr. André Rodrigues dos Reis, com quem muito aprendi, pela orientação e pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Professor Dr Martin Broadley pelos ensinamentos, competência, dedicação, amizade, grande exemplo de profissional durante meu doutorado sanduíche na University of Nottingham.

À Fazenda Aruanã, Sr. Sérgio Vergueiro, Ana Vergueiro e a todos da Fazenda Aruanã por todo suporte durante os meses que estive na fazenda realizando as coletas das amostras.

Aos meus amigos, que foram mais que irmãos Emanuele Amendola, Loana Dantas Krug, Regiane Carvalho, Vanessa Biazotto, Kelly Fox, Lenise Castilho Monteiro, Nubia Karen Goulart Mendes, Doris Ferreira Moriyama, Vinicius Carvalho, Polyanna Ribeiro, Vinicius Silva, Geraldo Gouvea, Priscilla Guerra Souza, Samara Vicentini, Thomas Alcock e Yara Barros que me ajudaram a superar problemas pessoais que me deram todo o apoio para terminar esta etapa da minha vida e que direta ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho e com os quais tive o privilégio de conviver, trocando experiências acadêmico-profissionais e, principalmente, usufruindo o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A Prof. Dra. Tsai Siu Mui, Prof. Hudson Wallace Pereira de Carvalho, Prof. Dr. Fernando Andreoti, Prof Dr. José Lavres Junior por cederem seus laboratórios para a realização das análises das amostras, aos técnicos de cada laboratório por toda a ajuda, paciência, ensino e amizade.

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

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e
da Sua boca vem à inteligência e o
conhecimento.”
Provérbios 2:6

RESUMO

A amêndoa da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é reconhecida como o alimento mais rico em selênio (Se) no mundo, sendo considerado um elemento-traço que apresenta propriedades essenciais ou tóxicas ao ser humano e aos animais dependendo da faixa de concentração no alimento ingerido. A recomendação de ingestão diária de Se para humanos é na faixa de 50 a 70 µg por dia. A deficiência ou toxidez de Se nos solos reflete no teor do elemento presente nos alimentos que são cultivados nestas regiões. Isso tem gerado interesse nos estudos de biogeoquímica deste elemento. O presente estudo buscou caracterizar os teores de Se na castanha-do-brasil em solos da região Amazônica e suas relações com a disponibilidade de Se e possíveis bactérias redutoras de Se do solo. As amostras de solo e amêndoas foram coletadas em ambiente natural de produção e em cultivos estabelecidos em diferentes regiões da bacia Amazônica. Foi realizado um mapeamento de novas áreas produtoras de castanhas bem como a caracterização química e biológica do solo das áreas dos novos castanhais comerciais. O DNA de microrganismos do solo foi extraído para caracterização e seleção de bactérias redutoras de Se. Pela análise filogenética dessas bactérias, foi obtida a classificação das comunidades de bactérias do gênero *Bacillus* presentes na rizosferas da castanheira com capacidade de reduzir selenato e selenito. Após a caracterização microbiológica, foram realizadas as análises de teores de Se total e disponível no solo, análises de bioacessibilidade e especiação de Se na castanha-do-brasil em ICP-MS na Universit of Nottingham, Nottingham – UK.

Palavras-chave: *Bertholletia excelsa* L.; bactéria; acúmulo de selênio; floresta amazônica.

ABSTRACT

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) are recognized as the richest food in selenium (Se), a trace element that has essential or toxic properties depending on the concentration range in the food ingested. The recommended daily Se intake for humans is in the range of 50 to 70 µg per day. Deficiency or toxicity of Se in soils is reflected in the content of the element present in foods that are grown in these regions. This has generated interest in biogeochemical studies of this element. The present study sought to better understand and characterize the Se content in Brazil nuts and in soils from the Amazon region and its relationship with the availability of Se and possible Se-reducing bacteria in the soil. Soil and almond samples were collected in a natural production environment and in crops established in different regions of the Amazon basin. The Aruanã farm distributes nut seedlings free of charge to small producers. A mapping of new nut producing areas was carried out, as well as the chemical and biological characterization of the soil in the areas of new commercial nut groves. DNA from soil microorganisms was extracted for characterization and selection of Se-reducing bacteria. The phylogenetic analysis of these bacteria was used to classify the bacterial communities present in the rhizosphere of Brazil nut trees. After microbiological characterization, analyzes of total and available Se content in soil, bioaccessibility and Se speciation analyzes in Brazil nuts were carried out in ICP-MS at the Universit of Nottingham, Nottingham - UK.

Keywords: *Bertholletia excelsa* L.; bacteria; selenium accumulation; Amazon rainforest.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	- Distribuição da castanheira-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da Bacia Amazônica.....	23
-----------------	--	----

Capítulo 2

Figura 1	- Localização geográfica do município de Itacoatiara, Amazonas....	44
Figura 2	- Idade e escolaridade dos produtores entrevistados.....	47
Figura 3	- Tempo de trabalho (anos) e relação com a terra.....	47
Figura 4	- Correlação entres fatores estudados (Heatmap)	48
Figura 5	- Tempo de atuação na produção de castanhas e expectativa temporal de colheita.....	49
Figura 6	- Tamanho da propriedade e número de árvores/ área.....	49
Figura 7	- Quantidade de árvores/ fazenda (propriedade).....	50
Figura 8	- Quantidade de sacas colhidas por ano/ % produtores que já está colhendo.....	50
Figura 9	- Motivação e benefícios quanto ao cultivo de castanha.....	51
Figura 10	- Produtor beneficiado por política pública.....	51
Figura 11	- Consumo de castanhas.....	52
Figura 12	- Uso de técnicas de enxertia e de insumos na produção.....	52
Figura 13	- Características do solo da fazenda.....	53
Figura 14	- Espaçamento entre linhas e entre plantas (metros).....	53
Figura 15	- Agentes compradores da castanha.....	54
Figura 16	- Expectativas de vendas das castanhas do Brasil em relação a.....	54
Figura 17	- Existência de atributos de qualidade estipuladas pelo agente comprador da castanha.....	55
Figura 18	- Ampliação de nível de confiança e melhoria social após a interação com a Fazenda Aruanã e produção de castanhas.....	55
Figura 19	- Perfil dos funcionários da Fazenda Aruanã entrevistados.....	56
Figura 20	- Familiares envolvidos na atividade de produção de castanha.....	56
Figura 21	- Consumo de castanhas.....	57

Capítulo 3

- Figura 1** - Concentração de Selênio em folhas (A), caule (B) e raízes (C) mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p\leq 0.05$)...... 79
- Figura 2** - Taxas de peroxidação lipídica estimadas pela concentração de MDA (A), e concentração de H_2O_2 (B) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p\leq 0.05$)...... 81
- Figura 3** - Atividade específica da superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p\leq 0.05$)...... 82
- Figura 4** - Concentração de nitrato (A), amônia (B) e aminoácidos (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais 84

indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$), ns= não significativo.....

- Figura 5** - Concentração de açúcar total (A) e sacarose (B) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n = 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$), ns = não significativo..... 85
- Figura 6** - Concentração de clorofila total (A), carotenóides (B) e feofitina total (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n = 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$)..... 86
- Figura 7** - Heatmap apresentando a correlação de Pearson entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de mudas de castanha do Brasil em resposta a aplicação de diferentes concentrações de Se nas fontes selenato ou selenito. * indica correlação significativa ($p \leq 0.05$)..... 88

Capítulo 4

- Figura 1** - Coloração de Gram de linhagens de *Bacillus* após o cultivo em meio LB + selenito. (A) colônia 1; (B) colônia 2; (C) colônia 3; (D) colônia 4..... 109
- Figura 2** - Isolados de *Bacillus* em meio LB + selenato (A) e LB + selenito 109

	(B).....	
Figura 3	- A partir da dose de 200mM não houve crescimento visível das colônias, enquanto os demais tubos apresentavam turbidez, as doses 200mM e 2M permaneceram translúcidos, somente para selenito. Para selenato, somente a dose 2M não apresentou crescimento aparente das colônias.....	110
Figura 4	- Efeito de diferentes concentrações de selenato e selenito no crescimento de isolados de bactérias de um solo contendo altas concentrações de Se. Médias e desvio padrão de 3 repetições. O crescimento foi estimado medindo a absorção das culturas a 600nm.....	112
Figura 5	Curva de crescimento de bactérias isoladas de um solo com alta concentração de selenio. (a) selenato; (b) selenito. Médias e desvio padrão de três repetições.....	113
Figura 6	Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 1 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).....	114
Figura 7	Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 2 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).....	115
Figura 8	Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 3 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).....	116
Figura 9	Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 4 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).....	117
Figura 10	Eletroforese resultante da PCR.....	118
Figura 11	Relações filogenéticas entre as cepas do presente trabalho e o <i>Bacillus</i> mais restritamente relacionado. O dendrograma foi gerado usando o programa MEGA 4.0.....	118

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.	- Teores totais de Se em alguns solos do Brasil.....	28
------------------	--	----

Capítulo 4

Tabela 1.	- Análise químicas e físicas de solo.....	105
------------------	---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcento
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual a
°C	Grau Celsius
µg	Micro grama
µL	Micro litro
µmol	Micromol
Abs	Absorbância
AIA	Ácido indo-3-acético
Al	Aluminio
AM	Amazonas
APX	Ascorbato peroxidase
B	Boro
BSA	Albumina de soro bovino
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CAT	Catalase
cm	centímetro
CTC	Capacidade de troca catiônica
Cu	Cobre
DAP	Diâmetro na altura do peito
dm ⁻³	Decímetro cúbico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Eh	Potencial redox
Fe	Ferro
FW	Fresh weight
g	Grama
GR	Glutathione redutase
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ha ⁻¹	Hectare
I	Iodo
IDAM	Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas
K	Potássio
KCN	Cianeto de potássio
kg ⁻¹	Quilograma
m	metro
M	Mol
MBC	Minimum bactericidal concentration
MCW	Metanol, clorofórmio e água
MDA	Malondialdeído
Met	Metionina
MeSeCys	Metilselenocisteína

mg	miligrama
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgO	Óxido de magnésio
MIC	Minimum inhibitory concentration
ml	mililitro
mm	milímetros
mM	Milimol
Mn	Manganês
MO	Matéria orgânica
ns	not significant
N	Nitrogênio
NAOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ SeO ₃	Selenito de sódio
Na ₂ SeO ₄	Selenato de sódio
NBT	Nitroblue tetrazolium
NH ₃	Amônia
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NO ₃	Nitrato
P	Fósforo
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotações por minute
s	segundo
S	Enxofre
Se	Selênio
Se ⁰	Selênio elementar
Se ²	Seleneto
Se-Cis	Selenocisteína
Se-Met	Selenometionina
SeO ₃ ²⁻	Selenito
SeO ₄ ²⁻	Selenato
Si	Silício
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidade
V%	Saturação de base
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
1.1	INTRODUÇÃO.....	19
1.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.2.1	Introdução.....	21
1.2.2	Castanha -do-brasil.....	23
1.2.3	Selênio no solo.....	25
1.2.4	Selênio na castanha-do-brasil.....	29
1.2.5	Bactérias Se-redutoras.....	31
	REFERÊNCIAS.....	33
2	PERFIL SOCIOECONÔMICO E PROFISSIONAL DE PRODUTORES DE CASTANHA-DO-BRASIL NA REGIÃO DE ITACOATIARA-AM.....	42
	RESUMO.....	42
	ABSTRACT.....	42
2.1	INTRODUÇÃO.....	43
2.2	METODOLOGIA.....	44
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERENCIAS.....	57
2.5	ANEXO I.....	60
3	APLICAÇÕES EXÓGENAS DE SELÊNIO (Se) AUMENTAM AS CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO EM RAÍZES E CAULES DE MUDAS DE CASTANHA DO BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i>) AO CUSTO DO EESTRESSEE OXIDATIVO DA PLANTA EM ALTAS TAXAS DE APLICAÇÃO.....	69
	RESUMO.....	69
	ABSTRACT.....	69
3.1	INTRODUÇÃO.....	70
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.2.1	Material vegetal e desenho experimental.....	72

3.2.2	Análise da concentração de Se.....	73
3.2.3	Análise do estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes.....	73
3.2.4	Peróxido de hidrogênio.....	74
3.2.5	Peroxidação lipídica.....	74
3.2.6	Atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1)	75
3.2.7	Atividade da Catalase (CAT, 1.11.1.6)	75
3.2.8	Atividade da Ascorbato peroxidase (APX, EC:1.11.1.11)	75
3.2.9	Proteínas solúveis.....	76
3.2.10	Açúcar total e sacarose.....	76
3.2.11	Compostos nitrogenados (nitrato, amônia e aminoácidos).....	77
3.2.12	Pigmentos fotossintéticos.....	78
3.2.13	Análise estatística.....	78
3.3	RESULTADOS.....	78
3.3.1	Análise de Selênio.....	78
3.3.2	Resposta do metabolismo antioxidante.....	80
3.3.3	Quantificação dos compostos nitrogenados.....	83
3.3.4	Fotoassimilados e pigmentos fotossintéticos.....	84
3.4	DISCUSSÃO.....	87
3.4.1	Análise de Selênio.....	87
3.4.2	Resposta do metabolismo antioxidante.....	89
3.4.3	Quantificação dos compostos nitrogenados.....	91
3.4.4	Fotoassimilados e pigmentos fotossintéticos.....	92
3.5	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	93
4	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLOS DA AMAZÔNIA TOLERANTES A ALTA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO.....	101
	RESUMO.....	101
	ABSTRACT.....	102
4.1	INTRODUÇÃO.....	102
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	104
4.2.1	Isolamento e triagem de cepas resistentes a selênio.....	104
4.2.2	Medição da taxa de crescimento das colônias e efeito tóxico de Se(VI) e Se(IV).....	106

4.2.3	Determinação da Concentração inibitória mínima (MIC).....	106
4.2.4	Caracterização dos isolados selecionados.....	107
4.2.5	Caracterização molecular.....	108
4.2.6	Análise estatística.....	108
4.3	RESULTADOS.....	108
4.4	DISCUSSÃO.....	118
4.5	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	120

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K), amplamente distribuída em toda a região Amazônica, possui grande importância social, ecológica e econômica para a região, onde milhares de famílias e produtores rurais utilizam sua semente como fonte de renda e alimento (WADT; KAINER, 2012). Por isso tem sido incentivado o plantio de castanhas-do-brasil, reincorporando as áreas degradadas ao processo produtivo, uma vez que é o segundo produto florestal não madeireiro de maior relevância comercial, ficando atrás apenas do fruto do açaí (*Euterpe* spp.) (PACHECO; SCUSSEL, 2007; IBGE, 2010).

Reconhecida como principal fonte de selênio (Se) para a dieta humana e animal, a castanheira-do-brasil tem sido objeto de muitos estudos, devido à grande variabilidade no teor desse elemento em suas castanhas, sendo reportados valores de até 512 mg Se kg⁻¹ em suas amêndoas (FREITAS *et al.*, 2004; DUMONT *et al.*, 2006). Segundo Kabata-Pendias e Mukherjee (2007) o Se possui importante papel na saúde animal, humana e em outros organismos, como bactérias e algas. Dentre os efeitos benéficos do selênio, Yang (2009) cita as atividades antioxidante e antiproliferativa, podendo prevenir câncer de próstata, fígado e pulmões, estimula o sistema imunológico, protege contra doenças do coração, entre outros.

Segundo Clement (1993) os altos teores de Se encontrados na castanheira-do-brasil ocorrem devido à similaridade desse elemento com o enxofre (S) associado as baixas concentrações de S nos solos da região Amazônica. Graças a essa similaridade, as plantas absorvem e metabolizam o Se na forma de selenato (SeO₄²⁻) utilizando os mesmos transportadores de S através do mesmo sítio de absorção (PILON-SMITS; QUINN, 2010). Para a forma de selenito (SeO₃²⁻), a absorção e metabolização do Se ocorre via transportadores de fosfato (LI; MCGRATH; ZHAO 2008; ZHU *et al.*, 2009).

O Se é um elemento traço, com função oxidante, associado à selenoproteínas que protegem contra a oxidação no organismo. Os teores naturais de Se nos solos podem variar de 0,05 a 1,50 mg kg⁻¹, onde os valores mais baixos são encontrados em florestas típicas em solos podzólicos e os maiores em organossolos.

Nos solos o Se é encontrado principalmente nas formas inorgânicas, como o selênio elementar (Se^0) seleneto (Se^{2-}), selenito (IV), selenato (VI); e orgânicas, como selenometionina (Se-Met) e selenocisteína (Se-Cis) (YUAN *et al.*, 2012).

Alguns fatores controlam a disponibilidade de Se para plantas e animais tais como os diferentes tipos de solos, geologia, condições redox, quantidade de matéria orgânica, pH do solo, presença de íons como o sulfato e o fosfato, textura do solo, atividade microbiana, etc. (FORDYCE *et al.*, 2010).

Existe, entretanto, uma preocupação por parte dos pesquisadores quanto à sua toxicidade e deficiência, pois a diferença entre a ingestão recomendada e a que produz toxidez é pequena (FREITAS *et al.*, 2010). A deficiência de Se atinge aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo, sendo associado problemas de saúde com a baixa ingestão desse elemento, como hipotireoidismo, doenças cardiomiopata (doença de Keshan), osteoartrite deformante (doença de Kashin-Beck) (WHITE; BROADLEY, 2009; RAYMAN, 2012).

Pesquisas vêm sendo realizadas a fim de determinar os teores de Se na castanha-do-brasil. Chang *et al.* (1995) avaliando os valores totais de Se em amêndoas de castanha-do-brasil em duas diferentes regiões do Brasil (Acre-Rondônia e Manaus-Belém) verificaram valores médios de 0,03-31,7 e 1,25-512 mg kg^{-1} , para cada região, respectivamente. Isso se deve provavelmente as diferentes concentrações de Se nestes solos ou a diferença na eficiência de absorção de Se pelas diferentes cultivares amostradas. A biodisponibilidade, determinada por parâmetros bio-físico-químicos, juntamente com a geologia subjacente são os principais fatores de controle da concentração de Se nos solos (FORDYCE, 2013).

Comunidades de microrganismos endofíticos e os presentes na rizosfera são fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas, agindo por mecanismos diretos ou indiretos (GLICK, 2012; JHA *et al.*, 2013). Eles são responsáveis pelo aumento da aquisição ou biodisponibilidade de nutrientes, incluindo a fixação biológica de nitrogênio; repressão de patógenos presentes no solo; aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos; e produção de fitohormônios como o AIA (ácido indo-3-acético) (GUPTA; GOPAL; TILAK *et al.*, 2000).

Microrganismos endofíticos Se-hiperacumuladores podem ser caracterizados por possuir resistência a Se, capacidade de produzir Se elementar e propriedades de promoção do crescimento das plantas em solos seleníferos (SURA-

DE JONG *et al.*, 2015). Altos níveis de Se em plantas hiperacumuladores podem afetar a fauna microbiana das áreas seleníferas. Material orgânico com elevados teores de Se (550 mg kg⁻¹ de matéria seca) foi decomposto mais rapidamente do que aquele que possuía baixos níveis de Se, o que sugere a presença de uma comunidade microbiana Se-resistente (QUINN *et al.*, 2011).

Sura-de Jong *et al.* (2015) avaliando a diversidade bacteriana endofítica de uma área selenífera, coletaram o solo próximo a rizosfera de duas espécies Se-hiperacumuladoras (*Stanleya pinnata* (Brassicaceae) e *Astragalus bisulcatus* (Fabaceae)) e duas não acumuladoras (*Physaria bellii* (Brassicaceae) e *Medicago sativa* (Fabaceae)), concluíram que ambos os solos possuíam a mesma comunidade bacteriana. As espécies de microrganismos incluíam *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Advenella*, *Arthrobacter*, e *Variovorax*, sendo que a maioria podia reduzir selenato a selenito, e selenito a Se elementar.

O presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar o teor de Se em amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de diferentes regiões da bacia Amazônica, 2) determinar o teor total e disponível de Se nos solos e observar o comportamento do Se com relação às variações regionais e locais, 3) determinar se há uma correlação entre o teor total de Se presente nas amêndoas e as concentrações de Se total e biodisponível nos solos da Amazônia, 4) extrair e identificar possíveis bactérias redutoras de Se nos solos da Amazônia.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Introdução

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K), amplamente distribuída em toda a região Amazônica (Roraima, Rondônia, Acre, Amazonas, Pará e norte dos estados de Goiás e Mato Grosso), possui grande importância econômica para as comunidades locais, sendo o segundo produto florestal não madeireiro de maior relevância comercial, ficando atrás apenas do fruto do açaí (*Euterpe* spp.) (PACHECO; SCUSSEL, 2007; IBGE, 2010).

Considerada uma das espécies de maior relevância na exploração extrativista, a castanheira-do-brasil possui sementes com elevado valor comercial e nutricional, sendo seus frutos utilizados na fabricação de artesanatos e sua madeira, apesar de seu corte ser proibido, empregada na construção naval e civil (LORENZI, 2002).

1 A castanheira-do-brasil pode ser encontrada em regiões de baixa fertilidade
2 do solo, bem estruturados e drenados, argilosos ou argilo-arenosos, ocorrendo com
3 maior frequência e solos de textura média a argilosa. Adaptada a regiões de clima
4 quente e úmido, ocorre em áreas com precipitação média de 1400 a 2800 mm ano⁻¹,
5 com déficit hídrico por 2 a 5 meses (CLEMENT, 1993).

6 Suas amêndoas têm despertado grande interesse por parte dos
7 pesquisadores devido a sua grande capacidade em acumular selênio (Se), sendo já
8 reportados valores de até 512 mg Se kg⁻¹ em suas amêndoas (CHANG *et al.*, 1995;
9 DUMONT *et al.*, 2006).

10 Segundo Kabata-Pendias e Mukherjee (2007) o Se possui importante papel
11 tanto na saúde animal, humana e em outros organismos como bactérias e algas. É
12 um elemento traço, com função oxidante e está associado à selenoproteínas que
13 protegem contra a oxidação no organismo. Existe, entretanto, uma preocupação por
14 parte dos pesquisadores quanto à sua toxicidade e deficiência, pois a diferença
15 entre a ingestão recomendada e a que produz toxidez é pequena (FREITAS *et al.*,
16 2010). A deficiência de Se atinge aproximadamente um bilhão de pessoas no
17 mundo, sendo associado problemas de saúde com a baixa ingestão dietética desse
18 elemento, atingindo aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo (COMBS,
19 2001; WHITE; BROADLEY, 2009).

20 A biodisponibilidade, determinada por parâmetros bio-físico-químicos,
21 juntamente com a geologia subjacente são os principais fatores de controle da
22 concentração de Se nos solos (FORDYCE, 2013). Alguns trabalhos demonstraram
23 que os níveis de Se no sangue humano está diretamente relacionado com o
24 conteúdo de Se nos alimentos, que por sua vez está altamente correlacionado com
25 a concentração, distribuição na fase sólida do solo bem como a especiação no
26 ambiente local, que são determinados pelas características geoquímicas (COMBS
27 JUNIOR, 2001). Hurst *et al.* (2013) relacionaram os baixos teores de Se nos solos
28 de Malawi com a deficiência endêmica desse elemento na população desse país.

29 As informações sobre os teores de Se nos solos brasileiros são escassas.
30 Contudo, há indícios de baixa ingestão de Se pela população (FERREIRA *et al.*,
31 2002; MAIHARA *et al.*, 2004). Segundo Combs Junior (2001) existe a necessidade
32 de se obter informações das concentrações de Se a nível nacional com o intuito de
33 compreender quais fatores influenciam tais concentrações.

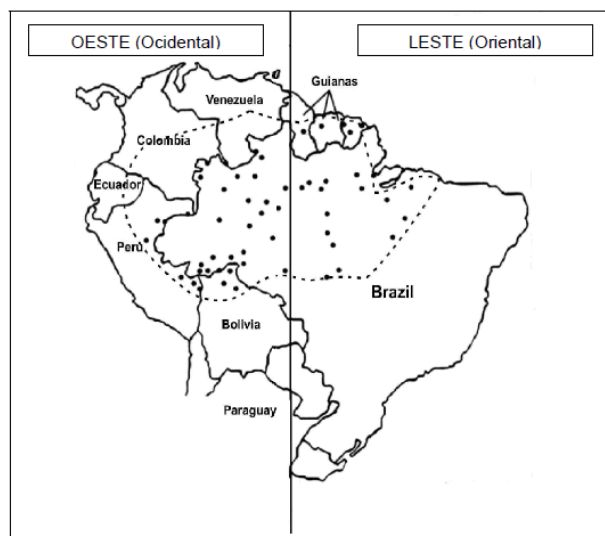
Devido a grande variabilidade nos teores de Se em amêndoas de castanha-do-brasil, há a necessidade de se realizar a caracterização desses teores em diferentes populações de castanheiras e os respectivos teores nos solos adjacentes, a fim de se obter quais fatores definem a eficiência da planta em acumular esse elemento em suas amêndoas (SILVA JUNIOR, 2016).

1.2.2 Castanha-do-brasil

Pertencente à classe Dicotiledônea, ordem Myrtiflorae e família Lecythidaceae, a castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma angiosperma de grande porte podendo atingir até 60 metros de altura e 2 metros de diâmetro na altura do peito (DAP), sendo que algumas espécies podem passar de 1.000 anos de idade (MORI; PRANCE, 1990; SALOMÃO *et al.*, 1995; LORENZI, 2002; ORTIZ, 2002).

Ocorrendo em toda a região Amazônica, Guianas, Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia (Figura 1), a castanheira-do-brasil tem as terras firmes (florestas não-inundadas) como seu principal habitat, com temperatura média anual variando de 24° a 27°C, umidade relativa do ar de 79% a 91%, precipitação de 1.400 mm a 2.800 mm, bem adaptada a Latossolos e Argissolos pobres em nutrientes (LOUREIRO; SILVA, 1968; FAO, 1986; LOUREIRO; SILVA; ALENCAR 1979; FIGUEIRÊDO; CARVALHO, 2002).

Figura 1. Distribuição da castanheira-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da Bacia Amazônica.



Fonte: adaptado de Pacheco; Scussel (2007).

1 Bem adaptada a Latossolos e Argissolos, segundo Locatelli, Vieira e Souza
2 (2010) a castanheira apresenta com crescimento tanto em diâmetro quanto em
3 altura em solos com pH ácido, com baixa saturação de bases e CTC e elevados
4 valores de saturação de alumínio. Segundo Schroth *et al.* (2001), ela é eficiente em
5 concentrar nutrientes provenientes de precipitação, lixiviação e deposição da matéria
6 orgânica.

7 Também conhecida como castanha-da-amazônia ou castanha-do-pará, a
8 castanha-do-brasil possui copa grande, fuste retilíneo e desrama natural dos galhos
9 em plantio. É encontrada comumente em grupos denominados “castanhais”,
10 agregados de 50 a 100 indivíduos, possuindo de 9 a 26 árvores adultas por hectare
11 (MORI; PRANCE, 1990; FERNANDES; ALENCAR, 1993).

12 Seu fruto, conhecido como ouriço, pode pesar de 500 a 1.500 g. Em seu
13 interior são encontradas as amêndoas (de 10-25 por fruto), parte comestível da
14 planta, de formato triangular-anguloso, medindo de 4 a 7 centímetros de
15 comprimento, com peso médio de 8,2 g (SOUZA, 1963). Possui alto valor nutritivo,
16 rica em selênio, cálcio, fósforo, magnésio e potássio, tida como uma das proteínas
17 vegetais mais completas (MORI; PRANCE, 1990; VILHENA, 2004).

18 Suas amêndoas possuem uma composição química complexa, constituídas
19 tipicamente por minerais, fibras, aminoácidos contendo enxofre, particularmente
20 metionina e cisteína (380 e 130 mg g⁻¹, respectivamente) (SUN; ALTENBACH;
21 LEUNG, 1987;), 50-70% de lipídeos, 10-20% de proteínas e 10-20% de
22 carboidratos, o que segundo Gonçalves *et al.* (2009) tornam suas análises
23 difíceis.

24 Considerada uma espécie de grande potencial em sistemas agroflorestais, a
25 castanha-do-brasil tem seu aproveitamento fundamentado principalmente na
26 exploração comercial de seus frutos (ouriços), sobretudo em árvores nativas
27 (YARED *et al.*, 1993; FIGUEIRÊDO; CARVALHO, 1990; SCOLES; GRIBEL, 2011).
28 Segundo Clement (2000) as árvores começam a produzir os ouriços a partir dos 8
29 anos de idade, regularizando sua produção aos 12 anos.

30 Apesar de protegida por lei, castanhais nativos vêm sendo dizimados, uma
31 vez que os fragmentos florestais não possuem condições favoráveis à polinização,
32 diminuindo assim sua produção econômica. Devido a sua grande importância social,
33 ecológica e econômica para a região Amazônica, onde milhares de famílias e
34 produtores rurais utilizam sua semente como fonte de renda e alimento, tem sido

então incentivado o plantio de castanhas-do-brasil, reincorporando as áreas degradadas ao processo produtivo (COSTA; WANDELLI; CASTRO, 2009; WADT; KAINER, 2012).

Em 1986, com a abertura dos portos da Amazônia ao comércio exterior, houve a expansão da produção e comercialização das castanha-do-brasil no exterior, principalmente países da Europa e Estados Unidos, onde são conhecidas como *Brazilian nuts* ou *Brazil nuts* (SOUZA *et al.*, 2008; WADT; KAINER, 2012).

1.2.3 Selênio no solo

Os teores naturais de Se nos solos podem variar de 0,05 a 1,50 mg kg⁻¹, onde os valores mais baixos são encontrados em solos podzólicos e os maiores em organossolos (KABATA-PENDIAS, 2011).

Em sua maioria, os solos das regiões temperada úmidas, originários de rochas sedimentares possuem níveis de Se insuficientes para a produção de alimento com teores adequados à nutrição humana e animal, sendo necessária a adubação de correção. Esse fato tem chamado a atenção de diversos pesquisadores, principalmente em áreas com problemas de deficiência ou toxicidade desse elemento (KABATA-PENDIAS, 2011).

Em contrapartida, solos com maior grau de intemperismo, como Latossolos e Argissolos, possuem teores mais elevados desse nutriente. Esse fato deve-se principalmente ao material de origem com teores mais altos de Se (granito e gnaisse) e a concentração de óxidos e hidróxidos de Fe e Al, que possuem alta afinidade pelas principais espécies iônicas de Se (GOH; LIM, 2004).

As principais formas de Se encontrados nos solos são: inorgânicas, como o selênio elementar (Se⁰), seleneto (Se²⁻), selenito (SeO₃²⁻), selenato (SeO₄²⁻); e orgânicas, como selenometionina e selenocisteína. As formas selenito e selenato são as predominantes em solos cultiváveis, e o principal mecanismo de controle da distribuição desse elemento na solução do solo é a adsorção em óxidos e hidróxidos e na borda dos argilominerais. Por outro lado, para que o Se orgânico esteja prontamente disponível para as plantas, é necessário que ocorra a mineralização do mesmo (KOPSELL; KOPSELL, 2007; SUPRIATIN *et al.*, 2015).

Os fatores que controlam a disponibilidade de Se para plantas e animais variam nos diferentes tipos de solos. Dentre eles, podemos citar a geologia, condições redox, quantidade de matéria orgânica, pH do solo, presença de íons

competidores como o sulfato e o fosfato, textura do solo, compactação e mineralogia, temperatura do solo, atividade microbiana, nível de precipitação, irrigação, etc (FORDYCE *et al.*, 2010). Por exemplo, solos com elevado teor de matéria orgânica e altos teores de oxihidróxidos de Fe e de argila tendem a inibir a absorção de Se pelas plantas e animais. (FORDYCE, 2007).

Uden *et al.* (2004) relataram que, devido à alta lixiviação do selenato (SeO_4^{2-}) do solo para as águas dos rios, esse elemento é facilmente absorvido pelas árvores com capacidade de retenção cumulativa, o que ocorre na região Amazônica. Entretanto, se esse Se não estiver na forma disponível para plantas, mesmo em concentrações adequadas, pode haver a deficiência desse nutriente tanto em plantas quanto em animais (SUPRIATIN *et al.*, 2015).

Existe uma dependência entre as formas de Se com relação ao pH e o potencial redox. Os processos de oxidação-redução regulam as transformações desse elemento, baseado principalmente nas interações entre os fatores citados anteriormente e as formas químicas de Se no solo (KOPSELL; KOPSELL, 2007; JEŽEK, 2012). O selenito pode ser oxidado a selenatos solúveis em solos alcalinos (pH 7,5-8,5), aumentando sua disponibilidade. Já em solos ácidos (pH 4,5-6,5), ocorre a diminuição da disponibilidade do selenito devido a ligação a composto de ferro. Os selenatos solúveis absorvidos pelas plantas são convertidos para formas orgânicas (selenometionina, seleneto de dimetila, disseleneto de dimetila e selenocisteína) (TIGLEA; CAPITANI, 2003).

Segundo Alfthan *et al.* (2014) fatores como precipitação, sorção, dessorção, dissolução, formação de complexos orgânicos, inorgânicos e metilação de compostos voláteis controlam a mobilidade de Se no solo e a disponibilidade deste elemento para as plantas. Quanto ao comportamento de Se no solo, os autores afirmam que o selenato é móvel no solo, entretanto, devido a adsorção de selenito na superfície dos óxidos, essa forma fica menos disponível para as plantas. Já os selenetos são praticamente imóveis em solos ácidos, devido principalmente a formação de minerais estáveis e compostos orgânicos (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Uma vez que o teor e a forma química do Se no solo determinam sua concentração em grãos e vegetais, o estudo da concentração de Se nos solos e seu comportamento auxiliariam no entendimento da ciclagem, fluxo e balanço de Se no ecossistema, bem como sua influência na saúde humana (LI *et al.*, 2008). Abreu

(2010), em estudos sobre a sorção de Se em solos do Cerrado brasileiro, verificaram que solos mais intemperizados, com maiores teores de argila e óxidos de Al possuíam uma maior afinidade pelo íon selenato, entretanto, houve uma menor retenção de Se em solos com textura média ou arenosa.

Muitas áreas agrícolas produzem plantas com baixos teores de Se devido à baixa solubilidade deste elemento na grande maioria dos solos. Solos com teores de Se abaixo de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para grãos de cereais e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para forrageiras, são considerados deficientes em Se (GISSEL-NIELSEN *et al.*, 1984). Entretanto em solos de zona áridas, ou mal-drenados, altamente adubados com lodo de esgoto ou restos de cinzas, enriquecidos com Se, pode haver o acúmulo de altas concentrações de Se nas plantas, suficiente para tornar estes alimentos tóxicos para animais e humanos que se alimentarem dos mesmos (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

A deficiência ou toxicidade, e consequentemente a maioria das doenças em humanos relacionadas ao Se, são em virtude das altas ou baixas concentrações deste elemento no solo, alimento e água, uma vez que grande parte do Se ingerido por humanos é proveniente do solo onde plantas e legumes são cultivados. Países como Sibéria, África Central, China, e alguns do leste Europeu, possuem áreas com baixas concentrações de Se. Como consequência, grande parte da população apresenta ingestão insuficiente de Se, diminuindo assim a eficiência das selenoenzimas no organismo (LYONS *et al.*, 2004).

Estudos relacionados ao Se no solo são recentes no Brasil, tendo a necessidade da busca por mais informações sobre os teores naturais deste elemento, principalmente em regiões agrícolas. Por exemplo, Silva *et al.* (2012) avaliando o teor natural de Se em solos do estado de Minas Gerais, encontraram valores entre $<0,05$ a $2,14 \text{ mg kg}^{-1}$ em diferentes tipos de solo (Latossolo, Argissolo, Neossolo, Basalto, CambEm contrapartida, Carvalho (2011) verificaram teores naturais de Se em solos do Cerradissolo e outros). o variando de 32 a $82 \mu\text{g kg}^{-1}$ no horizonte superficial e de < 22 a $63 \mu\text{g kg}^{-1}$ no horizonte subsuperficial.

Na tabela 1 encontra-se compilado alguns dados de teores de Se em solos brasileiros. Embora haja poucos trabalhos nesta área, há evidências da deficiência deste elemento em algumas regiões onde esses valores já foram avaliados (REIS, 2016).

Tabela 1. Teores totais de Se em alguns solos do Brasil.

Local amostrado	Teores ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
Amazonas	640	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Ceará	599	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Cerrado	10-80	Carvalho <i>et al.</i> (2012)
Cerrado (horizonte superficial)	32-81	Carvalho (2011)
Cerrado (horizonte subsuperficial)	<22-63	Carvalho (2011)
Goiás	1-8	Fichtner <i>et al.</i> (1990)
Goiás	215	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Mato Grosso do Sul	113	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Matão	2,3-15	Faria (2009)
São Paulo	0-800	Paiva Neto; Gargantini (1956)
São Paulo	89-1612	Gabos, Alleoni e Abreu (2014)
Pará	419	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Paraná	370	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Rio Grande do Sul	248	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Santa Catarina	262	Shaltout <i>et al.</i> (2011)
Faixa de teores deficientes	100-600	Lyons, Stangoulis e Graham (2003)

Fonte: Adaptado de Silva Junior (2016)

A biofortificação agronômica, visando a melhora da qualidade nutricional dos alimentos, é uma excelente alternativa para áreas onde há baixa disponibilidade de Se nos solos (WHITE; BROADLEY, 2009). O consumo de alimentos biofortificados com Se é uma prática importante e eficaz na diminuição da deficiência de Se na população mundial (COMBS, 2001). A adição de Se inorgânico em solos deficientes a fim de melhorar o status de Se na população (biofortificação) tem sido realizada em países como Finlândia, Austrália, Brasil e Reino Unido (ARO; ALFTHAN; VARO, 1995; LYONS *et al.*, 2005; LYONS, 2009; RAMOS *et al.*, 2010; BOLDRIN *et al.*, 2012, 2013).

A regulação genotípica e a fisiologia da planta também podem influenciar os teores de Se nos produtos agrícolas (LYONS *et al.*, 2005). Porém, mais pesquisas devem ser realizadas a fim de esclarecer como o Se se comporta no solo bem como os fatores ligados a variação genotípica quanto ao acúmulo de Se. Esses dados servirão de subsídio para futuras pesquisas nas áreas de melhoramento vegetal,

1 nutrição mineral e adubação, além da produção de alimentos com uma maior
2 qualidade nutricional.

4 **1.2.4 Selênio na castanha-do-brasil**

5 Valioso componente para os sistemas agroflorestais na região graças aos
6 seus múltiplos usos, a árvore da castanha-do-brasil apesar de bem adaptada aos
7 solos da região Amazônica brasileira, conseguindo extrair nutrientes de solos
8 pobres, responde positivamente a adubação com fertilizantes químicos e a calagem
9 (SCHROTH; MOTA; ELIAS, 2015).

10 Reconhecida como principal fonte de Se para a dieta humana e animal, a
11 castanheira-do-brasil tem sido objeto de muitos estudos. Ainda existem controvérsias
12 quanto aos riscos e benefícios de Se e discussões acerca de sua essencialidade,
13 sendo considerado um nutriente benéfico às plantas (TERRY *et al.*, 2000; FREITAS
14 *et al.*, 2004; LYONS *et al.*, 2009).

15 Diversos fatores influenciam tanto a absorção de Se pelas plantas quanto seu
16 valor total presente nos tecidos vegetais, entre eles o teor e forma química do Se no
17 solo, potencial redox (Eh), mineralogia, precipitação pluviométrica, fertilizantes
18 minerais e a atmosfera, que está em equilíbrio com seu ciclo (JEŽEK *et al.*, 2012).

19 A absorção de Se pelas raízes ocorre quando o elemento está na forma de
20 selenato, selenito ou como compostos orgânicos (selenocisteína e selenometionina),
21 porém são incapazes de absorver Se elementar ou selenidos metálicos. A principal
22 proteína que contem Se em sua composição é a selenometionina, sua forma
23 biodisponível (KANNAMKUMARATH *et al.*, 2002; WHITE; BROADLEY, 2009).

24 Segundo Clement (1993), os altos teores de Se encontrados na castanheira-
25 do-brasil ocorre devido à similaridade desse elemento com o enxofre (S) associado
26 as baixas concentrações de S nos solos da região Amazônica. Graças a essa
27 similaridade, as plantas absorvem e metabolizam o Se na forma de selenato
28 utilizando os mesmos transportadores de S através do mesmo sítio de absorção
29 (PILON-SMITS; QUINN, 2010). Para a forma de selenito, a absorção e
30 metabolização do Se ocorre via transportadores de fosfato (LI.; MCGRATH; ZHAO
31 2008; ZHU *et al.*, 2009).

32 As Angiospermas estão divididas em três grupos ecológicos de acordo com a
33 capacidade e habilidade da espécie em acumular Se em seus tecidos. São eles:

- 1 • Espécie não-acumuladoras: maior parte das angiospermas, contem
2 <25 mg kg⁻¹ de Se na matéria seca. Não podem colonizar solos
3 seleníferos uma vez que não toleram em seus tecidos concentrações >
4 10-10 mg kg⁻¹ de Se na massa seca. Essas plantas incorporam
5 selenocisteína e selenometionina em suas proteínas, causando
6 toxicidade (BROWN; SHRIFT, 1981; WHITE *et al.*, 2004; DHILLON;
7 DHILLON, 2009; WHITE, 2016).
- 8 • Se-indicadoras: toleram concentrações de Se em seus tecidos
9 próximos a 1000 mg kg⁻¹ de massa seca, colonizando solos seleníferos
10 ou não-seleníferos (MORENO RODRIGUEZ; CALA RIVERO;
11 JIME'NEZ BALLESTA, 2005).
- 12 • Se-acumuladoras: concentrações de Se em seus tecidos acima de
13 1000 mg kg⁻¹ de massa seca, colonizando principalmente solos
14 seleníferos. Incluem membros das famílias *Asteraceae*, *Brassicaceae* e
15 *Fabaceae*, que possuem elevadas concentrações de Se nas células
16 epidérmicas e nos tricomas foliares. Plantas hiperacumuladoras
17 concentram o Se primeiramente na forma de metilselenocisteína
18 (MeSeCys), que não é incorporado nas proteínas, portanto, não
19 causando toxicidade (FREEMAN *et al.*, 2010; QUINN, *et al.*, 2011; EL
20 MEHDAWI; PILON-SMITS, 2012). Sendo assim, são definidas como
21 “hiperacumuladoras” espécies amostradas em seu ambiente natural
22 cujas folhas apresentem concentrações maiores que 1000 mg kg⁻¹ de
23 massa seca. Representantes da família *Lecythidaceae* (*Bertholletia*
24 *excelsa*, *Lecythis zabucajo* Aubl., *Lecythis olaria* Loefl., entre outras)
25 também acumulam elevadas concentrações de Se em seus frutos e
26 sementes (WHITE, 2016).

27 A hiperacumulação tem sido reportada como mecanismo de proteção contra o
28 ataque de herbívoros e patógenos. Elevadas concentrações de Se mostrara-se
29 eficientes na proteção de uma grande variedade de herbívoros em *Brassica juncea*
30 (não-acumuladora), *Stanleya pinnata* e *Astragalus bisulcatus* (Se-acumuladoras)
31 (HANSON *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2006; QUINN *et al.*, 2010). Barclay *et al.*
32 (1995) analisando 700 amostras de alimentos consumidos no Reino Unido,
33 avaliaram os teores médios de Se em 100 tipos diferentes de alimentos e

1 encontraram as maiores concentrações de Se na castanha-do-brasil, com um teor
2 máximo de 2,54 mg kg⁻¹.

3 Diversos outros trabalho de pesquisa vêm sendo realizados a fim de
4 determinar os teores de Se na castanha-do-brasil. Chang *et al.* (1995) avaliando os
5 valores totais de Se em amêndoas de castanha-do-brasil em duas diferentes regiões
6 do Brasil (Acre-Rondônia e Manaus-Belém) encontraram valores médios de 0,03-
7 31,7 e 1,25-512 mg kg⁻¹, para cada região, respectivamente. Isso se deve
8 provavelmente as diferentes concentrações de Se nestes solos ou a diferença na
9 eficiência de absorção de Se pelas diferentes cultivares amostradas. Reilly (1999)
10 encontrou teores médios de Se na faixa de 3,6 mg/100 g a 51,2 mg/100g. Segundo
11 o autor, essa diferença pode ser atribuída à eficiência biológica da planta em
12 absorver selênio do solo.

13 Pacheco e Scussel (2007) encontraram valores entre 8,5 5 mg Se kg⁻¹ e 69,7
14 mg Se kg⁻¹, sendo que os valores mais altos foram obtidos na região Leste da
15 Amazônia (Pará, Amapá e Norte do Maranhão) e os teores mais baixos foram
16 obtidos na região Oeste da Amazônia (Acre, Rondônia, Roraima e a parte Leste do
17 Amazonas, após Manaus). De um lote proveniente da região de Manaus, Martins *et*
18 *al.* (2012) obtiveram uma concentração média de 22,7 mg Se kg⁻¹. Em contrapartida,
19 Silva, Mataveli e Arruda (2013) avaliando os teores de Se em amêndoas adquiridas
20 em um mercado de Campinas-SP, encontraram teores médios de 54,8 mg Se kg⁻¹.

21 Uma vez que os valores de Se na castanha-do-brasil são muito variáveis,
22 sendo dependentes da cultivar e do solo onde a planta foi cultivada, torna-se
23 necessário o monitoramento das concentrações desse elemento para que se
24 possam ser feitas as recomendações de consumo.

26 **1.2.5 Bactérias Se-redutoras**

27 Comunidades de microrganismos endofíticos e aqueles presentes na
28 rizosfera são fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas, agindo
29 por mecanismos diretos ou indiretos (GUPTA; GOPAL; TILAK *et al.*, 2000; GLICK,
30 2012). Esses microrganismos podem colonizar o interior das raízes, caule folhas,
31 flores, frutos ou sementes (JHA *et al.*, 2013).

32 Eles são responsáveis pelo aumento da aquisição ou biodisponibilidade de
33 nutrientes, incluindo a fixação biológica de nitrogênio; repressão de patógenos
34 presentes no solo (produção de cianeto de hidrogênio, antibióticos e/ou competição

por nutrientes); aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos (salinidade, seca e toxicidade por metais); e produção de fitohormônios como o AIA (ácido indo-3-acético) (GUPTA; GOPAL; TILAK *et al.*, 2000; JHA *et al.*, 2013).

Alguns fatores como espécie da planta, cultivar e condições de cultivo irão influenciar na diversidade desses microrganismos. Dentre os principais microrganismos presentes na rizosfera podemos citar as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Variovorax*, entre outros (MILLER *et al.*, 1998; LODIEWYCKX *et al.*, 2002; STROBEL *et al.*, 2004; GUAN *et al.*, 2005; TAGHAVI *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2008; ULRICH; ULRICH; EWALD, *et al.*, 2008; WEYENS *et al.*, 2013; CROES *et al.*, 2014).

Esses microrganismos vêm sendo utilizados na agricultura por meio da inoculação de algumas espécies de plantas, como *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Triticum*, *Phaseolus vulgaris*, entre outras. A utilização desses microrganismos possui efeitos positivos, proporcionando o aumento da produção dessas culturas, proteção contra patógenos e estresse abiótico bem como um aumento no valor nutricional das culturas (biofortificação) (PILON-SMITH, 2005).

Microrganismos endofíticos Se-hiperacumuladores podem ser caracterizados por possuir elevada resistência a Se, capacidade de produzir Se elementar e propriedades de promoção do crescimento das plantas em solos seleníferos (SURA-DE JONG *et al.*, 2015). Chen *et al.* (2014) relataram que a presença de metais pesados e espécies de plantas contribuíram na formação da comunidade bacteriana endofítica associada a hiperacumulação. Valdez Barillas *et al.* (2012) avaliando uma planta Se-hiperacumuladora (*Astragalus bisulcatus*), constataram que o grupo de Se-hiperacumuladores continha bactérias e fungos endofíticos, incluindo os rizóbios dos nódulos radiculares e fungos presentes no tegumento das sementes.

O elevado nível de Se em plantas hiperacumuladoras podem afetar a fauna microbiana das áreas seleníferas. Material orgânico com elevado teor de Se (550 mg kg⁻¹ de matéria seca) foi decomposto mais rapidamente do que aquele que possuía baixos níveis de Se, o que sugere a presença de uma comunidade microbiana decompositora Se-resistente (QUINN *et al.*, 2011). O Se pode ainda proteger as plantas de patógenos fúngicos sensíveis a esse elemento (Hanson *et al.*, 2003).

Sura-De Jong Jong *et al.* (2015) avaliando a diversidade bacteriana endofítica de uma área selenífera, coletaram o solo próximo a rizosfera de duas espécies Se-hiperacumuladoras (*Stanleya pinnata* (Brassicaceae) e *Astragalus bisulcatus* (Fabaceae)) e duas não acumuladoras (*Physaria bellii* (Brassicaceae) e *Medicago sativa* (Fabaceae)), concluíram que ambos os solos possuíam a mesma comunidade bacteriana. As espécies de microrganismos incluíam *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Advenella*, *Arthrobacter*, e *Variovorax*, sendo que a maioria podia reduzir selenato a selenito, e selenito a Se elementar.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. B. **Sorção de selênio em solos do bioma Cerrado**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ALFTHAN, G. *et al.* Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Muenchen, v. 31, p. 142-147, 2014.
- ARO, A; ALFTHAN, G.; VARO, P. Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland. **The Analyst**, Muenchen, v. 120, p. 841–843, 1995.
- BARCLAY, M. N. I.; MACPHERSON, A.; DIXON, J. Selenium content of a range of UK foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, United States of America, v 8, n 4, p 307–318, 1995.
- BOLDRIN, P. F. *et al.* Selenato e selenito na produção e biofortificação agrônômica com selênio em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 16, p. 831–837, 2012.
- BOLDRIN, P. F. *et al.* Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 31, n. 2, p. 238–244, set. 2013.
- BROWN, T. A.; SHRIFT, A. Exclusion of selenium from proteins in selenium-tolerant *Astragalus* species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, p. 1951–1953, 1981.
- CARVALHO, G. S. **Selênio e mercúrio em solos sob cerrado nativo**. 2011. 95 f. Tese (Doutorado em Recursos Ambientais e Uso da Terra) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- CARVALHO, L. C. B. *et al.* Phenotypic correlations between combining abilities of F2 cowpea populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 12, p. 211-214, 2012.

- CHANG, J. C. *et al.* Selenium content of Brasil nuts from two geographic locations in Brasil. **Chemosphere**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 801–802, 1995.
- CHEN, B. *et al.* The endophytic bacterium, *Sphingomonas* SaMR12, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *Sedum alfredii*. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. 9, 2014.
- CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazônica**: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA, Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2000.
- CLEMENT, C. R. Brazil nut. In: CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. (ed.). **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian Forests**. Roma: Forestry Dept, FAO, 1993. p. 115-127. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/v0784e/v0784e0k.htm>. Acesso em: 30 maio 2019.
- COMBS JUNIOR, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 85, n. 5, p. 517–547, 2001.
- COSTA, J. R.; WANDELLI, E. V.; CASTRO, A. B. C. **Aspectos silviculturais das castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. (Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 10).
- CROES, S. *et al.* Characterization of the cultivable bacterial populations associated with field grown *Brassica napus* L.: an evaluation of sampling and isolation protocols. **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 7, n. 7, p. 2379-92, 2014.
- DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Accumulation and distribution of selenium in some vegetable crops grown in selenate-Se treated clay loam soil. **Frontiers of Agriculture in China**, Beijing, v. 3, p. 366–373, 2009.
- DUMONT, E. *et al.* Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 684–692, 2006.
- EL MEHDAWI, A. F.; PILON-SMITS, E. A. H. Ecological aspects of plant selenium hyperaccumulation. **Plant Biology**, Chichester, v. 14, p. 1–10, 2012.
- FAO – Food and Agriculture Organization. Food and fruit-bearing forest species, 3rd edn. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1986. p. 308.
- FARIA, L. A. **Levantamento sobre selênio em solos e plantas do Estado de São Paulo e sua aplicação em plantas forrageiras**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. C. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. 4. Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), dez anos após o plantio. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 23, n. 2-3, p. 191-198, 1993.

- 1 FERREIRA, K. S. *et al.* Concentrações de selênio em alimentos consumidos no
2 Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v.11, p.172-177,
3 2002.
- 4
- 5 FIGUEIRÊDO, F. J. C.; CARVALHO, C. J. R. **Aspectos fisiológicos de sementes**
6 **de castanha-do-Brasil submetidas a condições de eestressee**: emergência e
7 respiração. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 22 p. (Boletim de Pesquisa e
8 Desenvolvimento, 5).
- 9
- 10 FIGUEIRÊDO, F. J. C.; CARVALHO, J. E. U. **Adiantamento da semeadura de**
11 **sementes de castanha-do-Brasil**. Belém: Embrapa-CPATU, 1990. 18 p.
12 (EHBRA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 112).
- 13
- 14 FICHTNER, S. S., *et al.* Estudo da composição mineral de solos, forragens e tecido
15 animal de bovinos do município de Rio Verde, Goiás. IV - cobre, molibdênio, selênio.
16 **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**, Goiânia, v. 20, n. 1, p. 1-6. 1990.
- 17
- 18 FORDYCE, F. M. Selenium geochemistry and health. **Ambio: A Journal of the**
19 **Human Environment**, Chan, v. 36, n. 1, p. 94–97, 2007.
- 20
- 21 FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. **Essentials of**
22 **Medical Geology**. Netherlands: Springer, 2013. p. 375–416.
- 23
- 24 FORDYCE, F. M *et al.* An initial study to assess the use of geological parent
25 materials to predict the Se concentration in overlying soils and in five staple
26 foodstuffs produced on them in Scotland. **The Science of the Total Environment**,
27 Amsterdam, v. 408, n. 22, p. 5295–305, 2010.
- 28
- 29 FREITAS, S.C. *et al.* **Selênio em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Rio
30 de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2004. (Comunicado técnico, 71).
- 31
- 32 FREITAS, S.C. *et al.* Comparação entre métodos de digestão de Amostras de
33 castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) para análise de selênio. *In*:
34 SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 3, 2010, Florianópolis. **Anais [...]**
35 Florianópolis: SBCTA-RS, 2010. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>.
36 Acesso em: 05 jun. 2019.
- 37
- 38 FREEMAN, J. L. *et al.* Molecular mechanisms of selenium tolerance and
39 hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, p.
40 1630–1652, 2010.
- 41
- 42 FREEMAN, J. L. *et al.* Selenium tolerant diamondback moth disarms
43 hyperaccumulator plant defense. **Current Biology**, Cambridge, v. 16, p. 2181–2192,
44 2006.
- 45
- 46 GABOS, M. B.; ALLEONI, L. R. F.; ABREU, C. A. Background levels of selenium in
47 some selected Brazilian tropical soils. **Journal of Geochemical Exploration**,
48 Amsterdam, v. 145, p. 35–39, 2014.
- 49

- 1 GISSEL-NIELSEN, G. *et al.* Selenium in soils and plants and its importance in
2 livestock and human nutrition. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 37, p.
3 397-460, 1984.
- 4
- 5 GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.
6 **Scientifica**, Cairo, v. 2012, 2012.
- 7
- 8 GOH, K. H.; LIM, T. T. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical
9 soil: effect of retention time, pH and competitive anion on arsenic and selenium
10 adsorption. **Chemosphere**, Oxford, v. 55, p. 849-859, 2004.
- 11
- 12 GONÇALVES, A. M. *et al.* Determination and fraction of Barium in Brazil nuts.
13 **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 760-769,
14 2009.
- 15
- 16 GUAN, S. H., *et al.* p-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove
17 endophyte: *Streptomyces griseus* subspecies. **Journal of Natural Products**,
18 Whashington, v. 68, p. 1198–1200, 2005.
- 19
- 20 GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK, K. V. Mechanism of plant growth promotion by
21 rhizobacteria. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.38, p. 856–
22 862, 2000.
- 23
- 24 HANSON, B. *et al.* Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from
25 invertebrate herbivory and fungal infection. **New Phytologist**, Chichester, v. 159, p.
26 461–469, 2003.
- 27
- 28 HURST, R *et al.* Soil-type influences human selenium status and underlies
29 widespread selenium deficiency risks in Malawi. **Scientific Reports**, London, v. 3, p.
30 1425, 2013.
- 31
- 32 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2010.
33 **Produção da extração vegetal e silvicultura 2009**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v.
34 23, p. 1-45.
- 35
- 36 JEŽEK, P. *et al.* Selenium – an important antioxidant in crops biofortification. *In*: EL-
37 MISSIRY, M. A. **Antioxidant enzyme**. Egypt: IntechOpen. p. 343-368, 2012.
- 38
- 39 JHA, N. P. *et al.* Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a
40 potential gateway to sustainable agriculture. **Greener Journal of Agricultural**
41 **Sciences**, Sango, v. 3, p. 73–84, 2013.
- 42
- 43 KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**.
44 Berlin: Springer-Verlag, 2007. 550 p.
- 45
- 46 KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 4. ed.
47 Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 367–383. Elements group 16.
- 48

KANNAMKUMARATH, S. S. *et al.* HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, p. 454-60, 2002.

KOPSELL, D. A.; KOPSELL, D. E. Selenium. *In*: BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. (ed). **Handbook of plant nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 515–550.

LI, Y. *et al.* Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China. **Journal of Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 20, n. 7, p. 859–64, 2008.

LI, H. F.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **The New Phytologist**, Chichester, v. 178, n. 1, p. 92–102, 2008.

LIN, S.L. *et al.* Selenium deficiency inhibits the conversion of thyroidal thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in chicken thyroids. **Biological Trace Element Research**, Heidelberg, v. 161, p. 263–271, 2014.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; SOUZA, V. F. **Castanha-do-Brasil**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2010. 1 p. (Embrapa Rondônia. Folder Castanha-do-Brasil).

LODEWYCKX, C. *et al.* Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, v. 21, p. 583–606, 2002.

LORENZI, A. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. **Catálogo de madeiras da Amazônia**. Belém: SUDAM, 1968. 433 p.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências florestais madeireiras da Amazônia**. Manaus: INPA, 1979. v. 1. 245 p.

LYONS, G. H. *et al.* Trends in selenium status of South Australians. **The Medical journal of Australia**, Richmond, v. 180, n. 8, p. 383–386, 2004.

LYONS, G. H. *et al.* Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? **Plant and Soil, Dordrecht**, , Dordrecht, v. 269, n. 1-2, p. 369–380, 2005.

LYONS, G. H. *et al.* Selenium increases seed production in Brassica. **Plant and Soil, Dordrecht**, , Dordrecht, v. 318, n. 1-2, p. 73–80, 2009.

LYONS, G. H.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 45-60, 2003.

- MAIHARA, V. A. *et al.* Daily dietary selenium intake of selected Brazilian population groups. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 259, p. 465-468, 2004.
- MARTINS, M. *et al.* Brazil nuts: determination of natural elements and aflatoxin. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 42, n. 1, p. 157–164, 2012.
- MILLER, C. M. *et al.* Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 84, p. 937–944, 1998.
- MORENO RODRIGUEZ, M. J.; CALA RIVERO, V.; JIMÉNEZ BALLESTA, R. Selenium distribution in topsoils and plants of a semi-arid Mediterranean environment. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 27, p. 513–519, 2005.
- MORI, S. A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology, and economy botany of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, Bronx, v. 8, p. 130–150, 1990.
- ORTIZ, E. G. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). In: SHANLEY, P.; PIERCE, A. R.; LAIRD, S. A.; GUILLEN, A. (ed.). **Tapping the green market: certification & management of non-timber forest products**. London: Earthscan Publications, 2002. p. 61-74.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the amazon basin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p. 11087–11092, 2007.
- PAIVA NETO, J. E.; GARGANTINI, H. Dosagem de selênio no solo. **Bragantia**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 13- 16, 1956.
- PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, 2005.
- PILON-SMITS, E. A. H.; QUINN, C. F. Selenium metabolism in plants. In: HELL, M.; MENDEL, R. R. **Cell biology of metals and nutrients**. Switzerland: Springer. v. 17, p. 225-241, 2010.
- QUINN, C. F. *et al.* Selenium hyperaccumulation offers protection from cell disruptor herbivores. **BMC Ecology**, London, v. 10, p. 19, 2010.
- QUINN, C. F. *et al.* Selenium accumulation in flowers and its effects on pollination. **New Phytologist**, Chichester, v. 192, p. 727–737, 2011.
- RAYMAN, M. Selenium and human health. **Lancet**, Londres, v. 379, p. 1256–1268, 2012.
- RAMOS, S. J. *et al.* Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 2010, n. 12, p. 584–588, 2010.

REILLY, C. Brazil nuts – the selenium supplement of choice? **BNF-Nutrition Bulletin**, Chichester, v. 24, n.88, p. 177-184, 1999.

REIS, A. R. Selenium status in Brazilian soils and crops: Agronomic biofortification as a strategy to improve food quality. GLOBAL advances in selenium research from theory to application. Boca Raton: Crc Press-taylor & Francis Group, 2016. p. 179-180, 2016.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 278, p. 1–9, 2008.

SALOMÃO, R. P. *et al.* Estrutura populacional e breve caracterização ecológica-econômica de 108 espécies arbóreas da floresta amazônica brasileira - I. **Interciência**, Peru, v. 20, n. 1, p. 20-29, 1995.

SCHROTH, G. *et al.* Nutrient fluxes in rainfall, throughfall and stemflow in tree-based land use systems and spontaneous tree vegetation of central Amazonia. **Agriculture, Ecosystems Environment**, Amsterdam, v. 87, p. 37–49, 2001.

SCHROTH, G.; MOTA, M. S. S.; ELIAS, M. E. A. Growth and nutriente accumulation of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in agroforestry at different fertilizer levels. **Journal of Forest Research**, Abingdon, v. 26, n. 2, p. 347–353, 2015.

SCOLES, R.; GRIBEL, R. Population structure of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) stands in two areas with different occupation histories in the Brazilian Amazon. **Human Ecology**, London, v. 39, p. 455–464, 2011.

SHALTOUT, A. A. *et al.* Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v.85, p. 1350–1356, 2011.

SILVA, J. *et al.* Teor Natural de selênio em solos do estado de Minas Gerais. In: FERTBIO, 2012, Maceió-AL. **Anais [...]**. Maceió: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. 2012. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/73195/1/0000000553-FERTBIO-Juscimar.pdf>. Acesso em: 28 maio 2019.

SILVA, E. G.; MATAVELI, L. R. V.; ARRUDA, M. A. Z. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, Amsterdam, v. 110, p. 53–7, 2013.

SILVA JUNIOR, E. C. **Selênio na castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) e em solos da região amazônica brasileira**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SOUZA, A. H. **Castanha do Pará**: estudo botânico, químico e tecnológico. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-Serviço de Informação Agrícola, 1963. 69 p. (Estudos Técnicos, 23).

- SOUZA, C. R. *et al.* **Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). Documentos (Embrapa Amazônia Ocidental)** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 22 p. Documentos, 60.
- STROBEL, G. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, p. 257–268, 2004.
- SUN, S. S. M.; ALTENBACH, S. B.; LEUNG, F. W. Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protein in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **European Journal of Biochemistry**, Chichester, v. 162, p. 477–483, 1987.
- SUPRIATIN, S.; WENG, L.; COMANS, R. N. J. Selenium speciation and extractability in Dutch agricultural soils. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 532, p. 368–382, 2015.
- SURA-DE JONG *et al.* Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 113, 2015.
- TAGHAVI, S. *et al.* Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 8500–8505, 2005.
- TERRY, N. *et al.* Selenium in Higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401–432, 2000.
- TIGLEA, P. CAPITANI, E. M. Selênio. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (ed). **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 239-262.
- UDEN, P. C. *et al.* Selective detection and identification of Se containing compounds- review and recent developments. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1050, n. 1, p. 85-93, 2004.
- ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD, D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 63, p. 169–180, 2008.
- VILHENA, M. R. **Ciência, tecnologia e desenvolvimento na economia da castanha-do-brasil – A transformação industrial das castanha-do-brasil na COMARU- Região Sul do Amapá**. 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- VALDEZ BARILLAS, J. R. *et al.* Selenium distribution and speciation in hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus* and associated ecological partners. **Plant Physiology**, Rockville, v. 159, p. 1834–1844, 2012.
- WADT, L. H. O.; KAINER, K. A. Domestication and breeding of the Brazil nut tree. In: BORÉM, A. *et al.* (ed.). **Domestication and breeding: Amazonian species**. Viçosa: Ed da UFV, 2012. p. 297–317.

- 1 WEYENS, N. *et al.* Bacteria associated with yellow lupine grown on a
2 metalcontaminated soil: in vitro screening and in vivo evaluation for their potential to
3 enhance Cd phytoextraction. **Plant Biology**, Chichester, v. 16, p. 988–996, 2013.
- 4
5 WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 117, n.
6 2, p. 217–235, 2016.
- 7
8 WHITE, P. J. *et al.* Interactions between selenium and sulphur nutrition in
9 *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p.
10 1927–1937, 2004.
- 11
12 WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral
13 elements often lacking in human diets -iron, zinc, copper, calcium, magnesium,
14 selenium and iodine. **New Phytologist**, Chichester, v. 182, p. 49–84, 2009.
- 15
16 YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **LWT - Food Science**
17 **and Technology**, London, v. 42, p. 1573–1580, 2009.
- 18
19 YARED, J. A. G. *et al.* Comportamento silvicultural de castanheira (*Bertholletia*
20 *excelsa* H. & K.), em diversos locais na Amazônia. *In*: CONGRESSO FLORESTAL
21 PANAMERICANO, 1, 1993, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Sociedade Brasileira de
22 Silvicultura/Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, 1993. v. 2, p. 416-418.
- 23
24 YUAN, L. *et al.* Selenium in plants and soils, and selenosis in enshi, China:
25 implications for selenium biofortification. *In*: YIN, X.; LINXI, Y. (ed.).
26 **Phytoremediation and biofortification**. Berlin: Springer, 2012. p. 7-31.
- 27
28 ZHU, Y. G. *et al.* Selenium in higher plants: understanding mechanisms for
29 biofortification and phytoremediation. **Trends in plant Science**, Oxford, v. 14, n. 8, p.
30 436–42, 2009.
- 31

2. CAPÍTULO 2. PERFIL SOCIOECONÔMICO E PROFISSIONAL DE PRODUTORES DE CASTANHA-DO-BRASIL NA REGIÃO DE ITACOATIARA-AM.

Resumo - A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma das espécies arbóreas de terras altas mais importantes e valiosas da região amazônica, utilizada por diversas comunidades extrativistas e indígenas como fonte de renda e alimentação. Caracteriza-se por ser uma espécie dominante, ocupando o dossel superior da floresta, tendo grande influência na sucessão florestal bem como na dinâmica de clareiras. Foram aplicados questionários aos funcionários da fazenda Aruanã e a pequenos produtores da região. A escolha dos pequenos produtores baseou-se no banco de dados das doações de mudas de castanha-do-Brasil pela fazenda. Com a aplicação do questionário, pode-se compreender alguns aspectos tanto do perfil dos produtores e funcionários da Fazenda Aruanã, quanto dos processos de produção e comercialização da castanha. O principal motivo para o cultivo da castanha foi o incentivo da Fazenda Aruanã e buscam através do cultivo dessa planta a criação de renda para suas respectivas famílias. Grande parte dos produtores entrevistados tem propriedade com 200 a 300 árvores de castanha. A maior parte dos pequenos produtores pretendem comercializar seus produtos com outros clientes. A Fazenda Aruanã tem certificação para produto orgânico e seus fornecedores devem atender as mesmas exigência de produtos orgânicos.

Palavra-chave: *Bertholletia excelsa* H.B.K; questionário socioeconômico; pequenos produtores.

Abstract - The Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is one of the most important and valuable upland tree species in the Amazon region, used by several extractivist and indigenous communities as a source of income and food (SOUZA et al., 2008). It is characterized by being a dominant species, occupying the upper canopy of the forest, having great influence on forest succession as well as on the dynamics of clearings (VILHENA, 2004). Questionnaires were applied to the employees of the Aruanã farm and to small producers in the region. The choice of small producers was based on the data bank of Brazil nut seedling donations from the farm. With the application of the questionnaire, we were able to understand

some aspects of the profile of the farmers and employees of Aruanã Farm, as well as the processes of production and commercialization of the nut. The main reason for the cultivation of Brazil nuts was the encouragement by Fazenda Aruanã for smallholders increase the income. Most of interviewed smallholders show properties containing around 200 to 300 Brazil nut trees. Most of smallholders intend to commercialize their products with other customers. Fazenda Aruanã is certified for organic products and its suppliers must meet the same requirements as organic products.

Key-words: *Bertholletia excelsa* H.B.K; socioeconomic questionnaire; small producers.

2.1 INTRODUÇÃO

A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma das espécies arbóreas de terras altas mais importantes e valiosas da região amazônica, utilizada por diversas comunidades extrativistas e indígenas como fonte de renda e alimentação (SOUZA *et al.*, 2008). Caracteriza-se por ser uma espécie dominante, ocupando o dossel superior da floresta, tendo grande influência na sucessão florestal bem como na dinâmica de clareiras (VILHENA, 2004). Após o decaimento da exploração comercial da borracha na região amazônica, a exploração da castanha se tornou uma das principais atividades econômicas da região, segundo Homma (2004).

Apesar do Decreto Federal nº 5.975/2006 que proíbe a exploração de árvores nativas, os castanhais nativos têm sido assolados, e sua produção vêm diminuindo uma vez que os fragmentos florestais restantes não comportam condições ecológicas benéficas à polinização (COSTA; WANDELLI; CASTRO, 2009). O plantio da castanha-do-Brasil tem sido fortemente estimulado, sendo indicado para a composição de diferentes sistemas de plantio na região amazônica, principalmente como componente agroflorestal em programas de reflorestamento, uma vez que este decreto não impede o seu plantio (SCOLES; GRIBEL; KLEIN, 2011; SALOMÃO; SANTANA; BRIENZA JUNIOR, 2013; LOCATELLI *et al.*, 2016).

Embora possui baixa representatividade nas exportações brasileiras, a cadeia produtiva da castanha-do-Brasil é a principal atividade econômica de varias comunidades extrativistas da região, e seu transporte, comercialização e

processamento gera renda e emprego na cadeia (CAVALCANTE *et al.*, 2011; BAYMA *et al.*, 2014).

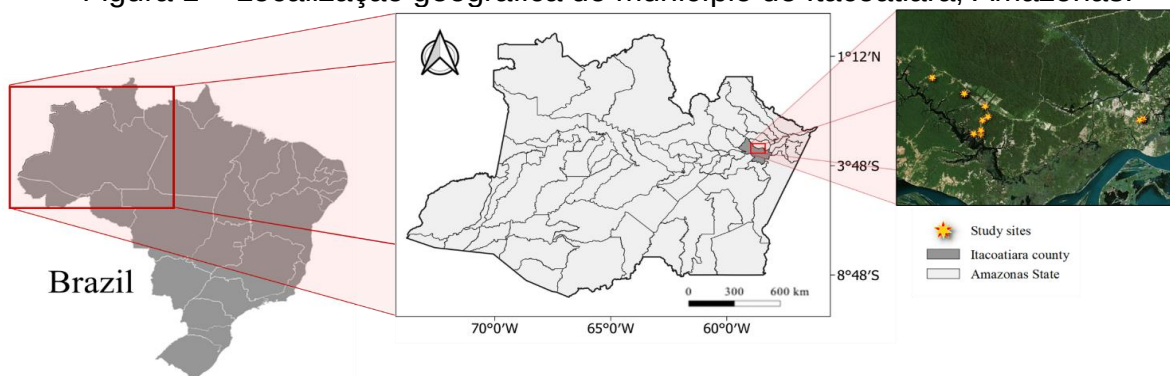
Dentre os produtos explorados e comercializados da castanheira, o mais importante é a amêndoa in natura. Entretanto, podemos citar outros produtos, tais como o óleo, leite, farinha, dentre outros, produzidos a partir da amêndoa. Além disso, essa espécie possui elevado potencial na indústria madeireira por possuir características silviculturais excelentes e madeira de ótima qualidade (SOUZA, 2003; LOCATELLI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2008).

Ao pesquisar o perfil socioeconômico de uma comunidade são coletados dados que permitam a tomada de decisões a fim de melhorar a vida da comunidade, traçando estratégias para a adoção de novas tecnologias e inovações, capacitando o produtor, (SOUZA *et al.*, 2018). A importância desta pesquisa está em elencar as dificuldades enfrentadas pelos pequenos produtores castanha-do-Brasil, indicando métodos e ferramentas para melhorar o desenvolvimento econômico e social desses produtores. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e analisar o perfil socioeconômico dos agricultores que se dedicam ao cultivo de castanha do Brasil na região de Itacoatiara, Amazonas, com o intuito de gerar informações a serem utilizadas como política para o fortalecimento e desenvolvimento da produção da castanha-do-Brasil.

2.2 METODOLOGIA

A coleta de dados foi realizada com o corpo de funcionários da fazenda Aruanã e em comunidades de pequenos produtores no município de Itacoatiara-AM (Figura 1), no período de março a maio de 2018, com a realização de questionário (Anexo 1).

Figura 1 – Localização geográfica do município de Itacoatiara, Amazonas.



Fonte: Do próprio autor (2020).

1 A empresa Agropecuária Aruanã S. A. com cerca de 1.500.000 árvores
2 representa o principal empreendimento com plantios de *Bertholletia excelsa* do
3 mundo. A fazenda possui um programa de doação de mudas de castanheira para os
4 pequenos produtores residentes em comunidades no município de Itacoatiara,
5 Amazonas.

6 A grupo amostral foi constituída por 39 funcionários da fazenda Aruanã e 34
7 pequenos produtores. A escolha dos pequenos produtores baseou-se no banco de
8 dados das doações de mudas de castanha-do-Brasil pela fazenda, variando quanto
9 ao gênero, faixa etária, grau de escolaridade, tamanho da propriedade, poder
10 econômico, tempo de atividade.

11 Os entrevistados foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e
12 posteriormente informados sobre o objetivo do estudo e da confidencialidade de
13 suas respostas. Foram desenvolvidos e aplicados dois questionários (Anexo I e II),
14 originalmente preparados em inglês, porém foi traduzido para o português para a
15 melhor compreensão dos entrevistados. O primeiro questionário, composto por 17
16 questões abertas e de múltipla escolha, foi aplicado aos funcionários da fazenda e
17 teve por objetivo analisar a caracterização organizacional da fazenda bem como a
18 relação dos funcionários com a castanha-do-Brasil. O segundo questionário,
19 composto por 42 questões abertas e de múltipla escolha, foi aplicado aos pequenos
20 produtores e teve por objetivo a compreensão das relações sociais e econômicas
21 entre a Fazenda Aruanã e os pequenos produtores de castanha-do-Brasil na região
22 de Itacoatiara.

23 Durante as visitas foram coletados pontos com GPS (*Global Position System*)
24 que permitiram a identificação da localização de cada produtor.

25 Com intuito de verificar a formação de grupos por similaridade, realizou-se a
26 análise multivariada de clusters hierárquica. Os pacotes “hclust” e “dendextend”
27 foram acessados e a distância euclidiana foi calculada para construir matrizes de
28 similaridade comunitária. A aglomeração de grupos foi realizada por dois métodos,
29 de Ward e da média. A aglomeração pelo método de Ward se baseia na distância
30 média de cada ponto de dados em um cluster em relação ao centroide. A
31 aglomeração pela média de pontos se baseia no cálculo da soma de quadrados
32 entre dois grupos, resultando ao final em agrupamentos de tamanhos
33 aproximadamente iguais devido a sua minimização na variação interna. Em cada

estágio, combinam-se os dois agrupamentos que apresentarem menor aumento na soma global de quadrados dentro dos agrupamentos.

Posteriormente procedeu-se a análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$), a fim de constatar as variáveis dependentes que se correlacionaram diretamente. O pacote “corrplot” foi acessado para criação do heatmap, utilizando-se as funções “cor” e “cor.mtest” para criação de matrizes de coeficientes e p-valor, respectivamente. Afim de facilitar a visualização das correlações que foram significativas, foram inseridos asteriscos nas células do heatmap.

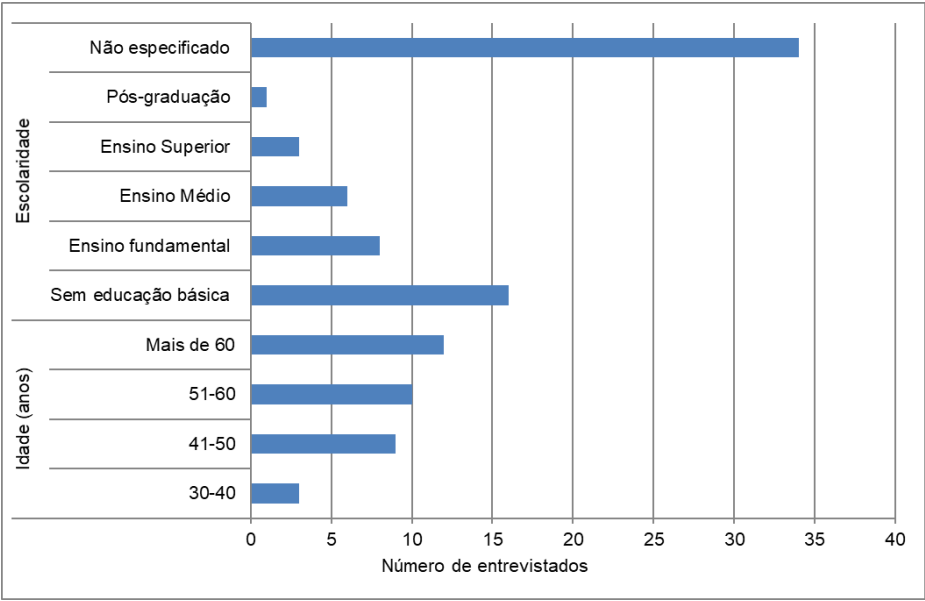
As análises dos dados coletados nos questionários aplicados foram organizadas em planilhas, tratados por meio de estatística descritiva para a determinação da porcentagem, médias, apresentadas em gráficos. O software empregado foi o Microsoft Excel 2016.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da aplicação de formulários de pesquisa a 34 produtores de castanhas na região Amazônica permite a compreensão prévia de alguns aspectos de perfil do produtor, de processo de produção e de comercialização.

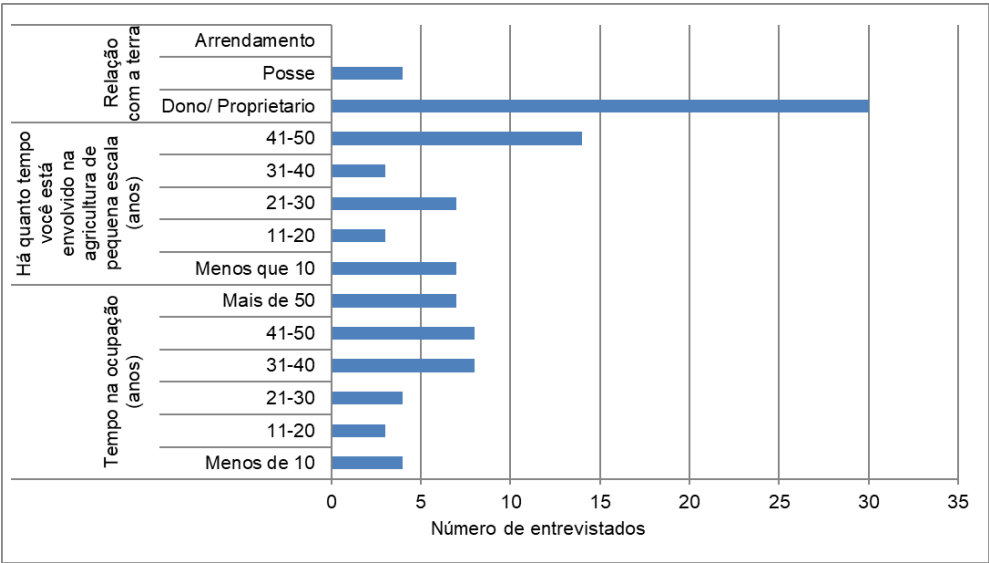
Os aspectos principais quanto ao perfil do produtor são de idade mais elevada, principalmente acima de 51 anos e menor nível de escolaridade (sem educação básica ou de ensino médio), envolvidos há tempo na agricultura de pequena escala (acima de 21 anos principalmente) e que é proprietário da terra (Fig. 2 e 3).

Figura 2. Idade e escolaridade dos produtores entrevistados.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 3. Tempo de trabalho (anos) e relação com a terra.

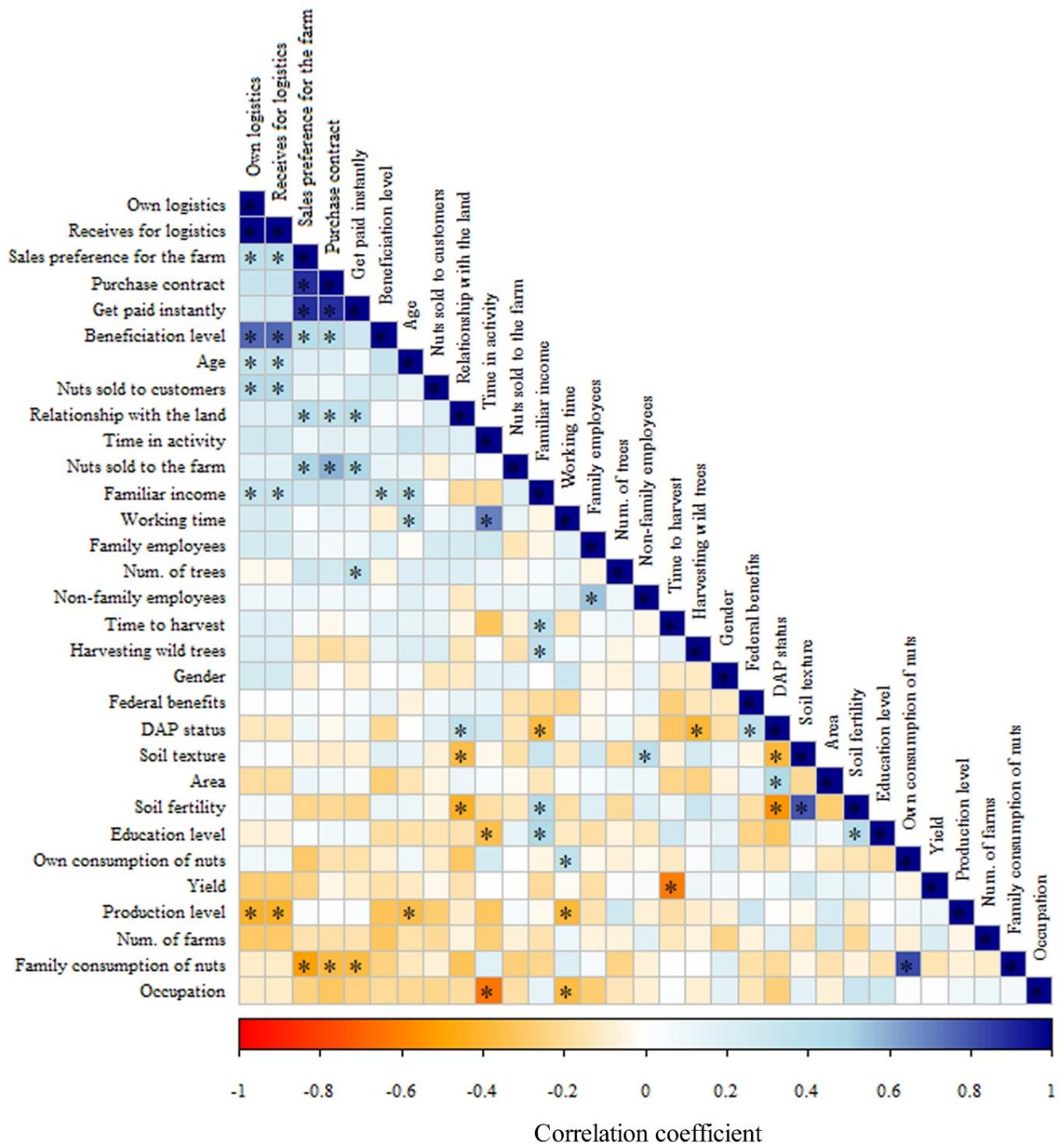


Fonte: Do próprio autor (2020).

Na Figura 4 podemos ver as correlações entre os fatores estudados. Os fatores idade e tempo de serviço na agricultura possuem correlação positiva. Entretanto, a correlação entre a escolaridade e o tempo de serviço é negativa, ou seja, quanto menor o nível de escolaridade, a mais tempo o entrevistado está envolvido com a agricultura.

1

Figura 4. Correlação entre os fatores estudados (Heatmap).



2

Correlation coefficient

3

Fonte: Do próprio autor (2020).

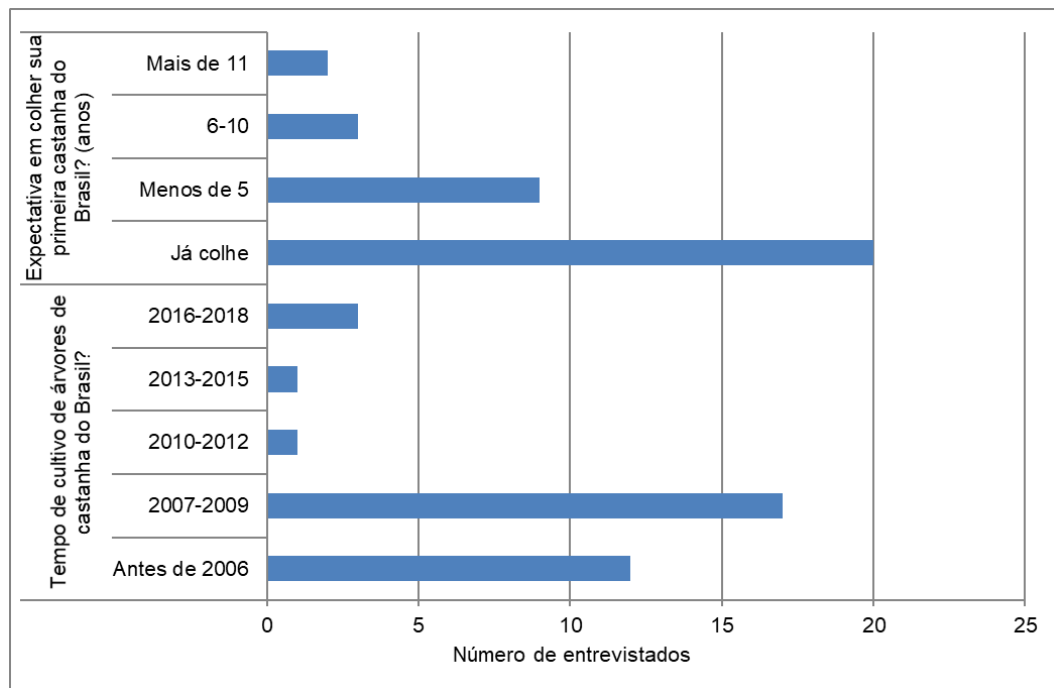
4

5

A maior parte deles iniciou o cultivo de árvores de castanha há dez anos (até o ano de 2009) e colhe a castanha na atualidade, sendo que 50% deles colhem mais de 3 sacas por ano. Mais de 50% dos produtores possui até 50 hectares, com um alto número de árvores por hectare (acima de 101 árvores); e não necessariamente as maiores propriedades é que possuem o maior número de árvores plantadas (Fig. 5 a 8).

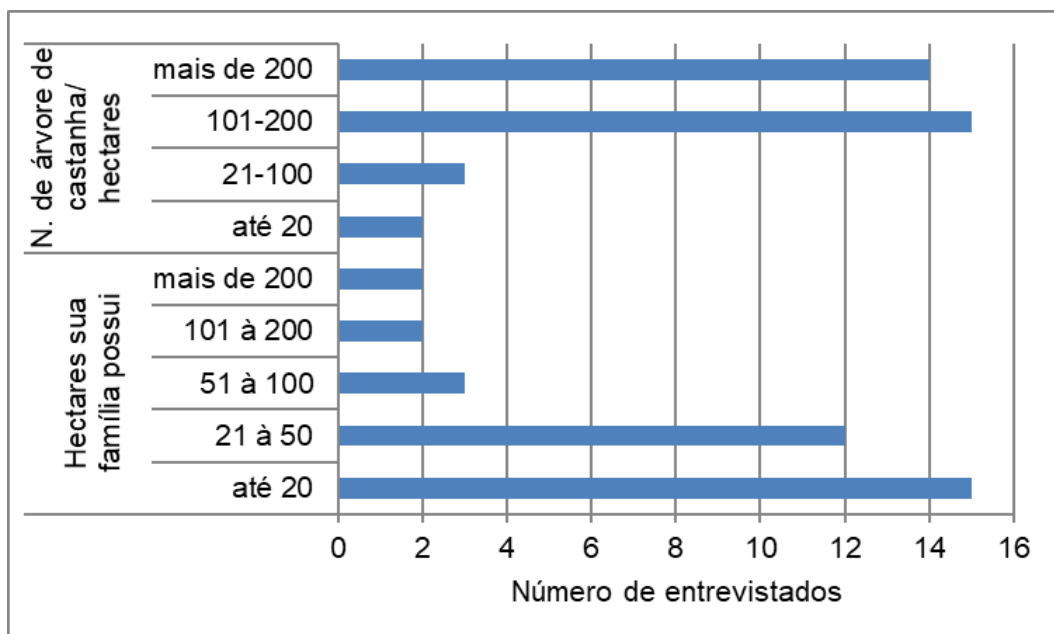
10

Figura 5. Tempo de atuação na produção de castanhas do Brasil e expectativa temporal de colheita.



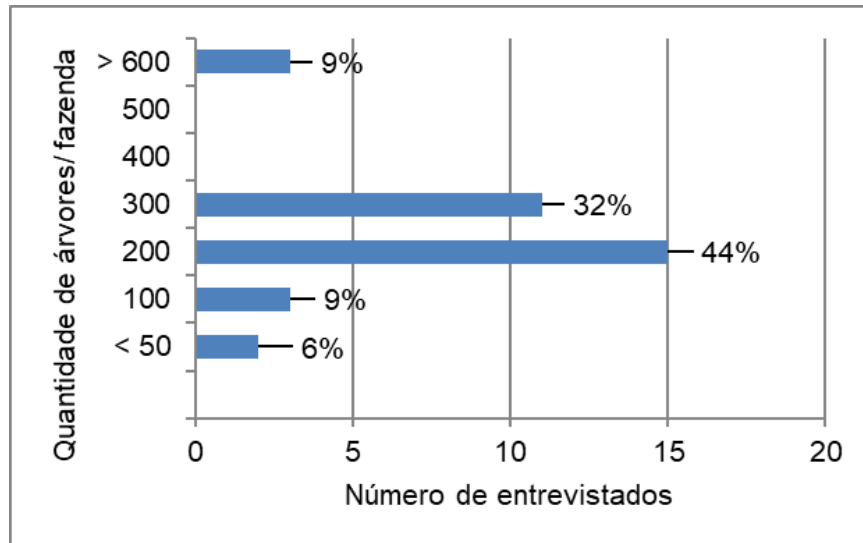
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 6. Tamanho da propriedade e número de árvores/área.



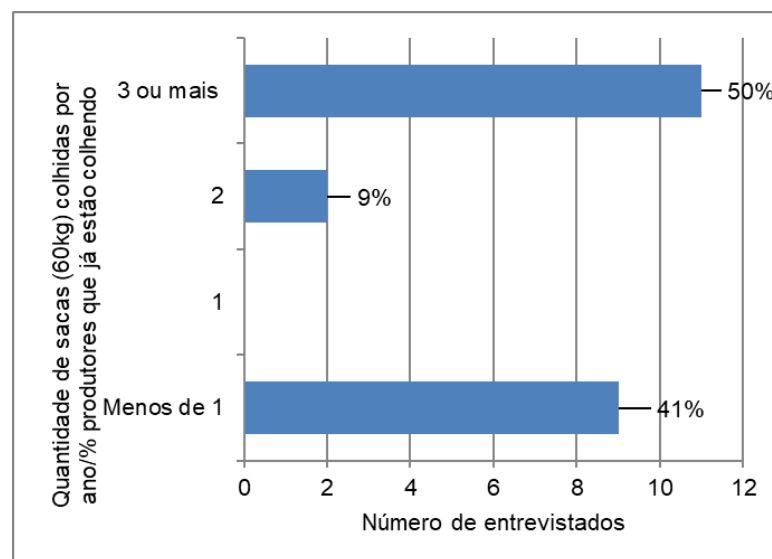
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 7. Quantidade de árvores/ fazenda (propriedade).



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 8. Quantidade de sacas colhidas por ano/ % produtores que já estão colhendo.

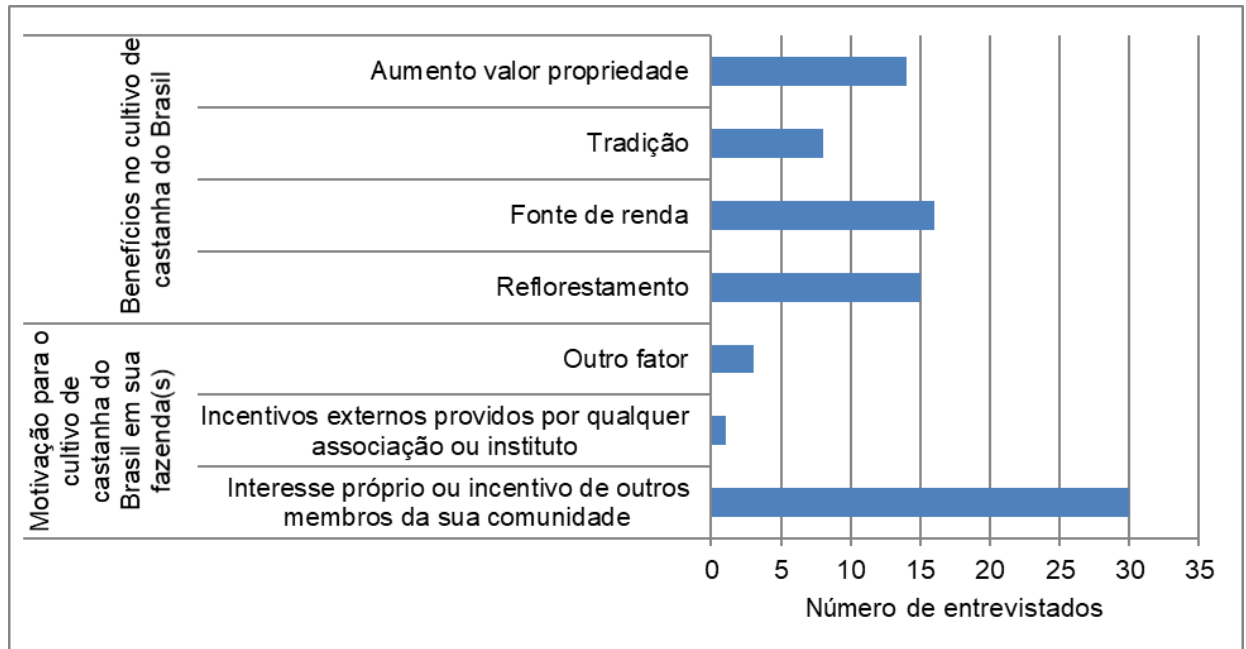


Fonte: Do próprio autor (2020).

A motivação principal ao cultivo da castanha fora de interesse próprio ou de incentivo de outros membros da comunidade, e não de agentes externos (associação ou Institutos); e os benefícios buscados são vários, destacando-se a perspectiva de fonte de renda, valorização da propriedade e reflorestamento (Fig. 9). Pode-se inferir que a alta expectativa no retorno da produção de castanhas tenha levado os produtores ao investimento, até mesmo sem o benefício de ocorrência de políticas públicas ou de incentivos de terceiros (Fig. 10). Apenas quatro produtores declararam ter recebido treinamentos em como plantar e conduzir as mudas, sendo

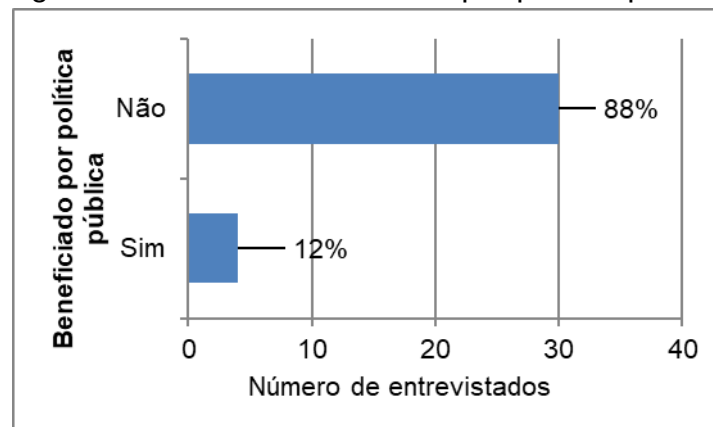
este feito pela Fazenda Aruanã e o Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM).

Figura 9. Motivação e benefícios quanto ao cultivo de castanha.



Fonte: Do próprio autor (2020).

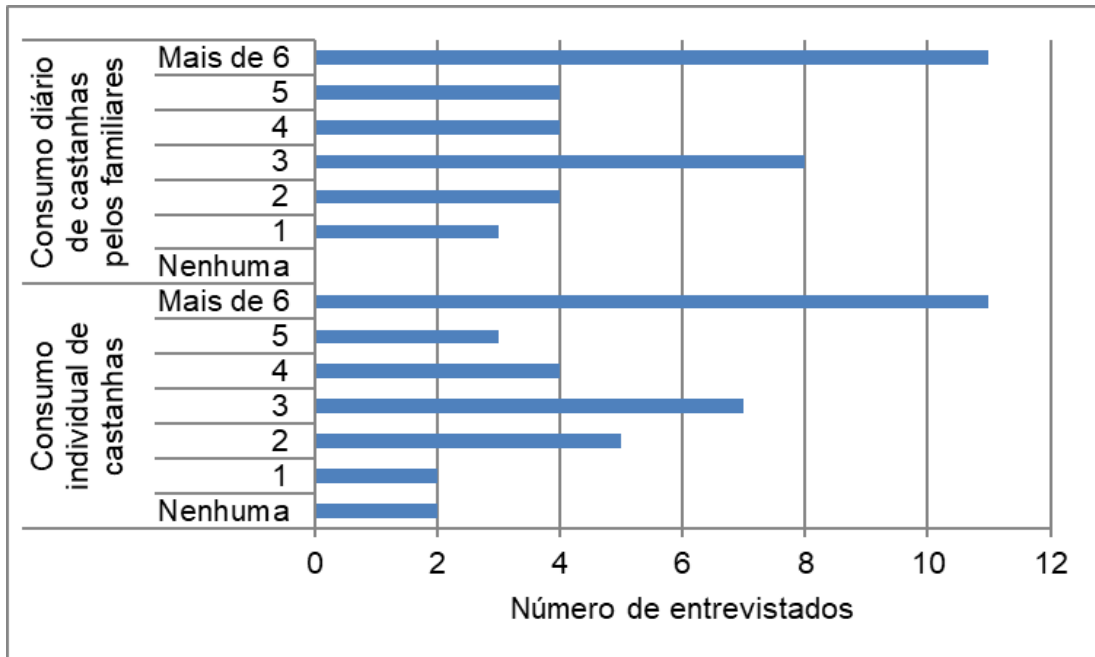
Figura 10. Produtor beneficiado por política pública.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Além de produzir, os produtores e seus familiares possuem o hábito de consumo de castanhas diariamente, como pode ser observado na figura 11 (mais expressivo de 3 ou 6 castanhas/ dia). O consumo de castanha pela família e o consumo pelo produtor possui correlação positiva (Fig. 4).

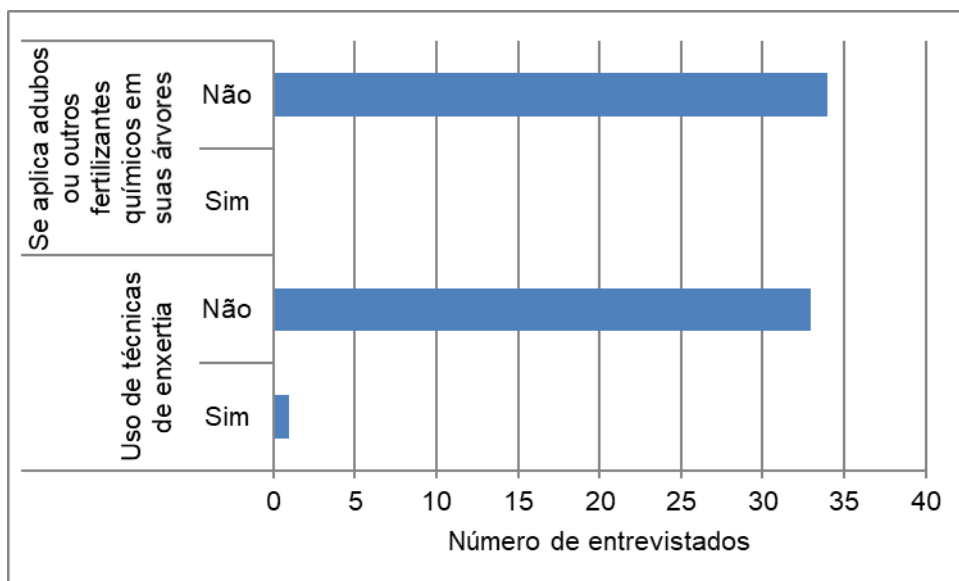
Figura 11. Consumo de castanhas.



Fonte: Do próprio autor (2020).

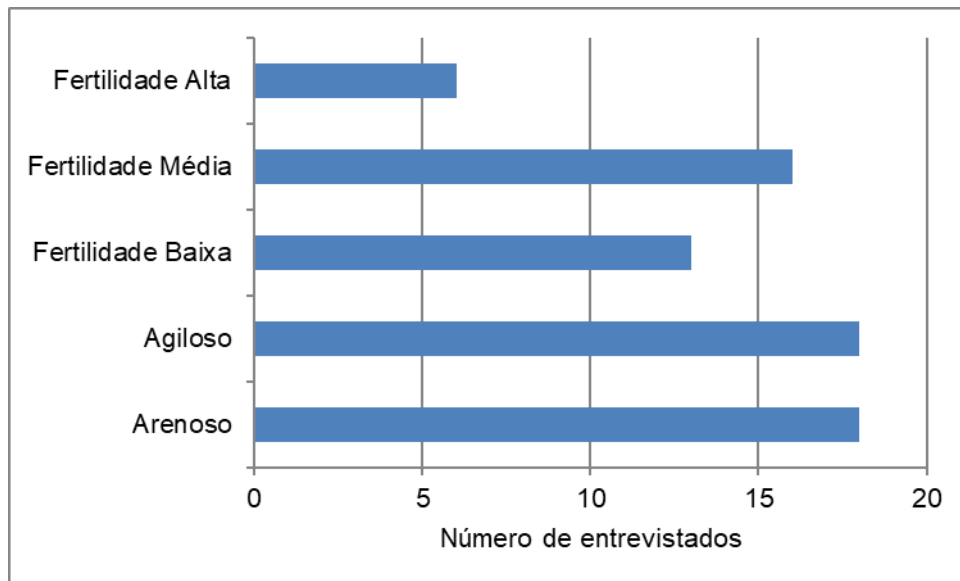
Em processo de produção, de modo amplo não se faz o uso da técnica de enxertia, tão bem como a aplicação de insumos químicos. Há um equilíbrio, em número de produtores, quanto ao tipo de solo utilizado: argiloso e arenoso. Todavia, com mais expressão de fertilidade média a baixa do solo. Há um predomínio (64%) de espaçamento de 10x5m entre linhas e entre as árvores plantadas (Fig. 12 a 14).

Figura 12. Uso de técnicas de enxertia e de insumos na produção.



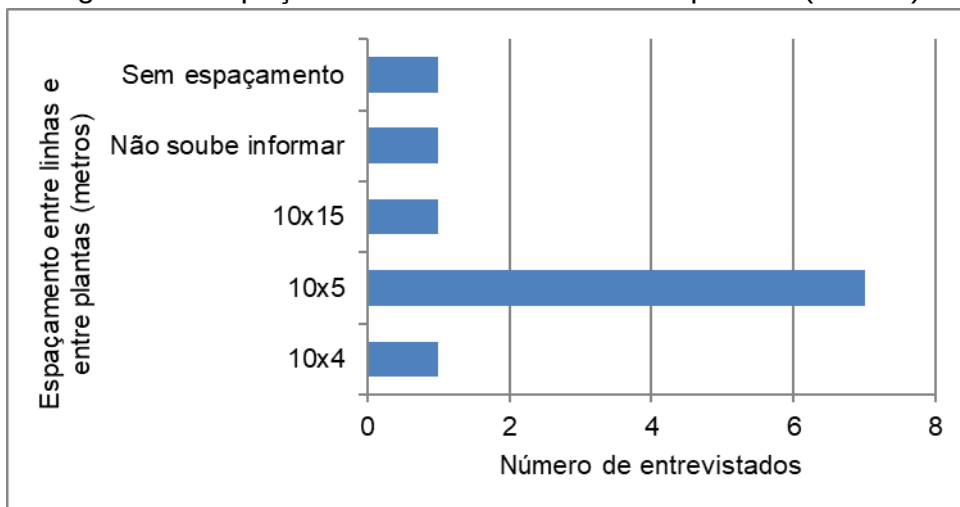
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 13. Características do solo da fazenda.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 14. Espaçamento entre linhas e entre plantas (metros).



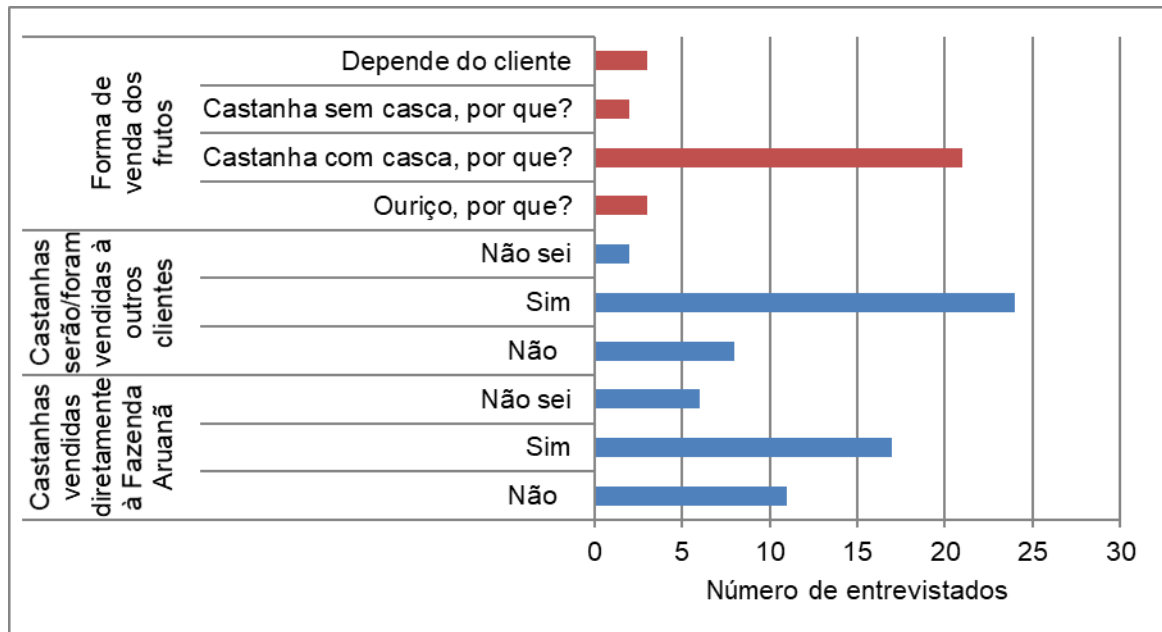
Fonte: Do próprio autor (2020).

Existe uma correlação positiva entre a textura e a fertilidade do solo (Fig. 4). Solos argilosos possuem fertilidade de média a alta. Em contra partida, os solos arenosos apresentavam fertilidade baixa. Locatelli, Vieira e Souza (2008) afirma que a castanha-do-Brasil ocorre principalmente em solos argilosos e se desenvolve melhor em solos de baixa fertilidade.

No âmbito da comercialização, 50% dos produtores responderam por suas vendas das castanhas à Fazenda Aruanã, havendo grande número deles (64%) que também optam ou optarão por comercialização a outros clientes. A forma de produto comercializada, predominantemente, é a de castanha com casca. Na relação de

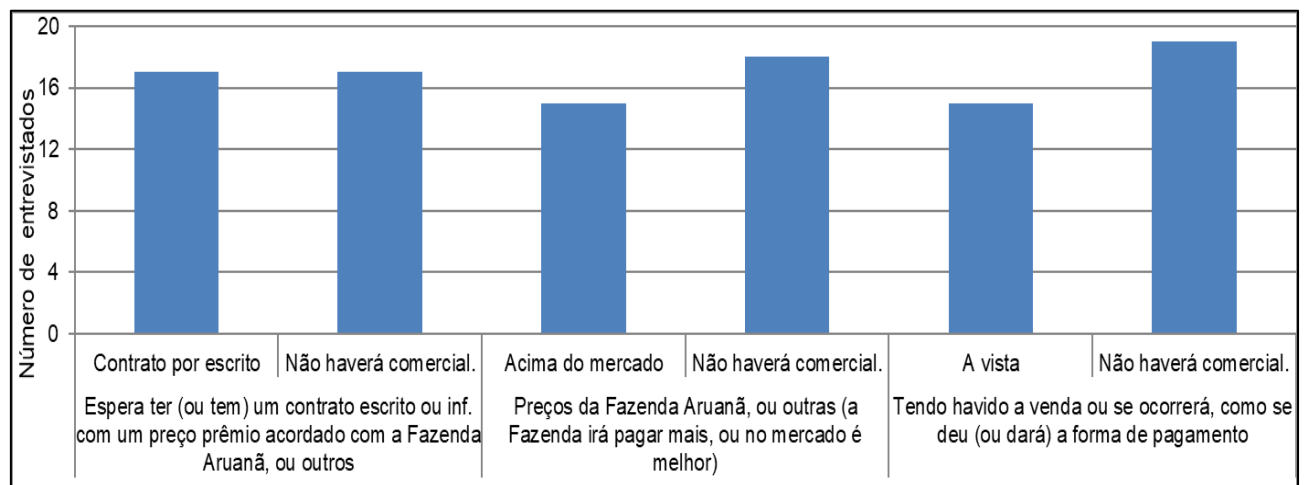
comercialização a forma de governança utilizada é a de contrato escrito e com recebimento de preços acima ao de mercado, a vista. E não exigência de atributos de qualidade especificadas pelo agente comprador; somente dois produtores realizando uma produção orgânica (Fig. 15 a 17).

Figura 15. Agentes compradores da castanha da Brasil.



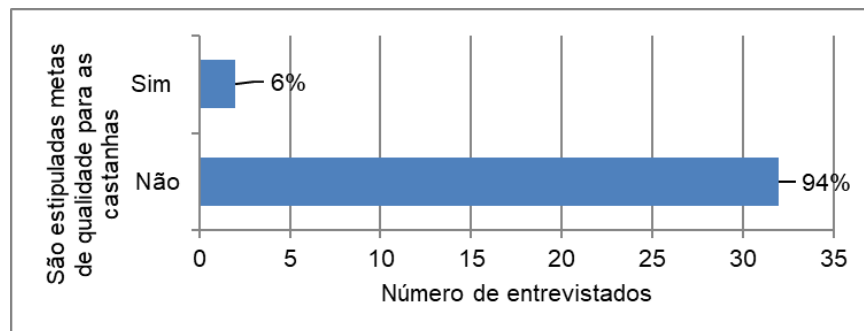
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 16. Expectativas de venda da castanha do Brasil em relação a.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 17. Existência de atributos de qualidade estipuladas pelo agente comprador da castanha.

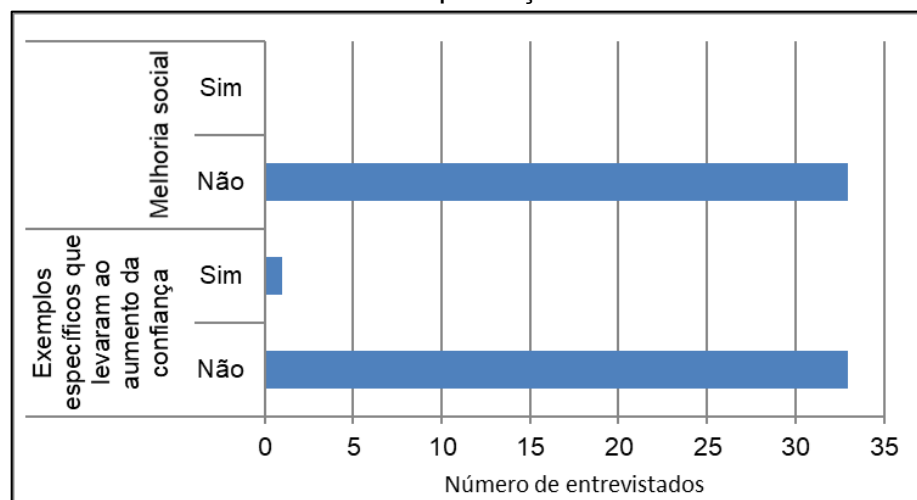


Fonte: Do próprio autor (2020).

O alto percentual de produtores que não irão comercializar sua produção está relacionado a baixa produção de castanha, média de duas sacas, uma vez que as primeiras mudas doadas pela fazenda começaram a produzir somente ano passado. Outro fator importante é que a fazenda possui certificado de produto orgânico, e para haver a compra da produção de outras fazendas as mesmas deverão possuir a mesma certificação. A exploração de produtos florestais não madeireiros gera incentivos para que as comunidades preservem e conservem as florestas se houver a melhora das condições de vida dos pequenos produtores (BAYMA *et al.*, 2014).

Ainda que a atividade de cultivo de árvores de castanhas tenha se iniciado há tempo (mais de 10 anos), na percepção dos produtores avaliados, não houve aumento no nível de confiança e melhoria de fatores sociais (fig. 18).

Figura 18. Ampliação de nível de confiança e melhoria social após a interação com a Fazenda Aruanã e produção de castanhas

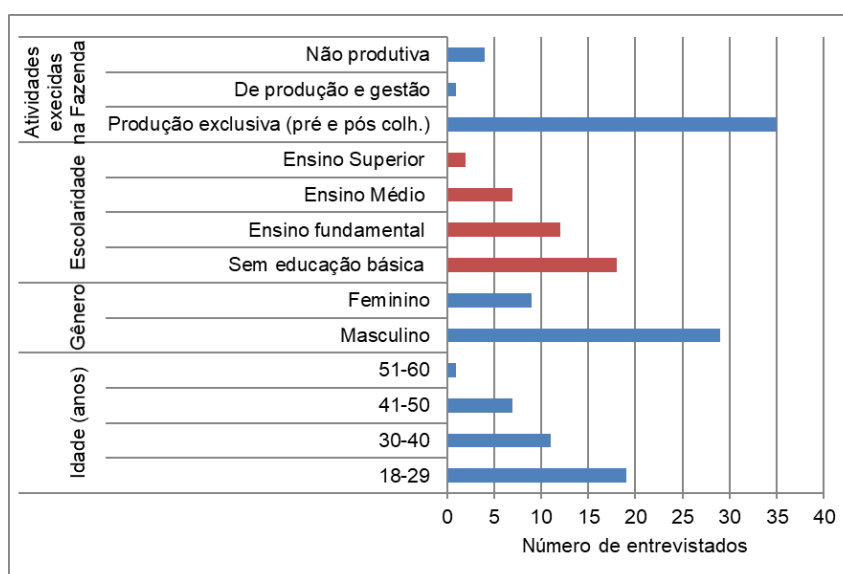


Fonte: Do próprio autor (2020).

O perfil dos funcionários entrevistados da Fazenda Aruanã é de mais jovens (18 a 40 anos) e do sexo masculino; maior parte com menor nível de instrução educacional (sem educação básica ou com ensino fundamental) e voltado às atividades de pré-colheita e pós-colheita. Há familiares também envolvidos nas atividades essas de produção (Fig. 19 e 20).

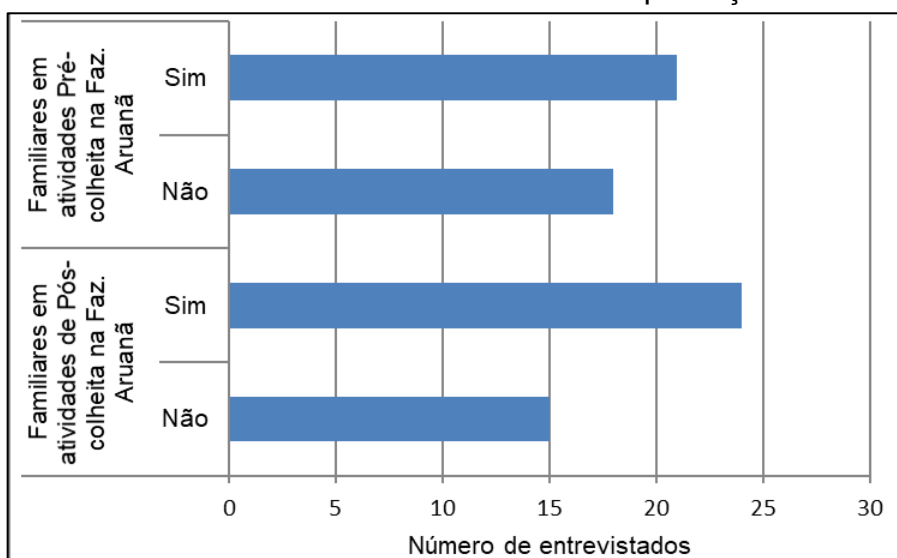
Nota-se, assim como na análise dos produtores, o consumo de castanha por esses profissionais (colaboradores da Fazenda Aruanã), em nível de 6 a mais castanhas/ dia (Fig. 21).

Figura 19. Perfil dos funcionários da Fazenda Aruanã entrevistados.



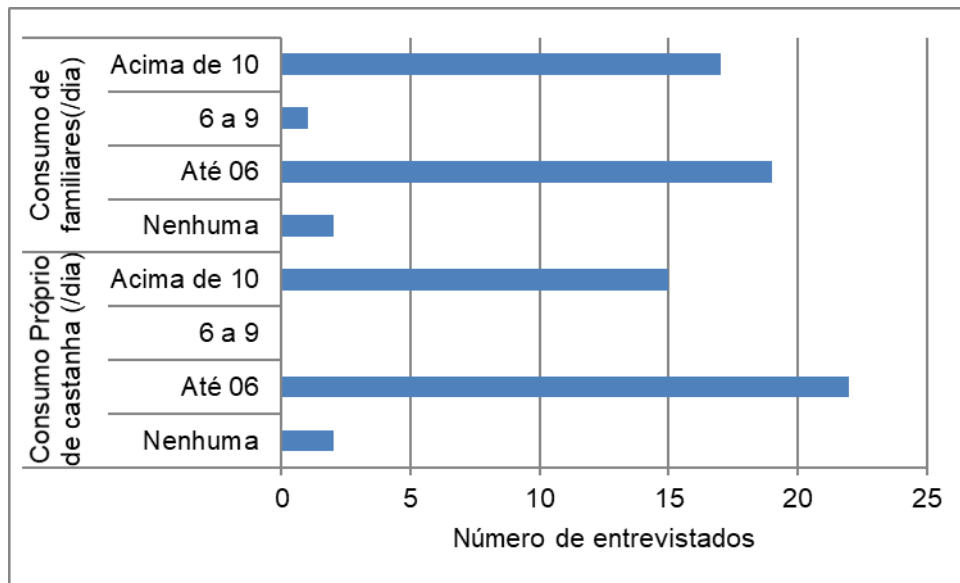
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 20. Familiares envolvidos na atividade de produção de castanha.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 21. Consumo de castanha.



Fonte: Do próprio autor (2020).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a aplicação do questionário pode-se compreender alguns aspectos tanto do perfil dos produtores e funcionários da Fazenda Aruanã, quanto dos processos de produção e comercialização da castanha. Em sua maioria, os produtores são mais velhos, com baixo nível de escolaridade. Em sua grande maioria, o principal motivo para o cultivo da castanha foi o incentivo da Fazenda Aruanã e buscam através do cultivo dessa planta a criação de renda para suas respectivas famílias. Grande parte dos produtores entrevistados tem propriedade com 200 a 300 árvores de castanha. A maior parte dos pequenos produtores pretendem comercializar seus produtos com outros clientes. A Fazenda Aruanã tem certificação para produto orgânico e seus fornecedores devem atender as mesmas exigências de produtos orgânicos.

Os funcionários da Fazenda Aruanã são em sua grande maioria homens de 18 a 40 anos, e trabalham em todas as etapas de produção da castanha-do-brasil (pré-colheita a pós-colheita).

REFERÊNCIAS

BAYMA, M.M.A. *et al.* Aspectos da cadeia produtiva da castanha-do-brasil no estado do Acre, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, Belém, v. 9, n. 2, p. 417-426, 2014.

- CAVALCANTE, K. V. *et al.* O extrativismo no século XXI: a castanha no Amazonas. **Encontro da sociedade brasileira de economia ecológica**. Brasília, DF. Brasil. v. 9, p. 1-20. Disponível em: http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/ix_en/GT4--100-20110619183937.pdf. Acesso em: 06 ago. 2020.
- COSTA, J.R.; WANDELLI, E.V.; CASTRO, A.B.C. **Aspectos silviculturais da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 10.
- HOMMA, A. K. O. Cemitério das castanheiras. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 34, n. 202, 2004.
- LOCATELLI, M. *et al.* Desenvolvimento silvicultural de castanheira-da –amazônia (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em dois sistemas de cultivo, Machadinho D´Oeste, Rondônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 10., 2016, Cuiabá. **Anais [...]**. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 2016.
- LOCATELLI, M *et al.* **Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. Sistemas de Produção, 7.
- LOCATELLI, M.; VIEIRA, A.H.; SOUZA, V.F. **Castanha-do-Brasil**. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 2010.
- SALOMÃO, R. P.; SANTANA, A. C.; BRIENZA JUNIOR, S. Seleção de espécies da Floresta Ombrófila Densa e indicação da densidade de plantio na restauração florestal de áreas degradadas na Amazônia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 139-151, 2013.
- SCOLES, R.; GRIBEL, R.; KLEIN, G. N. Crescimento e sobrevivência de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em diferentes condições ambientais na região do rio Trombetas, Oriximiná, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, Belém, v. 6, n. 3, p. 73-293, 2011.
- SOUZA, M. L. de. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-brasil com mandioca**. Campinas. 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- SOUZA, C. R. I *et al.* **Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. Documentos, 60.
- SOUZA, N. S. *et al.* Perfil socioeconômico dos produtores de mudas cítricas de uma comunidade em Capitão Poço, PA. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**, Jandaia, v. 5, n. 10, p. 140, 2018.
- VILHENA, M. R. **Ciência, tecnologia e desenvolvimento na economia da castanha-do-brasil – a transformação industrial das castanha-do-brasil na**

- 1 **COMARU- Região Sul do Amapá.** 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado) -
- 2 Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 3



Caracterizando a variação e acúmulo de selênio (Se) em castanhas do Brasil no estado do Amazonas, utilizando um programa de participação da população.

Questionário para funcionários e gerentes da Fazenda Aruanã. Esta pesquisa faz parte de um estudo mais amplo, que busca a compreensão de (1) A relação entre os solos, a produção e a qualidade da Castanha do Brasil, e (2) as relações sociais e econômicas entre a Fazenda Aruanã e os pequenos produtores/agricultores de Castanha do Brasil na região amazônica. Este levantamento inicial será acompanhado por interações mais detalhadas com um subconjunto dos participantes desta pesquisa.

Por favor, note que todas as perguntas são opcionais. Obrigada pela sua participação.

Nome do entrevistador: _____ **Data :** ____/____/____

Informações Pessoais (para todos os funcionários)		
1. Nome Completo:		
2. Idade	3. Gênero	4. Nacionalidade
5. Cargo exercido (período integral/meio período, temporada etc.)		6. Há quantos anos trabalha na Fazenda Aruanã?
7. Escolaridade () Sem educação básica () Ensino fundamental () Ensino Médio () Ensino Superior () Pós-graduação () Não especificado		
8. Endereço		

9. Telefone	10. Celular	11. E-mail
12. Descreva brevemente suas funções na Fazenda Aruanã. ☐ Atividade produtiva: ☐ Pré-colheita ☐ Pós-colheita ☐ Atividade não-produtiva: gestão		
Caracterização da Organização (para todos os funcionários)		
13. Quantos familiares contribuem nas atividades de pré-colheita de castanha do Brasil na Fazenda Aruanã?		
14. Quantos familiares contribuem nas atividades de pós-colheita de castanha do Brasil na Fazenda Aruanã?		
15. Gostaria de acrescentar mais comentários sobre seu trabalho na Fazenda Aruanã, ou sobre os pequenos produtores de castanha do Brasil na região amazônica? (gestor e funcionário)		
16. Você come castanha do Brasil? Se sim, aproximadamente quantas castanhas você come em um dia típico? (gestor e funcionário)		
17. Os membros da sua família comem castanha do Brasil? Se sim, aproximadamente quantas castanhas eles comem em um dia típico? (gestor e funcionário)		



Caracterizando a variação e acúmulo de selênio (Se) em castanhas do Brasil no estado do Amazonas, utilizando um programa de participação da população.

Questionário para pequenos produtores/comunidade produtora de castanha do Brasil. Esta pesquisa faz parte de um estudo mais amplo, que busca a compreensão de (1) A relação entre os solos, a produção e a qualidade da Castanha do Brasil, e (2) as relações sociais e econômicas entre a Fazenda Aruanã e os pequenos produtores/agricultores de Castanha do Brasil na região amazônica. Este levantamento inicial será acompanhado por interações mais detalhadas com um subconjunto dos participantes desta pesquisa. **Por favor, note que todas as perguntas são opcionais. Obrigada pela sua participação.**

Nome do entrevistador: _____ **Data :** ____/____/____

Informações pessoais		
1. Nome Completo		
2. Idade	3. Gênero	4. Nacionalidade
5. Descreva sua ocupação atual.		6. Há quantos anos trabalha nessa ocupação?
7. Escolaridade		
() Sem educação básica () Ensino fundamental () Ensino Médio () Ensino Superior () Pós-graduação () Não especificado		
Você fala alguma língua indígena? Se sim, qual língua indígena você fala?		
8. Endereço, incluindo vila, comunidade, e filiações tribais.		

9. Telefone	10. Celular	11. E-mail
Caracterização da Fazenda		
12. Você se descreve como um pequeno produtor? ☐ Não ☐ Sim ☐ ; Outra descrição _____		
13. Sua fazenda possui status DAP? (DAP=Declaração de Aptidão ao PRONAF; Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar) ☐ Não, por quê? ☐ Sim ☐ Não sei/não sei o que é DAP		
14. Há quanto tempo você está envolvido na agricultura de pequena escala (pequeno produtor)? ☐ Menos que 10 anos ☐ 11-20 anos ☐ 21-30 anos ☐ 31-40 anos ☐ 41-50 anos		
15. Quantas fazendas, e/ou quantos hectares sua família possui? Quantas árvore de castanha ☐ Número de fazendas _____ ☐ hectares _____ha ☐ número de árvores de castanha _____ Qual é sua relação com a terra: ☐ dono/proprietário ☐ posse ☐ arrendamento		
16. Você considera a renda da sua família: ☐ baixa, ☐ média, ou ☐ alta, em relação aos outros membros da sua comunidade? (por favor, escolha apenas uma) Você é beneficiado por algum programa de política pública? Qual? ☐ Não, por quê? ☐ Sim		
17. Quantos de seus familiares estão envolvidos na agricultura familiar? Pais/ avós ☐ Não ☐ Sim; quantos? _____		

Esposa/Esposo	() Não () Sim
Filha(s)	() Não () Sim; quantos? _____
Filho(s)	() Não () Sim; quantos? _____
Outros	() Não () Sim; quantos? _____
18. Você emprega não-familiares na sua fazenda(s)? () Não () Sim; quantos funcionários permanentes? _____ ; quantos funcionários temporários/safra? _____.	
19. Gostaria de compartilhar alguma outra informação sobre sua fazenda(s) ou família?	
Atividades na Fazenda e Produção de castanhas do Brasil	
20. Descreva brevemente as atividades agropecuárias que são realizadas na sua fazenda(s).	
21. Na sua opinião, quais atividades na sua fazenda(s) trazem os maiores lucros e por quê?	
22. Há quanto tempo você tem cultivado árvores de castanha do Brasil na sua fazenda(s)? () antes de 2006 () 2007-2009 () 2010-2012 () 2013-2015 () 2016-2018	
23. Qual é a circunferência do tronco da sua maior árvore de castanha do Brasil (medição na “altura do peito” em centímetros)? Cultivada Extrativismo	
24. Em quanto tempo você espera colher sua primeira castanha do Brasil?	
25. Se você já está colhendo castanha do Brasil na sua fazenda(s), aproximadamente quantas castanhas, ou quilos de castanha	

you colhe por ano?

26. Você atualmente colhe castanhas do Brasil de árvores nativas/silvestres?
 () Não () Sim; quantos a cada ano? _____; há quantos anos? _____

27. Você tem conhecimento de outras famílias dentro da sua comunidade, ou famílias de outras comunidades, que cultivam castanha do Brasil em suas fazendas?

Dentro da sua comunidade: () Não () Sim; quantos e área, se conhecido? __ _

Dentro de outras comunidades: () Não () Sim; quantos e área, se conhecido? _____

28. Qual foi sua motivação para o cultivo de castanha do Brasil em sua fazenda(s)?

() Foi interesse próprio, ou foi incentivo de outros membros da sua comunidade?

() Foram incentivos externos providos por qualquer associação ou instituto?

() Foi algum outro fator?

29. Quais são os benefícios no cultivo de castanha do Brasil? (Possíveis respostas: questão cultural, tradição, familiar, econômico, edafoclimático)

30. Por favor, você pode fornecer uma breve descrição da área de castanha do Brasil em sua fazenda(s)? Por exemplo:

(a) Descreva o solo da sua fazenda (tipo de solo, fertilidade, outros fatores)

(b) Quais outras culturas você cultiva?

(c) Qual é o espaçamento entre linhas e entre plantas?

(d) Você realiza técnicas de enxertia em suas plantas de castanha do Brasil?

(e) Você aplica adubos ou outros fertilizantes químicos em suas árvores?

(f) Há algum outro detalhe que você gostaria de compartilhar?

31. Você recebeu:

- treinamentos (Pela Fazenda, instituto ou outro agente);
- suporte de serviços de extensão (Fazenda, instituto, órgão estadual, federal, ONG, outros),
- ou financiamento/outros incentivos para o cultivo de castanha do Brasil? Por favor, forneça detalhes.

Marketing das Castanhas do Brasil e Relacionamento com Fazenda Aruanã

32. As castanhas do Brasil produzidas na sua fazenda(s) serão/foram vendidas diretamente à Fazenda Aruanã?

() Não () Sim () Não sei

33. As castanhas do Brasil produzidas na sua fazenda(s) serão/foram vendidas à outros clientes?

() Não () Sim () Não sei

34. Como você vende os frutos? Por exemplo, você pretende vender suas castanhas no fruto, ou a castanha com casca, ou a castanha sem casca (possivelmente tratados e/ou esterilizados)? Por favor, fornecer o máximo de informações que você gostaria de compartilhar.

() ouriço, por que?

() castanha com casca, por que?

() castanha sem casca, por que?

35. Você come castanha do Brasil? Se sim, aproximadamente quantas castanhas você come em um dia típico?

36. Seus familiares comem castanhas do Brasil? Se sim, aproximadamente quantas castanhas eles comem em um dia típico?

37. Você gostaria de consumir a castanha do Brasil produzida em sua própria fazenda(s)?

38. Quando você (comercializou) ou começar a colher as castanhas do Brasil, quais suas expectativas em relação a:
- (a) Você espera ter (ou tem) um contrato escrito ou de boca com um preço prêmio acordado com a Fazenda Aruanã, ou outros? Há confiança?
 - (b) Preços, da Fazenda Aruanã, ou outras (você acha que a Fazenda vai te pagar mais, ou no mercado é melhor?)?
 - (c) Tendo havido a venda ou se ocorrerá, como se deu (ou dará) a forma de pagamento? (a vista; parcelado..)

39. Como você pretende entregar suas castanhas do Brasil à Fazenda Aruanã, ou outros? Seu(s) cliente(s) virá(ão) à sua fazenda para comprar as castanhas, ou você irá entregar as castanhas para eles?
- () produtor entrega
 - () cliente busca
- Quem arca com o frete:
- () produtor
 - () cliente

40. São estipuladas metas de qualidade para suas castanhas? Se sim, você sabe se (são) serão definidas localmente, ou em conjunto com a Fazenda Aruanã, ou outros? Você têm outros comentários sobre a qualidade do produto, e se estas devem ser determinadas por seus clientes?

41. Você espera, ou deseja, receber investimentos da Fazenda Aruanã, ou outros? Se sim, por favor descreva o investimento que traria maior benefício (por exemplo, apoio financeiro ou de formação, mais mudas, etc.).

(PS. O senhor gostaria de receber mais ajuda da fazenda Aruna?

42. Como você descreveria seu relacionamento com a Fazenda Aruanã e o *Instituto Excelsa* em termos de confiança

- a) Você pode dar exemplos específicos que levaram ao aumento da confiança?
- b) Você notou qualquer melhoria social?
- c) Há alguma sugestão para melhorar suas interações com a Fazenda Aruanã e o *Instituto Excelsa*?
- d) Você recomendaria a outras famílias, comunidades a se envolverem?

3. CAPÍTULO 3 – APLICAÇÕES EXÓGENAS DE SELÊNIO (Se) AUMENTAM AS CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO EM RAÍZES E CAULES DE MUDAS DE CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*) AO CUSTO DO ESTRESSE OXIDATIVO DA PLANTA EM ALTAS TAXAS DE APLICAÇÃO

Resumo - As castanhas do Brasil são a fonte alimentar mais conhecida de selênio (Se) para a dieta humana em todo o mundo. Apesar da importância nutricional, a faixa entre os efeitos benéficos e tóxicos da Se nas plantas é estreita. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos fisiológicos e bioquímicos do Se sobre a resposta antioxidante, compostos nitrogenados, concentração de açúcar, e a distribuição da concentração de Se nas raízes, caules e folhas das plântulas de castanha do Brasil. Foram testadas cinco concentrações de Se (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 kg ha⁻¹) e duas fontes de Se (selenato de sódio e selenito de sódio). As plantas fertilizadas com selenato mostraram maior concentração de Se nas folhas, enquanto que as plantas fertilizadas com selenito mostraram maior concentração de Se nas raízes e no caule. A aplicação de até 2 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenito de sódio nas mudas de castanha do Brasil aumentou significativamente a síntese de clorofila, carotenóides e feofitina, aumentando a eficiência fotossintética e as concentrações de sacarose e aminoácidos. A peroxidação lipídica, o açúcar total e a sacarose aumentaram, e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX) diminuíram devido à aplicação de Se - mostrando o estresse oxidativo promovido pelas elevadas taxas de Se. Contudo, não foram observados sintomas visuais de toxicidade de Se nas folhas das mudas nas taxas mais elevadas de Se. A diminuição das atividades de APX, e o aumento do acúmulo total de açúcar, sacarose, amônia e aminoácidos nas folhas foram as principais respostas fisiológicas e bioquímicas das mudas de castanha do Brasil sob níveis elevados de exposição a Se.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes; metabolismo antioxidante; selenato; selenito; pigmentos fotossintéticos; respostas fisiológicas.

Abstract - Brazil nuts are the most known food source of selenium (Se) for the human diet worldwide. Despite the nutritional importance, the range between benefit and toxic effects of Se in plants is narrow. This study aimed to investigate the

physiological and biochemical effects of Se on the antioxidative response, nitrogen compounds, sugar concentration, and the distribution of Se concentration in roots, stems and leaves of Brazil nut seedlings. Five Se rates (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 kg ha⁻¹) and two Se sources (sodium selenate and sodium selenite) were tested. Total Se concentration was found in large concentration in roots, stem and leaves, respectively. Plants fertilized with selenate showed higher Se concentration in leaves, whereas plants fertilized with selenite showed higher Se concentration in roots and stem. Application up to 2 kg ha⁻¹ of Se as sodium selenite in Brazil nut seedling significantly increased the synthesis of chlorophyll, carotenoids and flavonoids, augmenting the photosynthetic processing and lead the high amount of sucrose and aminoacids. Lipid peroxidation, total sugar and sucrose increased, and the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) activities decreased due to Se application - showing the oxidative stress promoted by high Se rates. However, no visual symptoms of Se toxicity in seedling leaves were observed at higher Se rates. Decreased APX activities, and increased total sugar, sucrose, ammonia and aminoacids accumulation in leaves were the main physiological and biochemical responses of Brazil nut seedlings under high levels of Se exposure.

Key-words: Antioxidant enzymes; antioxidant metabolism; selenate; selenite; photosynthetic pigments; physiological responses.

3.1 INTRODUÇÃO

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma planta nativa da região amazônica amplamente distribuída por toda esta região. Apresenta grande importância social, ecológica e econômica para a região, onde milhares de famílias e pequenos produtores utilizam as suas castanhas como fonte de renda e alimento (WADT; KAINER, 2012). Os seus frutos são a maior fonte alimentar conhecida de selênio (Se) para a dieta humana e animal, e tem sido objeto de muitos estudos, devido à grande variabilidade das concentrações de Se nas castanhas, até 512 mg Se kg⁻¹ (Freitas *et al.*, 2004; Dumont *et al.*, 2006). As espécies vegetais cuja concentração de Se foliar é superior a 1 mg g⁻¹ de matéria seca, são definidas como Se-hiperacumuladoras (BRANCO, 2016), tais como a árvore selecionada para este estudo.

1 O selênio é um elemento traço que desempenha papel essencial na saúde
2 humana e animal (RAYMAN, 2012). Por outro lado, possui efeitos benéficos no
3 crescimento das plantas, uma vez que pode melhorar o estado nutricional de plantas
4 vasculares e ajudar a resistir aos eestressees oxidativos, bióticos e abióticos
5 (GRAHAM *et al.*, 2007; FORDYCE 2013; WHITE, 2016; REIS *et al.*, 2017). Vários
6 estudos demonstraram que a aplicação de baixos níveis de Se pode melhorar o
7 metabolismo antioxidante das plantas (EICHE *et al.*, 2015; EKANAYAKE *et al.*, 2015;
8 NAWAZ *et al.*, 2015; JING *et al.*, 2017). Em contrapartida, níveis elevados deste
9 elemento induzem diferentes efeitos tóxicos nas plantas; reduzem a eficiência
10 fotossintética e o crescimento das raízes, a clorose e a morte das plantas (VAN
11 HOEWYK 2013). No entanto, algumas espécies vegetais podem crescer em solos
12 que contém grandes concentrações deste elemento e ainda acumular concentrações
13 elevadas no tecido vegetal (PILON-SMITS *et al.*, 2016). Não há informação sobre
14 árvores de castanha do Brasil que crescem em diferentes concentrações Se no solo.

15 Apesar da importância nutricional, a faixa entre níveis deficientes e tóxicos de
16 Se é estreita (SCHIAVON AND PILON-SMITS, 2017; SILVA *et al.*, 2018). O
17 eestressee causado pelas elevadas concentrações de Se nas plantas pode alterar
18 as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de
19 hidrogênio (H₂O₂) e induzir elevadas taxas de peroxidação lipídica nas membranas
20 celulares (MOSTOFA *et al.*, 2017). As EROs são um indício de estresse nas plantas,
21 indicando danos na célula da planta, mas também atuam como moléculas de
22 sinalização em resposta a compostos eestresseantes nos tecidos da planta
23 (WRZACZEK; BROSCHE; KANGASJÄRVI, 2013; LUO *et al.*, 2016). O estresse
24 abiótico nas plantas é avaliado também pelo aumento de enzimas antioxidantes
25 como o ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), e catalase (CAT)
26 em resposta a elevados níveis de exposição a metais pesados (REIS *et al.*, 2017;
27 SANTOS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

28 A absorção de selênio pelas plantas é regulada pela fonte e disponibilidade
29 de Se no solo (BRANCO, 2018). Diferentes fontes de Se, tais como selenato e
30 selenito, apresentam comportamentos distintos no solo e nas plantas. Por exemplo,
31 a absorção, assimilação e translocação de selenato é mais rápida do que a de
32 selenito (GUPTA; GUPTA, 2017). O selenato é a principal forma de Se em solos
33 oxigenados, e o selenito encontra-se em ambientes anaeróbios (BRANCO, 2016).

A adição de selênio através de fertilizantes está envolvida na melhoria da qualidade dos produtos agrícolas (REIS *et al.*, 2018). Contudo, existe pouca informação sobre a aplicação da Se em mudas de castanhas do Brasil. Este estudo visou investigar os efeitos fisiológicos e bioquímicos de diferentes concentrações e fontes de Se (selenato de sódio e selenito de sódio) sobre as respostas antioxidantes, compostos nitrogenados, concentração de açúcar, crescimento e distribuição da concentração de Se nas raízes, caules e folhas de mudas de castanhas do Brasil.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e desenho experimental

O experimento foi realizado entre os meses de Julho e Agosto de 2018, na Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, em Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20°25' S e 51°20'O, 335 m). de acordo com a classificação climática de Köppen, o clima da região é Aw, tropical úmido, como estação chuvosa no verão e seca no inverno (CLEMENT, 2000).

O experimento foi conduzido em bancadas ao ar livre. O solo foi coletado na camada de 0-0,20 m, na Fazenda de Estudo, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) no município de Selviria, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (20°20'43"S; 51°24'7"O, 355 m). O solo foi seco ao ar e peneirado com uma peneira de 4 mm; em seguida, foram retiradas subamostras para a caracterização dos atributos químicos.

O solo foi classificado como: Latossolo Vermelho distrófico típico, com textura argilosa de acordo com Santos *et al.* (2018), com as seguintes características químicas: pH (CaCl₂) 4,6; fósforo (resina) 5 mg dm⁻³; enxofre 2 mg dm⁻³; potássio 1,3 mmolc dm⁻³; cálcio 5 mmolc dm⁻³; magnésio 4 mmolc dm⁻³; H + Al (tampão SMP) 18 mmolc dm⁻³; capacidade de troca catiônica (pH 7,0) 28,3 mmolc dm⁻³; saturação de base (V%) 36 %; boro 0,20 mg dm⁻³; cobre 1,0 mg dm⁻³; ferro 30 mg dm⁻³; manganês 11,0 mg dm⁻³; zinco 0,5 mg dm⁻³; Se total 3,6 µg dm⁻³; e matéria orgânica 15 g dm⁻³. Os atributos químicos do solo foram determinados conforme descrito por Raij *et al.* (2001). O calcário foi aplicado afim de aumentar a saturação de base até 50%, utilizando cal viva com 32% CaO, 15% MgO, poder neutralizante eficaz de 94,5%. A fertilização na base consistiu em 100 g de superfosfato triplo (EMBRAPA, 1995).

Mudas homogêneas de castanha do Brasil foram cultivadas até um ano de idade e então transplantadas para vasos com uma capacidade de 15 L. Cada vaso continha uma muda com 1 metro de altura e 10 folhas por planta, aproximadamente. As mudas foram cultivadas em vasos contendo substrato composto e solo (1:1 v/v).

Foi utilizado um desenho experimental em bloco casualizados, com um esquema fatorial de 5 x 2, onde, cinco concentrações de Se (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 kg ha⁻¹), e duas fontes Se (selenato de sódio e selenito de sódio) com quatro réplicas, num total de 40 vasos. Uma solução estoque contendo Se foi preparada, diluída e aplicada nos vasos. A irrigação foi realizada com base no cálculo da capacidade de campo do solo, utilizando um tensiômetro, sempre mantendo a capacidade do campo do solo acima de 60% (Boyer, 1976). As mudas foram expostas a diferentes concentrações de Se durante 12 dias. Posteriormente, as folhas foram colhidas em nitrogênio líquido para determinação da atividade enzimática anti-oxidante, concentração de açúcar, nitrato, amônia, aminoácidos e análise fotossintética dos pigmentos. A fim de avaliar a concentração de Se em diferentes partes do tecido vegetal, as mudas foram colhidas e separadas em folhas, caule e raízes.

3.2.2 Análise da concentração de Se

A folhas, caule e raízes de 3 repetições foram coletadas 12 dias após a aplicação dos tratamentos, secas e utilizadas para a quantificação de Se. As amostras de folha, caule e raiz foram digeridas num forno de microondas durante 30 min sob pressão controlada (20 bar), em 6 ml de ácido nítrico a 20% (Subbulhar), 2 ml de peróxido de hidrogênio (Merck) e completadas com água milli-Q até ao volume de 15 ml. Para o controle de qualidade analítica, as análises foram certificadas utilizando o padrão BCR 402 (trevo branco) (Sigma-Aldrich). Foram analisadas amostras de referência em branco e certificadas juntamente com a digestão de cada lote, que apresentou uma recuperação de 100%. A análise de selênio foi realizada por espectroscopia de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). A concentração de selênio final foi expressa em mg kg⁻¹ de matéria seca.

3.2.3 Análise do estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes

A folha de diagnóstico (terceira folha totalmente expandida) de cada tratamento foi colhida, congelada em nitrogênio líquido e subsequentemente

armazenada num congelador a -80 °C até à análise da atividade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), malonaldeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR).

Para quantificar a atividade de proteína total, superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), catalase (CAT, 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC:1.11.1.11) e glutathione redutase (GR, EC:1.6.4.2), pesou-se aproximadamente 1,5 g de material vegetal congelado e depois macerou-se em nitrogénio líquido utilizando almofariz e pistilo. Ao material macerado foram adicionados 4 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de ditioneitol (DTT) e 4% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) usando um método adaptado de Santos *et al* (2017). O material foi homogeneizado num vórtice e depois centrifugado numa centrifuga refrigerada a 9.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.

3.2.4 Peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada de acordo com Alexieva *et al.* (2001). Aproximadamente 400 mg de material vegetal congelado foi pesado e depois macerado em nitrogénio líquido usando almofariz e pistilo. Ao material macerado foram adicionados 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em um tubo Falcon de 15 ml. O material foi homogeneizado num vortex e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Depois, foram pipetados 200 µL de sobrenadante, ao qual foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, e 800 µL de solução de 1 M de iodeto de potássio. As amostras foram mantidas em gelo durante uma hora. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 390 nm num espectrofotómetro. A concentração foliar de peróxido de hidrogênio foi calculada utilizando uma curva padrão, e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MF.

3.2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, ou malonaldeído (MDA), foi medida de acordo com o método descrito por Heath e Packer (1968). Utilizando um almofariz e pistilo, 400 mg de material vegetal foi macerado em nitrogénio líquido. Ao material macerado foram adicionados 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) + 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) em um tubo Falcon de 15 ml. O material

homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A reação foi iniciada pela adição de 250 µL de sobrenadante e 1 ml de ácido tricloroacético 20% + 0,5% de solução de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram mantidas num banho seco a 95°C durante 30 minutos e subsequentemente transferidas para uma caixa sobre gelo durante 10 minutos. O material foi então centrifugado novamente a 10.000 rpm durante 10 minutos. A absorbância foi lida a dois comprimentos de onda, 535 e 600 nm, e os resultados foram expressos em nmol MDA g⁻¹ MF (massa fresco).

3.2.6 Atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi quantificada de acordo com (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Usando uma câmara de reação sob iluminação de lâmpada fluorescente 15-W a 25°C, 50 µL de amostra foi adicionado a 5 ml de uma solução contendo 50 mmol L⁻¹ tampão de fosfato de potássio, pH 7,8, 13 mmol L⁻¹ metionina, 75 mmol L⁻¹ nitroblue tetrazólio (NBT), 0,1 mmol L⁻¹ EDTA e 2 µmol L⁻¹ riboflavina. As amostras foram colocadas na câmara que foi protegida de qualquer luz exterior e mantida sob iluminação de lâmpadas fluorescentes durante 25 minutos. As amostras foram então homogeneizadas por vórtice, e a absorbância foi lida a 560 nm num espectrofotómetro, os resultados foram expressos como U SOD mg proteína⁻¹.

3.2.7 Atividade da Catalase (CAT, 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela monitorização da degradação de H₂O₂ de acordo com o método descrito por Reis *et al.* (2015). Um mililitro de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 2,5 µL de H₂O₂ (30%) foram adicionados a 5 µL do extrato proteico, e as amostras foram imediatamente vortexadas. A determinação da decomposição de H₂O₂ foi realizada a intervalos de 2 minutos a 25°C num espectrofotómetro a 240 nm, e os resultados foram expressos em µmol mg protein⁻¹.

3.2.8 Atividade da Ascorbato peroxidase (APX, EC:1.11.1.11)

A atividade do ascorbato peroxidase foi quantificada de acordo com Moldes *et al.* (2008). A 100 µL de extrato de planta foi adicionado 1,6 ml de tampão fosfato de

potássio 80 mM, pH 7,0, 300 μ L de ascorbato 5 mM e 300 μ L de EDTA 1 mM, seguido de incubação num banho de água a 30 °C durante 5 minutos, no escuro. A seguir, 300 μ L de 1 mM H₂O₂ foram adicionados, e a absorbância foi imediatamente lida a 290 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.2.9 Proteínas solúveis

As concentrações de proteínas solúveis totais foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976) para calcular a atividade específica de SOD, APX e GR. A quantificação foi realizada pela adição de 20 μ L de sobrenadante e 1 ml de reagente de Bradford. Após 10 minutos, a absorbância foi lida a 595 nm num espectrofotômetro. A concentração de proteínas foliares foi calculada usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), e os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

3.2.10 Açúcar total e sacarose

Para analisar a sacarose e os açúcares totais, o material foi extraído de acordo com o método descrito por Bieleski e Turner (1966). Para a extração, 1 g de material vegetal (folhas) foi macerado utilizando um almofariz e pistilo e pesado, seguido da adição de 10 ml de solução de MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água) num tubo Falcon de 15 ml. O material foi homogeneizado por vortex e depois centrifugado numa centrífuga refrigerada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A outro tubo foram adicionados 4 ml do sobrenadante de extrato de MCW, 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água. Após a separação de fases, foi determinada a concentração de açúcares totais e sacarose na fase solúvel em água.

Para quantificar os açúcares totais (Dubois *et al*, 1956), 20 μ L de extrato vegetal, 500 μ L de fenol a 5% e 2 ml de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a um tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada por vortex, e após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorbância a 490 nm foi lida utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

Para quantificar a sacarose (VAN HANDEL, 1968), 20 μ L de extrato, 500 μ L de 30% KOH e 2 ml de H₂SO₄ concentrado foram adicionados a um tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada por vortex e seca em estufa a 100°C durante 10

1 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorbância a 490 nm foi
2 lida utilizando um espectrofotômetro. Ambas as quantificações foram realizadas
3 utilizando uma curva padrão de sacarose. Os resultados foram expressos em mg g^{-1}
4 MF.

6 **3.2.11 Compostos nitrogenados (nitrato, amônia e aminoácidos)**

7 A concentração de nitrato, amônia e aminoácidos nas folhas foi determinada
8 no extrato obtido de 1,0 g de material fresco em 10 ml de solução (60% [v/v]
9 metanol; 25% [v/v] clorofórmio). O material foi homogeneizado por vortex e depois
10 centrifugado numa centrífuga refrigerada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A
11 outro tubo foram adicionados 4 ml de sobrenadante de extracto de MCW, 1 ml de
12 clorofórmio e 1,5 ml de água. Após a separação de fases, foi determinada a
13 concentração de nitrato, amônia e aminoácidos na fase solúvel em água.

14 A concentração de nitrato foi quantificada de acordo com Cataldo *et al* (1975).
15 Para a reacção, uma alíquota de 10 μL de extrato foi adicionada a 40 μL ácido
16 salicílico 5% em ácido sulfúrico e mantida à temperatura ambiente durante 20
17 minutos. Posteriormente, 1 ml de NaOH 2 N foi adicionado, o material foi
18 homogeneizado por vórtice e depois determinado por colorimetria a 410 nm de
19 absorbância. Os resultados para o nitrato foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

20 A concentração de amônia foi quantificada de acordo com McCullough (1967).
21 Para tal, foi adicionada uma alíquota de 200 μL do extrato a 1,0 ml de solução
22 colorimétrica. Esta solução foi preparada utilizando uma proporção 1:1 de reagente
23 de fenol (2,5 g de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em 250 ml) com o
24 reagente fosfato (1,25 g de hidróxido de sódio, 13,4 g de fosfato monobásico de
25 sódio, e 2,5 ml de hipoclorito de sódio a 5% em 250 ml). As amostras foram
26 incubadas a 37°C durante 1 h. A concentração de amônia foi então determinada por
27 colorimetria a 630 nm de absorbância. Os resultados para a amônia foram
28 expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

29 Finalmente, a concentração de aminoácidos foi quantificada de acordo com
30 Yemm e Cocking (1955). Para a reação, uma alíquota de 200 μL do extrato foi
31 adicionada a 500 μL citrato de sódio 0,2M, 200 μL ninidrina 5% em etilenoglicol e 1
32 ml KCN 0,0002M. Os tubos de ensaio foram homogeneizados por vórtice e
33 aquecidos a 100°C durante 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram arrefecidos

em água da torneira durante 10 minutos. Finalmente, 1 ml de etanol a 60% foi adicionado aos tubos de ensaio, misturado por vortex e quantificado por colorimetria a 570 nm. Foi utilizada uma curva padrão de leucina para calcular a concentração de aminoácidos nas folhas e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

3.2.12 Pigmentos fotossintéticos

Os níveis de clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenóides, feofitina a, feofitina b e feofitina total foram quantificados usando o método do espectrofotômetro proposto por Lichtenthaler (1987), utilizando matéria fresca das mudas armazenadas em extrato de acetone a 80%.

3.2.13 Análise estatística

Para todos os conjuntos de dados, a normalidade foi testada usando o teste Anderson-Darling e a homoscedasticidade usando o teste Levene para a igualdade de variâncias. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o teste F, $p \leq 0,05$. Quando foram encontradas diferenças significativas, o teste Tukey foi utilizado para testar as diferenças entre as fontes e as concentrações de Se, $p \leq 0,05$, utilizando o software estatístico R. Os gráficos foram plotados utilizando o software Sigma Plot.

O heatmap foi feito calculando a correlação de Pearson ($p < 0,05$) para avaliar a relação entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos utilizando o software R (R Development Core Team, 2015). O pacote "corrplot" foi utilizado para gerar o heatmap utilizando as funções "corr" e "cor.mtest" para criar coeficientes de matriz e p -valores, respectivamente. A fim de melhor visualizar as correlações estatísticas significativas, foram inseridos asteriscos nas células do heatmap.

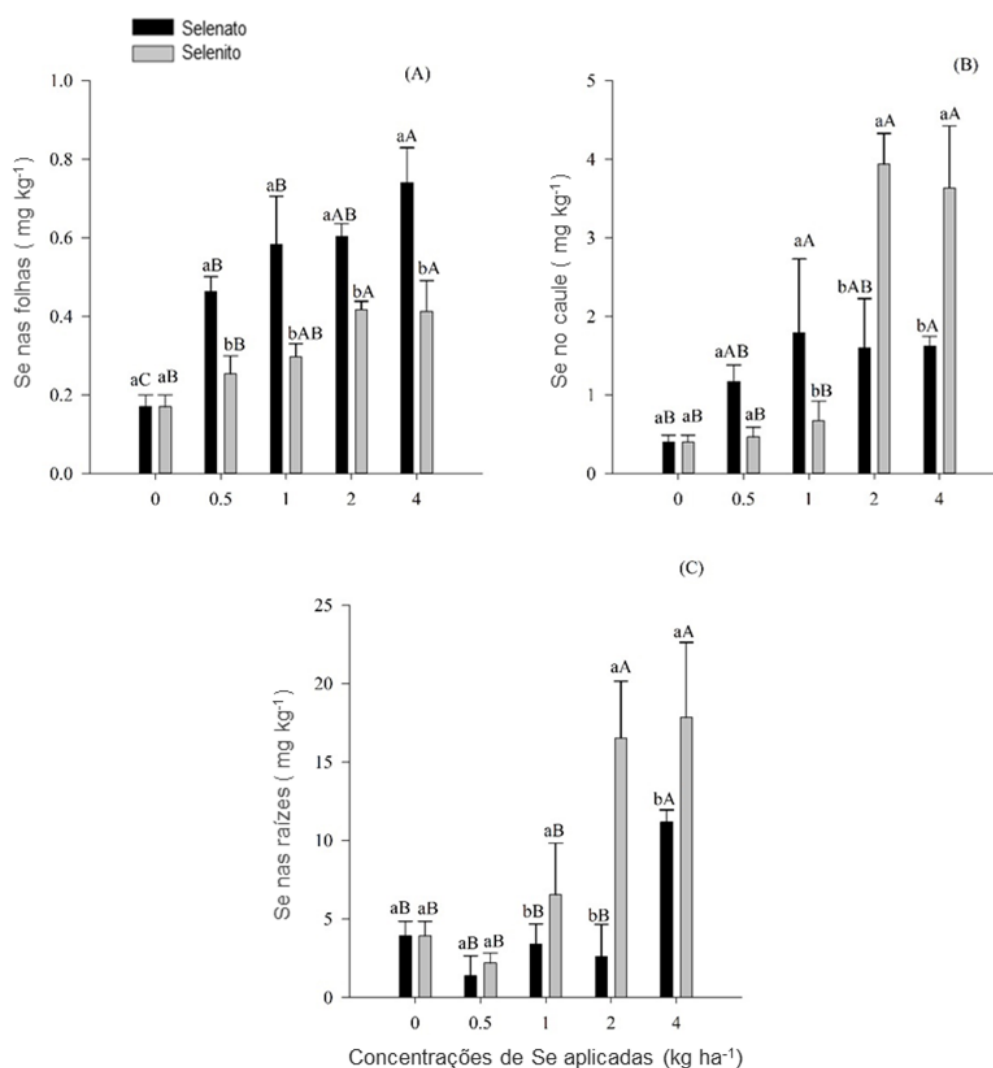
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise de Selênio

A aplicação de selenito de sódio ou selenato de sódio mostrou efeitos significativos sobre as concentrações de Se nas folhas, caule e raízes. A aplicação de Se melhorou a concentração de Se nas folhas, embora este efeito tenha sido maior com o selenato em comparação com o selenito. O aumento das concentrações de selenato de sódio proporcionou o aumento das concentrações de Se nas folhas de *Bertholletia excelsa*, e a aplicação de $4,0 \text{ kg ha}^{-1}$ de Se aumentou a

concentração de Se ~4,0 vezes em comparação com ao tratamento de sem selênio (Fig. 1a).

Figura 1. Concentração de Selênio em folhas (A), caule (B) e raízes (C) mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições). Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$).



Fonte: do próprio autor (2020).

A aplicação de selenito aumentou as concentrações de Se no caule (Fig. 1b). Um aumento na concentração de Se no caule foi observado em plantas que

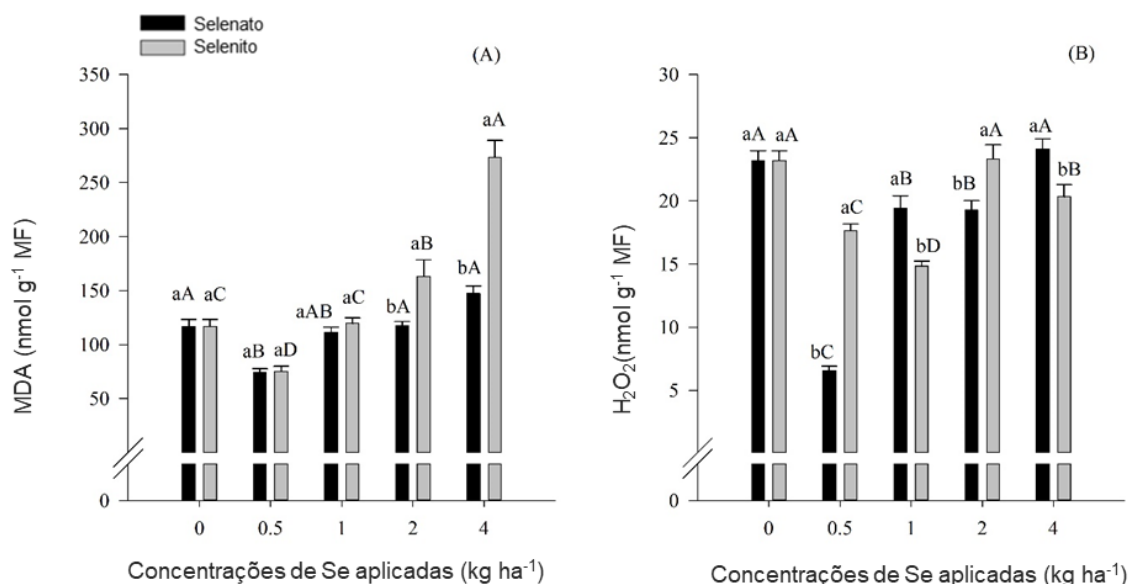
receberam 2,0 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenito de sódio. A aplicação de selenito aumentou a concentração de Se ~3,0 vezes no caule das mudas de castanha do Brasil, em comparação com o selenato.

A aplicação de selenito de sódio também afetou a concentração de Se nas raízes das mudas, aumentando a concentração de Se ~1,5 vezes em comparação com o selenato de sódio (Fig. 1c). A maior concentração de Se em plantas que receberam selenato de sódio foi observada à dose de 4,0 kg ha⁻¹ de Se, 60% maior que o tratamento sem Se.

3.3.2 Resposta do metabolismo antioxidante

A aplicação de Se como selenito de sódio e selenato de sódio teve efeito significativo na peroxidação lipídica (MDA) (Fig. 2a) e nas concentrações de H₂O₂ (Fig. 2b). A aplicação de 0,5 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio ou selenito de sódio foi associada a uma redução na peroxidação lipídica em comparação com o tratamento sem Se. As maiores taxas de peroxidação lipídica foram registradas em folhas de plantas tratadas com 4 kg ha⁻¹ de Se aplicadas como selenato de sódio, o que levou a um aumento de 57% nas taxas de peroxidação lipídica em comparação com o tratamento de sem Se.

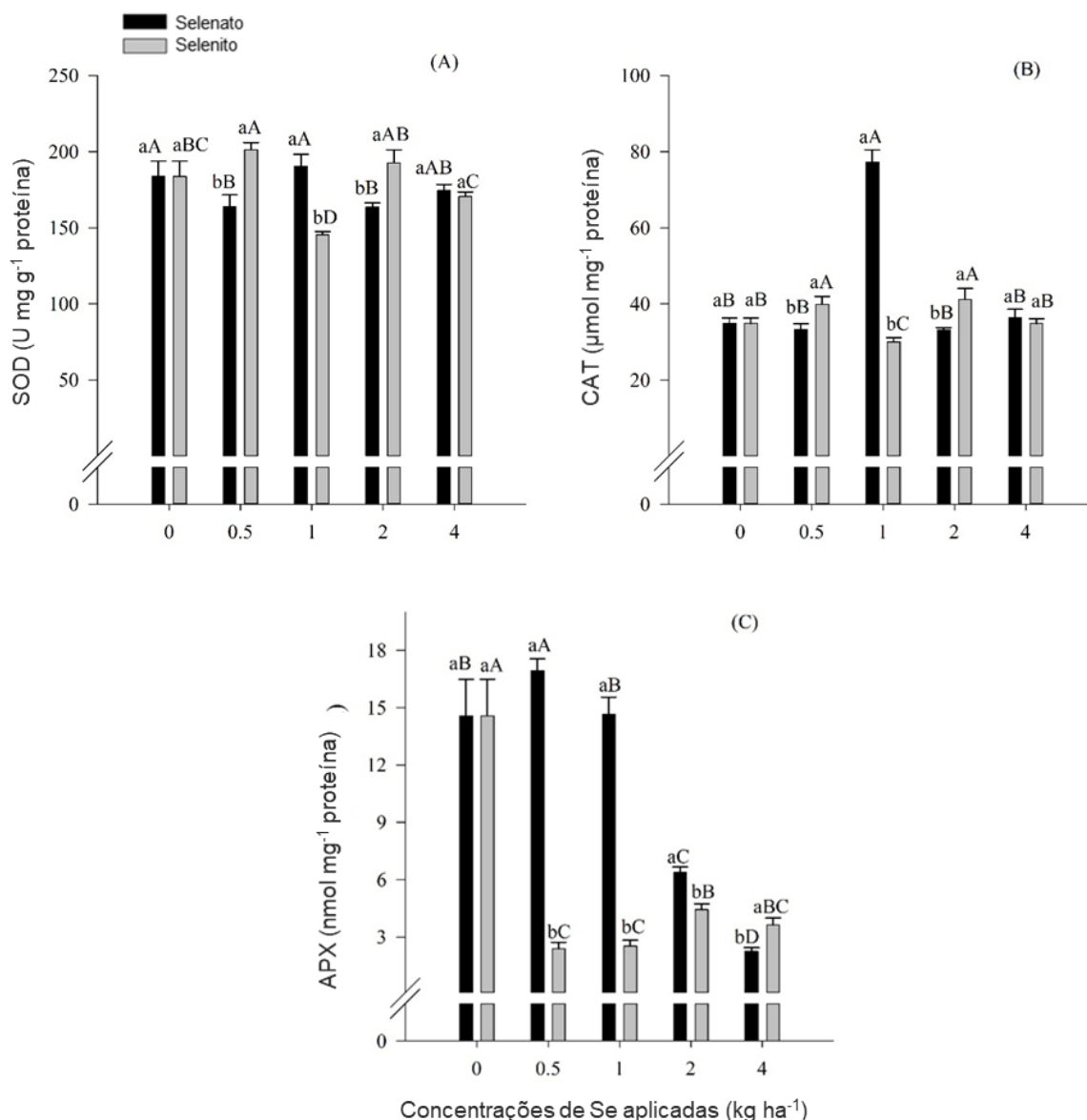
Figura 2. Taxas de peroxidação lipídica estimadas pela concentração de MDA (A), e concentração de H_2O_2 (B) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$).



Fonte: do próprio autor (2020).

A aplicação de Se afetou a atividade específica da SOD, CAT e APX no tecido foliar das mudas (Fig. 3). As atividades mais baixas da SOD (Fig. 3a) foram observadas em plantas que receberam 1,0 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenito de sódio. Por outro lado, as plantas que receberam 1,0 e 4,0 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenato de sódio não diferiram do tratamento sem Se. A aplicação de 0,5 e 2,0 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio mostrou a menor atividade da SOD.

Figura 3. Atividade específica da superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n=4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$).



Fonte: do próprio autor (2020).

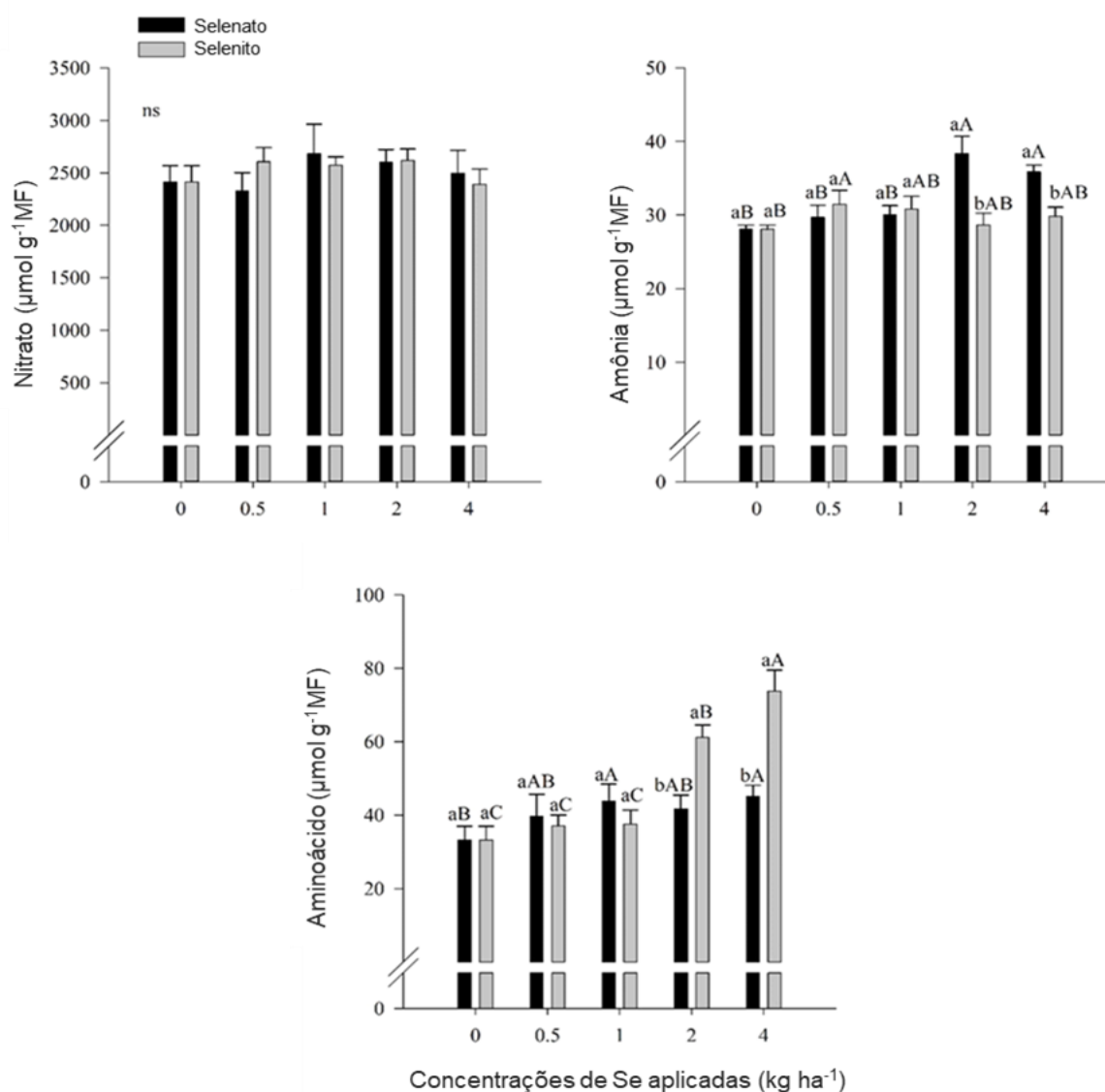
A atividade da catalase (Fig. 3b) aumentou com a aplicação de 1,0 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio, ~45% maior do que o tratamento sem Se. No entanto, a aplicação de 0,5 e 2,0 kg ha⁻¹ de Se diminuiu a atividade de CAT nas folhas das

mudas de castanhas do Brasil. A maior atividade de APX (Fig. 3c) foi observada em plantas tratadas com 0,5 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio e diminuiu à medida que mais Se foi aplicado. A aplicação deste elemento como selenato de sódio foi superior na concentração de 0,5 kg ha⁻¹ de Se e induziu a diminuição acentuada da atividade de APX, 85% menos do que o tratamento sem Se. A menor atividade de APX foi observada naqueles que receberam 4,0 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio.

3.3.3 Quantificação dos compostos nitrogenados

Não foi observada uma resposta significativa à aplicação de selenato de sódio ou selenito de sódio para concentração de nitrato (Fig. 4a). Contudo, o selenito de sódio e o selenato de sódio mostraram efeitos significativos na concentração de amônia (Fig. 4b) e aminoácidos (Fig. 4c) nas folhas das mudas de castanhas do Brasil. A concentração de amônia aumentou nas folhas de plantas que receberam 2,0 e 4,0 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio. A aplicação de 4,0 kg ha⁻¹ de Se como selenito de sódio elevou a concentração de aminoácidos 2,0 vezes maior do que o tratamento sem Se.

Figura 4. Concentração de nitrato (A), amônia (B) e aminoácidos (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n=4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$), ns= não significativo.

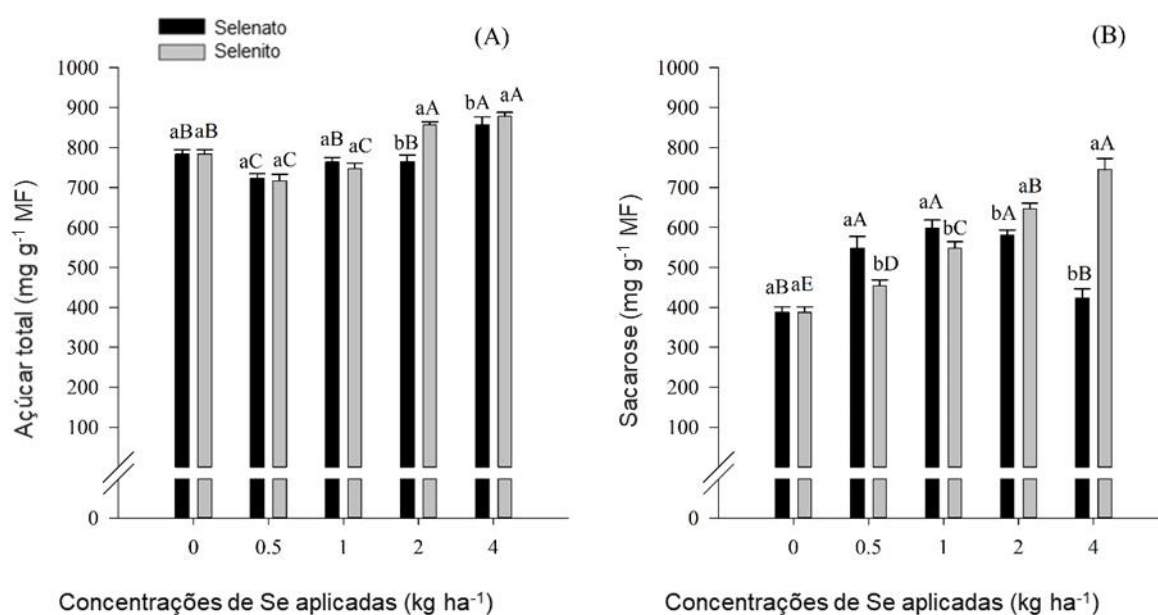


Fonte: do próprio autor (2020).

3.3.4 Fotoassimilados e pigmentos fotossintéticos

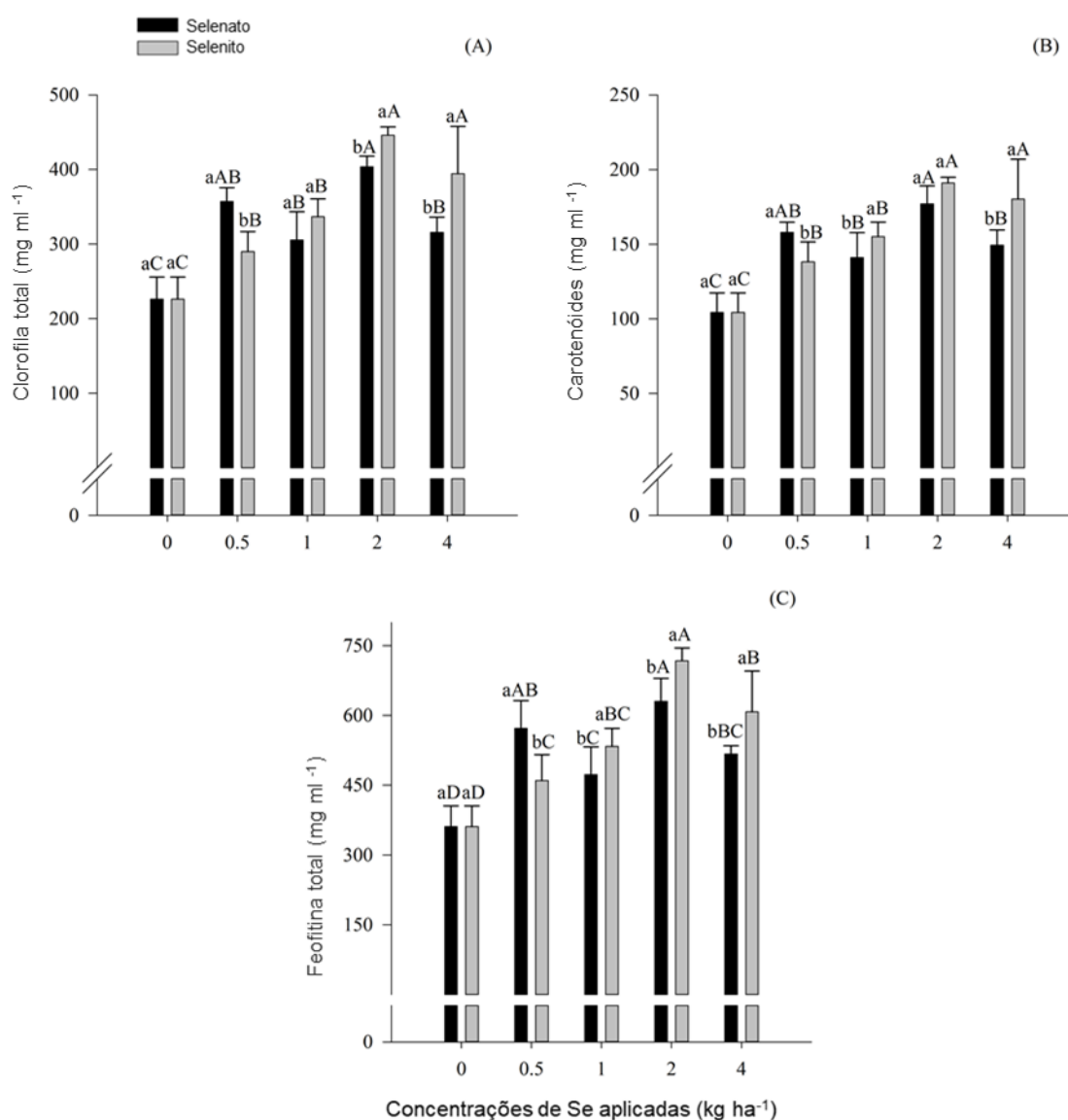
A aplicação de selênio afetou a concentração da sacarose, açúcares totais, clorofila total, carotenóides e de feofitina total nas folhas das mudas (Fig. 5 e 6).

Figura 5. Concentração de açúcar total (A) e sacarose (B) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$), ns = não significativo.



Fonte: do próprio autor (2020).

Figura 6. Concentração de clorofila total (A), carotenóides (B) e feofitina total (C) em folhas de mudas de castanha do Brasil fertilizadas com diferentes concentrações e fontes de Se. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. ($n= 4$ repetições); Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de concentrações de Se, e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias de fontes de Se (selenato ou selenito), de acordo com o teste Tukey ($p\leq 0.05$).



Fonte: do próprio autor (2020).

A concentração total de açúcar aumentou em folhas de plantas tratadas com Se acima de 0,5 kg ha⁻¹ como selenato de sódio. Um resultado semelhante foi obtido

nas plantas que receberam selenito de sódio, que aumentou com o aumento das aplicações de selenito até 4,0 kg ha⁻¹ de Se.

A concentração de sacarose nas folhas (Fig. 5b) aumentou com o aumento da aplicação de selenito de sódio até um máximo em plantas tratadas com 4,0 kg ha⁻¹ de Se, ~2,0 vezes mais do que o tratamento sem Se. A concentração de sacarose foi maior em plantas que receberam 0,5 até 2,0 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenito de sódio, o que foi 35% mais elevado do que o tratamento sem Se.

A concentração de clorofila total das folhas (Fig. 6a) aumentou com o aumento da Se com aplicações de selenito de sódio até 2,0 kg ha⁻¹ de Se, ~2,0 vezes mais do que o tratamento sem Se. Um resultado semelhante foi obtido para os carotenóides (Fig. 6b) e para a feofitina (Fig. 6c). As menores concentrações de pigmentos fotossintéticos foram observadas no tratamento sem Se.

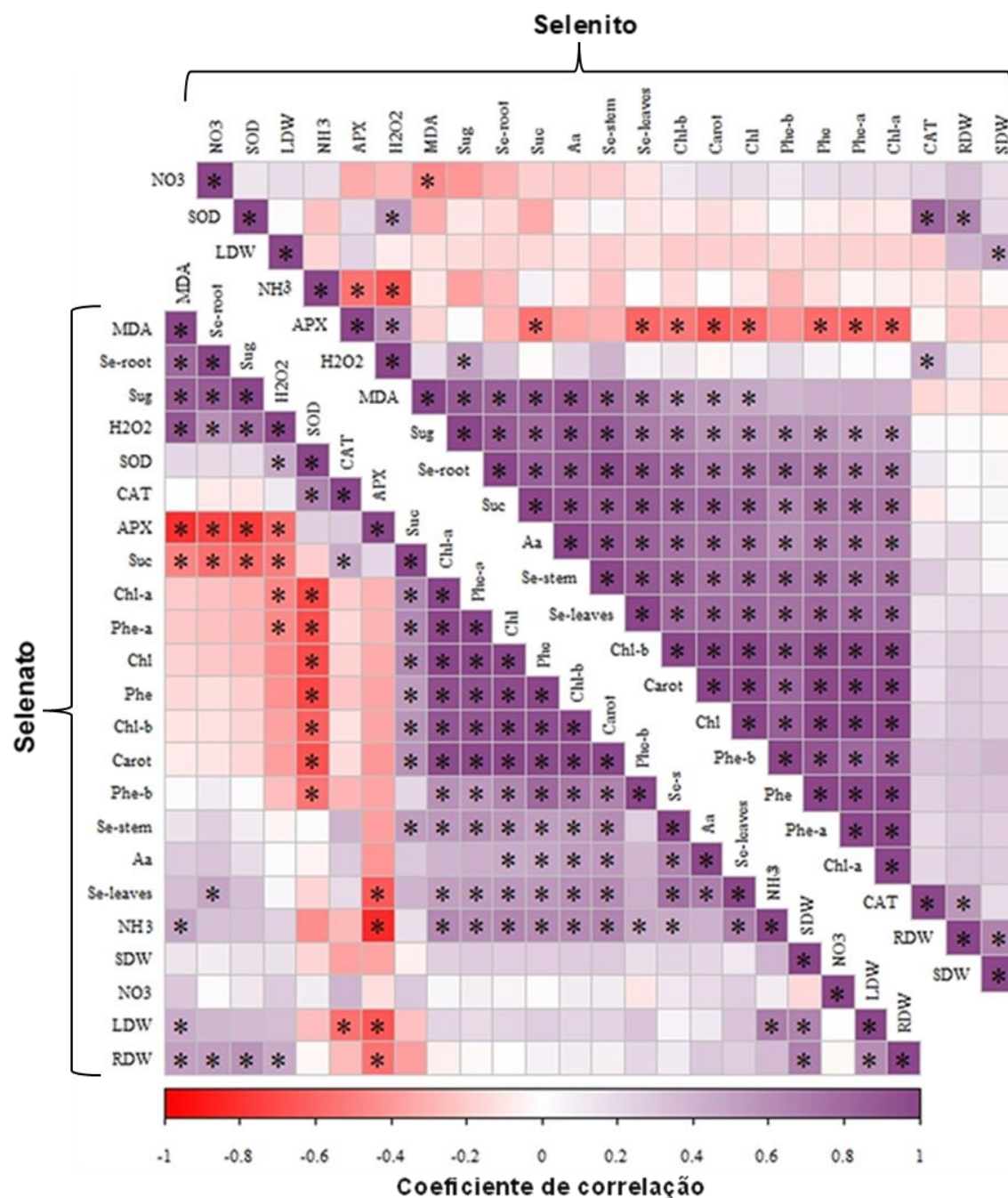
3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Análise de selênio

Houve diferença na absorção de selenito e selenato pelas raízes. Enquanto o selenato migra para as raízes e logo após se transloca para o caule através de transportadores de sulfato de alta afinidade, o selenito é geralmente assimilado em Se orgânico nas raízes e é pouco provável que se transloque para as partes aéreas (SORS *et al*, 2005).

A concentração do Se nas raízes, caules e folhas das castanhas do Brasil fertilizadas com selenito mostrou correlações positivas com o açúcar total, sacarose, aminoácidos e pigmentos, indicando que quanto maior for a concentração deste elemento nos respectivos órgãos, maior será a taxa fotossintética da planta (Fig.7).

Figura 7. Heatmap apresentando a correlação de Pearson entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de mudas de castanha do Brasil em resposta a aplicação de diferentes concentrações de Se nas fontes selenato ou selenito. * indica correlação significativa ($p < 0.05$).



Abreviações: Concentração de Se nas folhas (Se-leaves), Concentração de Se nos caules (Se-stem), Concentração de Se nas raízes (Se-root), Peso seco das folhas (LDW), Peso seco dos caules (SDW), Peso seco das raízes (RDW), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peróxido de hidrogênio peroxide (H₂O₂), malondialdeído (MDA), clorofila a (Chl-a), clorofila b (Chl-b), clorofila total (Chl), carotenoides (Carot), feofitina a (Ph-a), feofitina b (Ph-b), feofitina total (Phe), sacarose (Suc), açúcar total (Sug), nitrato (NO₃), amônia (NH₃), aminoácidos (Aa).

Fonte: do próprio autor (2020).

A forma mais oxidada de Se encontrada nos solos e a forma mais absorvida de Se pelas plantas é o selenato, como resultado das semelhanças químicas entre Se e enxofre (SORS *et al*, 2005). Devido a translocação imediata do selenato ao xilema, o selenato de sódio é mais prontamente absorvido do que o selenito de sódio (BRANCO *et al*, 2004; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008; BRANCO, 2016; BRANCO, 2018), e rapidamente translocado para as folhas, o que foi observado no presente estudo. A fertilização com selenato de sódio é mais eficaz no aumento do acúmulo de Se em comparação com selenito de sódio, levando a uma rápida absorção e distribuição do mesmo (SHARMA *et al*, 2010).

Estudos demonstraram que uma diminuição na disponibilidade de sulfato no solo resulta no aumento da expressão dos genes transportadores de sulfato, o que melhora a capacidade de absorção de sulfato e, portanto, aumenta a absorção de Se (HAWKESFORD, 2000; HAWKESFORD *et al*, 1968; SHINMACHI *et al*, 2010). Cabannes *et al*. (2011) observaram que as espécies hiperacumuladoras (acumulam mil a milhares de mg kg^{-1} de Se) cultivadas sem S mostraram uma tolerância elevada a Se com crescimento semelhante em comparação com plantas não-acumuladoras (acumulam níveis baixos de Se, $<25 \text{ mg kg}^{-1}$). A concentração de S no solo neste estudo foi baixa, o que pode ter contribuído para o aumento da absorção de Se pelas mudas de castanhas do Brasil.

O metabolismo e assimilação de selênio pelas raízes difere das folhas (PREMARATHNA *et al*, 2012), uma vez que a absorção de selenito através das raízes é mediada por transportadores de fosfato (LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). Neste estudo, verificou-se que a absorção de Se foi maior nas raízes e caules onde foi aplicado selenito em comparação ao selenato. A concentração de selenito aumentou com o aumento da taxa de selenito de sódio. Uma resposta semelhante na concentração de Se em raízes onde à aplicação de selenito e selenato foi também relatada por Cartes, Gianfreda e Mora *et al*. (2005) em azevém.

3.4.2 Resposta do metabolismo antioxidante

A peroxidação lipídica e a concentração de peróxido de hidrogênio indicam estresse em mudas que receberam concentrações elevadas de Se (Fig. 2), uma vez que espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo podem estar associadas à

toxicidade de Se (HARTIKAINEN, 2005; GOMES-JUNIOR *et al.*, 2007; TAMAOKI; FREEMAN; PILON-SMITS, 2008). As plantas que receberam 2,0 e 4,0 kg ha⁻¹ de Se (fonte de selenito de sódio) mostraram valores mais elevados para MDA em comparação com o sem Se, indicando estresse. No entanto, a diminuição das concentrações de MDA nas doses maiores que 0,5 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenato de sódio e selenito de sódio pode ser devida à indução do sistema antioxidante nas plantas, aumentando consequentemente a resistência ao estresse oxidativo (RIOS *et al.*, 2010). De acordo com vários estudos, a aplicação de Se aumentou a atividade antioxidante do trigo, canola e sorgo, melhorando a tolerância das mudas de trigo e de brássica à radiação ultravioleta, ao frio, à seca e ao estresse salino (SMRKOLIJ *et al.*, 2006; CHU; YAO; ZHANG 2010; DJANAGUIRAMAN; PRASAD; SEPPANEN *et al.*, 2010; YAO; CHU; BA *et al.*, 2010a,b; HASANUZZAMAN; FUJITA, 2011; HASANUZZAMAN; HOSSAIN; FUJITA, 2011; WANG, 2011).

As enzimas antioxidantes, tais como SOD e CAT, também podem ser ativadas pelo Se, ocasionando a redução da peroxidação lipídica e do peróxido de hidrogênio, reduzindo subsequentemente a senescência. A atividade da CAT e SOD em plantas que receberam selenato de sódio ou selenito de sódio pode ter ajudado a manter a concentração de MDA e H₂O₂ a níveis inferiores aos do tratamento sem Se, uma vez que CAT converte H₂O₂ em H₂O e O₂ (IGAMBERDIEV; LEA, 2002; SAIDI; CHTOUROU; DJEBAL, 2014). A redução na concentração de H₂O₂ em plantas que receberam selenato de sódio e selenito de sódio foram inferiores ao tratamento sem Se (Fig. 2b) mostrando a ação destas enzimas.

Os resultados deste estudo mostraram que a concentração de MDA foi maior nas plantas que receberam 4,0 kg ha⁻¹ de Se na fonte selenito de sódio. Isto pode estar relacionado com a conversão de selenito a formas orgânicas de Se e posterior incorporação em proteínas para substituir o S, causando toxicidade mais rapidamente quando comparada com o selenato (HOPPER; PARKER, 1999).

As plantas têm enzimas antioxidantes (por exemplo, SOD e CAT) e uma grande diversidade de compostos antioxidantes não enzimáticos para proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção excessiva de EROs através de estresse oxidativo pode causar danos nas membranas celulares, levando eventualmente à morte celular (BRANCO, 2016). SOD, CAT e APX mostraram picos de atividade em diferentes concentrações de Se. Segundo Silva *et al* (2018), isto

1 pode estar relacionado com a estimulação ou supressão de diferentes enzimas por
2 selênio em diferentes concentrações.

3 A concentração da SOD aumentou na dose de 0,5 e kg ha⁻¹ de Se como
4 selenato de sódio. Havia uma relação negativa entre a SOD e o peróxido de
5 hidrogênio (Fig. 7). A SOD é a primeira enzima que atua no sistema antioxidante,
6 responsável pela dismutação de O₂⁻ em H₂O₂ (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; SAIDI;
7 CHTOUROU; DJEBAL, 2014). O aumento das concentrações de peróxido de
8 hidrogênio em algumas doses foi causado pelas atividades inferiores de outras
9 enzimas (por exemplo, CAT e APX) e podem ter proporcionado um ambiente onde
10 houve estímulo para a síntese de SOD. Reis *et al* (2018) observaram que o arroz
11 fertilizado com Se tem um aumento na atividade de SOD. APX, uma enzima que
12 utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir H₂O₂ a H₂O (CAVERZAN *et*
13 *al*, 2012), apresentou maior atividade em plantas expostas a baixas concentrações
14 de Se (Fig. 3c). Neste estudo, foi observada uma relação negativa entre APX e
15 concentração de MDA (Fig. 7), mostrando a ação de APX para controlar a
16 peroxidação lipídica na membrana celular.

17 A atividade da catalase foi mais elevada para o tratamento com 1,0 kg ha⁻¹ de
18 Se na fonte selenato de sódio (Fig. 3b). Esta enzima encontra-se principalmente em
19 peroxissomas e converte H₂O₂ em água; mas, a sua afinidade com o substrato é mais
20 fraca que as outras enzimas antioxidantes (FENG;WEI;TU *et al*, 2013).

22 3.4.3 Quantificação dos compostos nitrogenados

23 A biossíntese e acúmulo de aminoácidos ocorre em resposta a estresses
24 ambientais (HSU;KAO, 2003) resultando na decomposição das proteínas estruturais
25 em aminoácidos componentes (BOM;ZAPLACHINSKI, 1994). O aumento da
26 concentração de aminoácidos por aplicação de selenito de sódio ou selenato pode
27 resultar da perturbação do metabolismo de aminoácidos que aumenta a
28 concentração de proteínas solúveis e a atividade de nitrato redutase
29 (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2004).

30 As aplicações de selenito aumentaram as concentrações de aminoácidos nas
31 mudas de castanhas do Brasil (Fig. 4). O aumento do aminoácido pode ser atribuído
32 à síntese de selenoaminoácidos não proteicos. As folhas com tratamentos com
33 selenito, em comparação com os tratamentos com selenato, mostram um aumento

na concentração total de aminoácidos devido ao fato de a redução do selenato por sulfurilase ATP ser uma etapa limitadora da concentração (TERRY *et al* 2000; RASPOR *et al* 2003). As espécies acumuladoras de Se desenvolveram um mecanismo em que o Se pode ser excluído da incorporação de proteínas como resultado da formação de selenoaminoácidos não protéicos, por exemplo, selenomtionina e selenocisteína, e a síntese destes compostos pode desviar o selênio da formação de SeCys e SeMet em espécies Se-tolerantes (PETERSON; BUTLER, 1962; BROWN; SHRIFT 1981).

3.4.4 Fotoassimilados e pigmentos fotossintéticos

Embora Se não seja um elemento essencial para plantas superiores (SORS *et al*, 2005), neste estudo, a aplicação de selenito de sódio aumentou a atividade dos pigmentos fotossintéticos em comparação com o tratamento sem Se (Fig. 6). Da mesma forma, outros autores também encontraram um efeito positivo da aplicação de Se na batata (*Solanum tuberosum*), erva de centeio (*Lolium perenne* L.), alface (*Lactuca sativa*), lentilha (*Lens culinaris* Medikus) e mostarda (*Brassica rapa* L.) (HARTIKAINEN; XEU; PIIRONEN, 2000; LYONS *et al.*, 2009; TURAKINEN; HARTIKAINEN; SEPPEANEN, 2004; EKANAYAKE *et al.*, 2015). O aumento dos pigmentos fotossintéticos nas mudas de castanhas do Brasil pode estar relacionado com o aumento da atividade antioxidante, o que confere uma fotossíntese mais eficiente (LYONS *et al*, 2009).

Os sintomas fisiológicos do estresse de Se nas plantas incluem atrofiamento das raízes, redução da biomassa e da eficiência fotossintética, clorose e morte das plantas (VAN HOEWYK, 2013). Não foi observado qualquer sintoma visual de toxicidade da Se em mudas de castanhas do Brasil tratadas com Se. A aplicação de 4,0 kg ha⁻¹ de Se como selenato de sódio diminuiu a concentração de clorofila total, carotenóides e feofitina total nas folhas (Fig. 6). Como resultado, a eficiência fotossintética foi mais elevada em plantas que receberam selenato de sódio do que nas que receberam selenito de sódio. Variações na concentração de clorofila de plantas cultivadas no solo suplementadas com diferentes fontes de Se foram relatadas por outros pesquisadores (XUE; HARTIKAINEN; PIIRONEN, 2001; HUANG; XU; HU, 2005; SHARMA *et al.*, 2010). Foi observada uma relação positiva entre carotenóides e açúcares, como ilustrado na Figura 7. Os carotenóides

protegem as plantas contra a luz solar e induzem as plantas a produzir mais sacarose (SILVA *et al.*, 2018).

O aumento da concentração de açúcar total e sacarose (Fig. 5) pode estar relacionado com o efeito do Se na atenuação do estresse oxidativo e da atividade das enzimas do metabolismo dos carboidratos (Fig. 1). Ribeiro *et al.* (2016) avaliaram o efeito de Se em *Arabidopsis thaliana* e detectaram uma menor degradação de amido ao cair da noite, e também a diminuição na concentração de sacarídeos e hexoses. Além disso, sementes de feijão caupi (*Phaseolus aureus* Roxb.) fertilizada com Se apresentaram aumento na atividade d invertase e da amilase (MALIK *et al.*, 2011). Uma diminuição dos pigmentos fotossintéticos nas folhas com o aumento da concentração de Se já foi descrita para o milho e o feijão-caupi (JIANG *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

3.5 CONCLUSÃO

Foi encontrada grandes quantidades de Se total nas raízes, caule e folhas das castanhas do Brasil. A aplicação de selenato aumentou mais a concentração de Se nas folhas do que nas raízes e caule em comparação com a aplicação do selenito.

A aplicação de 2 kg ha⁻¹ de selenito de sódio na muda da castanha do Brasil foi mais eficiente em induzir a síntese de clorofila, carotenóides e feofitina, ativando o sistema fotossintético e produzindo maiores quantidades de sacarose e aminoácidos.

A peroxidação lipídica e a sacarose aumentaram em resposta às concentrações de aplicação de Se, contudo, SOD, CAT e APX diminuíram devido à aplicação de Se, mostrando o estresse promovido por 4 kg ha⁻¹ de Se. A ativação de enzimas antioxidantes, acúmulo total de açúcar e sacarose nas folhas das mudas foi a principal resposta fisiológica e bioquímica das mudas de castanha do Brasil sob altas concentrações Se.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and estresse markers in pea and wheat. **Plant Cell Environment**. Chichester, v. 24, p. 1337-1344, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>

- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BOYER, J.S. Water deficits and photosynthesis. *In*: KOZLOWSKI, T. T. (ed.). **Water deficits and plant growth**. New York: Academic, 1976. v.4, p.153-190.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, p. 248-259, 1976.
- BROWN, T. A.; SHRIFT, A. Exclusion of selenium from proteins of selenium tolerant *Astragalus* species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, p. 1051–1053, 1981.
- CABANNES, E., *et al.* A comparison of sulfate and selenium accumulation in relation to the expression of sulfate transporter genes in *Astragalus* species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, p. 2227–2239, 2011.
- CARTES, P.; GIANFREDI, L.; MORA, M. L. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 276, p. 359–367, 2005.
- CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CAVERZAN, A. *et al.* Plant responses to stressors: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 1011-1019, 2012.
- CLEMENT, C. R. Domestication of Amazonian fruit-crop: past, present and future. *In*: VIEIRA, I. C. C. *et al.* (ed.). **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000. p. 347-367.
- CHU, J. Z.; YAO, X. Q.; ZHANG, Z. N. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. **Biological Trace Element Research**, Heidelberg, v. 136, p. 355–363, 2010.
- DJANAGUIRAMAN, M. D. *et al.* Impact of selenium spray on monocarpic senescence of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Asaba, v. 2, p. 44–47, 2004.
- DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology, and Biochemistry**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 48, p. 999–1007, 2010.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Dubois method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, San Diego, v. 28, p. 350-356, 1956.

- DUMONT, E. *et al.* Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 95, p. 684–692, 2006.
- EICHE, E. *et al.* Selenium distribution and speciation in plant parts of wheat (*Triticum aestivum*) and Indian mustard (*Brassica juncea*) from a seleniferous area of Punjab. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, p. 952–961, 2015.
- EKANAYAKE, L.J. *et al.* Selenium fertilization on lentil (*Lens culinaris* Medikus) grain yield, seed selenium concentration, and antioxidant activity. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 177, p. 9-14, 2015.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa. **A cultura da castanha-do-Brasil**. Brasília, DF: Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, 1995. 65 p. Coleção plantar
- FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic estressees. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 87, p. 58-68, 2013.
- FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. *In*: SELINUS, O.; ALLOWAY, B.; CENTENO, J. A. (ed.). **Essentials of Medical Geology**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 375-416, 2013.
- FREITAS, S. C. *et al.* **Selênio em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2004. Comunicado técnico, 71.
- FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 15, p. 1583-1606, 2011.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GOMES-JUNIOR, R. A. *et al.* Selenium-induced oxidative estresse in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 34, p. 449-456, 2007.
- GOOD, A. G.; ZAPLACHINSKI, S. T. The effects of drought estresse on free aminoacids accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 90, p. 9–14, 1994.
- GRAHAM, R. D. *et al.* Nutritious subsistence food systems. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 92, p. 1-74. 2007.
- GUPTA, M.; GUPTA, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 2074, 2017.
- HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Muenchen, v. 18, p. 309–318, 2005.

- HARTIKAINEN, H.; XEU, T.; PIIRONEN, V. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 225, p. 193–200, 2000.
- HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought estresse in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, Heidelberg, v. 143, p. 1758–1776, 2011.
- HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**. Heidelberg, v. 143, 1704–1721, 2011.
- HAWKESFORD, M. J. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 131–138, 2000.
- HAWKESFORD, M. J. *et al.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 125, p. 189-198, 1968.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 125, p. 189–198, 1968.
- HOPPER, J.L.; PARKER, D.R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 199-207, 1999.
- HSU, Y. T.; KAO, C. H. Changes in protein and aminoacids contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 40, p. 147–155, 2003.
- HUANG, Y.; XU, J.; HU, Q. Effect of selenium on preservative quality of green tea during autumn tea-processing season. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 7444–7447, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da extração vegetal e silvicultura 2009**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. V. 23, p. 1-45.
- IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolution of land plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.
- JING, D. *et al.* Selenium enrichment, fruit quality and yield of winter jujube as affected by addition of sodium selenite. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 225, p. 1-5, 2017.

- JIANG, C. *et al.* Effect of exogenous selenium supply on photosynthesis, Na⁺ accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity estresse. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 42039, 2017.
- LI, H. F.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **New Phytologist**, Chichester, v.178, p. 92–102, 2008.
- LICHTENTHALER, H.K. Clorofilas and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In*: PACKER, L.; DOUCE, R. (ed.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press, 1987. V. 148, p. 350-381.
- LUO, Z. B. *et al.* Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. **Biotechnology Advances**, New York, v. 34, p. 1131-1148, 2016.
- LYONS, G. H. *et al.* Selenium increases seed production in Brassica. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 318, p. 73–80, 2009.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, p. 297-304, 1967.
- MALIK, J. A. *et al.* Promotion of growth in mungbean (*Phaseolus aureus roxb.*) by selenium is associated with stimulation of carbohydrate metabolism. **Biological Trace Element Research**, Heidelberg, v. 143, p. 530-39, 2011.
- MOLDES, C. A. *et al.* Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, p. 469-479, 2008.
- MOSTOFA, M. G. *et al.* Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 178, p. 212-223, 2017.
- NAWAZ, F. *et al.* Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought estresse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Philadelphia, v. 113, p. 191-200, 2015.
- PETERSON, P. J.; BUTLER, G. W. The uptake and assimilation of selenite by higher plants. **Australian Journal of Biological Sciences**, Clayton, v. 15, p. 126–146, 1962.
- PILON-SMITS, E.A.H. *et al.* New insights into the multifaceted ecological and evolutionary aspects of plant selenium hyperaccumulation. *In*: BAÑUELOS, G. S.; LIN, Z-Q.; GUILHERME, L.R.G.; REIS, A.R. (ed.). **Global advances in selenium research from theory to application**. Londres: CRC Press, 2016. p. 179-180. 2016. Proceedings of the 4th International Selenium Conference in the Environment and Human Health.

PREMARATHNA, L. *et al.* Selenate-enriched urea granules are a highly effective fertilizer for selenium biofortification of paddy rice grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 6037-6044, 2012.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. Disponível em: URL <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 12 ago. 2019.

RAIJ, B. *et al.* **Chemical analysis for fertility evaluation of tropical soils**. Campinas: IAC, 2001. 285 p.

RASPOR, P. *et al.* The involvement of ATP sulfurylase in Se (VI) and Cr (VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 63, p. 89–95, 2003.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, London, v. 379, p. 1256-1268, 2012.

REIS, A.R., *et al.* Antioxidant metabolism in coffee (*Coffea arabica* L.) plants in response to nitrogen supply. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Rockville, v. 27, p. 203–213, 2015.

REIS, A. R. *et al.* Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. *In*: DE KOK, L. J.; HAKESFORD, M. J. (ed.). **Plant Ecophysiology**. Netherlands: Springer International, 2017. V. 11, p. 209-230.

REIS, H. P. G. *et al.* Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. **Journal of Cereal Science**, London, v. 79, p. 508-515, 2018.

RIBEIRO, D. M. *et al.* Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 39, p. 2235-2246, 2016.

RIOS, J. J. *et al.* Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 90, p. 1914-1919, 2010.

SAIDI, I.; CHTOUROU, Y.; DJEBALI, W. Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative estresse in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v. 171, p. 85-91, 2014.

SANTOS, E. F. *et al.* Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology, and Biochemistry**. Lausanne, v.113, p. 6-19, 2017.

SANTOS, H.G. *et al.* **Brazilian system of soil classification**. 5. ed. Rev. and ampl. Brasília: Embrapa, 2018.

- 1 SCHIAVON, M.; PILON-SMITS, E. A. H. The fascinating facets of plant selenium
2 accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. **New Phytologist**,
3 Chichester, v. 213, p. 1582-1596, 2017.
- 4
5 SILVA, V. M. *et al.* Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of
6 selenium toxicity in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**,
7 Amsterdam, v. 150, p. 172-182, 2018.
- 8
9 SHARMA, S. *et al.* Comparative effects of selenate and selenite on growth and
10 biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht,
11 v. 329, p. 339–348, 2010.
- 12
13 SHINMACHI, F. *et al.* Influence of sulfur deficiency on the expression of specific
14 sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in
15 wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, p. 327–336, 2010.
- 16
17 SMRKOLIJ, P. *et al.* Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of
18 Se (VI) and various levels of UV-B radiation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 96, p.
19 675-681, 2006.
- 20
21 SORS, T. G. *et al.* Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants
22 with varying capacities to accumulate selenium. **The Plant Journal**, Chichester, v.
23 42, p. 785–797, 2005.
- 24
25 TAMAOKI M.; FREEMAN J. L.; PILON-SMITS E. A. Cooperative ethylene and
26 jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in Arabidopsis. **Plant**
27 **Physiology**, Rockville, v. 146, p. 1219–1230, 2008.
- 28
29 TERRY, N. *et al.* Selenium in higher plants. **Annual review of Plant Physiology**,
30 **Rockville and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401–432, 2000.
- 31
32 TURAKINEN, M.; HARTIKAINEN, H.; SEPPEANEN, M. M. Effect of selenium
33 treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentration of soluble
34 sugars and starch **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.
35 52, p. 5378–5382, 2004.
- 36
37 VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**,
38 Philadelphia, v. 22, p. 280-283, 1968.
- 39
40 VAN HOEWYK, D. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative
41 estresse both contribute to selenium estresse in plants. **Annals of Botany**, Oxford,
42 v. 112, p. 965–972, 2013.
- 43
44 YAO, X.Q.; CHU, J.Z.; BA, C.J. Antioxidant responses of wheat seedlings to
45 exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. **Biological Trace**
46 **Element Research**, Heidelberg, v. 136, p. 96–105, 2010a.
- 47
48 YAO, X.Q.; CHU, J.Z.; BA, C.J. Responses of wheat roots to exogenous selenium
49 supply under enhanced ultraviolet-B. **Biological Trace Element Research**,
50 Heidelberg, v. 137, p. 244–252, 2010b.

- 1
2 YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin.
3 **Analyst**, Kaduna, v. 80, p. 209-213, 1955.
4
- 5 WADT, L. H. O.; KAINER, K.A. Domestication and breeding of the Brazil nut tree. *In*:
6 Borém, A. et al. (ed.). **Domestication and breeding**: Amazonian species. Viçosa:
7 Ed. da UFV, 2012. p. 297–317.
8
- 9 WANG, C. Q. Water-estresse mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. **Journal**
10 **of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 174, p. 276–282, 2011.
11
- 12 WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, Oxfoed, v. 117,
13 p. 217–235, 2016.
14
- 15 WHITE, P. J. Selenium metabolism in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**
16 **(BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1862, p. 2333-2342, 2018.
17
- 18 WHITE, P. J. *et al.* Interactions between selenium and sulphur nutrition in
19 *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1927–
20 1937, 2004.
21
- 22 WRZACZEK, M.; BROSCHÉ, M.; KANGASJÄRVI, J. ROS signaling loops-
23 production, perception, regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 16,
24 p. 575–582, 2013.
25
- 26 XUE, T.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth promoting
27 effect of selenium on senescing lettuce. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 55–61.
28

4. CAPÍTULO 4 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLOS DA AMAZÔNIA TOLERANTES A ALTA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO

Resumo – O selênio (Se) é um elemento essencial para a vida do humano, atuando principalmente na síntese do hormônio tireoide. Nas plantas é considerado um elemento benéfico que pode mitigar o estresse oxidativo nas células vegetais. A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é reconhecida mundialmente como a maior fonte de Se para alimentação, no mundo. Nativa de solos da Amazônia, que possuem, em sua maioria solos com teores de Se que não justificam as exageradas concentrações do elemento na castanha-do-Brasil. Devido a elevada diversidade de organismos nos solos da Amazônia, a hipótese desse estudo é de que existem bactérias redutoras de Se na rizosfera de castanha-do-Brasil. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar colônias de bactérias encontradas em rizosferas de Castanha-do-Brasil. Foram coletadas amostras de áreas nativas e de uma fazenda da região de Itacoatiara-AM. Desse material, foi realizada análise de concentração de Se no solo, as bactérias foram isoladas e submetidas ao teste de mínima concentração de inibição e taxa de crescimento sob efeito de selenito e selenato nas doses de 0,0002, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, 200 e 2000 mM de Se. Além disso foram realizadas análise morfológica e genética das bactérias isoladas. Apesar dos solos da fazenda apresentarem concentração de Se 10 vezes maiores que o solo de área nativa, os isolados de bactérias encontrados em ambos solos foi igual. Quatro colônias de *Bacillus* foram isoladas, apresentando inibição de crescimento quando expostas a doses muito elevadas: 2000 mM de Se (selenato) ou 200 mM de Se (selenito). A colônia 3 apresentou taxa de crescimento levemente inferior às demais, mas todas as colônias demonstraram grande tolerância ao crescimento em meio contendo Se. Esses isolados de bactéria apresentam características favoráveis para sobrevivência em áreas com alta concentração de Se, com potência para serem uma nova alternativa no fornecimento de Se às culturas por meio da solubilização do Se presente no solo.

Palavras-chave: Castanha-do-Brasil; *Bertholletia excelsa*; rizosfera; selenito; selenato.

Abstract - Selenium (Se) is an essential element for human life, acting mainly in the synthesis of the thyroid hormone, and in plants it is a beneficial element that can mitigate oxidative stress in plant cells. The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is recognized worldwide as the largest source of Se for food in the world. It is native to Amazonian soils, which have, in their majority, soils with Se contents that do not justify the exaggerated concentrations of the element in the Brazil nut. Due to the high diversity of organisms in Amazonian soils, the hypothesis of this study is that there are Se reducing bacteria in the rhizosphere of Brazil nuts. Therefore, the objective of this work was to isolate and characterize bacterial colonies found in Brazil nut rhizospheres. Samples were collected from native areas and from a farm in the region of Itacoatiara-AM. From this material, soil Se concentration analysis was performed, bacteria were isolated and submitted to the minimum inhibition concentration test and growth rate under the effect of selenite and selenate at doses of 0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 and 2000 mM of Se. In addition, morphological and genetic analyses of the isolated bacteria were performed. Although the farm soil had a Se concentration 10 times higher than the native soil, the bacterial isolates found in both soils were the same. Four colonies were isolated showing growth inhibition when exposed to very high doses: 2000 mM of Se (selenate) or 200 mM of Se (selenite). Colony 3 showed slightly lower growth rate than the others, but all colonies showed high tolerance to growth on medium containing Se. These bacterial isolates present favorable characteristics for survival in areas with high Se concentration, with potential to be a new alternative in the supply of Se to crops by solubilizing Se present in the soil.

Keywords: Brazil nuts; *Bertholletia excelsa*; rhizosphere; selenite; selenate.

4.1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento benéfico para plantas (WHITE, 2016; LANZA; REIS, 2021), mas considerado essencial para os animais e humanos (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011), além de exercer papel importante na biologia de organismos menos complexos, como Archeae e Prokaryota (FLOHÉ *et al.*, 2000). Por exercer função na ativação de enzimas ao combater o estresse oxidativo

1 (SILVA *et al.*, 2020), o Se pode mitigar o estresse da planta oriundo de condições
2 abióticas (WHITE, 2016).

3 Para os seres humanos, estima-se que aproximadamente 1 bilhão de
4 pessoas no mundo sofram pela falta de Se (COMBS, 2011). E a falta de Se está
5 associada a problemas de saúde como hipotireoidismo, doenças cardiovasculares,
6 fragilidade do sistema imunológico, infertilidade masculina e aumento na incidência
7 de vários tipos de câncer (FORDYCE, 2013).

8 Isso ocorre pois, o Se é um elemento escasso em solos de reação ácida com
9 alta teor de umidade, como é o caso dos solos tropicais (PILON-SMITS *et al.*, 2009),
10 consequentemente, as plantas, possuem concentrações reduzidas de Se em seus
11 tecidos comestíveis (REIS *et al.*, 2017). Portanto, é desejável a utilização de
12 artifícios para aumentar a disponibilidade desse elemento para as plantas. A
13 aplicação de Se como fertilizantes (REIS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019; MATEUS
14 *et al.*, 2021; LANZA *et al.*, 2021) e o uso de variedades geneticamente melhoradas
15 e/ou modificadas (ZHANG *et al.*, 2020), são as estratégias mais comuns para elevar
16 a concentração de Se nos alimentos de origem vegetal. Entretanto, existe também a
17 possibilidade de explorar bactérias endofíticas, que podem ter potencial para
18 aumentar a disponibilidade de Se para as plantas.

19 Bactérias presentes na rizosfera e no solo, são fundamentais para o
20 desenvolvimento das plantas, podendo contribuir por mecanismos diretos e indiretos
21 (GUPTA *et al.*, 2000; GLICK, 2012). Bactérias endofíticas, que podem colonizar o
22 interior do tecido vegetal, como das raízes, caule, folhas, flores, frutos ou sementes
23 (JHA *et al.*, 2013). Esses organismos são utilizados com frequência para promover o
24 crescimento de plantas (FENG *et al.*, 2013), podendo gerar também aumento na
25 disponibilidade de nutrientes (HE *et al.*, 2020). Esses microrganismos liberam no
26 solo sideróforos, que auxiliam no aumento da biodisponibilidade de alguns
27 elementos (BHATTACHARYA; JHA, 2012). E a secreção de ácidos orgânicos pode
28 ter influência na biodisponibilidade de Se no solo (JIA *et al.*, 2019).

29 Entre os microrganismos endófitos, alguns são descritos como
30 hiperacumuladoras de Se, devido suas características de tolerância ao Se,
31 capacidade de liberar Se elementar e possibilidade de promover o desenvolvimento
32 de plantas em solos com elevada concentração do elemento (SURA-DE JONG *et al.*
33 *et al.*, 2015). Além do efeito direto, disponibilizando Se para a planta, essas bactérias

podem contribuir de forma indireta para o desenvolvimento vegetal. Em estudo observando a decomposição de material orgânico com elevados níveis de Se (550 mg kg⁻¹ de matéria seca) foi constatada decomposição mais rápida em comparação a material orgânico com baixos níveis de Se, indicando a presença de comunidade microbiana decompositora Se-resistente (QUINN *et al.*, 2011).

Estudando a diversidade de bactérias endofíticas, Sura-De Joung *et al.*, 2015, observaram comunidades bacterianas iguais em rizosfera de plantas hiperacumuladoras e não hiperacumuladoras de Se, foram encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Advenella*, *Arthrobacter*, e *Variovorax*, em sua maioria, capazes de converter selenato a selenita, e selenito a Se elementar.

A castanha-do-Brasil é a fonte de Se mais rica que existe para a alimentação (DUMONT *et al.*, 2006) no mundo, sendo uma planta nativa da floresta amazônica. No entanto, estudos recentes indicam que a concentração de Se em solo amazônico não são exageradamente elevadas: Silva Junior *et al.* (2017) estudando a concentração de Se em solo da floresta amazônica, constataram que 98% dos solos avaliados foram classificados como solos deficientes em Se (concentrações inferiores a 0,6 mg kg⁻¹), no mesmo estudo, observaram no entanto uma elevada eficiência das arvores de acumular Se nas castanhas. Os solos da floresta amazônica possuem elevada biodiversidade microbiológica (FONSECA *et al.*, 2018; VERA-VELÉZ *et al.*, 2021), com potencial de abrigar inúmeros micro-organismos resistentes a presença de Se, e com capacidade de torna-lo mais disponível para as plantas.

A hipótese desse estudo é que, em solos amazônicos, ocorram micro-organismos tolerantes ao Se, capazes de aumentar a disponibilidade do elemento. O presente estudo teve como objetivo caracterizar bactérias encontradas em solos da Amazônia, buscando encontrar possíveis organismos endofíticos redutores de Se.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento e triagem de cepas resistentes à aplicação de selênio

As amostras de solo foram coletadas entre março e maio de 2018, na camada superficial (0-10 cm) do solo, em duas áreas localizadas na região de Itacoatiara-AM. A primeira coleta de solo foi realizada em uma área de plantio comercial de

castanha-do-Brasil, na fazenda Aruanã. A segunda coleta foi realizada em uma área de floresta nativa. As amostras foram então armazenadas a -80°C Pr posterior realização do isolamento e caracterização da comunidade microbiana. Os parâmetros de propriedades químicas e físicas destas áreas são apresentados na Tabela 1. As propriedades físicas do solo foram determinadas de acordo com Teixeira et al., 2017, as propriedades químicas foram determinadas de acordo com Silva et al., 2019.

Tabela1. Análise químicas e físicas de solo.

Area	Si	S	Se	I
	---mg kg ⁻¹ ---		---µg kg ⁻¹ ---	
Nativa	5,4±0,5	4,4±0,6	4,4±0,6	44,0±3,4
P21	6,7±0,2	20,3±0,6	42,9±0,5	80,8±0,8
P27	4,2±0,4	11,7±0,4	42,4±0,4	103,9±0,3
P28	4,5±0,4	7,7±0,2	40,7±0,5	62,6±1,0
P29	4,9±0,4	9,2±0,5	40,3±0,7	53,4±2,8
	Areia	Silte	Argila	
	---g kg ⁻¹ ---			
Nativa	587,6±2,9	289,1±0,5	123,3±0,3	
P21	749,2±0,3	103,1±0,8	147,7±2,7	
P27	730,1±0,3	95,0±3,8	174,9±0,2	
P28	659,5±0,2	103,9±0,9	236,6±0,2	
P29	735,3±0,5	97,1±1,6	167,7±1,8	

Fonte: Do próprio autor

Posteriormente, 10 gramas de cada amostra foram adicionadas em Erlenmeyers contendo 90 ml de solução de NaCl a 10%. As amostras foram então agitadas por 30 minutos a 150 rpm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de cada amostra, em uma escala de 10^{-1} a 10^{-3} . As alíquotas (0.1 ml) de cada diluição foram então espalhadas em placas contendo o meio Tryptic Soy Broth (TSB) mais agar.

Foram utilizadas duas fontes de selênio: selenato Se(VI) e selenito Se(IV) e quatro doses (0, 25 µmol, 50 µmol e 100 µmol). Devido a sensibilidade do Se a altas temperaturas, as doses de selênio só foram adicionadas ao meio após o processo de esterilização, quando o meio já em temperatura ambiente.

A incubação foi performada a 30 °C durante 3 dias. Após a incubação e crescimento microbiano, foram observados o tamanho, a cor e a morfologia das colônias que obtiveram crescimento positivo. Para a obtenção de culturas puras das

colônias isoladas, cada colônia foi sub-cultivada em meio TBS (tryptic soy broth) para que apenas colônias com características semelhantes crescessem no meio (CHOVANOVÁ *et al.*, 2004; MORTAZAVI *et al.*, 2005; ZOLGHARNEIN *et al.*, 2007; GHOSH *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2009).

4.2.2 Medição da taxa de crescimento das colônias e efeito tóxico de Se(VI) e Se(IV).

O estudo do crescimento das colônias foi feito em erlenmeyers contendo 50 ml de meio TBS, duas fontes (selenato e selenito) na dose de 20 mM, em triplicatas. Cepas das amostras das bactérias foram previamente inoculadas e, no dia seguinte, 1 ml do inóculo foi adicionado a cada frasco (ADARSH *et al.*, 2007; ABDELALEY *et al.*, 2011). Todos os frascos foram colocados em um shaker e mantidos a 250 rpm durante 1 semana em temperatura ambiente. Em intervalos pré definidos, o crescimento foi monitorado pela medição da absorbância a 600 nm usando um espectrofotômetro, até que a fase estacionária fosse atingida. (RAJA *et al.*, 2009). A curva final de crescimento foi baseada na média das triplicatas.

Para a análise do efeito tóxico do selenato e do selenito sob os isolados, foi realizado o teste de zona inibitória de crescimento. Para isto, 50 µL dos isolados foram inoculados em placa petri contendo o meio TBS + ágar. Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram umedecidos com 10 µL das soluções de selenato e selenito, nas nove concentrações (0 a 2M) e posteriormente incubados a 30°C por 24 horas (RABANAL *et al.*, 2002; SOLTAN *et al.*, 2008; PRAPAGDEE;WATCHARAMUSIK 2009).

4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A concentração mínima inibitória (MIC) é a concentração mínima de um inibitor responsável por limitar o crescimento de um determinado microrganismo (RICHARDS *et al.*, 2002; SOLTAN *et al.*, 2008). No presente estudo, MIC foi determinado em meio TBS (tryptic soy broth) com diferentes concentrações de selenato e selenito nas doses 0, 0,2 µM, 2 µM, 20 µM, 200 µM, 2 mM, 20 mM, 200 mM e 2M. a inoculação foi feita utilizando 100 µL de suspensão bacteriana pré-crescida (Mortazavi *et al.* 2005; Sarin, Sarin 2010; Nasrazadani *et al.* 2011). Após a incubação a 30 °C por 72 h a 150 rpm, foi realizado a medição da densidade óptica

a 600 nm. Um tubo de ensaio contendo respectivamente cada concentração de selenato e selenito, sem o inóculo, foi utilizado como branco para a medição da densidade óptica. (ABDELALEY *et al.*, 2011; NASRAZADANI *et al.*, 2011).

4.2.4 Caracterização dos isolados selecionados

A morfologia celular, incluindo reação gram e o formato da célula, foi observada ao microscópio. Para as análises por coloração de Gram foram utilizadas culturas jovens dos isolados crescidas em meio TBS por 2 dias a 30 °C. Uma gota de água deionizada estéril foi colocada no centro de uma lâmina limpa, em seguida, utilizando uma alça de platina flambada, uma pequena quantidade de amostra proveniente de uma colônia foi transferida para a lâmina e solubilizada na gota de água estéril. O esfregaço foi deixado em repouso para secar ao ar e depois fixado passando-se sob a lâmina a quente. Com a lâmina resfriada, o esfregaço foi coberto com solução de violeta genciana fenicada e deixado em repouso por 1 min. Posteriormente, o excesso de corante foi escorrido e o esfregaço foi coberto com a solução de iodo de Gram e deixado em repouso por mais 1 min. O excesso de solução de iodo de Gram foi escorrido e a lâmina foi lavada gotejando a solução descorante (álcool-acetona) por 15-30 segundos. A lâmina foi lavada com água deionizada e corada com a solução de fucsina fenicada por 30-60 segundos. Finalmente, a lâmina foi lavada com água deionizada, deixada secar ao ar e observada ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x).

A identificação dos isolados foi baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, usando uma cultura pura de cada colônia. A extração de DNA foi realizada de acordo com as instruções do kit de extração de DNA (CHOUDHARY; SAR 2009; RAJA *et al.*, 2009). Após assegurar a pureza e a quantidade de genoma extraído 16S rRNA bacteriano foi amplificado utilizando os primers F (27F, 341F e 968F) e R (1942R e 518R) (YAGHOOBIZADEH *et al.*, 2017).

A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) consistiu da seguinte mistura: 1 µl de DNA (aprox. 50 ng), 7,5 µl MgCl₂ (25mM), 4 µl de dNTP's (2,5mM), 0,1 µl dos primers (100mM), 5 µl Taq Buffer (10X), 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹) e 31,8 µl de água Milli-Q autoclavada, com volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada em um termociclador Gene Pro Thermal Cycler utilizando a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de

desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (63°C por 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (ODEE *et al.*, 2002).

Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida de coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta (ANDREOE *et al.*, 2007). As sequências válidas foram utilizadas para uma busca de similaridade por BLASTn no banco de dados GenBank (Basic Local Alignment Search tool) disponível no site NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov). A nova sequência foi submetida ao GenBank. A análise filogenética foi realizada pelo método de união de vizinhos usando o software MEGA 4.0 (ADARSH *et al.* 2007).

4.2.5 Caracterização molecular

DNA dos isolados foi extraído e amplificado. Logo após, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) em tampão 1xTAE e corado com brometo de etídio (0,5 µg.ml⁻¹) (Fig 4). As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]), no qual foi observada a similaridade destas seqüências com regiões 16S rDNA já depositadas no banco de dados.

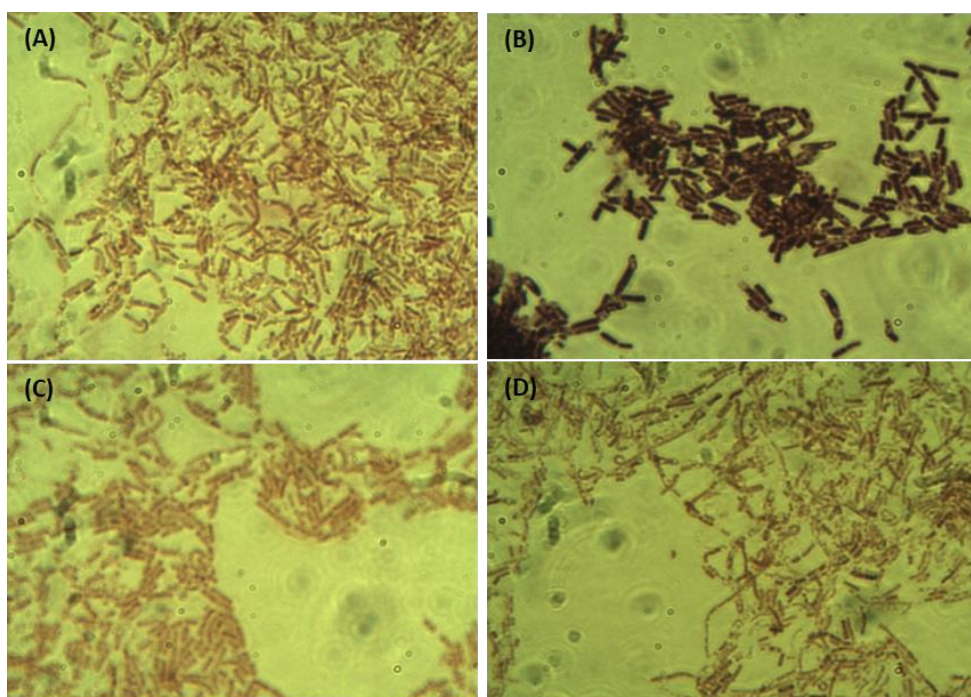
4.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA One-Way) por meio do software estatístico R. Em seguida, o teste de Tukey (P<0,05) foi aplicado para comparação entre as médias.

4.3 RESULTADOS

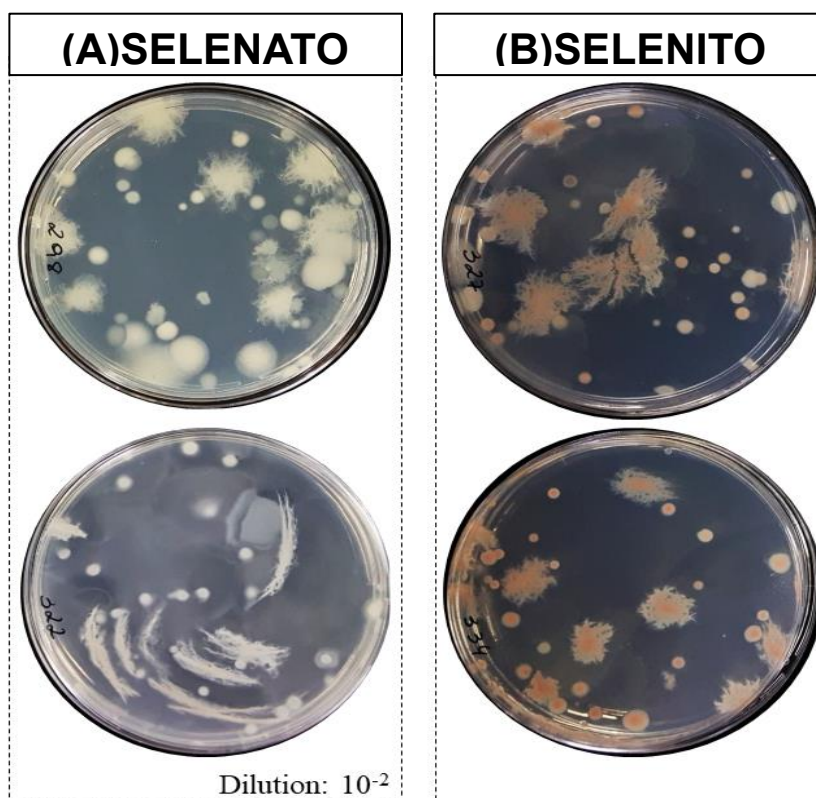
Quatro cepas foram isoladas dos solos provenientes a fazenda Aruanã. A caracterização primária desses isolados foi realizada com base na sua morfologia e o teste Gram. Todas as quatro colônias foram classificadas como *Bacillus* sp. Gram-negativas (Fig. 1 e 2). A produção da coloração vermelha no teste de crescimento é uma indicação da capacidade das bactérias em reduzir Se (IV) para Se (0) (Fig. 3).

Figura 1. Coloração de Gram de linhagens de *Bacillus* após o cultivo em meio LB + selenito. (A) colônia 1; (B) colônia 2; (C) colônia 3; (D) colônia 4.



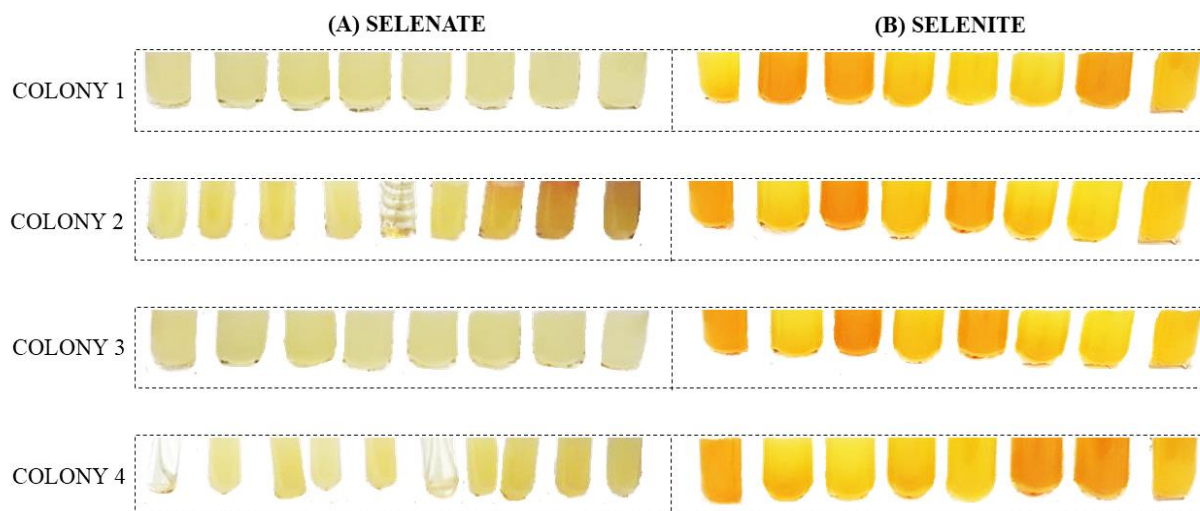
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 2. Isolados de *Bacillus* em meio LB + selenato (A) e LB + selenito (B).



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 3. A partir da dose de 200mM não houve crescimento visível das colônias, enquanto os demais tubos apresentavam turbidez, as doses 200mM e 2M permaneceram translúcidos, somente para selenito. Para selenato, somente a dose 2M não apresentou crescimento aparente das colônias.



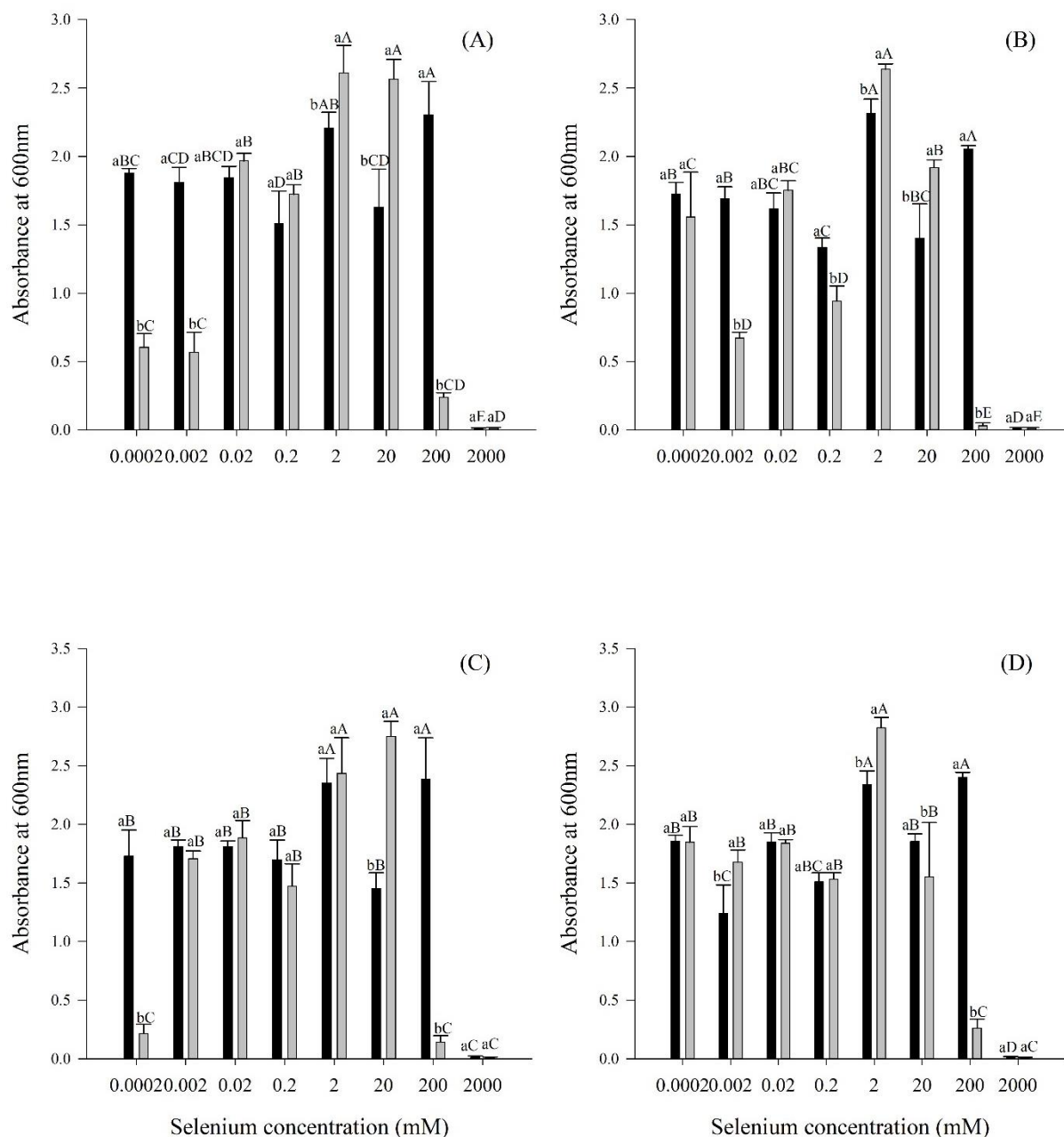
Fonte: Do próprio autor (2020).

A taxa de crescimento das colônias selecionadas na presença de selenato e selenito são apresentadas na Fig 4. Foi observada interação entre concentrações de exposição e fontes de Se no crescimento dos 4 isolados de bactéria observados (Fig. 4). A colônia 1 apresenta crescimento superior no selenato em relação ao selenito quando exposta as concentrações de 0.0002, 0.002 e 200 mM de Se, e o inverso quanto exposta as concentrações de 2 e 20, sob as concentrações de 0.02, 0.2 e 2000 mM de Se, não foi observada entre selenito e selenato para o crescimento (Fig. 4A). Para o selenato, a concentração de 200 mM de Se proporcionou o maior crescimento da colônia 1, e para o selenito o maior crescimento foi observado nas concentrações de 2 e 20 mM (Fig. 4A). Na colônia 2, a exposição ao selenato proporcionou maior crescimento que ao selenito nas concentrações de 0.002, 0.2 e 200 mM de Se, já o selenito proporcionou maior crescimento que o selenato nas concentrações de 2 e 20 mM, enquanto nas concentrações de 0.02 e 2000, não houve diferença entre as fontes (Fig. 4B). O maior crescimento foi observado sobre as concentrações de 2 e 200 mM de Se na forma de selenato, ou 2 mM de Se na forma de selenito (Fig. 4B). Na terceira colônia, o crescimento foi maior sob a aplicação de selenato nas concentrações de 0.0002 e 200 mM de Se, na aplicação de selenito o crescimento foi maior na

1 concentrações de 20 mM, enquanto nas demais concentrações não foi observada
2 diferença entre as fontes de Se (Fig. 4C). O maior crescimento de bactérias na
3 colônia 3, quando exposta ao selenato, foi observado nas doses de 2 e 200 mM de
4 Se, e quando exposta ao selenito, nas dose de 2 e 20 mM de Se (Fig. 4C). Para a
5 colônia 4, selenato apresentou maior crescimento que selenito nas concentrações
6 de 20 e 200 mM de Se, já o selenito proporcionou maior crescimento que o selenato
7 nas concentrações de 0.002 e 2 mM de Se, nas demais doses, não houve diferença
8 entre selenito e selenato (Fig. 4D). Novamente, os maiores crescimentos sob a
9 exposição ao selenato foram observados sob as concentrações de 2 e 200 mM de
10 Se, enquanto para o selenito, a concentração de 2 mM de Se proporcionou maior
11 crescimento. Na concentração de 2000 mM, tanto para selenito quanto para
12 selenato, nenhuma colônia apresentou crescimento (leitura de absorbância
13 praticamente 0), o mesmo foi observado também na concentração de 200 mM de Se
14 sob a forma de selenito, para a colônia 2 (Fig. 4).

15

1 Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de selenato e selenito no crescimento
 2 de isolados de bactérias de um solo contendo altas concentrações de Se. Médias e
 3 desvio padrão de 3 repetições. O crescimento foi estimado medindo a absorção das
 4 culturas a 600nm.



5 Selenium concentration (mM)

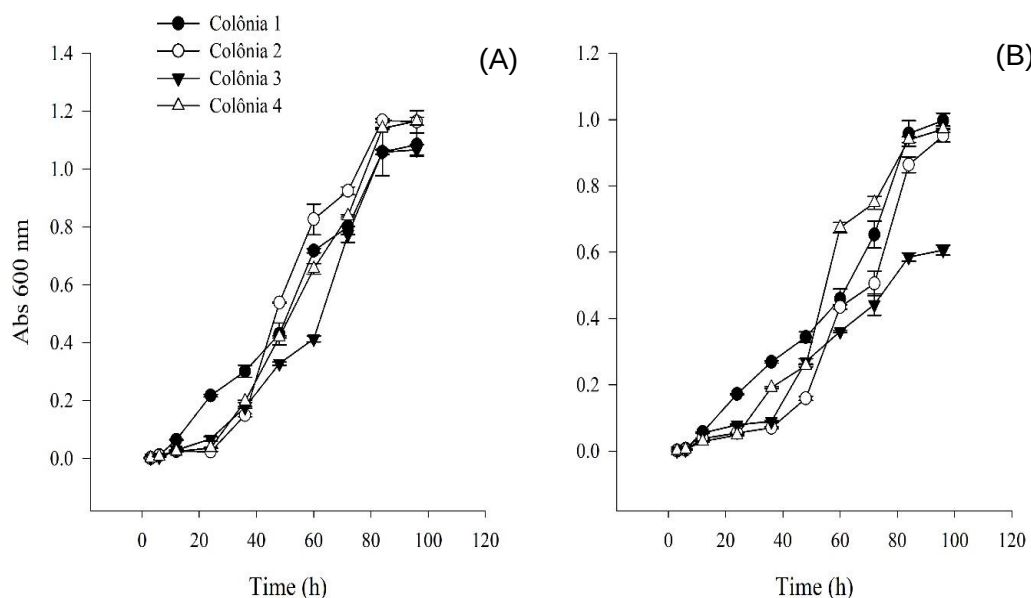
6 Fonte: Do próprio autor (2020).

7

8 Foi realizada a avaliação da curva de crescimento das bactérias ao longo de
 9 96 horas, sob o efeito de selenito ou selenato (Fig 5). Em exposição ao selenato, a
 10 Colônia 1 apresentou crescimento mais elevado que as demais colônias até do início
 11 do crescimento até as 36h. Entre 36 e 72 horas, a colônia 2 apresentou o maior

crescimento e a colônia 3, o menor crescimento. A partir de 72 horas, todas as colônias apresentaram crescimento semelhante até o final da avaliação (Fig. 5A). Em relação a aplicação de selenito, foi observada uma maior variação no crescimento entre as colônias: a colônia 1 apresentou o maior crescimento entre 0 e 48 horas, enquanto a colônia 4 apresentou o maior crescimento entre 48 e 60 horas. O menor crescimento foi observado na colônia 2 entre 36 e 48 horas, e de 48 em diante, a colônia 3 apresentou o menor crescimento. Ao final das 96 horas as colônias 1, 2 e 4 apresentaram crescimento semelhante, enquanto a colônia 3 cresceu menos que as demais (Fig. 5B).

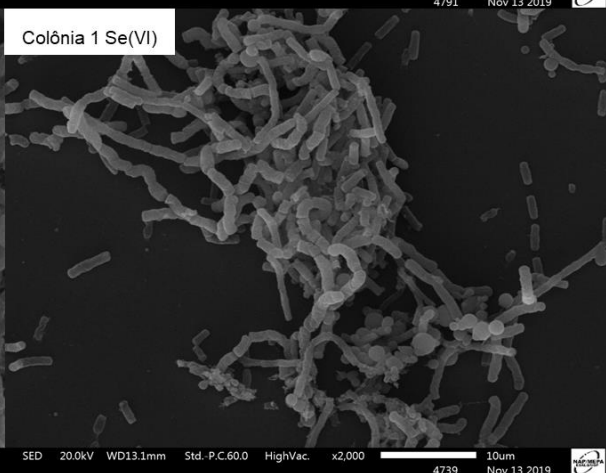
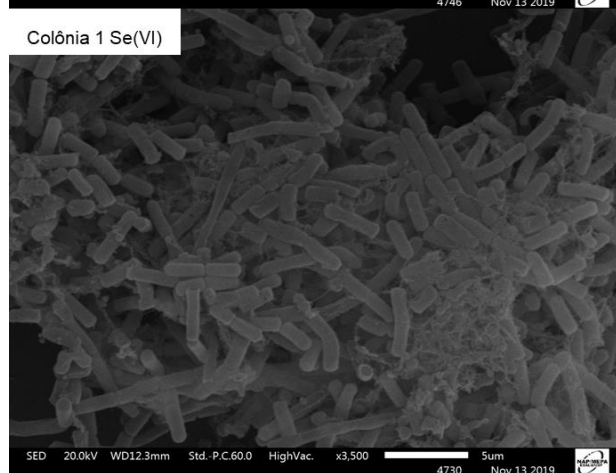
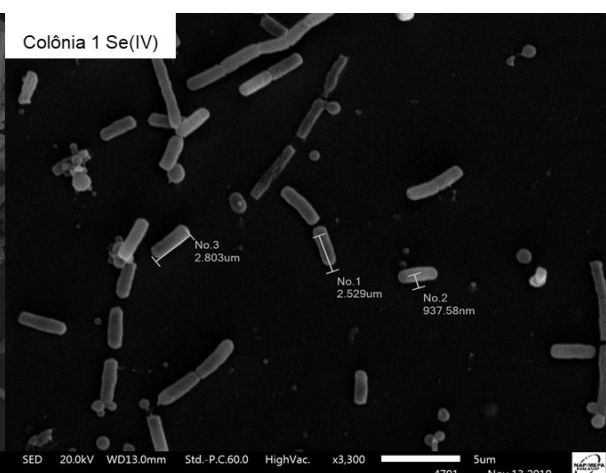
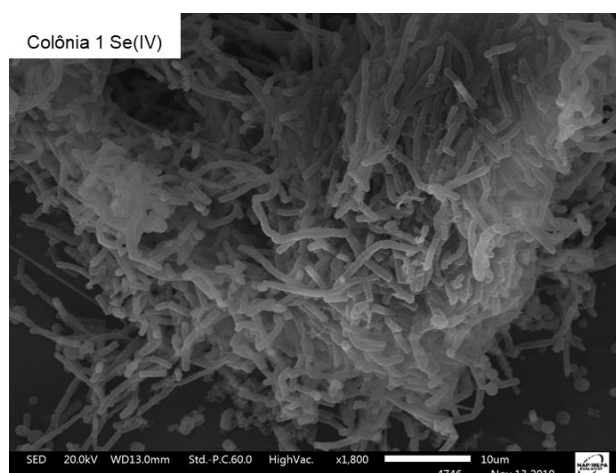
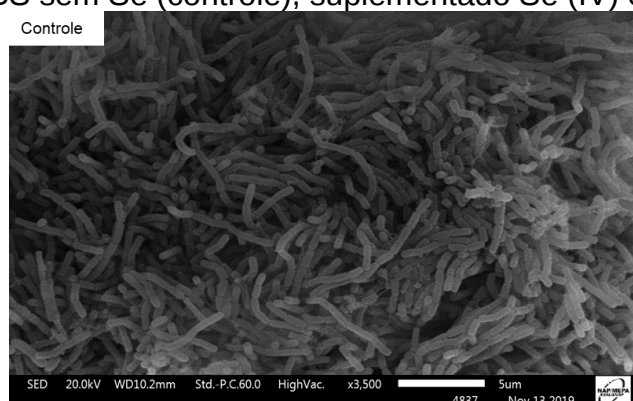
Figura 5. Curva de crescimento de bactérias isoladas de um solo com alta concentração de selenio. (a) selenato; (b) selenito. Médias e desvio padrão de três repetições.



Fonte: Do próprio autor (2020).

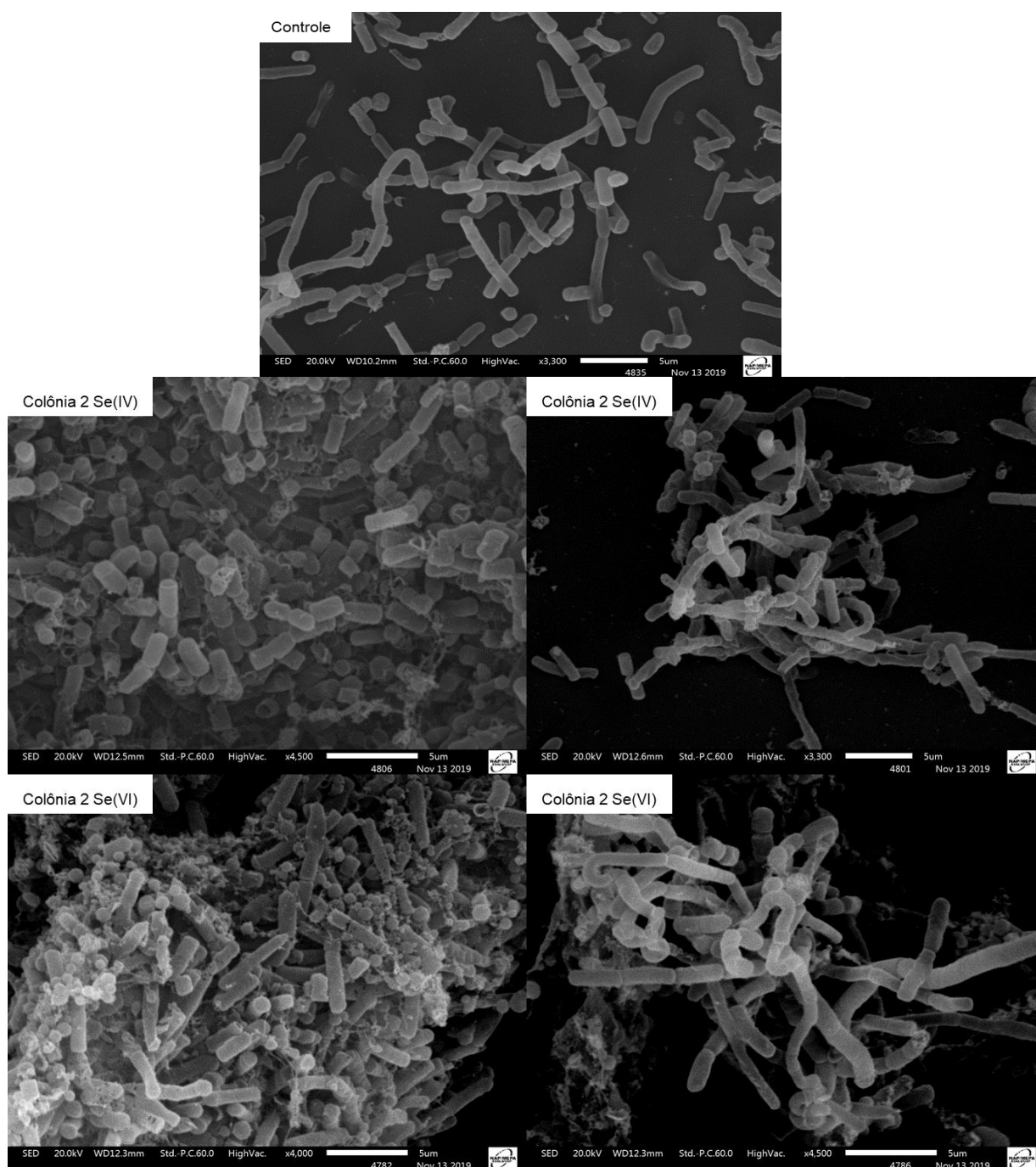
A análise da morfologia das bactérias pelas imagens do microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostram que o tamanho das células foi afetado pelos tratamentos com Se (Fig 6, 7, 8 e 9). Quando comparada com o controle, as bactérias tratadas com Se apresentaram um maior alongamento celular, bem como pequenas invaginações e evaginações. A presença de Se estimulou também a secreção de substâncias poliméricas extracelulares.

Figura 6. Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 1 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).



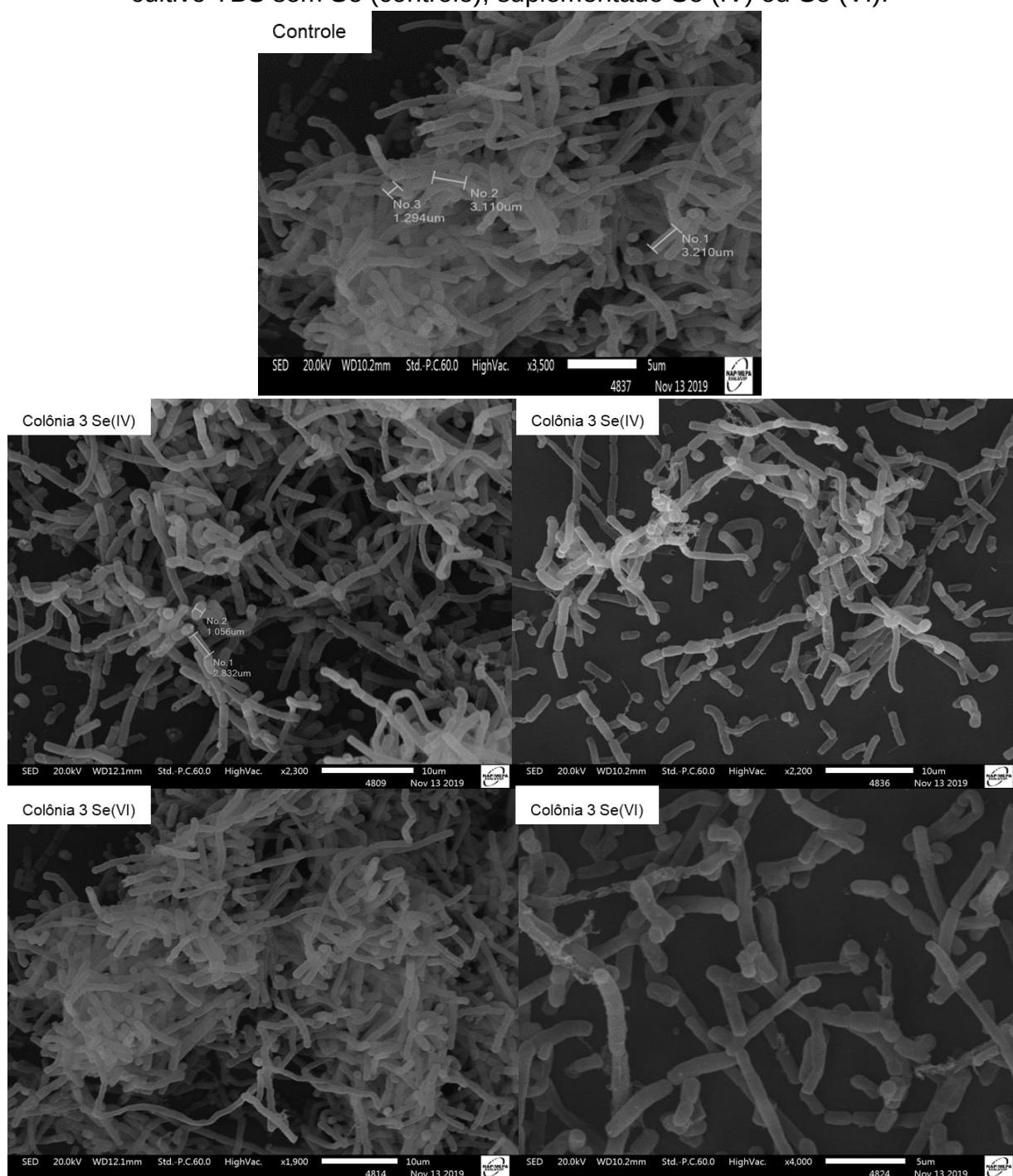
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 7. Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 2 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).



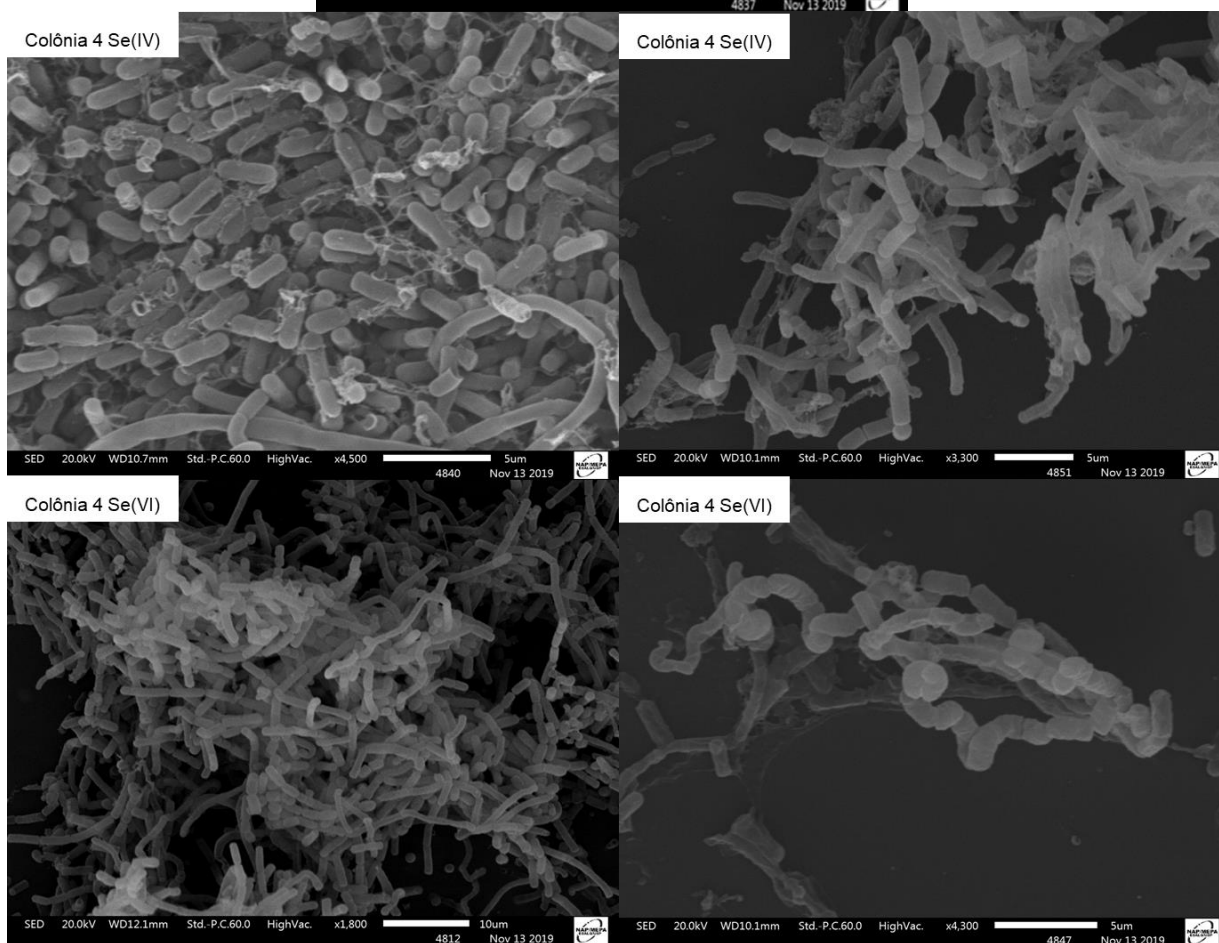
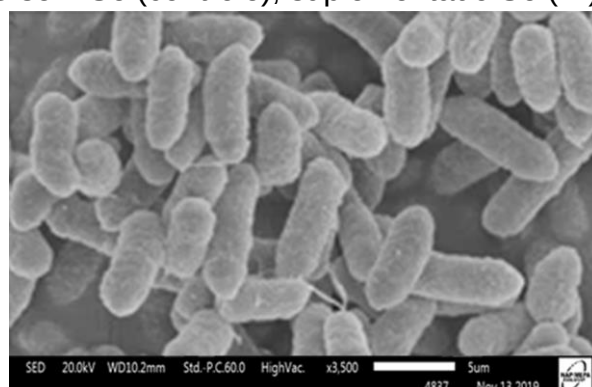
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 8. Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 3 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 9. Imagens MEV da morfologia celular das bactérias da colônia 4 em meio de cultivo TBS sem Se (controle), suplementado Se (IV) ou Se (VI).

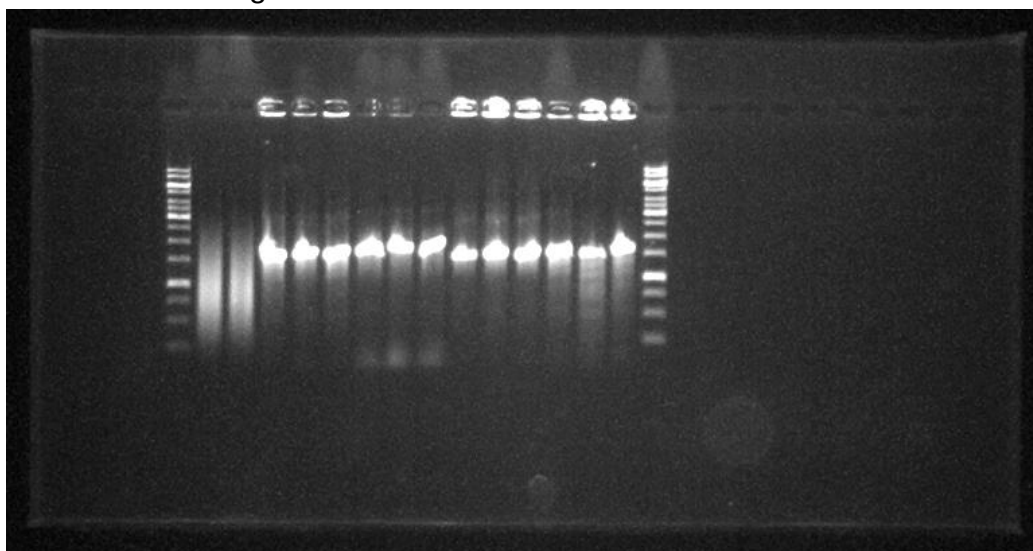


Fonte: Do próprio autor (2020).

O DNA dos isolados foi extraído e amplificado. Logo após, os amplicons foram analisados utilizando gel de agarose em eletroforese, como mostrado na figura 10. As sequências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram então alinhadas utilizando-se a

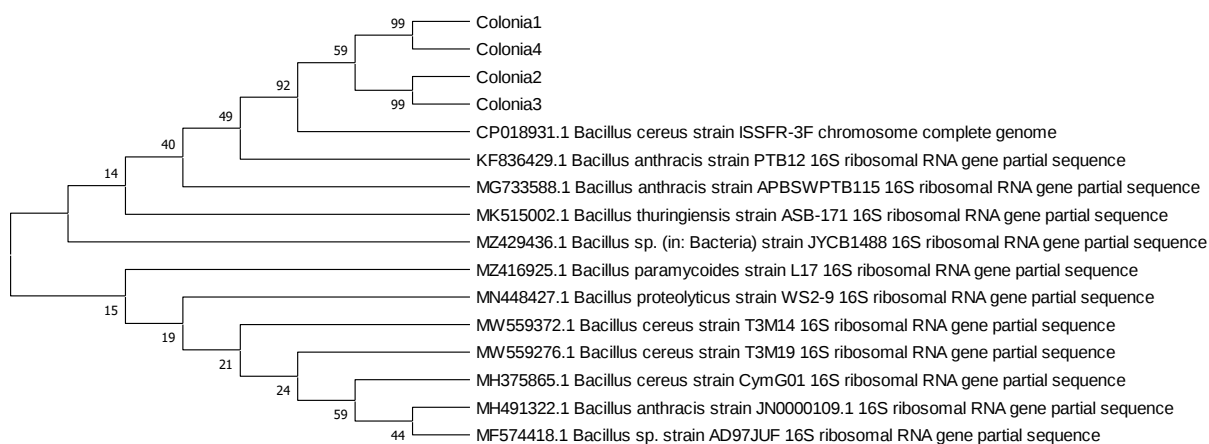
ferramenta ClustalW, no programa MEGA 4.0 e a árvore filogenética foi construída pelo método neighbor-joining (Fig 11).

Figura 10. Eletroforese resultante da PCR.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 11. Relações filogenéticas entre as cepas do presente trabalho e o *Bacillus* mais restritamente relacionado. O dendrograma foi gerado usando o programa MEGA 4.0.



4.4 DISCUSSÃO

Selenato e selenito são duas formas de Se observadas no ambiente (MEHDI *et al.*, 2013), podendo assim, afetar naturalmente os organismos. Comparando o efeito das duas fontes de Se no desenvolvimento da bactéria, observa-se que as mesmas são mais tolerantes ao selenato, que continuou proporcionando

1 crescimento regular na dose de 200 mM para todos os isolados, porém, e na mesma
2 concentração de selenito, todos os isolados apresentaram crescimento prejudicado,
3 ou completamente inibido. A faixa entre o benefício e a toxicidade causadas por Se
4 é estreita (SCHIAVON; PILON SMITS, 2017), e especificamente em bactérias, foi
5 observado que o Se elementar pode causar danos no DNA além de inibir o processo
6 respiratório (ZHU *et al.*, 2018).

7 O selenato é convertido a selenito, que então é posteriormente convertido até
8 chegar ao estado de Se elementar (HAGEMAN *et al.*, 2013), portanto espera-se que
9 a inibição do crescimento ocorra primeiro na presença do selenito, já que esse
10 composto será mais rapidamente convertido a Se elementar. No entanto mesmo a
11 inibição por selenito foi observada em concentrações muito elevadas: todos os
12 isolados de bactéria do presente estudo apresentaram maior sobrevivência quando
13 expostas ao Se que em estudos com *Rahnella aquatilis* (ZHU *et al.*, 2018),
14 *Stenotrophomonas maltophilia* (LAMPIS *et al.*, 2017), *Thauera selenatis* (BUTLER *et al.*, 2012) e *Astragalus bisculatus* (GREGORIO *et al.*, 2005).

16 Foi observado significativo alongamento celular nos tratamentos com Se (IV) e
17 Se (VI) (Fig 6, 7, 8 e 9) relacionado aos efeitos inibitórios do Se na divisão celular
18 (MCCREADY *et al.*, 1966). Estudos com *Rhodopseudomonas palustres*, *Rahnella*
19 *aquatilis* HX2 e *Pseudomonas* sp. (HUNTER; MANTER 2009; LI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018)

21 A produção excessiva de substâncias poliméricas extracelulares bem como
22 pequenas invaginações e evaginações membrana celular das bactérias corrobora
23 com resultados encontrados por Song *et al.* (2017) onde descreveram a produção
24 desses compostos pelas células bacterianas em concentrações iguais ou maiores que
25 1mM. Danos a membrana celular são reportados em vários trabalhos como
26 resultado das elevadas concentrações de Se, ocasionando em casos severos a
27 ruptura da célula e conseqüentemente a liberação de substâncias extracelulares
28 (KHAN; AL-KHEDHAIRY; MUSARRAT, 2015; LIU *et al.*, 2009; XI; BOTHUN, 2014;
29 ZHU *et al.*, 2018).

30 Apesar da diferença notável na concentração de Se natural nos solos de área
31 nativa e da fazenda (Tabela 1), as mesmas estirpes de bactéria foram encontradas
32 em ambas condições. Essas informações sugerem que as bactérias isoladas no
33 presente trabalho possuem alta tolerância quando expostas ao Se. Isso também é

reforçado pela avaliação da curva de crescimento dos isolados, que foi semelhante para selenito e selenato na concentração de 100 mM, com apenas uma ressalva para o crescimento final da colônia 3 sob efeito de selenito, que foi ligeiramente inferior aos demais materiais avaliados.

4.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, as 4 estirpes de *Bacillus* sp. são tolerantes e sobrevivem a altas concentrações de selenato e selenito. Esses isolados de bactéria apresentam características favoráveis para sobrevivência em áreas com alta concentração de Se, com potencial para serem uma nova alternativa no fornecimento de Se às culturas por meio da solubilização do Se presente no solo.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F. D *et al.* Identificação de bactérias pelo sequenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA). *In*: SANHUEZA, R. M. V.; MELO, I. S. **Métodos utilizados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e e Vinho, 2007. p. 67-74.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Dordrecht, v. 28, p. 1327-1350. 2012.
- BUTLER, C. S. *et al.* Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 40, p. 239-1243, 2012.
- CHOVANOVÁ, K. *et al.* Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from cadmium-contaminated sewage sludge. **Biologia**, Bratislava, v. 59, p. 817–827, 2004.
- COMBS, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 85, p. 517-547, 2011.
- DUMONT, E. *et al.* Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 95, p. 684-692, 2006.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. *et al.* Selenium in human health and disease. **Antioxidant and Redox Signaling**, New Rochelle, v. 14, p. 1337-1383, 2011.
- FENG, R. W.; WEI, C. Y.; TU, S. X. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stressors. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 87, p. 58-68, 2013.

- FLOHÉ, L. *et al.* Selenium, the element of the moon, in life on earth. **IUBMB Life**, Chichester, v. 49, p. 411-420, 2000.
- FONSECA, J. P. *et al.* Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. **Gene**, Amsterdam, v. 642, p. 389-397, 2018.
- FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. *In*: SELINUS, O.; ALLOWAY, B.; CENTENO, J. A. (ed.). **Essentials of medical geology**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 375-416.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, p. ID963401.
- GHOSH, A. *et al.* Isolation and characterization of selenite- and selenate-tolerant microorganisms from selenium-contaminated sites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 1607–1611, 2008.
- GREGORIO, S. D.; LAMPIS, S.; VALLINI, G. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: a biotechnological perspective. **Environmental International**, [S.l.], v. 31, p. 233-241, 2005.
- GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK, K. V. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Dehi, v. 38, p. 856–862, 2000.
- HAGEMAN, S. P. W. *et al.* Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. **Water Research**, Oxford, v. 7, p. 2118-2128, 2013.
- HE, L. *et al.* Enhancing iron uptake and alleviating iron toxicity in wheat by plant growth-promoting bacteria: theories and practices. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 23, p. 190-196, 2020.
- HUNTER, W. J.; MANTER, D. K. Reduction of Selenite to Elemental Red Selenium by *Pseudomonas* sp. Strain CA5. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 493-498, 2009.
- JHA, N. P. *et al.* Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, Sango, v. 3, p. 73–84, 2013.
- JIA, M. M. *et al.* Source apportionment of selenium and influence factors on its bioavailability in intensively managed greenhouse soil: a case study in the east bank of the dianchi lake, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Philadelphia, v. 170, p. 238-245, 2019.

- 1 KHAN, S. T.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; MUSARRAT, J. ZnO and TiO₂ nanoparticles as
2 novel antimicrobial agents for oral hygiene: a review. **Journal of Nanoparticle**
3 **Research**, Dordrecht, v. 17, 2015.
- 4
- 5 LANZA, M. G. D. B.; REIS, A. R. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS
6 scavenging responses against abiotic estressees. **Plant Physiology, and**
7 **Biochemistry**, Lausanne, v. 164, p. 27-43, 2021.
- 8
- 9 LAMPIS, S. *et al.* Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas*
10 *maltophilia* SeITE02: novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium
11 nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 324, p. 3-14, 2017.
- 12
- 13 LI, B.Z. *et al.* Reduction of Selenite to Red Elemental Selenium by
14 *Rhodopseudomonas palustris* Strain N. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, p. 4, 2014.
- 15
- 16 LIU Y *et al.* Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia*
17 *coli*. O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 107, p. 1193-1201,
18 2009.
- 19
- 20 MATEUS, M. P. B. *et al.* Selenium biofortification enhances ROS scavenge system
21 increasing yield of coffee plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,
22 Philadelphia, v. 209, p. 111772, 2021.
- 23
- 24 MEHDI, Y. *et al.* Selenium in the environment, metabolism and involvement in body
25 functions. **Molecules**, Basel, v. 18, p. 3292–3311, 2013.
- 26
- 27 MISHRA, R. R. *et al.* Characterization and evaluation of estresse and heavy metal
28 tolerance of some predominant Gram negative halotolerant bacteria from mangrove
29 soils of Bhitarkanika, Orissa, India. **African Journal of Biotechnology**, Sapele, v. 8,
30 p. 2224–2231, 2009.
- 31
- 32 MORTAZAVI, S. B. *et al.* Removal of mercuric chloride by a mercury resistant
33 *Pseudomonas putida* strain. **Journal of Biological Sciences**, Mumbai, v. 5, p. 269–
34 273, 2005.
- 35
- 36 ODEE, D. W. *et al.* Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from
37 tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya.
38 **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 801-811, 2002.
- 39
- 40 PILON-SMITS, E. A. H. *et al.* Physiological functions of beneficial elements. **Current**
41 **Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, p. 267-274, 2009.
- 42
- 43 QUINN, C. F. *et al.* Selenium accumulation in flowers and its effects on pollination.
44 **New Phytologist**, Chichester, v. 192, p. 727–737, 2011.
- 45
- 46 RABANAL, R. M. *et al.* Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the
47 Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 81, p. 287-292,
48 2002.
- 49

- 1 REIS, A. R. *et al.* Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected
2 areas, selenium-related health issues, and case studies. In: DE KOK, L. J.;
3 HAKESFORD M. J. (ed.). **Plant Ecophysiology**. Netherlands: Springer, 2017. V. 11,
4 p. 209-230.
- 5
6 REIS, H. P. G. *et al.* Agronomic biofortification of upland rice with selenium and
7 nitrogen and its relation to grain quality. **Journal of Cereal Science**, London, v. 79,
8 p. 508-515, 2018.
- 9
10 SCHIAVON. M.; PILON-SMITS, E. A. H. The fascinating facets of plant selenium
11 accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology. **New Phytologist**,
12 Chichester, v. 213, p. 1582-1596, 2017.
- 13
14 SILVA JUNIOR, E. C. *et al.* Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from
15 the Amazon region. **Chemosphere**, Oxford, v. 188, p. 650-658, 2017.
- 16
17 SILVA, V. M. *et al.* Agronomic biofortification of cowpea with selenium: effects of
18 selenate and selenite applications on selenium and phytate concentrations in seeds.
19 **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 13, p. 5969-5983,
20 2019.
- 21
22 SONG, D. *et al.* Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Enterobacter*
23 *cloacae* Z0206 as a consequence of fumarate reductase mediated selenite
24 reduction. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 3239, 2017.
- 25
26 SILVA, V. M. *et al.* Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS
27 scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp)
28 plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Philadelphia, v. 201, p. 110777,
29 2020.
- 30
31 SURA-DE JONG, M. *et al.* Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic
32 bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth
33 promoting properties. **Frontiers in Plant Sciences**, Lausanne, v. 6, p. 113, 2015.
- 34
35 TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Brasília:
36 Embrapa, 2017. 575 p.
- 37
38 VERA-VÉLEZ, R.; COTA-SÁNCHEZ, H. J.; GRIJALVA-OLMEDO, J. Beta diversity
39 and fallow length regulate soil fertility in cocoa agroforestry in the Northern
40 Ecuadorian Amazon. **Agricultural Systems**, Amsterdam, v. 187, p. 103020, 2021.
- 41
42 WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 117, p.
43 217–235, 2016.
- 44
45 XI, A. H.; BOTHUN, G. D. Centrifugation-based assay for examining nanoparticle-
46 lipid membrane binding and disruption. **Analyst**, Washington, v. 139, p. 973-981,
47 2014.

- 1 YAGHOOBIZADEH, F *et al.* Isolation, screening and identification of the best
2 selenium-reducing bacteria and study on the sorption mechanism. **Environmental**
3 **and Experimental Biology**, Latvia, v. 15, p. 161-171, 2017.
4
- 5 ZOLGHARNEIN, H. *et al.* Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria
6 isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas. **Iranian Journal of**
7 **Biotechnology**, Tehran, v. 5, p. 232–239, 2007.
8
- 9 ZHU *et al.* Biosynthesis of selenium nanoparticles and effects of selenite, selenate,
10 and selenomethionine on cell growth and morphology in *Rahnella aquatilis* HX2.
11 **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 102, p. 6191-6205, 2018
12
13