

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOFORTIFICAÇÃO E TOXICIDADE DE SELÊNIO NA
CULTURA DA ALFACE EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Raphael Leone da Cruz Ferreira

Engenheiro Agrônomo

2016

**D
I
S
S.**

/

**F
E
R
R
E
I
R
A**

**R.
L.
C.**

**2
0
1
6**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOFORTIFICAÇÃO E TOXICIDADE DE SELÊNIO NA
CULTURA DA ALFACE EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Raphael Leone da Cruz Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Renato de Mello Prado

Coorientador: Dr. Flávio José Rodrigues Cruz

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

2016

Ferreira, Raphael Leone da Cruz
F383b Biofortificação e toxicidade de selênio na cultura da alface em
solução nutritiva / Raphael Leone da Cruz Ferreira. -- Jaboticabal,
2016
iii, 36 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Renato de Mello Prado
Coorientador: Flávio José Rodrigues Cruz
Banca examinadora: Carmen Rosa Betancourt Aguilar, Wanderley
José de Melo
Bibliografia

1. Selênio. 2. Biofortificação. 3. Toxicidade. 4. Alface. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.453:635.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento
da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal.

unesp 

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOFORTIFICAÇÃO E TOXICIDADE DE SELÊNIO NA CULTURA DA ALFACE EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

AUTOR: RAPHAEL LEONE DA CRUZ FERREIRA
ORIENTADOR: RENATO DE MELLO PRADO
COORIENTADOR: FLÁVIO JOSÉ RODRIGUES CRUZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (CIÊNCIA DO SOLO), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. **RENATO DE MELLO PRADO**
Departamento de Solos e Adubos / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. **CARMEN ROSA BETANCOURT AGUILAR**
Faculdade de Agronomía da Universidad de Cienfuegos - Cuba



Prof. Dr. **WANDERSONY JOSÉ DE MELO**
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de setembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAPHAEL LEONE DA CRUZ FERREIRA – Nascido em Santarém, PA, no dia 25 de dezembro de 1990, filho de Glaucylene Mary Pereira Cruz. Ingressou em 2010 no curso Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia - Belém, PA, concluindo sua graduação no final de 2014. Durante a vida acadêmica foi estagiário voluntário do laboratório de Fisiologia Vegetal por 06 meses, após isto foi bolsista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, trabalhando com cultura de tecidos sob orientação da Dr. Ilmarina Campos de Menezes durante 18 meses, e monitor da disciplina Manejo e Conservação do Solo por 12 meses. Em março de 2015 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista CNPq por 18 meses. Cumprindo com suas obrigações dentro do programa e participando do Grupo de Estudos em Nutrição de Plantas (GENPLANT).

Porque todo o que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo, a nossa fé.

1 João 5:4

A DEUS

Ofereço.

A minha querida mãe, Glaucylene Cruz, e ao meu
tio Fabrício Cruz, pelo incentivo aos estudos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e força para concluir mais uma etapa da minha vida, superando as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato de Mello Prado por ter aceitado o desafio e acreditado no trabalho que poderíamos desenvolver juntos.

Ao meu coorientador Dr. Flávio José Rodrigues Cruz pela atenção dispensada em todos os momentos do mestrado, ensinando desde o experimento até a redação científica e sempre exigindo o meu melhor.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo) pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Grupo de Estudos em Nutrição de Plantas – GENPLANT, que contribuiu com a minha evolução durante os seminários realizados nas reuniões do grupo.

A minha maior incentivadora e mãe Glaucylene Cruz, pelo amor incondicional, pelas lutas vencidas e pela sua fé que eu posso ir cada vez mais longe, te amo.

A minha figura paterna e tio Fabrício Cruz, detentor de toda a minha admiração, tanto profissional e principalmente pessoal, um exemplo a ser seguido de pessoa trabalhadora e que ama sua família acima de tudo.

Aos meus avós maternos Leopoldo Cruz e Carolina Cruz pelo amparo, carinho, apoio, confiança e exemplo de vida, esta vitória também é de vocês.

Aos meus irmãos queridos Érick Cruz (*in memoriam*) e Matias Junior pelo companheirismo e apoio, junto aos demais familiares.

A minha namorada Manami Yamamoto, pelo amor, carinho e paciência, sempre acreditando e torcendo pelas minhas conquistas.

Aos amigos Michel Sato, Katiane Barros, Kilma Lima, Daniel Pinheiro, Nilvan Melo, Carlos Almeida, Luma Souza, Reinaldo Moraes e Flávio Cruz pela ajuda na caminhada.

Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cultura da alface	3
2.2 Selênio	4
2.3 Biofortificação e toxicidade de plantas com selênio	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO.....	21
7. REFERÊNCIAS	22

BIOFORTIFICAÇÃO E TOXICIDADE DE SELÊNIO NA CULTURA DA ALFACE EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

RESUMO - As informações sobre fontes de selênio (Se) em alface são incipientes na literatura, sobretudo, com relação ao limite entre biofortificação e toxicidade. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar níveis críticos de Se na solução nutritiva e foliar, e a melhor fonte que aumente a biofortificação da alface hidropônica sem causar toxicidade. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado representado por duas fontes de selênio, selenito de sódio (Na_2SeO_3) e selenato de sódio (Na_2SeO_4), dez concentrações de selênio (0; 2; 4; 6; 8; 16; 32; 64; 96; 128 μM) com quatro repetições por tratamento, totalizando 80 unidades experimentais. As concentrações adequadas estão entre 5,6 e 16 μM de selênio na forma selenato em solução nutritiva e teores foliares adequados de 10,2 a 41,8 mg kg^{-1} de selênio.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L , nível crítico, selenato, selenito

BIOFORTIFICATION AND SELENIUM TOXICITY IN CULTURE OF LETTUCE IN NUTRIENT SOLUTION

ABSTRACT - Information on sources of selenium (Se) in lettuce are scarce in the literature, especially with respect to the boundary between Biofortification and toxicity. The objective of this study was to determine critical levels of Se in the nutrient solution and leaf and the best source to increase biofortification of hydroponic lettuce without causing toxicity. The experimental design was completely randomized represented by two sources of selenium, sodium selenite (Na_2SeO_3) and sodium selenate (Na_2SeO_4) ten selenium concentrations (0. 2. 4. 6. 8. 16. 32. 64. 96. 128 μM) with four replicates per treatment, totaling 80 experimental units. The concentrations are between 5.6 and 16 μM selenium selenate form the nutrient solution and appropriate foliar 10.2 to 41.8 mg kg^{-1} of selenium.

Keywords: *Lactuca sativa* L, critical level, selenate, selenite

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é listado entre os 22 elementos minerais necessários à dieta humana por entrar na constituição de um conjunto de proteínas que participam ativamente do metabolismo humano. Dentre estas proteínas, destacam-se a glutathione peroxidase com função antioxidante e a iodotironina deiodinase com importante função no metabolismo do hormônio tireoidiano (DUNTAS; BENVENGA, 2015). Apesar da importância deste elemento mineral na dieta humana, estima-se que 15% da população mundial apresenta deficiência de Se, e este fato pode ser atribuído ao seu baixo teor nos solos (HAWRYLAK-NOWAK, 2013), o que reflete na planta e no ser humano.

Para evitar o aparecimento de doenças inerentes à nutrição insuficiente de Se em humanos, é recomendada a ingestão diária de 55 µg deste elemento por adulto, e acima deste valor pode haver o aparecimento de sintomas de toxicidade (BOYD, 2011). Portanto, é importante identificar a faixa de concentração de Se em plantas, a fim de estabelecer indicações adequadas do elemento na solução nutritiva de cultivo para suprir a dieta humana por Se. Este fato é oportuno, sobretudo, em espécies folhosas amplamente consumidas no mundo como alface e com custo baixo em relação a outros alimentos como castanha-do-Brasil e carne, que reconhecidamente têm alto teor de Se.

Neste sentido, a utilização de plantas comestíveis constitui uma forma de minimizar a deficiência de Se a partir de uma estratégia que na nutrição mineral de plantas é reconhecida como biofortificação de plantas, a qual é implementada via adubação ou melhoramento genético vegetal (GRAHAM et al., 2007; ÇAKMAK, 2008). Entretanto, conhecer o limite entre biofortificação e toxicidade de Se em plantas de alface é importante, pois o excesso deste elemento mineral na solução nutritiva induz o comprometimento do crescimento vegetal desencadeado pela toxicidade de Se, que é dependente da dose, fonte e cultivar utilizada.

Na literatura há relatos segundo os quais as plantas de alface apresentam maior tolerância à toxicidade de Se na forma selenato em relação a selenito. Estes estudos revelaram decréscimo na biomassa aérea da alface cv. Philipus com

concentração de Se na forma de selenato ($>80\mu\text{M}$) superior a fonte selenito ($>5\mu\text{M}$) (RÍOS et al.2013), e também na cv. Justyna com concentração de Se na forma selenato ($>20\mu\text{M}$) superior ao selenito ($>13\mu\text{M}$) (Hawrylack-Nowak, 2013).

Deve-se ressaltar que as concentrações de Se relatadas como tóxicas e relatadas por Ríos et al. (2013) e Hawrylack-Nowak (2013) para alface foram baseados apenas em teste de médias (comparação entre controle e os tratamentos de selênio) e não a partir da determinação dos níveis críticos de selênio. Na literatura atual, ainda não há informações relativas ao nível crítico de toxicidade de selênio em plantas de alface, impedindo a interpretação do estado nutricional da cultura por toxicidade de Se. Portanto, são necessárias mais informações relativas à concentração e fonte de selênio que promovam maior teor foliar sem risco de toxicidade às planta.

Diante do exposto, este estudo foi conduzido com o intuito de testar a hipótese segundo a qual o limite entre biofortificação e toxicidade de selênio é estreito e dependente da fonte e concentração de selênio. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar níveis críticos de Se na solução nutritiva e foliar, e a melhor fonte que aumente a biofortificação da alface hidropônica sem causar toxicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da alface

A família das Asteráceas abrange as hortaliças mais consumidas do mundo em forma de salada, com destaque para cultura da alface (*Lactuca sativa* L.), que é uma planta herbácea silvestre com origem no sul da Europa e Ásia Ocidental. Esta espécie caracteriza-se por um sistema radicular do tipo ramificado e superficial, chegando a explorar até 0,60 m de profundidade, quando cultivada em condições favoráveis (FILGUEIRA, 2008).

Embora sejam plantas de regiões temperadas, a entrada de cultivares melhoradas geneticamente proporcionou seu cultivo em climas tropicais, com disponibilidade da cultura durante todo o ano (FILGUEIRA, 2008). Para este autor, o uso de novas tecnologias de cultivo tem contribuído para o aumento da produção desta hortaliça, sendo o cultivo hidropônico o mais utilizado atualmente.

Mudanças importantes na alfacicultura brasileira ocorreram na última década, pois a preferência por alface tipo crespa teve um significativo aumento em comparação ao tipo lisa, representando atualmente 53% da alface consumida dentro do Estado de São Paulo. Neste segmento de alface crespa, as cultivares Verônica e Vera, lançadas nos anos 90 tem liderado o mercado nacional (SALA; COSTA, 2012).

A cultivar de alface Vera foi selecionada pelo cruzamento das cultivares Veronica e Slow Bolting em ensaios desenvolvidos em regiões produtoras do Estado de São Paulo. As plantas desta cultivar são vigorosas e com folhas crespas, resistentes ao florescimento prematuro induzido por altas temperaturas e ponto de colheita variando entre 50 e 70 dias (DELLA VECCHIA et al., 1999).

2.2 Selênio

O selênio (Se) foi descoberto por Jons Jacob Berzelius em 1817, entre os elementos na tabela periódica, o selênio (Se) é classificado como não-metal constituinte da família 6A da tabela periódica. Suas propriedades químicas assemelham-se às do enxofre (S), quanto ao raio atômico, energia de ligação, potencial de ionização e afinidade eletrônica (TINGGI, 2003).

O selênio é listado entre os 22 elementos minerais necessários à dieta humana, por entrar na constituição de um conjunto de proteínas que participam ativamente do metabolismo humano. É recomendado a ingestão diária por adultos de 55 μg de Se para evitar o surgimento de doenças referentes a sua deficiência. Entretanto, acima desta quantidade pode ocorrer o aparecimento de sintomas de toxicidade (BOYD, 2011).

Apesar da importância deste elemento na dieta humana, estima-se que 15% da população mundial apresente deficiência em Se, e este fato pode ser atribuído ao seu baixo teor nos solos (HAWRYLAK-NOWAK, 2013). O Se é fundamental ao metabolismo humano, pelo fato de participar da estrutura de proteínas denominadas selenoproteínas as quais têm várias funções como a de neutralizar espécies reativas de oxigênio, além de auxiliar na prevenção de doenças (RAMOS et al., 2011b).

Como os demais elementos-traço, o Se é um constituinte da crosta terrestre, sendo extraído do solo e incorporado à alimentação animal e de humanos através das plantas. Ele é encontrado nos solos em baixas concentrações, que variam de 0,01 - 2 mg kg^{-1} . Entretanto, sua distribuição é desuniforme, existindo regiões do mundo que apresentam solos com quantidades superiores, sendo estes denominados como solos seleníferos. Estes solos estão presentes em países como Estados Unidos, China e Irlanda que apresentam concentrações acima de 28 mg kg^{-1} (PRAUCHNER, 2014).

Na nutrição de plantas, o Se é considerado um elemento mineral benéfico, pois as plantas podem crescer e se desenvolver na ausência deste elemento mineral. Apesar disso, sua adição promove um incremento nos parâmetros de crescimento de culturas agrícolas, além do seu efeito antioxidante na planta (RÍOS et al., 2008a; HAWRYLAK-NOWAK, 2013).

2.3 Biofortificação e toxicidade de plantas com selênio

Objetivando-se minimizar os efeitos inerentes à deficiência de Se na dieta humana, o aumento da concentração de Se nos alimentos é uma alternativa promissora, sobretudo, em plantas de interesse agrícola. Neste sentido, o uso de plantas comestíveis constitui uma forma de minimizar a deficiência na ingestão de Se através de uma estratégia que na nutrição de plantas é conhecida como biofortificação a qual é implementada via adubação ou melhoramento genético vegetal (GRAHAM et al., 2007; ÇAKMAK, 2008), ou ainda, pela associação de ambas. Isto é possível pelo fato do transportador de membrana utilizado pelo Se ser o mesmo utilizado pelo enxofre, dada a similaridade química entre estes dois nutrientes (WHITE, 2016).

Devido à capacidade das plantas de absorverem o Se, elas podem ser classificadas quanto ao teor deste elemento mineral em seu tecido foliar, diferindo entre si em hiperacumuladoras (1000-15000 mg Se kg⁻¹ de massa seca), acumuladoras (100-1000 mg Se kg⁻¹ de massa seca) e não acumuladoras (<100 mg Se kg⁻¹ de massa seca) (WHITE, 2016). Entretanto, as plantas de interesse agrônomico normalmente não são acumuladoras de Se, pois possuem teores menores que 25 mg kg⁻¹ (PRAUCHNER, 2014).

A toxicidade de Se é originada a partir da substituição do enxofre pelo Se no aminoácido cisteína e metionina, e por induzir o estresse oxidativo. A assimilação do Se ocorre via cisteína, que é incorporado em proteínas não específicas em plantas não acumuladoras de Se (VAN HOEWYK, 2013; DIMKOVIKJ; VAN HOEWYK, 2014). Sendo assim, a estrutura terciária das proteínas é alterada e isto interfere na formação de pontes dissulfeto, originando proteínas má formadas e sem funcionalidade (VOET; JUDITH, 2013).

Para a cultura da alface, considerada principal hortaliça folhosa do Brasil (SALA; COSTA, 2012), um fator que deve ser considerado na toxicidade de Se é a demanda transpiratória das plantas que, em condições tropicais de elevada temperatura de cultivo, pode aumentar a absorção de Se dissolvido na solução nutritiva e tornar as concentrações consideradas biofortificantes em tóxicas às

plantas, sobretudo em espécies cujo crescimento e desenvolvimento são acelerados pela temperatura elevada do verão.

A caracterização do Se como um elemento benéfico ou tóxico é variável, pois o limite entre biofortificação e toxicidade em plantas de alface pode ser modificado em função da fonte e concentração de Se. Em estudos que avaliam a toxicidade de Se em plantas de alface, duas fontes têm sido amplamente utilizadas nas pesquisas, que são o selenito (Na_2SeO_3) e selenato (Na_2SeO_4).

Quando é utilizado o selenato, o maior teor de Se é registrado na biomassa aérea da planta, pois esta fonte de Se é absorvida pelos transportadores de sulfato e translocado em maior quantidade e incorporado em compostos orgânicos. Por outro lado, o selenito é incorporado em compostos orgânicos ainda no sistema radicular, ficando retido em maior quantidade neste órgão devido a fonte selenito estar em uma forma química mais reduzida (RÍOS et al., 2008a; MALAGOLI et al., 2015).

A adição de Se em altas concentrações na solução nutritiva pode promover sintomas de toxicidade em plantas, que implicam redução de crescimento, alteração nos pigmentos fotossintéticos e aparecimentos de clorose (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; MALAVOLTA, 1980). Vários estudos reportam a ação de fontes de Se (selenato e selenito) em plantas. Ríos et al. (2013) relatam que acima de $80 \mu\text{M}$ de Se na forma selenato há redução de 13% do crescimento da parte aérea de plantas de alface. Ainda de acordo com estes autores, o selenito a partir da concentração de $5 \mu\text{M}$ promoveu redução de 25% no crescimento de plantas de alface.

Resultados reportados por Hawrylak-Nowak (2013) trabalhando com plântulas de alface cultivar Justyna sob temperatura de $22/18 \text{ }^\circ\text{C}$ (dia/noite), mostram que a fonte selenito diminuiu em 30% a massa seca da parte aérea na concentração de $15 \mu\text{M}$ enquanto que para a fonte selenato houve redução de 15,7% na massa seca da parte aérea na concentração de $20 \mu\text{M}$, o que evidencia o efeito tóxico maior da fonte selenito em comparação ao selenato nas planta. Observou-se diminuição de 25% da massa seca da parte aérea de plantas de alface com uso do selenito a partir de $10 \mu\text{M}$ em solução nutritiva, e redução de 12,5% com selenato em concentrações superiores a $40 \mu\text{M}$ (RÍOS et al., 2008b). Portanto os estudos desenvolvidos com alface em solução nutritiva indicam que o selenato é menos tóxico às plantas em comparação ao selenito, como evidenciado por Ríos et al. (2008b). Estes autores

observaram que o teor de Se até 15 mg kg⁻¹ para a fonte selenato e até 6 mg kg⁻¹ para a fonte selenito promoveram efeitos benéficos. Porém, quando o teor foliar ultrapassou estes valores, o Se desencadeou efeitos tóxicos às plantas. Além disso, o aumento das concentrações de selênio em solução nutritiva pode atingir valores tóxicos às plantas, alterando o teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*) e, conseqüentemente, reduzir a produção de massa seca da cultura (SAFFARYAZDI et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para produção das mudas de alface, foram utilizadas bandejas de poliestireno preenchida com vermiculita e substrato orgânico Basaplant Hortaliças na proporção 1:1. O substrato utilizado é composto por casca de pinus, turfa, carvão e nutrientes. Posteriormente, as mudas de alface foram selecionadas de acordo com o vigor e uniformidade. Após dez dias da emergência (DAE), as raízes das mudas foram lavadas com água deionizada e, a seguir, transplantadas para vasos definitivos de 2 L de capacidade (15 cm largura x 15 cm comprimento x 11 cm altura) contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). A força iônica inicial da solução foi de 25%, sendo a mesma aumentada para 50, 75 e 100% à medida que a solução nutritiva foi trocada em intervalos de três dias. Durante o período experimental, a temperatura e umidade relativa do ar foram registradas mediante uso de um datalogger. Os dados de temperatura e umidade relativa do ar (mínima, máxima e média) estão apresentados na figura 1.

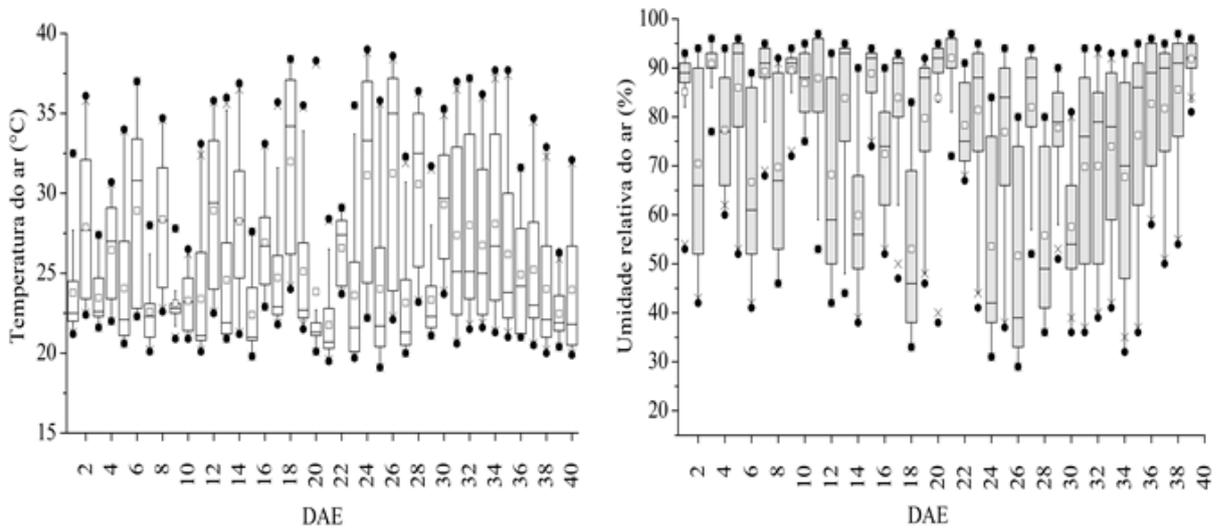


Figura 1. Temperatura e umidade relativa do ar registrados ao longo de 40 dias após a emergência (DAE) de plantas de alface cultivadas em solução nutritiva, com máxima (●), mínima (●), média (□) e desvio padrão (barra em coluna).

A cultivar de alface utilizada foi a Vera, devido sua resistência ao florescimento prematuro induzido por altas temperaturas, com ponto de colheita de 50 a 70 dias (DELLA VECCHIA et al., 1999).

A aplicação dos tratamentos de selênio (Se) ocorreu 28 DAE e, durante 12 dias, as plantas ficaram expostas às formas de Se. O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e mantido em $5,6 \pm 0,2$ utilizando-se solução de HCl ou NaOH 0,1 M quando necessário.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial representado por duas fontes de selênio (selenito de sódio - Na_2SeO_3 ; e selenato de sódio - Na_2SeO_4) e dez concentrações de Se (0, 2, 4, 6, 8, 16, 32, 64, 96 e 128 μM) com quatro repetições por tratamento, totalizando 80 unidades experimentais.

Ao final do experimento procedeu-se a colheita das plantas, lavando com água deionizada e separando em parte aérea e raiz. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa de ventilação forçada de ar a 60 °C por 48 horas. A massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) foi determinada utilizando balança analítica, com unidade expressa em g por planta.

O teor de selênio foi determinado pelo método de emissão de raio-x por energia dispersiva (EDXRF), conforme metodologia descrita por Tezotto et al. (2013). Um grama de massa seca foliar previamente triturado a pó fino foi colocado em porta amostra de polietileno de 20 mm de diâmetro interno coberto por filme de polipropileno de 6 μm de espessura. As amostras foram irradiadas por 300 s sob vácuo utilizando-se espectrômetro de emissão de raio-x por energia dispersiva (Shimadzu EDX-720). As amostras foram irradiadas utilizando-se um tubo de raio-x de Rh (ródio) operado a 15 e 50 Kv. A corrente foi automaticamente ajustada (máximo de 1 mA). A detecção foi conduzida usando-se um detector de Si (Li) resfriado com nitrogênio líquido. A intensidade do elemento de contagem $k\alpha$ por segundo (cps/ μs) foi determinada a partir de uma amostra de espectro de deconvolução de raio-x utilizando-se o software EDX Shimadzu

A área foliar (AF) foi determinada pelo método do disco foliar utilizando-se dez discos retirados do limbo de folhas totalmente expandidas, evitando-se as nervuras

(HUERTA, 1962; GOMIDE et al., 1977). O cálculo da área foliar foi obtido de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Área foliar (cm}^2 \text{ planta}^{-1}) = \frac{10 \times \text{área disco} \times \text{MSTF}}{\text{MSTD}}$$

Onde:

AF = área foliar

MSTF = massa seca de todas as folhas da planta

MSTD = massa seca de todos os discos foliares da planta

Área do disco = $\pi \times R^2$

Os teores de clorofilas *a* (Clor *a*) e *b* (Clor *b*) foram extraídos a partir de quatro disco foliares de 1 cm de diâmetro os quais foram pesados em balança analítica e, a seguir, incubados em acetona a 80% (ARNON, 1949) por 48 horas sob agitação constante e à temperatura de 15 °C. A seguir, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 646 e 663 nm. Os teores de pigmentos foram expressos em mg de pigmento por centímetro quadrado (mg cm⁻²), de acordo com Lichtenthaler (1987). Os cálculos dos teores de clorofilas foram feitos de acordo com as equações abaixo:

$$\text{Clorofila } a = \frac{12,25ABS_{663} - 2,79ABS_{646}}{\text{Área do disco}}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{21,50ABS_{646} - 5,10ABS_{663}}{\text{Área do disco}}$$

Onde:

ABS: absorbância

A determinação dos níveis críticos de toxicidade de Se foi realizada relacionando-se as concentrações das fontes de Se presentes na solução nutritiva e a variável resposta crescimento expressa em crescimento relativo. Nas figuras

relativas ao crescimento, optou-se por expressar a unidade em grama por planta. Considerou-se como tóxica a concentração de Se na solução nutritiva correspondente a uma redução de 10% da máxima produção de massa seca das plantas (DAVIS et al., 1978; FAGERIA, 2000). O acúmulo de Se na alface foi obtido pelo produto da massa seca pelo teor de selênio na parte aérea, na mesma concentração em solução nutritiva, conforme a equação abaixo:

$$\text{Acúmulo de Se (mg planta}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Teor de Se total (mg kg}^{-1}\text{) x MSPA (g planta}^{-1}\text{)}}{1000}$$

Os dados foram submetidos à análise de variância a 1% de probabilidade pelo teste de Fisher (F). Para as variáveis significativas foi realizada a análise de regressão polinomial do fator quantitativo concentração de selênio da solução nutritiva e o teste de Tukey para o fator qualitativo fonte de selênio. A escolha dos modelos de regressão polinomial foi realizada com base na significância dos tratamentos atestada pelo teste F e no melhor ajuste à variável resposta (R^2). Para as análises estatísticas foram utilizados os pacotes estatísticos Sigmaplot e Sisvar.

4. RESULTADOS

O aumento das concentrações de selênio na solução nutritiva promoveu incremento no teor de Se foliar para as fontes selenito e selenato (Figura 2a,b). Para a fonte selenato, o teor máximo de 440 mg kg^{-1} de Se foliar ocorreu na maior concentração de selênio na solução nutritiva. Entretanto, para selenito o teor foliar máximo de $20,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se ocorreu na concentração de $125 \text{ }\mu\text{M}$ de selênio na solução nutritiva.

O fornecimento de selênio em concentrações crescentes na solução nutritiva promoveu aumento do Se foliar acumulado nas plantas de alface na fonte selenato e selenito (Figura 2c,d). Para as duas fontes de selênio foi observado ajuste quadrático, sendo o selenato a fonte que promoveu maior acúmulo foliar, com ponto de máximo de $2100,6 \text{ }\mu\text{g}$ de Se por planta na concentração $83 \text{ }\mu\text{M}$ de selênio na solução nutritiva. Por outro lado, a fonte selenito promoveu acúmulo de Se com ponto de máximo de $157 \text{ }\mu\text{g}$ de Se por planta na concentração $87 \text{ }\mu\text{M}$ de selênio na solução nutritiva.

A adição de Se alterou o teor dos pigmentos fotossintéticos, independentemente das fontes utilizadas (Figura 3). No entanto, na fonte selenito mostrou-se mais danosa que o selenato. Para as concentrações de selênio, os teores de clorofila *a* e *b* diferiram significativamente nas duas formas de selênio utilizadas.

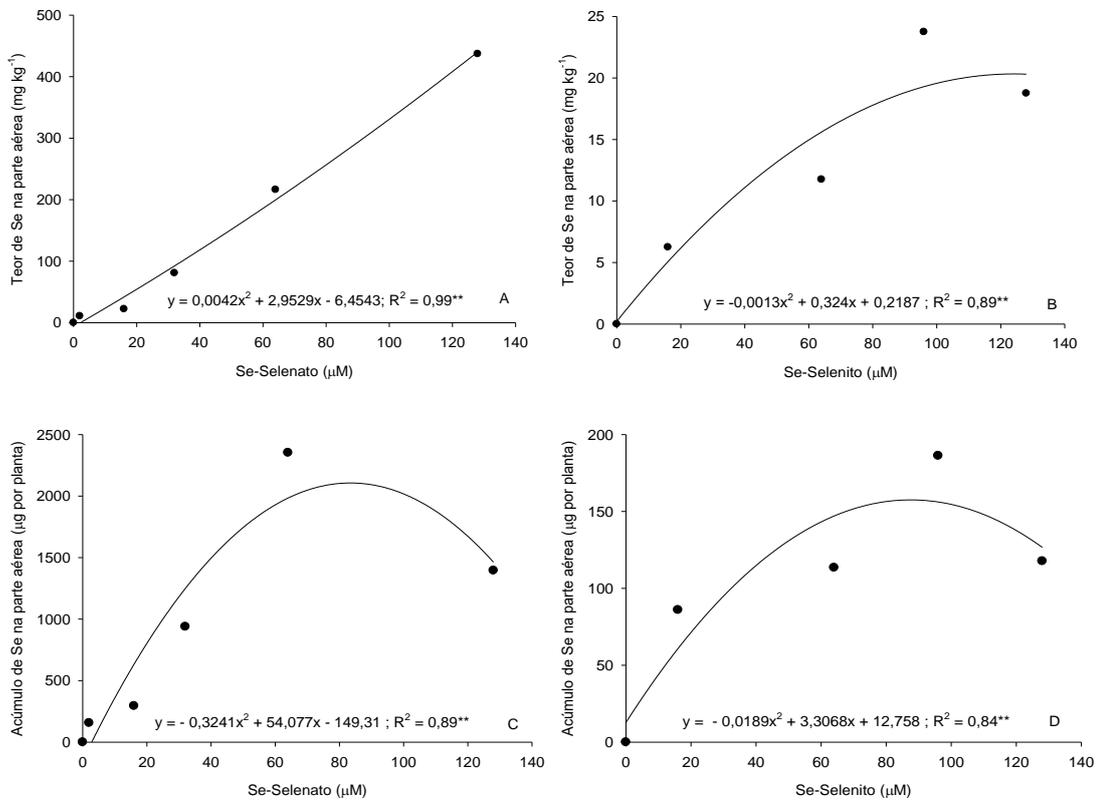


Figura 2. Efeito das concentrações de selênio (Se) no teor (A) e acúmulo (C) na fonte selenato, e teor (B) e acúmulo (D) na fonte selenito, em folhas de alface em solução nutritiva.

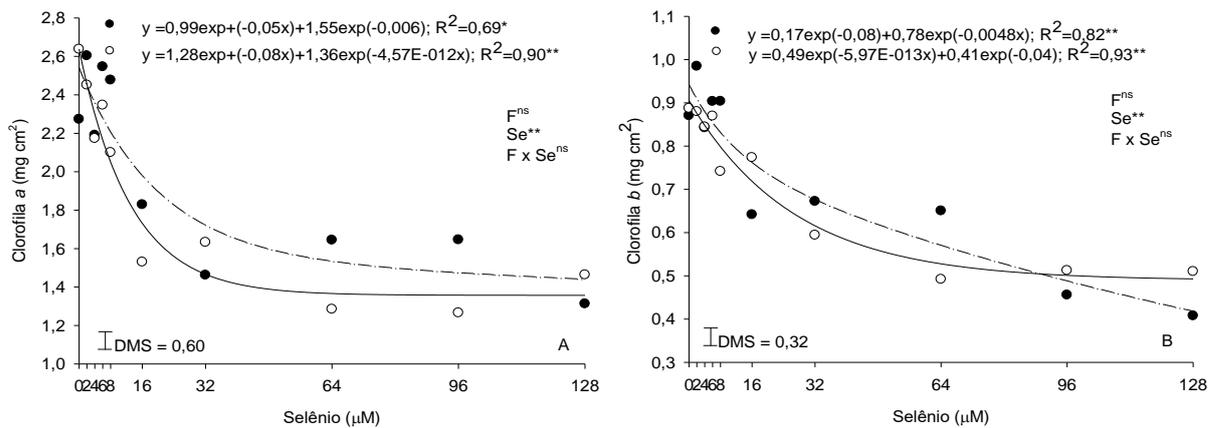


Figura 3. Efeito das concentrações de selênio (Se) em duas fontes (F) (—○— selenito; --●-- selenato) em solução nutritiva no teor de clorofila a (A) e clorofila b (B) em folhas de alface. ****p < 0,01** e ***p < 0,05**. Diferença mínima significativa (DMS) para comparação das concentrações de Se nas fontes selenito ou selenato.

As plantas de alface apresentaram área foliar com ponto de máximo de 891,01 e 910,16 cm² por planta, correspondentes às concentrações de 13,6 e 8,30 µM selenato e selenito, respectivamente (Figura 4a). Houve interação entre os fatores fontes e concentrações de selênio, com significância ao nível de 1% de probabilidade para a variável área foliar.

O aumento das concentrações de selênio da solução nutritiva promoveu um incremento na massa seca da parte aérea (MSPA) em baixas concentrações, seguida de uma redução no crescimento em altas concentrações de selênio na solução nutritiva. Estas diferenças foram significativas para as fontes e doses de Se (Figura 4b).

A MSPA ajustou-se às concentrações de selênio com base em funções logísticas exponenciais. Na fonte selenito a MSPA apresentou ponto máximo de 16 g de MSPA por planta na concentração de 8,4 µM de selênio. Por outro lado, na fonte selenato a MSPA atingiu ponto máximo de 15 g por planta na concentração 5,6 µM de selênio. Observou-se que o nível crítico de toxicidade foi de 14 e 16 µM de selênio para as fontes selenito e selenato respectivamente. Relacionando estas concentrações de selênio (14 e 16 µM da solução nutritiva), referentes ao nível crítico de toxicidade, aos seus respectivos teores foliares das plantas de alface, foi observado que estes foram de 4,5 e 41,8 mg kg⁻¹ de Se respectivamente (Figura 2a,b).

A aplicação de concentrações de selênio em solução nutritiva promoveu um aumento na massa seca da raiz (MSR) (Figura 4c) atingindo ponto de máximo de 2,15 e 2,32 g por planta na concentração de selênio de 6,32 e 17,3 µM de selenito e selenato, respectivamente, com diferenças significativas para fontes e doses de selênio. O nível crítico de toxicidade observado para a MSR foi de 30 e 9,7 µM de selenato e selenito, respectivamente (Figura 4c).

A toxicidade de Se induziu sintomas visuais na folha de alface. Foram observados que os sintomas iniciais de toxicidade de Se são semelhantes entre as fontes. Estes sintomas se caracterizaram pela clorose uniforme e diminuição do tamanho da folha, sendo evidentes na concentração de 32 e 16 µM nas fontes selenato e selenito, respectivamente, (Figura 5b,d) em relação às plantas controle (Figura 5a). Com o tempo, houve redução do tamanho das folhas, clorose intensa e

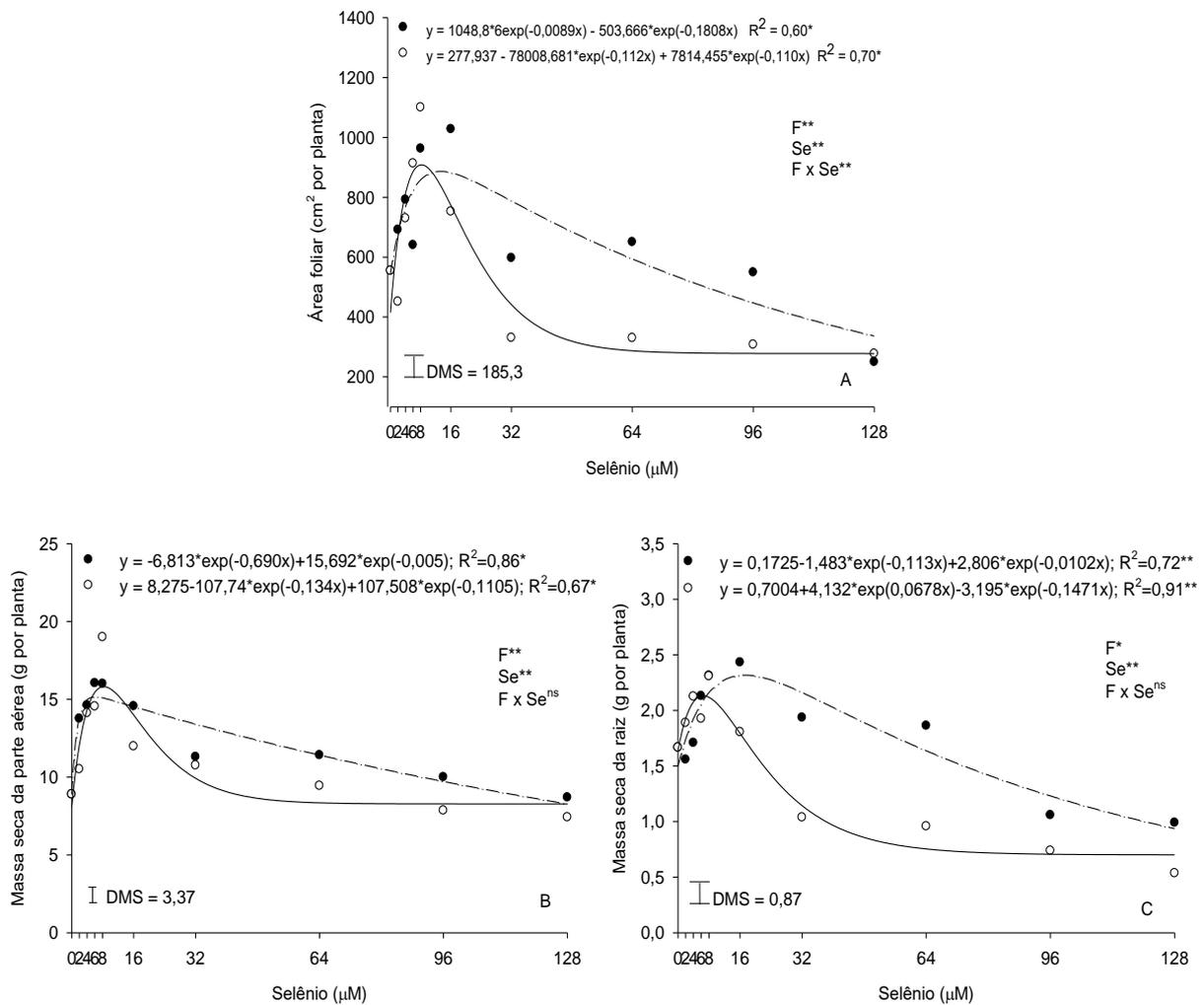


Figura 4. Efeito das concentrações de selênio (Se) em duas fontes (F) (—○— selenito; --●-- selenato) em solução nutritiva na área foliar (A), massa seca da parte aérea (B) e raiz (C) em plantas de alface. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. Diferença mínima significativa (DMS) para comparação das concentrações de Se nas fontes selenito ou selenato.

uniforme em ambas as fontes na maior concentração de selênio (Figura 5c,e). Similarmente às folhas, a toxicidade causada pelo selênio provocou modificações no sistema radicular da planta. Os sintomas iniciais caracterizaram-se pela redução no tamanho da raiz, maior sensibilidade à quebra e engrossamento do sistema radicular. Estes sintomas visuais foram intensos na concentração de 32 e 16 µM nas fontes selenato e selenito (Figura 6b,d), respectivamente, em comparação às plantas controle (Figura 6a). Foi observado, também, escurecimento das raízes na fonte selenito, sendo estes sintomas intensificados nas duas fontes utilizadas na maior concentração de Se (Figura 6c,e)

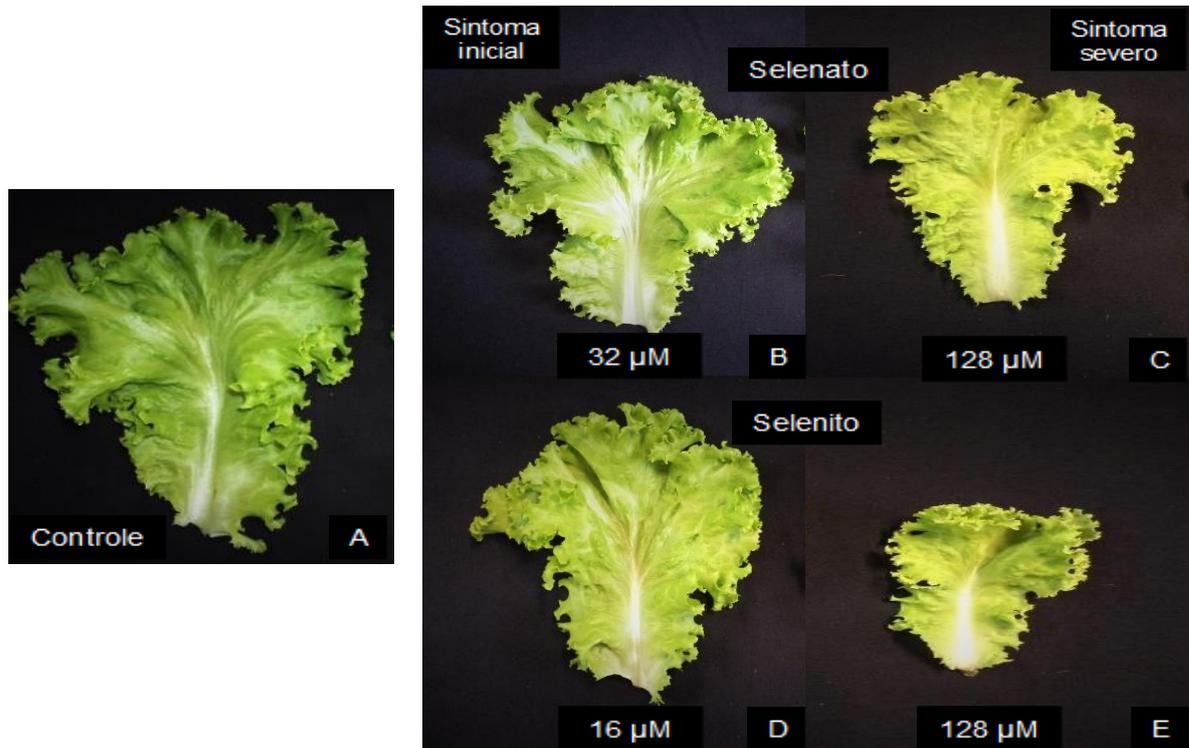


Figura 5. Sintomas de toxicidade de Se em folhas de alface. Controle (A) comparado à aplicação de selênio. Sintomas iniciais (B) e severo (C) na fonte selenato, e sintomas iniciais (D) e severo (E) na fonte selenito.



Figura 6. Sintomas de toxicidade de Se no sistema radicular de alface. Controle (A) comparado à aplicação de selênio. Sintomas iniciais (B) e severo (C) na fonte selenato, e sintomas iniciais (D) e severo (E) na fonte selenito.

5. DISCUSSÃO

O maior teor e acúmulo de Se na biomassa aérea (Figura 2) ocorreu na fonte selenato, devida esta fonte ser rapidamente absorvida pelos transportadores de sulfato, ser pouco acumulado na raiz e translocado para a parte aérea e, nesta estrutura, incorporado em compostos orgânicos, contrariamente ao que é observado para a fonte selenito. Esta fonte de selênio é incorporado em compostos orgânicos ainda no sistema radicular, ficando o Se retido em maior quantidade neste órgão (RÍOS et al., 2008a; RAMOS et al., 2010; RAMOS et al., 2011a,b; MALAGOLI et al., 2015).

Os resultados encontrados no presente estudo são similares aos observados com cinco cultivares de alface em solução nutritiva, no qual o selenato promoveu maior teor de Se na parte aérea em comparação a fonte selenito, em todas as cultivares estudadas (RAMOS et al., 2011a).

O Se é essencial para humanos por entrar na constituição bioquímica de um conjunto de proteínas que são fundamentais no funcionamento do metabolismo, e sua deficiência implica o aparecimento de várias doenças como câncer, diabetes tipo II, cardiopatias, disfunções pulmonares, entre outras (SEVEN et al., 2013; PITTS et al., 2014; PIECZYŃSKA; GRAJETA, 2015).

No Estado de São Paulo - Brasil, o consumo per capita de alface é de 8,5 g por dia (PAULUS, 2008) e, considerando que a percentagem média de matéria seca de plantas de alface crespa é 4,5% (RYDER, 1999) e que a recomendação de ingestão diária de Se por adultos é 55 µg por dia (BOYD, 2011). Neste sentido, o teor foliar de Se respectivo à concentração de 5,6 µM de selenato, a qual não contribui para redução do crescimento das plantas de alface, proporciona 5% da recomendação de ingestão diária de Se em humanos adultos. No entanto, a fonte selenito proporcionou apenas 1,4% da recomendação.

A diminuição dos teores de Clor *a* e *b* (Figura 3) nas plantas de alface ocorreu em função do aumento das concentrações de selênio nas formas fornecidas, afetando diretamente o crescimento das plantas. As reduções nos teores de Clor *a* e *b* é devido o processo de absorção da energia luminosa pelos pigmentos clorofilianos e conversão desta em energia química pelo aparato fotoquímico da

fotossíntese ter sido afetada, impactando negativamente na fixação de CO₂ e produção de matéria seca, como observado por Saffaryazdi et al. (2012). Segundo estes autores, a suplementação de selênio na forma de selenato de sódio acima de 1 µM promoveu redução dos teores de Clor *a* e Clor *b*.

No presente estudo, as concentrações de Se que produziram um efeito benéfico às plantas de alface ao incrementar a biomassa aérea foram de 5,6 e 8,4 µM para selenato e selenito respectivamente. Acima destas concentrações houve redução do crescimento. Estas concentrações encontradas no presente estudo são menores que aquelas encontradas por Hawrylak-Nowak. (2013) que verificou aumento no crescimento nas concentrações de selênio até 15 e 20 µM para as fontes selenito e selenato respectivamente.

Para as variáveis área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) (Figura 4), observou-se incremento na produção em baixas concentrações de Se na solução nutritiva, seguida de reduções no crescimento nas maiores concentrações de Se, sendo a fonte selenato menos danosa às plantas em comparação ao selenito. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Hawrylak-Nowak (2013) trabalhando com alface hidropônico.

A diminuição nas variáveis de crescimento estão relacionadas com a similaridade química entre selênio e enxofre, ambos os elementos minerais apresentam a mesma rota de absorção e assimilação, pois o Se pode ser absorvido e assimilado via aminoácido cisteína e este, agora denominado selenocisteína, pode ser incorporado em selenoproteínas não específicas em plantas não acumuladoras de Se (ZHU et al., 2009; VAN HOEWYK, 2013; DIMKOVIKJ; VAN HOEWYK, 2014).

Este fato altera a estrutura conformacional de várias proteínas, pois o aminoácido cisteína tem função crucial na formação de pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária de proteínas (VOET; JUDITH, 2013), o que resulta em maior dano no metabolismo das plantas e, conseqüentemente, no crescimento vegetal.

Os níveis críticos de toxicidade (NC_{tox}) de selênio foram superiores na fonte selenato (MSPA = 16 µM; MSR = 30 µM) em comparação ao selenito (MSPA = 14 µM; MSR = 9,7 µM). Estas diferenças estão relacionadas com a rápida incorporação

do selenito em compostos orgânicos ainda nas raízes, em comparação ao selenato que não é acumulado na raiz e translocado à parte aérea para depois promover sua toxicidade (VAN HOEWYK, 2013).

Em estudo com a cultivar Philipus cultivada sob níveis tóxicos de selênio e temperaturas média diurna de 25°C, Ríos et al. (2013) observaram que o selenato e selenito manifestaram toxicidade nas plantas em concentrações acima de 80 e 5 µM na parte aérea, sendo este valor acima do nível crítico de toxicidade encontrados no presente estudo, induzindo diminuições de 13 e 25% da biomassa aérea, respectivamente.

Em outro estudo com a mesma cultivar e condições de temperatura semelhantes, observou-se diminuição de 25% da massa seca da parte aérea com uso do selenito a partir de 10 µM, e redução de 12,5% com selenato em doses superiores a 40 µM em relação às plantas controle (RÍOS et al., 2008b).

A concentração de Se na solução nutritiva adequada ao cultivo de alface, considerando o máximo acúmulo de biomassa das folhas até o Nctox varia com a fonte, sendo para selenito de 8,4 a 14 µM e selenato de 5,6 a 16 µM, havendo maior amplitude do valor na última fonte.

O teor foliar crítico de toxicidade de Se nas plantas de alface encontrado nas fontes selenato (41,8 mg kg⁻¹) e selenito (4,5 mg kg⁻¹), indicam também que o teor de Se na biomassa aérea depende da fonte utilizada. Em alface cv. Philipus cultivadas em meio hidropônico sob condições de temperatura de 25/15 °C (dia/noite), Ríos et al. (2008a) observaram efeitos tóxicos na planta quando a concentração de Se na folha foi 37 mg kg⁻¹ para selenato e 6 mg kg⁻¹ para selenito.

Resultados reportados por Hawrylak-Nowak (2013) trabalhando com plântulas de alface cultivar Justyna sob temperatura de 22/18 °C (dia/noite), foram superiores aos encontrado no presente estudo, com teor foliar de 30,6 mg kg⁻¹ para selenito, e 43,3 mg kg⁻¹ na fonte selenato, evidenciando efeitos tóxicos na planta.

A faixa de suficiência obtida a partir do nível crítico de deficiência (Ncdef) e Nctox de Se, demonstra que a amplitude da faixa na fonte selenato (Ncdef= 2,5 mg kg⁻¹; Nctox=41,8 mg kg⁻¹) é maior comparado a fonte selenito (Ncdef=1,5 mg kg⁻¹; Nctox=4,5 mg kg⁻¹), o que confere a planta maior risco de toxicidade quando a fonte utilizada é o selenito.

Neste estudo, os efeitos inerentes à toxicidade de Se nas plantas de alface demonstraram redução no crescimento e sintomas iniciais de clorose nas folhas de plantas cultivadas em solução nutritiva (Figura 5) e estas respostas estão de acordo com Malavolta (1980) e Hawrylak-Nowak et al. (2015). O sistema radicular das plantas de alface (Figura 6) foi severamente afetado pela toxicidade de Se, verificado visualmente pelo volume reduzido e quebradiças ao toque. Entretanto, a severidade foi maior nas plantas cultivadas na presença da fonte selenito em comparação ao selenato, sendo os sintomas visuais de toxicidade de Se no sistema radicular mais intenso quando utilizada a fonte selenito.

No presente estudo, deve-se ressaltar que os níveis críticos de selênio encontrados são diferentes das concentrações tóxicas reportadas na literatura em estudos com plantas de alface (RÍOS et al., 2008 a), pois a temperatura e umidade relativa do ar (mínima, máxima e média) registradas ao longo do período experimental e que foram de 19,1; 39 e 24 °C; e 29, 97 e 76,84%, respectivamente, (Figura 1) podem ter contribuído para intensificar a perda de água por transpiração e aumentar a absorção radicular de selênio e, conseqüentemente, incrementar a toxicidade promovida por este elemento mineral. Este fato mostra linhas de evidências que revelam a interação entre fatores ecofisiológicos (e.g. temperatura e umidade relativa) e a nutrição de plantas, de modo que a ação deste binômio pode ter intensificado a toxicidade de selênio sob menores concentrações deste elemento mineral (14 e 16 μM de selenito e selenato, respectivamente, de acordo com os níveis críticos de toxicidade para a MSPA) em comparação a outros estudos com plantas de alface. Por exemplo, Ríos et al. (2008a) consideram que a partir de 40 e 10 mM de selênio (selenato e selenito, respectivamente) ocorre redução da MSPA em plantas de alface sob condições de câmara de crescimento e temperatura constante diurna de 25°C e umidade relativa do ar variando entre 60 e 80%.

6. CONCLUSÃO

O selenato é a fonte de selênio mais indicada ao cultivo hidropônico de alface em relação ao selenito, pois promove maior biofortificação e menor risco de toxicidade na planta. As concentrações adequadas estão entre 5,6 e 16 μM de selênio na forma selenato em solução nutritiva e teores foliares adequados de 10,2 a 41,8 mg kg^{-1} de selênio.

7. REFERÊNCIAS

- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- BOYD, R. Selenium stories. **Nature. Chemistry**, v.3, 570p. 2011.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? **Plant Soil**, v.302, p.1-17, 2008.
- DAVIS, R. D.; BECKETT, P. H. T.; WOLLAN, E. Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. **Plant and Soil**, v.49, p.395-408, 1978.
- DELLA VECCHIA, P. T.; KOCH, P. S.; KIKUCHI, M. VERA. 1999. Nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, v.17, p.171, 1999.
- DIMKOVIKJ, A.; VAN HOEWYK, D. Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: evidence of a mitochondrial stress response. **BMC Plant Biology**, v.14, p.1-15, 2014.
- DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine**, v.48, p.756-775, 2015.
- FAGERIA, N. K. Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo em solo de Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.390-395, 2000.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**. Ed. UFV, 3º Ed. p.300, 2008.
- GOMIDE, M.B.; LEMOS, O.V.; TOURINO, D.; CARVALHO, M.M.; CARVALHO, J.G.; DUARTE, C.S. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros Mundo Novo e Catuaí. **Ciência Prática**, v.1, n.2, p.118-123, 1977.
- GRAHAM, R. D.; WELCH, R. M.; SAUNDERS, D. A.; ORTIZMONASTERIO, I.; BOUIS, H. E.; BONIERBALE, M.; DE HAAN, S.; BURGOS, G.; THIELE, G.; LIRIA, R.; MEISNER, C. A.; BEEBE, S. E.; POTTS, M. J.; KADIAN, M., HOBBS, P.R., GUPTA, R. K., TWOMLOW, S. Nutritious subsistence food systems. **Advances in Agronomy**, v.92, p.1-74, 2007.
- HAWRYLAK-NOWAK, B. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, v.70, 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**, v.37, p.37-41, 2015.

HOAGLAND, D. R.; HARNON, D. The water method for growing plant without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Circ. 37, p.1-32, 1950.

HUERTA, S. A. Comparación de métodos de laboratorio y de campo para medir el area del cafeto. **Cenicafé**, v.13, n.1, p.33-42, 1962.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.362-385, 1987.

MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M.; DALL'ACQUA, S., PILON-SMITS, E. A. H. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. **Frontier Plant Science**, 5, article 280, 2015.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Ed. Agronômica Ceres, 1980.

PAULUS, D. **Produção, qualidade parâmetro fisiológicos e bioquímicos de alface sob hidroponia com águas salinas**. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

PIECZYŃSKA, J.; GRAJETA, H. The role of selenium in human conception and pregnancy. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.29, p.31-38, 2015.

PITTS, M. W.; BYRNS, C. N.; OGAWA-WONG, A. N.; KREMER, P.; BERRY, M. J. Selenoproteins in Nervous system development and function. **Biological Trace Element Research**, v.161, p.231-245, 2014.

PRAUCHNER, C. A. **A importância do selênio para a agropecuária e saúde humana**. Ed. UFSM, 376p. 2014.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, V.; ALMEIDA, H. J.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G.; BASTOS, C. E. A.; ÁVILA, P. A. Selenato e selenito na produção, nutrição mineral e biofortificação com selênio em cultivares de alface. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1347-1355, 2011a.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, R. J.; GUILHERME, L. R. G.; CASTRO, E. M.; ÁVILA, F. W.; CARVALHO, G. S.; BASTOS, C. E. A.; OLIVEIRA, C. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, v.12, p.584-588, 2010.

RAMOS, S. J., RUTZKE, M. A., HAYES, R. J., FAQUIN, V., GUILHERME, L. R. G. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **The Plant Journal**, v.233, p.649-660, 2011b.

RÍOS, J. J.; BLASCO, B.; LEYVA, R.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Nutritional balance changes in lettuce plant grown under different doses and forms of selenium. **Journal of Plant Nutrition**, v.36, p.1344-1354, 2013.

RÍOS, J. J.; ROSALES, M. A.; BLASCO, B.; CERVILLA, L. M.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. **Scientia Horticulturae**, v.116, p.248-255, 2008a.

RIOS, J. J.; BLASCO, B.; CERVILLA, L. M.; ROSALES, M. A.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. **Annals of Applied Biology**, n.154, p.107-116, 2008b.

RYDER, E.J. **Lettuce, Endive and Chicory**. CABI Publishing, 10 E. 40th St., Suite 3203, New York, NY 10016, 1999.

SAFFARYAZDI, A.; LAHOUTI, M.; GANJEALI, A.; BAYAT, H. Impacto of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. **Notulae Scientia Biologicae**, v.4, p.95-100, 2012.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SEVEN, M.; BASARAN, S. Y.; CENGIZ, M.; UNAL, S.; YUKSEL, A. Deficiency of selenium and zinc as a causative factor for idiopathic intractable epilepsy. **Epilepsy Research**, v.104, p.35-39, 2013.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J. L.; NETO, A. P.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; MAZZAFERA, P. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.70, p.263-267, 2013.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Austrain: a review. **Toxicology Letters**, v.137, p.103-110, 2003.

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

VOET, D.; JUDITH, G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

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

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