

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/08/2023.

**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**

Ilha Solteira
2021

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

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:



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 Emanoele 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 University 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	Gramma
GR	Glutathiona 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