

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

GERALDO CANDIDO CABRAL GOUVEIA

**CARACTERIZAÇÃO DE SINTOMAS FITOTÓXICOS DE SELÊNIO E
BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM Se E Zn EM ARROZ DE TERRAS
ALTAS**

Ilha Solteira
2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GERALDO CANDIDO CABRAL GOUVEIA
Engenheiro Agrônomo

**CARACTERIZAÇÃO DE SINTOMAS FITOTÓXICOS DE SELÊNIO E
BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM Se E Zn EM ARROZ DE TERRAS
ALTAS**

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

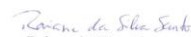
FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

G719c Gouveia, Geraldo Candido Cabral.
Caracterização de sintomas fitotóxicos de selênio e biofortificação
agronômica com Se e Zn em arroz de terras altas / Geraldo Candido Cabral
Gouveia. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
110 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. Biofortificação agronômica dupla. 2. Fitotoxidez. 3. Selênio. 4. Zinco. 5.
Arroz de terras altas.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

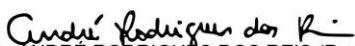
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

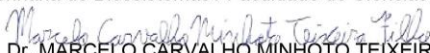
TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DE SINTOMAS FITOTÓXICOS DE SELÊNIO E
BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM Se E Zn EM ARROZ DE TERRAS ALTAS

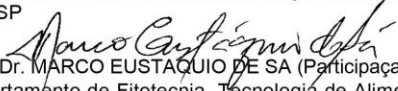
AUTOR: GERALDO CANDIDO CABRAL GOUVEIA

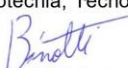
ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

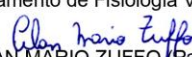
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA, área:
Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS (Participação Virtual)
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


Prof. Dr. FLAVIO FERREIRA DA SILVA BINOTTI (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia Vegetal / Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS


Dr. ALAN MARIO ZUFFO (Participação Virtual)
Editorial / Editora Pantanal

Ilha Solteira, 18 de dezembro de 2020

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Andréia, por sempre estar ao meu lado, me apoiando
e se dedicando a nossa família.

Ao meu amado filho Emanuel, por ser fonte de inspiração e me proporcionar alegrias
e momentos únicos que me fizeram sempre seguir em frente.

Aos meus pais Ademir Gouveia (in memorian) e Ádria Márcia Cabral Gouveia por
terem me mostrado o caminho correto da vida, me educando e sempre me
apoiando.

À minha querida irmã, pelo apoio e incentivo durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por me guiar e me proporcionar conquistas únicas.

Ao meu filho Emanuel, por tornar tudo mais fácil, sendo a minha fonte inspiradora.

À minha esposa Andréia, por ter me dado todo o suporte durante essa caminhada, sem ela, nada seria possível.

Aos amigos Alexandre e Gabriel, pelos momentos de companheirismo e descontração.

Ao grande amigo Eduardo Henrique Marcandalli Boleta que fiz durante o doutorado e com quem eu aprendi muito. Sua ajuda e ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento da tese.

Ao professor PhD André Rodrigues dos Reis, por ter me orientado e dado todo o suporte para a conclusão do doutorado. Seus ensinamentos levarei por toda vida assim como a sua amizade.

Ao professor Dr. Marco Eustáquio de Sá, pela coorientação, pelos momentos de conversa e por todos os conselhos de vida dados durante essa trajetória.

Aos professores Dr. Orivaldo Arf, Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho, Dr. Edson Lazarini e Dr. Enes Furlani Junior pelo suporte para a execução dos experimentos.

A todos os colaboradores do DFTASE, em especial a secretária Mirian e o técnico de laboratório Fábio, pessoas que tenho grande admiração e que construí amizade durante esses anos.

Aos amigos e companheiros de doutorado, Anne, Vinícius, Eduardo, Grace, Walmor, Jailson, Amanda, Matheus, Márcio, Tauan, Renan.

Aos grandes amigos que fiz em Ilha Solteira, Izaías, Paulo Henrique e toda a sua família pelo acolhimento, apoio e momentos de conversa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo de doutorado – Processo número: 88882.433609/2019.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo número: 88882.433609/2019-Código de Financiamento 001”

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”
(Albert Einstein)

RESUMO

A biofortificação agronômica é uma técnica que visa aumentar a concentração de minerais funcionais para as pessoas, em partes comestíveis das plantas, cultivadas por meio do manejo da adubação. O objetivo desse estudo em um primeiro momento (experimento 1) foi avaliar as respostas fenotípicas, fisiológicas e bioquímicas de quatro cultivares de arroz (BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga) cultivados em solução hidropônica tratados com selenato de sódio. Em um segundo momento (experimento 2) o objetivo foi entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na eficiência da biofortificação agronômica em plantas de arroz (BRS Esmeralda) por meio da aplicação foliar dupla de selênio (Se) e zinco (Zn) em condições a campo no cerrado brasileiro. Foi verificado no experimento 1 que o excesso de Se promoveu clorose nas folhas em plantas de arroz em decorrência da degradação dos pigmentos fotossintéticos e das proteínas solúveis afetando o crescimento da planta. As plantas tratadas com Se aumentaram a sacarose foliar, os açúcares totais, o nitrato, a amônia e a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e APX. O acúmulo de açúcar associado ao metabolismo antioxidante é um biomarcador eficiente para o diagnóstico da toxicidade do Se em plantas de arroz. A translocação de selênio da raiz para a parte aérea diminuiu sob condição de excesso de Se. Os resultados obtidos neste estudo facilitam o entendimento dos atributos fisiológicos, bioquímicos e fenotípicos que devem ser levados em consideração para o sucesso no cultivo sustentável de arroz em ambientes com alta concentração de Se. No experimento 2, foi verificado que a aplicação associada de Se e Zn promoveu aumento nas concentrações de Se nas folhas e grãos de arroz, além de aumentar a concentração de pigmentos fotossintetizantes. Isso por sua vez resultou em uma maior síntese de carboidratos pela planta, além de aumentar a produtividade de grãos de arroz. A aplicação de Zn, promoveu maior concentração de Zn, Fe, Ca e B nas folhas e grãos de arroz. A concentração de Se e de Zn nos grãos de arroz biofortificado aumentou a níveis recomendados para a alimentação humana.

Palavras-chave: Fitotoxidez. EROs. Açúcar total. Biofortificação dupla. *Oryza sativa* L.

ABSTRACT

Biofortification agronomy is a technique that aims to increase the concentration of functional minerals for people, in edible parts of plants, cultivated through fertilization management. The objective of this study at first (experiment 1) was to evaluate the phenotypic, physiological and biochemical responses of four rice genotypes (BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança and Bico Ganga) used in hydroponic solution treated with sodium selenate. In a second step (experiment 2) the objective was to understand the physiological mechanisms involved in the efficiency of agronomic biofortification in rice plants (BRS Esmeralda) through the double foliar application of selenium (Se) and zinc (Zn) in field conditions in the field. Brazilian Cerrado. It was verified in the experiment¹ that the excess of Se promoted chlorosis in the leaves of rice plants due to the degradation of photosynthetic pigments and soluble proteins affecting plant growth. Plants treated with Se increased leaf sucrose, total sugars, nitrate, ammonia and the activity of antioxidant enzymes such as SOD, CAT and APX. The accumulation of sugar associated with antioxidant metabolism is an efficient biomarker for the diagnosis of Se toxicity in rice plants. The translocation of selenium from the root to the aerial part decreased under condition of excess of Se. The results obtained in this study facilitate the understanding of the physiological, biochemical and phenotypic attributes that must be taken into account for success in the sustainable cultivation of rice in environments with a high concentration of Se. In experiment 2, it was found that the associated application of Se and Zn promoted an increase in the concentrations of Se in the leaves and grains of rice, in addition to increasing the concentration of photosynthetic pigments. This in turn resulted in a greater synthesis of carbohydrates by the plant, in addition to increasing the productivity of rice grains. The application of Zn promoted a higher concentration of Zn, Fe, Ca and B in the leaves and grains of rice. The concentration of Se and Zn in biofortified rice grains increased to levels recommended for human consumption.

Keywords: Phytotoxicity. ROS. Total sugar. Double biofortification. *Oryza sativa* L.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1	- Efeitos do selenato de sódio na massa seca da parte aérea (A) e massa seca da raiz (B) em cultivares de arroz.....	48
Figura 2	- Sintomas visuais de toxicidade de Se em folhas de arroz.....	49
Figura 3	- Efeitos do selenato de sódio nos pigmentos fotossintéticos, clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) em cultivares de arroz.....	50
Figura 4	- Efeito do selenato de sódio no metabolismo antioxidante, concentração de malondialdeído (A), concentração de peróxido de hidrogênio (B), atividade da superóxido dismutase (C), atividade da catalase (D), atividade da ascorbato peroxidase (E) e concentração da proteína total (F) em cultivares de arroz.....	51
Figura 5	- Efeitos do selenato de sódio na concentração de Se na parte aérea (A), concentração de Se na raiz (B), acúmulo de Se na parte aérea (C), acúmulo de Se na raiz (D) e translocação de Se da raiz para a parte aérea (E) em cultivares de arroz	52
Figura 6	- Efeitos do selenato de sódio sobre a concentração de sacarose (A), concentração de açúcares totais (B), concentração de nitrato (C), concentração de amônia (D) e concentração de aminoácidos (E) em folhas de cultivares de arroz	53
Figura 7	- Heatmap das correlações de Pearson entre os parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados na parte aérea e na raiz de cultivares de arroz expostos a condições de estresse de Se	54

Capítulo 3

Figura 1	- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz nos teores de (A) clorofila a, (B) clorofila b, (C) clorofila total e (D) carotenoides	80
Figura 2	- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz nos teores de (A) açúcar total em folhas, (B) açúcar total em grãos, (C) sacarose em folhas, (D) sacarose em grãos, (E) aminoácidos em folhas e (F) aminoácidos em grãos	81
Figura 3	- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) malondialdeído, (B) peróxido de hidrogênio, (C) atividade da superóxido dismutase, (D) atividade da catalase, (E) atividade da glutathione redutase e (F) proteína total	82
Figura 4	- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) selênio em folhas, (B) selênio em grãos, (C) zinco em folhas, (D) zinco em grãos, (E) ferro em folhas e (F) ferro em grãos	84
Figura 5	- Consumo diário recomendado de Se ($\mu\text{g dia}^{-1}$) (A) e de Zn (mg dia^{-1}) (B) de grãos de arroz cultivado em terras altas cultivar BRS Esmeralda	85
Figura 6	- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na produtividade	86
Figura 7	- Heatmap das correlações de Pearson entre parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados nas folhas e grãos em plantas de arroz expostas às concentrações de aplicação de Se e Zn	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcento
~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
°C	Grau Celsius
µg	Micro grama
µL	Micro litro
µmol	Micromol
APSR	Enzima APS redutase
APX	Ascorbato peroxidase
ATPS	Enzima ATP sulfuriase
B	Boro
BSA	Albumina de soro bovino
Ca	Cálcio
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Nitrato de cálcio tetrahidratado
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
Cis	Cisteína
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre
dia ⁻¹	Dia
dm ⁻³	Decímetro cúbico
DTT	Ditioltreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O _d	Água deionizada
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
ha ⁻¹	Hectare
K	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
kg ⁻¹	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KNO ₃	Nitrato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
L ⁻¹	Litro
MCW	Metanol, clorofórmio e água
MDA	Malondialdeído
Met	Metionina
MF	Matéria fresca
Mg	Magnésio
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado

mM	Milimol
mM _c	milimol de carga
Mn	Manganês
MnSO ₄	Sulfato de manganês
MO	Matéria orgânica
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaSO ₄ .10H ₂ O	Sulfato de sódico decahidratado
NBT	Nitroblue de tetrazólio
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fosfato monoamônico
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
OAS	O-acetilserina
P	Fósforo
PFA	Perfluoroalcoxi
pH	Potencial hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrodilona
S	Enxofre
Se	Selênio
Se-Cis	Selenocisteína
Se-Met	Selenometionina
SeO ₃ ²⁻	Selenito
SeO ₄ ²⁻	Selenato
SO ₄ ²⁻	Sulfato
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidade
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos
Zn	Zinco
ZnSO ₄	Sulfato de zinco
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.1	INTRODUÇÃO	14
1.2	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.2.1	Selênio no solo	16
1.2.2	Selênio na planta – absorção, transporte e assimilação	17
1.2.3	Selênio na fotossíntese	19
1.2.4	Papel do Selênio nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e metabolismo antioxidante	19
1.2.5	Toxidez de selênio em plantas	21
1.2.6	Papel do Se na biofortificação agronômica	23
1.2.7	O Zn nas plantas	25
1.2.8	Biofortificação agronômica com Zn	26
1.2.9	Perspectivas futuras	28
	REFERÊNCIAS	29
2	RESPOSTAS FENOTÍPICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS POR ESTRESSE POR TOXICIDADE DE SELÊNIO EM PLANTAS DE ARROZ: CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS E AJUSTE METABÓLICO DA PLANTA	38
2.1	RESUMO	38
2.2	INTRODUÇÃO	39
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.3.1	Condições de crescimento e arranjo experimental	41
2.3.2	Avaliações da biomassa seca e análise química	42
2.3.3	Análise de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	42
2.3.4	Peróxido de hidrogênio	43
2.3.5	Peroxidação lipídica	43
2.3.6	Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)	43
2.3.7	Atividade da catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)	44
2.3.8	Atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.11)	44
2.3.9	Proteínas solúveis	44
2.3.10	Pigmentos fotossintéticos	45
2.3.11	Sacarose e açúcar total	45

2.3.12	Nitrato	46
2.3.13	Amônia	46
2.3.14	Aminoácidos	46
2.3.15	Análise estatística	47
2.4	RESULTADOS	47
2.5	DISCUSSÃO	55
2.6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	DOCUMENTOS SUPLEMENTARES	63
 3	 BIOFORTIFICAÇÃO DO ARROZ COM SELÊNIO E ZINCO: UMA ABORDAGEM FISIOLÓGICA PARA ENTENDER O ACÚMULO DE MINERAIS EM GRÃOS	 67
3.1	RESUMO.....	67
3.2	INTRODUÇÃO	69
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.3.1	Material vegetal	71
3.3.2	Determinação da produtividade dos grãos	72
3.3.3	Análise nutricional das folhas e grãos	73
3.3.4	Peróxido de hidrogênio	73
3.3.5	Malondialdeído	74
3.3.6	Análise de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	74
3.3.7	Atividade da catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)	75
3.3.8	Atividade da glutathione redutase (GR, EC: 1.6.4.2)	75
3.3.9	Proteínas solúveis	76
3.3.10	Análise da concentração de pigmentos fotossintéticos	76
3.3.11	Açúcar total, sacarose e aminoácidos (folhas e grãos)	76
3.3.12	Cálculo da recomendação diária de arroz biofortificado com Se e Zn	 78
3.3.13	Análise estatística	78
3.4	RESULTADOS	78
3.5	DISCUSSÃO	88
3.6	CONCLUSÕES	91

REFERÊNCIAS	92
DOCUMENTOS SUPLEMENTARES	98
APÊNDICE	102

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A principal fonte de nutriente para as pessoas, provem dos alimentos, sendo que estes apresentam demanda crescente com o aumento da população mundial. Atualmente a taxa mundial de crescimento populacional é de 1,29%, com uma população em torno de 7,6 bilhões de habitantes (WORLDMETERS, 2020). Para o ano de 2100, estima-se que a população mundial chegue a 12,3 bilhões de pessoas (GERLAND *et al.*, 2014). A população brasileira é de 208,1 milhões e, em 2050, estima-se que haverá 260 milhões de brasileiros (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA- IBGE, 2019).

Além disso, a produção de cereais tem apresentado a mesma proporção da taxa de crescimento populacional, sendo que de acordo com as previsões de Ray *et al.* (2013), até o ano de 2050, a produção de alimentos deverá aumentar de 60 a 110% para suprir a progressiva demanda global por alimentos, sendo que, de acordo com a Food and Agriculture Organization- FAO (2019), no período entre 2016/2017, o consumo estimado de arroz foi de 87,11 kg por pessoa.

Em países no apresentam alta incidência na deficiência de micronutrientes como selênio (Se) e zinco (Zn), a maior parte da dieta alimentar é a base de cereais (CAKMAK *et al.*, 2010; BOUIS *et al.*, 2011). Em relação ao Se, 1,1 bilhão de pessoas no mundo são acometidas pela ingestão inadequada do mesmo (JONES *et al.*, 2017). Após a adoção de programas visando o aumento da ingestão de Se, ocorreu grande redução dos índices de mortalidade, principalmente em relação a doenças do coração, câncer e incidência de deficiência de vitamina E (JONES *et al.*, 2017). Uma nutrição adequada em Se também ajuda a reduzir o hipertireoidismo (bócio), uma vez que Se faz parte de uma enzima chave no metabolismo da tireoide (RAYMAN, 2002).

A deficiência por Zn, foi classificada como o 5° principal fator de risco para doenças no mundo em desenvolvimento, onde um terço da população mundial é acometida devido a deficiência de Zn (HOTZ; BROWN, 2004). Sua carência contribui para o crescimento retardado, anormalidades esqueléticas, cicatrização tardia de feridas, além do aumento do risco de aborto e diarreia (MARET; SANDSTEAD, 2006). A biofortificação agrônômica de alimentos básicos, com minerais essenciais e

vitaminas, pode ser considerada a solução mais econômica para a deficiência de micronutrientes em humanos (CAKMAK, 2008).

Na literatura, são escassas as informações a respeito da biofortificação agronômica conjunta com Se e Zn e suas implicações na cultura do arroz. Dessa forma, conhecer melhor a influência do acúmulo do Se e Zn na cultura do arroz, bem como a resposta bioquímica e fisiológica do vegetal quando tratados com esses minerais em cultivo no campo, é de suma importância para se adotar estratégias de biofortificação agronômica com maior eficácia.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Selênio no solo

O solo é a principal fonte de nutrientes para as plantas, com a capacidade de fornecer de forma adequada, além de nutrientes, água, temperatura e condições necessárias para o crescimento e desenvolvimento vegetal (BITTERLI *et al.*, 2010). Na maioria das vezes, o consumo adequado de Se pelas pessoas, está diretamente ligado a concentração ideal de Se no solo e sua absorção pelas plantas (SORS *et al.*, 2005). A quantidade de Se nas plantas, está diretamente relacionada com a biodisponibilidade desse elemento no solo e pela eficiência do sistema de transferência solo-planta, ambos altamente variáveis em todo mundo (WINKEL *et al.*, 2015). Além disso, a presença de Se no solo está relacionada com o tipo de solo, matéria orgânica e precipitação (STOFFANELLER; MORSE, 2015).

O Se é encontrado naturalmente em rochas sedimentares formadas durante o período carbonífero ao quartenário (WHITE *et al.*, 2004). Cerca de 80% das reservas globais de Se, são encontradas no Peru, China, EUA, Chile, Canadá, Nova Guiné e Austrália (LIU *et al.*, 2011; PILARCZYK *et al.*, 2019). Entretanto, cerca de quarenta países apresentam regiões com concentrações limitadas de Se no solo, com ingestão diária por pessoas a cerca de $10 \mu\text{g dia}^{-1}$ (WU *et al.*, 2015), muito abaixo do recomendado segundo a Departamento de Agricultura dos Estados Unidos- USDA (2019) que é de $55 \mu\text{g dia}^{-1}$.

No Brasil, existem áreas que apresentam baixa concentração de Se no solo, como o cerrado (1 a $8 \mu\text{g kg}^{-1}$) e áreas com altas concentrações de Se, como a região amazônica no estado do Pará (200 a $450 \mu\text{g kg}^{-1}$) (LEMIERE *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009). A disponibilidade de Se no solo é maior em solos que apresentam a faixa de pH entre 5,0 a 6,0 (XU *et al.*, 2018).

Geralmente os solos contêm Se inorgânico, como o selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}) e suas formas orgânicas, sendo que as formas orgânicas originam-se de plantas que acumulam Se (ROSENFELD; BEATH, 1964).

1.2.2 Selênio na planta – absorção, transporte e assimilação

As plantas utilizam menos de 5% do Se aplicado no solo, porém, a capacidade de acumulação de Se no tecido vegetal, varia entre as espécies de plantas (WHITE, 2016). Em geral, as plantas apresentam uma grande afinidade para selenato e selenito, entretanto, algumas formas orgânicas de Se, como a seleno-cisteína (Se-Cis) e seleno-metionina (Se-Met), tendem a ter maior fitodisponibilidade e são utilizadas como componentes ativos (GONZÁLEZ-MORALES *et al.*, 2017).

O Se apresenta semelhança química com o enxofre (S), compartilhando a mesma via para a absorção e translocação nas plantas, como é o caso do selenato que é análogo ao sulfato (SO_4^{2-}), competindo entre si por sítios de absorção (GOLOB *et al.*, 2016). O selenato, utiliza transportadores sulfato da membrana plasmática da célula da raiz, deste modo, a suplementação de S reduz sua absorção (GUPTA; GUPTA, 2017).

O estado nutricional interno e externo da planta é que irá determinar a preferência dos transportadores por selenato ou sulfato (WHITE *et al.*, 2004). Na presença de altas concentrações externas de sulfato, ocorre a diminuição da seletividade dos transportadores para Se e aumento da seletividade para S (WHITE *et al.*, 2004), corroborando com o verificado por Li *et al.* (2008), em *Triticum aestivum*, em que a baixa concentração de S acarretou no aumento da absorção de Se.

Após ser absorvido pelas células da raiz, o selenato se move de forma rápida por meio do simplasto da raiz, sendo translocado para o caule, enquanto o selenito é convertido em compostos de organoselênio, permanecendo muitas vezes no interior da raiz (WANG *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2017). Desta forma, o selenato é a espécie dominante de Se presente no xilema (LI *et al.*, 2008).

Transportadores de sulfato de baixa afinidade, homólogos de *arabidopsis* (AtSULTR2;1, AtSULTR2;2 e AtSULTR3;5) apresentam relação com o transporte de Se na forma de selenato pelo xilema das plantas, sendo que a expressão de AtSULTR2;1, AtSULTR2;2 e os seus homólogos em outras plantas é induzida pela deficiência de S e pelo aumento da disponibilidade de Se (GIGOLASHVILI; KOPRIVA, 2014).

Após o selenato ser transportado para caule da planta por meio do xilema, ele entra nas células das folhas através dos transportadores SULTR (GIGOLASHVILI; KOPRIVA, 2014). Em grande parte das plantas o selenato é capturado nos vacúolos das células presentes na vasculatura e mesófilo foliar (WANG *et al.*, 2015). Da parte aérea, o Se armazenado é retranslocado no floema em SeO_4^{2-} e orgão selênio (Se-Met e Se-Cis) sendo posteriormente enviado para grãos e outros tecidos vegetais por meio de homólogos de SULTR1;3 (CAREY *et al.*, 2012; WHITE, 2018)

A assimilação do Se ocorre por meio da conversão do Se inorgânico em selenito, sendo que esta etapa requer a ação sequencial de duas enzimas chamadas de ATP sulfúrilase (ATPS) e APS redutase (APSR). A ATPS catalisa a hidrólise da ATP para a formação de adenosina fosfoselenato, que por sua vez é reduzida a selenito por meio da APSR (SORS *et al.*, 2005). O selenito é convertido em seleneto pela enzima sulfito redutase, entretanto nas plantas, esta etapa também pode ser realizada pela glutatona (WALLENBERG *et al.*, 2010). Posteriormente o seleneto é convertido em Se-Cis devido ao acoplamento com O-acetilserina (OAS) na presença da enzima cisteína sintetase. A cisteína-sintase apresenta maior afinidade pelo seleneto em relação ao sulfeto, dessa forma, dependendo das espécies de plantas e das condições ambientais a Se-Cis pode então ser convertida em Se elementar na presença da enzima Se-Cis liase ou ser metilada em metil-Se-Cis por meio da selenocisteína metiltransferase ou pode ser convertida em Se-Met por diversas enzimas (PILON-SMITS; QUINN, 2010).

A aplicação foliar de Se é considerada uma forma mais eficiente na biofortificação de Se em comparação com a aplicação via solo, pelo fato de evitar a translocação de Se da raiz para a parte aérea (WINKEL *et al.*, 2015). Acredita-se que o SeO_4^{2-} aplicado via foliar siga o mesmo caminho que o do selenato carregado com o xilema. A fertilização de Se via solo pode apresentar baixas taxas de enriquecimento de Se na parte comestível do vegetal, além disso, o uso da fertilização via solo a longo prazo pode acarretar na toxidez do ecossistema (WINKEL *et al.*, 2015).

1.2.3 Selênio na fotossíntese

Quando as plantas são submetidas a estresse ambiental, seus cloroplastos são danificados, levando à interrupção da fotossíntese. No entanto, a adição de concentrações adequadas de Se pode reduzir um pouco os danos aos cloroplastos e aumentar o conteúdo de clorofila (FILEK *et al.*, 2009; HAWRYLAK-NOWAK, 2009; CHU *et al.*, 2010; WANG, 2011; YAO *et al.*, 2011; MALIK *et al.*, 2012).

Por meio da análise de proteínas, Wang *et al.* (2012) verificaram que em mudas de arroz (*Oryza sativa* L.), baixas doses de Se aumentaram a fotossíntese. Além disso, no sorgo, a aplicação de Se aumentou significativamente a taxa fotossintética, a condutância estomática e a taxa de transpiração (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2010). A restauração da fotossíntese em plantas estressadas após a aplicação de Se pode estar intimamente relacionada com a diminuição das concentrações de ROS, reativação de antioxidantes, restauração da estrutura dos cloroplastos danificados e aumento da produção de outros metabólitos vitais como a GSH.

No entanto, o excesso de Se pode agravar os danos ao sistema de fotossíntese das plantas. Concentrações mais elevadas de Se podem danificar o aparelho fotossintético, inibir a fotossíntese e resultar na superprodução de amido (VÍTOVÁ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Foi verificado que o excesso de Se reduziu a energia luminosa absorvida pelo complexo antena, reduziu o fluxo de energia de excitação, o transporte de elétrons através de fotossistema II (PSII), reduziu a eficiência do transporte de energia do complexo ante para centros de reação e o rendimento quântico do transporte de elétrons no PSII em três cultivares de trigo (LABANOWSKA *et al.*, 2012).

1.2.4 Papel do Selênio nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e metabolismo antioxidante

O estresse como frio, seca, luz alta, excesso de água, salinidade e fitotoxidez, pode desencadear o acúmulo de EROs nas plantas. O aumento na concentração de EROs pode representar uma ameaça para as plantas, mas acredita-se que as EROs também atuem como sinais para a ativação das vias de resposta ao estresse e de defesa (MITTLER, 2002). EROs incluem principalmente ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical livre hidroxílico ($OH^{\bullet}$), oxigênio singleto (1O_2),

radical metil ($\text{CH}_3\bullet$) e radicais livres de peroxidação lipídica. Após sua geração, $\text{O}_2\bullet^-$ induz uma série de processos de transferência de elétrons nas plantas, como a dismutação espontânea por enzima (superóxido dismutase (SOD)) em H_2O_2 e uma reação com Fe^{3+} (ou Cu^{2+}) para gerar Fe^{2+} (ou Cu^+), que irá então reagir com H_2O_2 para gerar o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$) (que é altamente ativo e afeta a membrana celular) (REIS *et al.*, 2018).

Geralmente, dois tipos de antioxidantes são acionados nas plantas para equilibrar as concentrações elevadas de EROs. Um tipo são as substâncias de baixo peso molecular, como glutatona (GSH), ascorbato (AsA) e tocoferol, e o outro tipo são as enzimas, como SOD, peroxidase, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GSH-Px), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutatona redutase (GR) (MEHARG; HARTLEY-WHITAKER, 2002; CAO *et al.*, 2004; HARTIKAINEN *et al.*, 2005; ASADA, 2006). Esses antioxidantes podem reagir com EROs direta ou indiretamente por meio de catálise enzimática.

Por meio da regulação de antioxidantes, Se pode controlar a produção e a extinção de EROs. A regulação das concentrações de EROs pelo Se pode ser um mecanismo chave para neutralizar o estresse ambiental nas plantas. Em condições normais, a produção de EROs em células vegetais é mantida em concentrações baixas, menos de $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2\bullet^-$ e $0,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em cloroplastos. No entanto, sob condições de estresse, as concentrações correspondentes aumentam para $240\text{--}720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2\bullet^-$ e $5\text{--}15 \mu\text{M}$ H_2O_2 (MITTLER, 2002).

Baixas concentrações de Se aos substratos de crescimento pode reduzir o excesso de geração de EROs, principalmente de $\text{O}_2\bullet^-$ e / ou H_2O_2 , em plantas submetidas a diversos estresses ambientais. Cartes *et al.* (2010) observaram que o selenito aliviou o estresse oxidativo induzido por alumínio (Al) em raízes de azevém, principalmente por aumentar a dismutação espontânea de $\text{O}_2\bullet^-$ em H_2O_2 . Mroczek-Zdyrska e Wójcik (2011) descobriram que uma dosagem baixa de Se ($1,5 \mu\text{M}$ Na_2SeO_3) diminuiu as concentrações de $\text{O}_2\bullet^-$ nas raízes de *Vicia faba* exposta ao chumbo (Pb). Em alga vermelha marinha com estresse de cádmio (Cd), $50 \mu\text{M}$ Se (Na_2SeO_3) foi utilizado para melhorar de forma eficiente a toxicidade de Cd, diminuindo o acúmulo de EROs ($\text{O}_2\bullet^-$ e H_2O_2) (KUMAR *et al.*, 2012). Em um experimento com mudas de colza (*Brassica napus*) expostas a 400 ou $600 \mu\text{M}$ de Cd,

a adição de 2 μM de Se (Na_2SeO_4) diminuiu o acúmulo de H_2O_2 na parte aérea e raízes da planta (FILEK *et al.*, 2008) Reduções nas concentrações de EROs com a adição de Se em plantas submetidas a outros estresses também têm sido observadas, como em sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) exposto a altas temperaturas ($\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2010), mudas de trigo (*Triticum aestivum* L., cv. Han NO.7086) sob estresse de radiação UV-B ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (YAO *et al.*, 2010a; YAO *et al.*, 2010b; YAO *et al.*, 2011) e estresse pelo frio ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (CHU *et al.*, 2010), mudas de colza sob estresse de sal e seca (H_2O_2) (HASANUZZAMAN *et al.*, 2011; HASANUZZAMAN; FUJITA, 2011), *Trifolium repens* L. sob estresse hídrico (WANG, 2011) e feijão-mungo (*Phaseolus aureus* Roxb.) sob estresse de arsênio (As) (H_2O_2) (MALIK *et al.*, 2012).

A aplicação de Se, quando utilizada em doses adequadas pode desencadear mecanismos que irão diminuir as concentrações de $\text{O}_2^{\cdot-}$, por meio da dismutação espontânea de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (sem catálise pela enzima SOD) (HARTIKAINEN *et al.*, 2000; CARTES *et al.*, 2010), da extinção direta de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\text{OH}^{\cdot}$ por compostos de Se, e a regulação de enzimas antioxidantes (XUE *et al.*, 1993).

1.2.5 Toxidez de selênio em plantas

A toxicidade das plantas por Se, é evidente quando ocorre a redução na produção da massa seca, além da correlação com a razão entre as concentrações de Se e S na parte aérea, sendo que o principal mecanismo de toxicidade de Se é a competição com S. Essa competição se manifesta principalmente com a incorporação incorreta de Se-Cis e Se-Met. no lugar da cisteína e metionina na síntese de proteínas (WHITE *et al.*, 2004).

A Se-Cis é considerada a principal fonte de má incorporação em proteínas (VAN HOEWYK, 2013). Os resíduos Cis são frequentemente encontrados em locais-chave nas estruturas de proteínas terciárias. Por exemplo, a substituição de Se-Cis por Cis em um local ativo pode aumentar ou inibir a atividade nesse local. Os resíduos Cis também são frequentemente encontrados em locais de ligação de metal. A incorporação de Se-Cis em tais locais pode alterar a resistência da ligação metálica. Outro aspecto importante da estrutura da proteína é a ponte dissulfeto, que é a ligação covalente entre os átomos S de dois resíduos Cis adjacentes um ao outro na estrutura

terciária. A substituição de Se-Cis nesses locais pode alterar as propriedades da ponte e afetar a estrutura e função geral da proteína (VAN HOEWYK, 2013). Além disso, dentro das proteínas do tipo fixadoras de nitrogênio (NIF), a substituição de Se-Cis pode levar à produção de Fe – Se em vez de aglomerados de Fe – S, que podem danificar processos fotossintéticos de forma crítica, como verificado por Freeman *et al.* (2010) ao cultivar plantas de *Stanleya albenscens* em solução de selenato na concentração 20 µM onde ocorreram reduções na taxa fotossintética.

Se-Met é significativamente menos prejudicial quando incorporado em proteínas do que o Se-Cis. O mecanismo geral de toxicidade da incorporação incorreta de Se-Met deriva do fato de que a taxa de formação de ligações peptídicas entre Se-Met e os aminoácidos subsequentes é reduzida em relação ao Met. Como Met é o aminoácido codificado pelo códon de iniciação, isso pode levar a uma taxa geral reduzida de início da tradução, desde que a concentração de Se-Met disponível seja suficientemente alta para competir com Met (EUSTICE *et al.*, 1981; VAN HOEWYK, 2013)

Evidências experimentais indicam que a exposição ao selenato está fortemente correlacionada ao aumento do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam muitos tipos de danos fisiológicos. A exposição a 20 µM de selenato através do meio de crescimento foi suficiente para induzir o acúmulo excessivo de superóxido de EROs e H₂O₂ em plantas de *S. albenscens* (FREEMAN *et al.*, 2010). Um estudo do efeito do selenato em *A. thaliana* mostrou que a redução da APS redutase (APR), envolvida na redução do selenato a selenito, causa um maior acúmulo de EROs em plantas expostas ao selenato (GRANT *et al.*, 2011).

O selenito pode ser mais tóxico para as plantas do que o selenato sendo que vários estudos demonstram que os efeitos adversos do Se começam a aparecer em concentrações mais baixas de selenito do que de selenato (HAWRYLAK-NOWAK, 2013). Na alface (*Lactuca sativa*) e no pepino (*Cucumis sativus*), foi verificada a diminuição da biomassa quando fornecido concentrações mais baixas de selenito do que o selenato, e a peroxidação lipídica (dano do radical livre aos lipídeos) aumentou significativamente em concentrações mais baixas de selenito. As concentrações de Se também foram maiores nas raízes das plantas de alface supridas com selenito e maiores na parte aérea, quando supridas com selenato (HAWRYLAK-NOWAK, 2013).

Resultados semelhantes também foram encontrados em um estudo posterior de plantas de pepino (HAWRYLAK-NOWAK *et al.*, 2015). A teoria prevalecente sobre a toxicidade do selenito é que, enquanto o selenato é transportado para a parte aérea e permanece principalmente como selenato, o selenito é amplamente assimilado na raiz em compostos orgânicos de Se como selenocisteína (Se-Cis) e Selenometionina (Se-Met), interferindo na produção normal de proteína (WHITE, 2018).

1.2.6 Papel do Se na biofortificação agronômica

Solos deficientes em nutrientes podem fornecer Se de forma insuficiente para o acúmulo em plantas e, conseqüentemente, em alimentos derivados de plantas para animais e humanos. A deficiência de Se está ligada a uma série de doenças e distúrbios no corpo humano (RAYMAN, 2002). A biofortificação de plantas destinadas a alimentação enriquecidas com Se é relatada como uma solução sustentável para a deficiência de Se na dieta humana (CAKMAK, 2008). Na literatura, existem alguns trabalhos relatando o sucesso no emprego da biofortificação agronômica com iodo (I) e Se. No caso do Zn, as abordagens agronômicas e de biofortificação genética, isoladamente ou em combinação, são demonstradas com sucesso (CAKMAK, 2008, 2010; IMRAN *et al.*, 2015, 2016; AKHTAR *et al.*, 2019).

A adequação do Se à biofortificação agronômica depende de sua absorção pelas raízes ou folhas e translocação através da via de transporte de S devido à similaridade química do S-Se (WHITE *et al.*, 2007). Assim, tanto a aplicação via solo quanto a foliar podem garantir concentração suficiente nas partes comestíveis. No entanto, o estado de oxidação das espécies de Se (selenato > selenito) é importante para sua biofortificação efetiva. As razões podem ser a rápida adsorção de espécies de selenito em superfícies de argila, resultando em baixa biodisponibilidade, baixa matéria orgânica, alto pH, baixa precipitação e alta temperatura, o que pode aumentar as razões de selenato para selenito em solos áridos (CHRISTOPHERSEN *et al.*, 2012).

A biofortificação agronômica refere-se à aplicação de fertilizantes através do solo, como pulverização foliar ou tratamento de sementes para melhorar o status de um micronutriente específico, vitamina A e/ou carotenóides, entre outros, e em partes comestíveis de plantas (ou seja, grãos em cereais e leguminosas, raízes em vegetais

e parte aérea em vegetais folhosos e forragens) (ZULFIQAR *et al.*, 2020). No caso do Se, a aplicação no solo pode ser um método relativamente caro em comparação a aplicação foliar, pois é necessária maior quantidade de fertilizante para a aplicação no solo. Além disso, as fontes de Se são relativamente caras em relação a outros micronutrientes e sua recuperação em grãos de cereais é estimada em cerca de 12% (BROADLEY *et al.*, 2010; ROS *et al.*, 2016; LYONS, 2018). As fontes de selênio são escassas, não renováveis e podem ser reduzidas em caso de uso excessivo, portanto, há extrema necessidade de conservá-las por meio de uso eficiente (ROS *et al.*, 2016; LYONS, 2018).

A aplicação foliar de formas de selenato tem se mostrado econômica e eficiente para melhorar a concentração do Se nos grãos em cereais, uma vez que impede os fatores do solo que reduzem a disponibilidade de Se para as plantas além de requerer pouca quantidade de fertilizante, evitando assim a deposição ambiental excessiva. Foi observado em estudos anteriores que para melhorar a concentração do grão para 100 $\mu\text{g Se kg}^{-1}$, cerca de 6 vezes mais fertilizante é necessário para aplicação no solo em comparação com a pulverização foliar (ROS *et al.*, 2016).

Em regiões onde os fertilizantes a base de Se não estão disponíveis ou são inacessíveis, a pulverização foliar de extrato de folha de *Moringa oleifera* pode ser recomendada para enriquecer grãos de cereais com Se (LYONS *et al.*, 2015). Pulverizações foliares combinadas de Se e Zn, Fe e I podem ser benéficas em relação ao enriquecimento simultâneo desses micronutrientes (CAKMAK, 2008, 2010; LYONS, 2018). O Se aplicado via foliar no arroz, uma vez absorvido, é convertido em seleno-aminoácidos (Se-Cis e Se-Met) no endosperma do arroz, que é biodisponível para o canal digestivo humano (WANG *et al.*, 2013). Consequentemente, mais de 80% do Se total do grão no arroz está biodisponível na forma orgânica, ou seja, proteínas ligadas ao Se, aminoácidos; portanto, a aplicação foliar foi considerada superior no enriquecimento de Se de grãos de cereais. Lyons (2018) sugeriu que o estágio de enchimento dos grãos (entre a inicialização e o estágio leitoso inicial) é considerado o melhor momento para a aplicação foliar de Se. Além disso, a Se-Met é descrita como a principal forma de Se biodisponível em grãos de cereais (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

1.2.7 O Zn nas plantas

O Zn é transportado nas plantas na forma de Zn^{2+} ou ligado a ácidos orgânicos. Em solos com o pH elevado, pode ser também absorvido como cátion monovalente (ZnOH^+). O Zn se acumula nos tecidos da raiz e é translocado via xilema para a parte aérea. A translocação de Zn para o xilema das raízes ocorre via simplasto e apoplasto, entretanto, teores de Zn também podem ser encontrados no floema, indicando que o Zn é translocado através dos tecidos do xilema e do floema (BORRILL *et al.*, 2014). Na parte aérea da planta, o Zn é parcialmente translocado das folhas velhas para os órgãos da planta em desenvolvimento (BORRILL *et al.*, 2014).

O Zn é um micronutriente essencial utilizado pelas plantas estando envolvido em várias funções fisiológicas importantes, incluindo a estrutura da membrana, fotossíntese, atividade de fitohormônios, metabolismo de lipídios e ácidos nucleicos, expressão e regulação de genes, síntese de proteínas e defesa contra seca e doenças. Como cofator, o Zn ativa diferentes hormônios que são necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta, como as auxinas. É essencial para vários processos bioquímicos, como produção de nucleotídeos, metabolismo de auxinas, ativação de enzimas e formação de clorofila. Tem papel especial na fertilização, pois os grãos de pólen apresentam elevada concentração de Zn (BEGUM *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2005). A deficiência de Zn nas plantas está relacionada com a baixa produtividade além do crescimento reduzido das plantas. Os sintomas visuais de deficiência de Zn incluem, entrenós curtos e folhas pequenas (BRENNAN; ARMOUR, 1993; BRENNAN; BOLLAND, 2002). As folhas mais jovens geralmente são afetadas primeiro e podem mostrar sinais de clorose entre as nervuras. Elevado pH e alta concentração de P ou Mn podem induzir a deficiência de Zn (ROSEN; ELIASON, 2005).

Diversas culturas alimentares são afetadas pela baixa disponibilidade de Zn no solo, como leguminosas, cereais, frutíferas e culturas não comestíveis como algodão e linho (HORNECK *et al.*, 2011). Sob deficiência de Zn, podem ocorrer perdas de até 30% nos grãos de cereais, sem qualquer sintoma visual óbvio de estresse, a chamada deficiência oculta (ALLOWAY, 2009). O Zn permite que as vias fisiológicas críticas funcionem normalmente e essas vias têm papéis importantes na fotossíntese e formação de açúcar, síntese de proteínas, fertilidade e produção de sementes, regulação do crescimento e imunidade a doenças. A maioria das plantas contém entre

30 e 100 mg Zn kg⁻¹ de matéria seca, com teores acima de 300 mg Zn kg⁻¹ a serem considerados geralmente como tóxicos (BORRILL *et al.*, 2014).

A deficiência de Zn nas lavouras ocorre na maioria dos países com clima do tipo mediterrâneo, onde os solos calcários alcalinos representam um tipo importante de solo agrícola e são dedicados principalmente ao cultivo de cereais. Na Turquia, por exemplo, 65% dos solos contêm CaCO₃ alto (> 20%) e o pH varia de 7,5 a 8,1. Esses solos contêm Zn disponível para plantas muito baixo (0,23 mg kg⁻¹ DTPA-Zn), embora o conteúdo total de Zn dos solos seja relativamente alto (39,6–62,4 mg kg⁻¹). A baixa disponibilidade de Zn nesses solos é devido ao Zn ser fortemente absorvido em CaCO₃, entretanto, a implantação de práticas agrícolas visando a correção de solos que apresentam baixa concentração de Zn é muito utilizada (CAKMAK, 2008).

1.2.8 Biofortificação agronômica com Zn

A biofortificação é o processo que visa aumentar o conteúdo de micronutrientes, como o Zn, nas porções comestíveis das plantas, seja por meio do melhoramento genético ou fertilização (WHITE; BROADLEY, 2005; SHAHZAD *et al.*, 2014). Dessa forma, é de suma importância a criação de novas variedades com potencial genético para acumular alto teor de Zn nos grãos e o uso de fertilizantes contendo Zn, para aumentar sua eficiência de utilização e, conseqüentemente, elevar o teor de Zn nos grãos (MONTALVO *et al.*, 2016). A biofortificação genética, que visa a transferência de genes envolvidos no aumento da capacidade de absorção de certos nutrientes, é provavelmente a abordagem mais econômica, entretanto, o uso de fertilizantes contendo Zn é necessário para melhorar o teor de Zn nas dietas (SADEGHZADEH, 2013).

Tipos de solo, estágio de crescimento e cultivares também desempenham um papel fundamental no uso eficiente de fertilizantes Zn, portanto, esses fatores devem ser levados em consideração durante a aplicação de fertilizantes (MONTALVO *et al.*, 2016). Outra prática para mitigar a deficiência de Zn inclui a aplicação foliar de Zn, que pode aumentar significativamente o conteúdo de Zn nas sementes (CAKMAK, 2008). A aplicação foliar de Zn é considerada um método eficiente de biofortificação agronômica, embora existam grandes diferenças entre as espécies de plantas no que diz respeito à eficácia do Zn aplicado foliar. Do ponto de vista agronômico, aumentar o teor de Zn nas sementes é um fator de qualidade desejável. Sementes com alto teor

de Zn podem influenciar de forma positiva o crescimento da cultura e aumentar a produtividade por meio de melhor germinação, vigor das mudas e tolerância ao estresse, particularmente em solos com deficiência de Zn (RENGEL; GRAHAM, 1995; YILMAZ *et al.*, 1998). Além disso, a biofortificação de grãos com Zn pode trazer efeitos benéficos para a saúde humana, ajudando a superar a desnutrição em populações com dietas à base de cereais (CAKMAK, 2008).

Estudos revelaram que alimentos à base de plantas são fontes significativas de Zn para humanos (WELCH; GRAHAM, 2004; WESSELLS; BROWN, 2012). Estima-se que 17,3% das pessoas em todo o mundo correm o risco de ingestão inadequada de Zn (HAASE *et al.*, 2020) e a deficiência de Zn leva a mortes anuais estimadas de 433.000 crianças menores de cinco anos (WHO, 2009). A deficiência de Zn em humanos pode causar perda de apetite, anemia, retardo de crescimento, hipogonadismo com capacidade reprodutiva prejudicada, função mental deprimida, ceratose prejudicada e efeitos teratogênicos (FROSSARD *et al.*, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2011). Outras complicações graves de saúde (distúrbio do sistema imunológico, déficit de aprendizagem, risco de infecções, danos ao DNA e câncer) também são relatadas como associadas a deficiências de Zn (GIBSON, 2006). Bebês e crianças em idade pré-escolar reduziram a incidência de diarreia e infecções respiratórias com o aumento da suplementação de Zn (RIVERA *et al.*, 1998), ao passo que se descobriu que concentrações baixas de Zn no solo estão relacionadas à deficiência de Zn nas pessoas (CAKMAK, 2009). Também pode ter efeitos tóxicos diretos quando encontrado em excesso, causando problemas gastrointestinais e imunológicos. Quantidades elevadas de Zn também podem inibir a absorção de cobre e resultar em sintomas de deficiência de cobre (FREELAND-GRAVESH *et al.*, 2020).

Por meio da cadeia alimentar, o Zn é bioacumulado, resultando em maiores teores de carne (gado) em comparação com vegetais e frutas (RONEY *et al.*, 2006). No entanto, de acordo com o Relatório de Avaliação de Risco (MUNN *et al.*, 2010) sobre a bioacumulação de Zn em animais e sobre a biomagnificação, concluiu-se que a avaliação dos padrões de qualidade para a proteção dos principais predadores de envenenamento secundário e proteção da saúde humana contra o consumo da pesca é considerado irrelevante na avaliação do efeito do Zn. Vários fatores podem contribuir para os diferentes requisitos de Zn, como diferenças na composição do solo em

diferentes áreas do mundo, tradições de preparação de alimentos em vários países, processamento e acessibilidade de alimentos, práticas culturais e poluição ambiental (FREELAND-GRAVES *et al.*, 2015; ZAMAN *et al.*, 2018).

1.2.9 Perspectivas futuras

A biofortificação agronômica é uma excelente estratégia para aumentar a ingestão de micronutrientes por humanos como Se e Zn. É necessário estudos de concentrações desses elementos em solos do Brasil e gerar mapas de distribuição para traçar estratégias de adubação em diferentes estados.

Estudos de efeito de classe textural, variação de pH, potencial redox na sorção, dessorção e disponibilidade desses elementos são de fundamental importância para aumentar a eficiência de absorção, uso e acúmulo de Se e Zn em diferentes espécies vegetais.

Estudos de variação genotípica e dose resposta de Se e Zn são importantes para calibrar a recomendação da aplicação desses elementos visando aumentar a concentração nas partes comestíveis nas plantas sem promover toxidez nas plantas, o que pode provocar queda na produtividade.

REFERÊNCIAS

- ALLOWAY, B. J. **Micronutrient deficiencies in global crop production**. Dordrecht: Springer Science Business Media, 2008.
- ALLOWAY, B. J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environmental Geochemistry and Health**, Netherlands, v. 31, n. 5, p. 537-548, 2009.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v.141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- BEGUM, M.C.; ISLAM, M.; SARKAR, M. R.; AZAD, M. A. S.; HUDA, A. N.; KABIR, A. H. Auxin signaling is closely associated with Zn-efficiency in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Interactions**, Oxford, v. 11, n. 1, p.124-129, 2016.
- BITTERLI, C.; BAÑUELOS, G. S.; SCHULIN, R. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v.107, n. 2, p. 206-216, 2010.
- BORRILL, P.; CONNORTON, J.; BALK, J.; MILLER, T.; SANDERS, D.; UAUY, C. Biofortification of wheat grain with iron and zinc: integrating novel genomic resources and knowledge from model crops. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 53, 2014.
- BOUIS, H. E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J. V.; PFEIFFER, W. H. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and nutrition bulletin**, Boston, v. 32, n.1, p. S31-S40, 2011. Suplemento 1
- BRENNAN, R. F.; ARMOUR, J. D.; REUTER, D. J. Diagnosis of zinc deficiency. In: **Zinc in soils and plants**. Dordrecht: Springer, 1993. p.167-181.
- BRENNAN, R. F.; BOLLAND, M. D. A. Relative effectiveness of soil-applied zinc for four crop species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 42, n. 7, p. 985-993, 2002.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and Soil**, Berlim, v. 302, n.1-2, p.1-17, 2008.
- CAKMAK, I. Enrichment of fertilizers with zinc: An excellent investment for humanity and crop production in India. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 23, n. 4, p. 281-289, 2009.
- CAKMAK, I. Zinc deficiency in wheat in Turkey. In: **Micronutrient deficiencies in global crop production**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 181-200.
- CAKMAK, I.; PFEIFFER, W. H.; MCCLAFFERTY, B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. **Cereal Chemistry**, Sant Paul, v. 87, n.1, p.10-20, 2010.

CAO, X.; MA, L. Q.; TU, C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v.128, n. 3, p. 317-325, 2004.

CAREY, A. M.; SCHECKEL, K. G.; LOMBI, E.; NEWVILLE, M.; CHOI, Y.; NORTON, G. J.; MEHARG, A. A. Grain accumulation of selenium species in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental science and technology**, Philadelphia, v. 46, n.10, p. 5557-5564, 2012.

CARTES, P.; JARA, A. A.; PINILLA, L.; ROSAS, A.; MORA, M. L. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium induced oxidative stress in ryegrass roots. **Annals of Applied Biology**, Malden, v.156, n. 2, p. 297-307, 2010.

CHANG, H. B.; LIN, C. W.; HUANG, H. J. Zinc induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Plant Growth Regulation**, Berlim, v. 46, n. 3, p. 261-266, 2005.

CHU, J.; YAO, X.; ZHANG, Z. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.136, n. 3, p. 355-363, 2010.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, New York, v. 115, n. 6, p.1119-1128, 2005.

DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n.12, p. 999-1007, 2010.

EUSTICE, D. C; KULL, F. J.; SHRIFT, A. Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, n. 5, p.1054-1058, 1981.

FILEK, M.; KESKINEN, R.; HARTIKAINEN, H.; SZAREJKO, I.; JANIAK, A.; MISZALSKI, Z.; GOLDA, A. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.165, n. 8, p. 833-844, 2008.

FILEK, M.; ZEMBALA, M.; HARTIKAINEN, H.; MISZALSKI, Z.; KORNAŚ, A.; WIETECKA-POŚLUSZNY, R.; WALAS, P. Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlim, v. 96, n.1, p.19-28, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO. **Food outlook**: biannual report on global food markets. Lugar de Publicação: Local de Edição, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/giews>. Acesso em: 6 set. 2020

FREELAND-GRAVES, J. H.; SANJEEVI, N.; LEE, J. J. Global perspectives on trace element requirements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 31, n. 1, p. 135-141, 2015.

FREELAND-GRAVES, J. H.; SACHDEV, P. K.; BINDERBERGER, A. Z.; SOSANYA, M. E. Global Diversity of Dietary Intakes and Standards for Zinc, Iron, and Copper. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 61, n. 3, p.126515, 2020.

FREEMAN, J. L.; TAMAOKI, M.; STUSHNOFF, C.; QUINN, C. F.; CAPPA, J. J.; DEVONSHIRE, J.; PILON-SMITS, E. A. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. **Plant physiology**, Rockville, v.153, n. 4, p.1630-1652, 2010.

FROSSARD, E.; BUCHER, M.; MÄCHLER, F.; MOZAFAR, A.; HURRELL, R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 80, n. 7, p. 861-879, 2000.

GERLAND, P.; RAFTERY, A. E.; ŠEVČÍKOVÁ, H.; LI, N.; GU, D.; SPOORENBERG, T.; BAY, G. World population stabilization unlikely this century. **Science**, Washington, v. 346, n. 6206, p. 234-237, 2014.

GIBSON, R. S. Zinc: the missing link in combating micronutrient malnutrition in developing countries. **Proceedings of The Nutrition Society**, Cambridge, v. 65, n.1, p. 51-60, 2006.

GIGOLASHVILI, T.; KOPRIVA, S. Transporters in plant sulfur metabolism. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 442, 2014.

GOLOB, A.; GADŽO, D.; STIBILJ, V.; DJIKIĆ, M.; GAVRIĆ, T.; KREFT, I.; GERM, M. Sulphur interferes with selenium accumulation in Tartary buckwheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 108, n. 1, p. 32-36, 2016

GONZÁLEZ-MORALES, S.; PÉREZ-LABRADA, F.; GARCÍA-ENCISO, E.; LEIJA-MARTÍNEZ, P.; MEDRANO-MACÍAS, J.; DÁVILA-RANGEL, I. BENAVIDES-MENDOZA, A. Selenium and sulfur to produce *Allium* functional crops. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 4, p. 558, 2017

GRANT, K.; CAREY, N. M.; MENDOZA, M.; SCHULZE, J.; PILON, M.; PILON-SMITS, E. A.; VAN HOEWYK, D. Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis* implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. **Biochemical Journal**, London, v. 438, n. 2, p. 325-335, 2011.

GUPTA, M.; GUPTA, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 2074, 2017

HAASE, H.; ELLINGER, S.; LINSEISEN, J.; NEUHÄUSER-BERTHOLD, M.; RICHTER, M. Revised DA-CH-reference values for the intake of zinc. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 61, n. 1, p. 126536, 2020.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 18, n. 4, p. 309-318, 2005.

HAWRYLAK-NOWAK, B. Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 132, n. 1-3, p. 259-269, 2009.

HAWRYLAK-NOWAK, B. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 149-157, 2013.

HAWRYLAK-NOWAK, B.; MATRASZEK, R.; POGORZELEC, M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 2, p. 41, 2015.

HORNECK, D. A.; SULLIVAN, D. M.; OWEN, J. S.; HART, J. M. **Soil test interpretation guide**. Corvallis: Osu, 2011.

HOTZ, C.; BROWN, K. H. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. **Food Nutrition Bulletin**, Tokio, v. 25, n. 1, p. 94–204, 2004.

HUANG, Q. Q.; WANG, Q.; WAN, Y. N.; YU, Y.; JIANG, R. F.; LI, H. F. Application of X-ray absorption near edge spectroscopy to the study of the effect of sulphur on selenium uptake and assimilation in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, Switzerland, v. 61, n. 4, p. 726-732, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Estimativas da população brasileira**. Brasília: RBG, 2020. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acessado em: 6 set. 2020.

JONES, G. D.; DROZ, B.; GREVE, P.; GOTTSCHALK, P.; POFFET, D.; MCGRATH, S. P.; SENEVIRATNE, S. I.; SMITH, P.; WINKEL, L. H. E. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n.11, p. 2848-2853, 2017.

KUMAR, M.; BIJO, A. J.; BAGHEL, R. S.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 51, p.129-138, 2012.

ŁABANOWSKA, M.; FILEK, M.; KOŚCIELNIAK, J.; KURDZIEL, M.; KULIŚ, E.; HARTIKAINEN, H. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings—EPR, enzymatic and fluorescence studies. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.169, n. 3, p. 275-284, 2012.

LEMIRE, M.; MERGLER, D.; HUEL, G.; PASSOS, C. J.; FILLION, M.; PHILIBERT, A.; NORMAND, G. Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, New York, v. 19, n. 2, p. 213-222, 2009.

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

MALIK, J. A.; GOEL, S.; KAUR, N.; SHARMA, S.; SINGH, I.; NAYYAR, H. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 77, n. ..., p. 242-248, 2012.

MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 20, n. ..., p. 3–18, 2006.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, Malden, v.154, n.1, p. 29-43, 2002.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONTALVO, D.; DEGRYSE, F.; SILVA, R. C.; BAIRD, R.; MCLAUGHLIN, M. J. Agronomic effectiveness of zinc sources as micronutrient fertilizer. In: AUTOR. **ADVANCES in agronomy**. San Diego: Academic Press, 2016. p. 215-267.

MROCZEK-ZDYRSKA, M.; WÓJCIK, M. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 147, n.1-3, p. 320-328, 2012.

MUNN, S.; ASCHBERGER, K.; OLSSON, H.; PAKALIN, S.; PELLEGRINI, G.; VEGRO, S.; PAYA PEREZ, A. B. European Union risk assessment report-zinc metal. **Publications Office of the European Union**, Luxembourg, v. 10, n. 1, p. 40041, 2010.

PILARCZYK, B.; TOMZA-MARCINIAK, A.; PILARCZYK, R.; MARCINIAK, A.; BAŁKOWSKA, M.; NOWAKOWSKA, E. Selenium, Se. In: **Mammals and birds as**

bioindicators of trace element contaminations in terrestrial environments.

Cham: Springer, 2019. p. 301-362.

PILON-SMITS, E. A.; QUINN, C. F. Selenium metabolism in plants. In: **Cell biology of metals and nutrients**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 225-241.

RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C.; FOLEY, J. A. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66428, 2013.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 61, n. 1, p. 203–215, 2002.

REIS, H. P. G.; BARCELOS, J. P. Q.; FURLANI JUNIOR, E.; SANTOS, E. F.; SILVA, V. M.; MORAES, M. F.; REIS, A. R. Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. **Journal of Cereal Science**, London, v. 79, n. 1, p. 508-515, 2018.

RENGEL, Z.; GRAHAM, R.D. Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn-deficient soil. **Plant and Soil**, Berlin, v. 173, n. 2, p. 259-266, 1995.

RIVERA, J. A.; RUEL, M. T.; SANTIZO, M. C.; LÖNNERDAL, B.; BROWN, K. H. Zinc supplementation improves the growth of stunted rural Guatemalan infants. **The Journal of Nutrition**, Oxford, v.128, n. 3, p. 556-562, 1998.

RONEY, N.; OSIER, M.; PAIKOFF, S. J.; SMITH, C. V.; WILLIAMS, M.; ROSA, C. T. ATSDR evaluation of the health effects of zinc and relevance to public health. **Toxicology and Industrial Health**, Thousand Oaks, v. 22, n.10, p. 423-493, 2006.

ROSEN, C. J.; BIERMAN, P. M. **Nutrient management for fruit and vegetable crop production: maintaining soil fertility in an organic system**. Minneapolis: Extension Service, 2005.

ROSENFELD, I.; BEATH, O. **Selenium geobotany, biochemistry, toxicity, and nutrition**. London: Academic Press, 1964. p. 384.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Santiago, v.13, n. 4, p. 905-927, 2013.

SHAHZAD, Z.; ROUACHED, H.; RAKHA, A. Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v.13, n. 3, p. 329-346, 2014.

SORS, T. G.; ELLIS, D. R.; NA, G. N.; LAHNER, B.; LEE, S.; LEUSTEK, T.; SALT, D. E. Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. **The Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 785-797, 2005.

STOFFANELLER, R.; MORSE, N. L. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 3, p. 1494-1537, 2015.

SUZUKI, H.; ASAKAWA, A.; LI, J.; TSAI, M.; AMITANI, H.; OHINATA, K.; INUI, A. Zinc as an appetite stimulator-the possible role of zinc in the progression of diseases such as cachexia and sarcopenia. **Recent Patents on Food, Nutrition Agriculture**, Sharjah, v. 3, n. 3, p. 226-231, 2011.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE-USDA. **National nutrient database for standard reference**. Washigton: Food Data Central, 2019.

VAN HOEWYK, D. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.112, n. 6, p. 965-972, 2013.

VÍTOVÁ, M.; BIŠOVÁ, K.; HLAVOVÁ, M.; ZACHLEDER, V.; RUCKI, M.; ČÍŽKOVÁ, M. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. **Aquatic Toxicology**, Netherlands, v. 102, n.1-2, p. 87-94, 2011.

WALLENBERG, M.; OLM, E.; HEBERT, C.; BJÖRNSTEDT, M.; FERNANDES, A. P. Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. **Biochemical Journal**, London, v. 429, n.1, p. 85-93, 2010.

WANG, C. Q. Water stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.174, n. 2, p. 276-282, 2011.

WANG, P.; MENZIES, N. W.; LOMBI, E.; MCKENNA, B. A.; JAMES, S.; TANG, C.; KOPITTKKE, P. M. Synchrotron-based X-ray absorption near-edge spectroscopy imaging for laterally resolved speciation of selenium in fresh roots and leaves of wheat and rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n.15, p. 4795-4806, 2015.

WANG, Y. D.; WANG, X.; WONG, Y. S. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. **Journal of Proteomics**, Valencia, v. 75, n. 6, p.1849-1866, 2012.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 353-364, 2004.

WESSELLS, K. R.; BROWN, K. H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n.11, p. e50568, 2012.

WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.117, n. 2, p. 217-235, 2016.

WHITE, P. J. Selenium metabolism in plants. Biochim. Biophys. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v.1862, n.11, p. 2333-2342, 2018.

WHITE, P. J.; BOWEN, H. C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W. P.; SPIBY, R. E.; SMITH, B. M. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p.1927-1937, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends in Plant Science**, London, v.10, n.12, p. 586-593, 2005.

WINKEL, L. H.; JOHNSON, C. A.; LENZ, M.; GRUNDL, T.; LEUPIN, O. X.; AMINI, M.; CHARLET, L. Environmental selenium research: from microscopic processes to global understanding. **Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 571-579, 2012.

WINKEL, L. H.; VRIENS, B.; JONES, G. D.; SCHNEIDER, L. S.; PILON-SMITS, E.; BAÑUELOS, G. S. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 6, p. 4199-4239, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Atlanta: World Health Organization, 2009.

WORLDOMETERS. **Estatísticas mundiais em tempo real**. London: Institute Worldometers, 2020. Disponível em: <http://www.worldometers.info/br>. Acessado em: 6 set. 2020.

WU, Z.; BAÑUELOS, G. S.; LIN, Z. Q.; LIU, Y.; YUAN, L.; YIN, X.; LI, M. Biofortification and phytoremediation of selenium in China. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1, p.136, 2015.

XU, Y.; LI, Y.; LI, H.; WANG, L.; LIAO, X.; WANG, J.; KONG, C. Effects of topography and soil properties on soil selenium distribution and bioavailability (phosphate extraction): a case study in Yongjia County, China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 633, n. 1, p. 240-248, 2018.

XUE, T.; HOU, S.; TAN, J.; LIU, G. L. The antioxidative function of selenium in higher plants: II. Non-enzymatic mechanisms. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 38, n. 1, p. 356-358, 1993.

YAO, X.; CHU, J.; BA, C. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.136, n.1, p. 96-105, 2010.

YAO, X.; CHU, J.; BA, C. Responses of wheat roots to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.137, n. 2, p. 244-252, 2010.

YAO, X.; CHU, J.; HE, X.; BA, C. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscou, v. 58, n. 2, p. 283-289, 2011.

YILMAZ, A.; EKIZ, H.; GÜLTEKIN, I.; TORUN, B.; BARUT, H.; KARANLIK, S.; CAKMAK, I. Effect of seed zinc content on grain yield and zinc concentration of wheat grown in zinc deficient calcareous soils. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n.10, p. 2257-2264, 1998.

ZAMAN, Q. U.; ASLAM, Z.; YASEEN, M.; IHSAN, M.Z.; KHALIQ, A.; FAHAD, S.; NAEEM, M. Zinc biofortification in rice: leveraging agriculture to moderate hidden hunger in developing countries. **Archives of Agronomy and Soil Science**, London, v. 64, n. 2, p.147-161, 2018.

ZHU, Y. G.; PILON-SMITS, E. A.; ZHAO, F. J.; WILLIAMS, P. N.; MEHARG, A. A. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. **Trends in plant science**, London, v.14, n. 8, p. 436-442, 2009.

2 RESPOSTAS FENOTÍPICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS POR ESTRESSE POR TOXICIDADE DE SELÊNIO EM PLANTAS DE ARROZ: CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS E AJUSTE METABÓLICO DA PLANTA

2.1 RESUMO

Selênio (Se) em baixa concentração é considerado elemento benéfico para as plantas. A faixa entre a concentração ótima e a concentração tóxica de Se é estreita e varia entre as espécies de plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fenotípicas, fisiológicas e bioquímicas de quatro cultivares de arroz (BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga) cultivados hidroponicamente e tratados com selenato de sódio ($1,5 \text{ mM L}^{-1}$). As plantas tratadas com Se mostraram uma redução na concentração de proteínas solúveis, clorofilas e carotenóides, resultando nos sintomas visuais de toxicidade caracterizados como clorose e necrose foliar. A toxicidade do Se causou uma redução na massa seca da parte aérea e da raiz das plantas de arroz. O excesso de Se aumentou o estresse oxidativo monitorado pelas concentrações de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. O sistema antioxidante enzimático (catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase) aumentou em resposta ao fornecimento de Se. Curiosamente, compostos do metabolismo primário, como sacarose, açúcares totais, nitrato, amônia e aminoácidos aumentaram em plantas tratadas com Se. O aumento desses metabólitos pode indicar um mecanismo de defesa para o reajuste osmótico das plantas de arroz para mitigar a toxicidade causada pelo Se. No entanto, esses metabólitos não foram eficazes para minimizar os danos às características fenotípicas, como clorose foliar e redução do peso seco da parte aérea e da raiz em resposta ao excesso de Se. O aumento da concentração de açúcares combinado com atividades de enzimas antioxidantes podem ser biomarcadores eficazes para indicar estresse induzido por Se em plantas de arroz. Este estudo mostra os atributos fisiológicos que devem ser levados em consideração para o sucesso no cultivo sustentável de arroz em ambientes contendo excesso de Se.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L. Variação genotípica. Metabolismo primário. Aminoácidos. Fitotoxicidade. Selênio.

2.2 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial para a saúde humana e animal devido à ativação dos sistemas de defesa antioxidantes (REIS *et al.*, 2017). Além disso, o Se mostra uma faixa estreita entre deficiência ($<40 \mu\text{g dia}^{-1}$) e toxicidade ($> 400 \mu\text{g dia}^{-1}$) na nutrição humana (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011). A deficiência de Se pode levar a doenças letais para humanos, como câncer de tireóide, fígado e doenças cardiovasculares (VINCETI *et al.*, 2016). A ingestão diária de Se recomendada para adultos é de $55 \mu\text{g dia}^{-1}$ (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011), no entanto, a ingestão elevada de Se pode ser tóxica, resultando em perda de cabelo e unhas, danos ao sistema nervoso central e gastrointestinais (VINCETI *et al.*, 2016).

Assim, a deficiência e a toxicidade de Se em humanos e animais são problemas globais (REIS *et al.*, 2020). Vários estudos investigaram a deficiência e toxicidade de Se em humanos (KROHN *et al.*, 2016; MANZANARES; HARDY, 2016). O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento básico em aproximadamente 33 países e fornece cerca de 80% da ingestão calórica diária de 3 bilhões de pessoas e faz parte de 50% da dieta da população mundial, principalmente dos países asiáticos (REIS *et al.*, 2020). No Brasil

A concentração média de Se nos grãos de arroz é de cerca de $95 \mu\text{g kg}^{-1}$ na China, que é a principal área de produção de arroz do mundo (DENG *et al.*, 2017). Portanto, aumentar as concentrações de Se no arroz com a aplicação de fertilizantes de Se tem implicações importantes para melhorar a nutrição de Se em humanos e animais (DENG *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2017). A aplicação de Se no arroz é uma forma segura e eficaz de fornecer esse elemento benéfico às plantas, evitando a deficiência de Se entre os que consomem uma dieta à base de arroz diariamente, mas também reduzindo o risco de câncer e outras doenças na população global (REIS *et al.*, 2019).

Para mitigar a deficiência de Se, as plantas atuam como veículos essenciais para fornecer a dieta da maioria da população e do gado em todo o mundo (MOSTOFA *et al.*, 2017). Entretanto, o uso constante e a aplicação excessiva de fertilizantes contendo Se para biofortificação, contribuem substancialmente para a liberação de Se no ecossistema agrícola, causando potenciais efeitos fitotóxicos nas plantas (MOSTOFA *et al.*, 2017). Atualmente as atividades antropogênicas, como irrigação, mineração, refino de petróleo, queima de combustíveis fósseis e lançamento de

efluentes industriais, constituem as principais fontes de poluição por Se (WINKEL *et al.*, 2015). Além disso, vários lugares do mundo têm naturalmente altas concentrações de Se no solo (REIS *et al.*, 2017). Portanto, compreender os mecanismos de como as plantas reagem com o excesso de Se é importante para a nutrição vegetal, humana e animal, além de reduzir os riscos de contaminação com Se no meio ambiente (SILVA *et al.*, 2018).

A alta concentração de Se nas plantas pode induzir a fitotoxicidade por interferir diretamente no metabolismo, causando clorose, degradação da membrana celular, senescência, redução do crescimento e produtividade de grãos de arroz (AKBULUT e ÇAKIR, 2010; REIS *et al.*, 2020). O aumento da peroxidação lipídica e alterações nas proteínas por meio de espécies reativas de oxigênio (EROs) também são controlados pela alta concentração de Se nas plantas (KOLBERT *et al.*, 2016; GUPTA; GUPTA, 2017; SILVA *et al.*, 2018). A toxicidade do Se também pode alterar o diâmetro do floema e a espessura do parênquima paliçádico, além de lesões necróticas e aumento das concentrações de açúcares nas folhas do feijão-caupi, devido ao aumento da atividade das enzimas do metabolismo dos carboidratos (SILVA *et al.*, 2018).

O acúmulo de Se no tecido vegetal também pode afetar o nitrogênio (N) ao interromper a atividade da redutase do nitrato e o metabolismo do enxofre (S) (REIS *et al.*, 2019). Além disso, o Se interrompe a absorção de molibdênio pelas plantas, que é necessária para a biossíntese de molibdopterina, um cofator essencial para a atividade da redutase do nitrato e assimilação de N do nitrato (SCHIAVON *et al.*, 2017). Mudanças na assimilação de N afetam a biossíntese de metabólitos de N, como aminoácidos, proteínas e nucleotídeos, metabólitos secundários, componentes da parede celular, crescimento da planta e respostas da planta ao estresse ambiental (WHITE, 2018). A toxicidade do Se em mudas de arroz é caracterizada por clorose foliar, queda acentuada nos pigmentos fotossintéticos, biomassa vegetal e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (MOSTOFA *et al.*, 2017).

A tolerância ao Se varia de acordo com as espécies de plantas e cultivares (WHITE, 2018). O arroz é uma planta que não apresenta acumulação de Se e altamente suscetível à toxicidade (REIS *et al.*, 2020). São necessárias informações sobre a tolerância ou toxicidade do Se em plantas de arroz. Estudos sobre como o Se afeta o metabolismo do N em cultivares de arroz são importantes para melhor compreender os mecanismos de tolerância e fitotoxicidade envolvidos. Este estudo

teve como objetivo caracterizar as respostas fenotípicas, fisiológicas e bioquímicas de cultivares de arroz ao excesso de Se.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Condições de crescimento e arranjo experimental

Sementes de arroz (*Oryza sativa*) de quatro cultivares (BRS Esmeralda; BRSMG Relâmpago; BRS Bonança e Bico Ganga) foram semeadas em tubos de polietileno contendo substrato de vermiculita. As mudas foram cultivadas por 28 dias após a emergência e lavadas com água deionizada e transplantadas para potes de polietileno de 14 L contendo solução nutritiva adaptada de Johnson *et al.* (1957). As mudas foram adaptadas em solução nutritiva com força iônica de 40% por 5 dias antes da aplicação dos tratamentos. A composição da solução nutritiva era KNO_3 1 mol L⁻¹, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 mol L⁻¹, NH_4NO_3 1 mol L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L⁻¹, CaCl_2 1 mol L⁻¹, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L⁻¹, KCl 1 mol L⁻¹, KH_2PO_4 1 mol L⁻¹, $\text{NaSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L⁻¹, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L⁻¹, Fe-EDTA (25 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 54 µmol L⁻¹ EDTA), KCl 50 µmol L⁻¹, H_3BO_3 25 µmol L⁻¹, MnSO_4 2 µmol L⁻¹, ZnSO_4 2 µmol L⁻¹, CuSO_4 0,5 µmol L⁻¹, H_2MoO_4 0,5 µmol L⁻¹. Foi realizada aeração da solução nutritiva, sendo o pH monitorado diariamente e ajustado para $5,5 \pm 0,1$ quando necessário.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 4 x 2, com quatro cultivares de arroz (BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga), e aplicação de Se (controle e 1,5 mM de selenato de sódio) com quatro repetições. Para avaliar a toxicidade do Se em cultivares de arroz, a concentração de Se neste estudo foi baseada em estudo anterior relatado por Mostafa *et al.* (2017).

Após cinco dias de adaptação das plantas em solução nutritiva a 40% de força iônica, as mudas de arroz foram cultivadas por cinco dias em solução nutritiva de força iônica 100% na ausência ou na presença de 1,5 mM de selenato de sódio. No quinto dia após a exposição ao Se, as folhas das plantas foram coletadas para o diagnóstico dos sintomas de toxicidade. Além disso, as folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análise de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, proteínas, pigmentos fotossintéticos e metabólitos de nitrogênio. Raiz e parte aérea das mudas de arroz também foram coletadas, lavadas com água

deionizada, secas e as amostras preparadas para avaliação de biomassa e análise de nutrientes.

2.3.2 Avaliações da biomassa seca e análise química

As raízes e todas as folhas da parte aérea das mudas de arroz foram separadas e colocadas em sacos de papel. O material foi identificado e seco em estufa com circulação forçada de ar a $\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante. A massa seca foi pesada e os resultados expressos em g planta^{-1} . Posteriormente, o material vegetal foi triturado em moinho Wiley para análise dos nutrientes. Subamostras ($\sim 0,20\text{ g}$) de materiais secos e moídos das raízes e parte aérea foram pesados (pesos exatos registrados) e digeridos em tubos de digestão de um material de revestimento de perfluoroalcoxi (PFA) contendo 2 mL de ácido nítrico (HNO_3) na concentração de 70%, 1 mL de água Milli-Q e 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Antes da análise elementar, as amostras digeridas foram diluídas na proporção de 1:10 usando água milli-Q. A digestão diluída do material vegetal foi analisada e as análises por ICP-MS foram realizadas de acordo com os métodos de Silva *et al.* (2018). O processamento de dados foi realizado usando o software QtegraTM (Thermo Fisher Scientific).

2.3.3 Análise de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

Para a determinação da concentração de proteínas solúveis e atividade de superóxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1), catalase (CAT, EC: 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.11), aproximadamente 0,25 g do material vegetal congelado foram pesados e macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. No material macerado, 1 mL de tampão de fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, ditioneitol 3 mM (DTT) e 4% (p / v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) foi adicionado e misturado de acordo com o uso o material macerado, utilizando a metodologia descrita por Silva *et al.* (2018). O material foi homogeneizado em vórtex e, em seguida, centrifugado em centrífuga refrigerada a 9000 rpm por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi utilizado para quantificação da proteína solúvel e atividade de SOD, CAT e APX.

2.3.4 Peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada de acordo com Alexieva *et al.* (2001). Aproximadamente 0,2 g de material vegetal congelado foram pesados e macerados em um almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Na planta macerada foi adicionado 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m / v) e mantido em tubo Eppendorf. O material foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, 200 μL do sobrenadante foram coletados e misturados com 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 (100 mM) e 800 μL de iodeto de potássio (1 M). As amostras foram colocadas em gelo por 1 h. Após o aquecimento à temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram feitas a $\lambda = 390 \text{ nm}$ em um espectrofotômetro. A concentração de H_2O_2 na folha foi calculada com base em uma curva padrão e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF (matéria fresca).

2.3.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida de acordo com Heath e Packer (1968). Amostras de folhas (0,2 g) foram macerados em um almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. No material macerado foi adicionado 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) + polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20% (m/v). O material foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. A reação foi realizada misturando 250 μL de sobrenadante com 1 mL de solução de ácido tricloroacético 20% (m / v) + 0,5% (m / v) de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram mantidas em banho seco a 95 °C por 30 min, a seguir transferidas para uma caixa de gelo por 10 min. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. As leituras da amostra foram feitas a $\lambda = 535$ e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA g^{-1} MF.

2.3.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada conforme descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Uma câmara de reação foi usada sob uma lâmpada fluorescente de 15 W a 25 °C. Para a reação enzimática, 50 μL do sobrenadante foi misturado com 2 mL de tampão de fosfato de potássio (50 mM) pH 7,8, 250 μL de metionina (13 mM), 200 μL de nitroblue de tetrazólio (NBT) (75 mM), 200 μL de EDTA

(0,1 mM) e 250 μ L de riboflavina (2 μ M). As amostras foram homogeneizadas por vórtex e mantidas dentro da caixa iluminada por 25 min. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas novamente e registradas em espectrofotômetro para leitura de absorbância em $\lambda = 560$ nm. Os resultados foram expressos em U SOD mg^{-1} proteína.

2.3.7 Atividade da catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada monitorando a degradação de H_2O_2 de acordo com o método descrito por Reis *et al.* (2015). Para medir a reação enzimática, 20 μ L do sobrenadante foram misturados com 3 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM) pH 7,5 e 25 μ L de H_2O_2 30% (v / v). A solução foi imediatamente homogeneizada e a decomposição do H_2O_2 determinada a 25 °C em espectrofotômetro a $\lambda = 240$ nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.8 Atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.11)

A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada de acordo com Reis *et al.* (2015). Para medir a reação enzimática, 100 μ L de sobrenadante foram misturados com 600 μ L de tampão de fosfato de potássio (80 mM), pH 7,0, 100 μ L de ascorbato (5 mM), 100 μ L de EDTA (1 mM) com subsequente incubação em banho-maria a 30 °C por 5 min no escuro, então 100 μ L de H_2O_2 (1 mM) foi adicionado com uma leitura de absorbância imediata em $\lambda = 290$ nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.9 Proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada de acordo com Bradford (1976) para calcular a atividade específica de SOD, CAT e APX. A determinação foi feita pela mistura de 20 μ L do sobrenadante com 1 mL do reagente de Bradford. Após 10 min de espera, uma leitura de absorbância foi feita em $\lambda = 595$ nm. A concentração de proteína foi calculada com base em uma curva padrão de BSA (“albumina de soro bovino”), os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF.

2.3.10 Pigmentos fotossintéticos

Para quantificar os pigmentos fotossintéticos, 0,5 g de folhas frescas foram picadas e misturadas com 5 mL de acetona fria 80% (v / v). Os tubos foram mantidos a 4 °C por 24 horas. A concentração de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenóides, foi quantificada pelo método espectrofotométrico proposto por Lichtenthaler (1987), utilizando material vegetal fresco armazenado em extrato de acetona a 80%.

2.3.11 Sacarose e açúcar total

Para analisar a sacarose e os açúcares totais, amostras de folhas foram extraídas de acordo com Bieleski e Turner (1966). Para a extração, 0,125 g de material vegetal foi macerado em um almofariz de porcelana e misturado a 1,25 mL de solução de MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água) e mantido em geladeira por 24 h a 4 °C. O material foi agitado em vórtex e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Em outro tubo, 1,0 mL do sobrenadante do extrato de MCW foi transferido e misturado com 125 µL de clorofórmio e 187 µL de água deionizada. Após a separação das fases, a concentração de açúcares totais, sacarose, nitrato, amônia e aminoácidos foi determinada usando a fase solúvel em água.

Para quantificar a sacarose, 10 µL do sobrenadante foram misturados com 250 µL de KOH 30% (m / v) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (VAN HANDEL, 1967). A mistura foi agitada em vórtice e aquecida em estufa a 100 °C por 10 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a $\lambda = 490$ nm usando um espectrofotômetro. Ambas as quantificações foram realizadas usando uma curva padrão de sacarose. Os resultados para sacarose foram expressos em mg g^{-1} MF.

Para quantificar os açúcares totais, 10 µL de sobrenadante foram misturados com 250 µL de fenol 5% (m / v) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (DUBOIS *et al.*, 1956). A mistura foi agitada com vórtice e, após resfriamento até a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a $\lambda = 490$ nm. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF.

2.3.12 Nitrato

A concentração de nitrato foi determinada de acordo com Cataldo *et al.* (1975). Para medições de nitrato, uma alíquota de 20 μL de sobrenadante foi misturada com 40 μL de ácido salicílico a 5% (m / v) em ácido sulfúrico (m / v). Após 20 min mantido à temperatura ambiente, 1 mL de NaOH (2 N) foi adicionado lentamente e agitado em vórtex. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as leituras foram realizadas usando um espectrofotômetro a $\lambda = 410 \text{ nm}$. A concentração de nitrato foi determinada usando uma curva padrão de solução de nitrato de sódio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

2.3.13 Amônia

A concentração de amônia foi medida de acordo com McCullough (1967). Para determinação de amônia, 20 μL de sobrenadante foram misturados com 500 μL de solução de fenol (2,5 g de fenol + 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em um volume final de 250 mL de H_2O deionizada) e 500 μL de solução de fosfato. A mistura foi homogeneizada por vórtex e, em seguida, incubada em um forno por 1 h a 37 °C. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as leituras do espectrofotômetro foram feitas a $\lambda = 630 \text{ nm}$. A concentração de amônia foi determinada usando a curva padrão da solução de sulfato de amônio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

2.3.14 Aminoácidos

A concentração total de aminoácidos livres foi medida de acordo com Yemm e Cocking (1955). Do extrato solúvel em água de MCW, uma alíquota de 60 μL foi removida e misturada com 100 μL de citrato de sódio 0,2 M, 40 μL de ninidrina 5% (m / v) em éter monometílico de etilenoglicol e 200 μL de KCN 0,2 mM. A mistura da solução foi incubada aquecida a 100 °C por 15 min e, em seguida, resfriada por 10 min em água. Posteriormente, 200 μL de álcool etílico a 60% (v / v) foram adicionados para interromper a reação e lidos em $\lambda = 570 \text{ nm}$. Os aminoácidos solúveis totais foram calculados com base em uma curva de calibração padrão de metionina. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

2.3.15 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade de Levene, ambos à 0,05 de probabilidade ($p < 0,05$) por meio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). Posteriormente, os dados normais foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para verificar as variáveis dependentes que estavam diretamente relacionadas aos tratamentos. O pacote “corrplot” foi acessado para criar o heatmap, usando as funções “color” e “cor.mtest” para criar matrizes de coeficiente e p-valor, respectivamente. Para facilitar a visualização de correlações significativas, asteriscos foram inseridos nas células do heatmap.

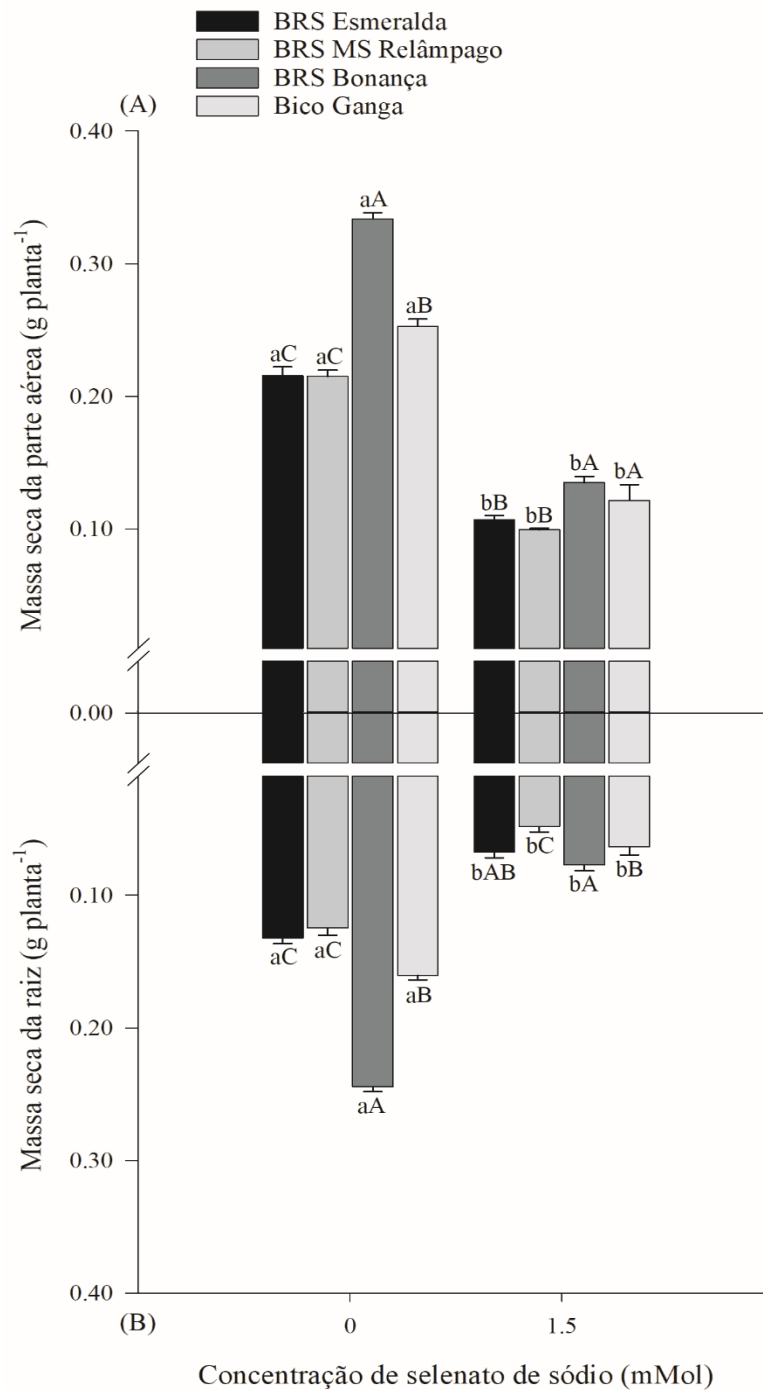
2.4 RESULTADOS

A massa seca da parte aérea e da raiz diminuiu drasticamente em resposta ao excesso de Se (Figura 1A-B). Sintomas de toxicidade visual foram observados em plantas de arroz tratadas com Se (Figura 2). BRS Esmeralda apresentou os sintomas de toxicidade mais pronunciados com clorose, necrose e enrugamento no ápice foliar.

A concentração de clorofila e carotenóide diminuiu em plantas tratadas com Se (Figura 3A, 3D). A concentração total de clorofila diminuiu no BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago e Bico Ganga em 81%, 45% e 148%, respectivamente (Figura 3C). A concentração de clorofila b diminuiu em BRS Esmeralda e Bico Ganga em 63% e 247%, respectivamente, quando comparadas ao controle (Figura 3B).

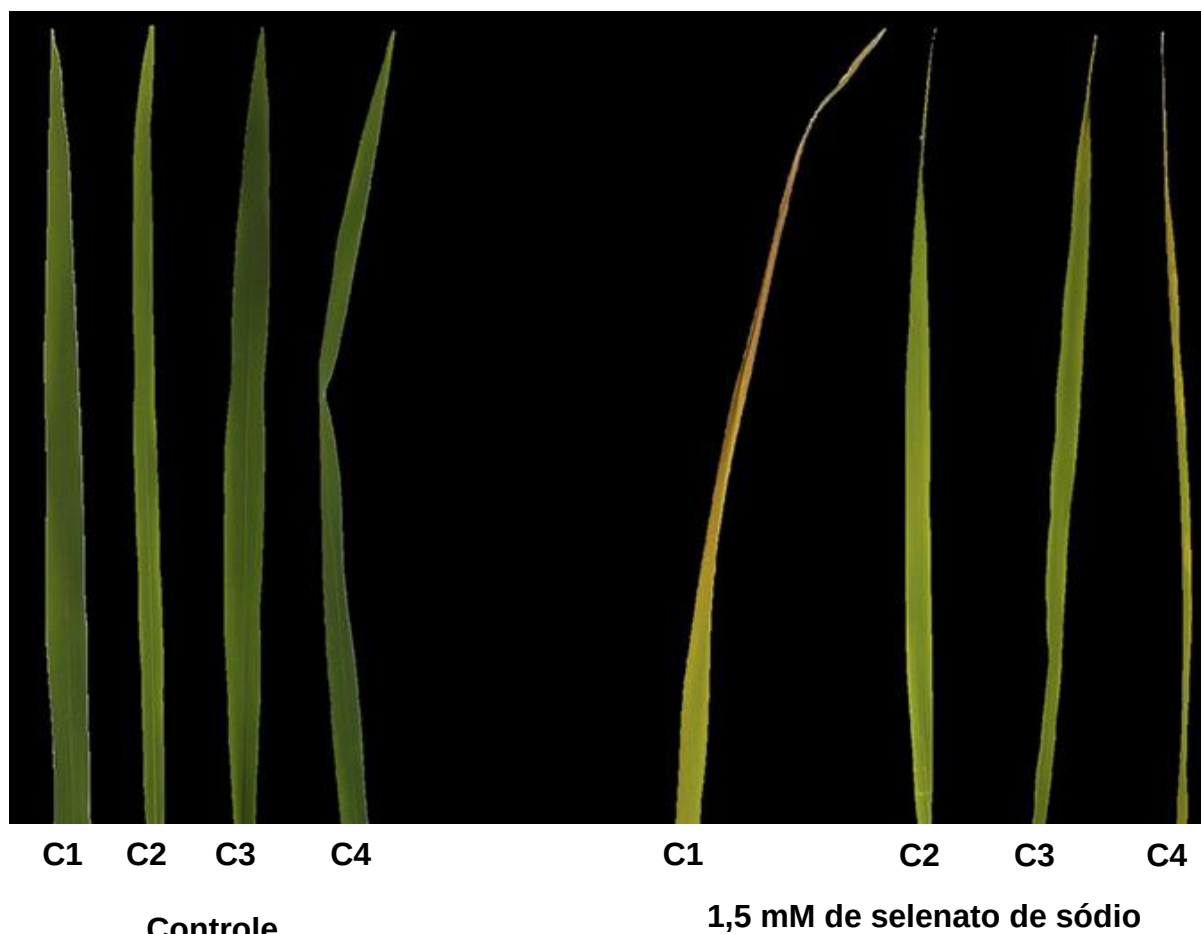
O estresse oxidativo aumentou nas plantas de arroz tratadas com Se (Figura 4A-B). Em comparação aos tratamentos de controle, a concentração de MDA aumentou em 148%, 219%, 595% e 166%, respectivamente para BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga, respectivamente. BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga apresentaram um aumento de 35%, 48%, 16% e 42% respectivamente para a concentração de H_2O_2 em comparação com plantas não tratadas com Se.

Figura 1 - Efeitos do selenato de sódio na massa seca da parte aérea (A) e massa seca da raiz (B) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Fonte: Do próprio autor (2020).

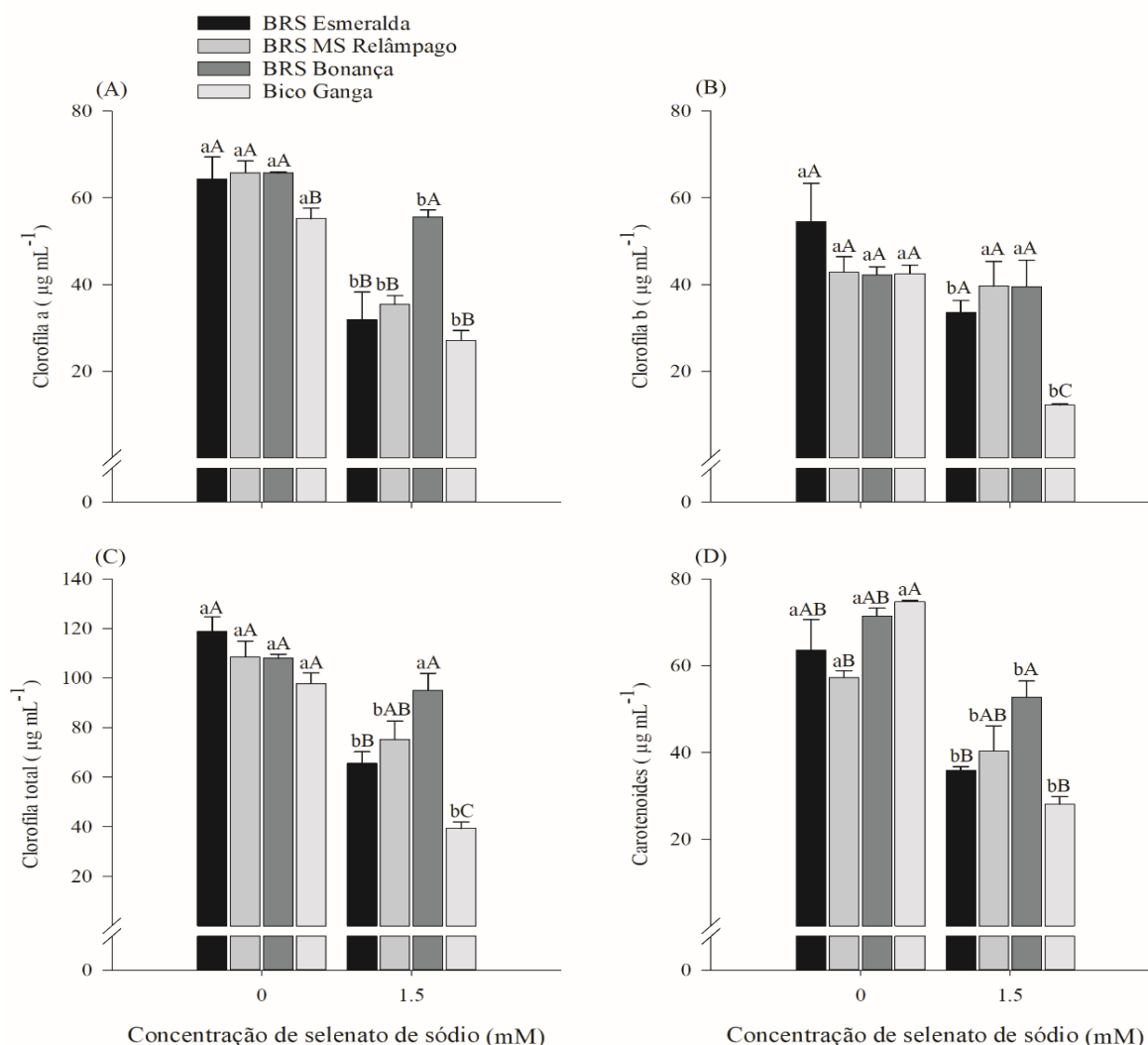
Figura 2 - Sintomas visuais de toxicidade de Se em folhas de arroz, onde C1 - BRS Esmeralda; C2 - BRSMG Relâmpago; C3 - BRS Bonança; C4 - Bico ganga. As imagens foram obtidas no quinto dia de exposição a 1,5 mM de selenato de sódio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

As plantas de arroz mostraram maior atividade da SOD em resposta ao fornecimento de Se (Figura 4C). O genótipo Bico Ganga aumentou 418% (Figura 4C) e 180% (Figura 4D), em relação ao controle, para atividades SOD e CAT. Um aumento na atividade de APX foi observado para BRSMG Relâmpago e Bico Ganga tratados com Se (Figura 4E), sendo um aumento de 1269% e 360%, respectivamente. O Se diminuiu a concentração de proteína solúvel para BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago e Bico Ganga (Figura 4F) em 39%, 136% e 420%, respectivamente.

Figura 3 - Efeitos do selenato de sódio nos pigmentos fotossintéticos, clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



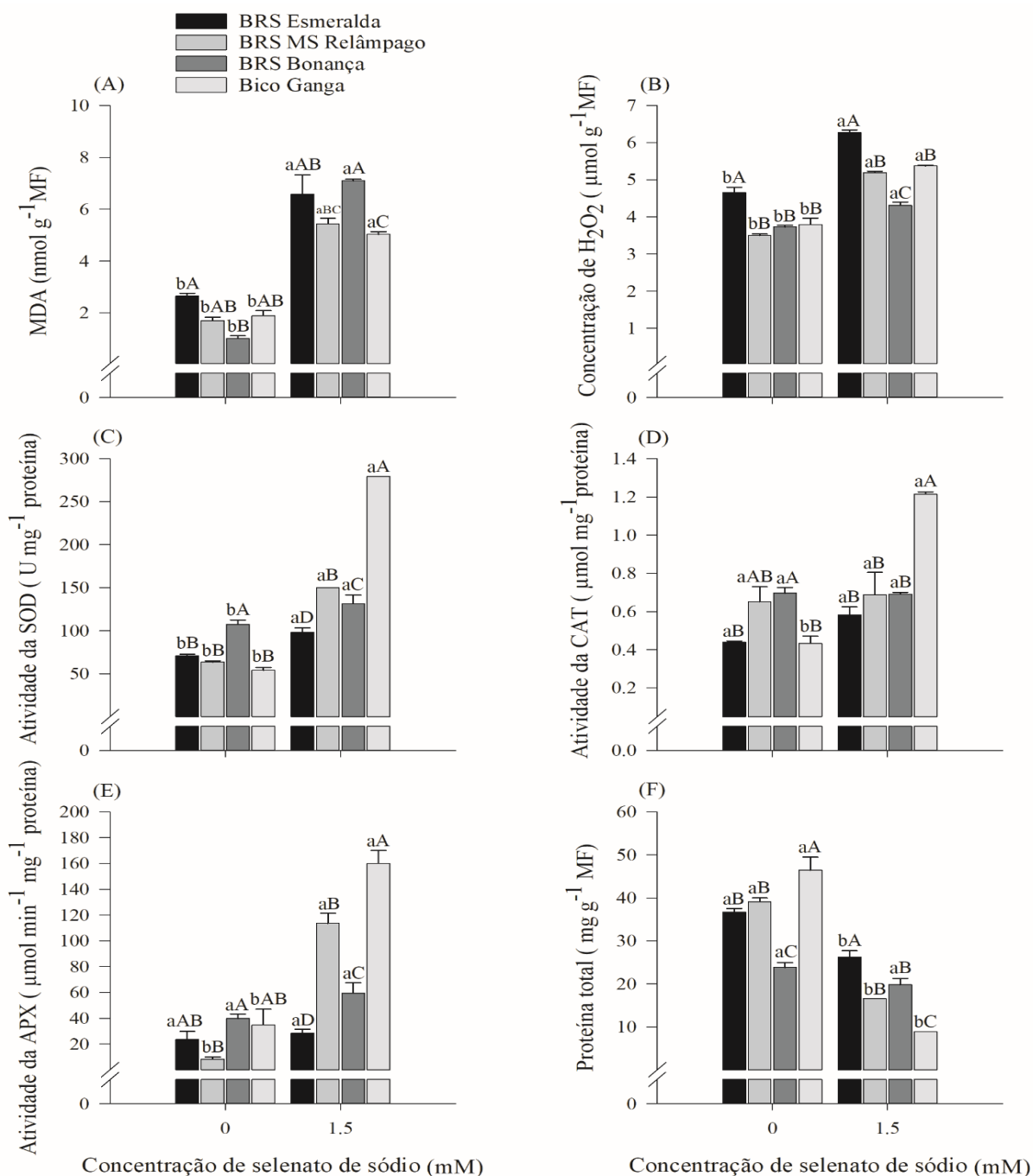
Fonte: Do próprio autor (2020).

A aplicação de Se aumentou drasticamente a concentração e o acúmulo de Se na parte aérea e na raiz (Figura 5A-D). BRS Esmeralda e Bico Ganga apresentaram aumento da concentração de Se na parte aérea de 716% e 826%, respectivamente. A translocação de Se da raiz para a parte aérea diminuiu nas plantas tratadas com Se (Figura 5E).

O fornecimento de Se aumentou a concentração de sacarose em 136%, 177%, 94% e 80% em comparação com as plantas não tratadas para BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga, respectivamente (Figura 6A).

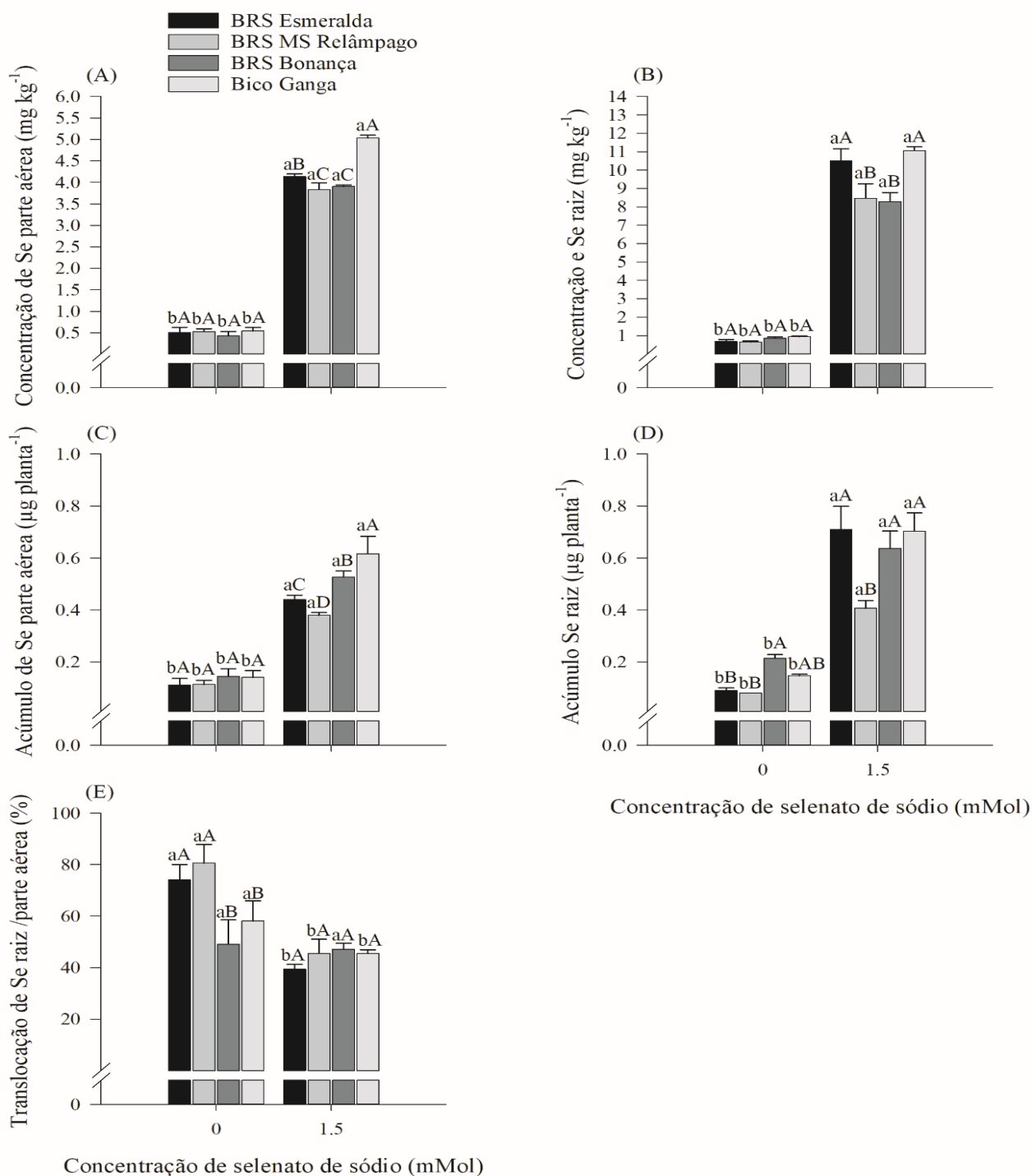
A concentração total de açúcar também aumentou nas plantas tratadas com Se em 356%, 895%, 1448% e 772% para BRS Esmeralda, BRSMG Relâmpago, BRS Bonança e Bico Ganga, respectivamente (Figura 6B).

Figura 4 - Efeito do selenato de sódio no metabolismo antioxidante, concentração de malondialdeído (A), concentração de peróxido de hidrogênio (B), atividade da superóxido dismutase (C), atividade da catalase (D), atividade da ascorbato peroxidase (E) e concentração da proteína total (F) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Fonte: Do próprio autor (2020).

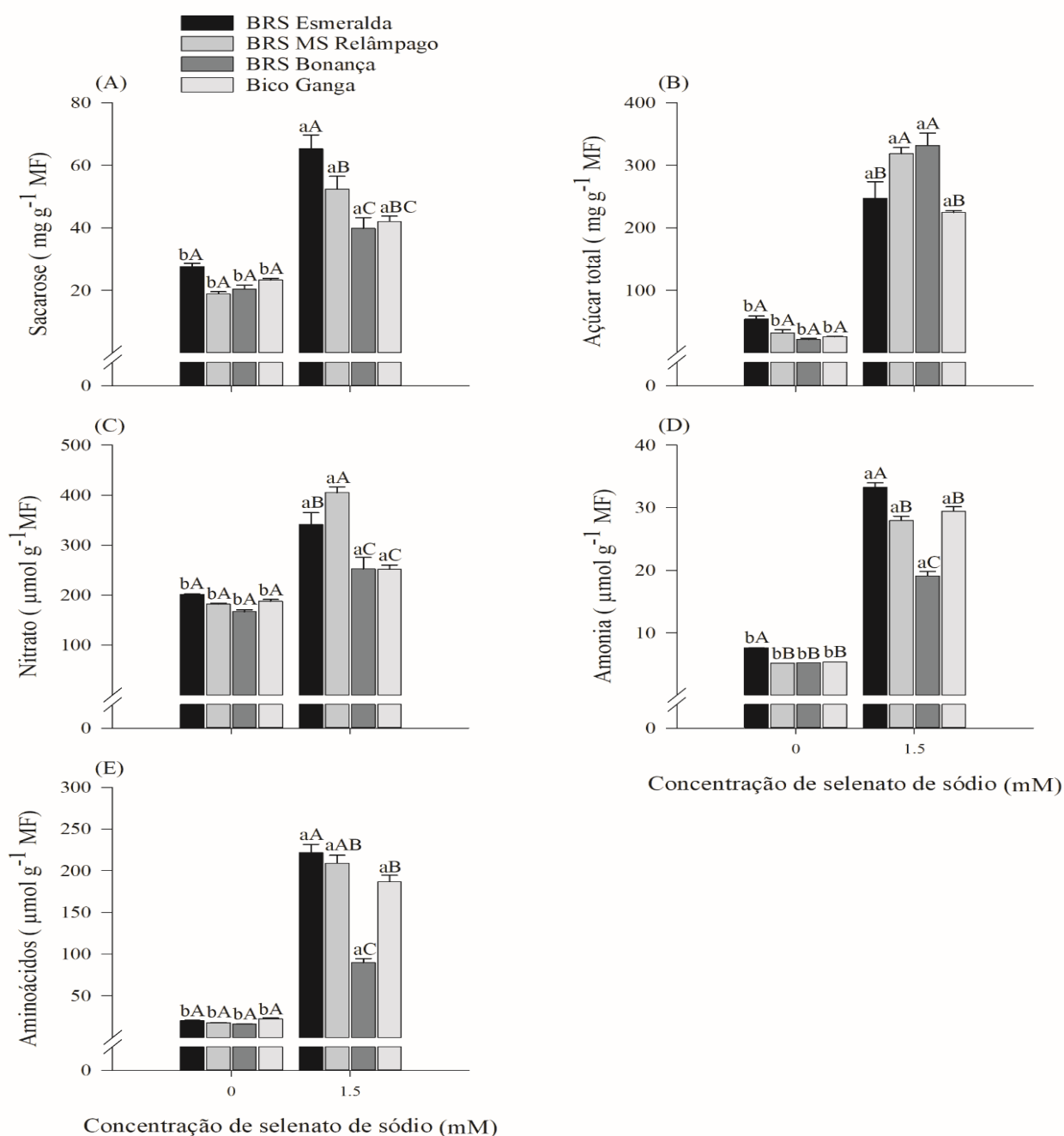
Figura 5 - Efeitos do selenato de sódio na concentração de Se na parte aérea (A), concentração de Se na raiz (B), acúmulo de Se na parte aérea (C), acúmulo de Se na raiz (D) e translocação de Se da raiz para a parte aérea (E) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Compostos de nitrogênio, como nitrato, amônia e aminoácidos aumentaram em resposta à fertilização com Se (Figura 6C-E). A concentração de Ca, Mg e K na parte aérea e raiz reduziu com o tratamento com Se em todos os cultivares. (Material complementar 1 A-F).

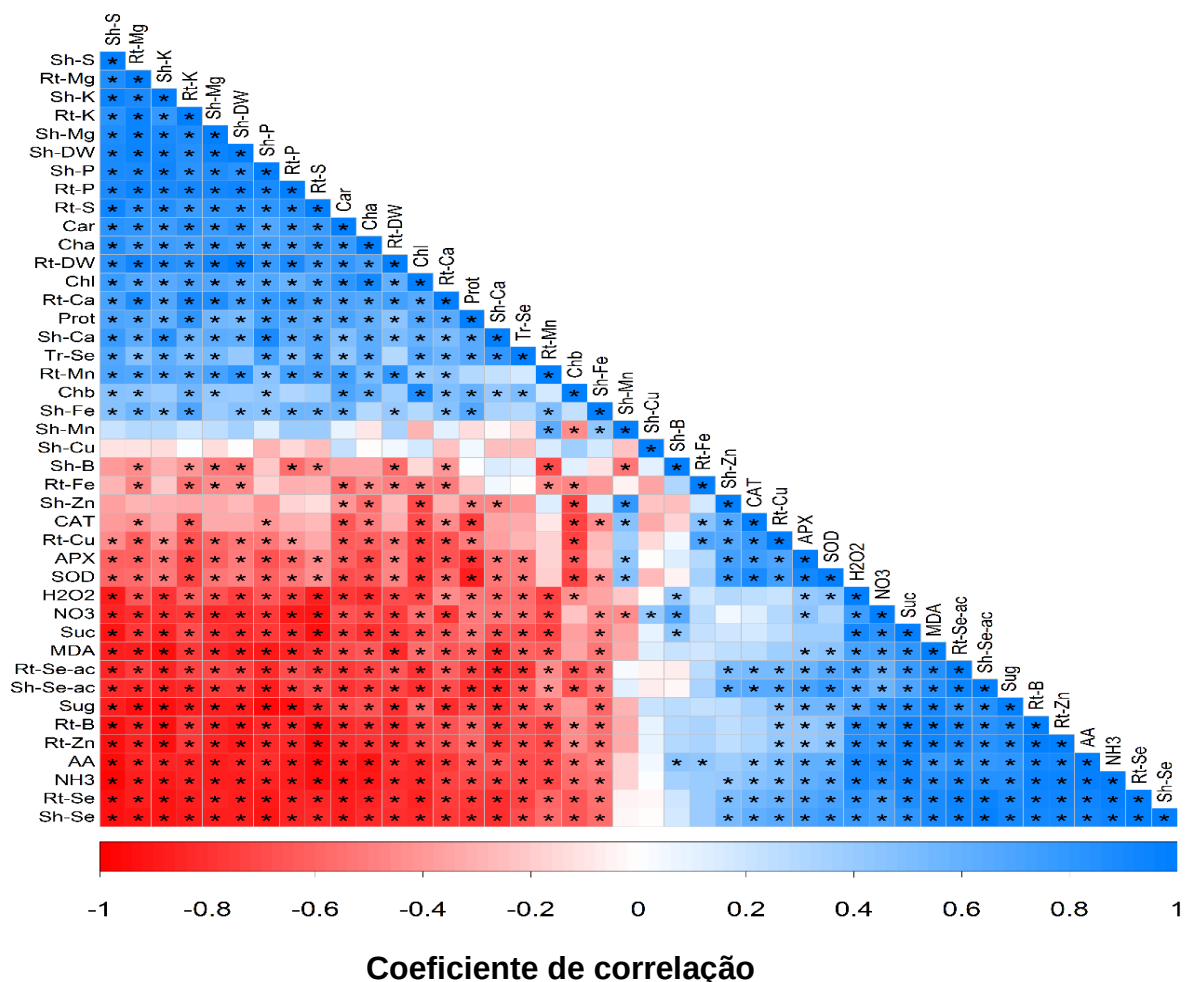
Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 6 - Efeitos do selenato de sódio sobre a concentração de sacarose (A), concentração de açúcares totais (B), concentração de nitrato (C), concentração de amônia (D) e concentração de aminoácidos (E) em folhas de cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 7- Heatmap das correlações de Pearson entre os parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados na parte aérea e na raiz de cultivares de arroz expostos a condições de estresse de Se. * indica relação significativa ($p < 0,05$). Abreviações: clorofila a (Cha), clorofila b (Chb), clorofila total (Chl), carotenóides (Car), massa seca da parte aérea (Sh-DW), massa seca da raiz (Rt-DW), sacarose (Suc), açúcar total (Sug), nitrato (NO_3), amônia (NH_3), aminoácidos (AA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), atividade da ascorbato peroxidase (APX), proteína total (Prot), concentração de Mn na parte aérea (Sh-Mn), concentração de Mn na raiz (Rt-Mn), concentração de Ca na parte aérea (Sh-Ca), concentração de Ca na raiz (Rt-Ca), concentração de Mg na parte aérea (Sh-Mg), concentração de Mg na raiz (Rt-Mg), concentração de K na parte aérea (Sh-K), concentração de K na raiz (Rt-K), concentração de P na parte aérea (Sh-P), concentração de P na raiz (Rt-P), concentração de S na parte aérea (Sh-S), concentração de S na raiz (Rt-S), concentração de B na parte aérea (Sh-B), concentração de B na raiz (Rt-B), concentração de Cu na parte aérea (Sh-Cu), concentração de Cu na raiz (Rt-Cu), concentração de Fe na parte aérea (Sh-Fe), concentração de Fe na raiz (Rt-Fe), concentração de Zn na parte aérea (Sh-Zn), concentração de Zn na raiz (Rt-Zn), concentração de Se na parte aérea (Sh-Se), concentração de Se na raiz (Rt-Se), acúmulo de Se na parte aérea (Sh-Se-ac), acúmulo de Se na raiz (Rt-Se-ac), translocação do Se Raiz/parte aérea (Tr-Se).



Fonte: Do próprio autor (2020).

Em comparação com as plantas não tratadas, o tratamento com Se diminuiu a concentração de Ca na parte aérea e na raiz em 40% e 48% no genótipo BRSMG Relâmpago tratado com Se. BRS Bonança apresentou redução de 52% e 114% na concentração de Mg na parte aérea e na raiz, respectivamente. Houve diminuição da concentração de K em todos os cultivares tratados com Se. A concentração de K as

raízes do genótipo Bico Ganga tratadas com Se diminuiu em 88%. Observou-se redução de P e S na parte aérea e raiz de todos os cultivares de arroz tratados com Se (Documento suplementar 2). A absorção de Se em alta concentração causou um efeito antagônico na concentração de S na parte aérea e na raiz das plantas de arroz.

2.5 DISCUSSÃO

O selenato de sódio na concentração de $1,5 \text{ mM L}^{-1}$ afetou negativamente a fisiologia das mudas de arroz, resultando em danos aos pigmentos fotossintéticos, diminuição da biomassa vegetal (Figura 1) e aumento do estresse oxidativo causando toxicidade foliar caracterizada por clorose e necrose (Figura 2). A diminuição da biomassa da parte aérea ou da raiz das plantas de arroz está possivelmente associada aos danos causados pelo excesso de Se em processos bioquímicos, como clorofila e biossíntese de proteínas (REIS *et al.*, 2020). Uma diminuição drástica das concentrações de clorofila a, b, clorofila total e carotenóide foi observada em plantas tratadas com Se (Figura 3). A correlação positiva entre a massa seca da parte aérea e da raiz com os pigmentos fotossintéticos (Figura 7) indica a contribuição desses pigmentos no acúmulo de biomassa da parte aérea e da raiz.

A diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos (Figura 3) está fortemente correlacionada com a clorose (Figura 2) observada principalmente para BRS Esmeralda e Bico Ganga. A alta concentração de Se nas folhas pode promover a degradação da clorofila e aumentar o estresse oxidativo (AKBULUT; ÇAKIR, 2010; SILVA *et al.*, 2018). Os sintomas tóxicos fisiológicos do estresse causado pelo Se nas plantas incluem redução da biomassa e eficiência fotossintética, clorose e morte da planta (VAN HOEWYK, 2013). Os carotenóides são pigmentos fotossintéticos capazes de mitigar as EROs, atuando como um protetor contra a degradação da membrana celular causada pelas EROs. A diminuição da concentração de carotenóides induzida pelo Se contribui para a oxidação da clorofila resultando em baixa eficiência fotossintética (MOSTOFA *et al.*, 2017).

O crescimento da planta e a produção de biomassa dependem da taxa fotossintética que impulsiona a biossíntese de carboidratos e proteínas da planta (MOSTOFA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018). Plantas tratadas com Se apresentaram clorose, aumento do estresse oxidativo monitorado pelo aumento de MDA e H_2O_2 , resultando na degradação da proteína solúvel (Figura 4A e B-F).

Para detectar estresse oxidativo em plantas, MDA e H_2O_2 são considerados bons biomarcadores monitorando as EROs (SILVA *et al.*, 2018). O aumento do estresse oxidativo foi observado em todos os cultivares de arroz tratados com Se, mostrando a degradação da membrana resultante das altas concentrações de MDA e H_2O_2 (Figura 4A-B). O peróxido de hidrogênio é uma molécula reativa com meia-vida relativamente longa (1 ms), apresentando capacidade de atravessar as membranas celulares e migrar em compartimentos de diferentes tecidos (GRATÃO *et al.*, 2005). Assim, o dano causado pelo H_2O_2 se espalha nas células vegetais agindo como um mensageiro do estresse ambiental. Além disso, o H_2O_2 participa de reações formadoras do radical hidroxila ($OH^\cdot$), um oxidante altamente reativo da família EROs, prejudicando o funcionamento fisiológico de plantas superiores (SILVA *et al.*, 2018).

O selênio nas plantas pode atuar como eliminador de EROs em baixa concentração, aumentando o metabolismo antioxidante ou aumentando o estresse oxidativo em altas concentrações (SILVA *et al.*, 2018). As plantas desenvolveram um sistema antioxidante para equilibrar as EROs causadas pelo acúmulo excessivo de Se, modulado por SOD, CAT, APX, glutathione redutase (GR) e glutathione reduzida (GSH).

Atividades mais altas de SOD e CAT foram observadas para plantas de arroz tratadas com Se (Figura 4C-D). A catalase é encontrada principalmente em peroxissomos e converte H_2O_2 em água. SOD dismuta oxigênio singlete em H_2O_2 e a CAT é uma enzima que acelera a quebra de H_2O_2 em H_2O e gás oxigênio devido à alta afinidade com este substrato. No entanto, a afinidade da CAT com H_2O_2 é mais fraca em comparação com outras enzimas antioxidantes. Isso explica a alta correlação positiva entre CAT e SOD observada em nosso estudo (Figura 7). De acordo com Silva *et al.* (2018), as enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX mostraram capacidade de reduzir as EROs ao transformar oxigênio singlete em H_2O_2 por meio da SOD e, posteriormente, a transformação de H_2O_2 é transformada em H_2O e catalizada por atividades da CAT e APX ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$).

As plantas de arroz tratadas com Se também apresentaram aumento na atividade de APX, exceto para BRS Esmeralda e BRS Bonança (Figura 4 E). O ascorbato peroxidase é uma enzima que utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir H_2O_2 em H_2O apresentando alta atividade em plantas tratadas com Se (REIS *et al.*, 2017). Neste estudo, a atividade APX foi mais de 100 vezes maior do que a CAT em todos os cultivares testados em resposta ao fornecimento de Se,

mostrando uma forte correlação com H_2O_2 (Figura 7). A aplicação de selênio diminuiu a concentração de proteína solúvel em plantas de arroz (Figura 4 F). Nas plantas, o Se inorgânico pode ser assimilado em selenocisteína e selenometionina, substituindo a cisteína e a metionina (aminoácidos contendo S) em proteínas. Selenocisteína e selenometionina são ambos selenoaminoácidos que podem ser incorporados incorretamente em proteínas, aumentando as EROs, causando toxicidade em plantas devido ao excesso de Se (VAN HOEWYK, 2013). Esse resultado sugere que o Se pode substituir o S em cisteína e metionina durante a formação de proteínas, resultando na ruptura de estruturas protéicas (VAN HOEWYK, 2013).

A concentração de Se na parte aérea e na raiz aumentou drasticamente em plantas tratadas com Se (Figura 5A-B). A aplicação de $1,5 \text{ mM L}^{-1}$ de selenato de sódio foi eficaz para caracterizar os sintomas de toxicidade em mudas de arroz. A alta concentração de Se nas células vegetais altera a biossíntese de proteínas, interfere na cadeia transportadoras de elétrons e prejudica o estado redox de enzimas em cloroplastos, diminuindo a atividade da fotossíntese (VAN HOEWYK, 2013) e a biomassa de plantas superiores (SILVA *et al.*, 2018).

O selênio aumentou a concentração de sacarose e açúcares totais em todos os cultivares testados (Figura 6A-B). O metabolismo do açúcar pode ser afetado pelo Se para mitigar o estresse oxidativo e aumentar as enzimas do metabolismo de carboidratos (SILVA *et al.*, 2018). A sacarose é o principal produto da fotossíntese que impulsiona o crescimento da planta, sinalização e aclimação ao estresse ambiental (MOSTOFA *et al.*, 2017). A expressão gênica que codifica a sacarose e as enzimas envolvidas no metabolismo do açúcar estão altamente associadas às respostas ao estresse ambiental (KEUNEN *et al.*, 2013). Os açúcares solúveis são um indicador biomarcador de EROs. Estes podem estar envolvidos na via oxidativa da pentose fosfato, mitigando a formação de EROs em células vegetais (BOLOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2010).

O excesso de produção de açúcar pode resultar em concentrações elevadas de H_2O_2 citosólico (KEUNEN *et al.*, 2013). Neste estudo foi observada uma correlação positiva entre H_2O_2 e açúcar total (Figura 7). Enquanto a disponibilidade de açúcares também determina a redução da produção de energia que contribui para a eliminação de EROs em cloroplastos e H_2O_2 (BOLOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2010). A primeira reação comprometida nessa via é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. A atividade desta enzima pode ser crucial na regulação da capacidade de

desintoxicação redox e EROs em cloroplastos (KEUNEN *et al.*, 2013). Além disso, açúcares ausentes ou em excesso podem prejudicar o metabolismo respiratório, aumentando assim a produção de EROs (SILVA *et al.*, 2018), o que também pode aumentar a produção de H_2O_2 , desnaturação de proteínas e oxidação de pigmentos fotossintéticos, conforme observado neste estudo.

Compostos de nitrogênio, como nitrato, amônia e aminoácidos aumentaram em resposta ao fornecimento de Se (Figura 6C e D-E). Plantas sob estresse abiótico podem induzir a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), principalmente óxido nítrico (NO), que é considerado um protetor com capacidade de induzir a expressão gênica envolvida na defesa da planta (REIS *et al.*, 2015). Segundo Gupta e Gupta (2017) as vias redutoras e oxidativas, assim como os diferentes compartimentos subcelulares estão envolvidos na produção de NO, porém na via redutora o nitrito é utilizado como substrato, que é gerado pela nitrato redutase.

Existem poucos estudos sobre os efeitos do Se no metabolismo do N (REIS *et al.*, 2019). Nowak *et al.* (2004) demonstraram que altas concentrações de Se no solo diminuem as atividades da nitrato redutase e nitrito redutase. Neste estudo, o excesso de Se pode afetar as enzimas do metabolismo do N, causando o acúmulo de nitrato, amônia e aminoácidos nas plantas de arroz. O aumento dos compostos do metabolismo primário ocorre em resposta ao efeito deletério causado pelo excesso de Se. Esta é uma estratégia fisiológica para mitigar os efeitos deletérios causados pelo excesso de Se nas plantas (SILVA *et al.*, 2018).

2.6 CONCLUSÕES

O excesso de Se promoveu clorose em plantas de arroz nas cultivares BRS Esmeralda e Bico Ganga em decorrência da degradação dos pigmentos fotossintéticos e das proteínas solúveis afetando o crescimento da planta. As plantas tratadas com Se aumentaram a sacarose foliar, os açúcares totais, o nitrato, a amônia e a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e APX. O acúmulo de açúcar associado ao metabolismo antioxidante é um biomarcador eficiente para o diagnóstico da toxicidade do Se em plantas de arroz.

A translocação de selênio da raiz para a parte aérea diminuiu sob condição de excesso de Se. A identificação dos mecanismos envolvidos na modulação da absorção e transporte de Se em plantas de arroz deve ser entendida para a produção agrícola em áreas contaminadas com Se. Os resultados obtidos neste estudo facilitam o entendimento dos atributos fisiológicos, bioquímicos e fenotípicos que devem ser levados em consideração para o sucesso no cultivo sustentável de arroz em ambientes com alta concentração de Se.

REFERÊNCIAS

- AKBULUT, M.; ÇAKIR, S. The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 1, p. 160-166, 2010.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1337-1344, 2001.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, n. 4, p. 278-293, 1966.
- BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; LE ROY, K.; XIANG, L.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **Federation of European Biochemical Societies**, Oxford, v. 277, n. 3, p. 2022-2037, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Athens, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- DENG, X.; LIU, K.; LI, M.; ZHANG, W.; ZHAO, X.; ZHAO, Z.; LIU, X. Difference of selenium uptake and distribution in the plant and selenium form in the grains of rice with foliar spray of selenite or selenate at different stages. **Field Crops Research**, Oxford, v. 211, n. 3, p. 165-171, 2017.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signalling**, Larchmont, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.
- GUPTA, M.; GUPTA, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.125, n. 2, p. 189–198, 1968.

- JOHNSON, C. M.; STOUT, P. R.; BROYER, T. C.; CARLTON, A. B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 337-353, 1957.
- KEUNEN, E.; PESHEV, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN, D. E. W.; CUYPERS, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.
- KOLBERT, Z.; LEHOTAI, N.; MOLNÁR, Á.; FEIGL, G. "The roots" of selenium toxicity: a new concept. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 11, n. 10, p. E1241935, 2016.
- KROHN, R. M.; LEMAIRE, M.; SILVA, L. F. N.; LEMARIÉ, C.; BOLT, A.; MANN, K. K.; SMITS, J. E. High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 27, n. 1, p. 9-15, 2016.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, n. 2, p. 350-382, 1987.
- MANZANARES, W.; HARDY, G. Can dietary selenium intake increase the risk of toxicity in healthy children? **Nutrition**, Tarrytown, v. 32, n. 1, p. 149-150, 2016.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.
- MOSTOFA, M. G.; HOSSAIN, M. A.; SIDDIQUI, M. N.; FUJITA, M.; TRAN, L. S. P. Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 178, n. 1, p. 212-223, 2017.
- NOWAK, J.; KAKLEWSKI, K.; LIGOCKI, M. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 10, p. 1553-1558, 2004.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 set. 2020.
- REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GRATÃO, P. L.; CAPALDI, F. R.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism in coffee (*Coffea arabica* L.) plants in response to nitrogen supply. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Berna, v. 27, n. 1, p. 203-213, 2015.
- REIS, A. R.; EL-RAMADY, H.; SANTOS, E. F.; GRATÃO, P. L.; SCHOMBURG, L.; 2017. Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. In: **Selenium in Plants**. Berna: Springer, 2017. p. 209-230.
- REIS, H. P. G.; BARCELOS, J. P. Q.; SILVA, V. M.; SANTOS, E. F.; TAVANTI, R. F. R.; PUTTI, F. F.; YOUNG, S. D.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; REIS, A. R. Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland

rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 100, n. 1, p. 1990-1997, 2019.

REIS, A. R.; BOLETA, E. H. M.; ALVEZ, C. Z.; COTRIM, M. F.; BARBOSA, J. Z.; SILVA, V. M.; PORTO, R. L.; LANZA, M. G. D. B.; LAVRES, J.; GOMES, M. H. F.; CARVALHO, H. W.; 2020. Selenium toxicity in upland field-grown rice: seed physiology responses and nutrient distribution using the μ -XFR technique. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 190, n. 1, p. 110147, 2020.

SCHIAVON, M.; LIMA, L. W.; JIANG, Y.; HAWKESFORD, M. J. Effects of selenium on plant metabolism and implications for crops and consumers. In: PILON-SMITS, E. A. H.; WINKEL, L. H. E.; LIN, Z. Q. **Selenium in plants**. Cham: Springer, 2017. p. 257-275.

SILVA, V. M.; BOLETA, E. H. M.; LANZA, M. G. D. B.; LAVRES, J.; MARTINS, J. T.; SANTOS, E. F.; SANTOS, F. L. M.; PUTTI, F. F.; FURLANI JUNIOR, E.; WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R.; CARVALHO, H. W. P.; REIS, A. R. Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, London, v. 150, n. 2, p. 172-182, 2018.

VAN HANDEL, E. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.19, n. 1, p. 193-194, 1967.

VAN HOEWYK, D. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.112, n. 6, p. 965-972, 2013.

VINCETI, M.; BURLINGAME, B.; FILIPPINI, T.; NASKA, A.; BARGELLINI, A.; BORELLA, P. The epidemiology of selenium and human health. In: HATFIELD, D. L.; SCHWEIZER, U.; TSUJI, P. A.; GLADYSHEV, V. N. **Selenium: its molecular biology and role in human health**. Berna: Springer, 2016. p. 365–376.

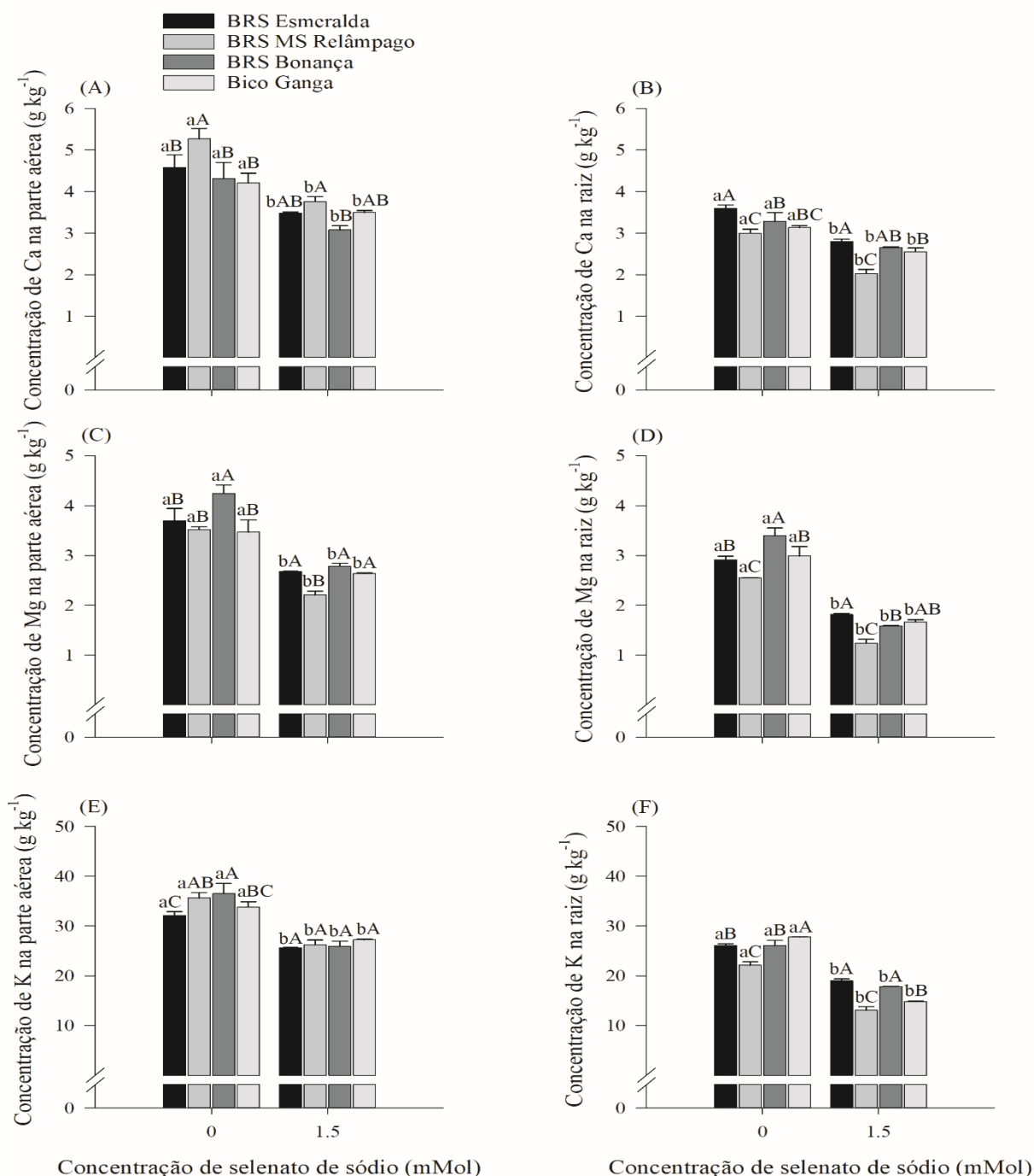
WHITE, P. J. Selenium metabolism in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1862, n. 11, p. 2333-2342, 2018.

WINKEL, L. H. E.; VRIENS, B.; JONES, G. D.; SCHNEIDER, L. S.; PILON-SMITS, E.; BANUELOS, G. S. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: a critical review. **Nutrients**, Basel, v.7, n. 2, p. 4199-4239, 2015.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

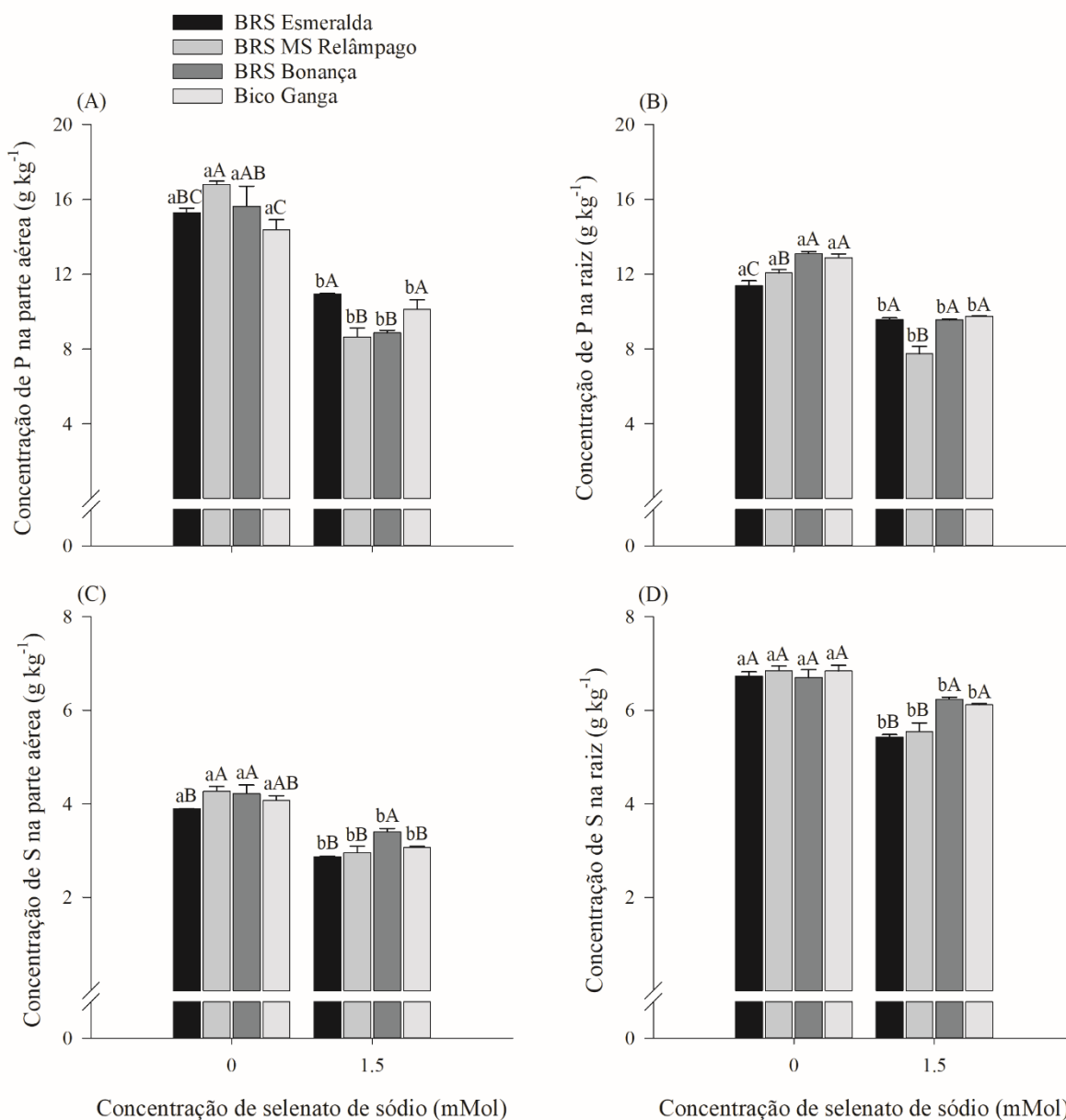
DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Documento suplementar 1 - Efeitos do selenato de sódio na concentração de Ca na parte aérea (A), concentração de Ca na raiz (B), concentração de Mg na parte aérea (C), concentração de Mg na raiz (D), concentração de K na parte aérea (E) e concentração de K na raiz (F) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



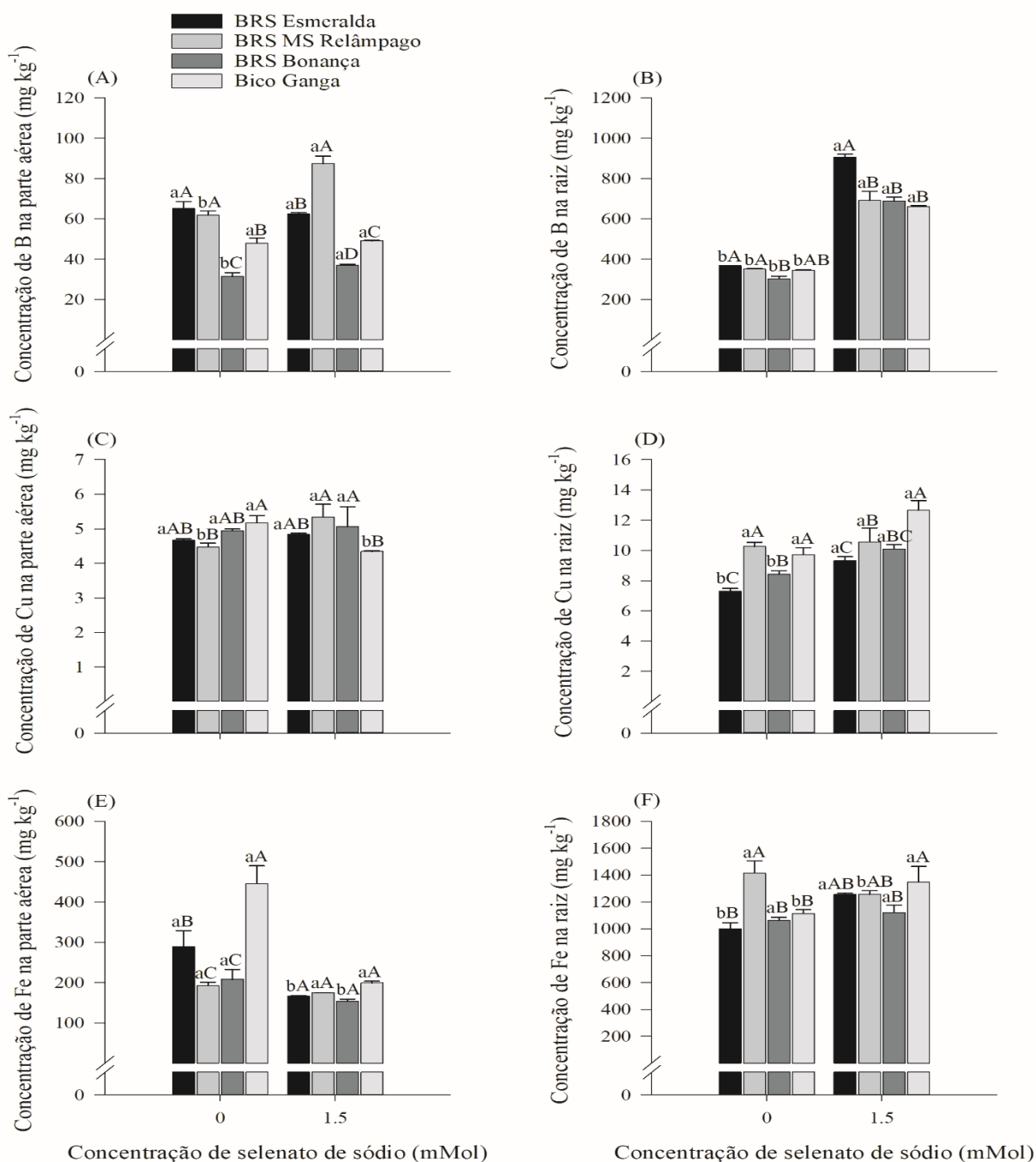
Fonte: Do próprio autor (2020).

Documento suplementar 2- Efeitos do selenato de sódio na concentração de P na parte aérea (A), concentração de P na raiz (B), concentração de S na parte aérea (C) e concentração de S na raiz (D) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



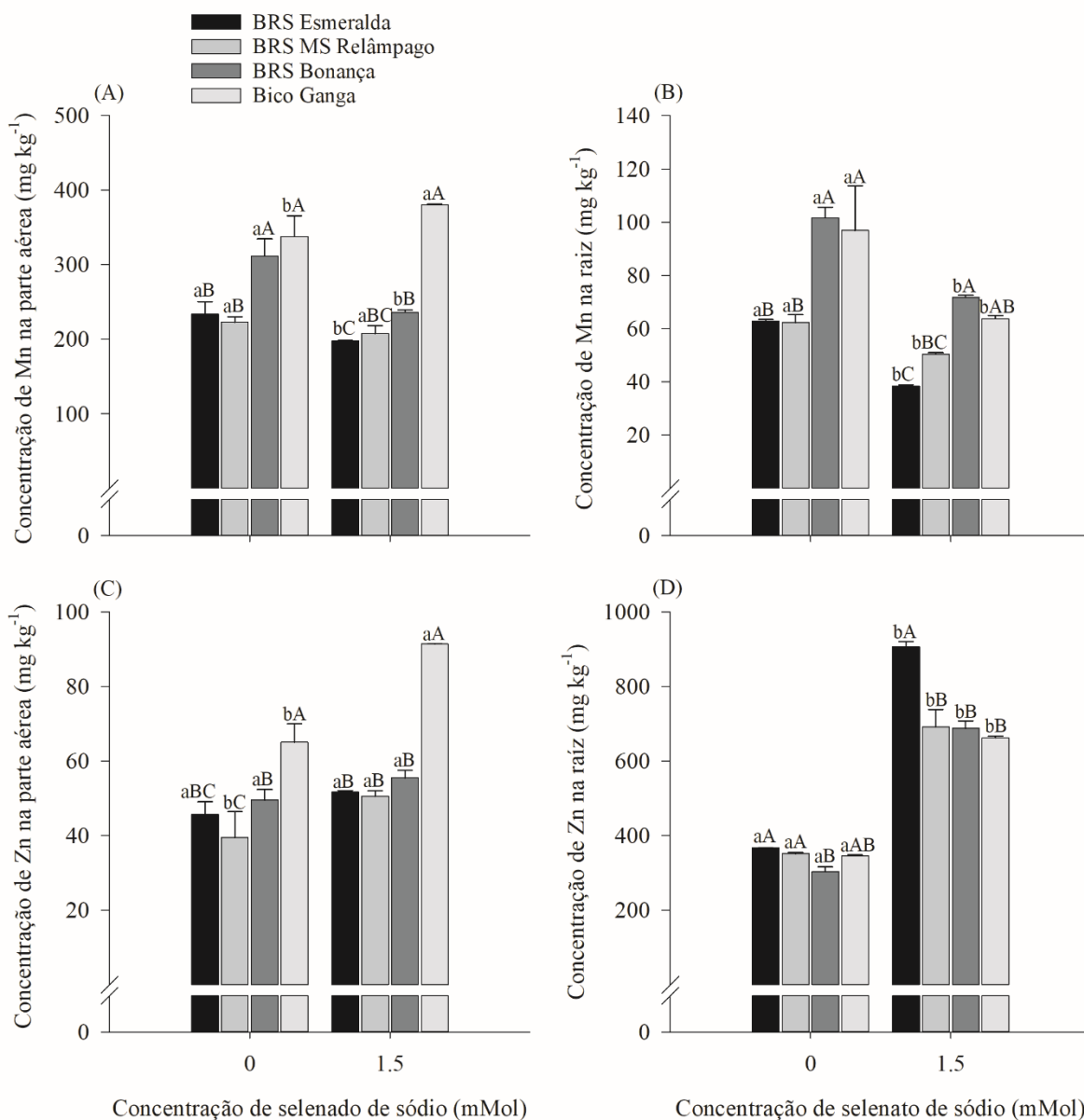
Fonte: Do próprio autor (2020).

Documento suplementar 3 - Efeitos do selenato de sódio na concentração de B na parte aérea (A), concentração de B na raiz (B), concentração de Cu na parte aérea (C), concentração de Cu na raiz (D), concentração de Fe na parte aérea (E) e concentração de Fe na raiz (F) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Documento suplementar 4- Efeitos do selenato de sódio na concentração de Mn na parte aérea (A), concentração de Mn na raiz (B), concentração de Zn na parte aérea (C) e concentração de Zn na raiz (D) em cultivares de arroz. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas correspondem à concentração de selenato de sódio na solução nutritiva e as letras maiúsculas correspondem aos cultivares de arroz.



Fonte: Do próprio autor (2020).

3 BIOFORTIFICAÇÃO DO ARROZ COM SELÊNIO E ZINCO: UMA ABORDAGEM FISIOLÓGICA PARA ENTENDER O ACÚMULO DE MINERAIS EM GRÃOS

3.1 RESUMO

A biofortificação agronômica é uma técnica que consiste em aumentar a concentração de nutrientes em produtos agrícolas comestíveis pela fertilização com elementos considerados essenciais para os seres humanos. O aumento da concentração de nutrientes essenciais para a saúde humana em arroz pode combater a desnutrição e fome oculta devido a cultura ser a base alimentar de grande parte da população global. O presente estudo teve como objetivo entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na eficiência da biofortificação agronômica em plantas de arroz por meio da aplicação foliar separada de selênio (Se) e zinco (Zn) em condições a campo. O impacto da biofortificação dupla com Se e Zn na concentração de macro e micronutrientes, enzimas antioxidantes, pigmentos fotossintetizantes e na concentração de Zn e Se nos grãos de arroz foram avaliados. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4x4, sendo constituído por quatro doses de Se (0, 5, 10 e 20 g ha⁻¹) utilizando como fonte selenato de sódio aplicadas aos 67 dias após a emergência (DAE) e quatro doses de Zn (0, 500, 1000 e 1500 g ha⁻¹) utilizando a fonte sulfato de zinco, aplicadas aos 86 DAE contendo quatro repetições por tratamento. A adubação com 20 g ha⁻¹ de Se associado a 500 até 100 g ha⁻¹ de Zn promoveu aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, as quais resultaram na redução da concentração de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica. Além disso, a biofortificação dupla com 5 g ha⁻¹ de Se e 1500 g ha⁻¹ de Zn aumentou a concentração de pigmentos fotossintetizantes que resultaram no aumento da sacarose e açúcar total. A aplicação foliar de 20 g ha⁻¹ de Se promoveu aumento de 251% na concentração de Se nas folhas. A fertilização de 20 g ha⁻¹ de Se e 1000 g ha⁻¹ de Zn, aumentou a concentração de Se nos grãos de arroz em 834%. O fornecimento de 1500 g ha⁻¹ de Zn de forma isolada aumentou em 2.755% a concentração de Zn nas folhas. Seguindo os critérios de recomendação de ingestão diária de arroz necessária para humanos, a biofortificação agronômica com a aplicação de 5 g ha⁻¹ de Se associada a aplicação de 1500 g ha⁻¹ de Zn pode fornecer via grãos de arroz 180% de Se e 68% de Zn acima da quantidade mínima necessária dietética. Esses valores detectados nos grãos de

arroz são de 153,82 mg de Se e 18,53 mg de Zn estão dentro das faixas adequadas para nutrição humana. Essa pesquisa comprova que a biofortificação dupla com Se e Zn melhora o sistema antioxidante, aumenta a concentração de pigmentos fotossintetizantes e de açúcares em platas de arroz. Além disso, o presente estudo mostra que a biofortificação agrônômica do arroz com Se e Zn é uma técnica eficiente para aumentar a concentração desses elementos, visando suprir as exigências dietéticas para a nutrição humana.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; Selenato de sódio; Nutrição humana; Enriquecimento de grãos; Saúde humana.

3.2 INTRODUÇÃO

O acúmulo de selênio (Se) e zinco (Zn) nas culturas é dependente da disponibilidade desses elementos químicos no solo (MOREIRA *et al.*, 2018; MONTANHA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020). Diversos estudos demonstram que a disponibilidade de Se e Zn não está relacionada somente com o conteúdo total desses elementos no solo, mas também com a influência das propriedades físico-químicas do solo (TOLU *et al.*, 2014; SOLTANI *et al.*, 2015; ANTONIADIS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). A concentração de Se no solo pode variar entre 0,01 a 2 mg kg⁻¹, sendo que a média mundial é de 0,4 mg kg⁻¹, enquanto que em solos seleníferos, a concentração pode variar de 1 a 5000 mg kg⁻¹. Solos altamente intemperizados como os solos de regiões tropicais, apresentam concentração baixa de Se que varia de 0 a 2,14 mg kg⁻¹ (GABOS *et al.*, 2014). A disponibilidade de Se no solo geralmente aumenta até um determinado ponto com o aumento do pH, entretanto a faixa de pH do solo com maior disponibilidade de Se é de 5,0 a 6,0 (XU *et al.*, 2018).

A deficiência nutricional é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, afetando mais de 50% da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento (MANGUEZE *et al.*, 2018). Selênio e Zn são nutrientes minerais indispensáveis para os animais e o homem, sendo obtido para humanos por meio de fontes dietéticas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011). As estatísticas apontam que 15% a 30% da população mundial, não ingerem quantidades adequadas de Se e Zn, que é de 55 µg dia⁻¹ para Se e 11 a 16 mg dia⁻¹ para Zn (WHITE; BROADLEY, 2011; MORENO *et al.*, 2013). Segundo Chattha *et al.* (2017), a deficiência de Zn é um problema nutricional que acomete todo o globo, causando enfermidades, como: nanismo, diarreia e pneumonia em crianças. Além disso, a deficiência de Zn pode acarretar no aumento da mortalidade infantil (WHITE; BROADLEY, 2011).

O Se tem um dos intervalos mais estreitos entre a sua deficiência dietética (<40 µg dia⁻¹) e a dose tóxica dietética para os seres humanos (> 400 µg dia⁻¹). A ingestão deficiente de Se, pode acometer o sistema imunológico, responsável pela defesa do organismo, sendo associada com o surgimento de vários tipos de câncer, cardiopatias e demências (FORDYCE, 2013). Tendo em vista que o Se alimentar provém basicamente de alimentos, a deficiência de Se em humanos, está relacionada

com o consumo de alimentos contendo baixo teor de Se nas partes comestíveis (REIS *et al.*, 2017).

A biofortificação agronômica é uma prática eficiente, confiável e sustentável para aumentar a concentração e a biodisponibilidade de Se e Zn nas partes comestíveis das plantas (LANZA *et al.*, 2021). A biofortificação agronômica é voltada principalmente para culturas básicas (arroz, trigo, milho, sorgo, milheto, batata doce e leguminosas) por serem alimentos presentes na dieta alimentar de todo o mundo, em especial, os grupos de pessoas mais vulneráveis socialmente (SALTZMAN *et al.*, 2013). O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento básico em aproximadamente 33 países e fornece cerca de 80% da ingestão calórica diária de 3 bilhões de pessoas e faz parte de 50% da dieta da população mundial, principalmente dos países asiáticos (GOUVEIA *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2020). Naturalmente, são encontradas baixas concentrações de Se e Zn em grãos de arroz, integral ou polido, sendo que esses valores são ainda menores quando as plantas se desenvolvem em solos com baixa biodisponibilidade desses minerais (REIS *et al.*, 2019). Portanto, o fornecimento de fertilizantes contendo Se e Zn para as plantas, em quantidades consideradas adequadas para a alimentação humana, torna-se uma estratégia interessante para o aumento da ingestão desses nutrientes pela população global (CAKMAK, 2008; MANGUEZE *et al.*, 2018; WALTER *et al.*, 2008;).

Mangueze *et al.* (2018) após realizar aplicação foliar simultânea de Se (100 g ha⁻¹) e Zn (600 g ha⁻¹), em plantas de arroz, verificou o aumento na concentração desses minerais nos grãos, em torno de 100% e 42%, respectivamente. DAI *et al.* (2020) ao aplicar via homogeneização em solo 1,5 mg kg⁻¹ de Se + 15 mg kg⁻¹ de Zn, verificou aumento de 300% na concentração de Se e 350% na concentração de Zn, nos grãos de soja. Embora haja vários trabalhos relatando o aumento da concentração de Se ou de Zn nos grãos de arroz, são escassas informações sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na biofortificação conjunta com Se e Zn.

Portanto, esse estudo teve como objetivo entender os mecanismos fisiológicos envolvidos na eficiência da biofortificação agronômica em plantas de arroz por meio da aplicação foliar de Se e Zn e suas doses em condições a campo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

O experimento foi realizado na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual Paulista – UNESP, localizada no município de Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°20'43" S, 51° 24'7" W; altitude de 355m). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região Aw, tropical úmido, com verões chuvosos e invernos secos (SILVA *et al.*, 2018). A pluviosidade média anual é 1.232 mm e a temperatura média é de 24,5°C. As temperaturas mínimas, médias e máximas e precipitações diárias registradas durante o experimento, podem ser encontradas no Documento suplementar 1.

De acordo com Demattê (1980), o solo no local do experimento é classificado como Latossolo Vermelho Típico e distrófico argiloso. Os atributos químicos do solo na camada de 0-20 cm foram determinadas de acordo com Raij *et al.* (1997), sendo as seguintes: pH (CaCl₂ 0,01M) 5,0; fósforo (extração de resina) 23 mg dm⁻³; enxofre (extrator de fosfato de cálcio) 6 mg dm⁻³; potássio (extração de resina) 2,3 mmol_c dm⁻³; cálcio (extração por resina) 20 mmol_c dm⁻³; magnésio (extração por resina) 17mmol_c dm⁻³; H + Al (pH-SMP) 34 mmol_c dm⁻³; capacidade de troca catiônica de 73,3 mmol_c dm⁻³; saturação de base de 54%; boro (extração com água quente) 0,20 mg dm⁻³; cobre (extração de DTPA) 3,5 mg dm⁻³; ferro (extração de DTPA) 29 mg dm⁻³; manganês (extração de DTPA) 14,2 mg dm⁻³; zinco (extração de DTPA) 0,6 mg dm⁻³; Se total 42 µg kg⁻¹, matéria orgânica 20 g dm⁻³.

O local experimental foi preparado por dessecação dos resíduos remanescentes da cultura, utilizando glifosato (2 L ha⁻¹), seguido de aração e gradagem. A semeadura ocorreu em 24 de fevereiro de 2018, com uma densidade de 70 kg de sementes ha⁻¹. Antes da semeadura, as sementes de arroz (*Oryza sativa* (L.)) variedade BRS Esmeralda, foram tratadas com piraclostrobina (25 g L⁻¹ de produto comercial), tiofanato de metila (225 g L⁻¹ de produto comercial) e fipronil (250 g L⁻¹ de produto comercial) a 2 mL de produto kg⁻¹ de sementes. A adubação realizada no sulco de semeadura, consistiu em 20 kg ha⁻¹ de N, na forma de NH₄NO₃ (60 kg ha⁻¹), 40 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de KCl (66 kg ha⁻¹) e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅, na forma de superfosfato simples (140 kg ha⁻¹). Quando necessário, a irrigação era realizada por um pivô central com lâmina d'água média de 14 mm e tempo de volta de 24 horas.

A emergência das plântulas iniciou em 01 de março de 2018, cinco dias após a semeadura (DAS). Aos 35 e 50 dias após a emergência (DAE), a adubação nitrogenada com cobertura superficial foi realizada com 50 kg ha⁻¹ de N, na forma de uréia. O delineamento do experimento foi em blocos casualizados completos, em esquema fatorial (4 x 4), sendo 4 doses de Se (0, 5, 10 e 20 g ha⁻¹) combinados com 4 doses de Zn (0, 500, 1000 e 1500 g ha⁻¹), com quatro repetições para cada tratamento. Cada parcela experimental foi constituída por cinco linhas de 5 m de comprimento e espaçamento entre linhas de 0,34 m, com área total de 6,8 m². Para aplicação foliar de Se, a fonte utilizada foi o selenato de sódio e para a aplicação foliar de Zn, foi utilizada como fonte o sulfato de zinco heptahidratado. As aplicações foliar do Se foi realizada aos 67 DAE (grão leitoso) e a aplicação de Zn aos 86 DAE (grão pastoso). Cada tratamento foi diluído em água para o equivalente a uma solução de pulverização de 300 L ha⁻¹. A aplicação foliar foi realizada com um pulverizador costal, calibrado para 100 mL de solução por linha da parcela.

Para o controle das plantas daninhas, foram aplicados os seguintes compostos: 0 DAS (pendimetalina, 4 L ha⁻¹ para controle de plantas daninhas, pré-emergência); 20 DAE (metsulfurom metílico, 3,3 g ha⁻¹ de produto comercial para controle de plantas daninhas de folha larga); 40 DAE (2,4-dichlorophenoxy, 1,2 L ha⁻¹). Para controle preventivo de fungos, trifloxistrobina e tebuconazol (0,1 L ha⁻¹) foram aplicados aos 59 e 75 DAE.

3.3.2. Determinação da produtividade dos grãos

A colheita foi realizada aos 119 DAE, selecionando duas linhas homogêneas de cada parcela, das quais todas as panículas foram colhidas manualmente. Os grãos foram debulhados, secos ao ar, processados e polidos. Posteriormente, foram pesadas, obtendo-se a produtividade estimada de grãos com 13% base úmida.

3.3.3 Análise nutricional das folhas e grãos

Para a determinação da análise química nas folhas, foram coletadas aos 93 DAE, dez folhas bandeira em cada parcela. As folhas foram acomodadas em sacos de papel, colocadas em estufa de ar forçado ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) para secar sendo moídas em seguida. Para a análise química dos grãos, após a colheita, uma amostra de cada parcela do experimento contendo os grãos de arroz foram coletadas. Os grãos foram descascados e polidos, sendo posteriormente moídos. Amostras contendo 0,20 g de folhas e grãos moídos, foram digeridos e analisados por espectrometria de massa de plasma, acoplada individualmente (ICP-MS; Agilent 7500ce, Agilent Technologies®, Tóquio, Japão). As amostras foram colocadas em tubos de digestão, contendo 2 mL de HNO_3 70%, 1 mL de água mili-Q e 1 mL de H_2O_2 35%. Antes de se realizar as análises, as amostras foram diluídas em 1 parte da amostra digerida para 10 partes de água milli-Q. A digestão diluída do material vegetal, foi analisada por meio de ICP-MS de acordo com Silva *et al.* (2018). O processamento dos dados foi realizado usando o software Qtegra™ (Thermo Fisher Scientific).

3.3.4 Peróxido de hidrogênio

Foram pesados aproximadamente 400 mg do material vegetal congelado, que foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. No material macerado, foi adicionado 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em tubo falcon de 15 mL. Posteriormente o material foi homogeneizado através de agitação em vórtex e centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C . Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado na quantificação de H_2O_2 e MDA.

A quantificação de H_2O_2 foi determinada segundo Alexieva *et al.* (2001). Foi utilizada uma alíquota de 350 μL de sobrenadante, no qual foram adicionados 200 μL de tampão fosfato de potássio, pH 7,5, (100 mM) e 800 μL de solução de iodeto de potássio (1M). As amostras foram mantidas em gelo durante uma hora. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram realizadas leituras de absorbância a $\lambda = 390\text{ nm}$ em espectrofotômetro. A concentração de H_2O_2 no tecido foliar foi calculada com base numa curva padrão e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ MF}$.

3.3.5 Malondialdeído

A quantidade de malondialdeído (MDA), foi mensurado segundo metodologia de Heath e Packer (1968). Foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido 400 mg do material vegetal. No material macerado foi adicionado 4 mL de ácido de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) + polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20% em tubo falcon de 15 mL. O material foi homogeneizado em vortex e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A reação foi realizada pela adição de 350 µL do sobrenadante em 1 mL de solução de ácido tricloroacético 20% + de ácido tiobarbitúrico 0,5%. As amostras foram mantidas em banho-seco a 95 °C durante 30 minutos, posteriormente, transferidas para caixa contendo gelo por 10 minutos. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. Foram realizadas leituras das amostras em $\lambda = 535$ e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA g⁻¹ MF.

3.3.6 Análise de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

Para a determinação da superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), catalase (CAT, EC:1.11.1.6), glutathione redutase (GR, EC:1.6.4.2) e proteínas totais, foram coletadas folhas bandeira aos 74 e 93 DAE. Foram coletadas aleatoriamente dez folhas bandeira em cada parcela. O material foi congelado imediatamente após a coleta em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

A extração para análise de enzimas e proteínas, foi realizada pesando aproximadamente 1,5 g do material vegetal congelado, que foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. No material macerado foi adicionado 4 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 3 mM, e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 4% (p/v), utilizando metodologia descrita por Silva *et al.* (2018). O material foi homogeneizado em vortex e em seguida foi centrifugado em centrífuga refrigerada à 9.000 rpm por 20 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi então mantido a -80 ° C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da SOD, CAT, GR e quantificação de proteínas solúveis.

3.3.6.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Utilizou-se uma câmara de reação sob iluminação de lâmpada fluorescente de

15 W a 25 °C. Foi adicionado 10 µL da amostra em 2 mL da solução tampão fosfato de potássio pH 7,8 (50 mM L⁻¹) + 250 µL de metionina (13 mM L⁻¹), 200 µL de nitroblue tetrazólio (NBT) (75 mM L⁻¹), 200 µL de EDTA (0,1 mM L⁻¹) e 250 µL de riboflavina (2 µmol L⁻¹). As amostras foram homogeneizadas em vortex, acondicionadas na caixa, tampada e livre de qualquer luz exterior, e mantidas sob a iluminação da caixa por 25 minutos. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas novamente e submetidas a leitura de absorbância a $\lambda = 560$ nm em espectrofotômetro, os resultados foram expressos em U SOD mg⁻¹ proteína.

3.3.7. Atividade da catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada usando a metodologia de Azevedo *et al.* (1998). Em tubos Eppendorf, foram adicionados 1 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), e 2,5 uL de H₂O₂ 30%, seguido por 25 uL do extrato proteico. Imediatamente após a adição do extrato proteico, os tubos foram rapidamente homogeneizados em vórtice. A atividade enzimática foi determinada através do monitoramento da decomposição do H₂O₂, que foi realizada em intervalos de 1 minuto a 25°C em espectrofotômetro (SP-220, bioespectro TM) absorbância em $\lambda = 240$ nm. Os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg de proteína.

3.3.8. Atividade da glutathiona redutase (GR, EC: 1.6.4.2)

Para a atividade da glutathiona redutase, a determinação foi realizada de acordo com Gomes Junior *et al.* (2006). Foi utilizado 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,5 que foram misturados com 500 µL de DTNB. A mistura foi incubada em banho-maria a 30° C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de glutathiona oxidada (GSSG) a 1 mM, 100 µL de NADPH a 0,1 mM e 50 µL de extrato de proteína. A mistura foi rapidamente agitada e imediatamente analisada usando um espectrofotômetro (SP-220, bioespectro TM) a $\lambda = 412$ nm por 1 min. Os resultados foram expressos em nmoL min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.9. Proteínas solúveis

Para a quantificação de proteínas solúveis, foi utilizada a metodologia de Bradford (1976). A determinação das proteínas solúveis, foi realizada por meio da mistura de 30 μL de sobrenadante com 1 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos, foi realizada leitura de absorbância em $\lambda = 595$. A concentração de proteína foi calculada com base em uma curva padrão de BSA (soro de albumina bovina), e os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF. A concentração de proteínas solúveis foi utilizada para calcular a atividade específica da SOD, CAT e GR.

3.3.10 Análise da concentração de pigmentos fotossintéticos

Para a clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenóides, quinze folhas bandeira, foram coletadas aleatoriamente em cada parcela, aos 74 e 93 DAE. O tecido da folha foi macerado em 80% de acetona, uma alíquota de 200 μL do extrato foi coletada e adicionada a 1,8 mL de 80% de acetona. Um espectrofotômetro (SP-220, bioespectro™) foi utilizado para realizar medições nos seguintes comprimentos de onda (absorbância): 470, 647, 653, 663 e 665 nm. As concentrações de pigmento foram estimadas de acordo com Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.11 Açúcar total, sacarose e aminoácidos (folhas e grãos)

Para a análise do açúcar total, sacarose e aminoácidos, o material foi extraído de acordo com o método descrito por Bieleski e Turner (1966). Foi utilizado 1g para a extração das folhas, e 0,5g para a extração de grãos. O material vegetal foi macerado com almofariz e pilão de porcelana e pesados, seguido da adição de 10 mL de solução de MCW (60% de metanol, 25% de clorofórmio e 15% de água v/v) e colocados em tubo falcon. O material foi homogeneizado por vortex e centrifugado em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após 24 h, uma alíquota de 4 mL foi transferida para um novo tubo, o qual foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada para a separação de fases. A fase aquosa separada, foi utilizada para a realização das análises de açúcar total, sacarose e aminoácidos.

Para quantificar os açúcares totais nas folhas e grãos, foi utilizada a metodologia proposta por Dubois *et al.* (1956). Foram adicionados em um tubo de vidro, 100 µl de extrato das folhas, 500 µl de fenol 5% e 2 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi homogeneizada por vortex e, após arrefecimento até à temperatura ambiente, a absorbância a $\lambda = 490$ nm foi lida utilizando um espectrofotômetro. Os resultados expressos como mg g⁻¹ MF. Para a quantificação de açúcares totais dos grãos, foram adicionados em um tubo de vidro, 50 µl de extrato dos grãos, 500 µl de fenol 5% e 2 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi homogeneizada por vortex e, após arrefecimento até à temperatura ambiente, a absorbância a $\lambda = 490$ nm foi lida utilizando um espectrofotômetro. Os resultados expressos como mg g⁻¹ MF.

Para quantificação de sacarose, foi utilizada a metodologia proposta por Van Handel (1967). Para a quantificação de sacarose nas folhas, foi utilizado 250 µl do extrato das folhas, 500 µl de KOH a 30% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, adicionados a um tubo de vidro. A mistura foi homogeneizada por vórtex e aquecida em estufa a 100 °C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância em $\lambda = 490$ nm foi lida usando um espectrofotômetro. Para a quantificação de sacarose nos grãos, foi utilizado 450 µl do extrato dos grãos, 500 µl de KOH a 30% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, adicionados a um tubo de vidro. A mistura foi homogeneizada por vórtex e aquecida em estufa a 100 °C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância em $\lambda = 490$ nm foi lida usando um espectrofotômetro. Ambas as quantificações foram realizadas usando uma curva padrão de sacarose. Os resultados para sacarose são expressos em mg g⁻¹ MF.

Para a determinação de aminoácidos, foi utilizado o método de Yemm e Cocking (1955). Do extrato hidrossolúvel do MCW, foi retirado uma alíquota 350 uL proveniente das folhas, adicionadas a 650 uL de H₂O, 500 µL de citrato de sódio 0,2 M, 200 µL de ninidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol e 1000 µL KCN 0,2 mM. O ensaio foi aquecido a 100° C por 15 minutos e, após, resfriado por 10 minutos em água corrente. Acrescentou-se 1000 µL de álcool etílico 60%. Para a quantificação de aminoácidos nos grãos, foi retirado do extrato hidrossolúvel do MCW, uma alíquota de 450 uL proveniente dos grãos, adicionados a 550 uL de H₂O, 500 µL de citrato de sódio 0,2 M, 200 µL de ninidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol e 1000 µL KCN 0,2 mM. O ensaio foi aquecido a 100° C por 15 minutos e após, resfriado por 10 minutos em água corrente. Acrescentou-se 1000 µL de álcool etílico 60%. Posteriormente seguindo-se a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 570$ nm. A

concentração de aminoácidos solúveis totais foi avaliada utilizando-se curva padrão de metionina. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

3.3.12. Cálculo da recomendação diária de arroz biofortificado com Se e Zn

O consumo médio de arroz pela população brasileira é de 25 kg ano^{-1} , ou seja, $68,5 \text{ g dia}^{-1}$ per capita (Reis, 2015). Para calcular o consumo diário de Se via arroz biofortificado, o consumo diário de arroz deve ser multiplicado pelo teor de Se da amostra, conforme equação 1, e para o cálculo do consumo diário de Zn, se deve utilizar a equação 2 respectivamente.

(1) $68.5 \text{ g dia}^{-1} \times \text{teor de Se na amostra (mg kg}^{-1}) = \text{consumo diário de Se (}\mu\text{g dia}^{-1})$

(2) $[68.5 \text{ g dia}^{-1} \times \text{teor de Zn na amostra (mg kg}^{-1})] / (1000) = \text{consumo diário de Zn (mg dia}^{-1})$

3.3.13. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade de Levene, ambos a 0,05 de probabilidade ($p < 0,05$) por meio do software R (R Development Core Team, 2015). Posteriormente, os dados normais foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para verificar as variáveis dependentes que se correlacionavam diretamente com os tratamentos. O pacote “corrplot” foi acessado para criar o mapa de correlação, usando as funções “color” e “cor.mtest” para criar matrizes de coeficiente e valor p, respectivamente.

3.4. RESULTADOS

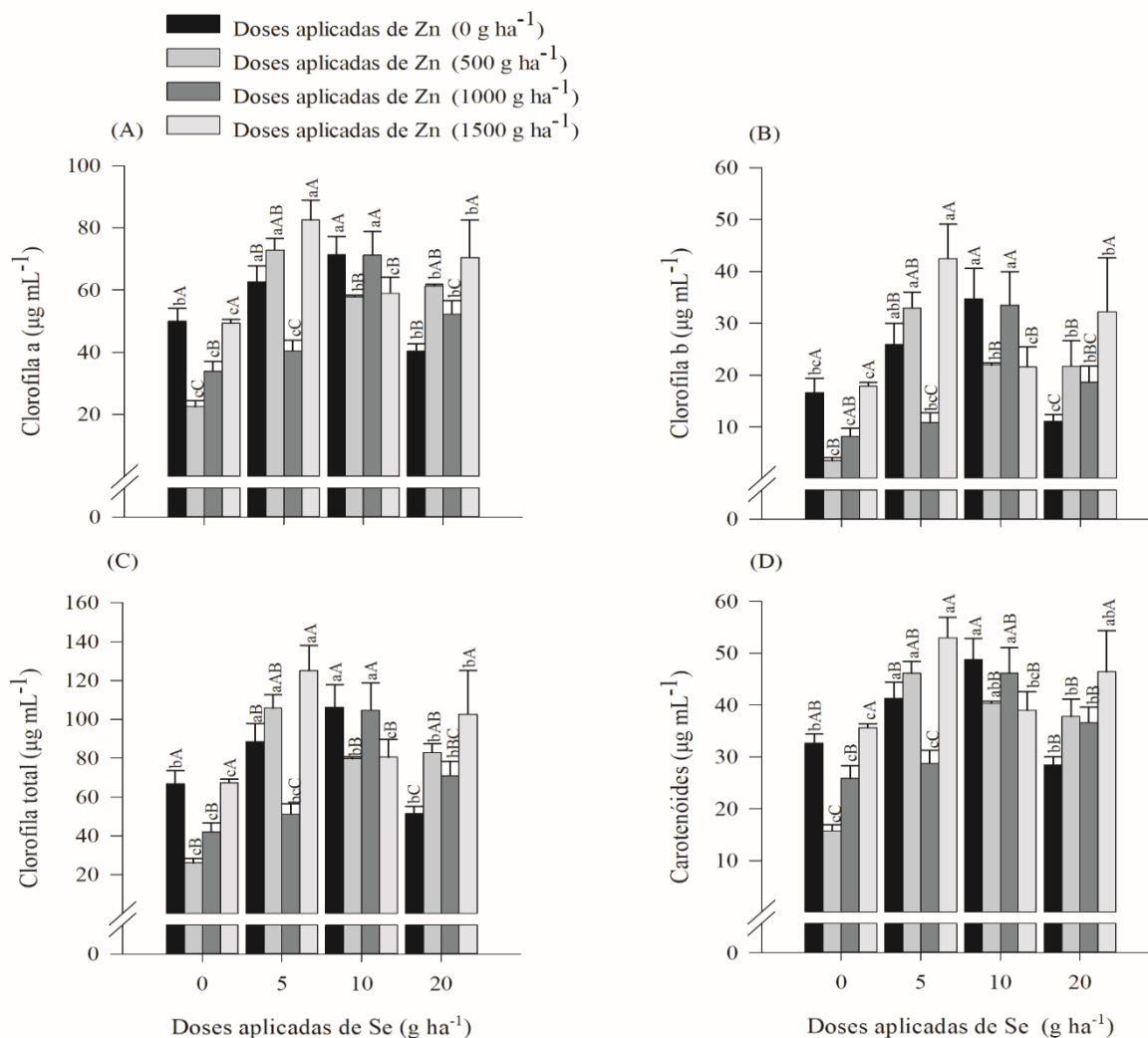
A aplicação de Se associada à aplicação de Zn, propiciou aumento nos teores dos pigmentos fotossintetizantes de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides (Figura 1). A ausência de aplicação de Se, associada à aplicação de 500 g, 1000 g e 1500 g ha^{-1} de Zn, proporcionaram redução nos teores de clorofila a, em torno de 55%, 32% e 1%, respectivamente, em relação ao controle. Também foi verificado que a ausência de aplicação de Se, associada a aplicação de 500 g e 1000 g de Zn, reduziram em torno de 79% e 51%, respectivamente, os teores de clorofila b, 61% e

37%, respectivamente, os teores de clorofila total, 52% e 21%, respectivamente, os teores de carotenoides. De modo geral, a aplicação associada entre Se e Zn, proporcionaram aumento nos teores dos pigmentos fotossintetizantes, se destacando a aplicação de 5 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1500g ha⁻¹ de Zn que acarretou no aumento de 65%, nos teores de clorofila a, 155% nos teores de clorofila b, 88% nos teores de clorofila total e 62% nos teores de carotenoides em relação ao controle (Figura 1A, B, C, D). Ocorreu aumento de 23% e 27% em relação ao controle, na concentração de açúcar total das folhas em que foi aplicado 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500 e 1500 g ha⁻¹ de Zn, respectivamente (Figura 2A). O mesmo padrão seguiu a concentração de sacarose nas folhas com aumento de 16% e 22% na concentração de sacarose em relação ao controle (Figura 2C).

A aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500 g, 1000 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, propiciou aumento na concentração de açúcar total de 17% 30% e 22% em relação ao controle (Figura 2B). A maior concentração de sacarose nos grãos ocorreu nas plantas em que foi aplicado 5 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1500 g ha⁻¹ de Zn, sendo 45% superior em relação ao controle (Figura 2D).

A aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada a aplicação de 0 g, 500 g, 1000 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, proporcionou redução de 45%, 73%, 75% e 49% na concentração de aminoácidos nas folhas, respectivamente, em relação ao controle (Figura 2E). Em relação a concentração de aminoácidos nos grãos, todos os tratamentos, exceto o controle, apresentaram aumento na concentração (Figura 2F). As maiores concentrações de aminoácidos foram verificadas nas plantas com ausência de Se, associadas à aplicação de 500g, 1000g e 1500g ha⁻¹ de Zn, sendo 126%, 122% e 156% respectivamente, superiores em relação ao controle.

Figura 1 - Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz nos teores de (A) clorofila a, (B) clorofila b, (C) clorofila total e (D) carotenóides. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.

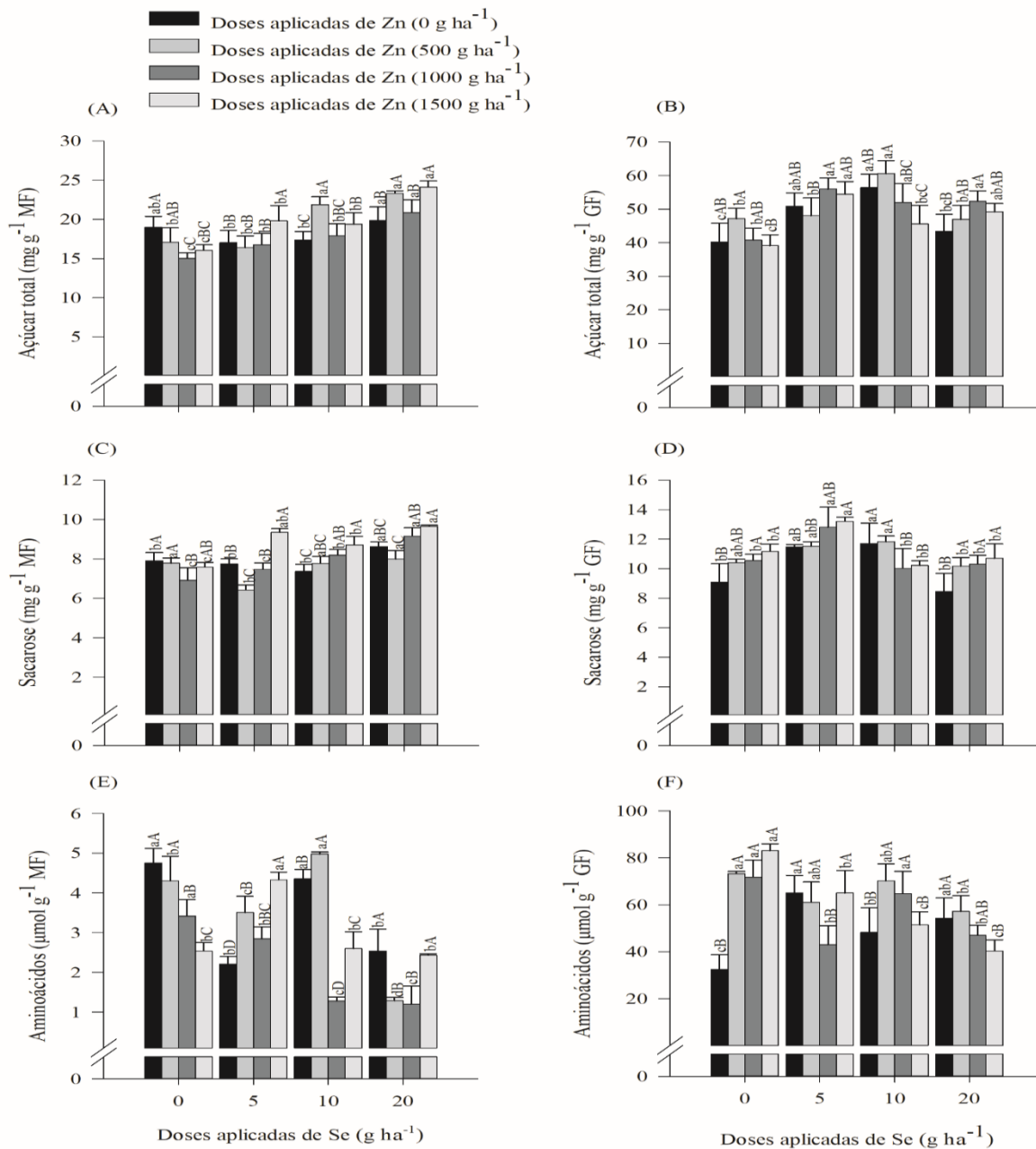


Fonte: Do próprio autor (2020).

A concentração de MDA diminuiu com o aumento da dosagem de Se. As maiores concentrações de MDA foram verificadas no controle e nas plantas com ausência da aplicação de Se, associadas à aplicação de 500 g ha⁻¹ de Zn. A menor concentração de MDA foi verificada nas plantas que foram submetidas à aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1000 g ha⁻¹ de Zn, apresentando redução de 45% em relação ao controle (Figura 3A). As plantas que foram submetidas à aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associadas à aplicação de 0 g, 500 g, 1000 g e 1500 g

ha⁻¹ de Zn, apresentaram as menores concentrações de H₂O₂, sendo 46%, 51%, 44% e 37%, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 3B).

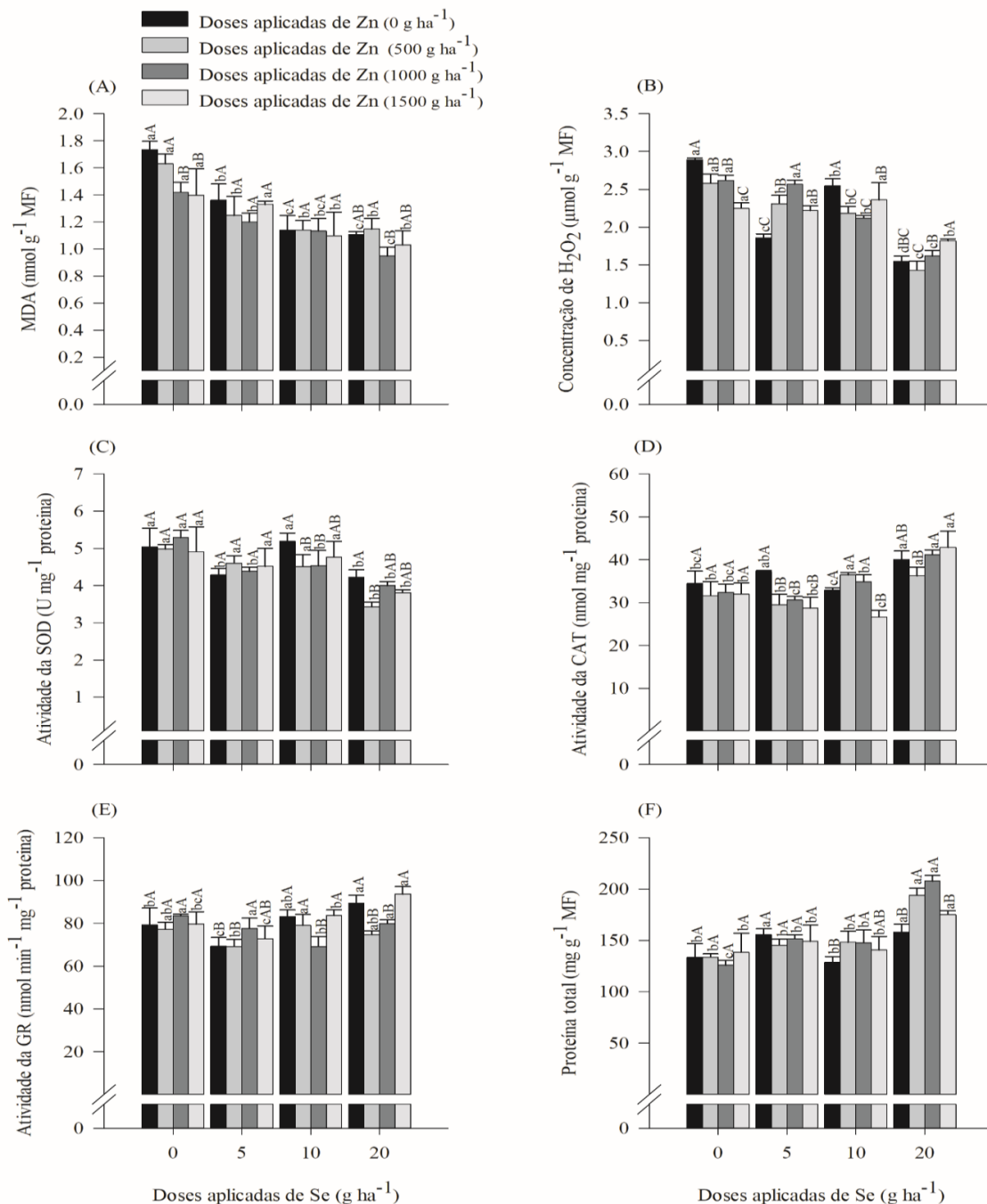
Figura 2- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz nos teores de (A) açúcar total em folhas, (B) açúcar total em grãos, (C) sacarose em folhas, (D) sacarose em grãos, (E) aminoácidos em folhas e (F) aminoácidos em grãos. Matéria Fresca (MF), Grão Fresco (GF). O erro padrão da média (n = 4) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

As plantas submetidas à aplicação de 0 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500 g, 1000 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, não apresentaram diferença na atividade da SOD em relação ao controle (Figura 3C).

Figura 3- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) malondialdeído, (B) peróxido de hidrogênio, (C) atividade da superóxido dismutase, (D) atividade da catalase, (E) atividade da glutatona redutase e (F) proteína total. Matéria Fresca (MF). O erro padrão da média (n = 4) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

A aplicação de 5 g ha⁻¹ de Se associada à aplicação de 0 g e 1000 g ha⁻¹ de Zn, propiciou redução na atividade da SOD de 15% e 13%, respectivamente, em relação ao controle. A aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 0 g, 500 g, 1000 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, proporcionou redução na atividade da SOD de 16%, 32%, 21% e 24%, respectivamente, em relação ao controle.

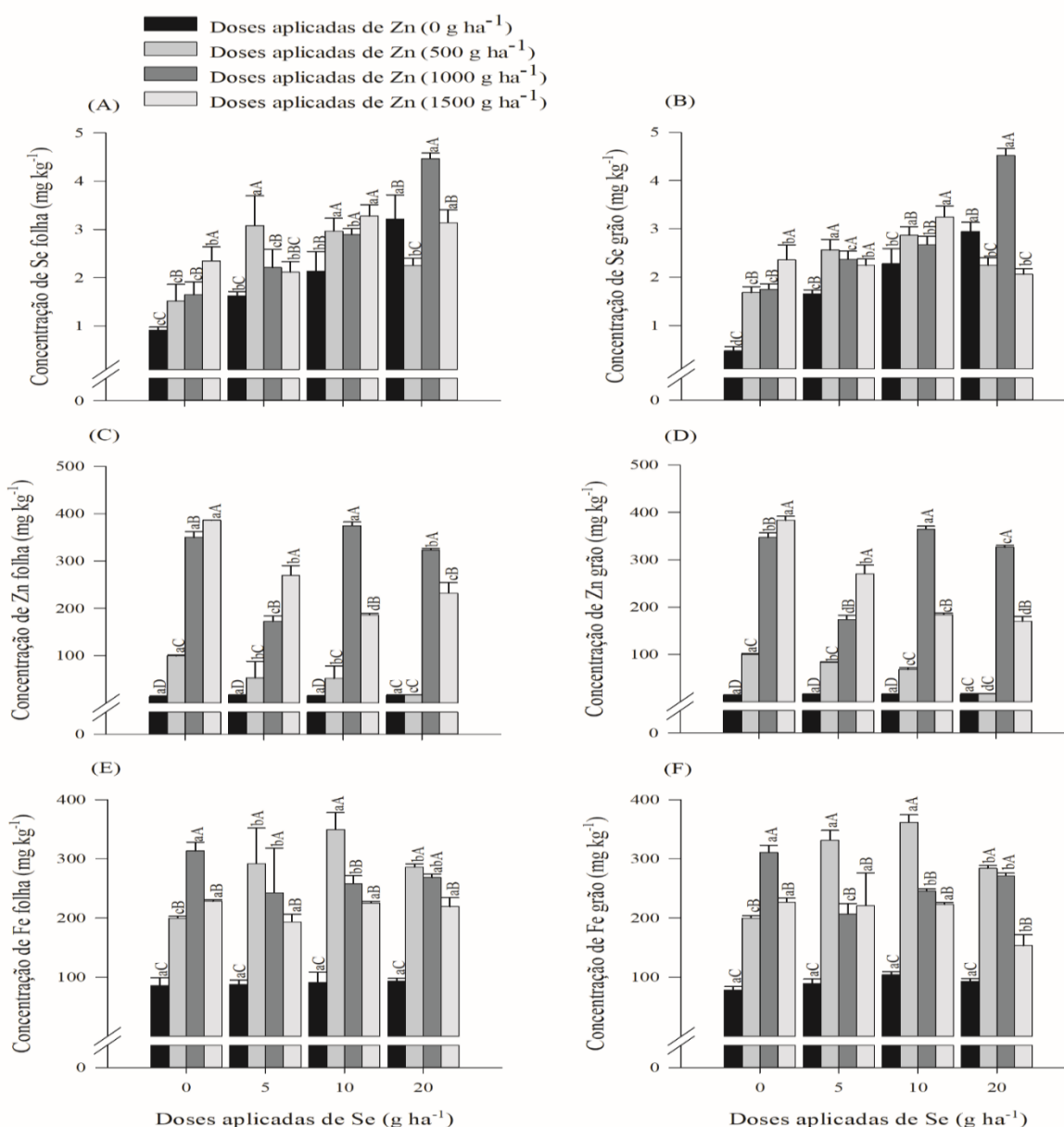
Foi verificada maior atividade da CAT nas plantas que foram submetidas à aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1000 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, respectivamente, sendo 20% e 24% superior em relação ao controle (Figura 3D). A aplicação de 10 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1500 g ha⁻¹ de Zn, reduziu em 23% a atividade da CAT em relação ao controle. A aplicação de 0 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de Zn nas diferentes doses, não apresentou diferença na atividade da GR em relação ao controle (Figura 3E). As plantas submetidas à aplicação de 5 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 0 g e 500 g ha⁻¹ de Zn, tiveram redução de 12% e 13% respectivamente, na atividade da GR em relação ao controle. Maior atividade da GR foi verificada nas plantas submetidas à aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 0 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, sendo 13% e 18% respectivamente, superior em relação ao controle.

A aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 0 g e 1500 g ha⁻¹ de Zn, propiciou aumento na concentração de proteína total de 18% e 31%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 3F). As maiores concentrações de proteína total, foram verificadas nas plantas submetidas à aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500g e 1000g ha⁻¹ de Zn, respectivamente, sendo 45% e 55% superiores em relação ao controle.

As folhas de arroz em que foram realizadas a aplicação de 20 g ha⁻¹ de Se na ausência de Zn, apresentaram um aumento de 251% na concentração de Se em relação ao controle. A concentração de Se nos grãos, seguiu o mesmo padrão em relação as folhas, sendo que o aumento da concentração comparada ao controle, foi de 509%. A maior concentração de Se, foi verificada nas plantas de arroz submetidas ao tratamento com 20 g ha⁻¹ de Se associado com 1000g ha⁻¹ de Zn, sendo 170% e 158% superiores nas folhas e grãos respectivamente, em relação as plantas tratadas com 1000 g ha⁻¹ de Zn, na ausência de Se (Figura 4A, B).

A maior concentração de Zn em folhas e grãos foi verificada nas plantas com ausência de aplicação de Se, a uma dose de 1500 g ha⁻¹ de Zn, sendo 2755% e 637% em folhas e grãos respectivamente, superiores em relação as plantas com a ausência de Zn. A aplicação de 10 g ha⁻¹ de Se, associada a aplicação de 1000 g ha⁻¹ de Zn, propiciou um aumento de 7% e 5% na concentração de Zn nas folhas e grãos respectivamente, em relação as plantas em que não ocorreu a aplicação de Se (Figura 4C, D).

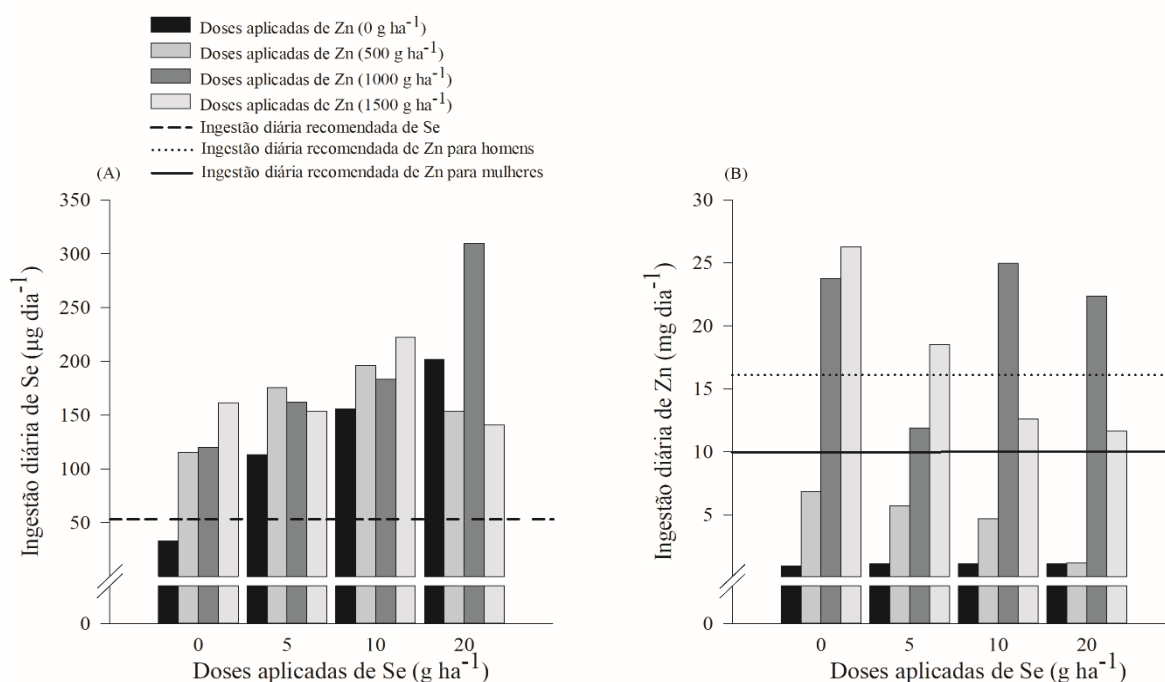
Figura 4 - Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) selênio em folhas, (B) selênio em grãos, (C) zinco em folhas, (D) zinco em grãos, (E) ferro em folhas e (F) ferro em grãos. O erro padrão da média (n = 4) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Ocorreu aumento na concentração de Fe em folhas e grãos, em todas as plantas que foram submetidas à aplicação de Zn, independente da aplicação de Se. As maiores concentrações de Fe em folhas e grãos foram verificadas nas plantas em que ocorreu à aplicação de 10 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500g ha⁻¹ de Zn, sendo 184% e 136% superiores em relação a testemunha (Figura 4E, F).

Figura 5 - Consumo diário recomendado de Se ($\mu\text{g dia}^{-1}$) (A) e de Zn (mg dia^{-1}) (B) de grãos de arroz cultivado em terras altas cultivar BRS Esmeralda



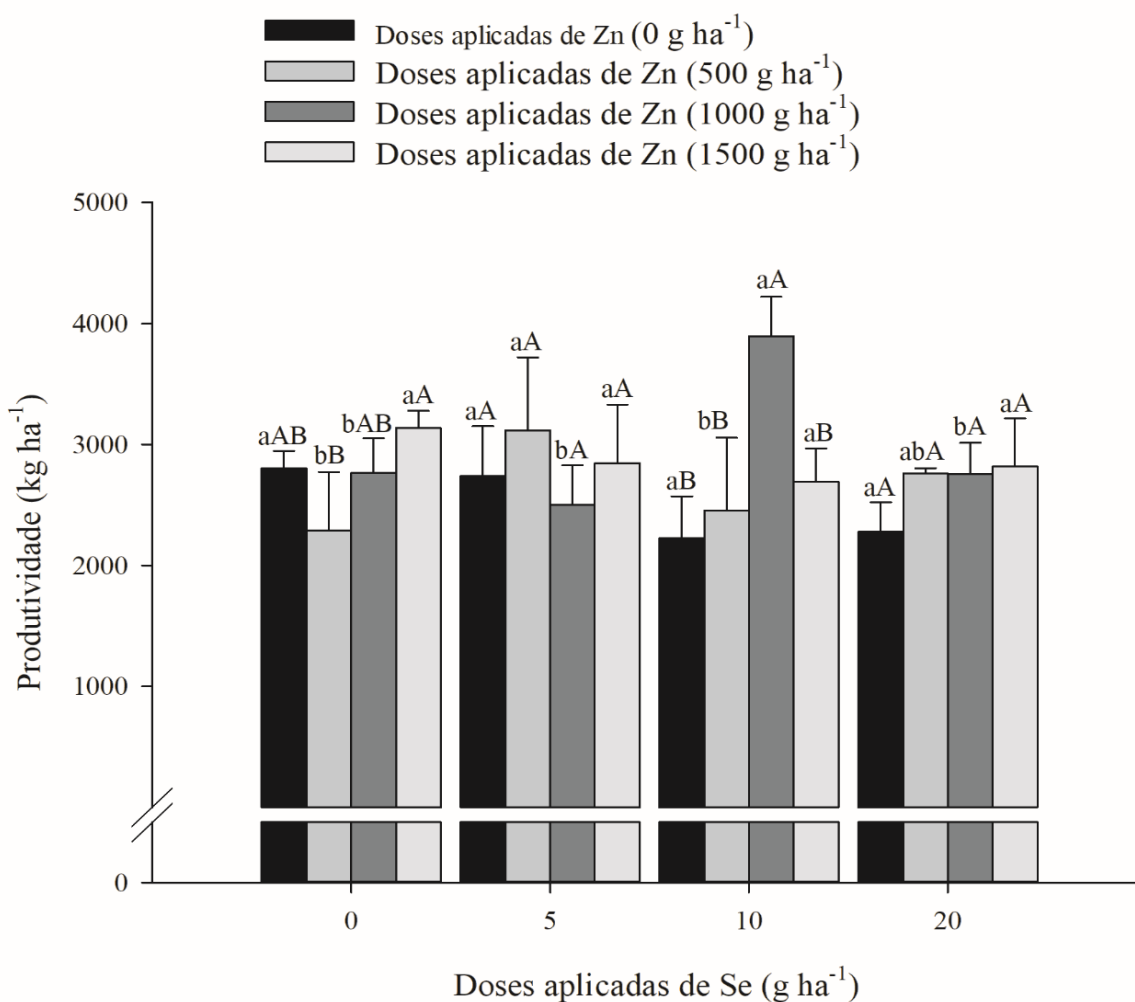
Fonte: Do próprio autor (2020).

A ingestão média diária estimada de Se do arroz biofortificado foi de 180,84 $\mu\text{g dia}^{-1}$ (Figura 5A), ou seja, 3,29 vezes acima do nível recomendado que é de 55 $\mu\text{g dia}^{-1}$, entretanto, dentro do limite máximo aceitável que é de 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$. A ingestão diária média de Zn (Figura 5B), foi de 14,21 mg dia^{-1} , ficando dentro do valor recomendado que é de 11 mg a 16 mg dia^{-1} de Zn.

A aplicação de 0 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1500 g ha⁻¹ de Zn, proporcionou aumento de 12% na produtividade em relação ao controle (Figura 6). Padrão semelhante foi verificado na aplicação de 5 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 500 g ha⁻¹ de Zn, com produtividade 11% superior em relação ao controle. A maior produtividade foi verificada nas plantas que foram submetidas à

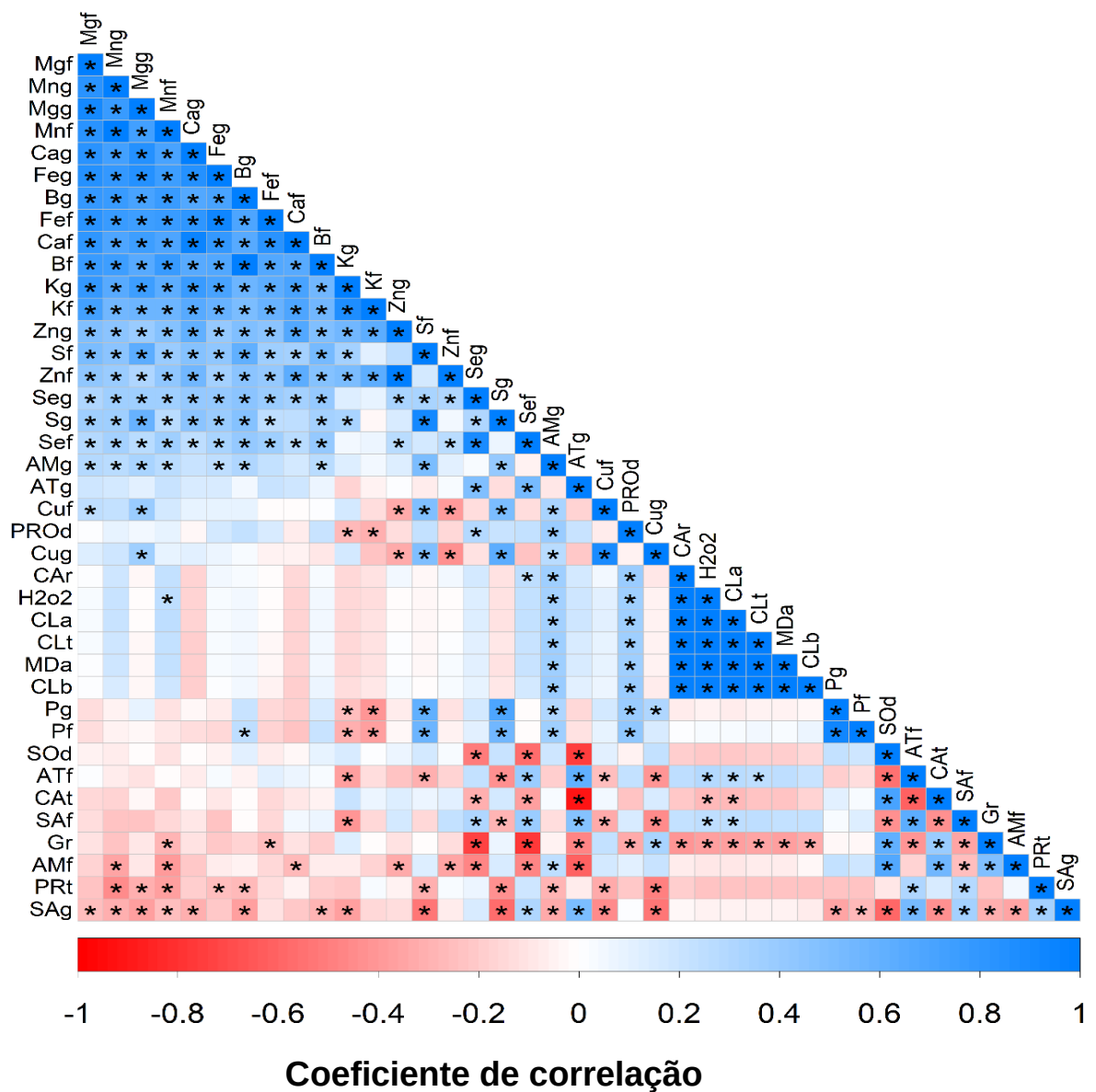
aplicação de 10 g ha⁻¹ de Se, associada à aplicação de 1000 g ha⁻¹ de Zn, com aumento de 39% em relação ao controle.

Figura 6- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na produtividade. O erro padrão da média (n = 4) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

Figura 7- Heatmap das correlações de Pearson entre parâmetros nutricionais e bioquímicos analisados nas folhas e grãos em plantas de arroz expostas às concentrações de aplicação de Se e Zn. * Indica relação significativa ($p < 0.05$). Abreviações: Concentração de Mg na folha (Mgf), concentração de Mn no grão (Mng), concentração de Mg no grão (Mgg), concentração de Mn na folha (Mnf), concentração de Ca no grão (Cag), concentração de Fe no grão (Feg), concentração de B no grão (Bg), concentração de Fe na folha (Fef), concentração de Ca na folha (Caf), concentração de B na folha (Bf), concentração de K no grão (Kg), concentração de K na folha (Kf), concentração de Zn no grão (Zng), concentração de S na folha (Sf), concentração de Zn na folha (Znf), concentração de Se no grão (Seg), concentração de S no grão (Sg), concentração de Se na folha (Sef), aminoácidos no grão (AMg), açúcar totam no grão (ATg), concentração de Cu na folha (Cuf), produtividade (PROd), concentração de Cu no grão (Cug), carotenoides (CAr), peróxido de hidrogênio (H2o2), clorofila a (CLa), clorofila total (CLt), malondealdeído (MDa), clorofila b (CLb), concentração de P no grão (Pg), concentração de P na folha (Pf), atividade da superóxido dismutase (SOD), açúcar total na folha (ATf), atividade da catalase (CAT), sacarose na folha (SAf), atividade da glutatona redutase (Gr), aminoácido na folha (AMf), proteína total (PRt), sacarose no grão (SAG).



Fonte: Do próprio autor (2020).

3.5 DISCUSSÃO

O Se pode atuar de forma positiva a concentração de pigmentos fotossintetizantes, sendo um indicador do estado metabólico celular (REIS *et al.*, 2018). No nosso estudo a aplicação associada de Se e Zn, proporcionou o aumento dos pigmentos fotossintetizantes (Figura 1A, B, C, D). De acordo com Silva *et al.* (2020), à aplicação de 2,5 g ha⁻¹ de Se, sob a forma de selenato de sódio, em plantas de *Vigna unguiculata*, propiciou aumento na concentração de pigmentos, como clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides. Segundo Reis *et al.* (2018), o Se em baixas concentrações, atua como antioxidante, proporcionando aumento nos teores de pigmentos e acarretando em melhorias na fotossíntese, crescimento e produtividade.

A aplicação associada de Se e Zn, proporcionou aumento na concentração de açúcar total e sacarose nas folhas e nos grãos de arroz (Figura 2A, B, C, D). Os açúcares agem como moléculas sinalizadoras que regulam vários processos metabólicos e de desenvolvimento dos vegetais (COUÉE *et al.*, 2006; BOLOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2010; KEUNEN *et al.*, 2013). Vale ressaltar que o Se pode estimular o aumento da atividade das amilases e invertases (MALIK *et al.*, 2011). Dessa forma, a aplicação de 5 g e 10 g ha⁻¹ de Se, pode ter contribuído para o aumento de açúcar total e sacarose nos grãos. O Se quando aplicado em doses adequadas, pode contribuir para o aumento da concentração de açúcar e sacarose nas folhas (AHMAD *et al.*, 2016), corroborando com os nossos resultados, sendo que foi verificado a correlação positiva, entre a concentração de Se e a concentração de açúcar e sacarose nas folhas (Figura 7). Cabe destacar, que o aumento na concentração de pigmentos fotossintetizantes em resposta a aplicação de Se, pode influenciar na síntese de carboidratos, como açúcar e sacarose (KAUR *et al.*, 2018).

Neste estudo, a aplicação associada de Se e Zn, reduziu as concentrações de MDA e H₂O₂ nas plantas de arroz (Figura 3A, B). A peroxidação lipídica serve como indicador das espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam as células, uma vez que o estresse oxidativo causa a peroxidação de ácidos graxos insaturados, aumentando a concentração de MDA (FAROOQ *et al.*, 2019). A planta por meio do seu metabolismo antioxidante, consegue minimizar os efeitos prejudiciais das EROs, com a síntese de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos que irão atuar no

vegetal. A SOD converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o acúmulo de H_2O_2 na célula é evitado pela redução em H_2O por meio das ações da CAT (RIZWAN *et al.*, 2017). No nosso estudo, verificou-se que a aplicação de 20 g ha^{-1} de Se, associada a aplicação de 1000 g ha^{-1} de Zn, propiciou taxas mais baixas de peroxidação lipídica, tendo em vista que a concentração de MDA para esse tratamento foi a menor. Sob concentrações elevadas de MDA, o aumento do H_2O_2 é indicativo de que essa molécula pode estar atuando como promotor do estresse oxidativo (Feng *et al.*, 2013). Entretanto, sob concentrações mais baixas de MDA, o aumento do H_2O_2 pode indicar sinalização de estresse (FAROOQ *et al.*, 2019). Porém, foi verificado que a aplicação de Se na dosagem de 20 g ha^{-1} , em associação com 500 g ha^{-1} de Zn, propiciou menor concentração de H_2O_2 .

Outro ponto a se destacar, é que o aumento da atividade enzimática da CAT e GR quando fornecido a dosagem de 20 g ha^{-1} de Se (Figura 3D, E), pode ter ajudado a manter a concentração de MDA e H_2O_2 em concentrações mais baixas em relação ao controle, devido a CAT converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002) e a GR catalisar a redução da glutathiona oxidada em glutathiona reduzida (NOCTOR *et al.*, 2012).

A atividade da SOD teve uma redução quando aplicado 20 g ha^{-1} de Se (Figura 3C). Vale ressaltar que alguns estudos apontam para o efeito negativo do Se sobre a atividade da SOD em plantas (CHENG *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2018), corroborando com a correlação negativa entre Se e SOD verificados no nosso estudo (Figura 7).

Estudos realizados por meio de técnicas polarográficas e voltamétricas apontaram para a existência de interação entre Se e Zn (FEROCI *et al.*, 2005; HOUSE; WELCH, 1989). A aplicação de altas doses de Se, pode promover a maior absorção e o transporte de Zn, pelas plantas (Figura 4C, D). Boldrin *et al.* (2013), verificaram que à aplicação de $0,75\text{ mg kg}^{-1}$ de Se, apresentou efeito sinérgico na absorção de Zn, em folhas grãos de arroz. Entretanto, foi observado que à aplicação de 10 g e 20 g ha^{-1} de Se, associada à aplicação de 500 g ou 1500 g ha^{-1} de Zn, teve um efeito antagônico, diminuindo a concentração de Zn, nas folhas e grãos, possivelmente ocasionado pela competição entre Se e Zn, como verificado por Mangueze *et al.* (2018). O aumento da concentração de Fe nas folhas e grãos de arroz (Figura 4E, F) ao se aplicar doses de Zn, está relacionada a um transportador em comum ao Zn e

Fe, chamado IRT1 (transportador regulado por ferro), que é induzido com doses elevadas de Zn. Dessa forma, as diferentes doses de Zn, ativaram o transportador, aumentando a absorção de Fe pelas plantas, resultando no aumento da concentração desse nutriente.

A aplicação foliar associada de Se e Zn, foi eficaz na biofortificação agronômica de grãos de arroz, apresentando concentrações que suprem as indicações segundo Haase *et al.* (2020); Departamento de Agricultura dos Estados Unidos- Usda (2019) de consumo diário de grãos de arroz da população (Figura 5A, B). Dados que corroboram com os obtidos por Reis *et al.* (2019) que ao aplicar via foliar em plantas de arroz, 25 g ha⁻¹ de Se, conseguiu fornecer via biofortificação agronômica 66 µg dia⁻¹ de Se.

A produtividade de grãos, aumentou quando associada a aplicação de 10 g ha⁻¹ de Se e 1000 g ha⁻¹ de Zn (Figura 6). Também foi verificado por Biswas *et al.* (2018), aumento de 18% na produtividade de grãos de arroz, quando aplicado via foliar Zn na concentração de 8,5%.

A biofortificação dupla com Se e Zn em arroz, pode ser considerada uma ferramenta no auxílio ao combate a doenças ocasionadas pela subnutrição de Se e Zn em pessoas, tendo em vista que o arroz é o alimento presente na refeição de mais de 50% da população mundial, além disso, o custo relativamente baixo da biofortificação agronômica com Se e Zn, se torna interessante pelo fato de poder ser utilizado em países subdesenvolvidos.

3.6. CONCLUSÕES

A aplicação foliar de Se e Zn, realizada em estágios distintos da planta, promoveu aumento nas concentrações de Se nas folhas e grãos de arroz, além de aumentar a concentração de pigmentos fotossintetizantes, que por sua vez resultou em uma maior síntese de carboidratos pela planta, além de aumentar a produtividade de grãos de arroz.

A aplicação de Zn, via foliar, promoveu maior concentração de Zn, Fe, Ca e B nas folhas e grãos de arroz.

As aplicações foliares de 10 g ha⁻¹ de Se e de 1000 g ha⁻¹ de Zn, propiciaram a biofortificação agrônômica de Se e Zn nos grãos de arroz.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; WARAICH, E. A.; NAWAZ, F.; ASHRAF, M. Y.; KHALID, M. Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants—a myth or fact? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 96, n. 2, p. 372-380, 2016.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.24, n. 1, p. 1337-1344, 2001.
- ANTONIADIS, V.; SHAHEEN, S. M.; TSADILAS, C. D.; SELIM, M. H.; RINKLEBE, J. Zinc sorption by different soils as affected by selective removal of carbonates and hydrous oxides. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 49-58, 2018.
- ASTANEH, R. K.; BOLANDNAZAR, S.; NAHANDI, F. Z.; OUSTAN, S. The effects of selenium on some physiological traits and K, Na concentration of garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. **Information Processing in Agriculture**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 156-161, 2018.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild type and a catalase deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BISWAS, J. C.; HAQUE, M. M.; KHAN, F. H.; ISLAM, M. R.; DIPTI, S. S.; AKTER, M.; AHMED, H. U. Zinc fortification: Effect of polishing on parboiled and unparboiled rice. **Current Plant Biology**, London, v. 16, n. 1, p. 22-26, 2018.
- BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; LE ROY, K.; XIANG, L.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **The FEBS Journal**, London, v. 277, n. 9, p. 2022-2037, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p.248-254, 1976.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and soil**, Dordrecht, v. 302, n. 1-2, p. 1-17, 2008.
- CHATTHA, M. U.; HASSAN, M. U.; KHAN, I.; CHATTHA, M. B.; MAHMOOD, A.; CHATTHA, M. U.; NAWAZ, M.; SUBHANI, M. N.; KHARA, M.; KHAN, S. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 2, p.281, 2017.

CHENG, B.; LIAN, H.; LIU, Y.; YU, X.; SUN, Y.; SUN, X.; LIU, S. Effects of selenium and sulfur on antioxidants and physiological parameters of garlic plants during senescence. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 15, n. 3, p. 566-572, 2016.

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 449-459, 2006.

DAI, H.; WEI, S.; TWARDOWSKA, I. Biofortification of soybean (*Glycine max* L.) with Se and Zn, and enhancing its physiological functions by spiking these elements to soil during flowering phase. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 740, n. 2, p. 139648, 2020.

DEMATTE, J. L. I. **Levantamento detalhado dos solos do campus experimental de Ilha Solteira**. Piracicaba: Esalq/USP, p.11-31, 1980.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 1, p. 350-356, 1956.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signalling**, Larchmont, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011.

FAROOQ, M. A.; NIAZI, A. K.; AKHTAR, J.; SAIFULLAH, FAROOQ, M.; SOURI, Z.; RENGEL, Z. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 141, n. 1, p.353-369, 2019.

FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 58-68, 2013.

FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: **Essentials of Medical Geology**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 375-416.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, Larchmont, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GABOS, M. B.; ALLEONI, L. R. F.; ABREU, C. A. Background levels of selenium in some selected Brazilian tropical soils. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 35-39, 2014.

GARCIA MORENO, R.; BURDOCK, R.; DÍAZ ÁLVAREZ, M. C.; CRAWFORD, J. W. Managing the selenium content in soils in semiarid environments through the recycling of organic matter. **Applied and Environmental Soil Science**, London, v. 2013, n. 1, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GOUVEIA, G. C. C.; GALINDO, F. S.; LANZA, M. G. D. B.; SILVA, A. C. R.; MATEUS, M. P. B.; SILVA, M. S.; TAVANTI, R. F. R.; TAVANTI, T. R.; LAVRES, J. REIS, A. R. Selenium toxicity stress-induced phenotypical, biochemical and physiological responses in rice plants: Characterization of symptoms and plant metabolic adjustment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 202, n. 1, p.110916, 2020.

HAASE, H.; ELLINGER, S.; LINSEISEN, J.; NEUHÄUSER-BERTHOLD, M.; RICHTER, M. Revised DA-CH-reference values for the intake of zinc. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 61, n. 1, p. 126536, 2020.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p.189–198, 1968.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

KAUR, M.; SHARMA, S.; SINGH, D. Influence of selenium on carbohydrate accumulation in developing wheat grains. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 49, n. 13, p.1 650-1659, 2018.

KEUNEN, E.; PESHEV, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DEN ENDE, W.; CUYPERS, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.

LANZA, M. G. D. B.; SILVA, V. M.; GABRIEL, S. M.; LAVRES, J.; CARVALHO, H. W. P.; REIS, A. R. Assessment of selenium spatial distribution using μ -XFR in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) plants: Integration of physiological and biochemical responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 207, n. 1, p. 111216, 2020.

LI, Z.; LIANG, D.; PENG, Q.; CUI, Z.; HUANG, J.; LIN, Z. Interaction between selenium and soil organic matter and its impact on soil selenium bioavailability: A review. **Geoderma**, Amsterdam, v. 295, n. 2, p. 69-79, 2017.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, n. 1, p. 350-382, 1987.

MAHMOUD SOLTANI, S.; HANAFI, M. M.; WAHID, S. A.; KHARIDAH, S. M. S. Zinc fractionation of tropical paddy soils and their relationships with selected soil

properties. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Surrey, v. 27, n. 2, p. 53-61, 2015.

MALIK, J. A.; KUMAR, S.; THAKUR, P.; SHARMA, S.; KAUR, N.; KAUR, R.; PATHANIA, D.; BHANDHARI, K.; KAUSHAL, N.; SINGH, K.; SRIVASTAVA, A.; NAYYAR, H. Promotion of growth in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) by selenium is associated with stimulation of carbohydrate metabolism. **Biological Trace Element Research**, London, v. 143, n. 1, p. 530-539, 2011.

MANGUEZE, A. V. J.; PESSOA, M. F. G.; SILVA, M. J.; NDAYIRAGIJE, A.; MAGAIA, H. E.; COSSA, V.S. I.; RAMALHO, J. C. Simultaneous Zinc and selenium biofortification in rice. Accumulation, localization and implications on the overall mineral content of the flour. **Journal of Cereal Science**, London, v. 82, n. 1, p. 34-41, 2018.

MONTANHA, G. S.; RODRIGUES, E. S.; ROMEU, S. L. Z.; ALMEIDA, E.; REIS, A. R.; LAVRES, J.; CARVALHO, H. W. P. Zinc uptake from ZnSO₄ (aq) and Zn-EDTA (aq) and its root-to-shoot transport in soybean plants (*Glycine max*) probed by time-resolved in vivo X-ray spectroscopy. **Plant Science**, Shannon, v. 292, n. 1, p. 110370, 2020.

MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; REIS, A. R. The molecular genetics of zinc uptake and utilization efficiency in crop plants. In: **Plant Micronutrient Use Efficiency**. Cambridge: Academic Press, 2018. p. 87-108.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN, Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 454-484, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 set. 2020.

RAIJ, B. VAN; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

REIS, A. R. Selenium status in Brazilian soils and crops: agronomic biofortification as a strategy to improve food quality. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SELENIUM IN THE ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH GLOBAL ADVANCES IN SELENIUM RESEARCH FROM THEORY TO APPLICATION, 4., São Paulo. **Proceedings of the 4th International Conference on Selenium in the Environment and Human Health 2015**. São Paulo: CRC Press, 2015. p.179-180.

REIS, A. R.; BOLETA, E. H. M.; ALVES, C. Z.; COTRIM, M. F.; BARBOSA, J. Z.; SILVA, V.M.; CARVALHO, H. W. P. Selenium toxicity in upland field-grown rice: Seed physiology responses and nutrient distribution using the μ -XRF technique. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 190, n. 1, p. 110147, 2020.

REIS, A. R.; EL-RAMADY, H.; SANTOS, E. F.; GRATÃO, P. L.; SCHOMBURG, L. Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-

related health issues, and case studies. In: PILON-SMITS, E. A. H.; WINKEL, L. H. E.; LIN, Z. Q. **Selenium in plants**. Cham: Springer, 2017. p. 209-230.

REIS, H. P.G.; BARCELOS, J. P.DE Q.; JUNIOR, E. F.; SANTOS, E. F.; SILVA, V.M.; MORAES, M. F.; REIS, A. R. Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. **Journal of Cereal Science**, London, v. 79, n. 2, p. 508-515, 2018.

REIS, H. P.G.; BARCELOS, J. P. Q.; SILVA, V. M.; SANTOS, E. F.; TAVANTI, R. F. R.; PUTTI, F. F.; REIS, A. R. Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 100, n. 5, p. 1990-1997, 2020.

RIZWAN, M.; ALI, S.; ADREES, M.; IBRAHIM, M.; TSANG, D. C. W.; ZIA-UR-REHMAN, M.; OK, Y. S. A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. **Chemosphere**, Oxford, v. 182, n. 1. p. 90-105, 2017.

SALTZMAN, A.; BIROL, E.; BOUIS, H. E.; BOY, E.; MOURA, F. F.; ISLAM, Y.; PFEIFFER, W. H. Biofortification: progress toward a more nourishing future. **Global Food Security**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 9-17, 2013.

SILVA, V.M.; BOLETA, E. H. M.; LANZA, M. G. D. B.; LAVRES, J.; MARTINS, J. T.; SANTOS, E. F.; REIS, A. R. Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 172-182, 2018.

SILVA, V. M.; BOLETA, E. H. M.; MARTINS, J. T.; MENDES SANTOS, F. L.; SILVA, A. C. R.; ALCOCK, T. D.; REIS, A. R. Agronomic biofortification of cowpea with selenium: effects of selenate and selenite applications on selenium and phytate concentrations in seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 99, n. 13, p. 5969-5983, 2019.

SILVA, V. M.; TAVANTI, R. F. R.; GRATÃO, P. L.; ALCOCK, T. D.; REIS, A. R. Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 201, n. 1, p. 110777, 2020.

SINGH, D.; MCLAREN, R. G.; CAMERON, K. C. Effect of pH on zinc sorption-desorption by soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, n. 19-20, p. 2971-2984, 2008.

TOLU, J.; THIRY, Y.; BUENO, M.; JOLIVET, C.; POTIN-GAUTIER, M.; LE HECHO, I. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils, from mineral to organic rich. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 479, n. 1, p. 93-101, 2014.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE- USDA. **National nutrient database for standard reference**. Washigton: Food Data Central, 2019.

VAN HANDEL, E. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 19, n. 1, p. 193-194, 1967.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Rice: composition and nutritional characteristics. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, J.; LI, H.; LI, Y.; YU, J.; YANG, L.; FENG, F.; CHEN, Z. Speciation, distribution, and bioavailability of soil selenium in the Tibetan Plateau Kashin–Beck disease area—a case study in Songpan County, Sichuan Province, China. **Biological Trace Element Research**, London, v. 156, n. 1-3, p. 367-375, 2013.

WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of botany**, Oxford, v. 117, n. 2, p. 217-235, 2016.

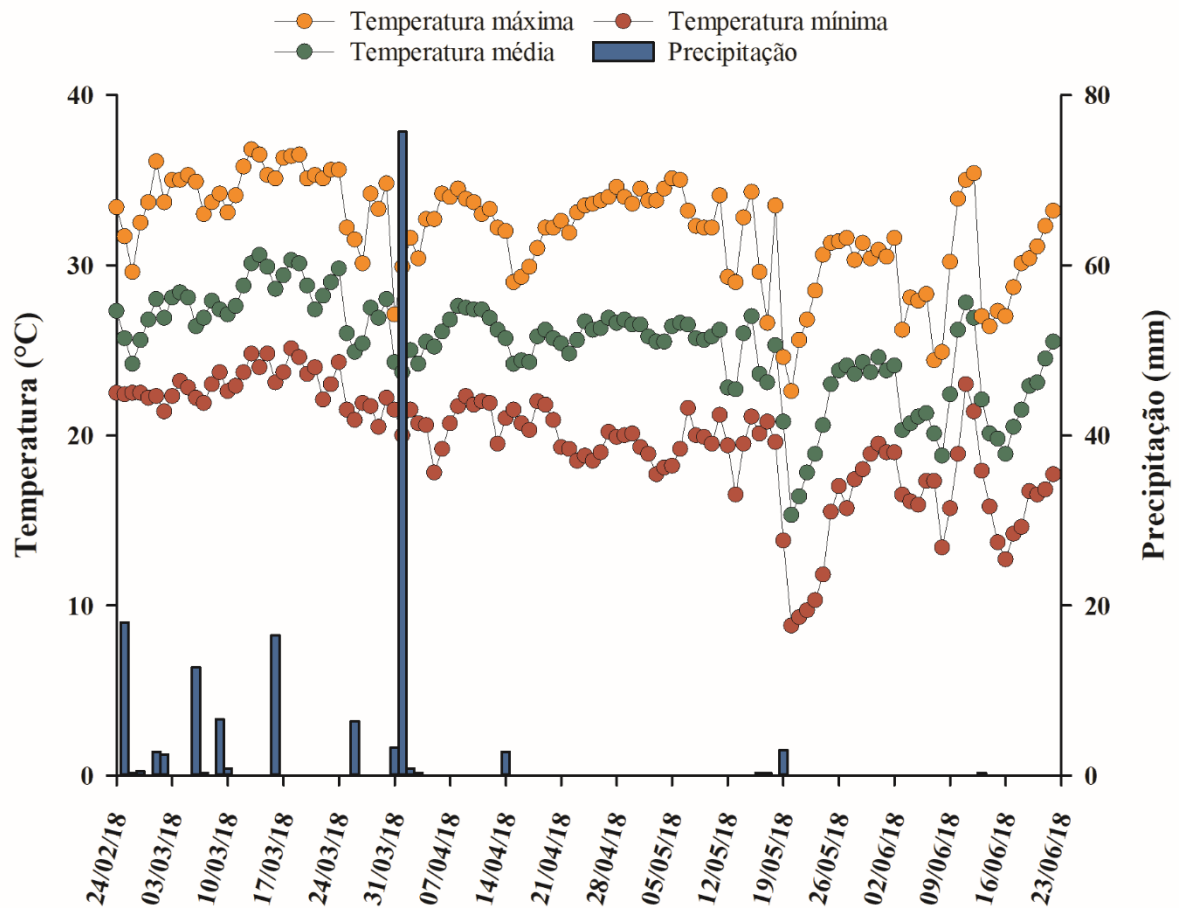
WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 2, n. 1, p. 80, 2011.

XU, Y.; LI, Y.; LI, H.; WANG, L.; LIAO, X.; WANG, J.; KONG, C. Effects of topography and soil properties on soil selenium distribution and bioavailability (phosphate extraction): A case study in Yongjia County, China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 633, n. 1, p. 240-248, 2018.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

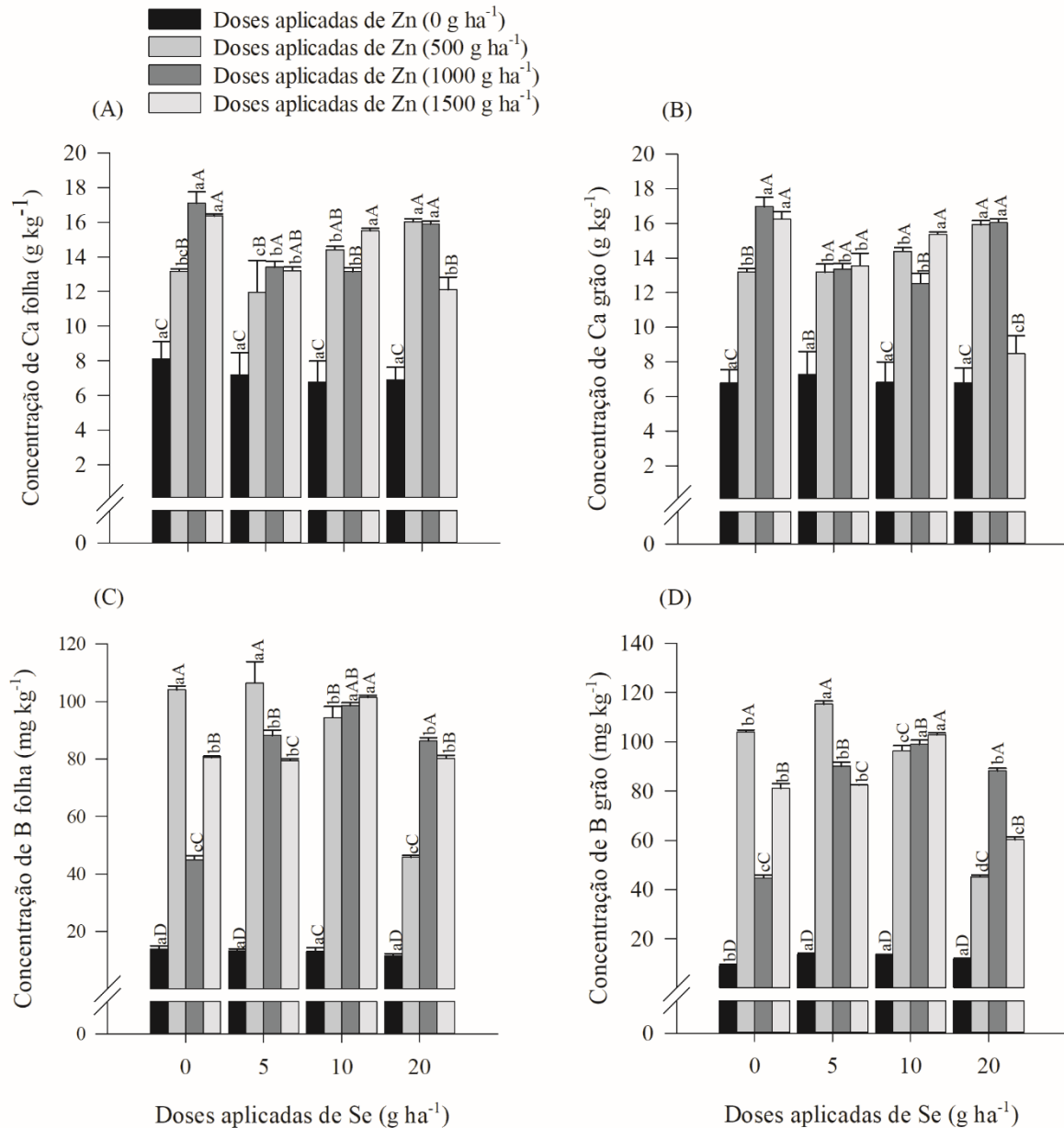
DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Documento complementar 1- Temperatura e precipitação do campo experimental de cultivo de arroz.



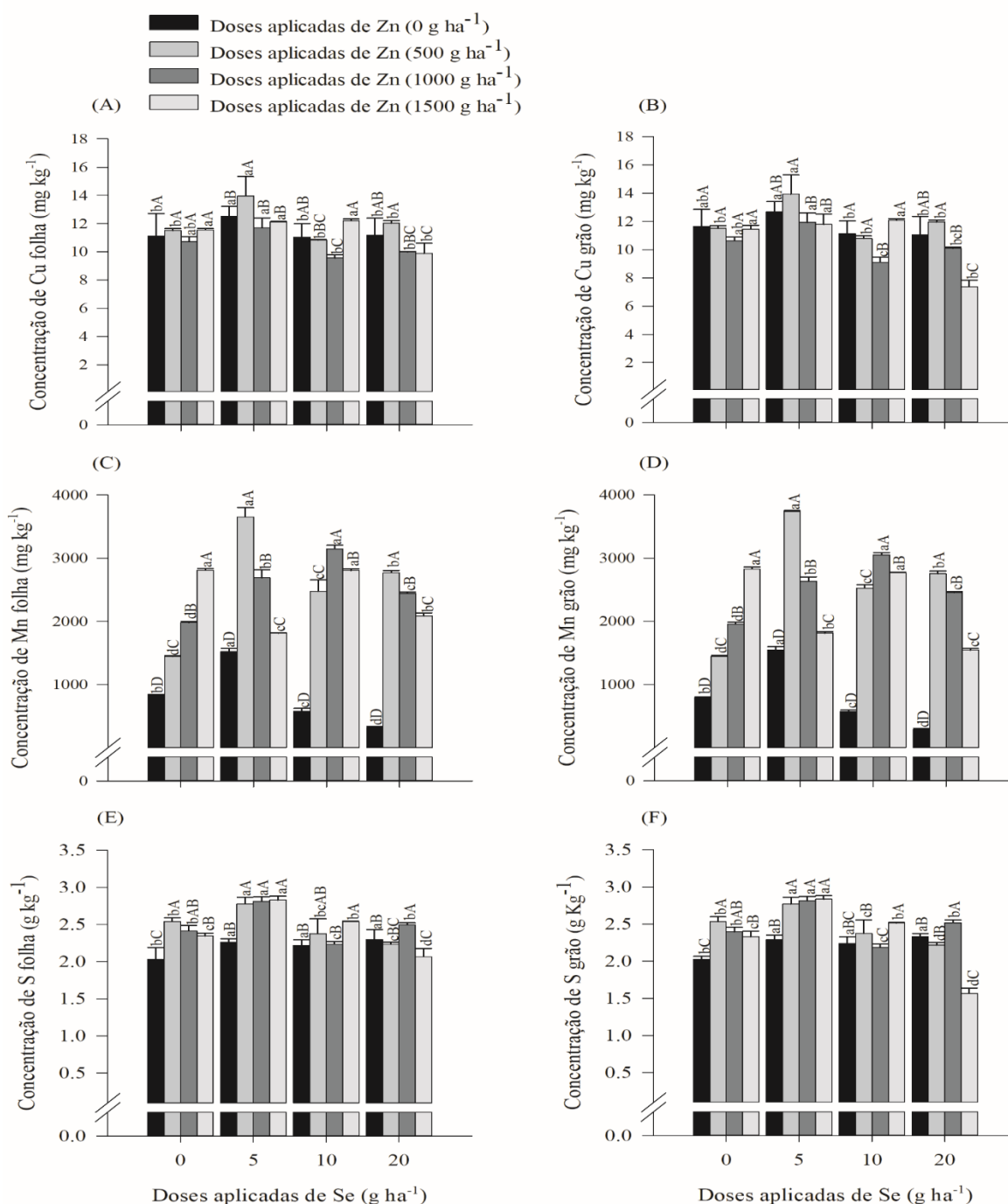
Fonte: Do próprio autor (2020).

Documento suplementar 2- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) cálcio em folhas, (B) cálcio em grãos, (C) boro em folhas e (D) boro em grãos. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas coparam as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



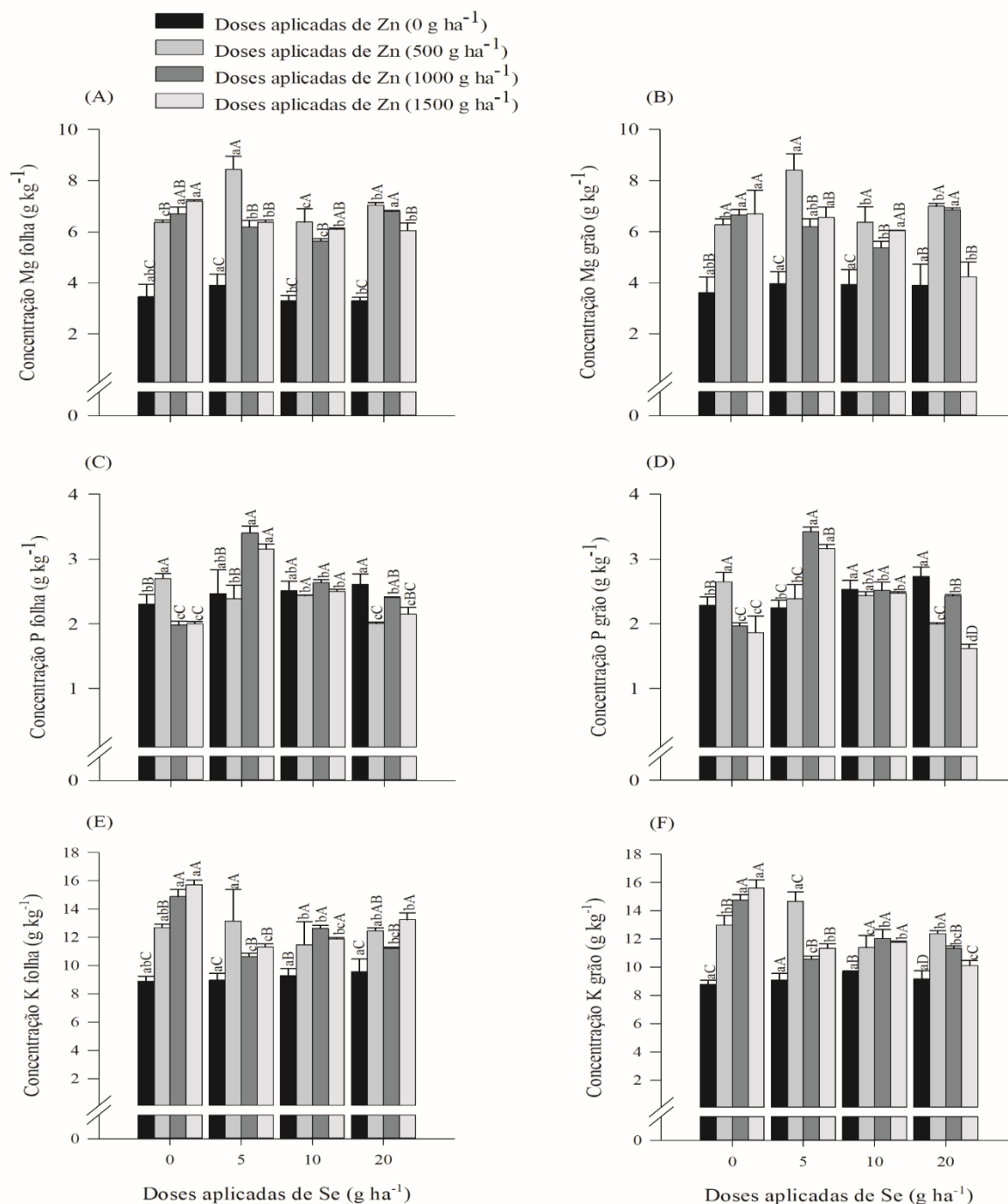
Fonte: Do próprio autor (2020).

Documento Suplementar 3- Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) cobre em folhas, (B) cobre em grãos, (C) manganês em folhas, (D) manganês em grãos, (E) enxofre em folhas e (F) enxofre em grãos. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas coparam as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

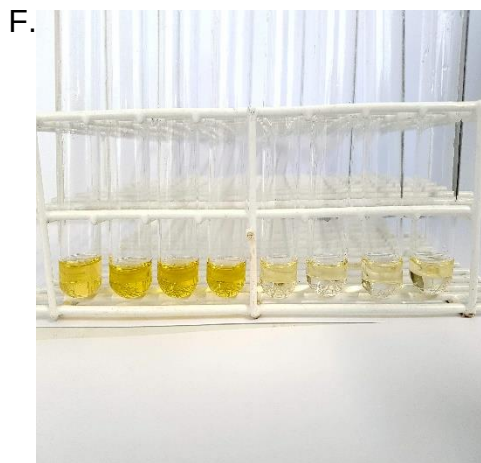
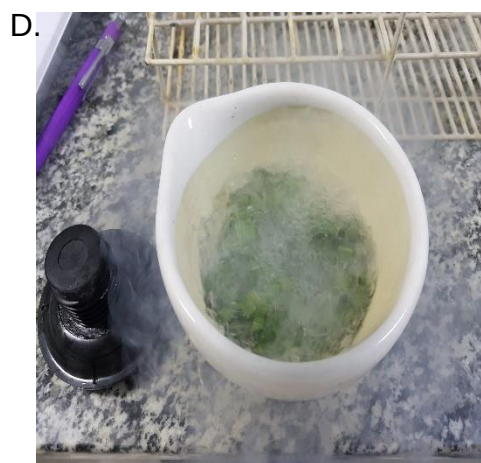
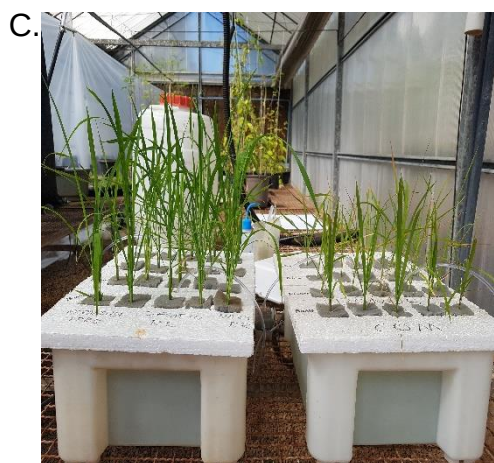
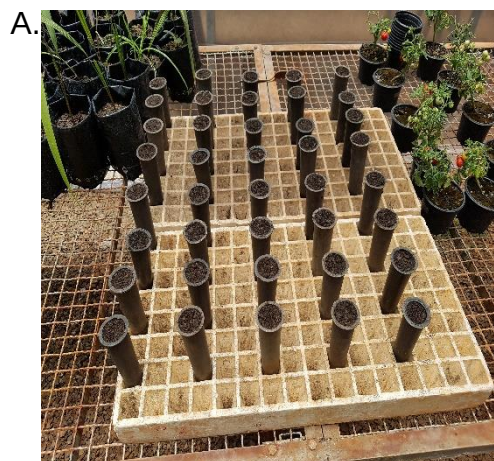
Documento Suplementar 4 - Efeitos da interação da aplicação foliar de doses de Se e Zn em plantas de arroz na concentração de (A) magnésio em folhas, (B) magnésio em grãos, (C) fósforo em folhas, (D) fósforo em grãos, (E) potássio em folhas e (F) potássio em grãos. O erro padrão da média ($n = 4$) é indicado por barras de erro. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas comparam a mesma dosagem de zinco com interação nas diferentes doses de selênio e letras maiúsculas comparam as diferentes doses de zinco dentro da mesma dosagem de selênio.



Fonte: Do próprio autor (2020).

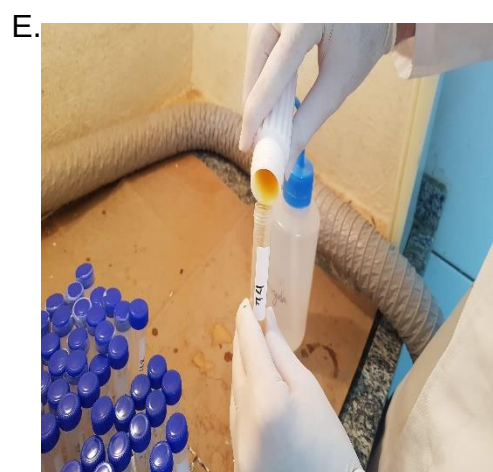
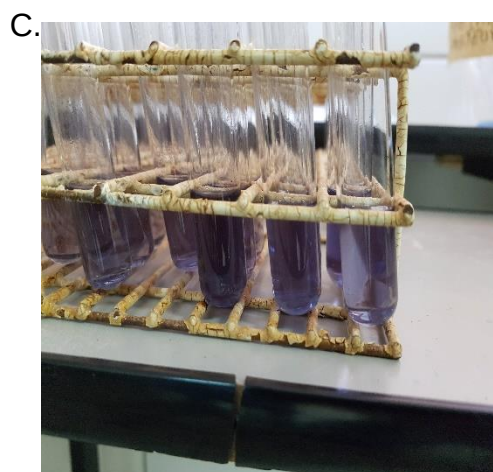
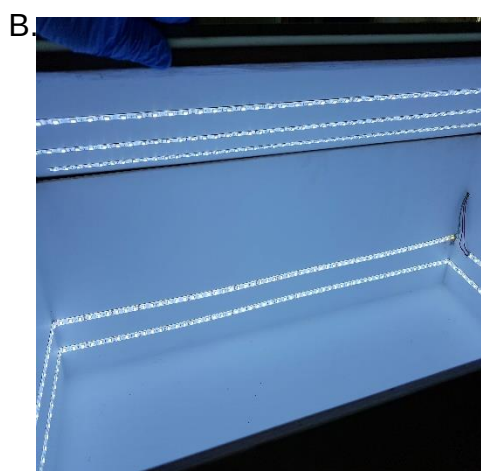
APÊNDICE – Fotos

1 - Tubetes com sementes de arroz cultivar BRS-Esmeralda para produção de mudas(A), solução nutritiva em contato com a raiz da planta (B), comparação da altura das plantas com ausência e presença de selenato de sódio (C), maceração do material vegetal em nitrogênio líquido (D), extrato do material vegetal pronto para análise bioquímica (E), e quantificação de açúcar total (F).



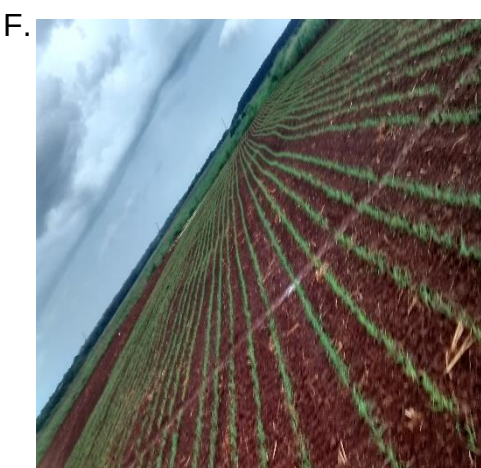
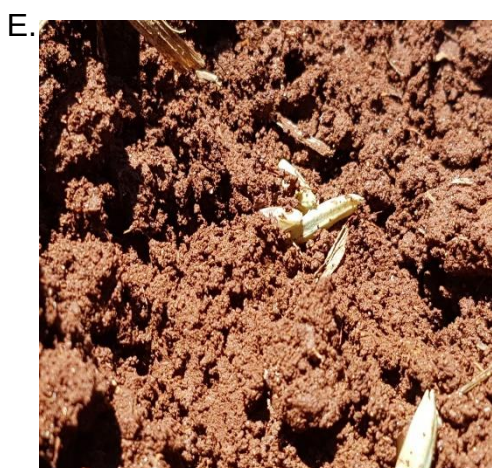
Fonte: Do próprio autor (2020).

2 - Espectrofotômetro UV/Vis para a leitura das amostras (A), caixa de luz para o banho de luz SOD (B), amostras após o banho de luz (C), tubo contendo material vegetal para a digestão em micro-ondas (D), material vegetal digerido (E), e aparelho micro-ondas para digestão fechada (F).



Fonte: Do próprio autor (2020).

3 - Sementes de arroz cultivar BRS-Esmeralda (A), tratamento das sementes (B), produto utilizado no tratamento de sementes (C), semeadura (D), verificação da distribuição das sementes no solo (E), e desenvolvimento da cultura 6 DAE (F).



Fonte: Do próprio autor (2020).

4. Desenvolvimento da cultura aos 13 DAE (A), realização da capina aos 28 DAE (B) e primeira adubação nitrogenada realizada aos 35 DAE (C).

A.



B.



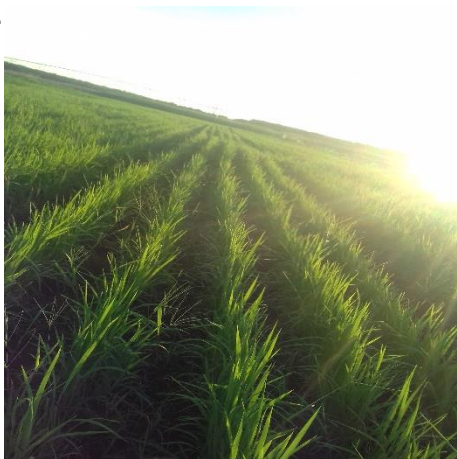
C.



Fonte: Do próprio autor (2020).

5. Desenvolvimento da cultura aos 41 DAE (A), capina aos 56 DAE (B), floração do arroz (C), aplicação foliar do Se aos 67 DAE (D), aplicação foliar do Zn aos 86 DAE (E), e colheita do arroz aos 119 DAE (F).

A.



B.



C.



D.



E.



F.



Fonte: Do próprio autor (2020).