

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KELLYN KLEIN

**SELÊNIO EM OLIVEIRAS: TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E
BIOFORTIFICAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM**

São Gabriel

2024

KELLYN KLEIN

**SELÊNIO EM OLIVEIRAS: TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E
BIOFORTIFICAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Frederico Costa Beber Vieira

São Gabriel

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pela autora através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

K64s Klein, Kellyn

Selênio em oliveiras: tolerância ao estresse hídrico e
biofortificação do azeite de oliva extravirgem / Kellyn Klein.

105 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2024.

"Orientação: Frederico Costa Beber Vieira".

1. selênio. 2. oliveira. 3. estresse hídrico. 4.
biofortificação. I. Título.

KELLYN KLEIN

**SELÊNIO EM OLIVEIRAS: TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E
BIOFORTIFICAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Qualidade ambiental.

Dissertação defendida e aprovada em: 19 de fevereiro de 2024.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Frederico Costa Beber Vieira
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Luciane Almeri Tabaldi
(UFSM)

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
(UFLA)

Dedico este trabalho às produtoras e aos produtores,
pesquisadores e simpatizantes da olivicultura no país.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Frederico Costa Beber Vieira, por ser um excelente profissional a servir como modelo e uma pessoa admirável. Pelo apoio e incentivo do início ao fim deste trabalho. Por todo conhecimento compartilhado com sabedoria e humildade.

À Universidade Federal do Pampa (Unipampa), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte estrutural e financeiro para realização deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora, Dra. Luciane e Dr. Luiz Roberto, por aceitarem contribuir com esta dissertação com seus vastos e valiosos conhecimentos e experiências que carregam consigo.

Aos professores Jeferson Luis Franco e Thais Posser pelas contribuições acerca das análises de estresse oxidativo e atividade antioxidante. Aos técnicos dos laboratórios da Unipampa, em especial à Rosângela e ao Giovani, pelo auxílio com reagentes e equipamentos.

Aos colegas do meu grupo de pesquisa LabSEF, Cassiano, Eduarda, Matheus, Pietro e Rafaela, por toda ajuda nos trabalhos de campo e no laboratório ao decorrer dos experimentos. À querida colega Vanessa Rosseto, pelas valiosas dicas quanto à extração e análises do azeite de oliva. Às colegas do grupo de pesquisa GPEOSCEL, Ana, Jaciana, Karen, Luana e Maria, pela disponibilidade contínua durante as análises realizadas para esta dissertação. Sem todos vocês, este trabalho não seria o que é.

Aos olivicultores Adriano, Simone, Thais e Thiago por disponibilizarem seus pomares para a realização deste estudo e o incentivarem. À empresa OlivoPampa pela doação das mudas de oliveira.

À minha família, especialmente minha mãe, Jane, por estar sempre presente, mesmo com a distância geográfica. Às minhas amigas do coração, Ana Beatriz, Ana Klotz, Jéssica, Mary e Stéfany, pelas conversas, sorrisos e abraços. Ao meu amor, Guilherme, pelo imenso carinho, apoio e incentivo. À minha psicóloga, Gabriela, por me ajudar a segurar as pontas nas últimas semanas de finalização desta dissertação.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a execução deste trabalho, meus profundos agradecimentos.

“As folhas mais verdes serão dadas ao homem que vencer suas dificuldades, e que este homem seja do bem, e que sua saúde seja tão longa quando a própria árvore da vida, a oliveira [...]

Ditado iídiche

RESUMO

A aplicação de selênio (Se) em plantas pode promover a tolerância das mesmas a estresses abióticos, através da redução de espécies reativas de oxigênio (ERO) e do aumento de compostos antioxidantes. Ainda, traz benefícios significativos para a nutrição e saúde humana, sendo um elemento essencial para mamíferos. No entanto, há uma lacuna de conhecimento em relação aos efeitos do Se em oliveiras sujeitas a condições de seca e alagamento do solo, considerando o contexto atual das mudanças climáticas globais, com oscilações extremas de temperatura e no regime de chuvas. Além disso, existe uma carência de estudos relacionados a biofortificação de produtos olivícolas com Se. Com isso, o objetivo desta dissertação foi avaliar o efeito da fertilização foliar com selênio em oliveiras sobre a amenização do estresse hídrico das plantas e sobre a biofortificação e qualidade do azeite de oliva. Para isso, foram conduzidos dois estudos independentes entre si. O primeiro avaliou o efeito da fertilização foliar com diferentes doses de Se no teor total de Se, atividade de ERO, compostos antioxidantes e produtividade de oliveiras adultas em duas cidades do Rio Grande do Sul, bem como focou em caracterizar a biofortificação dos azeites de oliva extravirgens extraídos, sua qualidade físico-química e propriedades antioxidantes, com o estudo de campo realizado em dois pomares adultos com árvores da cultivar Arbequina. O segundo abordou o efeito da presença e ausência de Se nas respostas ao estresse hídrico promovido por ERO e atividade antioxidante do tecido foliar e radicular de oliveiras jovens da cultivar Frantoio, cultivadas em casa de vegetação, expostas a condições de escassez e excesso de água no solo, nos períodos pós estresse hídrico e pós recuperação. No primeiro estudo, diferentes doses de Se aumentaram o teor total de Se nas folhas e no azeite de oliva, atingindo até 2,056 mg Se kg⁻¹ de azeite. Entretanto, a aplicação de Se não alterou a produtividade dos frutos e a qualidade físico-química do azeite. A fertilização com Se promoveu níveis mais baixos de ERO nas folhas do pomar da cidade de Caçapava do Sul, onde maiores teores de Se foram detectados no azeite. Após a primeira aplicação de Se, níveis mais baixos de ERO foram quantificados no tecido foliar com as doses de 150 e 200 mg Se dm⁻³, enquanto após a segunda aplicação de Se o nível mais baixo foi observado no tratamento de 100 mg Se dm⁻³, havendo um aumento de ERO com as doses de maior concentração de Se. No segundo estudo, os teores de Se no tecido foliar e de raízes

em todos os tratamentos ficaram abaixo do limite de quantificação pelo ICP-OES. Contudo, observou-se aumento dos níveis de GSH e diminuição da peroxidação lipídica em folhas, bem como diminuição de ERO no tecido foliar e de raízes de plantas tratadas com Se. O selênio não promoveu alteração na carga de frutos e na qualidade do azeite de oliva, entretanto, demonstrou uma ação antioxidante e pró-oxidante dependente da dose em oliveiras adultas. Apesar de não detectado nas folhas e raízes de oliveiras jovens, a aplicação de Se apresentou resultados benéficos para as plantas, independente do tratamento hídrico.

Palavras-chave: Arbequina; Frantoio; olivicultura; *Olea europaea* L.; estresse oxidativo; fertilização de plantas; qualidade nutricional; selenito de sódio.

ABSTRACT

The application of selenium (Se) in plants can enhance their tolerance to abiotic stresses by reducing reactive oxygen species (ROS) and increasing antioxidant compounds. Furthermore, it brings significant benefits for human nutrition and health, as it is an essential element for mammals. However, there is a knowledge gap regarding the effects of Se on olive trees subjected to drought and soil flooding conditions, considering the current context of global climate change with extreme temperature fluctuations and changes in rainfall patterns. Additionally, there is a lack of studies related to the biofortification of olive products with Se. Therefore, the aim of this dissertation was to evaluate the effect of foliar selenium fertilization on olive trees concerning the alleviation of plant water stress and the biofortification and quality of olive oil. For this purpose, two independent studies were conducted. The first evaluated the effect of foliar fertilization with different doses of Se on the total Se content, ROS activity, antioxidant compounds, and productivity of adult olive trees in two cities in Rio Grande do Sul. This study also focused on characterizing the biofortification of extra virgin olive oils extracted from two adult orchards of the Arbequina cultivar. The second study addressed the effect of the presence and absence of Se on responses to water stress induced by ROS and antioxidant activity of leaf and root tissues of young Frantoio olive trees grown in a greenhouse. These plants were exposed to conditions of water scarcity and excess in the soil during post-water stress and recovery periods. In the first study, different doses of Se increased the total Se content in leaves and olive oil, reaching up to 2.056 mg Se kg⁻¹ of oil. However, Se application did not induce significantly changes in fruit productivity or the physicochemical quality of the oil. Se fertilization led to lower levels of ROS in the leaves of the orchard in the city of Caçapava do Sul, where higher Se levels were detected in the oil. After the first Se application, lower levels of ROS were quantified in leaf tissue with doses of 150 and 200 mg Se dm⁻³, while after the second Se application, the lowest level was observed in the treatment of 100 mg Se dm⁻³, with an increase in ROS observed with higher Se concentrations. In the second study, Se levels in leaf and root tissues in all treatments were below the quantification limit by ICP-OES. However, an increase in GSH levels and a decrease in lipid peroxidation were observed in leaves, as well a decrease in ROS in leaf and root tissues of plants treated with Se. Selenium did not significantly

alter fruit yield or olive oil quality but demonstrated both antioxidant and pro-oxidant actions dependent on the dose in adult olive trees. Although Se was not detected in the leaves and roots of young olive trees, its application showed beneficial results for the plants, regardless of water treatment.

Keywords: Arbequina; Frantoio; olive cultivation; *Olea europaea* L.; oxidative stress; plant fertilization; nutritional quality; sodium selenite.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1: Zoneamento edafoclimático da oliveira para o Rio Grande do Sul.....25

Estudo 1 – Artigo

Figure 1: Relationship between the applied selenium dose (x) and leaf selenium content (y) in the SG orchard, with adjustment of the linear equation in the response function. SG = São Gabriel. Values expressed as averages of each treatment (n=5)..47

Figure 2: Relationship between the applied selenium dose (x) and leaf selenium content (y) in the CS orchard, with adjustment of the linear equation in the response function. CS = Caçapava do Sul. Values expressed as averages of each treatment (n=5).....48

Figure 3: Fruit yield of olive in SG (black dots) and CS (gray dots) orchards in relation to the foliar application of Se. Values expressed as averages of each treatment in each site (n=5).....49

Figure 4. Peroxide index values of olive oil samples over 96 hours, during the Schaal Oven Test. Values expressed as means of triplicates of each sample (n=1).....55

Estudo 2 – Artigo

Figura 1: Temperatura em casa de vegetação (°C) e conteúdo volumétrico de água no solo (%), registrados sempre às 8h30, durante os 12 dias de tratamento de restrição hídrica e no primeiro dia de recuperação.....71

Figura 2: Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). Diferentes letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹.....76

Figura 3: Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). Diferentes letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹.....77

Figura 4: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). O asterisco representa diferença significativa entre ausência e presença de selênio (A) e diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre tratamentos hídricos (B), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). 0 mg Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 mg Se = 150 mg Se L⁻¹; CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.....78

Figura 5: Análise do tecido foliar de oliveiras jovens no período de recuperação (T2), considerando os testes: níveis de GSH (A) e peroxidação lipídica (B). Diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.....79

Figura 6: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar de oliveiras jovens no período de recuperação (T2). O asterisco representa diferença significativa entre ausência e presença de selênio (A) e diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos (B), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). 0 mg Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 mg Se = 150 mg Se L⁻¹; CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.....79

Figura 7: Análise do tecido radicular de oliveiras jovens no período de recuperação (T2), considerando os testes: níveis de GSH (A) e peroxidação lipídica (B). Diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.....80

Figura 8: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido radicular de oliveiras jovens no período de recuperação (T2). Diferentes letras maiúsculas

demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹

¹81

LISTA DE TABELAS

Estudo 1 – Artigo

Table 1: Analysis of GHS levels, lipid peroxidation and reactive oxygen species in the leaf tissue of trees fertilized with different doses of selenium, after the first application of Se, in the SG and CS orchards.....50

Table 2: Analysis of GHS levels, lipid peroxidation and reactive oxygen species in the leaf tissue of trees fertilized with different doses of selenium, after the 2nd application of Se, in the SG and CS orchards.....51

Table 3: Fruit maturation index, oil yield and paste moisture of the treatments selected for the extraction of olive oil samples from olive groves in SG and CS.....52

Table 4: Characterization of the physicochemical standards of olive oil quality and total selenium in extra virgin olive oil samples extracted from orchards in SG and CS.....52

Estudo 2 – Artigo

Tabela 1. Biomassa seca (g) da parte aérea e raízes de oliveiras em diferentes tratamentos hídricos, com e sem selênio.....75

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

AOCS – American Oil Chemists' Society

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

EVOO – Extra Virgin Olive Oil

FAO – Food and Agriculture Organization

IBRAOLIVA – Instituto Brasileiro de Olivicultura

ICP-MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

IOC – International Olive Council

OMS – Organização Mundial da Saúde

SiBCS – Sistema Brasileiro de Classificação de Solos

Unipampa – Universidade Federal do Pampa

USEPA – United States Environmental Protection Agency

WHO – World Health Organization

WRB – World Reference Base

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Oliveira.....	24
2.2 Selênio.....	26
2.3 Estresse oxidativo.....	28
2.4 Biofortificação de selênio.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 HIPÓTESE.....	33
4.1 Hipótese geral.....	33
4.2 Hipótese específicas.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Artigo 1 – Effect of foliar selenium fertilization on oxidative stress and productivity in <i>Olea europaea</i> L., biofortification and quality of extra virgin olive oil.....	35
1 Introduction.....	36
2. Material and methods.....	38
2.1 Reagents and standards.....	38
2.2 Experimental setup.....	39
2.3 Total selenium quantification.....	40
2.4 Fruit yield.....	40
2.5 Sampling of plant material.....	41

2.6 Biochemical analyzes of plant tissue.....	41
2.6.1 Obtaining the plant extract.....	41
2.6.2 Quantification of GSH levels.....	41
2.6.3 Lipid Peroxidation Estimation Assay.....	41
2.6.4 Determination of reactive oxygen species.....	42
2.6.5 Protein quantification.....	42
2.7 Fruit maturation index, oil yield and paste moisture.....	42
2.8 Physicochemical parameters of quality and antioxidant activity of extra virgin olive oil.....	43
2.8.1 Quality index.....	43
2.8.2 Schaal Oven Test.....	44
2.8.3 Chemical analysis of extra virgin olive oil.....	44
2.8.3.1 Obtaining the polar extract.....	44
2.8.3.2 Total phenolic compounds and total flavonoids.....	44
2.8.3.3 Total chlorophyll and total carotenoids.....	45
2.8.3.4 In vitro antioxidant activity.....	45
2.9 Statistical analysis.....	46
3. Results.....	46
4. Discussion.....	55
5. Final considerations.....	60
Acknowledgements.....	60
References.....	60
5.2 Artigo 2 – Efeito do selênio na amenização do estresse oxidativo de oliveiras jovens sob condições de seca e alagamento.....	66
1 Introdução.....	67

2 Material e métodos.....	69
2.1 Reagentes e padrões.....	69
2.2 Material vegetal e delineamento experimental.....	69
2.3 Coleta e armazenamento de folhas e raízes.....	72
2.4 Biomassa seca da parte aérea e raízes.....	72
2.5 Análise de selênio total.....	72
2.6 Análises bioquímicas.....	72
2.7 Análise estatística.....	74
3. Resultados.....	74
3.1 Biomassa seca da parte aérea e raízes.....	74
3.2 Análise de selênio total.....	75
3.3 Análises bioquímicas.....	75
3.3.1 Período de estresse hídrico em folhas.....	75
3.3.2 Período de recuperação em folhas.....	78
3.3.3 Período recuperação em raízes.....	80
4. Discussão.....	82
5. Considerações finais.....	85
Agradecimentos.....	85
Referências.....	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE 1.....	102
APÊNDICE 2.....	103

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera de origem mediterrânea e seu cultivo no Rio Grande do Sul adquiriu maior relevância nos últimos anos com a ampliação das áreas de plantio, devido aos benefícios do consumo do azeite de oliva à saúde humana (ALBA et al., 2013). O estado possui cerca de 6,3 mil hectares (ha) de área plantada e é responsável por 80% da produção de azeite nacional (IBRAOLIVA, 2023), sendo a Arbequina a principal variedade cultivada (OLIVEIRA et al., 2022). Esta variedade é predominante em todos os estados do país devido à sua grande adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas, sendo o conteúdo resultante de seus azeites considerado alto (entre 16 e 18 %) e de boa qualidade (NOVA, 2019).

O potencial para o aumento da olivicultura é promissor, tendo em vista que, conforme o Zoneamento edafoclimático da oliveira para o Rio Grande do Sul, o estado possui cerca de 7,4 milhões de hectares considerados como área recomendável para a cultivo da espécie (ALBA et al., 2013). Além disso, a produção atual abastece menos de 2% do mercado nacional de azeite de oliva, sendo que o Brasil é o segundo maior importador de azeite e azeitona de mesa mundial (IOC, 2023).

O consumo regular de azeite de oliva extravirgem tem benefícios comprovados à saúde humana, promovendo efeitos protetores para doenças cardiovasculares, para alguns tipos de câncer e diabetes mellitus. Esses benefícios estão associados às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e sua composição rica em polifenóis e ácidos graxos monoinsaturados (ZARONI et al., 2012; FOSCOLOU et al., 2018).

Aliado aos componentes benéficos intrínsecos do azeite, a prática da biofortificação de produtos olivícolas é uma maneira de combater deficiências de micronutrientes essenciais para a saúde humana (REIS et al., 2017). Essas deficiências, também conhecidas como “fome oculta”, ocorrem quando os alimentos ingeridos pelas pessoas não satisfazem as necessidades nutricionais para o seu crescimento e desenvolvimento (BOUIS & ISLAM, 2012).

Dentre estas, encontra-se a deficiência de selênio (Se), que é um microelemento essencial para mamíferos e organismos unicelulares (KIELISZEK, 2019). O Se desempenha importantes funções no metabolismo humano, promovendo aumento das atividades antioxidante, anti-inflamatória, cerebrais e reprodutivas

(NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000), bem como prevenindo a manifestação de diversas doenças, dentre elas cardíacas, carcinogênicas e tireoidianas (RAYMAN et al., 2000; LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017; REIS et al., 2017; SCHIAVON et al., 2020).

Mundialmente, a deficiência de Se e seus prejuízos à saúde humana aumentaram gradativamente nas últimas décadas (SCHIAVON et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma ingestão diária para adultos de 55 µg (KIELISZEK, 2019). Entretanto, estima-se que um bilhão de pessoas no mundo tenham uma ingestão escassa de Se, devido aos baixos níveis no solo e, conseqüentemente, nos alimentos (KIPP et al., 2015; LARA et al., 2019).

Buscando prevenir o avanço e o agravamento da deficiência de Se, a biofortificação agrônômica apresenta muitas vantagens sobre a sua suplementação direta. Isso se deve ao Se inorgânico absorvido pela planta ser transformado em formas orgânicas, que apresentam maior biodisponibilidade para o organismo humano (D'AMATO et al., 2020). Além disso, essa prática promove benefícios para as plantas.

No metabolismo de plantas superiores, a essencialidade do Se ainda é alvo de discussões, embora seja evidente os efeitos positivos em baixas concentrações (D'AMATO et al., 2014). Estudos demonstram aumento de compostos antioxidantes, da fotossíntese, da produtividade, da biofortificação dos alimentos produzidos e redução do estresse oxidativo, hídrico e salino (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; CHAUHAN et al., 2019; LARA et al., 2019; LANZA & REIS, 2021; REGNI et al., 2021).

O estresse oxidativo em plantas está relacionado com a geração desequilibrada de espécies reativas de oxigênio (ERO), ocasionada por diferentes fatores como seca, salinidade, temperaturas extremas, metais pesados e poluição (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014). Como exemplos de ERO destacam-se o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), que são compostos químicos produzidos no metabolismo aeróbio (FENG, WEI & TU, 2013), desempenhando importantes funções para a regulação celular quando presentes em níveis adequados (FOYER & NOCTOR, 2005).

Em resposta ao estresse causado pelo excesso de ERO, as plantas acionam componentes de sinalização, aumentando a atividade de enzimas e compostos

antioxidantes, proporcionando a diminuição dos efeitos indesejados pela produção exacerbada de ERO, que podem causar danos a biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

O estresse hídrico, resultante da escassez ou do excesso de água no solo, exerce impacto significativo no desenvolvimento e na produtividade das culturas. A seca prolongada pode ocasionar a diminuição da fotossíntese, da condutância estomática, da transpiração e, conseqüentemente, da produtividade, enquanto aumenta a produção de ERO (PROIETTI et al., 2013; ANDRADE et al., 2018; D'AMATO et al., 2018b). Dessa forma, observa-se que o aumento do preço do azeite de oliva nos últimos anos está diretamente relacionado às oscilações extremas de temperatura e no regime de chuvas, com longos períodos de seca que afetam o potencial produtivo dos olivais (HEDGECOE, 2023).

Outro problema que resulta em estresse para a planta é a saturação do solo com água, que provoca seu alagamento e impossibilita a respiração das raízes devido ao excesso de água (SASIDHARAN et al., 2017). Essa condição provoca alteração no crescimento e morfologia da parte aérea e raízes, redução da condutância estomática e assimilação de CO₂ e o esgotamento do oxigênio no solo, que altera a capacidade de absorção de nutrientes (GARCÍA, MENDOZA & POMAR, 2008; LOOSE et al., 2017; LORETI & PERATA, 2020).

A cultura da oliveira apresenta baixa tolerância a solos mal drenados e, em algumas regiões do estado do RS onde a cultura tem se expandido, os solos apresentam horizontes subsuperficiais com gradiente textural e má drenagem. Associados a uma pluviosidade elevada, nestes locais, o principal problema associado ao desenvolvimento e sanidade dos olivais é o excesso de umidade devido à inadequada drenagem do solo, o que eleva a resistência da difusão dos gases do solo para a atmosfera (ALBA et al., 2013).

Em olivais fertilizados com Se, estudos demonstram sua eficiência na mitigação de estresses abióticos como a escassez de água, na produtividade e na biofortificação de azeitonas e do azeite de oliva extravirgem (PROIETTI et al., 2013; TEDESCHINI et al., 2015; D'AMATO et al., 2017; D'AMATO et al., 2018a; D'AMATO et al., 2018b; DE BRUNO et al., 2020). Entretanto, existe uma lacuna acerca das doses com maior eficiência para serem utilizadas. Ainda, diversos aspectos relacionados à fertilização

com Se em oliveiras necessitam ser elucidados, como por exemplo, seus efeitos no azeite de oliva quando biofortificado, sua ação na atividade antioxidante do produto e das plantas e no estresse oxidativo de oliveiras submetidas a seca e, principalmente, ao alagamento, tanto no tecido foliar como em raízes.

Portanto, estabelecer estratégias para a fertilização foliar através de formas e doses seguras de Se é fundamental para estimular seus benefícios em oliveiras e aumentar suas respostas metabólicas em condições de estresse, bem como promover a biofortificação do azeite de oliva extravirgem, que atualmente representa uma grande expansão da economia no Rio Grande do Sul. Com base nisso, foram realizados dois experimentos para avaliar a atividade antioxidante e estresse oxidativo de oliveiras jovens sob estresse hídrico e o estresse oxidativo e a carga de frutos em dois pomares adultos, além da biofortificação e a atividade antioxidante do azeite de oliva extravirgem extraídos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Oliveira

De origem mediterrânea, a oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera pertencente à família botânica Oleaceae e ao gênero *Olea*, do qual pertencem 35 espécies (COUTINHO, 2009). Estão incluídas na espécie seis subespécies, todas as oliveiras silvestres da variedade *sylvestris* e as oliveiras cultivadas da variedade *europaea* (GREEN, 2002). A *Olea europaea* L. é a única espécie da família Oleaceae com frutos comestíveis. A oliveira é uma árvore milenar e seu registro fóssil mais antigo é datado de 780 mil anos a.C na região da Jordânia (LANGGUT et al., 2019). O início da olivicultura se deu na região da Bacia Mediterrânea, a qual possui clima caracterizado por verão seco e quente e inverno frio e úmido e baixa pluviosidade anual (VILLA; OLIVEIRA, 2012). Posteriormente, a olivicultura foi se expandindo para outras regiões do mundo.

No Brasil, os registros datam os primeiros plantios a partir de 1800, tendo exemplares trazidos pelos europeus, com o intuito de proporcionar azeite para as lamparinas e ramos para a festa de Domingo de Ramos (GOMES, 1979). Entretanto, efetivamente a expansão de plantios comerciais começou nas últimas décadas para produção de azeite e azeitona, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (MESQUITA; GARCIA; COSTA, 2012). No Rio Grande do Sul, a cultura da oliveira foi introduzida oficialmente em 1948, através da criação do Serviço Oleícola, um órgão especializado da Secretaria da Agricultura com a finalidade de superintender e orientar os trabalhos de fomento e pesquisa (COUTINHO, 2009). Atualmente, o Rio Grande do Sul é considerado o maior produtor de oliveiras do Brasil onde, atualmente, existe cerca de 6,3 mil hectares cultivados, em 110 municípios, 321 produtores, 70 marcas e 18 lagares estabelecidos para a produção do azeite (OLIVEIRA et al., 2022; IBRAOLIVA, 2023). O estado é responsável por 80% da produção brasileira de azeite de oliva extravirgem, demonstrando exponencial crescimento quantitativo e qualitativo (IBRAOLIVA, 2023).

Segundo o Zoneamento edafoclimático da oliveira para o Rio Grande do Sul, o estado possui cerca de 7,4 milhões de hectares considerados como área recomendável para a cultivo da espécie (ALBA et al., 2013), os quais podem ser observados na figura 1, onde as melhores regiões para o plantio situam-se no Oeste

e Metade Sul, que possuem umidade relativa do ar menor em comparação as regiões litorâneas e serranas, favorecendo o florescimento e a produtividade da espécie.



Figura 1: Zoneamento edafoclimático da oliveira para o Rio Grande do Sul.

A oliveira possui características de plantas xerófilas, adaptadas a regiões secas, com folhas coriáceas, simples e lanceoladas, tendo a face adaxial verde escura com uma camada cerosa e cutícula grossa e a face abaxial branco-prateada, com tricomas protegendo os estômatos e reduzindo as perdas de água pela transpiração (RAPOPORT; MORENO-ALÍAS, 2017). Suas flores se apresentam em forma de inflorescências formadas nas axilas foliares dos nós de crescimento vegetativo do ano anterior. Podem ser de dois tipos: perfeitas (hermafroditas) com estames e pistilo bem desenvolvidos; e estaminadas ou imperfeitas, as quais têm o ovário rudimentar ou

ausente e parecem se formar por uma falha no seu desenvolvimento (CRUZ et al., 2012). A espécie possui polinização anemocórica e, adicionalmente, diversas cultivares dependem da polinização cruzada para a sua fecundação (SÁNCHEZ-ESTRADA; CUEVAS, 2018), além disso, é necessário o acúmulo de horas de frio para que ocorra a quebra da dormência e o florescimento e a formação do fruto.

O fruto, denominado azeitona, é uma drupa composta por endocarpo, mesocarpo, que é a polpa onde se acumula o azeite no vacúolo das células parenquimáticas, e exocarpo (CRUZ et al., 2012). A oliveira apresenta bianualidade, com alternância entre anos de alta produção (*on*) e baixa produção (*off*). Os frutos da oliveira podem ser utilizados para alimentação, com a produção do azeite de oliva ou de azeitonas de mesa. De acordo com Oliveira et al. (2022), as cultivares mais utilizadas para produção de azeite no Rio Grande do Sul são Arbequina, Koroneiki, Picual, Arbosana, Frantoio e Coratina.

Destaca-se que o aumento da olivicultura é promissor no Brasil, uma vez que o país é reconhecido como o segundo maior importador de azeite e azeitona de mesa em nível mundial, conforme informações do Conselho Oleícola Internacional (IOC, 2023). Isso representa um grande potencial de expansão dos olivais no Rio Grande do Sul, podendo promover aumento da economia e oportunidades de emprego no estado.

2.2 Selênio

Em 1817, o químico Johns Jacob Berzelius identificou um novo elemento que, em seu estado metálico, apresentava uma coloração acinzentada brilhante, sendo denominado como selênio, derivado do termo grego Σελήνη, Selíní, que significa "lua" (TROFAST, J, 2011). O selênio, de número atômico 34 da tabela periódica, é um não metal do grupo dos calcogênios localizado entre o enxofre (S) e o telúrio (Te), elementos com os quais apresenta semelhanças nas propriedades químicas e físicas, especialmente com o S (MATOS, 2017).

O selênio encontra-se amplamente distribuído na crosta terrestre, sendo que uma considerável porção deste elemento está associada a minerais sulfetados (SHAMBERGER, 1981). Sua presença nos solos depende da composição do material

de origem e de processos subsequentes à formação pedológica (SHAMBERGER, 1981). As crescentes atividades antropogênicas têm aumentado a liberação do Se de suas fontes naturais (rochas e solos), tornando-o disponível no ambiente (SEIXAS E KEHRIG, 2007). Entretanto, o Brasil está entre os países com níveis de Se no solo mais baixos do mundo (SILLANPÄÄ & JANSSON, 1992).

As formas de Se naturalmente encontradas podem ser orgânicas e inorgânicas. Na forma inorgânica, apresenta-se sob quatro estados de oxidação: selenato ($\text{Se}+6$), selenito ($\text{Se}+4$), selênio elementar ($\text{Se}0$) e seleneto ($\text{Se}-2$) (MEOTTI & NOGUEIRA, 2003). O selenito e selenato são as principais formas encontradas em condições naturais no solo. O selenito predomina em solos ácidos e sofre adsorção com óxidos na fração argila com maior facilidade e é menos móvel na planta. Já o selenato ocorre em solos alcalinos e demonstra maior disponibilidade e mobilidade em comparação ao selenito (LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017). Na sua forma orgânica, a biossíntese do Se produz dois aminoácidos análogos de aminoácidos sulfurados, a selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCis) (GIERUS, 2007; LANZA & REIS, 2021).

A faixa entre a quantidade necessária para que a ação do Se seja benéfica ou tóxica é bastante estreita para todos os organismos vivos (REICH & HONDAL, 2016). Isso se deve ao acúmulo de Se inorgânico e orgânico durante o metabolismo do Se, bem como a substituição inespecífica por Se de análogos de S quimicamente semelhantes (CHAUHAN et al., 2019). Assim, seus efeitos nos organismos dependem da concentração, da forma química e de outros fatores ambientais (REGNI et al., 2021).

Desde a descoberta da sua essencialidade em mamíferos em 1957 (SCHARZ & FOLTZ, 1957), o papel do Se na mitigação do estresse ambiental tem sido amplamente investigado em animais e humanos e, em menor grau, em plantas (FENG, WEI & TU, 2013). Em seres humanos, o Se forma a selenocisteína, que integra a glutathione peroxidase, uma enzima com importantes funções antioxidantes, cerebrais e reprodutivas (NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000). Pesquisas demonstram sua ação no aumento da atividade antioxidante e anti-inflamatória, prevenção de doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, disfunções na tireoide, entre outras (RAYMAN et al., 2000; LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017; REIS et al., 2017; SCHIAVON et al., 2020).

A essencialidade do Se em plantas superiores ainda está em debate. Embora seja prejudicial às plantas em altas concentrações, exerce efeitos benéficos em baixas concentrações (D'AMATO et al., 2014). No Brasil, ainda não existem manuais de recomendação como referência para a concentração ideal de aplicação de Se em oliveiras. Em estudos realizados com oliveiras, principalmente na região da Bacia do Mediterrâneo, o Se é majoritariamente aplicado na forma de selenato de sódio (Na_2SeO_4), via pulverização foliar, em doses que variam de 50 a 150 mg de Se L⁻¹, em quantidades que variam conforme a idade e tamanho das plantas (PROIETTI et al., 2013; TEDESCHINI et al., 2015; D'AMATO et al., 2018b; DE BRUNO et al., 2020; DEL PINO et al., 2021).

No metabolismo vegetal, estudos demonstram aumento da atividade de compostos antioxidantes, fotossíntese, produtividade de culturas comerciais, biofortificação de produtos alimentícios, mitigação dos efeitos causados por estresses abióticos e redução do estresse oxidativo (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; CHAUHAN et al., 2019; LARA et al., 2019; LANZA & REIS, 2021; REGNI et al., 2021).

2.3 Estresse oxidativo

Substâncias oxidantes são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais incluem radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (SALVADOR & HENRIQUES, 2004; DAS & ROYCHOUDHURY, 2014; LUSHCHAK, 2014). Também existem espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais podemos destacar o óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito, resultante da interação entre o O_2^- e NO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Devido a sua alta capacidade reativa, essas moléculas têm o potencial de danificar estruturas essenciais à sobrevivência celular, uma vez que podem oxidar lipídios de membranas e proteínas e provocar danos ao DNA (COOKE et al., 2003; DAS & ROYCHOUDHURY, 2014; LUSHCHAK, 2014).

As espécies reativas de oxigênio são geradas tanto em condições normais quanto sob estresse em cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, membranas plasmáticas e parede celular. Durante a exposição à luz, os cloroplastos e os peroxissomos destacam-se como as principais fontes de ERO, enquanto em

condições de escuridão, a mitocôndria assume o papel principal na produção dessas espécies reativas (CHOUDHURY et al., 2013).

Devido à redução parcial do O_2 ou como resultado da transferência de energia para o O_2 , as ERO estão sendo constantemente geradas nos cloroplastos. Segundo Das & Roychoudhury (2014), geralmente o ânion superóxido é o primeiro a ser formado. Isso ocorre no PSI localizado no tilacoide durante a cadeia de transporte de elétrons não cíclica e em outros compartimentos celulares (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014). O peróxido de hidrogênio, uma ERO moderadamente reativa, é formado quando o O_2^- sofre redução univalente e protonação. Pode ocorrer de forma não enzimática ao ser dismutado em H_2O_2 sob condições de pH baixo e principalmente por uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014). Já o radical hidroxila é a ERO mais reativa e tóxica conhecida entre os membros da sua família. É gerado em pH neutro pela reação de Fenton entre H_2O_2 e O_2^- catalisada por metais de transição como Fe (Fe^{2+} , Fe^{3+}) (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

Uma forma de melhorar a tolerância de plantas ao estresse oxidativo é aumentar sua capacidade de remover ERO (PROIETTI et al., 2013). Os sistemas de defesa antioxidantes possibilitaram a coexistência diante da exposição a espécies reativas, ao neutralizar e detoxificar essas substâncias, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo (ALI et al., 2020). Dessa forma, a extensão da acumulação de ERO é determinada pelo sistema antioxidante, que permite aos organismos manter proteínas e outros componentes celulares num estado ativo para o metabolismo (FOYER & NOCTOR, 2005).

Neste contexto, é promissor o uso do Se, cujo efeito é a proteção de danos celulares, em algumas espécies herbáceas, induzindo defesas antioxidantes (SEPPÄNEN et al., 2003). No entanto, esse microelemento funciona como um antioxidante apenas em baixas concentrações e em concentrações mais altas atua como pró-oxidante, induzindo o aumento de ERO (TERRY et al., 2020). Quanto à fitotoxicidade, El-Ramady et al. (2016) indicam que o Se em concentrações superiores a 1 mg kg^{-1} é considerado tóxico para a maioria das plantas e acumula-se nos tecidos vegetais afetando o metabolismo celular. Assim, se torna imprescindível a utilização de uma dosagem correta para cada cultura a ser fertilizada, levando em conta os aspectos do solo e clima de cada região.

2.4 Biofortificação de selênio

A desnutrição e a insegurança alimentar representam desafios persistentes ao longo da história da humanidade. Ao discutir soluções e estratégias para combater esses problemas, frequentemente são consideradas alternativas à base de plantas, como a biofortificação e variedades de culturas melhoradas (FAO, 2022). A biofortificação em culturas alimentares refere-se a um conjunto de técnicas empregadas para aumentar o teor de nutrientes nos alimentos ingeridos pela população (HIRSCHI, 2009; REIS et al., 2017), visando combater deficiências de micronutrientes essenciais para a saúde humana, como Fe, I, Se, Zn (WHITE & BROADLEY, 2009).

Essas deficiências, também denominadas como “fome oculta”, surgem quando os alimentos consumidos não atendem às exigências nutricionais necessárias para o crescimento e desenvolvimento das pessoas (BOUIS & ISLAM, 2012). A persistente deficiência crônica de micronutrientes originada de solos e cultivos com carência destes elementos resulta em sérios problemas à saúde, afetando mais de 2 bilhões de pessoas no mundo (FAO, 2022).

Em escala global, a deficiência de Se e seu impacto negativo na saúde aumentaram progressivamente nas últimas décadas (SCHIAVON et al., 2020). O déficit nutricional é causado pelo consumo de alimentos produzidos em solos com baixa disponibilidade deste elemento. Portanto, a qualidade nutricional dos alimentos está diretamente relacionada à qualidade e saúde dos solos (FAO, 2022). Esse fenômeno envolve também fatores socioeconômicos, uma vez que grande parte das fontes de Se é encontrada em alimentos de alto valor agregado, como carnes, nozes e frutos do mar (LANZA & REIS, 2021). A ingestão diária recomendada para adultos é de 55 $\mu\text{g dia}^{-1}$ pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KIELISZEK, 2019). Entretanto, estima-se que um bilhão de pessoas no mundo tenham uma ingestão escassa de Se, devido aos baixos níveis no solo e, conseqüentemente, nos alimentos (KIPP et al., 2015; LARA et al., 2019).

A biofortificação agrônômica apresenta muitas vantagens sobre a suplementação direta de Se, uma vez que o Se inorgânico absorvido pela planta é transformado em formas orgânicas, que apresentam maior biodisponibilidade (D'AMATO et al., 2020). Desta forma, as plantas desempenham um papel fundamental

para incluir o Se na cadeia alimentar e superar a deficiência humana desse elemento (LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017; HOSSAIN et al., 2021).

Contudo, o sucesso da biofortificação para o enriquecimento de plantas com Se depende de muitas variáveis, como a espécie de Se a ser utilizada, o modo de adubação e a espécie de cultivo (SCHIAVON et al., 2020). Para avaliar a biofortificação, a aplicação de selênio nas formas de selenato e selenito ou selenoaminoácidos, via solo e foliar, tem sido utilizada em uma grande variedade de culturas alimentares, como em cereais (CHEN et al., 2002; GALINHA et al., 2015; D'AMATO et al., 2019, VEGA-RAVELLO et al., 2023; DE LIMA et al., 2023), leguminosas (RAHMAN et al., 2013; POBLACIONES et al., 2014; NGIGI et al., 2019, SILVA et al., 2023), hortaliças (FERRARESE et al., 2012; HAWRYLAK-NOWAK, 2013; SCHIAVON et al., 2016; SABATINO et al., 2019), árvores frutíferas (ZHU et al., 2017; BABALAR et al., 2019; ZAHEDI et al., 2019, DE SOUSA et al., 2023), entre outras (ZAUZA et al., 2023).

Outro aspecto positivo atrelado à presença do Se em produtos alimentícios é a valorização comercial do produto, uma vez que proporcionaria aos consumidores os benefícios do microelemento para a saúde. Especialmente na olivicultura, diversos estudos expõem a eficiência na biofortificação de Se em azeitonas e no azeite de oliva extravirgem (D'AMATO et al., 2014; D'AMATO et al., 2017; D'AMATO et al., 2018a; D'AMATO et al., 2018b; DE BRUNO et al., 2020). Além disso, por estar associado à ação antioxidante, o azeite biofortificado com Se tem demonstrado resultados favoráveis às propriedades qualitativas e nutricionais do produto, podendo aumentar sua vida de prateleira (D'AMATO et al., 2017; 2018).

O presente trabalho difere dos aqui citados no sentido em que utiliza diferentes doses de Se na forma de selenito de sódio (Na_2SeO_3), aplicados em dois estágios do desenvolvimento reprodutivo da oliveira, visando promover a biofortificação do azeite de oliva, avaliar a produtividade de frutos por árvore e o efeito destas doses sobre a atividade antioxidante e pró-oxidante das folhas e do azeite de oliva.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fertilização foliar com selênio em oliveiras sobre a amenização do estresse hídrico das plantas e sobre a biofortificação e qualidade do azeite de oliva.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar o efeito de diferentes doses de Se foliar no teor de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e atividade antioxidante não enzimática do tecido foliar e na qualidade físico-química do azeite de oliva de oliveiras adultas em dois pomares da região Sul do Brasil.
2. Medir o teor total de Se nas folhas e o potencial de biofortificação do azeite de oliva.
3. Quantificar a resposta da produtividade de frutos a fertilização foliar com diferentes doses de Se.
4. Diagnosticar o teor de Se total em folhas e raízes de mudas de oliveiras com a presença e ausência de fertilização foliar de Se.
5. Avaliar o potencial do selênio em amenizar o estresse hídrico de oliveiras jovens em condições de escassez e excesso de água no solo.

4 HIPÓTESE

4.1 Hipótese geral

A fertilização foliar com selênio melhora a resistência de oliveiras em condições de estresse hídrico e promove a biofortificação do azeite de oliva.

4.2 Hipóteses específicas

1. Diferentes doses de Se foliar utilizadas promoverão respostas distintas aos parâmetros de estresse oxidativo e atividade antioxidante avaliados no tecido foliar e na qualidade físico-química do azeite de oliva de oliveiras adultas.
2. A aplicação de Se foliar promoverá aumento no teor total de Se em folhas e a biofortificação do azeite de oliva.
3. A carga de frutos aumentará conforme as doses, em caso do Se atuar com efeito protetor em eventuais condições estressantes para a planta, que prejudicariam sua produtividade.
4. A aplicação de Se promoverá um teor mais elevado em folhas, mas não alterará o teor de Se nas raízes, uma vez que o Se aplicado como selenito de sódio é menos móvel na planta.
5. A presença de Se em oliveiras jovens promoverá um efeito protetor nas condições de escassez e excesso de água no solo. O selênio promoverá aumento da atividade antioxidante e redução do estresse oxidativo.

5 RESULTADOS

Os resultados da dissertação serão apresentados na forma de artigos.

Estudo 1 – **Artigo: “Effect of foliar selenium fertilization on oxidative stress and productivity in *Olea europaea* L., biofortification and quality of extra virgin olive oil”**. Submetido na Revista “Journal of Food Composition and Analysis”.

Estudo 2 – **Artigo: “Efeito do selênio na amenização do estresse oxidativo de oliveiras jovens sob condições de seca e alagamento”**. A ser submetido para a revista “Plant and Soil”.

Effect of foliar selenium fertilization on oxidative stress and productivity in *Olea europaea* L., biofortification and quality of extra virgin olive oil

Kellyn Klein^{1*}, Maria Victoria Takemura Mariano¹, Pietro Pimentel Morales Duran¹, Eduarda Pereira de Pereira¹, Rafaela Rosa Freire¹, Thais Posser¹, Jeferson Luis Franco¹, Frederico Costa Beber Vieira¹.

¹ Federal University of Pampa/Unipampa, Campus São Gabriel, Rua Aluizio Barros Macedo, BR290-Km423, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. *Corresponding author - E-mail address: kellynklein.aluno@unipampa.edu.br

Abstract

Fertilization of plants with selenium (Se) can increase their resistance to abiotic stresses and enhance human nutrition and health. However, in olive trees, selenium fertilization is still a gap. This study aimed to evaluate the effect of foliar fertilization with doses of Se on leaf Se content, oxidative stress, productivity of olive trees, the biofortification of extra virgin olive oils (EVOO) and their physicochemical quality and antioxidant. The field study was replicated in two adult orchards in Rio Grande do Sul, Brazil. Doses of 0, 50, 100, 150, and 200 mg Se dm⁻³ were applied twice, at six and one month before fruit harvest, using sodium selenite as the Se source. Oxidative stress in leaves and fruit productivity were analyzed. From the harvested fruits, EVOO extraction was carried out, and qualitative and antioxidant analyses were performed. Although the Se application did not promote changes in fruit productivity, different Se doses increased the total Se content in leaves and EVOO. Lower levels of reactive oxygen species (ROS) were observed in leaves fertilized with 100 and 150 mg Se dm⁻³, after the first and second application, respectively. There was no visual evidence of Se excess toxicity in any plant. Thus, the application of Se foliar has the potential to reduce ROS and promote the biofortification of extra virgin olive oil.

Keywords: sodium selenite, olive tree, abiotic stress, reactive oxygen species, antioxidant, human health, hidden hunger, selenium deficiency, foliar fertilization

1. Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a fruitful tree of Mediterranean origin and its cultivation in the State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, has acquired greater relevance in recent years with the expansion of planting areas, due to the benefits of consuming olive oil at human health (ALBA et al., 2013). Regular consumption of extra virgin olive oil has proven benefits for human health, promoting protective effects against cardiovascular diseases, some types of cancer and diabetes mellitus, in addition to influencing the gut microbiota and cognitive health. These benefits are associated with its anti-inflammatory and antioxidant properties and its composition rich in polyphenols and monounsaturated fatty acids (ZARONI et al., 2012; FOSCOLOU et al., 2018; MILLMAN et al., 2021).

Combined with the intrinsic components of EVOO, biofortification of olive products is a way to combat deficiencies of micronutrients essential for human health (REIS et al., 2017). These deficiencies, also known as hidden hunger, occur when the food eaten by people does not satisfy the nutritional needs for their growth and development (BOUIS & ISLAM, 2012). Insufficiency of selenium (Se) is among the main deficiencies.

Selenium is an essential microelement for mammals and unicellular organisms (KIELISZEK, 2019). In humans, Se forms selenocysteine, which integrates glutathione peroxidase, an enzyme with important antioxidant, brain and reproductive functions (NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000). Studies demonstrate its action in increasing antioxidant and anti-inflammatory activity, preventing heart disease, some types of cancer, thyroid dysfunction, among others (RAYMAN et al., 2000; LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017; REIS et al., 2017; SCHIAVON et al., 2020).

On a global scale, Se deficiency and its negative impact on human health have progressively increased in recent decades (SCHIAVON et al., 2020). The recommended daily intake for adults is 55 $\mu\text{g day}^{-1}$ by the World Health Organization (WHO) (KIELISZEK, 2019). However, it is estimated that one billion people in the world have a low intake of Se, due to low levels in the soil and, consequently, in food (KIPP et al., 2015; LARA et al., 2019). This phenomenon also involves socioeconomic factors, as a significant portion of Se sources are found in high-value-added foods such as meats, nuts, and seafood (LANZA & REIS, 2021). In this way, the agronomic

biofortification of Se is a key strategy to prevent the advancement and worsening of deficiencies, demonstrating advantages over direct supplementation, since the plant transforms the absorbed inorganic Se into organic forms that are more bioavailable to the human body (D'AMATO et al., 2020).

Concomitant to the important role of Se for human health, the practice of biofortification can promote benefits to plants and olive growers, optimizing its use in adverse environmental conditions. Although Se essentiality for plants has not been proven, the element is considered beneficial for higher plants (ANDRADE et al., 2018). Studies demonstrate an increase in the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds and a reduction in oxidative stress, in conditions which the plant signals an increase in reactive oxygen species (ROS) (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; LARA et al., 2019; LANZA & REIS, 2021; REGNI et al., 2021).

Reactive oxygen species, such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($OH\cdot$), are chemical compounds produced by the metabolic processes of cells (FENG et al., 2013) and in low concentrations are eliminated by antioxidants and other defense systems, preventing cellular damage (FOYER & NOCTOR, 2005). Different types of stress, such as drought, extreme temperatures, salinity, pollution, among others, can cause disturbances in the subtle balance between the generation and elimination of ROS (FOYER & NOCTOR, 2005) and, consequently, promote damage to biomolecules such as lipids, proteins and DNA (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

In this sense, Se acts on plants, benefiting their development, with an increase in photosynthesis, water use efficiency, productivity, fruit quality and resistance to environmental stresses (PROIETTI et al., 2013; TEDESCHINI et al., 2015; ANDRADE et al., 2018; D'AMATO et al., 2018; RYANT et al., 2020; REGNI et al., 2021). Research using foliar fertilization with Se in olive trees in Mediterranean region demonstrated its potential for increasing fruit productivity and Se content, phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids in EVOO (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2018). However, the action of Se on plant metabolism changes from beneficial to toxic in a narrow range of concentrations (FENG et al., 2013). Therefore, adjusting Se application to match the best efficiency dose-response to the soil and climate

conditions of each region is essential to guarantee the positive effects of Se on olive trees.

In studies carried out with olive trees, mainly in the Mediterranean Basin region, Se is mostly applied in the form of sodium selenate (Na_2SeO_4), via foliar spray, in doses ranging from 50 to 150 mg of Se dm^{-3} , in quantities which vary according to the age and size of the plants (PROIETTI et al., 2013; TEDESCHINI et al., 2015; D'AMATO et al., 2018; DE BRUNO et al., 2020; DEL PINO et al., 2021). The present work differs from those cited here in the sense that it uses different doses of Se in the form of sodium selenite (Na_2SeO_3), applied in two stages of the reproductive development of the olive tree, aiming to promote the biofortification of olive oil, evaluate fruit productivity per tree and the effect of these doses on the antioxidant and pro-oxidant activity of leaves and olive oil.

Another positive aspect linked to the enrichment of Se in EVOO is the commercial valorization of the product, as it would provide consumers with the benefits arising from EVOO and also from the biofortification of the nutrient itself. In addition to adding value to the product, improving qualitative and nutritional properties, EVOO biofortification can increase its shelf life (D'AMATO et al., 2017; 2018). However, little is known about the action of Se in olive trees, considering aspects that refer to biofortification as a way of alleviating nutritional deficiencies, environmental adversities promoted by climate change, the doses and period required for application, fruit productivity and the peculiarities of each type of EVOO.

Based on the aforementioned aspects, this work aimed to evaluate the effect of selenium foliar fertilization with sodium selenite at different doses on the total Se content, oxidative stress parameters and productivity of adult olive trees, as well as to characterize the biofortification of extra virgin olive oils, their physicochemical quality and antioxidant properties.

2. Material and methods

2.1 Reagents and standards

Comassie Brilliant Blue G-250, Triton X-100, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), 5,5-dithio-bis (2- nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma-

Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

2.2 Experimental setup

The field study was conducted on trees of the Arbequina cultivar, from August 2022 to February 2023, in two adult olive groves, aged 7 and 6 years, located respectively in the municipalities of São Gabriel (SG) (30°20'S, 54°21 'W) and Caçapava do Sul (CS) (30°30'S, 53°29'W), State of Rio Grande do Sul, Brazil. The climate is characterized as humid subtropical Cfa in both municipalities, according to the Köppen classification. The average annual rainfall are 1700 and 1745 mm for SG and CS, respectively, while the average annual temperatures are 19.1°C and 18.0°C. The areas are classified as recommended for olive cultivation according to the agroclimatic zoning of Rio Grande do Sul (ALBA et al., 2013).

Prior to applying the treatments, in June 2022, soil samples (from the row and interrows) and leaf tissue samples were collected for chemical analysis.

In the SG orchard, the spacing between trees is 6m x 5m. The soil is classified in the Brazilian System as Planossolo Háplico Eutrófico típico (Planosol in the WRB/FAO system and Alfisol in Soil Taxonomy classification system). In layers of 0-20 and 20-40 cm, respectively, it presented a silty loam texture (58.1 and 60.3% silt, 28.3 and 23.7% sand and 13 and 16% clay), with moderate acidity (pH 6.0 and 5.9) and a concentration of 1.7 and 1.5% of organic matter, 16 and 8.9 mg dm⁻³ of exchangeable P, 93 and 79 mg dm⁻³ of exchangeable K and 2.4 and 1.6 mg dm⁻³ of available B. Due to its poor drainage conditions, each row of olive trees was planted in raised beds of about 0.5 m height.

In the CS orchard, the spacing is 7m x 5m. The soil is a well-drained soil classified as Neossolo Regolítico in the Brazilian system (Regosol in the WRB/FAO and Psamment in Soil Taxonomy). At the 0-0.20 and 0.20-0.40 m layers, the soil had a sandy loam texture (59.5 and 57.0% sand, 26.3 and 24.2% silt and 14.2 and 18.8% clay), with moderate acidity (pH 5.5 and 5.0) and concentration of 3.0 and 2.1% organic matter, 21 and 7.0 mg dm⁻³ of exchangeable P, 159 and 63 mg dm⁻³ of exchangeable K and 4.4 and 4.0 mg dm⁻³ of available B.

A composite sample of leaf tissue from all trees used in the experiment, in each of the two locations, was ground and analyzed for macronutrient and micronutrient content. The results for the SG and CS orchards were, respectively, for macronutrients (in % m m⁻¹): 1.5 and 1.4 N; 0.21 and 0.20 P; 1.0 and 1.2 K; 1.1 and 0.61 Ca; 0.14 and 0.16 S; and micronutrients (in mg kg⁻¹): 118 and 25 Cu; 25 and 19 Zn; 393 and 161 Fe; 13 and 23 Mn; and 20 and 19 B.

Both orchards had low Se content in the soil and leaf tissue, not detected by ICP-OES (<0.849 mg Se kg⁻¹).

The experimental design was in randomized blocks, with 5 treatments and 5 replications totaling 25 trees per location. The treatments correspond to the doses of Se, defined after bibliographic review: 0 (T1) 50 (T2), 100 (T3), 150 (T4) and 200 mg of Se dm⁻³ (T5), applied through foliar spraying of a solution of sodium selenite (Na₂SeO₃) diluted in water and 0.5% wetting agent. Three liters of such solution were sprayed per tree, repeated on two occasions before the commercial harvest of the olives: in periods of 6 months (August/2022), to evaluate antioxidant and ROS activity in leaves, and 1 month (January/2023), aiming to promote the biofortification of EVOO.

2.3 Total selenium quantification

Total selenium analysis was performed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). For sample digestion and Se determination, the analytical methods EPA 3050: 1996 (USEPA, 1996), EPA 3051 A: 2007 (USEPA, 2007) and EPA 6010 D: 2018 (USEPA, 2018) were used on soil samples, PR-Tb-IN 014 (AOAC, 2019) in plant tissue samples and PR-Tb IN 009 (AOAC, 2019) for olive oil samples.

2.4 Fruit yield

In February 2023, the commercial harvesting season for the fruits in the region, the productivity of each tree was determined individually by the fresh mass of the fruits. One kg of fruits per tree was kept at -4°C for subsequent EVOO extraction.

2.5 Sampling of plant material

Healthy and fully expanded leaves were collected at the four cardinal points of each tree, in the middle third of the crown, in branches of the year. Sampling was carried out in periods of 49 days after the first application of Se and 36 and 39 days after the second application of Se in CS and SG, respectively. The second sampling event coincided with the harvest of the fruits. In the laboratory, the samples were stored at -80°C until the plant extract was obtained and biochemical analyzes were carried out.

2.6 Biochemical analyzes of plant tissue

2.6.1 Obtaining the plant extract

The plant extract was obtained according to Zhu et al. (2004), with adaptations. After macerating the leaves in liquid nitrogen, they were homogenized in buffer solution (50 mM potassium phosphate pH 7.8, 1 mM EDTA and 0.5% Triton X-100) and filtered through filter paper. The resulting solution was centrifuged at 13,000 *g* for 20 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to microtubes and kept at -80°C until analysis. The supernatant of the plant extract was used to carry out subsequent analyses.

2.6.2 Quantification of GSH levels

Reduced glutathione (GSH) total thiol levels were measured according to Ellman (1959) with modifications. In a 96-well plate, 50 µL of supernatant, 190 µL of 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 and 10 µL of 5 mM DTNB were added and kept in the dark for 20 minutes. The reading was performed at 412 nm on a microplate reader (PerkinElmer-EnSpire 2300 Multilabel Reader) and the result was expressed in µmol GSH mg⁻¹ of protein.

2.6.3 Lipid Peroxidation Estimation Assay

Lipid peroxidation was determined using the method of El-Moshaty et al. (1993) with modifications, for quantification of malondialdehyde (MDA), a product generated by the oxidation of membrane lipids by ROS. In vertical glass tubes (25 cm length, 1.5 cm diameter), 150 µL of supernatant and 450 µL of buffer containing 20% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5% thiobarbituric acid (TBA) were added. The tubes

were heated in a water bath at 95°C for 1 hour and 30 minutes and subsequently transferred to 96-well plates to read the absorbance at 532 nm (PerkinElmer-Enspire 2300 Multilabel Reader). Lipid peroxidation was expressed as nmol TBARS mg⁻¹ of protein.

2.6.4 Determination of reactive oxygen species

To determine reactive species levels, oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) was used according to Lebel, Ischiropoulos & Bondy (1992) with modifications. In 96-well plates, 20 µL of supernatant was incubated with 274 µL of 20 mM HEPES buffer pH 7 and 6 µL of 10 mM DCF reagent. Fluorescence emission from DCF was verified after 20 minutes at an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 530 nm (Carestream - Image Station 4000MM PRO). The values were normalized by the protein concentration in the samples and the result was expressed as total fluorescence.

2.6.5 Protein quantification

Protein levels in the samples were determined by the method of Bradford (1976), which is based on the binding of the dye Coomassie Brilliant Blue G-250 to proteins, resulting in a change in color measured spectrophotometrically. Protein standard curves were prepared using known concentrations of Bovine Serum Albumin (BSA). Samples were diluted and pipetted into 96-well plates. Subsequently, a solution containing the dye was added to the standard curve and sample wells. After incubation for 10 minutes in the dark, absorbance was measured at 595 nm (PerkinElmer-Enspire 2300 Multilabel Reader). The concentration of proteins in the samples was determined by correlating their absorbance values with the standard curve ($R^2 = 0.984$).

2.7 Fruit maturation index, oil yield and paste moisture

The evaluation of the fruit maturation index (MI) was carried out per orchard, in accordance with the International Olive Council (IOC, 2011) standard, in order to relate the olive oil yield associated with the best quality. For this, a sample composed of all replications was selected to qualify the fruits by categories from 0 to 7, according to the color stage of the skin and pulp. Subsequently, the formula was applied: $M.I. = A*0 + B*1 + C*2 + D*3 + E*4 + F*5 + G*6 + H*7 / 100$, where the letters refer to the number

of fruits defined in each category of coloring, obtaining the maturation index of each orchard.

Due to laboratory limitations for extracting one EVOO sample per day, treatments with doses of 0, 100 and 200 mg Se dm⁻³ were selected to obtain EVOOs and carry out subsequent analyses. For extraction, the fruits were initially crushed with a manual mill. Subsequently, according to the method adapted from Miho et al. (2018), malaxation was performed with the crushed fruits for 30 minutes, using a mixer-type agitator, kept in a water bath at approximately 28°C. The resulting paste was centrifuged at 3.000 rpm for 10 minutes and the supernatant liquid fraction was separated and centrifuged two more times at 4.000 rpm for 10 minutes, to separate the oil and aqueous phases. The EVOOs found were stored in amber glass bottles and kept in the dark at room temperature until analysis was carried out.

The oil yield was calculated using the volume of EVOO extracted per kg of olives sampled, using the calculation: oil yield = ((volume of oil extracted / kg of fruit) * 100), expressed as a percentage.

The moisture content of the paste was determined by the fraction of the olive paste made up of water from the vegetation and the volatile components of the olive, through the following calculation: moisture (%) = (weight of (water + volatile matter) / weight of paste * 100), expressed as a percentage (IOC, 2011).

2.8 Physicochemical parameters of quality and antioxidant activity of extra virgin olive oil

2.8.1 Quality index

The quality indices of EVOO were evaluated according to the percentage of peroxide index, free acidity and specific extinction in the ultraviolet. Peroxide values were determined according to the IOC method (2017a). For this, the EVOO samples were dissolved in a mixture of solvents (chloroform and acetic acid 3:2 v:v ratio), in addition to potassium iodide to release the iodide in the reaction and titration with sodium thiosulfate (0.01 M), using a starch solution as indicator. The results were expressed in milliequivalents of active oxygen per kilogram of olive oil (mEq O₂ kg⁻¹). Free acidity was evaluated using the IOC method (2017b), using the solvents diethyl

ether and ethanol (1:1 v:v ratio) and subsequent titration with sodium hydroxide (0.1 M). The results were expressed as percentage of oleic acid. The specific extinction in the ultraviolet was determined at 232 and 270 nm, in a spectrophotometer (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis), by dissolving the samples in cyclohexane (IOC, 2019). All analyzes were performed in triplicate.

2.8.2 Schaal Oven Test

The evaluation of the oxidative stability of olive oil was performed using the Schaal Oven Test according to the Cg 5-97 method (AOCS, 2003) with modifications and determination of the peroxide index over time. The olive oil samples (100 g) were placed in 250 mL glass beakers and heated in an oven ($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) without air circulation. Heating was carried out for the time necessary for the samples to reach peroxide values $\geq 20 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$, maximum value stipulated by legislation to qualify extra virgin olive oil (BRASIL, 2012; CODEX, 2021). The samples were analyzed at regular time intervals of 12 hours during the first 48 hours and, subsequently, 24 hours until the last sample reached the established peroxide value, with 96 hours of accelerated oxidation.

2.8.3 Chemical analysis of extra virgin olive oil

2.8.3.1 Obtaining the polar extract

Olive oil extracts were obtained by liquid-liquid extraction, adapted from Nakbi et al. (2010): 2.5 g of olive oil was added to a solution containing 5 mL of methanol/water (3:2) and 5 mL of hexane and homogenized on a magnetic stirrer for 10 minutes. The solution was centrifuged for 5 minutes at 5,000 *g*. The polar phase was removed with a syringe and filtered through a 0.45 μm nylon filter and used for analyzes of phenolic compounds, flavonoids and in vitro antioxidant activity.

2.8.3.2 Total phenolic compounds and total flavonoids

Total phenolic compounds were quantified using the Folin-Ciocalteu method, described by Swain & Hills (1959), with modifications. In a 96-well plate, 4 μL of polar olive oil extract, 175 μL of distilled water, 35 μL of 1N Folin-Ciocalteu reagent and 70 μL of 15% sodium carbonate were added in each tube. After 2 hours, absorbance readings were taken at 760 nm on a microplate reader (PerkinElmer-EnSpire 2300

Multilabel Reader). From a standard curve of gallic acid ($R^2 = 0.9991$), the results were expressed in mg of EAG 100 g of polar extract⁻¹ (EAG = Gallic acid equivalent).

Total flavonoid contents were obtained using the method described by Kumaran & Karunakaran (2006), with modifications. For that, 150 μ L of polar extract and 150 μ L of 2% aluminum chloride were pipetted in tubes of a 96-well plate. For the blank sample, 150 μ L of distilled water and 150 μ L of polar extract were pipetted. After 10 minutes of rest, absorbance readings were taken on a microplate reader (PerkinElmer-EnSpire 2300 Multilabel Reader) at 415 nm. The results were expressed in mg of EQ 100 g of polar extract⁻¹ (EQ = Quercetin Equivalent), based on a quercetin standard curve ($R^2 = 0.9984$).

2.8.3.3 Total chlorophyll and total carotenoids

The determination of pigments was carried out according to the method of Mosquera et al. (1991), in which 7.5 grams of olive oil were dissolved in 25 mL of cyclohexane. The absorption of the homogenized solution was determined at 670 nm for chlorophyll and 470 nm for carotenoids in a spectrophotometer (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis). The results were expressed as mg of pheophytin and lutein per kilogram of olive oil, for total chlorophyll and carotenoids, respectively. Pigment concentration was expressed using the following equations: Chlorophyll = $A_{670} * 106 / 613 * 100$; Carotenoids = $A_{470} * 106 / 2000 * 100$; where A_{670} and A_{470} are equivalent to the absorbance at the respective wavelengths of 670 and 470 nm, respectively.

2.8.3.4 In vitro antioxidant activity

Antioxidant activity was evaluated through the ability to capture the radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) by the compounds present in EVOOs, according to a method adapted from Re et al. (1999). For this, the ABTS stock solution (7 mM) was mixed with potassium persulfate (140 mM). To use ABTS in the reactions, it was diluted 50x from the stock solution. The polar extract of the sample was diluted in 900 mg mL⁻¹ of distilled water. In microplates, it was pipetted: the blank, with 250 μ L of distilled water; ABTS, with 50 μ L of distilled water and 200 μ L of ABTS; and the sample, with 2 μ L of the extract, 48 μ L of distilled water and 200 μ L of ABTS. The plates were kept at rest for 6 minutes in the dark and the absorbance was determined on a microplate reader (PerkinElmer-EnSpire 2300 Multilabel Reader)

at 734 nm. For the calculation, the blank absorbance was discounted from all other readings and the formula was applied: % scavenging = (ABTS absorbance - sample absorbance) / ABTS absorbance * 100). The result was expressed as % scavenging at 900 mg mL⁻¹ of extract.

The antioxidant activity by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH•) was determined through the ability of the compounds present in the samples to scavenge the stable radical DPPH, according to the method of Brand-Williams (1995), with modifications. The procedure was like the one mentioned above. DPPH stock solution (10mM) was prepared with methanol and diluted to 900 µM for analysis. The polar extract of the sample was diluted to 900 mg mL⁻¹. It was pipetted in microplates: the blank, with 300 µL of methanol; DPPH, with 270 µL of methanol and 30 µL of DPPH; and the sample, with 10 µL of the extract, 260 µL of methanol and 30 µL of DPPH. The plate was kept at rest for 45 minutes in the dark and the absorbance was read on a microplate reader (PerkinElmer-EnSpire 2300 Multilabel Reader) at 517 nm. For the calculation, the blank absorbance was discounted from all other readings and the formula was applied: % scavenging = (DPPH absorbance – sample absorbance) / DPPH absorbance * 100). The result was expressed as % scavenging at 900 mg mL⁻¹ of extract.

2.9 Statistical analysis

Two-way analyses of variance ($P < 0.05$) were used considering the effects of fertilization with Se and blocks on fruit productivity and biochemical parameters of leaf tissue. Means were compared using Tukey's post hoc test ($P < 0.05$). For the total Se content in leaves, regression analysis was used. All analyzes used and graphical representations were carried out using the SigmaPlot v.11.0 program.

3. Results

Selenium content in leaf tissue

The quantification of total Se in leaves was carried out only after the second application of Se. In both orchards, an increase in leaf Se content was observed with the applied Se doses, with an adjustment of the linear equation in the response

function. The increases were relatively similar in both orchards, given by the linear equations adjusted in each site. In the SG orchard (Figure 1), the relationship between applied Se dose (x) and foliar Se content (y) is represented by the equation: $y = -2.357 + 2.462 x$ ($R^2 = 0.822$; $P = 0.034$). In the CS orchard (Figure 2), in turn, the equation was: $y = -2.199 + 2.242 x$ ($R^2 = 0.908$; $P < 0.012$). Therefore, both the intercept and the angular coefficient were similar, evidencing that distinct soil and climate conditions did not affect leaf Se content. Thus, for the range of doses used in our study, the behavior was linear and the highest Se dose applied promoted the highest Se foliar content. However, it is worthy to note that the Se content in leaf tissue from trees amended with the largest Se rate (200 mg de Se dm⁻³) tended to stabilize in relation to the 150 mg de Se dm⁻³ (the upmost value of Se content in the SG orchard was 9.9 mg Se kg⁻¹ of dry mass). In CS, the largest Se content in leaves was 7.9 mg Se kg⁻¹ of dry mass (observed in the treatment of 200 mg de Se dm⁻³). In trees without Se application, in turn, leaf Se content was below the detection limit of the ICP-OES (0,849 mg Se kg⁻¹) in all samples, in agreement with the Se scarcity in the soils of the study sites.

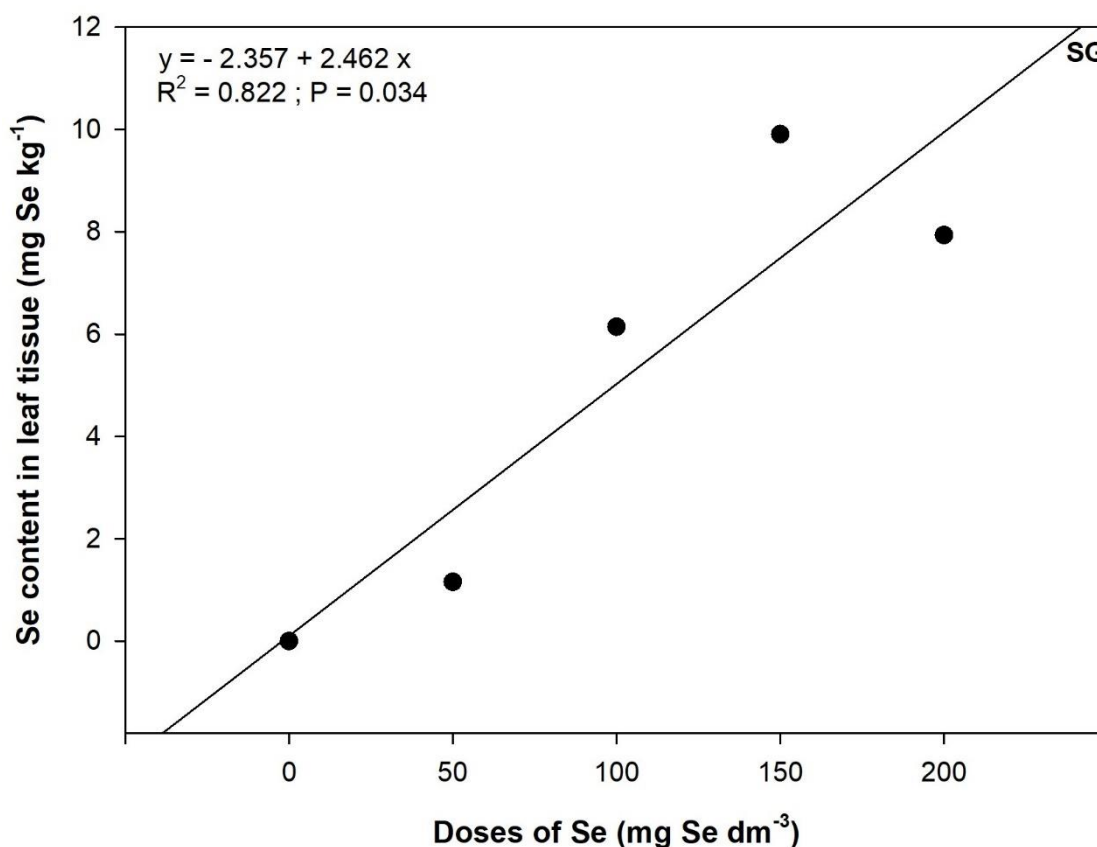


Figure 1: Relationship between the applied selenium dose (x) and leaf selenium

content (y) in the SG orchard, with adjustment of the linear equation in the response function. SG = São Gabriel. Values expressed as averages of each treatment (n=5).

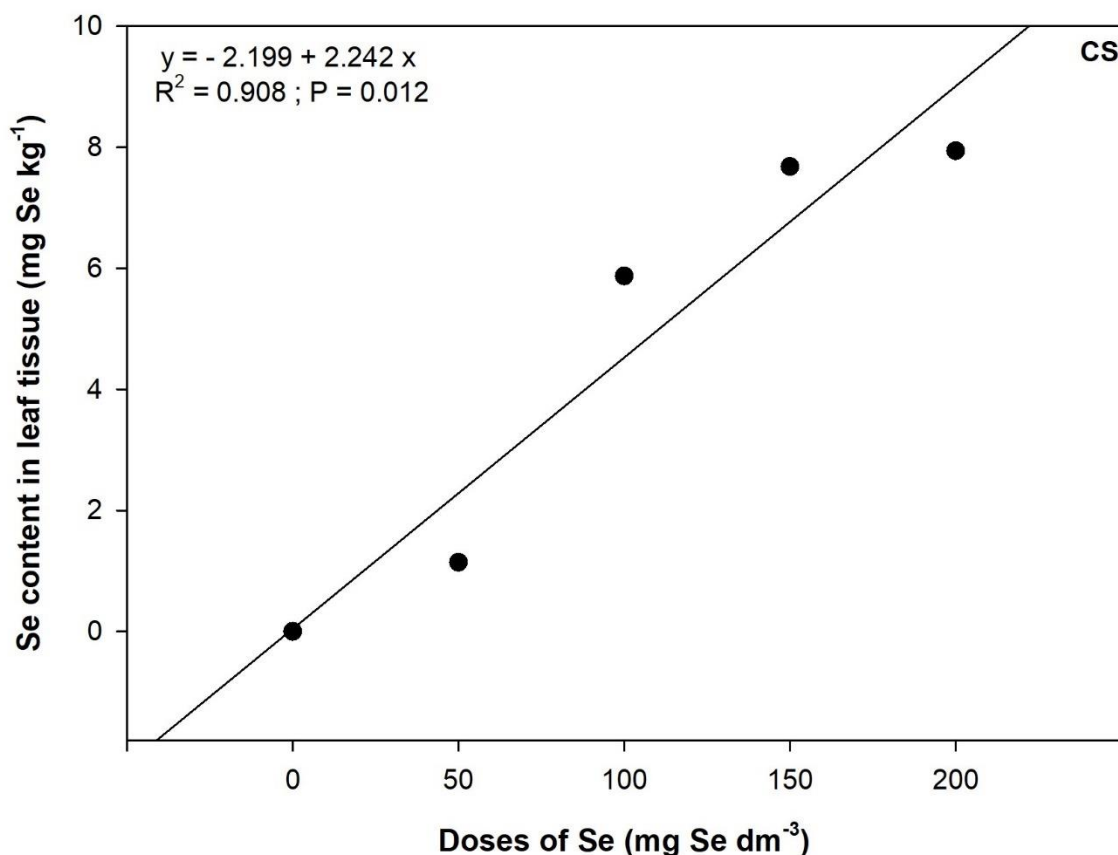


Figure 2: Relationship between the applied selenium dose (x) and leaf selenium content (y) in the CS orchard, with adjustment of the linear equation in the response function. CS = Caçapava do Sul. Values expressed as averages of each treatment (n=5).

Fruit yield

In both orchards, there was no significant effect of Se doses on the fruit yield of olives ($P > 0.05$) (Figure 3). It is worth mentioning that yields ranged among 5.8 to 8.8 kg fruit tree⁻¹, indicating a low yield typical of an “off” year in the natural bearing of olive trees.

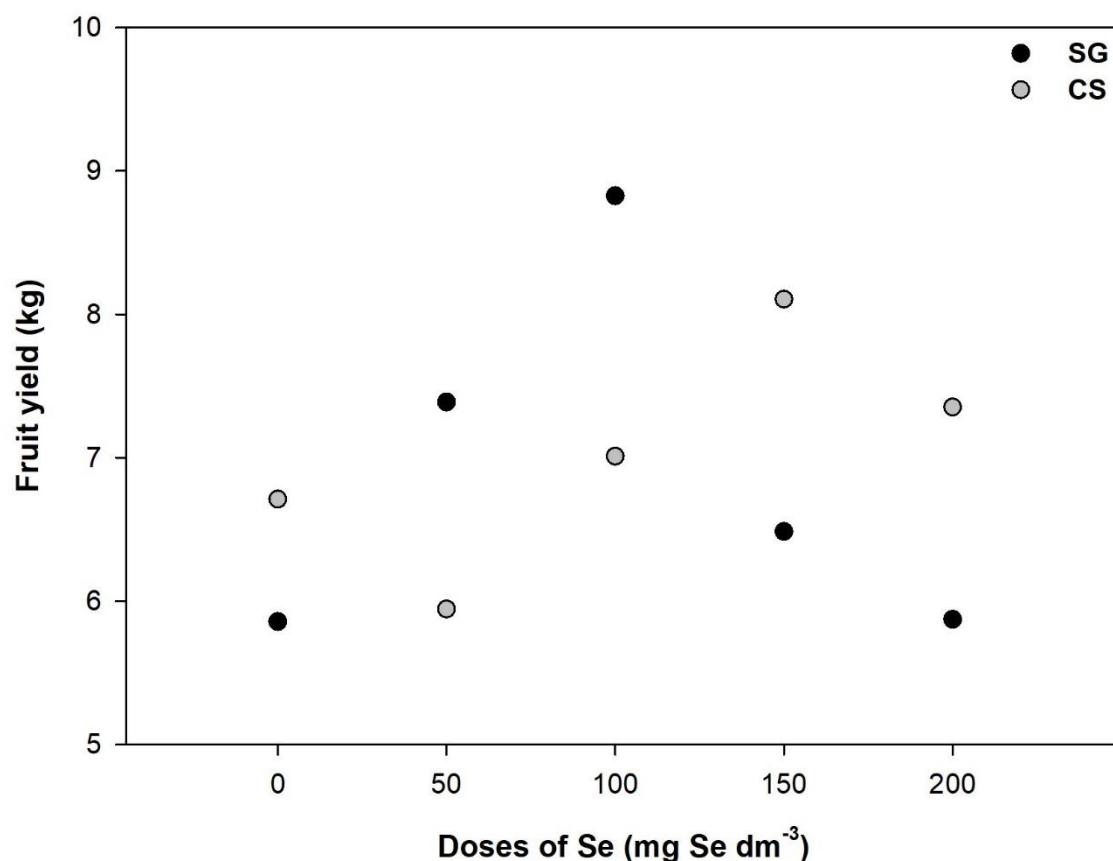


Figure 3: Fruit yield of olive in SG (black dots) and CS (gray dots) orchards in relation to the foliar application of Se. Values expressed as averages of each treatment in each site (n=5).

Biochemical analyzes of leaf tissue

In both periods of leaf tissue analysis, a significant difference was observed between treatments ($P < 0.05$) only for ROS, in the CS orchard, represented by the DCF-DA fluorescence in the samples (Table 1). In the period after the 1st application, samples with 150 mg Se dm⁻³ resulted in lower fluorescence (30.90) compared to the dose of 0 mg Se dm⁻³ (49.61), indicating less ROS in the leaf tissue of plants fertilized with Se. Through numerical differences, greater fluorescence was observed in all treatments in the SG orchard in relation to the CS orchard (Table 1).

In the period after the 2nd Se application, samples from treatment with 100 mg Se dm⁻³ showed mean fluorescence (10.02) significantly lower than in doses of 150 and 200 mg Se dm⁻³ (34.60 and 35.59, respectively), indicating less ROS at T3 (Table

2). Numerically, a decrease in the content of reactive species was observed in the period after the 2nd application compared to the period after the 1st application, in both orchards (Table 1 and 2).

There was no significant difference in the levels of GSH and lipid peroxidation in leaf tissue between treatments, in both periods and olive groves evaluated (Table 1 and 2).

Table 1: Analysis of GHS levels, lipid peroxidation and reactive oxygen species in the leaf tissue of trees fertilized with different doses of selenium, after the first application of Se, in the SG and CS orchards.

		0	50	100	150	200
GSH levels ($\mu\text{mol GSH mg protein}^{-1}$)	SG	48.82 $\pm$	51.21 $\pm$	59.11 $\pm$	63.23 $\pm$	61.98 $\pm$
		12,47 ns	10,81 ns	16,58 ns	9,33 ns	11,31 ns
	CS	48.67 $\pm$	49.53 $\pm$	47.48 $\pm$	48.74 $\pm$	49.19 $\pm$
		5,90 ns	3,03 ns	5,81 ns	2,13 ns	9,50 ns
Lipid peroxidation (nmol TBARS mg protein ⁻¹)	SG	0.00185 $\pm$	0.00173 $\pm$	0.00183 $\pm$	0.00193 $\pm$	0.00181 $\pm$
		0,00043 ns	0,00034 ns	0,00048 ns	0,00025 ns	0,00025 ns
	CS	0.00257 $\pm$	0.00214 $\pm$	0.00206 $\pm$	0.00215 $\pm$	0.00240 $\pm$
		0,00124 ns	0,00046 ns	0,00025 ns	0,00045 ns	0,00038 ns
DCF-DA fluorescence	SG	53.91 $\pm$	55.85 $\pm$	55.66 $\pm$	57.82 $\pm$	52.53 $\pm$
		14,25 ns	16,11 ns	7,77 ns	8,98 ns	5,94 ns
	CS	49.61 $\pm$	47.35 $\pm$	46.50 $\pm$	30.90 $\pm$	38.71 $\pm$
		14,46 b	12,75 ab	6,73 ab	21,00 a	7,91 ab

Values expressed as means $\pm$ SE of repetitions (n=5). Means followed by different letters in the lines represent a significant difference between treatments, according to the Tukey test ($P < 0.05$). Ns = not significant differences. 0 = 0 mg Se dm⁻³, 50 = 50 mg Se dm⁻³, 100 = 100 mg Se dm⁻³, 150 = 150 mg Se dm⁻³ and 200 = 200 mg Se dm⁻³. SG = São Gabriel orchard and CS = Caçapava do Sul orchard.

Table 2: Analysis of GSH levels, lipid peroxidation and reactive oxygen species in the leaf tissue of trees fertilized with different doses of selenium, after the 2nd application of Se, in the SG and CS orchards.

		0	50	100	150	200
GSH levels ($\mu\text{mol GSH mg protein}^{-1}$)	SG	42.45 $\pm$	43.16 $\pm$	49.24 $\pm$	46.26 $\pm$	48.34 $\pm$
		5,22 ns	7,11 ns	4,81 ns	3,61 ns	3,86 ns
	CS	49.04 $\pm$	48.55 $\pm$	49.67 $\pm$	44.26 $\pm$	53.14 $\pm$
		6,72 ns	11,91 ns	3,78 ns	5,58 ns	3,55 ns
Lipid peroxidation (nmol TBARS mg protein ⁻¹)	SG	0.00165 $\pm$	0.00160 $\pm$	0.00167 $\pm$	0.00172 $\pm$	0.00176 $\pm$
		0,00014 ns	0,00025 ns	0,00027 ns	0,00029 ns	0,00041 ns
	CS	0.00138 $\pm$	0.00133 $\pm$	0.00131 $\pm$	0.00142 $\pm$	0.00146 $\pm$
		0,00044 ns	0,00027 ns	0,00015 ns	0,00016 ns	0,00017 ns
DCF-DA fluorescence	SG	16.51 $\pm$	25.92 $\pm$	21.31 $\pm$	22.57 $\pm$	18.29 $\pm$
		7,94 ns	12,51 ns	11,16 ns	8,66 ns	7,31 ns
	CS	24.54 $\pm$	17.54 $\pm$	10.02 $\pm$	34.60 $\pm$	35.59 $\pm$
		11,65 ab	11,45 ab	8,31 a	12,53 b	12,25 b

Values expressed as means $\pm$ SE of repetitions (n=5). Means followed by different letters in the lines represent a significant difference between treatments, according to the Tukey test ($P < 0.05$). Ns = not significant differences. T1 = 0 mg Se dm⁻³, T2 = 50 mg Se dm⁻³, T3 = 100 mg Se dm⁻³, T4 = 150 mg Se dm⁻³ and T5 = 200 mg Se dm⁻³. SG = São Gabriel orchard and CS = Caçapava do Sul orchard.

Fruit maturation index, oil yield, paste moisture

The maturation index of the fruits analyzed was 2.14 in São Gabriel and 0.93 in Caçapava do Sul, being below the ideal range between 3 and 4 indicated for olive harvesting, to guarantee the balance between the best yield and the sensory characteristics and quality parameters of EVOO (IOC, 2011). The olive harvest during this ripening period was conducted simultaneously with the commercial harvest defined by producers of each orchard. The olive oil samples obtained from the SG orchard did not differ in terms of oil yield between the three treatments, resulting in 11% olive oil per sample. The olive oil yield of the CS samples was lower, reaching

8.33% for T1 and 9.14% for T3 and T5, due to the lower maturity of the fruits in this orchard. As for paste moisture, the values of the SG samples ranged from 18.62 to 21.37%, while in CS they ranged between 20.06 and 22.77% (Table 3).

Table 3: Fruit maturation index, oil yield and paste moisture of the treatments selected for the extraction of olive oil samples from olive groves in SG and CS.

	SG 0	SG 100	SG 200	CS 0	CS 100	CS 200
Fruits maturity index		2.14			0.93	
Olive oil yield (%)	11.00	11.00	11.00	8.33	9.14	9.14
Paste moisture (Mst) (%)	18.62	21.37	19.60	21.41	22.77	20.06

SG 0 = 0 mg Se dm⁻³, SG 100 = 100 mg Se dm⁻³ and SG 200 = 200 mg Se dm⁻³ in São Gabriel orchard; CS 0 = 0 mg Se dm⁻³, CS 100 = 100 mg Se dm⁻³ and CS 200 = 200 mg Se dm⁻³ in Caçapava do Sul orchard.

Extra virgin olive oil

Selenium content in extra virgin olive oil

All olive oil samples presented Se content above the quantitation values in ICP-OES. The highest levels were observed in T3 EVOOs, being 1.400 and 2.056 mg Se kg⁻¹ of olive oil, for SG and CS, respectively (Table 4). The oils obtained from the CS orchard resulted in higher Se levels in all treatments, compared to those from SG. The T1 samples, without application of Se, presented Se levels close to those treated with Se at the largest dose.

Table 4: Characterization of the physicochemical standards of olive oil quality and total selenium in extra virgin olive oil samples extracted from orchards in SG and CS.

	SG 0	SG 100	SG 200	CS 0	CS 100	CS 200	Legislation ¹
Selenium content (mg Se kg ⁻¹)	1.243	1.400	1.180	1.535	2.056	1.797	-
Extinction UV (232 nm)	2.219	2.045	1.325	2.043	0.888	0.861	≤2.50
Extinction UV	0.136	0.169	0.053	0.061	0.082	0.133	≤0.22

(270 nm)

Free acidity (% oleic acid)	0.46	0.48	0.44	0.35	0.46	0.41	<0.80
Peroxide index (mEq O ₂ kg ⁻¹)	3.90	3.86	3.63	3.72	2.99	3.97	≤20.00
Total phenol (mg EAG 100 g ⁻¹)	11.88	11.88	11.89	11.88	11.88	11.88	-
Total flavonoids (mg EQ 100 g ⁻¹)	0.0504	0.0560	0.0546	0.0462	0.0560	0.0574	-
Chlorophyll (mg pheophytin kg ⁻¹)	2.02	1.92	1.78	2.76	4.09	3.35	-
Carotenoid (mg lutein kg ⁻¹)	2.10	1.77	1.65	2.65	3.58	3.09	-
ABTS (% scavenging)	22.83	18.37	27.30	14.17	16.80	12.60	-
DPPH (% scavenging)	4.146	7.073	10.244	5.366	1.951	4.390	-

Results expressed as means of triplicates of each sample (n=1). SG 0 = 0 mg Se dm⁻³, SG 100 = 100 mg Se dm⁻³ and SG 200 = 200 mg Se dm⁻³ in São Gabriel orchard; CS 0 = 0 mg Se dm⁻³, CS 100 = 100 mg Se dm⁻³ and CS 200 = 200 mg Se dm⁻³ in Caçapava do Sul orchard. ¹BRASIL (2012).

Quality index of extra virgin olive oil

All EVOOs produced presented quality index within the maximum limits established by Brazilian and international legislation for EVOO (BRASIL, 2012; CODEX, 2021), indicating the good quality of olive oils from Rio Grande do Sul in terms of the parameters evaluated (Table 4). In specific extinction in the ultraviolet at 232 nm, lower values were observed for oils from T5 in SG and T3 and T5 in CS. At a wavelength of 270 nm, the oils obtained from T5 in SG and T1 and T3 in CS showed lower absorption. Comparing the numerical results, a local effect was identified on the absorption values at both wavelengths, being lower in olive oils extracted from CS compared to those from SG. Regarding free acidity, no differences were observed between the treatments used. The lowest oleic acid content was obtained from CS

sample T1. The peroxide values did not demonstrate differences between treatments, with the lowest peroxide value observed in T3 olive oil from the CS orchard (Table 4).

Total phenolic compounds and total flavonoids

The values of total phenolic compounds did not change according to the stipulated treatments, resulting in 11.88 mg of EAG 100 g⁻¹ of polar extract in all EVOOs produced. The results of total flavonoid did not demonstrate differences between treatments, except for sample T1 from the CS orchard, which presented a value of 0.0462 mg of EQ 100 g⁻¹ of polar extract, lower compared to the other samples (Table 4).

Total chlorophyll and total carotenoids

The chlorophyll and carotenoid content was higher in the EVOOs samples obtained from the CS orchard, which may be related to the lower maturity of the fruits. Among these samples, T3 presented the highest values, both for chlorophyll and carotenoids. The values obtained in samples in the SG orchard were lower and did not vary much between treatments, being higher in sample T1 for both pigments (Table 4).

In vitro antioxidant activity

The antioxidant activity of the EVOOs extract determined by the capture of the ABTS radical resulted in greater inhibition of T5, T1 and T3 in the SG orchard, while in the CS orchard the greatest inhibition was of T3, T1 and T5. A local difference in the results was observed, with the SG orchard showing a higher percentage of inhibition compared to CS, indicating a greater antioxidant capacity of the EVOOs obtained in SG. Regarding the DPPH• radical scavenging capacity of the samples evaluated, the application of Se increased the antioxidant activity of olive oils obtained in SG, with a direct relation to the Se doses (Table 4). Such relation was not observed in the CS orchard. In both methods of evaluating the antioxidant capacity of olive oils (ABTS and DPPH), the SG T5 sample presented higher values compared to the others (Table 4).

Oxidative stability

Figure 4 shows the behavior of the peroxide index of EVOOs with different Se treatments obtained in SG and CS. The CS T3 sample showed lower oxidative stability, reaching a value of 20 mEq O₂ kg⁻¹ in a period of 48h. Olive oils T1 and T5 from CS and T5 from SG reached the stipulated value within 72 hours after the start of the test. The oils that showed the greatest oxidative stability were T1 and T3 from SG, after 96 hours of accelerated oxidation.

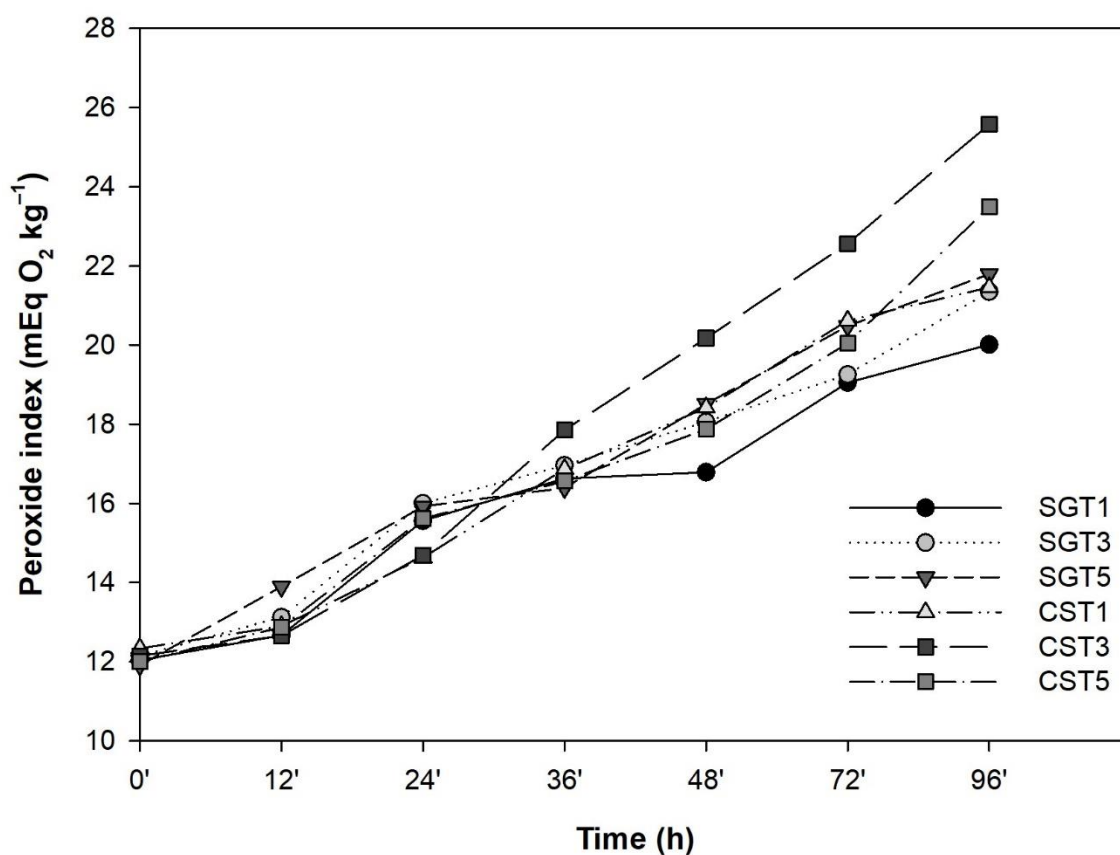


Figure 4. Peroxide index values of olive oil samples over 96 hours, during the Schaal Oven Test. Values expressed as means of triplicates of each sample (n=1).

4. Discussion

This work evaluated the effects of different doses of selenium on total Se content in leaf, fruit productivity and responses to oxidative stress in olive leaves of the Arbequina cultivar, in addition to verifying biofortification with Se, quality parameters and antioxidant characteristics of EVOOs extracted in two orchards with different soil conditions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

As expected, an increase in Se concentration in leaf tissue was observed, indicating that sodium selenite administered by foliar spray was efficiently absorbed by the trees. The increase in Se content was linear according to the Se doses and reached contents of 9.9 mg Se kg⁻¹ in SG (dose of 150 mg Se dm⁻³) and 7.9 mg Se kg⁻¹ of dry mass in CS (dose of 200 mg Se dm⁻³). Other studies in olive trees showed an increase in Se content in leaves with doses of 50 and 150 mg Se dm⁻¹ as a mineral source of sodium selenate, with average values of 0.026 and 0.036 mg Se kg⁻¹ of fresh mass (PROIETTI et al., 2013). Research conducted on olive trees with the addition of Se via foliar spraying and endoxylematic injection (TEDESCHINI et al., 2015) and hydroponics (REGNI et al., 2021) also observed an increase in the concentration of the element in the leaf tissue. In our study there was no visual evidence of toxicity due to excess Se in any plant, even at the highest dose applied. Visual symptoms of Se toxicity include leaf chlorosis and necrosis (ÁVILA et al., 2020; GOUVEIA et al., 2020; YILDIZ, PEHLIVAN & TERZI, 2023).

Regarding the oxidative stress parameters of the leaves, there was a significant effect of the presence of Se on the ROS levels in CS after the 1st application of Se, with the 150 mg Se dm⁻³ treatment showing lower total fluorescence and, therefore, less ROS in comparison with samples without Se. Through foliar spraying with Se, Proietti et al. (2013) observed changes in the levels of reactive species in olive trees, with a decrease in MDA levels. In the period after the 2nd application of Se, a reduction in ROS levels was observed in both orchards compared to the period after the 1st application. However, such effect had not a direct and linear relation to Se doses. Only in CS was there a significant difference between the doses of Se applied. Samples with 100 mg Se dm⁻³ showed lower total fluorescence compared to treatments with higher doses of Se (150 and 200), which resulted in higher levels of ROS, indicating a pro-oxidant effect. Evaluating physiological and biochemical changes induced by selenium toxicity in maize seedlings, Yildiz, Pehlivan & Terzi (2023) observed an increase in oxidative stress with excess Se, through the accumulation of ROS and increased lipid peroxidation.

Even though no significant difference was observed in fruit productivity between the doses of Se applied, it is important to note that they did not promote a reduction in the productive potential of the trees. Fruit yield in the largest Se dose was similar to the absence of Se application. The apparently larger fruit yield in intermediate Se

doses need to be confirmed in years of high fruit yield, because, as mentioned previously, this study coincided with the year of low production (“off” year). Alternate bearing occurs naturally in olive trees and is affected by several biotic and abiotic factors. The low yield may have masked the effect of Se, as the yields in the studied orchards can surpass 40 kg of fruit per tree in “on” years (personal registers). Furthermore, it is known that the olive tree physiologically begins the reproductive development of a given crop 12 months before harvest, with floral induction, followed by floral initiation in autumn and floral differentiation after breaking dormancy, between August and September in South hemisphere. Therefore, when the first foliar application of Se was carried out, the floral induction and initiation stages had already taken place and, therefore, were not affected by the treatments. There are studies reporting increase of fruit yield by Se application. Olive trees fertilized with 50 and 150 mg Se dm⁻³ via soil (D'AMATO et al., 2014) and 100 mg Se dm⁻³ via foliar spray (D'AMATO et al., 2018) showed higher olive productivity under conditions of water stress, compared to unfertilized trees. The authors described an alleviation on the negative effect of low water availability on fruit production by the Se application (D'AMATO et al., 2018).

Although the application of Se increased the element content in the leaf tissue proportionally to the doses, the same behavior was not evident in the Se content in EVOO. Samples without Se application presented Se levels close to those treated with Se. This behavior may be due to the absorption of Se from the soil, because although the natural levels in the soil are low, in agreement with low Se content in leaf tissue of trees without Se application, the long period of absorption by perennial plants and the great volume of soil explored by the root system can favor the absorption of Se. This explanation would also justify the higher values obtained in the CS orchard in relation to the SG, with the content and availability of Se existing in the CS soil (Regosol, with almost double the organic matter content in relation to the SG Planosol), may have favored better nutrition of olive trees with Se native to the soil. The translocation and storage of Se in olive trees is not well known. However, the higher levels found in olive oils from the CS orchard than in SG show that the variability of Se in soils is a factor that must be better known, to adjust Se doses aiming at the biofortification of olive products.

Evaluating the efficiency of Se foliar spraying in the biofortification of olive oil D'Amato et al. (2014; 2018) found an increase in the concentration of the element in olive oils, however they obtained lower levels than those found in our study. This may be related to the age of the plants, volume of selenium solution applied and the period of application, which differed from ours. Biofortification of food products with Se has been studied and efficiently obtained in other commercial crops, such as rice (ANDRADE et al., 2018), wheat (LARA et al., 2019), carrots (KÁPOLNA et al., 2009), coffee (SOUSA et al., 2022), among others. However, specifically in olive oil, scientific results are still scarce.

The intrigant scenario of EVOO exhibiting a substantial Se concentration at a 0 mg Se dm⁻³ dose, yet remaining undetected in the leaf tissue of the same treatment, warrants attention. The metabolic pathways of Se in plants are diverse and contingent upon factors such as species, developmental stages, Se form and concentration, and soil conditions, including pH and salinity (GUPTA & GUPTA, 2017). Assimilation and translocation mechanisms in plants further contribute to this complexity. These processes are driven by a multitude of transporters and enzymes specific to each Se form. In leaf tissues, selenite undergoes assimilation and transforms into selenocysteine (SeCys) and selenomethionine (SeMet), serving as precursors for selenoproteins or undergoing methylation into methyl-SeCys and methyl-SeMet. After methylation, Se has the potential to be volatilized into the atmosphere, manifesting as non-toxic dimethylselenide (DMSe) or dimethyldiselenide (DMDSe) (GUPTA & GUPTA, 2017; RYANT et al., 2020). The phenomenon of volatilization may elucidate the apparent loss of Se from leaves, naturally absorbed from the soil, resulting in non-detection at T1. Generally, Se concentration is higher in younger leaves compared to older ones during plant growth (GUPTA & GUPTA, 2017; RYANT et al., 2020). Nevertheless, Se content in leaves experiences a significant reduction during the reproductive phase, accompanied by an increase in seed content (RYANT et al., 2020). The Se reserves may be stored in the other tissues than leaf, as in roots and trunk. This dynamic may elucidate the mobilization of Se from reserve tissues to fruits, contributing to a heightened Se concentration in EVOO and the absence of detection in leaves in the Se non-application treatment.

Through the evaluated parameters, the extracted olive oils presented excellent quality, with peroxide, free acidity and specific UV extinction values below the limit

stipulated for extra virgin olive oil. We observed lower specific extinction values in the UV at 232 and 270 nm with doses of 100 and 200 mg Se dm⁻³, indicating lower levels of secondary oxidative compounds, such as conjugated dienes and trienes, absorbed at these wavelengths, respectively. In EVOOs from CS, we identified lower absorption values compared to those from SG at both wavelengths, in addition to higher concentrations of chlorophylls and carotenoids. These factors may be associated with a higher concentration of Se in the extracted oils and a lower MI in CS fruits. However, free acidity and peroxide values did not vary between treatments. D'Amato et al. (2014) also did not observe any influence of the presence of Se in olive oil on the aforementioned indices.

During the Schaal Oven Test, no clear effect of Se on the oxidative stability was observed. In fact, the oil from T3 sample, from CS, had the largest Se content among the oil samples and, in spite of that, was the fastest to reach 20 mEq O₂ kg⁻¹, which is the limit stipulated for EVOO by legislation (BRAZIL, 2012; CODEX, 2021). The T1 and T3 olive oils from SG showed greater oxidative stability, being evaluated for up to 96 hours of accelerated oxidation to reach the peroxide value. Bossoni et al. (2021) evaluated the behavior of olive oils produced in Santa Catarina, also in southern Brazil, which showed lower oxidative stability in EVOOs from the Arbequina cultivar, reaching the stipulated limit after 24 h of testing, suggesting greater quality and resistance to oxidation of the EVOOs evaluated in this study.

Foliar selenium fertilization induced changes in oxidative stress indicators over time, indicating its dose-dependent role in plant antioxidant and pro-oxidant metabolism. However, there was no effect of selenium presence on olive oil quality parameters and antioxidant activity. While distinct responses were noted in leaf tissue oxidative stress, no such differences were observed in the extracted olive oil samples across the doses applied. Selenium addition effectively increased total Se content in leaves in a dose-dependent manner, but this proportional increase was not mirrored in the olive oil, with higher concentrations observed at intermediate doses. Fruit productivity remained unaffected by the applied doses in this study, and there was no visual evidence of selenium toxicity in any plant.

5. Final considerations

The results indicate that selenium foliar fertilization was effective in proportionally increasing the total Se content in leaves according to the doses tested. However, the increase in Se levels in olive oil did not show this behavior, and higher concentrations were observed in the intermediate dose.

The addition of Se promoted changes in plant oxidative stress indicators over time, indicating its role in dose-dependent antioxidant and pro-oxidant metabolism. No change in fruit productivity was observed with the applied doses. There was no visual evidence of Se excess toxicity in any plant.

In the present study, there was no effect of Se application on the physical-chemical quality of olive oil and its antioxidant properties. Nevertheless, the application of Se foliar has the potential to reduce ROS in leaves and promote the biofortification of extra virgin olive oil.

Acknowledgements

This work was supported by the Universidade Federal do Pampa and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). We thank the olive growers from the companies Alma do Segredo and Orvalho do Pampa for making their olive groves available for the experiments.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors used ChatGPT to improve readability and language, with caution. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and takes full responsibility for the content of the publication.

References

ALBA, J. M. F.; FLORES, C. A.; WREGE, M. S. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Brasília, DF, 2013.

ANDRADE, F. R.; DA SILVA, G. N.; GUIMARÃES, K. C.; BARRETO, H. B. F.; DE SOUZA, K. R. D.; GUILHERME, L. R. G.; REIS, A. R. DOS. Selenium protects rice plants from water deficit stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 562-570, 2018.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21st Edition, AOAC, Washington DC, 2019.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 2003.

ÁVILA, P. A.; FAQUIN, V.; ÁVILA, F. W.; KACHINSKI, W. D.; CARVALHO, G. S.; GUILHERME, L. R. G. Phosphorus and sulfur in a tropical soil and their effects on growth and selenium accumulation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 44060-44072, 2020.

BONISSONI et al. Caracterização e avaliação da estabilidade oxidativa de amostras de azeite de oliva produzidas na EPAGRI/CEPAF, Chapecó/ SC. In: Cordeiro, C. A. M; SILVA, E. M.; SILVA, B. A. **Ciência e tecnologia de alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**. Editora Científica Digital. 2021. p. 162-171.

BOUIS, W.; ISLAM, Y. Biofortification: Leveraging Agriculture to Reduce Hidden Hunger. In: FAN, S.; PANDYA-LORCH, R. **Reshaping Agriculture for Nutrition and Health**. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, 2012. p. 83-92.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Instrução Normativa nº1, 30 de janeiro de 2012. **Regulamento técnico do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva**. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

CODEX. Codex Alimentarius. Standards for olive oils and olive pomace oils, CXS 33-1981. Roma: Secretaria of the Joint FAO/WHO. **International Food Standards**, 2021.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1-13, 2014.

D'AMATO, R.; PROIETTI, P.; NASINI, L.; DEL BUONO, D.; TEDESCHINI, E.; BUSINELLI, D. Increase in the selenium content of extra virgin olive oil: quantitative and qualitative implications. **Grasas y Aceites**, v. 65, n. 2, e025, 2014.

D'AMATO, R.; PROIETTI, P.; ONOFRI, A.; REGNI, L.; ESPOSTO, S.; SERVILI, M.; BUSINELLI, D.; SELVAGGINI, R. Biofortification (Se): Does it increase the content of phenolic compounds in virgin olive oil (VOO)?. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p.1-13, 2017.

D'AMATO, R.; DE FEUDIS, M.; HASUOKA, P. E.; REGNI, L.; PACHECO, P. H.; ONOFRI, A.; BUSINELLI, D.; PROIETTI, P. The Selenium Supplementation Influences Olive Tree Production and Oil Stability Against Oxidation and Can Alleviate the Water Deficiency Effects. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–8, 2018.

D'AMATO, R.; REGNI, L.; FALCINELLI, B.; MATTIOLI, S.; BENINCASA, P.; DAL BOSCO, A.; PACHECO, P.; PROIETTI, P.; TRONI, E.; SANTI, C.; BUSINELLI, D. Current Knowledge on Selenium Biofortification to Improve the Nutraceutical Profile of Food: A Comprehensive Review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 4075-4097, 2020.

DE BRUNO A, PISCOPO A, CORDOPATRI F, POIANA M, MAFRICA R. Effect of Agronomical and Technological Treatments to Obtain Selenium-Fortified Table Olives. **Agriculture**, v. 10, n. 7, p. 284, 2020.

DEL PINO, A. M.; REGNI, L. D'AMATO, R.; DI MICHELE, A.; PROIETTI, P.; PALMERINI, C. A. Persistence of the Effects of Se-Fertilization in Olive Trees over Time, Monitored with the Cytosolic Ca^{2+} and with the Germination of Pollen. **Plants**, v. 10, p. 2290, 2021.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

EL-MOSHATY, F. I. B.; PIKE, S. M.; NOVACKY, A. J.; SEHGAL, O. P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 4, ed. 2, p. 109-199, 1993.

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

FOSCOLOU, A.; CRITSELIS, E.; PANAGIOTAKOS, D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. **Maturitas**, v. 118, p. 60-66, 2018.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

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**, v. 202, p. 110916, 2020.

GUPTA, M.; GUPTA, S. An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-14, 2017.

IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). 2011. **Guide for the determination of the characteristics of oil-olives**. COI/OH/Doc. N° 1. Available on: <http://www.internationaloliveoil.org>. Accessed on: Dec. 10, 2022.

IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). 2017a. **Determination of peroxide value**. COI/T.20/Doc. N° 35/Rev.1. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>. Accessed on: Dec. 10, 2022.

IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). 2017b. **Determination of free fatty acids, col method**. COI/T.20/Doc. N° 34/Rev. 1. Available on: <http://www.internationaloliveoil.org>. Accessed on: Dec. 10, 2022.

IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). 2019a. **Method of analysis spectrophotometric investigation in the ultraviolet**. COI/T.20/Doc. N° 19/Rev. 5. Available from: Available on: <http://www.internationaloliveoil.org>. Accessed on: 10 dez. 2022.

KÁPOLNA, E.; HILLESTROM, P. R.; LAURSEN, K. H.; HUSTED, S.; LARSEN, E. H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1357-1363, 2009.

KIELISZEK, M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food. **Molecules**. v. 24, n. 7. p. 1-14, 2019.

KIPP, A. P.; STROHM, D.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHOMBURG, L.; BECHTHOLD, A.; LESCHIK-BONNET, E.; HESEKER, H. German Nutrition Society (DGE). Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 195-199, 2015.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 109-114, 2006.

LANZA, M. G. D. B.; REIS, A. R. DOS. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 164, p. 27-43, 2021.

LARA, T. S.; LESSA, J. H. L.; SOUZA, K. R. D.; CORGUINHA, A. P. B.; MARTINS, F. A. D.; LOPES, G.; GUILHERME, L. R. G. Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 81, p. 10-18, 2019.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n.2, p. 227-231, 1992.

LOPES, G.; ÁVILA, F.W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 605-615, 2017.

MIHO, H.; DÍEZ, C.M.; MENA-BRAVO, A.; de MEDINA, V.S.; MORAL, J.; MELLIOU, E.; MAGIATIS P.; RALLO, L.; BARRANCO, D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Cultivar influence on variability in olive oil phenolic profiles determined through an extensive germplasm survey. **Food Chemistry**, v. 266, p. 192-199, 2018.

MILLMAN, J. F.; OKAMOTO, S.; TERUYA, T.; UEMA, T.; IKEMATSU, S.; SHIMABUKURO, M.; MASUZAKI, H. Extra-virgin olive oil and the gut-brain axis: influence on gut microbiota, mucosal immunity, and cardiometabolic and cognitive health. **Nutrition Reviews**, v. 79, p. 1362-1374, 2021.

MINGUEZ-MOSQUERA, M.I.; REJANO-NAVARRO, L.; GANDUL'ROJAS, B.; SANCHEZ-GOMEZ, A.H.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Color-pigment correlation in virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, p.332-336, 1991.

NAKBI, A.; ISSAOUI, M.; DABBOU. S.; KOUBAA, N.; ECHBILI, A.; HAMMAMI, M. et al. Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.711-715, 2010.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the total environment**, v. 249, n. 1-3, p. 347-371, 2000.

PROIETTI, P.; NASINI, L.; DEL BUONO, D.; D'AMATO, R.; TEDESCHINI, E.; BUSINELLI, D. Se protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 165-171, 2013.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REGNI, L.; PALMERINI, C.A.; DEL PINO, A.M.; BUSINELLI, D.; D'AMATO, R.; MAIRECH, H.; MARMOTTINI, F.; MICHELI, M.; PACHECO, P.H.; PROIETTI, P. Effects of selenium supplementation on olive under salt stress conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 278, p. 1-8, 2021.

REIS, A. R. DOS.; 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: Selenium in plants, PILON-SMITS et al. **Plant Ecophysiology**, v. 11, p. 211-230, 2017.

RYANT, P.; ANTODOVSKÝ, J.; ADAM, V.; DUCSAY, L.; SKARPA, P.; SAPÁKOVÁ, E. The importance of selenium in fruit nutrition. In: SRIVASTAVA, A. K.; HU, C. **Fruit Crops: Diagnosis and Management of Nutrient Constraints**. 2020. p. 241-254.

SCHIAVON, M.; NARDI, S.; DALLA VECCHIA, F.; ERTANI, A. Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. **Plant Soil**, v. 453, p. 245-270, 2020.

SOUSA, G. F.; SILVA, M. A.; MORAIS, E. G.; VAN OPBERGEN, G. A. Z.; VAN OPBERGEN, G. G. A. Z.; OLIVEIRA, R. R.; AMARAL, D.; BROWN, P.; CHALFUN-JUNIOR, A.; GUILHERME, L. R. G. Selenium enhances chilling stress tolerance in coffee species by modulating nutrient, carbohydrates, and amino acids content. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1-15, 2022.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

TEDESCHINI, E.; PROIETTI, P.; TIMORATO, V.; D'AMATO, R.; NASINI, L.; BUONO, D. D.; BUSINELLI, D.; FRENGUELLI, G. Selenium as stressor and antioxidant affects pollen performance in *Olea europaea*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 16-22, 2015.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Acid digestion of Sediments, Sludges and Soils** – Method 3050B, 1996. Available on: <https://www.epa.gov/>.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Microwave assisted Acid digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils** – Method 3051A, 2007. Available on: <http://www.epa.gov/>.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry** – Method 6010D, 2018. Available on: <https://www.epa.gov/>.

YILDIZ, M.; PEHLIVAN, E.; TERZI, H. Selenium toxicity induced physiological and biochemical alterations in maize seedlings. **European Journal of Biology**, v. 82, p. 154-160, 2023.

ZARONI, A. A. et al. Importância do azeite de oliva para a saúde humana. In: de OLIVEIRA, A. F. **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, 2012. p. 729-772.

ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 163, p. 527-533, 2004.

Efeito do selênio na amenização do estresse oxidativo de oliveiras jovens sob condições de seca e alagamento

Kellyn Klein¹, Maria Victoria Takemura Mariano¹, Cassiano de Bairros Lima Rodrigues¹, Matheus Silva dos Santos¹, Cimélio Bayer², Thais Posser¹, Jeferson Luis Franco¹, Frederico Costa Beber Vieira¹.

¹ Universidade Federal do Pampa/Unipampa, Campus São Gabriel, Rua Aluizio Barros Macedo, BR 290 – Km 423, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. ² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Solos, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

Estudos têm apontado o potencial do selênio (Se) em promover benefícios às plantas na tolerância a estresses abióticos, como a seca, diminuindo o estresse oxidativo através do aumento de compostos antioxidantes. No entanto, há uma lacuna de conhecimento em relação aos efeitos do Se em oliveiras sob condições de seca e alagamento do solo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da presença e ausência de Se no estresse oxidativo em oliveiras (*Olea europaea* L.) expostas a condições de escassez e excesso de água no solo. Árvores jovens com 1 ano com estresse hídrico (cv. Frantoio) foram tratadas por pulverização foliar com soluções de selenito de sódio (150 mg Se L⁻¹) e sem Se. A partir do extrato de folhas e raízes, o teor de Se total, níveis de glutathione reduzida (GSH), peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio (ERO) foram avaliados em árvores bem irrigadas, não irrigadas e alagadas, tratadas e não tratadas com Se. As análises foram realizadas após o período de 8 e 12 dias de estresse hídrico e após 7 dias de recuperação das plantas. Além disso, foi quantificada a biomassa seca da parte aérea e raízes das plantas. Os teores de Se no tecido foliar e radicular ficaram abaixo do limite de detecção em todos os tratamentos. Contudo, observou-se aumento dos níveis de GSH e da peroxidação lipídica em folhas, bem como diminuição de ERO no tecido foliar e radicular de plantas tratadas com Se, sugerindo um potencial da utilização deste elemento para aumentar a tolerância de mudas de oliveira ao estresse hídrico.

1. Introdução

No ano de 1817, o químico John Jacob Berzelius descobriu a identidade de um novo elemento, o qual possuía características químicas semelhantes ao enxofre e ao telúrio e em seu estado metálico possuía uma coloração acinzentada brilhante, denominando-o de selênio, do grego *Σελήνη*, *Selíní*, "lua" (TROFAST, J, 2011). Por muitos anos, esse elemento foi apontado como tóxico para os seres vivos, até a descoberta da sua essencialidade para animais em 1957 (SCHWARZ & FOLTZ, 1957). Em humanos, o Se promove benefícios para uma série de doenças, como cardíacas, tireoidianas e carcinogênicas (RAYMAN et al., 2000; LOPES, ÁVILA & GUILHERME, 2017; REIS et al., 2017; VINCETI et al., 2017; SCHIAVON et al., 2020) e integra a glutathione peroxidase, uma enzima que desempenha importantes funções antioxidantes, cerebrais e reprodutivas (NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000).

Embora não seja comprovada sua essencialidade para as plantas, o elemento é considerado benéfico para o metabolismo vegetal (CHAUHAN et al., 2019). Isso se deve, principalmente, ao papel do Se em estimular a atividade de compostos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, em condições em que a planta sinaliza o estresse oxidativo pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), mitigando seus efeitos negativos (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; LARA et al., 2019; LANZA & REIS, 2021; REGNI et al., 2021).

O ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) são exemplos de ERO, compostos químicos naturalmente produzidos pelo metabolismo aeróbio (FENG, WEI & TU, 2013) e, quando presentes em níveis adequados, desempenham funções importantes para a regulação celular (FOYER & NOCTOR, 2005). O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço na produção de ERO em detrimento às defesas antioxidantes da planta, promovendo danos à membrana e até morte celular. Esse desbalanço ocorre devido a condições abióticas adversas para as plantas, como por exemplo, o estresse hídrico (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

Em oliveiras (*Olea europaea* L.), o Se vem sendo estudado com potencial para atenuar prejuízos causados por estresse oxidativo em condições de escassez de água (PROIETTI et al., 2013; TEDESCHINI et al., 2015; D'AMATO et al., 2018),

especialmente nos países da região do mediterrâneo, onde o índice pluviométrico pode chegar a 250-550 mm anuais nos meses secos do verão. A espécie apresenta características de plantas xerófilas, adaptadas a ambientes secos, apresentando folhas coriáceas com uma camada cerosa sobre a parte superior e tricomas sobre a parte inferior, reduzindo as perdas de água pela transpiração (RAPOPORT; MORENO-ALÍAS, 2017).

Embora sejam plantas adaptadas a seca, o déficit hídrico prolongado promove a redução da fotossíntese, condutância estomática, transpiração e produção de frutos e o aumento de ERO (PROIETTI et al., 2013; D'AMATO et al., 2018). Assim, observa-se diminuição do potencial produtivo dos olivais e, conseqüentemente, o aumento do preço do azeite de oliva nos últimos anos, que está diretamente relacionado às oscilações extremas de temperatura e no regime de chuvas, com longos períodos de seca na Europa (HEDGECOE, 2023). Dessa forma, faz-se necessário mais estudos que avaliem a fertilização com selênio na amenização dos efeitos negativos promovidos pela escassez de água na olivicultura.

Além disso, um dos principais problemas associado ao desenvolvimento de oliveiras é o excesso de umidade devido à inadequada drenagem do solo, o que eleva a resistência na difusão dos gases do solo para a atmosfera (ALBA et al., 2013). O alagamento é a saturação do solo com água e ocorre quando as raízes não conseguem respirar devido ao excesso de água (SASIDHARAN et al., 2017). Essa condição ambiental provoca alteração no crescimento e morfologia da parte aérea e raízes, diminuição da germinação de sementes e emergência de plantas, redução da condutância estomática e assimilação de CO₂ e o esgotamento do oxigênio no solo, que altera a capacidade de absorção de nutrientes (GARCÍA, MENDOZA & POMAR, 2008; LOOSE et al., 2017; LORETI & PERATA, 2020).

Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos do Se sobre a cultura da oliveira em estresse hídrico causado por excesso de água e a capacidade destas em tolerar uma baixa concentração de oxigênio no solo. Além disso, equivocadamente considera-se a hipóxia como um estresse ambiental de menor importância, quando comparado à seca (LORETI & PERATA, 2020). Essas condições podem ser observadas em pomares estabelecidos em regiões de clima subtropical úmido com maior índice pluviométrico e em locais com solos mal drenados, como é o caso de

algumas regiões do Rio Grande do Sul, onde a olivicultura vem crescendo gradativamente nos últimos anos.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da presença de selênio na amenização do estresse oxidativo promovido por espécies reativas de oxigênio em oliveiras expostas a condições de escassez e excesso de água no solo.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes e Padrões

Comassie Brilliant Blue G-250, Triton X-100, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), 5,5-dithio-bis (2- nitrobenzoic) acid (DTNB) foram adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Todos os outros produtos químicos eram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais.

2.2 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Pampa - campus São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil (30°20'S, 54°21'O). Utilizaram-se oliveiras jovens com um ano de idade da cultivar Frantoio com cerca de um metro de altura, cultivadas durante o período de quatro meses, de agosto a dezembro de 2022. As mudas foram transplantadas para vasos (uma muda por vaso, equivalente a uma unidade experimental) com capacidade de 5 dm³, contendo 5 kg de Neossolo Quartzarênico (classificação SiBCS), retirado da camada de 0-40 cm de profundidade de um núcleo de arenização do município de Alegrete, RS. O solo caracterizou-se por ser ácido (pH-H₂O de 5,1), baixo teor de argila (13%), pobre em matéria orgânica (0,3%) e baixa fertilidade, com 4,6 mg dm⁻³ de P trocável; 19 mg dm⁻³ de K trocável; 0,1 mg dm⁻³ de B disponível; e teor de selênio não detectado (<0,849 mg Se kg⁻¹). O solo de todos os vasos foi fertilizado com a adição dos seguintes nutrientes, expressos em mg de nutriente kg⁻¹ de solo, adaptado de Silva et al. (2007): N=100; P=300; K=150; B=1; Cu=1,5; Fe=5,0; Mn=5; Zn=5; Mo=0,15. Testes iniciais apontaram que, nos vasos, o solo apresentou a umidade da capacidade de campo de

240 g H₂O kg solo⁻¹ e densidade de 1,52 g cm⁻³. Optou-se por usar este solo devido à baixa retenção de água, o que favoreceria a manipulação da umidade.

Todos os vasos foram calcariados e fertilizados com macro e micronutrientes, previamente ao transplante das mudas. As fontes de nutrientes utilizadas foram: ureia CO(NH₂)₂; Superfosfato Simples - SFS (18% P₂O₅ CNA+H₂O; 18% Ca; 10% S); KCl (58% K₂O); Ulexita (6% B; 1% P₂O; 3,2% S-SO₄); CuSO₄; FeSO₄.7H₂O; MnCl₂.4H₂O; ZnSO₄.7H₂O; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O. O S-SO₄ foi obtido por meio das diferentes fontes citadas acima. A dosagem de N e K foi parcelada em três vezes: a primeira no momento do transplante, misturado ao solo e as duas restantes em cobertura, após 15 e 30 dias após o transplante (um terço da dose em cada aplicação). A fonte de Ca e Mg foi obtida através da calagem, utilizando calcário dolomítico Filler (26% CaO e 14% MgO). O pH-H₂O do solo foi ajustado a 7,5 com a quantidade de calcário aplicada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 com 4 repetições, totalizando 24 árvores. O fator A consistiu na presença e ausência da adubação foliar com selênio. As plantas adubadas receberam uma solução contendo 150 mg Se L⁻¹, utilizando como fonte mineral 328,51 mg de selenito de sódio (Na₂SeO₃) diluído em 1 L água destilada e 0,5% de agente surfactante. Cada planta foi pulverizada com 30 mL da solução, totalizando 7,5 mg Se por planta. As mudas que consistiram na ausência de selênio, com 0 mg Se L⁻¹, foram pulverizadas com a solução contendo apenas água e o agente umectante. Após a pulverização do Se foliar, as plantas passaram pelo período de 24 horas sem a irrigação por microaspersão, para evitar a lavagem do fertilizante da superfície da folha.

O fator B consistiu na irrigação do solo em três níveis de água, sendo elas: umidade de solo mantida entre 70% e 80% da capacidade de campo (CC) pelo período de 12 dias; solo mantido com restrição hídrica total (RH) por 12 dias; e solo alagado (AL) com lâmina d'água na superfície pelo período de oito dias, com os vasos selados para evitar a saída de água. O período de tratamento hídrico do AL foi interrompido após oito dias devido as condições visuais de estresse extremo em que as plantas se encontravam. Ao final do período de tratamento hídrico (T1), as mudas passaram pelo período de sete dias de recuperação (T2), com a irrigação reestabelecida completamente para RH e três dias de drenagem livre do solo, sem irrigação, seguida de quatro dias de irrigação para AL.

A temperatura do ar no interior da casa de vegetação foi medida diariamente, sempre às 8:30 da manhã. O tratamento CC consistiu na irrigação do solo por microaspersão, programada quatro vezes ao dia, em quantidade conforme testes prévios para manter a umidade entre 70 e 80% da capacidade de campo. A umidade do solo foi medida diariamente através de sensores de umidade do solo (Decagon Devices® modelo 5TM). Os vasos sob tratamento AL foram irrigados diariamente para manter a lâmina d'água constante sobre a superfície do solo.

Durante o período T1, a temperatura média do ar no interior da casa de vegetação foi de 28,6°C, com máxima de 32,3°C e mínima de 26,3°C, enquanto no primeiro dia do período T2 a temperatura registrada foi de 27,1°C (Figura 1). Durante os 12 dias de tratamento de RH, a umidade volumétrica do solo reduziu de 21,12 g H₂O 100 cm⁻³ solo para 5,4 g H₂O 100 cm⁻³ no décimo segundo dia. Houve um aumento para 20,4 g H₂O 100 cm⁻³ após o primeiro dia de recuperação com o reestabelecimento da irrigação (Figura 1).

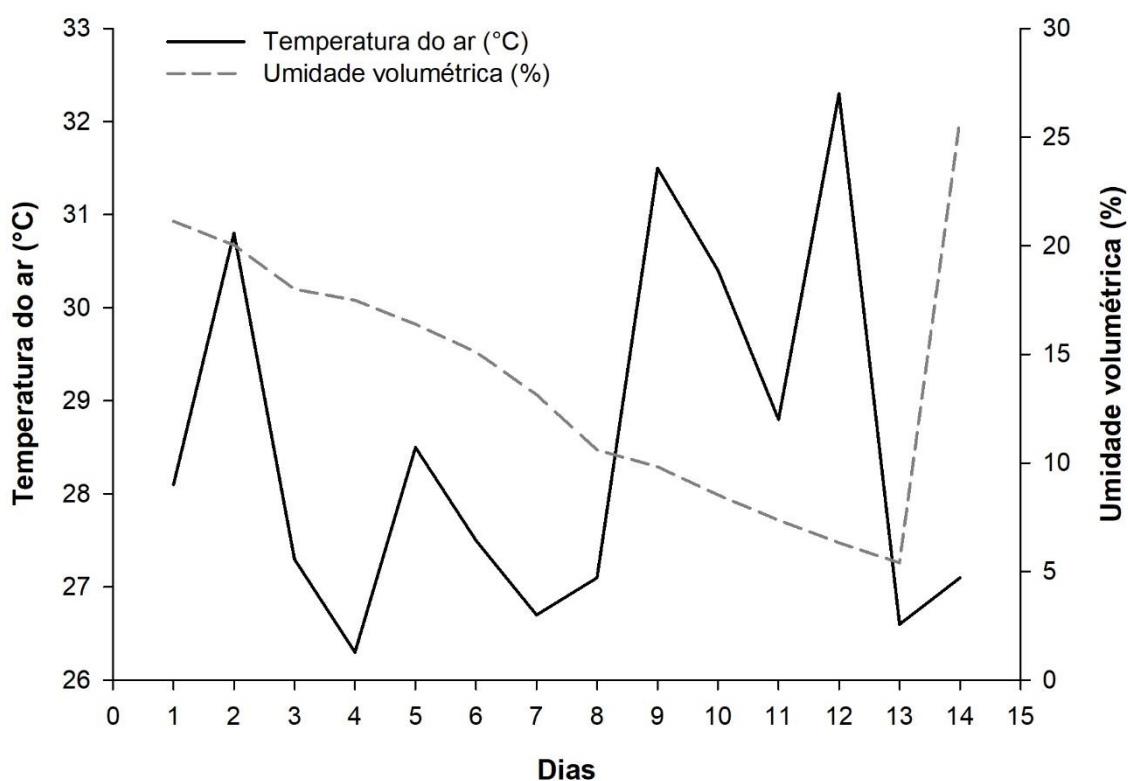


Figura 1: Temperatura em casa de vegetação (°C) e conteúdo volumétrico de água no solo (%), registrados sempre às 8h30, durante os 12 dias de tratamento de restrição hídrica e no primeiro dia de recuperação.

2.3 Coleta e armazenamento de folhas e raízes

Ao final do período de tratamento hídrico e do período de recuperação, foram coletadas 20 folhas totalmente expandidas de cada repetição e armazenadas a temperatura de -80°C até a realização das análises bioquímicas. Findado o experimento, a parte aérea e as raízes foram separadas e as raízes lavadas com água para retirada das partículas de solo. Parte das raízes foi armazenada a -80°C e utilizada para análises bioquímicas e a outra para análise de selênio total e biomassa seca. Para a análise de Se total, foram coletadas 50 folhas por planta. As folhas e raízes foram secas a 60°C até peso constante e moídas a 1 mm.

2.4 Biomassa seca da parte aérea e raízes

A parte aérea e raízes não utilizadas para as análises químicas e bioquímicas foram coletadas e armazenadas em sacos de papel para secagem em estufa a 60°C até atingir o peso constante. Posteriormente, foi verificada a biomassa seca em balança analítica de precisão. Os resultados foram expressos em g planta^{-1} .

2.5 Análise de selênio total

A análise de selênio total foi realizada com a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), utilizado para determinar elementos traços em soluções aquosas, com limite de detecção de $0,849 \text{ mg Se kg}^{-1}$. Para digestão das amostras e determinação do Se, os métodos analíticos EPA 3050 B: 1996 (USEPA, 1996), EPA 3051 A: 2007 (USEPA, 2007) e EPA 6010 D (USEPA, 2018) foram utilizados em amostras de solo e PR-Tb-IN 014 (AOAC, 2019) em amostras de tecido foliar e radicular.

2.6 Análises bioquímicas

O extrato vegetal foi obtido conforme Zhu et al. (2004), com modificações. A partir da maceração das folhas e raízes em nitrogênio líquido, foi realizada a mistura com tampão de homogeneização (fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM e 0,5% Triton X-100) e filtragem em papel filtro. A solução resultante foi centrifugada a

13.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para microtubos e mantido a -80°C até a realização das análises. O sobrenadante do extrato vegetal foi utilizado para realização das análises subsequentes.

Quantificação dos níveis de GSH

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram medidos de acordo com Ellman (1959) com modificações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 50 µL do sobrenadante, 190 µL de Tris/HCl 0,5 M pH 8,0 e 10 µL de DTNB 5 mM e mantidos no escuro por 20 minutos. A leitura foi realizada a 412 nm em leitor de microplacas (PerkinElmer-EnSpire 2300 Multilabel Reader) e o resultado foi expresso em µmol GSH mg⁻¹ de proteína.

Ensaio de estimativa de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de El-Moshaty et al. (1993) com modificações, para quantificação do malondialdeído (MDA), produto da oxidação dos lipídios de membrana por espécies reativas de oxigênio. Foram adicionados em tubos de ensaio 150 µL do sobrenadante e 450 µL do tampão contendo 20% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 95°C por 1 hora e 30 minutos e, posteriormente, transferidos para placas de 96 poços para leitura da absorbância a 532 nm em leitor de microplacas (PerkinElmer-Enspire 2300 Multilabel Reader). A peroxidação lipídica foi expressa em nmol TBARS mg⁻¹ de proteína.

Determinação de espécies reativas de oxigênio

Para determinar os níveis de espécies reativas, a oxidação do diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA) foi utilizada de acordo com Lebel, Ischiropoulos & Bondy (1992) com modificações. O volume de 20 µL de sobrenadante foi incubado em placas de 96 poços com 274 µL de tampão HEPES 20 mM pH 7 e 6 µL do reagente DCF 10 mM. A emissão da fluorescência do DCF foi verificada após 20 minutos em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 530 nm

(Carestream - Image Station 4000MM PRO). Os valores foram normalizados pela concentração de proteína nas amostras e o resultado expresso em fluorescência total.

Quantificação de proteínas

Os níveis de proteína nas amostras foram determinados pelo método de Bradford (Bradford 1976), que se baseia na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 às proteínas, resultando em uma mudança na coloração medida por espectrofotometria. Curvas padrão de proteína foram preparadas utilizando concentrações conhecidas de Albumina de Soro Bovino (BSA). Após incubação das amostras diluídas e curva padrão com o corante por 10 minutos no escuro, a absorbância foi medida a 595 nm utilizando um leitor de microplacas (PerkinElmer-Enspire 2300 Multilabel Reader). A concentração de proteínas nas amostras foi determinada correlacionando seus valores de absorbância com a curva padrão ($R^2 > 0,98$). Utilizou-se a quantificação das proteínas para calcular e expressar os valores das análises supracitadas.

2.7 Análise estatística

Uma ANOVA bidirecional foi conduzida para analisar os efeitos da fertilização com Se e disponibilidade hídrica nos parâmetros bioquímicos e químicos selecionados, bem como para análise da biomassa seca das plantas. A análise de variância foi empregada a 95% de significância. A suposição de normalidade dos dados foi verificada e transformada por raiz quadrada quando necessário. As médias foram comparadas pelo teste post hoc de Tukey ($P < 0,05$) e as análises estatísticas foram realizadas no programa SigmaPlot v.11.0.

3 Resultados

3.1 Biomassa seca da parte aérea e raízes

Para a biomassa seca, não foi observada diferença significativa entre as médias dos tratamentos hídricos e na presença e ausência de selênio ($p > 0,05$), tanto para a parte aérea quanto para as raízes (tabela 1).

Tabela 1. Biomassa seca (g) da parte aérea e raízes de oliveiras jovens em diferentes tratamentos hídricos, com e sem selênio.

		Tratamentos					
		CC 0 Se	RH 0 Se	AL 0 Se	CC 150 Se	RH 150 Se	AL 150 Se
Parte aérea		38.56 ±	41.62 ±	34.56 ±	45.01 ±	40.06 ±	39.46 ±
		7,89 ns	3,71 ns	7,04 ns	5,59 ns	8,19 ns	5,25 ns
Raízes		28.15 ±	30.03 ±	37.35 ±	32.56 ±	23.73 ±	31.03 ±
		5,84 ns	5,42 ns	10,91 ns	10,29 ns	4,87 ns	3,45 ns

Resultados expressos em médias ± desvio padrão (g planta⁻¹, n = 4). Ns = diferença estatística não significativa (ANOVA). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹.

3.2 Análise de selênio total

Através da determinação de Se total pelo ICP-OES, as amostras de tecido foliar e radicular não apresentaram conteúdo de Se superior ao limite de detecção do equipamento utilizado (<0,849 mg Se kg⁻¹), em todos os tratamentos de disponibilidade hídrica e presença ou ausência de Se. As mesmas amostras foram encaminhadas para nova análise em laboratório terceirizado que utiliza o equipamento ICP-MS, cujo limite de detecção é mais preciso. No entanto, por motivo de necessidade de manutenção do equipamento, até o momento de finalização desta dissertação não ficaram prontos os resultados. Estes serão utilizados para a submissão do manuscrito do presente estudo a um periódico científico indexado.

3.3 Análises bioquímicas

3.3.1 Período de estresse hídrico em folhas

Após o período de estresse hídrico, houve interação significativa entre a presença e ausência de Se e os tratamentos hídricos em relação aos níveis de GSH em folhas (P = 0,018) (Figura 2). As plantas com aplicação de Se apresentaram maior

teor de tióis em relação às plantas sem aplicação de Se no tratamento AL, indicando um aumento da atividade antioxidante com a aplicação do Se, o que pode estar relacionado com o maior estresse promovido pela condição de alagamento, enquanto na umidade ideal e na restrição hídrica não houve efeito da aplicação do Se. Entre as plantas sem aplicação de Se, houve diferença significativa entre os tratamentos hídricos, com maiores teores de tióis totais em RH do que AL e CC (Figura 2).

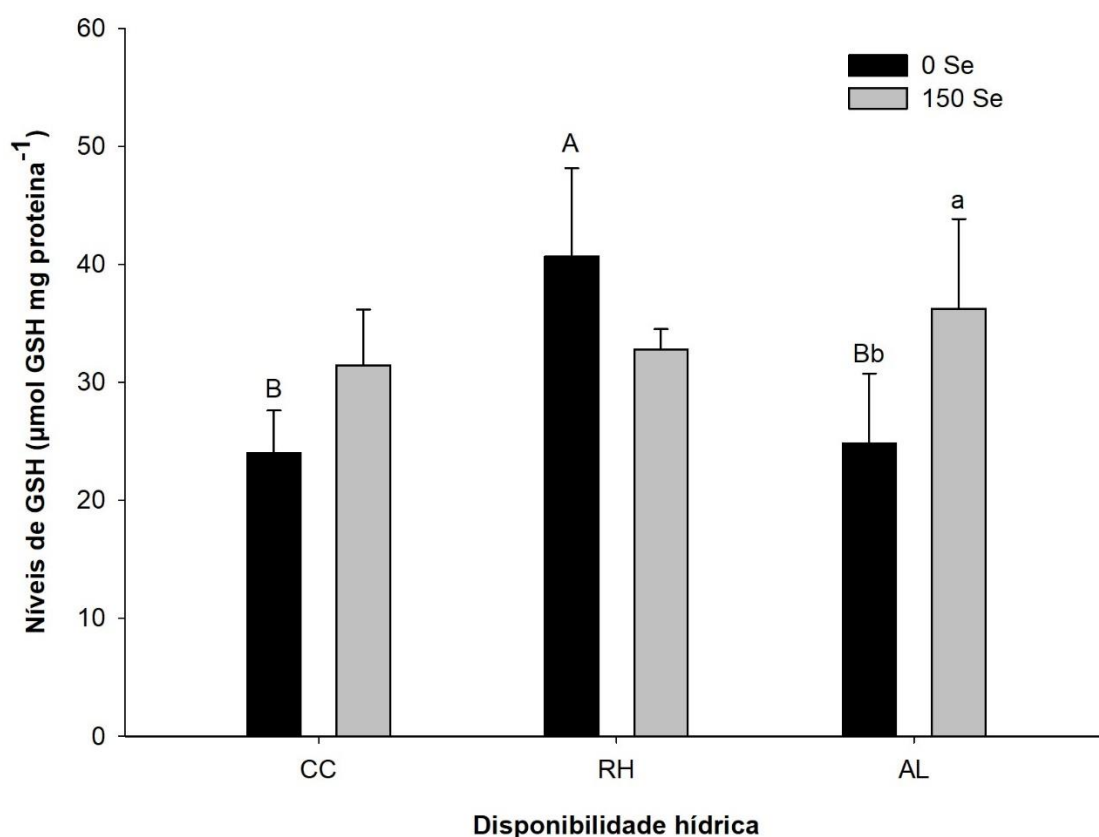


Figura 2: Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). Diferentes letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹.

O ensaio de peroxidação lipídica também apresentou interação significativa entre o fornecimento de Se e a disponibilidade hídrica ($P < 0,001$). Neste caso, houve diferença significativa entre a presença e ausência de Se apenas no tratamento CC, com maior peroxidação lipídica em plantas sem Se, indicando menor estresse

oxidativo em plantas tratadas com Se (Figura 3). Porém, a adição de Se não promoveu efeito significativo quando houve excesso ou falta de água. Comparando apenas as plantas sem Se, verificaram-se diferenças quanto aos tratamentos hídricos, sendo que o maior teor de TBARS mg proteína^{-1} foi observado em CC do que em RH e AL (Figura 3).

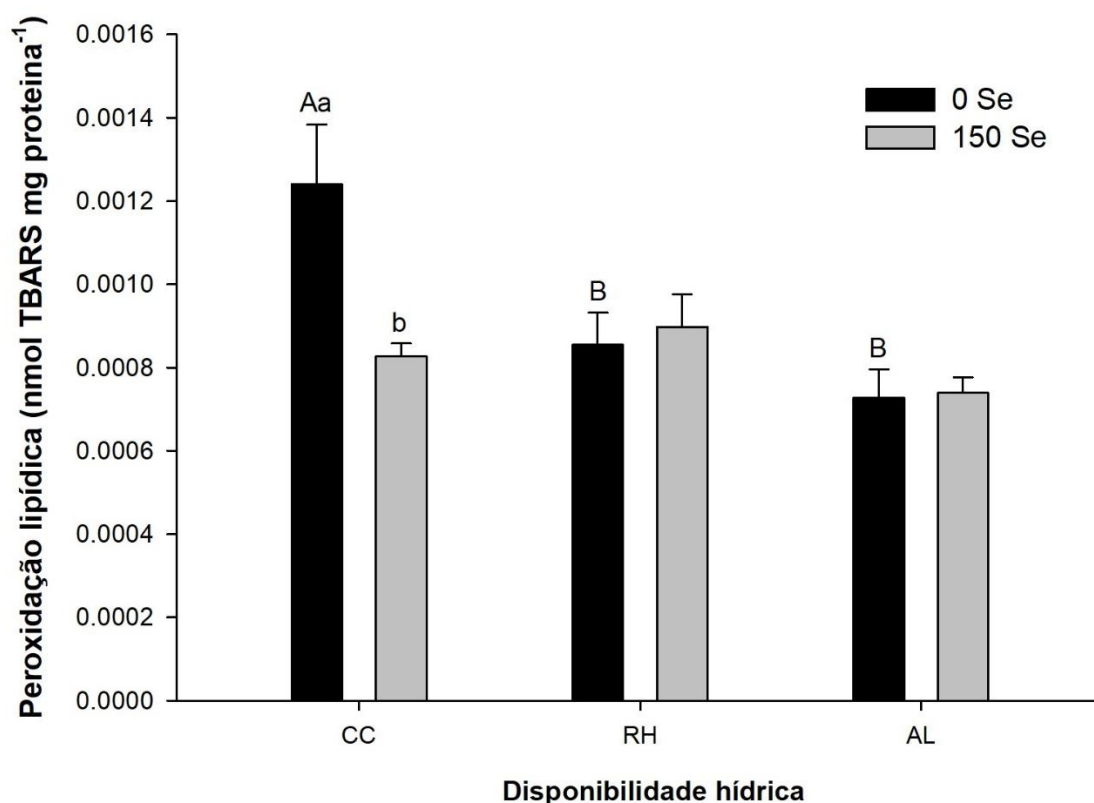


Figura 3: Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). Diferentes letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L^{-1} ; 150 Se = 150 mg Se L^{-1} .

Na determinação de espécies reativas de oxigênio, substâncias promotoras do estresse oxidativo, não houve interação significativa entre Se e disponibilidade hídrica no tecido foliar. Comparando o efeito da presença e ausência de fertilização com selênio, verificou-se que a adição de Se promoveu quantidade de espécies reativas significativamente menor que nas plantas sem selênio (Figura 4 A), indicando a ação benéfica da aplicação de Se, independentemente do tratamento hídrico. A análise

também resultou em diferença significativa entre os tratamentos hídricos CC e AL, onde observou-se um aumento de espécies reativas em CC (Figura 4 B). A maior quantidade de espécies reativas de oxigênio em CC do que nos tratamentos com estresse hídrico é intrigante, mas está em acordo com os menores níveis de GSH e maior peroxidação lipídica no tratamento CC.

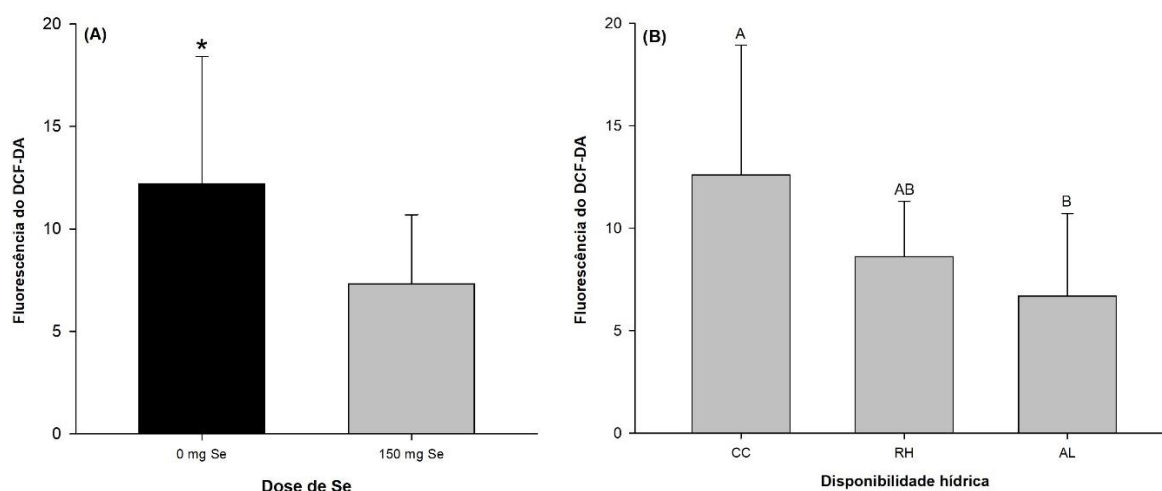


Figura 4: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar de oliveiras jovens no período de tratamento hídrico (T1). O asterisco representa diferença significativa entre ausência e presença de selênio (A) e diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre tratamentos hídricos (B), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). 0 mg Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 mg Se = 150 mg Se L⁻¹; CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.

3.3.2 Período de recuperação em folhas

No período pós recuperação das mudas de oliveira, as análises do tecido foliar apresentaram valores de GSH e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico significativamente maiores no tratamento AL em comparação ao CC (Figura 5 A e B), com comportamento intermediário no RH. Os valores de GSH indicam que a quantidade de tióis no tratamento AL foi quase duas vezes maior do que no CC neste momento, enquanto a peroxidação lipídica foi cerca de 50% maior no AL do que no CC. Em contrapartida, a quantidade de ERO foi significativamente menor no AL do que nos demais tratamentos hídricos (Figura 6 B). Houve diminuição significativa no teor de espécies reativas de oxigênio em amostras contendo selênio em comparação às sem selênio (Figura 6 A), enquanto a adição de Se não promoveu efeito nos teores

de tióis e na peroxidação lipídica no tecido foliar após o período de recuperação (resultados não apresentados).

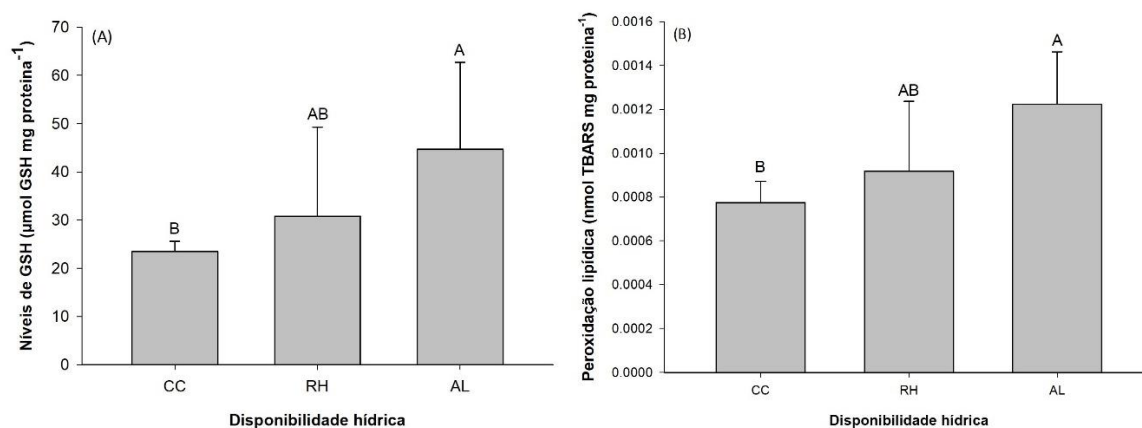


Figura 5: Análise do tecido foliar de oliveiras jovens no período de recuperação (T2), considerando os testes: níveis de GSH (A) e peroxidação lipídica (B). Diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.

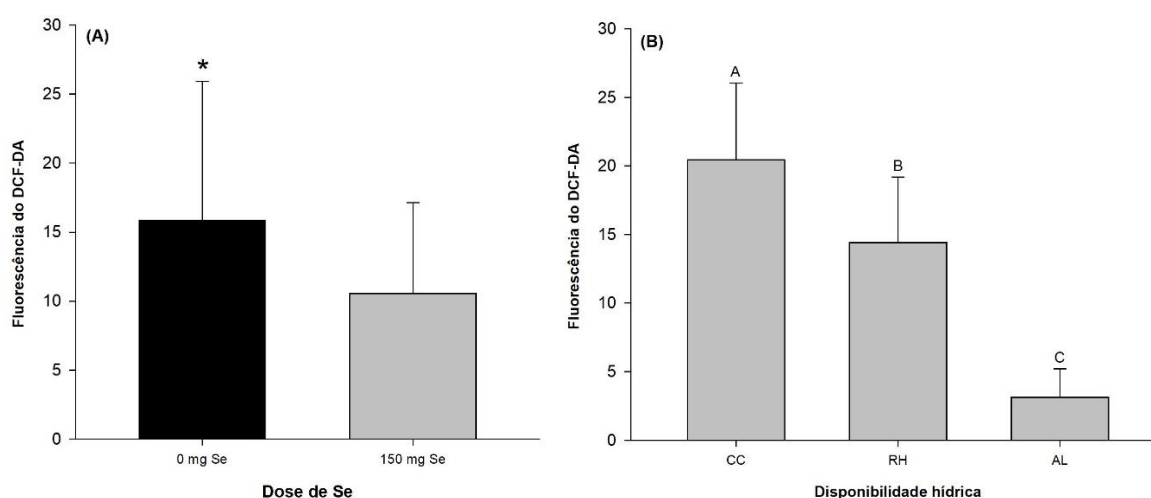


Figura 6: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido foliar de oliveiras jovens no período de recuperação (T2). O asterisco representa diferença significativa entre ausência e presença de selênio (A) e diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos (B), segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). 0 mg Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 mg Se = 150 mg Se L⁻¹; CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.

3.3.3 Período recuperação em raízes

Semelhante ao tecido foliar, no período pós recuperação, não houve efeito da aplicação de Se sobre os níveis de GSH e peroxidação lipídica em raízes (Figura 7), mas houve efeito do Se na concentração de ERO (Figura 8), com interação significativa com a disponibilidade hídrica.

Os níveis de GSH no tecido de raízes (Figura 7 A) foram significativamente maiores no CC do que no AL, ambos não diferindo do intermediário (RH). Este resultado indica menor atividade antioxidante no AL. A análise de peroxidação lipídica, por sua vez, indicou menor valor no AL, mas não diferiu significativamente do CC, apenas do tratamento de RH (Figura 7 B).

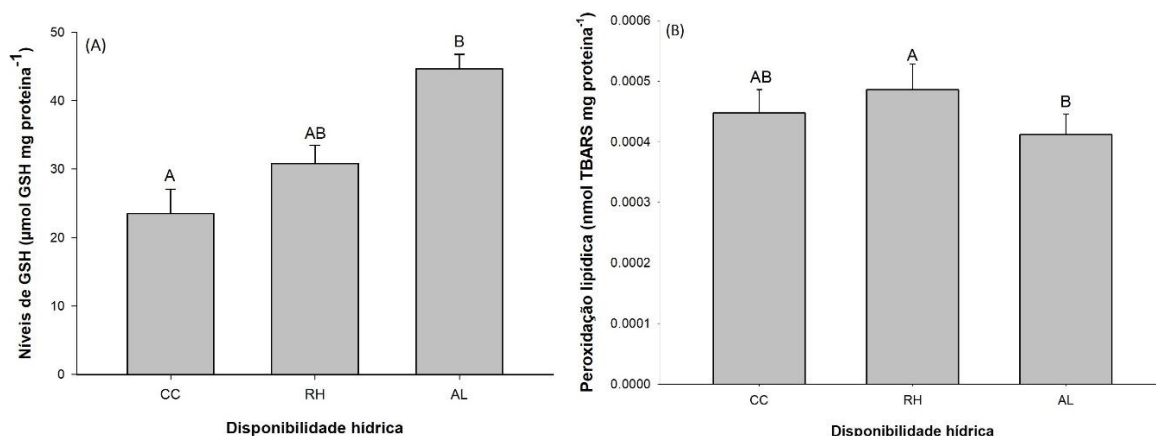


Figura 7: Análise do tecido radicular de oliveiras jovens no período de recuperação (T2), considerando os testes: níveis de GSH (A) e peroxidação lipídica (B). Diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos hídricos, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado.

Como supracitado, houve interação significativa entre o efeito do Se e da disponibilidade hídrica quanto aos níveis de ERO ($P = 0,003$). Verificou-se maior fluorescência total em plantas sem selênio em relação às com selênio nos tratamentos hídricos CC e RH. No tratamento AL, entretanto, a concentração de espécies reativas de oxigênio foi baixa, independente da presença do Se, não havendo efeito significativo da aplicação deste elemento (Figura 8).

Ao comparar o efeito dos tratamentos hídricos sobre as espécies reativas de oxigênio, verifica-se que houve efeito significativo entre os tratamentos hídricos

apenas nas plantas sem Se, onde RH e CC apresentaram quantidades significativamente maiores que AL. Entretanto, ao adicionar Se, não houve diferença entre os tratamentos hídricos (Figura 8).

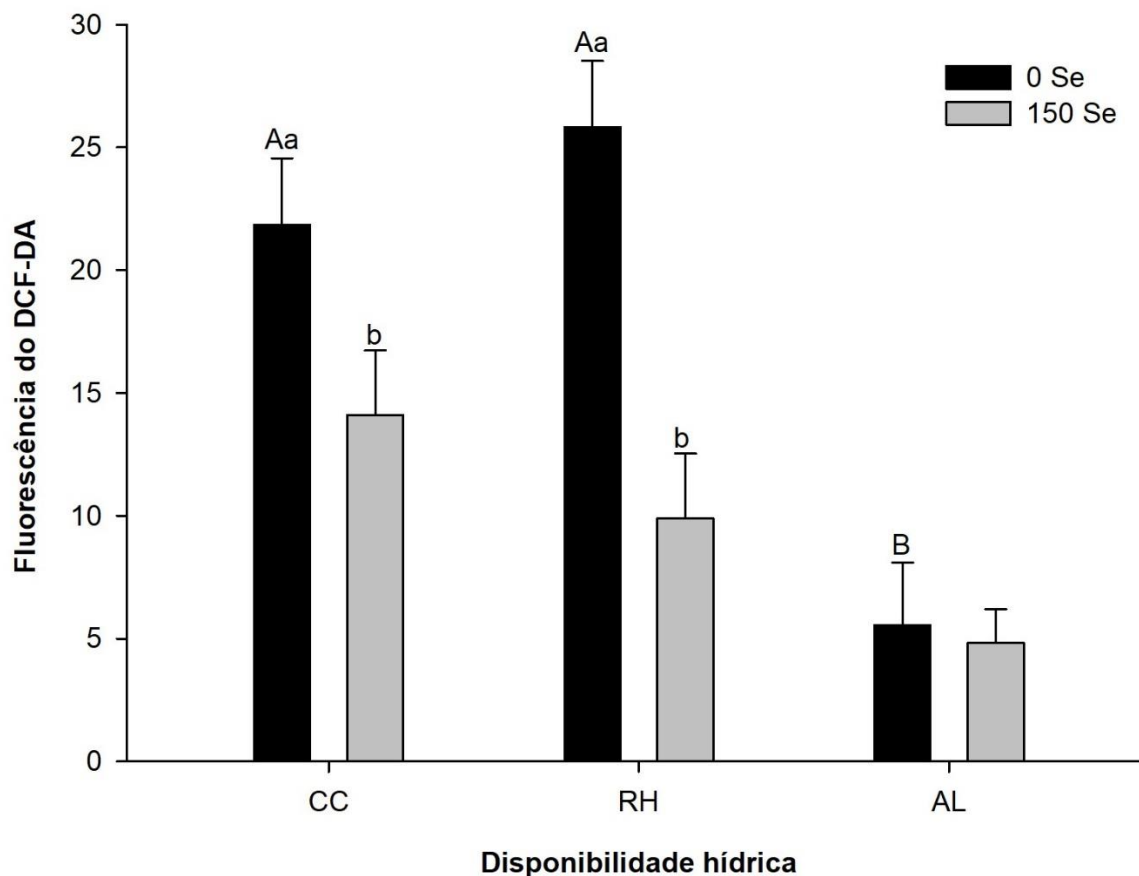


Figura 8: Quantificação de espécies reativas de oxigênio no tecido radicular de oliveiras jovens no período de recuperação (T2). Diferentes letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os tratamentos hídricos, enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa na presença e ausência de Se, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). CC = Capacidade de campo do solo; RH = Restrição hídrica total; AL = Solo alagado; 0 Se = 0 mg Se L⁻¹; 150 Se = 150 mg Se L⁻¹.

4. Discussão

Neste estudo, através da aplicação de selênio por pulverização foliar em oliveiras jovens, objetivamos avaliar o efeito do microelemento sobre alguns marcadores de estresse oxidativo em plantas expostas a condições de estresse hídrico por seca e alagamento.

Nos tratamentos de ausência e presença de Se e em todos os tratamentos hídricos, não foi possível detectar a presença de Se no tecido foliar e radicular pelo ICP-OES, que tinha o limite de detecção de $0,849 \text{ mg Se kg}^{-1}$. Como anteriormente citado, as amostras foram encaminhadas para análise em ICP-MS, que é um equipamento mais sensível para determinação dos teores de elementos-traço do que o ICP-OES. Entretanto, considerando a quantidade de Se adicionada por tratamento, suspeita-se que a absorção de Se pela folha possa ter sido prejudicada devido ao curto intervalo de tempo sem irrigação por microaspersão, de 24 h após a pulverização foliar.

As folhas coriáceas das oliveiras apresentam uma camada cerosa na parte superior e tricomas que protegem os estômatos na parte inferior (RAPOPORT; MORENO-ALÍAS, 2017), o que pode ter retardado a absorção do Se. A entrada de nutrientes por aplicação foliar pode ocorrer por um processo passivo devido à diferença de concentração, além de cutículas foliares, estômatos, células mesófilas e transportadores específicos (LANZA & REIS, 2021). Além disso, geralmente a concentração de Se é maior em folhas jovens em comparação com as mais velhas, durante o crescimento das mudas (GUPTA & GUPTA, 2017; RYANT et al., 2020). Como foram coletadas folhas totalmente expandidas e, portanto, mais velhas para a análise de Se, esse fator pode ter influenciado nos resultados. Entretanto, Proietti et al. (2013) observaram aumento significativo do teor de Se nas folhas de oliveiras jovens com as doses de 50 e 150 mg Se L^{-1} , na forma de selenato de sódio, detectado através de um espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com fonte de grafite e lâmpada de deutério.

Apesar dos teores de Se no tecido das plantas terem ficado abaixo do limite de detecção, este estudo apresenta resultados interessantes sobre os efeitos da aplicação de Se nos parâmetros de estresse oxidativo e atividade antioxidante das plantas submetidas a diferentes tratamentos hídricos.

Após o período de estresse hídrico, os níveis de GSH em folhas foram significativamente maiores em plantas com a adição de Se sob AL, em comparação às sem Se no mesmo tratamento hídrico. Maiores níveis de GSH representam um aumento da atividade antioxidante, uma vez que a glutatona reduzida atua como um importante antioxidante endógeno, sendo o tiol celular mais abundante nos seres vivos (HUBER et al., 2008). Esse aumento sugere que o Se desempenhou um

importante papel protetor durante o estresse hídrico por alagamento, que pode ter promovido um maior estresse para a planta. Além disso, os tratamentos RH e AL sem aplicação de Se apresentaram valores significativamente maiores em comparação ao CC, indicando maior necessidade de uma resposta antioxidante da GSH pelas plantas sob estresse hídrico e sem aplicação de Se.

Em contraponto aos resultados supracitados, o Se não afetou a atividade da GSH do tecido foliar e radicular dos tratamentos hídricos no período pós recuperação. Observou-se, entretanto, diminuição significativa da atividade antioxidante em folhas no tratamento CC em comparação à AL, enquanto o resultado oposto foi observado nas raízes, com maiores níveis de GSH em CC e menores em AL, indicando que a atividade da GSH foi mais requerida em folhas sobre estresse hídrico em AL. Huber et al. (2008) expõe que, na evolução bioquímica, a GSH surgiu como um recurso contra espécies reativas de oxigênio geradas por processos oxidativos. Avaliando o efeito do estresse hídrico em oliveiras, Brandão (2023) identificou aumento da peroxidação lipídica e dos teores de H_2O_2 no período de recuperação das plantas sob condição de alagamento por 12 dias. Dessa forma, em nosso estudo, o aumento dos níveis de GSH nas folhas pós recuperação pode ser explicado como uma resposta da planta à proteção contra o estresse oxidativo proporcionado na condição de alagamento, que também promoveu o aumento da peroxidação lipídica, mesmo após o período de recuperação. Concomitante a isso, houve diminuição da peroxidação lipídica em raízes sob AL em comparação ao tecido foliar no mesmo período e aumento sob RH, representando menor e maior estresse oxidativo em raízes sob AL e RH, respectivamente.

Em comparação ao tratamento sem selênio, a fertilização com Se proporcionou diminuição significativa da peroxidação lipídica após o período de tratamento hídrico nas folhas de oliveiras sob CC, entretanto, em condições de estresse hídrico por seca e alagamento, não foi observado efeito da aplicação de Se na peroxidação lipídica. Ademais, o Se diminuiu os teores de ERO em folhas independentemente do tratamento hídrico em ambos os períodos de avaliação. As espécies reativas de oxigênio são substâncias promotoras do estresse oxidativo. Tendo em vista que a aplicação de Se diminuiu os seus teores, independentemente do tratamento hídrico, podemos sugerir a ação benéfica da aplicação de Se nas plantas.

Segundo Feng et al., (2003), direta ou indiretamente o Se pode controlar a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio, através da regulação de antioxidantes. Outros estudos demonstraram diminuição do H_2O_2 em plantas de arroz tratadas com Se em condições de déficit hídrico (ANDRADE et al., 2018). Em um estudo utilizando Se em mudas de *Trifolium repens* L., induzidas ao déficit hídrico por polietilenoglicol (PEG), Wang (2011) observou que menores quantidades de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e H_2O_2 acumularam-se nas plantas tratadas com PEG e Se do que nas plantas tratadas apenas com PEG, revelando o aumento da tolerância em mudas com Se. Em relação aos tratamentos hídricos CC e AL, observou-se diferença significativa no teor de ERO após o período de tratamento hídrico, com maior fluorescência em CC em comparação a AL, o que pode estar relacionado a maior atividade antioxidante da GSH em AL.

Além disso, no tecido radicular de plantas, a aplicação de Se promoveu diminuição significativa no teor de ERO em comparação às sem aplicação de Se, nos tratamentos hídricos CC e RH. Isso demonstra um aumento da tolerância das raízes ao estresse oxidativo causado por restrição hídrica com a aplicação do Se. No entanto, em situação de alagamento, não houve efeito significativo da aplicação do Se. As plantas sob CC podem ter apresentado menores teores de ERO nas raízes por conta do aumento dos níveis de GSH no mesmo tratamento. Avaliando o déficit hídrico induzido em raízes de pepino, Jozwiak & Politycka (2019) observaram maior geração de ERO nestas condições, indicando maior estresse oxidativo. Entretanto, a aplicação de Se promoveu maior tolerância ao estresse nas raízes das mudas, através do aumento da atividade antioxidante e inibição da peroxidação lipídica causada por ERO. No presente estudo, entre as plantas sem fertilização de Se, verificou-se maior quantidade de espécies reativas de oxigênio em RH e CC do que em AL, ou seja, no tratamento com alagamento, a quantidade de espécies reativas foi baixa, independente da adição ou não de Se. Ao analisar raízes de oliveiras sob estresse hídrico, Brandão (2023) observou aumento significativo dos valores o teor de H_2O_2 e peroxidação lipídica em plantas sob condições de irrigação na capacidade de campo do solo em comparação a seca e ao alagamento, sugerindo que os mecanismos de estresse oxidativo das plantas podem ser modulados por diferentes fatores além do tratamento hídrico.

5. Considerações finais

Apesar de não detectados teores de selênio nas amostras pelo ICP-OES, observou-se efeito da aplicação de Se no tecido foliar e nas raízes de oliveiras submetidas a diferentes níveis de água, com o aumento dos níveis de GSH e diminuição da peroxidação lipídica em folhas, bem como diminuição de espécies reativas no tecido foliar e radicular, sugerindo um potencial da utilização deste elemento para aumentar a tolerância de mudas de oliveira ao estresse hídrico. A biomassa seca das plantas não diferiu em relação aos tratamentos.

Os tratamentos hídricos CC, RH e AL apresentaram respostas distintas aos parâmetros avaliados após o período de tratamento hídrico e de recuperação no tecido foliar e radicular, demonstrando efeitos do estresse oxidativo em todos os tratamentos, inclusive em CC.

Dentro de um cenário de mudanças climáticas globais e da iminência de adaptação da produção agrícola a tais mudanças, esta pesquisa demonstra o potencial da aplicação de Se para melhorar a resistência a seca e ao alagamento em oliveiras. Mais estudos devem ser desenvolvidos para avaliar os potenciais mecanismos de tolerância proporcionados pelo Se às plantas diante de estresses hídricos, principalmente por alagamento do solo, que não estão completamente elucidados, uma vez que estes podem ser atribuídos a vários processos metabólicos distintos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Universidade Federal do Pampa (Unipampa) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos à empresa OlivoPampa pelo fornecimento das mudas para o experimento.

Referências

ANDRADE, F. R.; DA SILVA, G. N.; GUIMARÃES, K. C.; BARRETO, H. B. F.; DE SOUZA, K. R. D.; GUILHERME, L. R. G.; REIS, A. R. DOS. Selenium protects rice plants from water deficit stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 562-570, 2018.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, C. **Estado nutricional e valores de referência pelos métodos DRIS e CND para a cultura da oliveira no estado do Rio Grande do Sul**. 2023. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas.

CHAUHAN, R.; AWASTHI, S.; SRIVASTAVA, S.; DWIVEDI, S.; PILON-SMITS, E. A. H.; DHANKHER, O. P.; TRIPATHI, R. D. Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 21, p. 1937-1958, 2019.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1-13, 2014.

D'AMATO, R.; PROIETTI, P.; ONOFRI, A.; REGNI, L.; ESPOSTO, S.; SERVILI, M.; BUSINELLI, D.; SELVAGGINI, R. Biofortification (Se): Does it increase the content of phenolic compounds in virgin olive oil (VOO)?. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p.1-13, 2017.

D'AMATO, R.; DE FEUDIS, M.; HASUOKA, P. E.; REGNI, L.; PACHECO, P. H.; ONOFRI, A.; BUSINELLI, D.; PROIETTI, P. The Selenium Supplementation Influences Olive Tree Production and Oil Stability Against Oxidation and Can Alleviate the Water Deficiency Effects. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–8, 2018

EL-MOSHATY, F. I. B.; PIKE, S. M.; NOVACKY, A. J.; SEHGAL, O. P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 4, ed. 2, p. 109-199, 1993.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

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

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

GARCÍA, I.; MENDOZA, R. POMAR, M. C. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 304, p. 117-131, 2008.

GUPTA, M.; GUPTA, S. An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-14, 2017.

HEDGECOE, G. Olive oil price skyrockets as Spanish drought bites. BBC, 2023. Disponível em: <https://www.bbc.com/news/world-europe-67565503>. Acesso em: 26 de março de 2024.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

JOZWIAK W.; POLITYCKA B. Effect of Selenium on Alleviating Oxidative Stress Caused by a Water Deficit in Cucumber Roots. **Plants**, v. 8, n. 7, p. 217.

LANZA, M. G. D. B.; REIS, A. R. DOS. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 164, p. 27-43, 2021.

LARA, T. S.; LESSA, J. H. L.; SOUZA, K. R. D.; CORGUINHA, A. P. B.; MARTINS, F. A. D.; LOPES, G.; GUILHERME, L. R. G. Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 81, p. 10-18, 2019.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n.2, p. 227-231, 1992.

LOPES, G.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 605-615, 2017.

LORETI, E.; PERATA, P. The many facets of hypoxia in plants. **Plants**, v. 9, p. 745, 2020.

LOOSE, L.; HELDWEIN, A.; LUCAS, D. D. P.; HINNAH, F. Sunflower emergence and initial growth in soil with water excess. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 644-655, 2017.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the total environment**, v. 249, n. 1-3, p. 347-371, 2000.

PROIETTI, P.; NASINI, L.; DEL BUONO, D.; D'AMATO, R.; TEDESCHINI, E.; BUSINELLI, D. Se protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 165-171, 2013.

RAPOPORT, H. F.; MORENO-ALÍAS, I. Botânica y morfología. In: BARRANCO NAVERO, D. et al. **El cultivo del olivo**. 7ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2017, p. 35-64.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

REGNI, L.; PALMERINI, C.A.; DEL PINO, A.M.; BUSINELLI, D.; D'AMATO, R.; MAIRECH, H.; MARMOTTINI, F.; MICHELI, M.; PACHECO, P.H.; PROIETTI, P. Effects of selenium supplementation on olive under salt stress conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 278, p. 1-8, 2021.

REIS, A. R. DOS.; 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: Selenium in plants, PILON-SMITS et al. **Plant Ecophysiology**, v. 11, p. 211-230, 2017.

RYANT, P.; ANTODOVSKÝ, J.; ADAM, V.; DUCSAY, L.; SKARPA, P.; SAPÁKOVÁ, E. The importance of selenium in fruit nutrition. In: SRIVASTAVA, A. K.; HU, C. **Fruit Crops: Diagnosis and Management of Nutrient Constraints**. 2020. p. 241-254.

SASIDHARAN, R.; BAILEY-SERRES, J.; ASHIKARI, M.; ATWELL, BJ; COLMER, TD; FAGERSTEDT, K.; FUKÃO, T.; GEIGENBERGER, P.; HEBELSTRUP, KH; COLINA, RD; et al. Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. **The New Phytologist**, v. 214, p. 1403–1407, 2017.

SCHIAVON, M.; NARDI, S.; DALLA VECCHIA, F.; ERTANI, A. Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. **Plant Soil**, v. 453, p. 245-270, 2020.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an Integral Part of Factor 3 against Dietary Necrotic Liver Degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 3292-3293, 1957.

SILVA, W. G. D.; TUCCI, C. A. F.; HARA, F. A. D. S.; SANTOS, R. A. C. D. Efeito de micronutrientes sobre o crescimento de mudas de mogno (*Swietenia macrophylla* King) em Latossolo amarelo. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 371-376, 2007.

TEDESCHINI, E.; PROIETTI, P.; TIMORATO, V.; D'AMATO, R.; NASINI, L.; BUONO, D. D.; BUSINELLI, D.; FRENGUELLI, G. Selenium as stressor and antioxidant affects pollen performance in *Olea europaea*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 16-22, 2015.

TROFAST, J. Berzelius' discovery of selenium. **Chemistry International**, v. 33, p. 16, 2011.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Acid digestion of Sediments, Sludges and Soils – Method 3050B, 1996. Available on: <https://www.epa.gov/>.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Microwave assisted Acid digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils** – Method 3051A, 2007. Available on: <http://www.epa.gov/>.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry** – Method 6010D, 2018. Available on: <https://www.epa.gov/>.

VINCETI, M.; FILIPPINI, T.; CILLONI, S. CRESPI, C. M. Chapter One - The Epidemiology of Selenium and Human Cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 136, p. 1-48, 2017.

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

ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 163, p.527-533, 2004.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adubação foliar com selênio promoveu alterações nos indicadores de estresse oxidativo ao longo do tempo, indicando seu papel no metabolismo antioxidante e pró-oxidante dependente da dose nas plantas, entretanto, não houve efeito da presença de Se nos parâmetros de qualidade e atividade antioxidante do azeite. Deste modo, a hipótese 1 foi parcialmente aceita, uma vez que notamos respostas distintas no estresse oxidativo e atividade antioxidante do tecido foliar, mas não nas amostras de azeite de oliva extraídas, com as diferentes doses aplicadas.

A adição de selênio foi eficaz em aumentar proporcionalmente o teor de Se total nas folhas de acordo com as doses testadas. Porém, o aumento dos níveis de Se no azeite não apresentou esse comportamento, sendo observadas concentrações mais elevadas na dose intermediária. Assim, a hipótese 2 foi aceita, com a verificação do aumento do teor de Se nas folhas e no azeite de oliva.

No presente estudo não foi observada alteração na produtividade dos frutos com as doses aplicadas, entretanto, não houve evidência visual de toxicidade por excesso de Se em nenhuma planta. Desta forma, a hipótese 3 foi recusada. Deve-se salientar, entretanto, que a alternância de produção de frutos fez com que o ano deste estudo coincidissem com o ano de baixa produção (ano “off”). Além disso, quando o Se foi aplicado, as etapas de indução e iniciação floral já haviam acontecido na fisiologia do seu desenvolvimento reprodutivo. Esses fatores podem ter mascarado o efeito do Se, já que a produtividade das árvores foi baixa.

No estudo 2, não foram detectados teores de selênio acima do limite quantificável pelo ICP-OES no tecido foliar e radicular das mudas com e sem aplicação de Se. Dessa forma, não foi possível concluir a hipótese 4. Vale ressaltar que, considerando a quantidade de Se adicionada por tratamento, suspeita-se que a absorção de Se pela folha possa ter sido prejudicada devido ao curto intervalo de tempo sem irrigação por microaspersão, de 24 h após a aplicação foliar.

Observou-se efeito da aplicação de Se no tecido foliar e nas raízes de oliveiras submetidas a diferentes níveis de água, com o aumento dos níveis de GSH e diminuição da peroxidação lipídica em folhas, bem como diminuição de espécies reativas no tecido foliar e radicular. Isso demonstra que a hipótese 5 foi parcialmente aceita, ao passo que houve um efeito protetor da aplicação de Se em condições de

estresse hídrico, com aumento da atividade antioxidante e redução das espécies reativas de oxigênio, mas estes resultados não podem ser completamente associados ao Se, por não detectarmos sua presença no tecido vegetal das mudas.

Além disso, observamos visualmente que as plantas submetidas ao alagamento apresentaram sintomas de estresse hídrico mais extremos em comparação aos outros tratamentos, independentemente da aplicação de Se. Isso revela que o excesso de água no solo pode implicar em prejuízos ao desenvolvimento de oliveiras.

Por fim, sugere-se mais estudos que avaliem regionalmente o efeito de diferentes doses de Se em oliveiras, tanto para os parâmetros de estresse oxidativo e atividade antioxidantes nas plantas frente a estresses abióticos, quanto para os parâmetros de qualidade e outras características físico-químicas do azeite de oliva extravirgem, bem como sua biofortificação. Este trabalho serve como um degrau no caminho das elucidações acerca da fertilização foliar com selênio na olivicultura.

REFERÊNCIAS

- ALBA, J. M. F.; FLORES, C. A.; WREGE, M. S. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Brasília, DF, 2013.
- ALI, S. S.; AHSAN, H.; ZIA, M. K.; SIDDIQUI, T.; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.
- ANDRADE, F. R.; DA SILVA, G. N.; GUIMARÃES, K. C.; BARRETO, H. B. F.; DE SOUZA, K. R. D.; GUILHERME, L. R. G.; REIS, A. R. DOS. Selenium protects rice plants from water deficit stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 562-570, 2018.
- BABALAR, M.; MOHEBBI, S.; ZAMANI, Z.; ASKARI, M. A. Effect of foliar application with sodium selenate on selenium biofortification and fruit quality maintenance of 'Starking Delicious' apple during storage. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 99, n. 11, p. 5149-5156, 2019.
- BOUIS, W.; ISLAM, Y. Biofortification: Leveraging Agriculture to Reduce Hidden Hunger. In: FAN, S.; PANDYA-LORCH, R. **Reshaping Agriculture for Nutrition and Health**. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, 2012. p. 83-92.
- CHAUHAN, R.; AWASTHI, S.; SRIVASTAVA, S.; DWIVEDI, S.; PILON-SMITS, E. A. H.; DHANKHER, O. P.; TRIPATHI, R. D. Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 21, p. 1937-1958, 2019.
- CHEN, L.; YANG, F.; XU, J.; HU, Y.; HU, Q.; ZHANG, Y.; PAN, G. Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5128-5130, 2002.
- CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant signaling & Behavior**, v. 8, e23681, 2013.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, H., **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 125 p. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

CRUZ, M. C. M. da.; OLIVEIRA, D. L. de.; OLIVEIRA, A. F. de.; CHALFUN, N. N. J. Botânica, anatomia e ecofisiologia. Oliveira, A. F. (Ed.) **Oliveiras no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 119-157, 2012.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1-13, 2014.

D'AMATO, R.; PROIETTI, P.; NASINI, L.; DEL BUONO, D.; TEDESCHINI, E.; BUSINELLI, D. Increase in the selenium content of extra virgin olive oil: quantitative and qualitative implications. **Grasas y Aceites**, v. 65, n. 2, e025, 2014.

D'AMATO, R.; PROIETTI, P.; ONOFRI, A.; REGNI, L.; ESPOSTO, S.; SERVILI, M.; BUSINELLI, D.; SELVAGGINI, R. Biofortification (Se): Does it increase the content of phenolic compounds in virgin olive oil (VOO)? **PLoS One**, v. 12, n. 4, e0176580, 2017.

D'AMATO, R.; PETRELLI, M.; PROIETTI, P.; ONOFRI, A.; REGNI, L.; PERUGINI, D.; BUSINELLI, D. Determination of changes in the concentration and distribution of elements within olive drupes (cv. Leccino) from Se biofortified plants, using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 4971-4977, 2018a.

D'AMATO, R.; DE FEUDIS, M.; HASUOKA, P. E.; REGNI, L.; PACHECO, P. H.; ONOFRI, A.; BUSINELLI, D.; PROIETTI, P. The Selenium Supplementation Influences Olive Tree Production and Oil Stability Against Oxidation and Can Alleviate the Water Deficiency Effects. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1– 8, 2018b.

D'AMATO, R.; DE FEUDIS, M.; GUIDUCCI, M.; BUSINELLI, D. *Zea mays* L. Grain: Increase in Nutraceutical and Antioxidant Properties Due to Se Fortification in Low and

High Water Regimes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 25, p. 7050-7059, 2019.

D'AMATO, R.; REGNI, L.; FALCINELLI, B.; MATTIOLI, S.; BENINCASA, P.; DAL BOSCO, A.; PACHECO, P.; PROIETTI, P.; TRONI, E.; SANTI, C.; BUSINELLI, D. Current Knowledge on Selenium Biofortification to Improve the Nutraceutical Profile of Food: A Comprehensive Review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 4075-4097, 2020.

DE BRUNO A, PISCOPO A, CORDOPATRI F, POIANA M, MAFRICA R. Effect of Agronomical and Technological Treatments to Obtain Selenium-Fortified Table Olives. **Agriculture**, v. 10, n. 7, p. 284, 2020.

DE LIMA, A. B.; VILALTA, T. A.; LESSA, J. H. L.; LOPES, G.; GUILHERME, L. R. G.; GUERRA, M. B. B. Selenium bioaccessibility in rice grains biofortified via soil or foliar application of inorganic Se. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 124, p. 105652, 2023.

DE SOUSA, G. F.; SILVA, M. A.; CARVALHO, M. R.; MORAIS, E. G.; BENEVENUTE, P. A. N.; OPBERGEN, G. A. Z. V.; OPBERGEN, G. G. A. Z. V.; GUILHERME, L. R. G. Foliar Selenium Application to Reduce the Induced-Drought Stress Effects in Coffee Seedlings: Induced Priming or Alleviation Effect?. **Plants**, v. 12., p. 3026, 2023.

DEL PINO, A. M.; REGNI, L. D'AMATO, R.; DI MICHELE, A.; PROIETTI, P.; PALMERINI, C. A. Persistence of the Effects of Se-Fertilization in Olive Trees over Time, Monitored with the Cytosolic Ca^{2+} and with the Germination of Pollen. **Plants**, v. 10, p. 2290, 2021.

EL-RAMADY, H. R. et al. Selenium and nano-selenium in plant nutrition. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, p. 123-147, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Soils for nutrition: state of the art**. Rome, p. 96, 2022.

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

FERRARESE, M.; SOURESTANI, M.; QUATTRINI, E.; SCHIAVI, M.; FERRANTE, A. Biofortification of spinach plants applying selenium in the nutrient solution of floating system. **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 76, n. 1, p. 127-136, 2012.

FOSCOLOU, A.; CRITSELIS, E.; PANAGIOTAKOS, D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. **Maturitas**, v. 118, p. 60-66, 2018.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

GALINHA, C.; SANCHEZ-MARTINEZ, M.; PACHECO, A. M. G.; FREITAS, M. D. C.; COUTINHO, J.; MACAS, B.; ALMEIDA, A. S.; PEREZ-CORONA, M. T.; MADRID, Y.; WOLTERBEEK, H. T. Characterization of Selenium-Enriched Wheat by Agronomic Biofortification. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4236-4245, 2015.

GARCÍA, I.; MENDOZA, R. POMAR, M. C. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 304, p. 117-131, 2008.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

GOMES. Pimentel. **A Olivicultura no Brasil**. 2ed. Ed. Nobel. São Paulo. 1979.

GREEN, P. S. A revision of *Olea* L. (Oleaceae). **Kew Bulletin**, v. 57, n. 1, p. 91-140, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 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, n. 2, p.149-157, 2013.

HEDGECOE, G. **Olive oil price skyrockets as Spanish drought bites**. BBC, 2023. Disponível em: <https://www.bbc.com/news/world-europe-67565503>. Acesso em: 26 de março de 2024.

HIRSCHI, K. D. Nutrient Biofortification of Food Crops. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, p.401-421, 2009.

HOSSAIN, A.; SKALICKY, M.; BRESTIC, M.; MAITRA, S.; SARKAR, S.; AHMAD, Z.; VEMURI, H.; GARAI, S.; MONDAL, M.; BHATT, R.; KUMAR, P.; BANERJEE, P.; SAHA, S.; ISLAM, T.; LAING, A.M. Selenium Biofortification: Roles, Mechanisms, Responses and Prospects. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 881, 2021.

IBRAOLIVA (Instituto Brasileiro de Olivicultura). **Sucesso da Abertura da Colheita da Oliva gera otimismo entre os produtores**. 2023. Disponível em: <https://www.ibraoliva.com.br/noticias/detalhe/181/sucesso-da-abertura-da-colheita-da-oliva-gera-otimismo-entre-os-produtores>. Acesso em: 12 dez. 2023.

IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). **World trade in olive oil and table olives**. 2023. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2023/09/IOC-Imports-2022-2023-1.html#content>. Acesso em: 12 dez. 2023.

KIELISZEK, M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food. **Molecules**. v. 24, n. 7. p. 1-14, 2019.

KIPP, A. P.; STROHM, D.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHOMBURG, L.; BECHTHOLD, A.; LESCHIK-BONNET, E.; HESEKER, H. German Nutrition Society (DGE). Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 195-199, 2015.

LANGGUT, D.; CHEDDADI, R.; CARRIÓN, J. S.; CAVANAGH, M.; COLOMBAROLI, D.; EASTWOOD, W. J.; GREENBERG, .R.; LITT, T.; MERCURI, A. M.; MIEBACH, A.; ROBERTS, C. N.; WOLDRING, H. WOODBRIDGE, J. The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. **The Holocene**, v. 29, n. 5, p. 902-922, 2019.

LANZA, M. G. D. B.; REIS, A. R. DOS. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 164, p. 27-43, 2021.

LARA, T. S.; LESSA, J. H. L.; SOUZA, K. R. D.; CORGUINHA, A. P. B.; MARTINS, F. A. D.; LOPES, G.; GUILHERME, L. R. G. Selenium biofortification of wheat grain via

foliar application and its effect on plant metabolism. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 81, p. 10-18, 2019.

LOOSE, L.; HELDWEIN, A.; LUCAS, D. D. P.; HINNAH, F. Sunflower emergence and initial growth in soil with water excess. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 644-655, 2017.

LOPES, G.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 605-615, 2017.

LORETI, E.; PERATA, P. The many facets of hypoxia in plants. **Plants**, v. 9, p. 745, 2020.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MATOS, Roberta Pereira. **Determinação do teor total e biodisponível de selênio em diferentes classes de solos da região do Vale do Jequitinhonha – MG**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências -Química) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

MEOTTI, F. C.; NOGUEIRA, C. W. Ações biológicas de compostos de selênio e telúrio: efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central. **Ciência & Natura**, Santa Maria, v. 25 p.163-187, 2003.

MESQUITA, H. A.; GARCIA, C. N.; COSTA, E. L. Solos, aspectos nutricionais e sugestões de fertilização. In: Oliveira, A. F. (Ed.) **Oliveiras no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 387-432, 2012.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the total environment**, v. 249, n. 1-3, p. 347-371, 2000.

NGIGI, P. B.; LACHAT, C.; MASINDE, P. W.; DU LAING, G. Agronomic biofortification of maize and beans in Kenya through selenium fertilization. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, p. 2577– 2591, 2019.

NOVA, T. B. **Arbequina é uma das oliveiras mais cultivadas no Brasil**. EMBRAPA, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/>

/noticia/41939110/arbequina-e-uma-das-oliveiras-mais-cultivadas-no-brasil. Acesso em: 22 de março de 2024.

OLIVEIRA, A. M. R. de et al. **Caracterização de olivais no Rio Grande do Sul: aspectos socioeconômicos, fitossanitários, de nutrição e fertilidade dos solos**. SEAPDR/DDPA, Porto Alegre, RS, 2022.

POBLACIONES, M. J.; RODRIGO, S.; SANTAMARIA, O.; CHEN, Y.; MCGRATH, S. P. Selenium accumulation and speciation in biofortified chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Mediterranean conditions. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1101-1106, 2014.

PROIETTI, P.; NASINI, L.; DEL BUONO, D.; D'AMATO, R.; TEDESCHINI, E.; BUSINELLI, D. Se protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 165-171, 2013.

RAHMAN, M. M.; ERSKINE, W.; ZAMAN, M. S.; THAVARAJAH, P.; THAVARAJAH, D.; SIDDIQUE, K. H. M. Selenium biofortification in lentil (*Lens culinaris* Medikus subsp. *culinaris*): Farmers' field survey and genotype × environment effect. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1596-1604, 2013.

RAPOPORT, H. F.; MORENO-ALÍAS, I. Botânica y morfología. In: BARRANCO NAVERO, D. et al. **El cultivo del olivo**. 7ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2017, p. 35-64.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

REGNI, L.; PALMERINI, C.A.; DEL PINO, A.M.; BUSINELLI, D.; D'AMATO, R.; MAIRECH, H.; MARMOTTINI, F.; MICHELI, M.; PACHECO, P.H.; PROIETTI, P. Effects of selenium supplementation on olive under salt stress conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 278, p. 1-8, 2021.

REICH, H. J.; HONDAL, R. J. Why nature chose selenium. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 821-841, 2016.

REIS, A. R. DOS.; 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: Selenium in plants, Pilon-Smits et al. (eds). **Plant Ecophysiology**, v. 11, p. 211-230, 2017.

SABATINO, L.; NTATSI, G.; IAPICHINO, G.; D'ANNA, F.; DE PASQUALE, C. Effect of selenium enrichment and type of application on yield, functional quality and mineral composition of curly endive grown in a hydroponic system. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 207, 2019.

SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; CUEVAS, J. 'Arbequina' olive is self-incompatible. **Scientia Horticulturae**, v. 230, p. 50-55, 2018.

SASIDHARAN, R.; BAILEY-SERRES, J.; ASHIKARI, M.; ATWELL, BJ; COLMER, TD; FAGERSTEDT, K.; FUKÃO, T.; GEIGENBERGER, P.; HEBELSTRUP, KH; COLINA, RD; et al. Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. **The New Phytologist**, v. 214, p. 1403–1407, 2017.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an Integral Part of Factor 3 against Dietary Necrotic Liver Degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 3292-3293, 1957.

SCHIAVON, M.; BERTO, C.; MALAGOLI, M.; TRENTIN, A.; SAMBO, P.; DALL'ACQUA, S.; PILON-SMITS, E. A. H. Selenium Biofortification in Radish Enhances Nutritional Quality via Accumulation of Methyl-Selenocysteine and Promotion of Transcripts and Metabolites Related to Glucosinolates, Phenolics, and Amino Acids. **Frontiers in Plant Science**, 2016, v. 7, p. 1371, 2016.

SCHIAVON, M.; NARDI, S.; DALLA VECCHIA, F.; ERTANI, A. Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. **Plant Soil**, v. 453, p. 245-270, 2020.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 264-276, 2007.

SEPPÄNEN, M. M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H. Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, v. 165, p. 311-319, 2003.

SHAMBERGER, R. J. Selenium in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 17, n. 1, p. 59-74, 1981.

SILLANPÄÄ, M., JANSSON, H. Status of cadmium, lead, cobalt and selenium in soils and plants of thirty countries. **FAO Soils Bulletin 65**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 194, 1992.

SILVA, M. A.; SOUSA, G. F.; BAÑUELOS, G.; AMARAL, D.; BROWN, P. H.; GUILHERME, L. R. G. Selenium Speciation in Se-Enriched Soybean Grains from Biofortified Plants Grown under Different Methods of Selenium Application. **Foods**, v. 12, p.1214, 2023.

TEDESCHINI, E.; PROIETTI, P.; TIMORATO, V.; D'AMATO, R.; NASINI, L.; BUONO, D. D.; BUSINELLI, D.; FRENGUELLI, G. Selenium as stressor and antioxidant affects pollen performance in *Olea europaea*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 16-22, 2015.

TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DE SOUZA, M. P.; TARUN, A. S. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 401–432, 2000.

TROFAST, J. Berzelius' discovery of selenium. **Chemistry International**, v. 33, p. 16, 2011.

VEGA-RAVELLO, R.; ROMERO-POMA, M. B.; OLIVEIRA, C.; GUILHERME, L. R. G.; LOPES, G. Soil Selenium Addition for Producing Se-Rich Quinoa and Alleviating Water Deficit on the Peruvian Coast. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 23, p. 238-250, 2023.

VILLA, F.; OLIVEIRA, A. F. Origem e expansão da oliveira na América Latina In: OLIVEIRA, A. F. de (Ed.). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. EPAMIG, 2012. 22-38p.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, v. 182, p. 49-84, 2009.

ZAHEDI, S. M.; HOSSEINI, M. S.; DANESHVAR HAKIMI MEYBODI, N.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Foliar application of selenium and nano-selenium affects pomegranate (*Punica granatum* cv. Malase Saveh) fruit yield and quality. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 350- 358, 2019.

ZARONI, A. A. et al. Importância do azeite de oliva para a saúde humana. In: de OLIVEIRA, A. F. **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, 2012. p. 729-772.

ZAUZA, S. B.; NAMORATO, F. A.; SILVA, V. M.; OLIVEIRA, C.; LOPES, G.; LI, L.; PASQUAL, M.; GUILHERME, L. R. G.; DÓRIA, J. Biofortification of Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) Through Soil Selenium Application. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 23, p. 5233-5244, 2023.

ZHU, S.; LIANG, Y.; AN, X.; KONG, F.; GAO, D.; YIN, H. Changes in sugar content and related enzyme activities in table grape (*Vitis vinifera* L.) in response to foliar selenium fertilizer. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4094-4102, 2017.

APÊNDICE 1

Material vegetal do Estudo 1

O material vegetal consistiu em oliveiras adultas da cultivar Arbequina, com 7 e 6 anos de idade, nos pomares de São Gabriel e Caçapava do Sul, respectivamente. O tamanho das árvores de ambos os pomares era, em média, X m de altura com uma projeção de copa de X m.

Fotos pomar SG:



Fotos pomar CS:



APÊNDICE 2

Material vegetal e sintomas visuais de estresse hídrico do Estudo 2

O material vegetal consistiu em oliveiras jovens da cultivar Frantoio, adubadas com selênio (150 mg Se) e não adubadas (0 mg Se), nos tratamentos hídricos capacidade de campo (CC), restrição hídrica total (RH) e solo alagado (AL).

Fotos CC 0 mg Se pós tratamento hídrico:



Fotos CC 150 mg Se pós tratamento hídrico:



Fotos RH 0 mg pós tratamento hídrico:



Fotos RH 150 mg pós tratamento hídrico:



No tratamento hídrico RH, após 12 dias com escassez de água, observamos sinais de estresse hídrico com perda de turgescência, murcha e ressecamento das folhas, que ficaram mais evidentes em plantas não tratadas com Se.

Fotos AL 0 mg pós tratamento hídrico:



Fotos AL 150 mg pós tratamento hídrico:



No tratamento hídrico AL, após 8 dias de saturação do solo com água, observamos sintomas visuais de perda de turgescência, murcha e perda de folhas, sem grandes diferenças entre as plantas tratadas e não tratadas com Se.