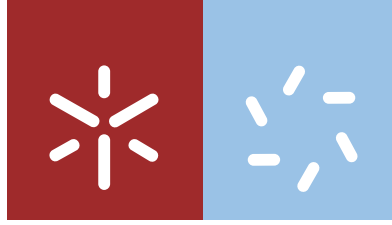




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Celso Manuel Fonseca Santos

Avaliação do efeito de composto e frações enriquecidas em substâncias húmicas em ensaios à escala de campo e à escala laboratorial in vitro



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Celso Manuel Fonseca Santos

Avaliação do efeito de composto e frações enriquecidas em substâncias húmicas em ensaios à escala de campo e à escala laboratorial in vitro

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Ana Cristina Gomes Cunha
e do
Professor Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para agradecer a um conjunto de pessoas, sem as quais este trabalho não seria possível de realizar, e às quais devo os meus sinceros agradecimentos.

À Prof. Doutora Ana Cunha e ao Prof. Doutor Rui Oliveira, orientadores deste trabalho. Um grande obrigado pela disponibilidade, paciência, ajuda e oportunidade de realizar esta tese.

Aos professores da Licenciatura de Biologia Aplicada e do mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas, que ao longo de 5 anos me transmitiram conhecimentos e virtudes que me foram essenciais na realização desta tese, e serão também cruciais no meu futuro profissional.

À colega de tese, Ana Teixeira, que me acompanhou ao longo deste ano e me ajudou de início ao fim. Um grande obrigado.

A todos os elementos do Laboratório de Biologia Vegetal e colegas de mestrado, que me acolheram de forma tão calorosa e foram responsáveis por muitos bons momentos ao longo destes 2 anos.

E por fim, mas nem por isso menos importante, à minha família, amigos, namorada e Faísca. Por acreditarem em mim e me darem força para concluir esta epopeia.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Avaliação do efeito de composto e frações enriquecidas em substâncias húmicas em ensaios à escala de campo e à escala laboratorial in vitro

Resumo

Com o crescimento atual da população surgem necessidades mais urgentes de aumentar a produtividade agrícola, redirecionar o desperdício alimentar/agrícola e diminuir o impacto de ameaças como agentes patogénicos na agricultura. Neste sentido, a compostagem apresenta-se como uma proposta de valor (social, ambiental e económica) na reutilização destes excedentes, transformando-os num composto orgânico com enorme valor agrícola, como promotor de crescimento e biopesticida. Tendo isto em consideração, foi objetivo deste trabalho avaliar o efeito que a utilização de 4 compostos orgânicos diferentes (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)), e de extratos húmicos e macerados preparados a partir destes, podem ter na produção de culturas como a alface (*Lactuca sativa*) e o morangueiro (*Fragaria ananassa*), num ensaio de campo; e num ensaio in vitro, a capacidade de promover o crescimento de alface, e a inibição/promoção de crescimento de microrganismos patogénicos/mutualistas. Num estudo de campo, o composto CA a concentração de 2,55 Kg/m², demonstrou produzir alfaces com mais e maiores raízes e folhas. Já o composto N, de origem vegetal, demonstrou ser superior a um de origem animal (G), ao produzir morangos em maior quantidade e com maior tempo de prateleira. Destacando-se que a qualidade de um composto é mais importante que o aumento da quantidade aplicada deste, e que a presença de um fertilizante orgânico é, de forma geral, melhor que a sua ausência. *In vitro*, os extratos húmicos do composto de algas (CA) produziram plântulas com raízes, pecíolos e folhas mais compridas que os restantes compostos. Os extratos húmicos também se mostraram eficientes na inibição de crescimento de microrganismos patogénicos como a *Phytophthora cinnamomi*, *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola*. Além destes, também os macerados (principalmente de Guano a 50 g/L) exerceram um efeito inibitório no crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola*, e na promoção de crescimento, e produção de extrólitos, de *Penicillium citrinum*.

De acordo com os resultados aqui presentes, parece inquestionável a mais valia do uso de fertilizantes orgânicos e das substâncias neles presentes, salientando-se assim, inerentemente, o valor de uma prática como a compostagem.

Palavras Chave – Biopesticida, Compostagem, Composto orgânico, Substâncias húmicas

Evaluation of the effect of compost and fractions enriched on humic substances in field assays and in vitro laboratory scale trials

Abstract

With current population growth, there are more urgent needs to increase agricultural productivity, redirect food/agricultural waste and lessen the impact of threats as pathogens in agriculture. In this sense, composting presents itself as a value proposition (socially, environmentally and economically) in the reuse of these surpluses, transforming them into an organic compound with enormous agricultural value, as a growth promoter and biopesticide. Taking this into consideration, the objective of this work was to evaluate the effect that the use of 4 different organic compounds (Municipal waste (N), Guano (G), Vermicompost (VC) and Algae compound (CA)), and humic and macerated extracts. prepared from these, can have in the production of crops such as lettuce (*Lactuca sativa*) and strawberry (*Fragaria ananassa*) in a field trial; and in an *in vitro* assay, the ability to promote lettuce growth, and the inhibition/promotion of growth of pathogenic and mutualists microorganisms. In a field study, the CA compound at a concentration of 2.55 kg/m² was shown to produce lettuce with more and larger roots and leaves. On the other hand, the compound N, of vegetable origin, proved to be superior to one of animal origin (G) when producing strawberries in larger quantity and with longer shelf life. Noting that the quality of compost is more important than the increased amount of compost added, and the presence of organic fertilizer is generally better than its absence. *In vitro*, the humic extracts of the algae compound (CA) produced seedlings with longer roots, petioles and leaves than the other compounds. Humic extracts were also effective in inhibiting the growth of pathogenic microorganisms such as *Phytophthora cinnamomi*, *Salmonella typhimurium*, and *Xanthomonas arboricola*. Also, macerates (mainly Guano at 50 g / L) exerted an inhibitory effect on the growth of *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola*, and on the promotion and growth of *Penicillium citrinum*.

According to the results presented here, it seems unquestionable the added value of the use of organic fertilizers and the substances present in them, thus inherently emphasizing the value of a practice such as composting.

Key-words – Biopesticide, Composting, Humic substances, Organic compost

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xv
1 – Introdução.....	1
1.1 – Enquadramento do trabalho: dos fundamentos ao projeto Res2ValHUM.....	1
1.2 – Compostagem de matéria orgânica: reciclagem e fonte de novos produtos.....	3
1.3 – Húmus e substâncias húmicas.....	4
1.3.1 – Origem das substâncias húmicas.....	5
1.3.2 – Composição química e estrutura de SH.....	6
1.3.3 – Efeito das substâncias húmicas nos solos, microrganismos e plantas.....	6
1.4 – Modelos vegetais para o estudo dos efeitos de compostos e substâncias húmicas: morangos e alfaces.....	8
1.5 – Modelos microbianos para o estudo dos efeitos de compostos e substâncias húmicas: microrganismos patogénicos e mutualistas.....	9
1.5.1 – Bactérias.....	9
1.5.2 – Fungos.....	10
1.5.3 – Oomicotas.....	10
1.6 – Objetivos.....	11
2 – Materiais e Métodos.....	13
2.1 – Compostos orgânicos.....	13
2.1.1 – Extratos de substâncias húmicas e soluções aquosas de compostos.....	14
2.2 – Material biológico.....	14
2.2.1 – Material vegetal.....	14
2.2.2 – Microrganismos.....	15
2.3 – Ensaio de campo: desenho experimental e parâmetros avaliados.....	15
2.3.1 – Desenho experimental e manutenção das culturas.....	16
2.3.2 – Parâmetros de produtividade.....	19
2.3.2.1 – Número de folhas (alface).....	19

2.3.2.2 – Biomassa da parte aérea (alface)	19
2.3.2.3 – Área foliar (alface).....	20
2.3.2.4 – Análise do sistema radicular (alface)	21
2.3.2.5 – Número de frutos e volume (morangueiro)	21
2.3.3 – Parâmetros fisiológicos (alface)	22
2.3.3.1 – Conteúdo relativo em água	22
2.3.3.2 – Área Foliar Específica.....	22
2.3.3.3 – Teor de pigmentos fotossintéticos	22
2.3.4 – Parâmetros de qualidade (alface e morango).....	23
2.3.4.1 – Teor de vitamina C	23
2.3.4.2 – Teor de antocianinas	24
2.3.4.3 – Tempo de prateleira.....	24
2.4 – Avaliação do efeito das substâncias húmicas em culturas vegetais e microbianas <i>in vitro</i>	25
2.4.1 – Efeito em culturas <i>in vitro</i> de alface	25
2.4.2 – Efeito sobre crescimento de microrganismos: efeito promotor e antimicrobiano 26	
2.4.2.1 – Efeito sobre proliferação de fungos	26
2.4.2.2 – Capacidade antibacteriana.....	27
2.5 – Questionário	29
2.6 – Análise estatística	29
3 – Resultados e Discussão	30
3.1 – Avaliação do efeito de compostos orgânicos em ensaio de campo	30
3.1.1 – Produtividade de alface e morango em 2018 e 2019.....	30
3.1.1.1 – Ensaio 2018.....	30
3.1.1.2 – Ensaio 2019.....	33
3.1.2 – Parâmetros fisiológicos em alface em 2018 e 2019	36
3.1.2.1 – Ensaio 2018.....	36
3.1.2.2 – Ensaio 2019.....	38
3.1.3 – Avaliação da qualidade nos ensaios de 2018 e 2019.....	40
3.1.3.1 – Quantificação de antocianinas e vitamina C em morangos e alfaces	40
3.1.3.2 – Tempo de prateleira do morango	41

3.2 – Avaliação da atividade de extratos húmicos e macerados de compostos em ensaios <i>in vitro</i>	44
3.2.1 – Efeito em variedades de alface	44
3.2.2 – Efeito em espécies microbianas	50
3.2.2.1 – Efeito de extratos húmicos no crescimento de bactérias	50
3.2.2.2 – Efeito de extratos húmicos e macerados de compostos no crescimento de Fungos e Oomicotas.....	53
3.2.2.2.1 – Efeito de extratos húmicos em <i>Phytophthora cinnamomi</i> ..	53
3.2.2.2.2 – Efeito de macerados de compostos em <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Diplodia corticola</i> e <i>Penicillium citrinum</i>	58
3.3 – Inquérito online sobre compostagem: perceções e motivação da população portuguesa	63
4 – Conclusões e perspetivas futuras	66
5 – Referências	69
6 – Apêndice	80
6.1 - Apêndice 1 - Planificação do questionário.....	80
6.2 - Apêndice 2 – Avaliação do efeito de diferentes controlos no crescimento de sementes de alface no ensaio <i>in vitro</i>	83
6.3 - Apêndice 3 – Avaliação do efeito de extratos húmicos em microrganismos	84

Lista de abreviaturas

A – Absorvância

AF – Ácidos Fúlvicos

AFE – Área Foliar Específica

AH – Ácidos Húmicos

C3g – Cianidina-3-glicósido

CA – Composto de Algas

DF – fator de diluição

DW – *Dry Weight* ou peso seco

FW – *Fresh Weight* ou peso fresco

G – Guano

LB – Luria Bertani

MS - Murashige e Skoog

MW - Peso molecular

N – Resíduos urbanos

Ns – Não significativo

P3g – Pelargonidina-3-glicósido

PGA – Potato-Glucose-Agar

RWC – *Relative Water Content* ou Conteúdo relativo em água

rpm – Rotações por minuto

SH – Substâncias Húmicas

TNB – *Temple–Northeastern–Birmingham*

TW – *Turgid Weight* ou peso túrgido

VC – Vermicomposto

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação hierárquica dos diferentes componentes orgânicos do solo. Imagem baseada em Peña-Méndez *et al.*, (2005) e Huang e Hardie (2009)..... **5**
- Figura 2.** Ilustração da estrutura monomérica de um ácido húmico (A), segundo o modelo TNB (*Temple–Northeastern–Birmingham*) de Davies *et al.*, 1997 (imagem de Pope *et al.*, 2010, baseada em Davies *et al.*, 1997); e de um monômero de ácidos fúlvicos (B), segundo o modelo TNB (Imagem de Guo *et al.*, 2019, baseada em Alvarez-Puebla *et al.*, 2006)..... **6**
- Figura 3.** Desenho experimental do ensaio de campo 2018, encontrando-se representados a verde as alfaces e a vermelho os morangueiros. Os 2 compostos em estudo estão representados por N e G (Resíduos urbanos e Guano, respetivamente), seguidos das respetivas concentrações. Existe para cada condição um espaço total de 0,9 m², espaçamento entre pés de 0,3 m e para a margem de 0,15 m. **18**
- Figura 4.** Desenho experimental do ensaio de campo 2019, encontrando-se representadas a verde as alfaces utilizadas no ensaio e a cinzento as alfaces de bordadura. Os 4 compostos e o controlo estão representados por N, G, VC, CA e C (Resíduos urbanos, Guano, Vermicomposto, Composto de Algas e Controlo, respetivamente), com as respetivas concentrações entre parêntesis retos, expressas em Kg/m², seguido do número do plot (.1 ou .2). Existe no espaço total de 25 m², espaçamento entre *plots* de 0,5 m e entre alfaces da mesma condição de 0,3 m. **19**
- Figura 5.** Correlações entre o comprimento x largura máximas de folhas de alface e respetiva área foliar obtidas a partir de recolhas de folhas de alface no campo em fases de desenvolvimento distintas: a azul, numa fase de desenvolvimento inicial, com 44 amostras e, a verde, numa fase de desenvolvimento mais avançada, com 72 amostras. **20**
- Figura 6.** Exemplares representativos dos três calibres maioritariamente encontrados de raízes de alface (grosso, intermédio e fino)..... **21**
- Figura 7.** Exemplificação de uma placa com crescimento de um fungo. A metodologia usada para a medição do crescimento do micélio consistiu na medição deste em dois eixos perpendiculares (x e y), sendo estes usados para o cálculo de um diâmetro médio. **27**
- Figura 8.** Representação exemplificativa de uma placa do ensaio antibacteriano. Os círculos brancos representam as gotas de inóculo de suspensão bacteriana. As colunas representam as réplicas (total de 3) e as linhas representam inóculos de suspensões de diferentes espécies (*Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola* (estirpes CPBF 426 e 1521)). **28**
- Figura 9.** Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N), a concentrações de 5 e 10 ton/ha, nos parâmetros de produtividade: número de folhas (A), biomassa da parte aérea (B) e área foliar da maior folha (C) da alface no ensaio de 2018. Encontram-se representados valores médios (n≥3) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05)..... **31**
- Figura 10.** Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N), a concentrações de 5 e 10 ton/ha, nos parâmetros de produtividade: número de morangos produzidos semanalmente (A); a média de morangos produzidos por semana (B); e o volume do fruto em cm³ (C) do morangueiro no ensaio de 2018. Encontram-se representados valores médios (n≥11) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05)..... **32**

- Figura 11.** Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) nos parâmetros de produtividade: número de folhas produzidos ao longo do ensaio (A); número de folhas produzidos no último dia do ensaio (B); e biomassa da parte aérea (C) da alface no ensaio de 2019. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **33**
- Figura 12.** Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) na área foliar total da alface, medidas no final da semana 3 (lado esquerdo) ou no final do final do ensaio (lado direito), no ensaio de 2019. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **34**
- Figura 13.** Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) no sistema radicular de Alface no ensaio de 2019. Neste critério foram analisados o comprimento da raiz (A); o peso fresco e peso seco da raiz (B); e o número de raízes grossas, intermédias e finas (C). Encontram-se representados valores médios (n≥6) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **35**
- Figura 14.** Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N) (a 5 e 10 ton/ha) no conteúdo relativo em água (A) e de pigmentos fotossintéticos (Clorofila A, clorofila B e Carotenoides) (B) em alfaces no ensaio de 2018 à sexta semana. Encontram-se representados valores médios (n≥4) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **37**
- Figura 15.** Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²), no conteúdo relativo em água (RWC) (A), e Área foliar específica (B) em alfaces no ensaio de 2019, à terceira e quinta semana. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **38**
- Figura 16.** Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²), no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Clorofila A, clorofila B e Carotenóides) de alfaces no ensaio de 2019, à terceira e quinta semanas. Encontram-se representados valores médios (n≥6) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05). **39**
- Figura 17.** Comparação ao longo de 4 dias, por inspeção visual, da qualidade de morangos produzidos com diferentes compostos (Resíduos urbanos (N) e Guano (G) a 5 e 10 ton/ha), com e sem cortes superficiais. **42**
- Figura 18.** Comparação ao longo de 4 dias, por inspeção visual, da qualidade entre morangos produzidos com diferentes compostos (Resíduos urbanos (N) e Guano (G) a 5 e 10 ton/ha), quando sujeitos à temperatura ambiente e a 6°C. **43**
- Figura 19.** Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, na percentagem de germinação de sementes de alface ao longo de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios (n≥3) ± desvio padrão.

Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes, em comparação com o controle ($p \leq 0,05$). Ou em caso de ausência de diferença por n.s (não significativo). **45**

Figura 20. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) $\mu\text{g/mL}$, na percentagem de plântulas com cotilédones expandidos de alface ao longo de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes, em comparação com o controle ($p \leq 0,05$). Ou em caso de ausência de diferença por n.s (não significativo). **46**

Figura 21. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) $\mu\text{g/mL}$, no comprimento da raiz de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... **47**

Figura 22. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) $\mu\text{g/mL}$, no comprimento da folha primária de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... **47**

Figura 23. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) $\mu\text{g/mL}$, no comprimento do pecíolo de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... **48**

Figura 24. Percentagens de variação de crescimento (inibição ou promoção do crescimento (Equação 11)) de *Salmonella typhimurium* (S.t) e estirpes 426 e 1521 de *Xanthomonas arboricola* (X.a 426 e X.a 1521) em meios de LB com ácidos húmicos (AH) e substâncias húmicas (SH) a diferentes concentrações (250, 500, 750 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$) provenientes de diversos compostos orgânicos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA). Encontram-se representados valores médios ($n=3$) \pm desvio padrão. Significância estatística presente, sob a forma de *($P < 0,05$) ou n.s (não significativo), é feita com a comparação do número de colónias entre essa condição e o controlo solvente. **51**

Figura 25. Percentagens de inibição, no crescimento de micélio de *Phytophthora cinnamomi*, de extratos húmicos (Ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF)) provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) por ordem crescente, no dia 3 (A e B) e 6 (C e D) do ensaio. Apenas as condições que apresentem percentagens de inibição positiva estão presentes. Encontram-se representados valores médios ($n=3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo)..... **54**

Figura 26. Percentagens de inibição, no crescimento de micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , de substâncias húmicas (SH) provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA), do dia 3 ao 6 do ensaio. Apenas as condições que apresentem percentagens de inibição positiva estão presentes. Encontram-se representados valores médios (n=3) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo).....	55
Figura 27. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , em meio PGA (contolo) ou em meio PGA suplementado com substâncias húmicas (SH) de composto Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA) nas concentrações de 750 e 1000 µg/mL; ao sexto dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 6 dias a 25 °C na ausência de luz.	56
Figura 28. Análise do crescimento do micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> cultivado em meio PGA, após ser transferido de placas com meio PGA e substâncias húmicas (SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) e concentrações (750 e 1000 µg/mL) do terceiro ao quinto dia. Encontram-se representados valores médios (n=3) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo).....	57
Figura 29. Percentagens na variação do crescimento (inibição ou promoção do crescimento) de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (A), <i>Diplodia corticola</i> (B) e <i>Penicillium citrinum</i> (C) sob efeito de macerados de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) incorporados a concentrações de 25 e 50 g de composto por Litro de água em meio PGA.....	59
Figura 30. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , em meio PGA (contolo) ou em meio PGA suplementado com macerados de diversos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) nas concentrações de 25 e 50 g/L; ao sexto dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 6 dias a 25 °C na ausência de luz. .	60
Figura 31. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de <i>Penicillium citrinum</i> em meio PGA (contolo) ou em meio PGA suplementado com macerados de diversos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) nas concentrações de 25 e 50 g/L; ao sétimo (A) e ao décimo quarto (B) dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 14 dias a 25 °C na ausência de luz.	61
Apêndice 1.1. Secção 1 do questionário.	80
Apêndice 1.2. Secção 2 do questionário.	80
Apêndice 1.3. Secção 3 do questionário.	81
Apêndice 1.4. Secção 4 do questionário.	81
Apêndice 1.5. Secção 5 do questionário.	82
Apêndice 1.6. Secção 6 do questionário.	82

Apêndice 2. Comparação entre controlo negativo (apenas meio MS) e controlo solvente (meio MS + quantidade de solvente (NaOH 0,1 M) utilizada para dissolver os extratos à maior concentração) nos diferentes parâmetros avaliados (Percentagem de germinação e de presença de cotilédones no dia 2, 5 e 10; e no comprimento da raiz, folha primária e pecíolo), em sementes de Alface cultivadas em meio MS no ensaio <i>in vitro</i> . Cada valor é representado sob a forma de média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas são representadas pela diferença de letras. .	83
Apêndice 3.1. Crescimento do micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meios de PGA com ácidos húmicos (AH) ou ácidos fúlvicos (AF), provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos (A e B), Guano (C e D), Vermicomposto (E e F) e Composto de Algas (G e H)) a diferentes concentrações (250, 500, 750 e 1000 µg/mL) em comparação com um controlo.	84
Apêndice 3.2. Crescimento do micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meios de PGA com substâncias húmicas (SH), provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos (A), Guano (B), Vermicomposto (C) e Composto de Algas (D)) a diferentes concentrações (750 e 1000 µg/mL) em comparação com um controlo.....	85

Lista de tabelas

Tabela 1. Resumo dos principais efeitos das substâncias húmicas em plantas, solo e microrganismos.....	7
Tabela 2. Caracterização dos compostos orgânicos utilizados ao nível de matéria orgânica, humidade, elementos químicos e rendimento de extração de substâncias húmicas. Valores de C, N, P, Mg, Na e K expressos em percentagem mássica (m/m). Relativamente à origem dos dados, os dados da caracterização do rendimento de extração foi feita na Universidade de Santiago de Compostela; e a restante caracterização dos compostos (percentagens de matéria orgânica, humidade, C, N, P, Mg, Na, K e ratio de C/N), corresponde à ficha técnica do respetivo composto.	13
Tabela 3. Lista de microrganismos, e respetivos fornecedores, utilizados neste trabalho.	15
Tabela 4. Caracterização do local, data, culturas vegetais e compostos orgânicos utilizados nos ensaios de campo de 2018 e 2019.	16
Tabela 5. Parâmetros avaliados nos ensaios de campo de 2018 e 2019. A presença do (x) representa a realização desse ensaio.	16
Tabela 6. Resumo da aplicação de composto para o Ensaio de campo 2018. A quantidade de composto e substâncias húmicas adicionadas teve em consideração o uso de uma área de 0,9 m ² . A estimativa da quantidade de substâncias húmicas adicionadas foi baseada no rendimento de extração da Tabela 2.....	17
Tabela 7. Resumo técnico sobre doses de aplicação de composto para o Ensaio de campo 2019. A quantidade de composto e substâncias húmicas adicionadas teve em consideração o uso de uma área de 0,525 m ² . A estimativa da quantidade de substâncias húmicas adicionadas foi baseada no rendimento de extração da Tabela 2.....	17
Tabela 8. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N) e Guano (G), a diferentes doses (5 e 10 ton/ha) na concentração de vitamina C e antocianinas em alface e morango, no ensaio de 2018. Resultados de vitamina C expressos em mg de ácido ascórbico/g FW; e de antocianinas em mg cianidina-3-glicósido/g FW para a alface e em mg pelargonidina-3-glicósido / g FW para o morango.	

Encontram-se representados valores médios ($n \geq 4$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... **40**

Tabela 9. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA) a diferentes doses (Kg/m^2), na concentração de vitamina C e antocianinas em Alface, no ensaio de 2019. Resultados de vitamina C expressos em mg de ácido ascórbico/g FW; e de antocianinas em mg cianidina-3-glicósido /g FW. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 6$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... **40**

Tabela 10. Resumo dos ensaios do efeito das substâncias húmicas em culturas *in vitro* de alface. Os extratos húmicos (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e mistura (substâncias húmicas)) dos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) que foram testadas, consistiram em 3 concentrações diferentes (500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$). “X” representa a realização desse ensaio. **44**

Tabela 11. Comparação entre as diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) do mesmo composto no comprimento da raiz (expresso em mm). Efeito dos ácidos húmicos de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) a concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$, no comprimento da raiz de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. A negrito ressaltou-se os valores máximos. Cada valor é representado sob a forma de média ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Diferença estatística, entre concentrações do mesmo composto, representada pela diferença de letras..... **49**

Tabela 12. Média de percentagem de variação (inibição ou promoção), por ordem decrescente, no crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola* e *Penicillium citrinum* sob efeito de meios com macerados de compostos na totalidade do ensaio. Os macerados são provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) e foram incorporados em meio PGA a concentrações de 25 e 50 g de composto por Litro de água. Cada valor é representado sob a forma de média ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Diferença estatística, entre concentrações do mesmo composto, representada pela diferença de letras... **60**

1 – Introdução

1.1 – Enquadramento do trabalho: dos fundamentos ao projeto Res2ValHUM

Vivemos atualmente na época mais próspera alguma vez testemunhada a par de um aumento populacional acelerado. A pobreza extrema (viver com menos de 1,90 dólares internacionais por dia) diminuiu para cerca de metade nos últimos 20 anos, 80% de todas as crianças conhecem a vacinação em primeira mão e a esperança média de vida nunca foi tão alta (Our World in Data, 2019). Contudo, com as novas e melhores condições de vida, surgiram também problemas que o ser humano nunca teve de enfrentar em tão grande escala. De entre eles surgem dois particularmente cruciais e que se mantêm aparentemente sem resposta: como alimentamos tanta população de forma sustentável ambiental e economicamente; e o que fazemos com todo o desperdício alimentar e agrícola produzido nesse processo.

É sem surpresa, portanto, que neste recente virar de século um dos focos de desenvolvimento societal esteja na capacidade de se fornecer alimento à população mundial, que se prevê aumentar em 50% até 2050 (United Nations, 2017; FAO, 2017). Este aumento significa que, até essa data, a humanidade terá de produzir mais comida do que de há 6000 anos a.C. até ao presente (WWF, 2012). Com este aumento de produção também se espera que os já grandes desperdícios do setor agrícola e alimentar aumentem a par. Sendo a sociedade humana ineficiente na reutilização destes produtos, será expectável que uma grande parte destes continue a acabar em aterros, contribuindo para a poluição do ar e da água, assim como para a perda de biodiversidade e de qualidade do solo (Danthurebandara *et al.*, 2012). A nível rural, as queimadas costumam ser uma solução para evitar a deposição de material indesejado. Contudo, esta prática não só tem impactos ambientais devido aos gases libertados, como também pode ser causa de incêndios. Estima-se que, em 2017, de entre os 7883 incêndios com causa conhecida, cerca de 3000 tiveram origem em práticas negligentes, sendo as queimadas uma das principais (REA, 2019).

Juntamente com o desaproveitamento destes excedentes, no final da cadeia associada à economia alimentar, o desperdício de comida também representa um grande problema social e ambiental. Atualmente, de acordo com a FAO (Food and Agricultural Organization) perto de 1/3 de toda a

comida produzida não é aproveitada, representando na Europa cerca de 1,3 mil milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2011). Nos Estados Unidos (ano de 2010) e na Europa (em 2012), a quantidade de comida perdida equivale a uma perda monetária de 161 mil milhões de dólares e 143 mil milhões de euros, respetivamente (Buzby *et al.*, 2014; Stenmarck *et al.*, 2016). O desperdício e a perda de produtos alimentares representam, assim, dos materiais produzidos em maior quantidade e a chegar em maior quantidade a aterros, comparando com o restante “lixo” (EPA, 2018; Taiwo, 2011).

De forma a se conseguir fornecer alimento às futuras gerações, não só é importante haver um melhor aproveitamento dos alimentos produzidos, como também se torna relevante ter a maior produtividade agrícola possível. Uma das maiores ameaças à produtividade vegetal são as perdas causadas por agentes patogénicos (Oerke, 2006). A nível global, esta ameaça está presente de igual forma entre países desenvolvidos e sub-desenvolvidos, contudo, são os menos desenvolvidos que padecem mais, pelo facto de não terem acesso suficiente a químicos e pesticidas (Sundström, 2014). A globalização e as alterações climáticas são fatores que ajudam a intensificar este problema, não só permitindo uma maior facilidade na dispersão destes agentes, como também contribuindo para uma maior dispersão de espécies vegetais para locais onde estas não possuem resistência aos microrganismos ou outras pragas locais (Strange e Scott, 2005; Stuthmanv *et al.*, 2007). De entre os vários agentes patogénicos, os fungos, as bactérias e os oomicotas são causadores de um número surpreendentemente grande de doenças para inúmeros hospedeiros hortícolas (Strange e Scott, 2005, Stuthmanv *et al.*, 2007), sendo também dos maiores contribuidores para o impacto em espécies de grande importância global como o trigo, o algodão, o arroz e o milho (Oerke, 2006).

Neste sentido, o uso de fertilizantes e de pesticidas, tem sido fundamental para manter o melhor crescimento e produtividade possível de plantas e para reduzir as perdas por doenças causadas por agentes patogénicos (Oerke, 2006; Carvalho, 2017). Os fertilizantes agrícolas são uma fonte viável de macro e micronutrientes e o seu uso na presente cultura agrícola é uma prática comum e bastante antiga. As primeiras evidências do uso de fertilizantes com o intuito de aumentar a produtividade vegetal, remontam há aproximadamente 8000 anos (Bogaard *et al.*, 2013), tendo o seu uso aumentado até aos dias que correm (Tilman *et al.*, 2001). Porém, o uso excessivo de fertilizantes e pesticidas, especialmente sintéticos, tem-se provado nefasto (Udeigwe *et al.*, 2015;

Sharma e Singhvi, 2017). Enquanto os primeiros podem provocar grandes danos para o ambiente, contribuindo para a poluição de corpos de água, salinização e poluição do solo, e para a perda (indireta) de biodiversidade; os pesticidas sintéticos, além de poderem criar resistências ou acumularem-se no ambiente, podem provocar grandes problemas ao nível da saúde do utilizador, através do consumo de água contaminada ou inalação que podem levar ao surgimento de doenças como o cancro (Alavanja *et al.*, 2003; Gilliom *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007; Mozumder and Berrens, 2007; Stacey *et al.*, 2010; Udeigwe *et al.*, 2015; Sharma e Singhvi, 2017). Tendo isto em consideração, na crescente intensificação agrícola, seria de grande interesse encontrar um substituto para estes aditivos.

Desde o homem neolítico, há 12.000 anos atrás, que aprendemos com a natureza, o que contribuiu para o nosso sucesso enquanto espécie. E pode ser que, mais uma vez, seja nela que se encontre a resposta para alguns dos problemas com os quais nos deparamos atualmente. Neste contexto, já existem soluções a serem postas em prática. Esta tese enquadra-se no projeto Res2ValHUM, em parceria com a Lipor e com diversos centros científicos como a Universidade do Minho e a Universidade de Santiago de Compostela. A finalidade deste projeto consiste na valorização de uma prática agrícola sustentável, baseada no uso de compostos orgânicos produzidos a partir da compostagem de desperdícios alimentares e agrícolas. Valorização esta, fundamentada pela análise do valor prático inerente ao uso destes fertilizantes e das substâncias húmicas (SH) neles presente. Adicionalmente, seria do nosso interesse avaliar a qualidade e as diferenças que existem nas substâncias que contribuem para os efeitos positivos destes compostos.

1.2 – Compostagem de matéria orgânica: reciclagem e fonte de novos produtos

Toda a matéria orgânica eventualmente perece perante o ciclo da matéria e, em certa altura, irá ser degradada por decompositores. Esta é a reciclagem da natureza, sendo considerada, por Eliot Epstein, como “a forma mais elevada de reciclagem” (Epstein, 1997). Este autor define compostagem (quando feita pelo homem) como a decomposição biológica de matéria orgânica sob condições aeróbicas controladas (no sentido de otimização e manutenção) num produto

húmico estável (composto; Epstein, 1997). De outro modo, a compostagem pode também definir-se como a decomposição de matéria orgânica através de fenómenos físico-químicos provocados por organismos decompositores, como bactérias, fungos e minhocas, em que os resíduos vegetais e animais são transformados num composto orgânico rico (FAO, 2003). A compostagem pode depois ser dividida em diversos tipos consoante a matéria orgânica usada, o tipo de agentes decompositores ou a variação de parâmetros físico-químicos (FAO, 2003).

A prática de compostagem, cujos indícios remontam há 6000 anos atrás, tem vindo a aumentar em países com uma enorme produção de lixo orgânico, como os Estados Unidos, passando da reutilização de 4,2 milhões de toneladas de excedentes e comida em 1990, para 23,4 no ano de 2015 (Diaz e De Bertoldi, 2007; EPA, 2018). Esta prática demarca-se das restantes opções de lidar com resíduos sólidos orgânicos (como incineração ou aterros), pelas suas vantagens económicas e ambientais e pela conseqüente produção de um fertilizante orgânico (ou composto) (Epstein, 1997; Seo *et al.*, 2004; Taiwo, 2011). O recurso à compostagem pode ainda mostrar-se como uma prática de remediação de imenso valor, podendo dar resposta a alguns dos problemas atrás referidos, como a redução da deposição de matéria orgânica em aterros; diminuição do número de incêndios; e a formação de um fertilizante orgânico, cujas propriedades poderão beneficiar a produtividade agrícola, o meio ambiente, e levar à eventual substituição de fertilizantes e pesticidas sintéticos. Para além da quantidade e diversidade de micro e macronutrientes que o composto contém na sua composição, existem outras substâncias com propriedades muito relevantes, são estas as substâncias húmicas.

1.3 – Húmus e substâncias húmicas

Os primeiros estudos relativos à capacidade da terra em fazer crescer as plantas remontam a meados do século XVIII por Wallerius, começando nessa altura a ser definido e extraído “húmus” (Kleber e Johnson, 2010). Desde então, muitos outros estudos foram realizados e sabe-se agora que este componente do solo está amplamente disseminado no meio terrestre, das florestas tropicais até aos solos gelados da Antártida, representando uma enorme reserva de carbono a nível global (Peña-Méndez *et al.*, 2005; Abakumov, 2010).

O húmus é considerado ser o produto estável da decomposição da matéria orgânica presente no solo, sendo constituído por substâncias húmicas (substâncias com peso molecular variável

formadas por reações secundárias) e não húmicas (aminoácidos, gorduras, resinas, ceras, entre outras classes de compostos bioquímicos; Huang e Hardie, 2009; Figura 1). Destes componentes húmicos do solo, as substâncias húmicas são usadas num variado leque de aplicações, desde a indústria (da cerâmica, ao trabalho com madeira e cabedal, da metalurgia ao papel), à agricultura (em fertilizantes, principalmente) e ao ambiente (no tratamento de resíduos tóxicos em ambientes aquáticos, por exemplo) (Peña-Méndez *et al.*, 2005).

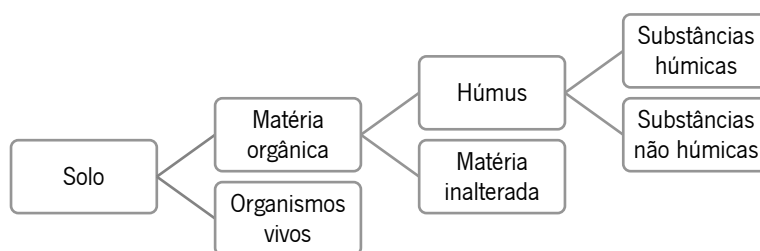


Figura 1. Representação hierárquica dos diferentes componentes orgânicos do solo. Imagem baseada em Peña-Méndez *et al.*, (2005) e Huang e Hardie (2009).

1.3.1 – Origem das substâncias húmicas

O processo através do qual a degradação da matéria orgânica pode levar à formação de substâncias húmicas é designado por humificação. Esta consiste em duas fases de degradação (Bollag *et al.*, 1997; Huang e Hardie, 2009). Na primeira, ocorre principalmente a produção de resíduos biológicos semidecompostos e substratos simples pela atividade de microrganismos ou enzimas livres, durante a qual se dá a redução do tamanho das partículas e a principal decomposição dos componentes mais instáveis, como proteínas e açúcares. Numa segunda instância, continua o processo de degradação da matéria por enzimas, mediado principalmente por fungos, havendo principalmente a degradação de lenhina. No final do processo de humificação, as substâncias húmicas surgem da associação de componentes como hidratos de carbono, fragmentos de lenhinas, aminoácidos, compostos alifáticos e pectinas. Estas associações podem variar consoante: relações complexas entre a matéria orgânica a ser degradada (relações entre C e N dos resíduos, por exemplo), que afetam o produto final; e componentes abióticos (pH do solo, temperatura, arejamento, humidade, mecanismos de proteção física) e bióticos do solo (microflora e organismos decompositores) que influenciam a velocidade do processo (Burdon, 2001; Peña-Méndez *et al.*, 2005; Huang e Hardie 2009; Al-Faiyz, 2013; Silva *et al.*, 2014).

1.3.2 – Composição química e estrutura de SH

Existem 3 grupos distintos de substâncias húmicas: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas. Esta classificação distingue as SH por diferenças no peso molecular, nos grupos funcionais presentes e no grau de polimerização, diferenças estas que, por sua vez, afetam as condições de solubilidade das moléculas (Stevenson, 1982; Piccolo, 2001). Ácidos húmicos (Figura 2.A) são solúveis em água a pH elevado e é o principal componente extraído das SH do solo, tendo uma cor preta ou acastanhada. Ácidos fúlvicos (Figura 2.B) são solúveis em água independentemente do pH e têm uma cor amarelo-acastanhado. As huminas não são solúveis em água a qualquer pH (Stevenson, 1982; Piccolo, 2001; Guo *et al.*, 2019). Existem vários modelos de caracterização das SH, que diferem na quantidade e conformação de cadeias proteicas, anéis aromáticos, grupos carboxílicos, fenóis, quinonas, entre outros (Davies *et al.*, 1997; Alvarez-Puebla *et al.*, 2006; Pope *et al.*, 2010; Al-Faiyz, 2013; Guo *et al.*, 2019).

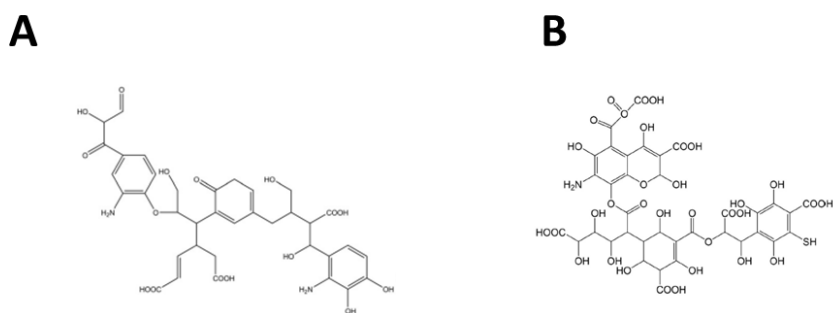


Figura 2. Ilustração da estrutura monomérica de um ácido húmico (A), segundo o modelo TNB (*Temple–Northeastern–Birmingham*) de Davies *et al.*, 1997 (imagem de Pope *et al.*, 2010, baseada em Davies *et al.*, 1997); e de um monômero de ácidos fúlvicos (B), segundo o modelo TNB (Imagem de Guo *et al.*, 2019, baseada em Alvarez-Puebla *et al.*, 2006).

1.3.3 – Efeito das substâncias húmicas nos solos, microrganismos e plantas

Dada a complexidade estrutural e química das SH, moléculas de grandes dimensões e com vários grupos funcionais, pensa-se que, pelo menos, alguns dos efeitos que o uso de composto tem nas culturas agrícolas possa ser devido à atividade das SH aí presentes. Esta série de efeitos está bem documentada na literatura e repartem-se essencialmente por 3 principais vertentes:

- ao nível das plantas (desenvolvimento da planta, fisiologia e bioquímica),
- ao nível do solo (estrutura física e neutralização de componentes tóxicos);
- ao nível dos microrganismos (efeito antimicrobiano ou pró-microbiano).

Apresenta-se na Tabela 1 um resumo de alguns efeitos demonstrados pelas substâncias húmicas em cada uma destas vertentes.

Tabela 1. Resumo dos principais efeitos das substâncias húmicas em plantas, solo e microrganismos.

Alvo	Efeito	Referências
Plantas	Produtividade e crescimento	Valdrighi <i>et al.</i> , 1996; Trevisan <i>et al.</i> 2010; Jindo <i>et al.</i> , 2011; Canellas <i>et al.</i> , 2013; Kamel <i>et al.</i> , 2014; Canellas <i>et al.</i> , 2015; Garcia <i>et al.</i> , 2016; Olivares <i>et al.</i> , 2017
	Aumento na resistência a stresses	Garcia <i>et al.</i> , 2012; Moghadan, 2015
	Produção de metabolitos primários e secundários	Schiavon <i>et al.</i> , 2010; Canellas <i>et al.</i> , 2013; Xu <i>et al.</i> , 2019
Solo	Propriedades físicas do solo	Piccolo <i>et al.</i> , 1997; Sinkpehounv e Yönter, 2018
	Adsorção e eliminação de poluentes	Senesi, 1992; Davies <i>et al.</i> , 1997; Zeng <i>et al.</i> , 2002; Shahid <i>et al.</i> , 2012
Microrganismos	Fungicida	Loffredo <i>et al.</i> , 2007; Wu <i>et al.</i> , 2016
	Antibacteriano	Valdrighi <i>et al.</i> , 1996; Tikhonov <i>et al.</i> , 2010; Olivares <i>et al.</i> , 2017
	Aplicação simultânea de Fungos/Bactérias e SH para aumento de produtividade vegetal	Schoebitz <i>et al.</i> , 2016; Ekin, 2019

Como se pode constatar, são de grande importância os efeitos reportados das SH na produtividade agrícola, havendo contribuição direta destas substâncias para alterações no desenvolvimento e no metabolismo; mas também indiretas, através da eliminação de substâncias poluentes e microrganismos patogénicos, e pela promoção de relações mutualistas com a microflora e pelo melhoramento estrutural do solo. Posto isto, seria de interesse verificar se existem diferenças entre diferentes tipos de fertilizantes orgânicos, com composições distintas de SH, bem como entre extratos de SH, e quais os seus efeitos na produtividade de espécies hortícolas de interesse nacional, assim como em alguns microrganismos de interesse agronómico.

1.4 – Modelos vegetais para o estudo dos efeitos de compostos e substâncias húmicas: morangos e alfaces

Desde cedo nos é ensinado que as frutas e os legumes são uma base essencial da pirâmide dos alimentos, e que o seu consumo é de suma importância para a nossa saúde. Cerca de metade da nossa dieta diária deve consistir no consumo de frutas e legumes (WHO/FAO, 2003). O morango (*Fragaria ananassa*) e a alface (*Lactuca sativa*) são dois vegetais bastante presentes na cultura agrícola e culinária portuguesa, e de um modo geral em toda a cultura ocidental. Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2017, foram produzidas em Portugal 9347 toneladas de morangos e mais de 56 mil toneladas de alfaces; tendo atingido, a exportação de morango, o valor de 9,7 milhões de euros e de alface o valor de 11 milhões de euros no mesmo ano (INE, 2018). Não só a nível agro-alimentar e económico, mas também ao nível da saúde este fruto e legume têm uma enorme relevância como modelos de estudo.

Os morangos apresentam uma forte capacidade antioxidante (2 a 11 vezes mais que outros frutos), devido à presença de vitamina C (58,8 mg por 100 g de peso fresco (FW); Ayesha *et al.*, 2011), por exemplo, como também uma relevante quantidade de antocianinas (1 a 63 mg / 100 g FW; Horbowicz *et al.*, 2008) , contribuindo deste modo para uma série de benefícios, tais como efeitos anti-obesidade, anti-diabético e anti-cancro (Giampieri *et al.*, 2012; Afrin *et al.*, 2016).

A alface também apresenta uma variada paleta de nutrientes, minerais e fitoquímicos, dos quais se destacam a vitamina C, compostos fenólicos e antocianinas (Horbowicz *et al.*, 2008; Maksimovic *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016), possuindo igualmente vários efeitos benéficos no nosso organismo, tais como, anti-inflamatórios, anti-colesterolémicos e anti-diabéticos (Lee *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2015; Pepe *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016).

Portanto, e como previamente referido, o uso de compostos orgânicos derivados da compostagem pode apresentar-se vantajoso para a produção destas duas importantes espécies horto-frutícolas, tal como se revela para muitas outras (Canellas *et al.*, 2015). Do ponto de vista do produtor e do consumidor há 4 dimensões muito relevantes associadas aos produtos horto-frutícolas que consumimos em que o uso de compostos e SH pode contribuir para o seu melhoramento: a produtividade das culturas (aumento da produção em biomassa ou número de frutos, redução de doenças e redução de custos) e que os frutos e legumes pareçam bem, saibam bem e façam

bem. Tendo isto em consideração, surgem vários parâmetros relevantes para avaliar os efeitos de compostos e SH para além das tradicionais medidas de crescimento dos frutos e legumes, tais como, aspeto a curto e mais longo prazo, conteúdo nutricional e fitoquímico e propriedades organolépticas.

1.5 – Modelos microbianos para o estudo dos efeitos de compostos e substâncias húmicas: microrganismos patogénicos e mutualistas

No que diz respeito a estudos sobre os efeitos de SH em microrganismos, fomos debruçar-nos em particular sobre espécies com relevância no contexto deste trabalho de tese, ou seja, em microbiota do solo, com impacte positivo ou negativo para as plantas, que possam ser manipuláveis em laboratório, de modo a se poderem realizar experiências controladas. De entre estas salientam-se espécies de bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola*; de fungos como *Diplodia corticola* e *Penicillium citrinum*; e de oomicotas como *Phytophthora cinnamomi*.

1.5.1 – Bactérias

Salmonella typhimurium, assim como outras espécies deste género, é uma bactéria gram-negativa causadora de muitas doenças e intoxicações alimentares, como a febre tifóide e gastroenterite, em animais e humanos, a nível mundial, afetando, especialmente, países subdesenvolvidos devido à falta de condições de higiene e cuidados com a preparação de alimentos (Crump *et al.*, 2004; Eng *et al.*, 2015). Além disso, também tem a capacidade de usar frutos e vegetais (como tomate e alface) como hospedeiros aderindo à superfície destes para posterior invasão, podendo depois levar à morte da planta ou infetar quem delas se alimente (Golberg *et al.*, 2011; Goudeau *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013; Wiedemann *et al.*, 2015).

Xanthomonas arboricola é uma espécie gram-negativa e conhecida pelos danos causados a uma vasta gama de frutos, dos quais se destacam frutos de caroço e frutos secos, causando impactos económicos e ambientais em todo o mundo (Stefani, 2010). A *spot disease*, doença que se caracteriza pelas manchas negras presentes em folhas e frutos infetados, afeta a produtividade das plantas pela perda de folhas devido a necrose, ou à queda do fruto, podendo vir a infetar

outras plantas (Roselló e Santiago, 2012; Boudon *et al.*, 2005). No campo, o controlo deste agente patogénico é feito com a aplicação de compostos à base de cobre; ou do uso de microrganismos antagonísticos, como a bactéria *Pseudomonas fluorescens* (Biondi *et al.*, 2009; Stefani, 2010).

1.5.2 – Fungos

Diplodia corticola é um fungo patogénico oportunista com um enorme impacto em diversas espécies de grande valor económico, como, por exemplo, o carvalho (*Quercus suber*) e o eucalipto (*Eucalyptus globulus*), importantes na produção de cortiça e papel respetivamente. A infeção por este fungo é causadora de cancro em ramos, descoloração das folhas, necrose vascular, entre outros (Barradas *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2017; Martin e Munck, 2017). Não se conhece ao certo qual a sua expansão global, contudo, existem relatos de perdas na população de diferentes espécies nos Estados Unidos, Itália e Portugal (Lynch *et al.*, 2010; Linaldeddu *et al.*, 2013; Barradas *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2017; Martin e Munck, 2017). Do ponto de vista do controlo da espécie, apenas se aplicam cuidados na altura da poda, na destruição de material infetado e na aplicação de fungicidas (Martin e Munck, 2017).

Para além do controlo direto de microrganismos fitopatogénicos através do uso de compostos adequados e/ou formulações com SH com efeito fungicida, também seria de enorme interesse avaliar o efeito promotor do crescimento de espécies mutualistas, que, assim, poderiam ter um papel no aumento da produtividade das culturas e da sua resistência a agentes patogénicos. Tendo já sido verificado que a aplicação mútua de microrganismos mutualistas e substâncias húmicas exerce uma influência muito positiva na produtividade de plantas (Schoebitz *et al.*, 2016; Ekin, 2019).

Penicillium citrinum é um fungo filamentosso endófitico distribuído mundialmente, capaz de produzir uma série de extrólitos (do inglês, *extrolits*), como micotoxinas, de entre as quais se destacam a citrinina, citrinadina, e a quinolactacina (Houbraken *et al.*, 2010). Estas micotoxinas podem ser importantes para o cultivo, já que podem, por exemplo, beneficiar rizobactérias como *Paenibacillus polymyxa* (Park *et al.*, 2008), plantas que crescem em solos áridos e sob stresse salino (Khan *et al.*, 2008; Leitão e Enguita, 2016) e na remediação de solos (Leitão, 2009).

1.5.3 – Oomicotas

Phytophthora cinnamomi é um oomicota muito parecido com os fungos e uma grande ameaça para diferentes espécies de grande importância económica a nível mundial (Cahill *et al.*, 2008;

Hardham e Blackman, 2017). O seu principal ponto de “ataque” são as raízes, que após sofrerem necrose, levam a uma incapacidade da planta em absorver água e nutrientes, causando eventualmente a morte da mesma (Jung *et al.*, 2013). A partir do sudeste asiático, considerado o centro de origem desta espécie, dispersou-se globalmente devido ao transporte de terra contaminada e restos vegetais infetados, estando agora distribuída e afetando mundialmente um enorme número de espécies, como por exemplo, pinheiro, carvalho, eucalipto e abacate (Ko *et al.*, 1978; Hardham, 2005; Jung *et al.*, 2013). O que torna este organismo especial e resistente em estratégias de combate a agentes patogénicos, reside numa das poucas características que os distingue dos fungos: a presença de uma parede celular de celulose e beta-glucanos, que torna ineficazes os fungicidas comumente usados no combate à parede de quitina dos fungos (Strange e Scott, 2005, Hardham, 2005). Esta ineficácia pode ter contribuído para que este agente patogénico tenha causado vastos danos económicos e ambientais em todo o mundo, algo que lhe concedeu um lugar nas 100 espécies invasoras mais nefastas do mundo, de acordo com a “Global Invasive Species Database” (GISD, 2019).

1.6 – Objetivos

Pelo exposto, torna-se evidente que a compostagem e as substâncias húmicas podem ter um papel importante numa gestão do sector agrícola, ao mesmo tempo mais racional e mais ecológica. Compostos com propriedades específicas, nomeadamente como fertilizantes, no biocontrolo de pragas e doenças e correção do solo, seriam de enorme valor, não só para o produtor/agricultor, já que conseguiria produzir mais e melhores produtos com redução de custos associados ao controlo de fitopatogénios; para o consumidor, que iria obter um alimento orgânico de elevada qualidade nutricional e seguro; e para a sociedade em geral, que iria beneficiar de uma alternativa ambiental e socialmente mais responsável, que as queimadas e a deposição em aterros na gestão de resíduos biológicos. Assim, foi objetivo deste trabalho de mestrado avaliar o efeito de diversos compostos orgânicos, assim como de extratos de substâncias húmicas obtidos a partir deles, ao nível da produção vegetal e do controlo de microrganismos.

Para isso, realizaram-se:

- ensaios de campo com diversos compostos em espécies com valor alimentar e económico, como a alface e o morangueiro, avaliando-se parâmetros de produtividade

(como o número de folhas e frutos, e a análise do sistema radicular), fisiológicos (como o conteúdo relativo em água e de pigmentos fotossintéticos) e de qualidade (exemplo do conteúdo em vitamina C e de antocianinas);

- ensaios complementares, em condições controladas *in vitro*, que permitiram estudar o efeito de extratos de substâncias húmicas em culturas de alface *in vitro*;
- ensaios microbianos com macerados dos compostos e extratos de substâncias húmicas, em que se avaliou a sua capacidade de inibição/promoção do crescimento de microrganismos com importância ambiental e económica, como *Phytophthora cinnamomi*, *Penicillium citrinum*, *Diplodia corticola*, *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola*.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Compostos orgânicos

Neste trabalho foram utilizados 4 fertilizantes diferentes – Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA), tendo sido usados diretamente, nos ensaios de campo, e para obtenção de extratos de substâncias húmicas e macerados, testados nos ensaios laboratoriais. Todos estes compostos são comerciais e apresentam uma origem 100% orgânica, diferindo na origem da matéria orgânica e no processo de compostagem.

O composto Resíduos urbanos é fabricado através de um sistema de compostagem aeróbica em túnel, com recolha seletiva de matéria orgânica proveniente de resíduos urbanos de cozinha, jardins, florestais, entre outros. O Guano, é um fertilizante orgânico de origem animal (maioritariamente esterco galináceo), sem recurso ao processo de compostagem. O Vermicomposto e o Composto de Algas, têm como fonte de matéria orgânica restos de frutos/algas e estrume de origem animal (40 e 60%, respetivamente), havendo diferença apenas no processo de compostagem. O CA sofre compostagem aeróbica, enquanto que, para a produção de VC, a matéria orgânica é vermicompostada (o principal agente decompositor são as minhocas). As principais características destes compostos encontram-se indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos compostos orgânicos utilizados ao nível de matéria orgânica, humidade, elementos químicos e rendimento de extração de substâncias húmicas. Valores de C, N, P, Mg, Na e K expressos em percentagem mássica (m/m). Relativamente à origem dos dados, os dados da caracterização do rendimento de extração foi feita na Universidade de Santiago de Compostela; e a restante caracterização dos compostos (percentagens de matéria orgânica, humidade, C, N, P, Mg, Na, K e ratio de C/N), corresponde à ficha técnica do respetivo composto.

Compostos	Mat. org. (%)	Humidade (%)	C/N	C (%)	N (%)	P (%)	Mg (%)	Na (%)	K (%)	Rendimento de extração (g/Kg)	
				m/m	m/m	m/m	m/m	m/m	m/m	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
<i>N</i>	57	22	10,4	28	2,4	1,3	0,5	9	2	21,09	3,52
<i>G</i>	58	21	8	33	4,1	3	0,3	4,1	0,3	53,63	10,9
<i>VC</i>	47	30	14	22	1,3	1,4	0,3	3,1	1,3	33,4	2,27
<i>CA</i>	37,5	35	12	21,8	1,8	1,7	0,4	2,3	1,8	19,87	2,7

2.1.1 – Extratos de substâncias húmicas e soluções aquosas de compostos

A partir dos 4 compostos foram preparados, pelos parceiros da Universidade de Santiago de Compostela (USC), 2 extratos de substâncias húmicas (SH): de ácidos húmicos (AH) e de ácidos fúlvicos (AF). Para os diferentes ensaios laboratoriais, preparou-se uma solução *stock* dissolvendo 5 mg destes extratos secos em 1 mL de solvente. Visto que os dois extratos (AH e AF) apresentam diferentes solubilidades (Stevenson, 1982), utilizou-se água desionizada para dissolver AF e uma solução aquosa de NaOH (0,1 M) para AH. Após adição de solvente, as soluções foram deixadas em agitação (350 rpm, Orbital Shaker SO1) durante a noite, tendo depois sido corrigido o pH para valores semelhantes aos dos meios de cultura usados para crescimento de plantas e microrganismos (pH entre 5,7-6,7). Posteriormente, e acautelando uma eventual presença de microrganismos, as soluções foram esterilizadas por autoclavagem (121 °C, 2 atm, 20 min). Este procedimento é seguro visto estar reportado que o impacto na composição e na estrutura das substâncias húmicas é mínimo (Kolokassidou *et al.*, 2007; Katsumi *et al.*, 2016). Além destes extratos de SH mais ou menos purificadas, de forma a poder estudar uma versão mais realista duma lixiviação do composto em ensaios *in vitro*, ou seja, uma solução *proxy* da resultante da aplicação de composto no campo, foram feitas macerações aquosas a partir dos 4 compostos. Assim, 50 g de cada composto foram misturados em 400 mL de água com agitação (100 rpm, Orbital Shaker 01) durante 3 dias, seguido de 2 dias sem agitação. Após filtração com uma peneira de chã e centrifugação (10 min, 6000 rpm, Sigma 4K10), o sobrenadante foi recolhido, constituindo a soluções aquosa de composto. A solução assim obtida (125 g/L) foi posteriormente diluída para 50 e 25 g/L, e todas foram usadas diretamente para a preparação dos meios de cultura para os ensaios.

2.2 – Material biológico

2.2.1 – Material vegetal

No que se refere aos dois ensaios de aplicação de composto e avaliação dos seus efeitos no desenvolvimento de plantas à escala de campo (realizados em 2018 e 2019), utilizaram-se como culturas de interesse agro-alimentar a alface (*Lactuca sativa* var. “Maravilha das 4 Estações”) e o

morangueiro (*Fragaria ananassa* var. “San Andreas”). No ensaio de 2018 o material vegetal foi obtido no Espaço Agrícola Corredoura (Recesinhos São Mamede, Penafiel) e no de 2019 no horto Brago (Braga). Em ambos os casos, foram adquiridos pés de cada planta (com raízes de 8 cm e 5 folhas), sendo estes depois transplantados para o campo de acordo com a planificação e desenho experimental, referido em baixo. Relativamente ao ensaio *in vitro* sobre o efeito das substâncias húmicas em culturas vegetais, a espécie em estudo foi a alface (*Lactuca sativa*) var. Batávia Loura (Casa César Santos, lote C18025).

2.2.2 – Microrganismos

Nos ensaios de avaliação do efeito das substâncias húmicas no crescimento de diferentes espécies de microrganismos, as espécies selecionadas devido às características previamente citadas encontram-se indicadas na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de microrganismos, e respetivos fornecedores, utilizados neste trabalho.

Microrganismos		Fornecidos por
Bactérias	<i>Xanthomonas arboricola</i> Estirpes: CBPF 426 e 1521	Fernando Tavares (Faculdade de Ciências da Universidade do Porto)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Departamento de Biologia da Universidade do Minho
Fungos	<i>Diplodia corticola</i>	Ana Cristina Esteves (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro)
	<i>Penicillium citrinum</i>	Departamento de Biologia da Universidade do Minho
Oomicotas	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Helena Machado (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária)

2.3 – Ensaios de campo: desenho experimental e parâmetros avaliados

A avaliação do efeito dos compostos em condições de campo foi efetuada em dois ensaios independentes, sendo um realizado em 2018 e outro em 2019 (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização do local, data, culturas vegetais e compostos orgânicos utilizados nos ensaios de campo de 2018 e 2019.

Ensaio de Campo	Local	Data	Culturas	Compostos			
				N	G	VC	CA
2018	Horta em Marco de Canavezes	julho - setembro	Alface Morango	X	X		
2019	Hortas comunitárias da Universidade do Minho	maio - junho	Alface	X	X	X	X

Com estes ensaios foi possível avaliar o efeito dos compostos nas espécies vegetais em diferentes dimensões relevantes: da produtividade das culturas e da fisiologia e da qualidade do produto comercial. Na Tabela 5 encontram-se os parâmetros avaliados para cada cultura em cada ensaio.

Tabela 5. Parâmetros avaliados nos ensaios de campo de 2018 e 2019. A presença do (x) representa a realização desse ensaio.

		Ensaio de campo 2018		Ensaio de campo 2019
		Alface	Morangueiro	Alface
Parâmetros de produtividade	Nº folhas	X		X
	Nº caules		X	
	Área foliar	X		X
	Biomassa aérea	X		X
	Nº frutos		X	
	Volume frutos		X	
	Análise morfológica raiz	X		X
Parâmetros fisiológicos	RWC	X		X
	AFE			X
	Teor pigmentos fotossintéticos	X		X
Parâmetros de qualidade	Teor vitamina C	X	X	X
	Teor antocianinas		X	X
	Tempo de prateleira		X	

Relative Water Content – RWC; Área foliar específica - AFE

2.3.1 – Desenho experimental e manutenção das culturas

Em ambos os ensaios, as culturas foram plantadas em solo agrícola, previamente utilizado em modo biológico, ao qual se adicionou previamente diferentes quantidades de composto, de acordo

com as Tabelas 6 e 7. As concentrações de composto testadas nos ensaios de 2018 e 2019 foram selecionadas, como se pode verificar, a partir de recomendações (das fichas técnicas e da opinião da Dra. Júlia Oliveira da Lipor) e das fichas técnicas de cada composto, respetivamente. O composto foi adicionado e misturado manualmente com o solo local, na área previamente determinada para cada *plot* (área de cultivo designada para cada condição, ou camalhão). Realizou-se um tipo de agricultura biológica sem recurso a pesticidas, outros fertilizantes ou aditivos. A manutenção das culturas foi feita, geralmente, com regas diárias e limpeza de ervas daninhas sempre que necessário.

Tabela 6. Resumo da aplicação de composto para o Ensaio de campo 2018. A quantidade de composto e substâncias húmicas adicionadas teve em consideração o uso de uma área de 0,9 m². A estimativa da quantidade de substâncias húmicas adicionadas foi baseada no rendimento de extração da Tabela 2.

Compostos	Dose de aplicação		Composto aplicado por <i>plot</i> (0,9 m²)	Substâncias húmicas aplicadas por <i>plot</i> (0,9 m²)	
	Recomendado (ton/ha)	Equivalente (Kg/m ²)		Ácidos húmicos (g)	Ácidos fúlvicos (g)
<i>N</i>	5 e 10	0,5 e 1	0,45 e 0,9	9,49 e 18,981	1,58 e 3,17
<i>G</i>	5	0,5	0,45	24,13	4,91

Tabela 7. Resumo técnico sobre doses de aplicação de composto para o Ensaio de campo 2019. A quantidade de composto e substâncias húmicas adicionadas teve em consideração o uso de uma área de 0,525 m². A estimativa da quantidade de substâncias húmicas adicionadas foi baseada no rendimento de extração da Tabela 2.

Compostos	Dose de aplicação		Composto aplicado por <i>plot</i> (0,525 m²)	Substâncias húmicas adicionadas por <i>plot</i> (0,525 m²)	
	Ficha técnica	Equivalente (Kg/m ²)		Ácidos húmicos (g)	Ácidos fúlvicos (g)
<i>N</i>	25 e 50 L/100 m ²	0,15 e 0,35	0,079 e 0,18	1,67 e 3,8	0,28 e 0,63
<i>G</i>	3000 e 5000 kg/ha	0,3 e 0,5	0,16 e 0,26	8,58 e 13,94	1,74 e 2,83
<i>VC</i>	5 L/m ²	1,53	0,8	26,72	1,82
<i>CA</i>	40 L /20 m ²	2,55	1,34	26,63	3,62

O desenho experimental relativo ao ensaio de campo de 2018 encontra-se representado na Figura 3. Para cada uma das espécies e condição experimental, 12 pés (réplicas) foram plantados em camalhões com cerca de 30 cm de altura e 0,9 m², tendo-se usado um espaçamento entre pés de 30 cm e para a margem de 15 cm. Neste ensaio testaram-se para N, duas concentrações informalmente recomendadas, 5 e 10 ton/ha, e 5 ton/ha para G.

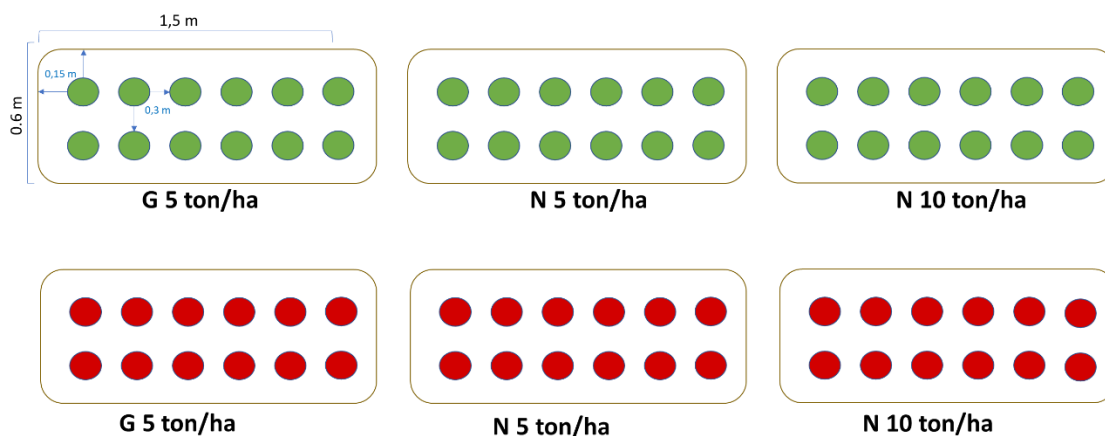


Figura 3. Desenho experimental do ensaio de campo 2018, encontrando-se representados a verde as alfaces e a vermelho os morangueiros. Os 2 compostos em estudo estão representados por N e G (Resíduos urbanos e Guano, respetivamente), seguidos das respetivas concentrações. Existe para cada condição um espaço total de 0,9 m², espaçamento entre pés de 0,3 m e para a margem de 0,15 m.

O ensaio de campo de 2019 foi realizado nas hortas comunitárias da Universidade do Minho, ocupando uma área total de aproximadamente 25 m², usando apenas a alface. O desenho experimental encontra-se ilustrado na Figura 4. Como se pode observar, neste ensaio foi possível fazer, para cada condição experimental, dois *plots* independentes (camalhões de 0,525 m²), cada um com 5 alfaces (réplicas), num total de 10 alfaces por condição. Os vários *plots* foram distribuídos aleatoriamente pela área disponível de modo a acomodar possíveis heterogeneidades no terreno (exposição à luz, estrutura do solo, temperatura, teor em água, etc). Neste ensaio foi introduzida uma condição controlo, em que as alfaces foram plantadas em camalhões de solo igualmente manipulado, mas sem adição de qualquer fertilizante, tendo-se preparado 3 *plots*. De forma a evitar “efeitos de bordadura” (as plantas no perímetro externo do ensaio estão mais sujeitas a danos e fatores não controlados), foi ainda plantada uma linha de alfaces nos limites exteriores, alfaces essas que não foram usadas para análise. A distribuição dos 15 *plots* no terreno, bem como os espaçamentos definidos, podem ser observados na Figura 4.

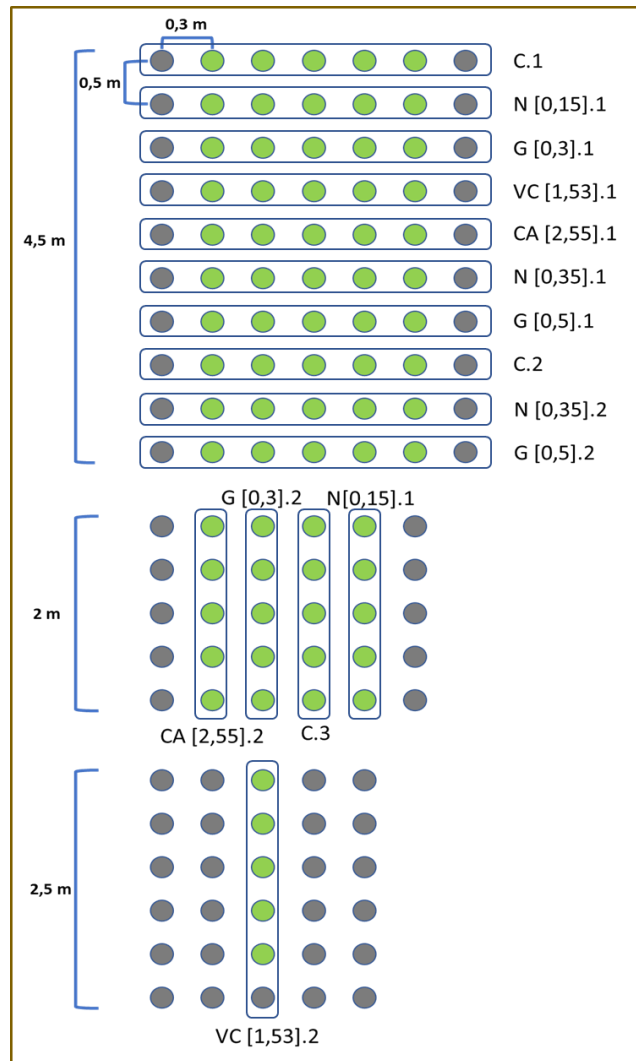


Figura 4. Desenho experimental do ensaio de campo 2019, encontrando-se representadas a verde as alfaces utilizadas no ensaio e a cinzento as alfaces de bordadura. Os 4 compostos e o controlo estão representados por N, G, VC, CA e C (Resíduos urbanos, Guano, Vermicomposto, Composto de Algas e Controlo, respetivamente), com as respetivas concentrações entre parêntesis retos, expressas em Kg/m², seguido do número do plot (.1 ou .2). Existe no espaço total de 25 m², espaçamento entre *plots* de 0,5 m e entre alfaces da mesma condição de 0,3 m.

2.3.2 – Parâmetros de produtividade

2.3.2.1 – Número de folhas (alface)

No decorrer de ambos os ensaios foram contabilizadas, semanalmente, todas as folhas de alfaces selecionadas. Durante o ensaio de 2018 amostraram-se as 12 réplicas por condição, e no de 2019 a amostragem consistiu em 3 réplicas por *plot* (i.e., 6 alfaces por condição e 9 para o controlo).

2.3.2.2 – Biomassa da parte aérea (alface)

No final de ambos os ensaios, as alfaces inteiras foram recolhidas, com cuidado para não se danificar o sistema radicular, e trazidas rapidamente para o laboratório, acondicionadas em sacos plástico. Aqui procedeu-se à separação da parte aérea da radicular e imediatamente à pesagem da

parte aérea. Após remoção de solo, as raízes foram lavadas e o excesso de água retirado com papel absorvente antes de posterior processamento. A amostragem consistiu em 5 alfaces no ensaio 2018 e 6 no ensaio 2019.

2.3.2.3 – Área foliar (alface)

No ensaio de 2018, a área foliar seguida foi a da folha de maiores dimensões, sendo esta área determinada pelo método do peso da silhueta. Este método faz uso do peso da silhueta da folha em papel, e do peso de um recorte do mesmo papel com uma área conhecida, sendo a área da folha de alface calculada por proporcionalidade. No ensaio de 2019, a área de todas as folhas das alfaces amostras foi determinada de modo a calcular a área foliar total. Neste ensaio, este parâmetro foi determinado através da reta de correlação (Figura 5) obtida entre o produto do comprimento e largura máximas da folha (CxL, cm²), e a área foliar da respetiva folha. Neste caso, a área foliar foi calculada, assim como em 2018, pelo método do peso da silhueta. Para o estabelecimento daquela reta de correlação entre as variáveis, 116 folhas de alface de dimensões distintas foram usadas (Figura 5). Assim, com a obtenção da equação da reta de correlação, as amostragens semanais neste ensaio foram não destrutivas, tendo sido apenas medido no terreno o comprimento e largura de todas as folhas das alfaces seleccionadas.

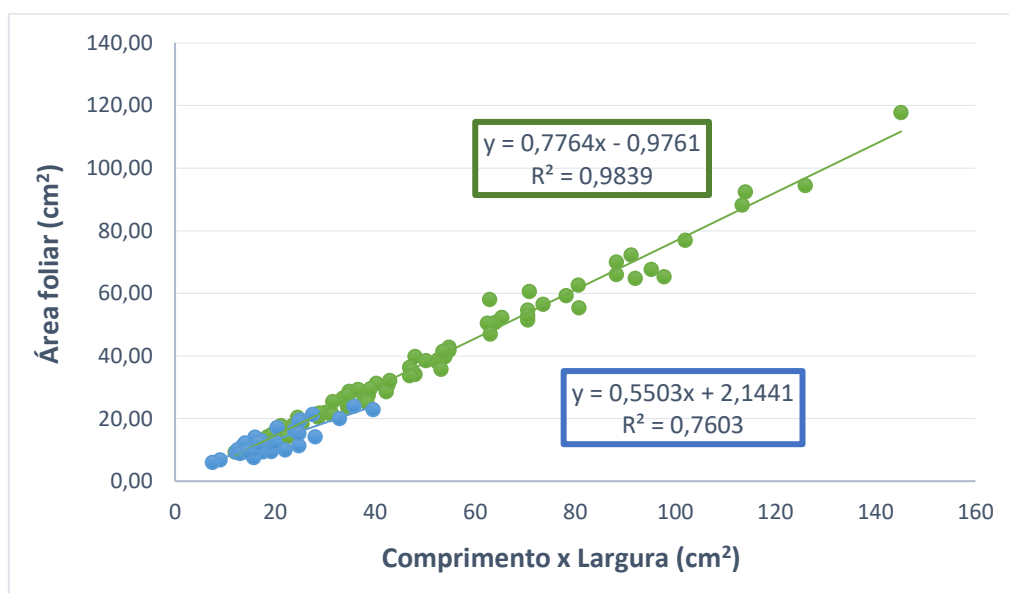


Figura 5. Correlações entre o comprimento x largura máximas de folhas de alface e respetiva área foliar obtidas a partir de recolhas de folhas de alface no campo em fases de desenvolvimento distintas: a azul, numa fase de desenvolvimento inicial, com 44 amostras e, a verde, numa fase de desenvolvimento mais avançada, com 72 amostras.

2.3.2.4 – Análise do sistema radicular (alface)

Após limpeza das raízes, como atrás referido, procedeu-se à análise do sistema radicular e medição de vários parâmetros de crescimento, do seguinte modo:

- **Peso fresco e seco da raiz:** a parte radicular foi pesada (peso húmido) e, posteriormente, colocada a secar numa estufa a 60 °C até peso constante (peso seco).
- **Comprimento da raiz:** a medição foi feita do colo até ao ápice da raiz mais comprida.
- **N^o raízes por classe de calibre:** após identificar os 3 principais calibres de raiz encontrados, raízes finas, intermédias e grossas (Figura 6), o número de raízes foi contabilizado.

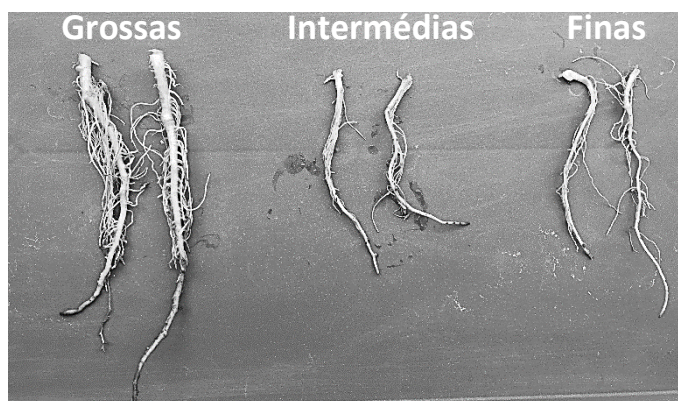


Figura 6. Exemplos representativos dos três calibres maioritariamente encontrados de raízes de alface (grosso, intermédio e fino).

2.3.2.5 – Número de frutos e volume (morangueiro)

O número de frutos foi contabilizado, semanalmente, nos 12 pés de morangueiros de cada condição. Uma vez atingida a fase de maturação ideal para colheita e consumo, os morangos maduros foram recolhidos, geralmente diariamente, e o seu volume determinado através do método de deslocação de água em proveta graduada ao mL. Seguidamente, os morangos foram congelados (-20 °C) até posterior análise.

2.3.3 – Parâmetros fisiológicos (alface)

2.3.3.1 – Conteúdo relativo em água

O conteúdo relativo em água (RWC) das folhas de alface foi determinado segundo o método descrito por Barr e Weatherley (1962), com algumas otimizações a nível do tempo de incubação para obtenção de peso túrgido. No final do ensaio de 2018, e na terceira e quinta semana do ensaio de 2019, com o auxílio de um furador ($\varnothing=11$ mm), removeram-se discos do limbo de zonas análogas de diferentes folhas de alface, preparando 4 réplicas no ensaio de 2018 e 6 réplicas no ensaio de 2019. Os discos foram imediatamente colocados em microtubos Eppendorf pré-pesados (1 disco por microtubo), que foram acondicionados em sacos térmicos e transportados para o laboratório onde se determinou o peso fresco do material biológico (FW). De seguida, os discos foram submersos em água desionizada durante 3 horas e, após remoção de excesso de água superficial com papel absorvente, foi determinado o peso túrgido à máxima hidratação (TW). Estes discos foram depois colocados em estufa a 60 °C durante 24 h e determinado o peso seco (DW). O conteúdo relativo em água do material biológico (RWC) foi calculado através da Equação 1:

$$\text{RWC \%} = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

2.3.3.2 – Área Foliar Específica

Na medição da área foliar específica (AFE), foram utilizados os valores da área de cada disco (0,9503 cm²) e do respetivo peso seco (DW), e procedeu-se ao cálculo da área foliar específica de acordo com a Equação 2.

$$\text{AFE (cm}^2\text{/g)} = \text{Área do disco} / \text{Peso seco do disco (DW)} \quad \text{Equação 2}$$

2.3.3.3 – Teor de pigmentos fotossintéticos

A concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides de folhas de alface foi determinada de acordo com Lichtenthaler (1987). Discos foliares foram recolhidos com auxílio de um furador ($\varnothing = 7$ mm), como acima descrito. No ensaio de 2018, e para cada condição, foram recolhidos 2 discos por alface em 5 réplicas. No de 2019, recolheu-se apenas em 1 disco em 3 réplicas por *plot*, perfazendo um total de 6 réplicas por condição. Após medição do peso fresco (FW), adicionou-se 1500 μ l de uma solução de acetona a 80% (Honeywell, AnalaR Normapur), deixando-se a extrair por 24 h ao abrigo da luz. Após este período de tempo, o sobrenadante foi recolhido para uma

cuvete de vidro e lida a absorvância (A) a 470, 646,8 e 663,2 nm (Spectronic Genesys 20). A concentração dos pigmentos, expressa em µg/mL, foi calculada de acordo com as Equações 3, 4, 5 e 6 (Lichtenthaler, 1987).

$$Ca = \text{concentração Chl. a} = (12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}) \quad \text{Equação 3}$$

$$Cb = \text{concentração Chl. b} = (21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}) \quad \text{Equação 4}$$

$$Ca+b = \text{concentração de clorofilas totais} = (7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}) \quad \text{Equação 5}$$

$$Cx+c = \text{concentração de carotenóides} = (1000 A_{470} - 1,82 Ca - 85,02 Cb)/198 \quad \text{Equação 6}$$

2.3.4 – Parâmetros de qualidade (alface e morango)

2.3.4.1 – Teor de vitamina C

A metodologia utilizada para determinação do teor em vitamina C em morangos e alfaces (congelados no caso do ensaio de 2018) foi baseada no trabalho de Elgailani e colaboradores (2017). No caso do morango, utilizaram-se 30 g de fruto, tendo-se preparado 3 réplicas por condição experimental. Depois de triturar num liquidificador com 60 mL de ácido oxálico (0,5 %; Merck, p.a, 99,5%), o homogeneizado foi filtrado com 4 camadas de gaze e centrifugado a 2500 rpm, 4 °C, 5 min (Centrifuge 5804R). Recolhido o sobrenadante, diluiu-se 1 mL em 100 mL de água desionizada.

Relativamente à alface, utilizaram-se 3 g de folhas, tendo-se preparado 3 réplicas por condição (ensaio 2018) ou 4 réplicas (2 por *plot*, ensaio 2019). O material foi depois homogeneizado em almofariz (ensaio 2018) ou liquidificador (ensaio 2019) com 7,5 mL de ácido oxálico (0,5 %). De igual modo, o homogeneizado foi filtrado com 4 camadas de gaze e centrifugado nas condições acima descritas. Recolhido o sobrenadante, diluiu-se 1 mL em 25 mL de água desionizada.

Para o estabelecimento da curva de calibração de ácido ascórbico, foram preparadas soluções de de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL em ácido oxálico (0,5 %), a partir de uma solução *stock* de 1 mg de ácido ascórbico em 1 mL de ácido oxálico 0,5 %.

De todas as diluições preparadas (padrões e amostras) foram retirados 10 mL para tubos de ensaios e adicionados 1 mL de KMnO₄ 0.1M. O branco consistiu em 10 mL de solução de ácido oxálico com 1 mL de KMnO₄ 0.1M. Após a adição de KMnO₄ aguardaram-se 2 min e mediu-se a absorvância a 530 nm. Após terem sido determinadas todas as D.O's, retiraram-se ao branco os

valores obtidos pelas diluições das condições, e o teor de vitamina C foi determinado através da respectiva equação da curva de calibração.

2.3.4.2 – Teor de antocianinas

A metodologia utilizada para determinação do teor em antocianinas em morangos e alfaces foi baseada nos trabalhos de Prior e colaboradores (1998), Lee e colaboradores (2005) e Giusti e Wrolstad (2001). No ensaio de 2018, os morangos foram inicialmente descongelados, tendo sido feitas 3 réplicas por condição. Quinze gramas de morangos foram homogeneizados num liquidificador com 22,5 mL de acetonitrilo (Merck, 99,8%), com 4% de ácido acético (Honeywell, 99,8%). O homogeneizado foi depois mantido sob agitação durante 30 min e posteriormente centrifugado (5000 rpm, 15 min, 4 °C).

No ensaio de 2019, utilizaram-se folhas de alfaces recém colhidas, tendo-se preparado 2 réplicas por *plot* (4 por condição). Assim, 3 g de folhas de alfaces foram homogeneizadas em liquidificador em 10 mL de acetonitrilo com 4 % de ácido acético e, posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado nas condições acima descritas e recolhido o sobrenadante. Prepararam-se seguidamente duas sub-amostras: num tubo de polipropileno 1 foi adicionado 1 mL de sobrenadante e 6 mL de solução de cloreto de potássio 0,025 M a pH 1, e num tubo de polipropileno 2, adicionou-se igualmente 1 mL de sobrenadante e 6 mL da solução tampão de acetato de sódio 0,4 M de pH 4,5. Após 20 Min, as absorvâncias das sub-amostras foram lidas a 510 e a 700 nm, tendo-se usado como branco acetonitrilo com 4 % de ácido acético. O cálculo da concentração de antocianinas foi feito segundo Giusti e Wrolstad (2001) e Tonutare e colaboradores (2014) através das Equações 7 e 8, em que A corresponde à absorvância; MW, ao peso molecular, DF, ao fator de diluição e ϵ ao coeficiente de extinção molar. Tendo em consideração que a antocianina mais presente em alface é a C3g (cianidina-3-glicósido) e no morango é a P3g (pelargonidina-3-glicósido) (Horbowicz *et al.*, 2008)

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}$$

Equação 7

$$\text{Pigmento monomérico de antocianina (mg/L)} = (A \times Mw \times DF \times 1000) / (\epsilon \times L)$$

Equação 8

2.3.4.3 – Tempo de prateleira

Um ensaio preliminar para avaliar o impacto dos tratamentos com composto no tempo de prateleira (do inglês *shelf-life*) dos frutos, em particular, no aparecimento de contaminação microbiana, foi realizado com morangos frescos colhidos em 2018. Neste ensaio prepararam-se

3 réplicas por condição experimental, cada uma com 3 morangos. Sendo feitas observações visuais e registo fotográfico diariamente. Para avaliar o efeito da temperatura, um lote foi mantido à temperatura ambiente do laboratório (ca. 21 °C) e outro à temperatura geralmente usada para armazenamento/acondicionamento (6 °C). Numa segunda abordagem, para acelerar o surgimento da resposta, um lote de morangos foi sujeito a pequenas incisões superficiais, mantendo-se um lote sem incisões, sendo ambos, posteriormente, mantidos à temperatura ambiente de laboratório (ca. 21 °C) durante 4 dias.

2.4 – Avaliação do efeito das substâncias húmicas em culturas vegetais e microbianas *in vitro*

De forma a estudar o efeito das substâncias húmicas e dos macerados extraídos dos compostos orgânicos em estudo em condições controladas, avaliou-se o seu efeito na germinação e crescimento de culturas *in vitro* de alface, mas também se analisou o seu potencial microbiano, nomeadamente, o antimicrobiano contra espécies patogénicas e o promotor do crescimento em espécies mutualistas.

2.4.1 – Efeito em culturas *in vitro* de alface

Neste ensaio, utilizou-se a variedade Batávia loura por ter uma germinação e um crescimento mais rápido *in vitro* do que a variedade utilizada nos ensaios de campo (informação pessoal de Patrícia Cruz), permitindo assim realizar mais ensaios e produzir resultados mais rápidos. As substâncias húmicas (SH) testadas foram: AH, AF (apenas do composto CA) e AH+AF (1:1), dos 4 compostos (VC, CA, N e G), sendo testadas concentrações de 500, 1000 e 1500 µg/mL. Para isto, diferentes volumes de extratos de SH de uma solução stock (5 mg/mL) foram incorporados em meio MS líquido para formar as concentrações supracitadas num volume final de 15 mL (Murashige e Skoog, 1962). Meio MS este, previamente preparado (sacarose 2% (p/v), agar 0,8% (p/v), pH 5,7) e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 2 atm, 20 min) e mantido líquido em estufa a 50 °C, para que não arrefecesse e solidificasse. Para avaliar efeito do solvente, prepararam-se dois controlos: um só com meio de cultura e outro ao qual se adicionou um volume de solvente (NaOH 0,1 M para AH e AH+AF) igual ao usado na adição dos extratos a maior concentração. Foram preparados 4 frascos de cultura (réplicas) para cada concentração.

Posteriormente, sementes de alface foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 5% (p/v; Panreac), em agitação, durante 20 Min e, de seguida lavadas 3 vezes com água desionizada estéril. Após serem colocadas 6 sementes por frasco de cultura em câmara de fluxo, os frascos foram colocados na sala de culturas *in vitro*, sob condições de temperatura e luz controladas (23 °C, 16 h de fotoperíodo com intensidade luminosa de 45-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Diariamente foram registados vários parâmetros por inspeção visual: número de plântulas germinadas, estado de desenvolvimento do ápice caulinar e número de folhas expandidas. Após 11 dias finalizou-se o estudo com uma amostragem destrutiva, onde foram medidos os comprimentos da raiz, do pecíolo e do limbo das folhas.

2.4.2 – Efeito sobre crescimento de microrganismos: efeito promotor e antimicrobiano

2.4.2.1 – Efeito sobre proliferação de fungos

Neste ensaio foi avaliado o efeito dos extratos de SH e dos macerados aquosos dos compostos no crescimento de culturas de microrganismos filamentosos *P. cinnamomi*, *D. corticola* e *P. citrinum*, tendo-se utilizado o método *Poisoned Food*. Previamente aos ensaios, estes organismos filamentosos foram cultivados em placas de petri com meio Potato-Glucose-Agar (PGA, Sigma-Aldrich) (39 g/L) e armazenados numa incubadora (Orbital Incubator SI50) a 25 °C. Após terem sido preparadas as soluções com os extratos de SH, estas foram incorporados em diferentes volumes em meio PGA para formarem as concentrações desejadas (250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), num volume final de 20 mL. Foram testadas as capacidades antifúngicas de AF, de AH e de AF+AH, em volumes iguais (1:1).

Relativamente ao efeito das macerações, as soluções de 50 g/L e 25 g/L preparadas a partir dos compostos, foram utilizadas diretamente na preparação do meio de cultura com PGA. Sendo também estabelecido um controlo com PGA em água desionizada. Devido à eventual carga bacteriana presente nos extratos e nos macerados, todos os meios foram posteriormente autoclavados nas condições acima descritas, e dispensados em caixas de Petri de 9 cm.

A partir de culturas fúngicas *stock* mantidas a 4° C, um disco ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) de micélio foi colocado no centro da placa de Petri como indicado na Figura 7, tendo-se preparado 3 réplicas independentes para cada condição experimental. Todos os discos foram retirados à mesma distância relativamente ao centro das placas *stock*, para que a idade e estado de desenvolvimento do micélio de cada espécie estudada seja o mais próxima possível. Foram igualmente utilizados

dois controlos, um com o volume de NaOH 0,1 M igual ao usado para adicionar às condições de extrato à concentração maior, e outro apenas com meio de cultura. As placas foram mantidas em condições controladas, no escuro e a 25 °C.

O crescimento do fungo foi avaliado diariamente, medindo os 4 raios (formados pela interceção de 2 eixos) ocupados pela colónia em eixos X e Y perpendiculares e calculando o diâmetro médio. Para uma análise quantitativa do crescimento e dos efeitos inibitórios dos extratos, calculou-se o índice de crescimento e a % de inibição de acordo com a Equação 9 e 10, respetivamente, onde Dc corresponde ao diâmetro do micélio da placa controlo e Ds ao diâmetro do micélio da placa com extrato; valores estes comparados diariamente.

$$\text{Índice de crescimento} = (D_s/D_c) * 100 - 100$$

Equação 9

$$\% \text{ de inibição} = ((D_c - D_s)/D_c) * 100$$

Equação 10

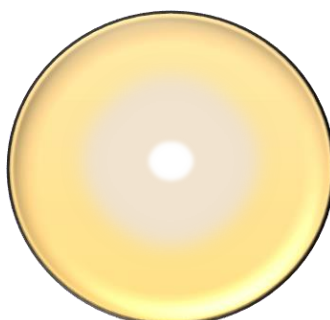


Figura 7. Exemplificação de uma placa com crescimento de um fungo. A metodologia usada para a medição do crescimento do micélio consistiu na medição deste em dois eixos perpendiculares (x e y), sendo estes usados para o cálculo de um diâmetro médio.

Adicionalmente, de forma a analisar se as gerações seguintes seriam influenciadas pelo meio com extratos húmicos em que a geração original cresceu, foi retirado um inóculo de cada condição e posto a crescer em meio PGA; sendo depois acompanhado o crescimento do micélio desta nova cultura. Além disto, também a olho nu foi avaliada a densidade do micélio.

2.4.2.2 – Capacidade antibacteriana

Com o intuito de avaliar o efeito dos extratos húmicos no crescimento de culturas de bactérias das espécies *Xanthomonas arboricola* e *Salmonella typhimurium*, procedeu-se, assim como no ensaio dos fungos, à incorporação destes ácidos a diferentes concentrações no meio onde os

microrganismos foram depois postos a cultivar. As culturas, cresceram e foram mantidas em placas de petri com meio Luria Bertani (LB) (25 g/L, Agar 2%) numa estufa (Heraus) a 30 °C, sendo depois preservadas a 4 °C. À exceção de *X. arboricola*, cujo crescimento inicial foi feito em meio yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC) (extrato levedura 1%, D(+)-glucose anidra 2%, carbonato de cálcio 2%, e agar 1,5%). Posto isto, foram depois contabilizadas as colónias presentes em cada condição e controlo para determinar a percentagem de inibição.

Inicialmente, um pré-inóculo foi preparado misturando uma ansa de cultura *stock* em 5 mL de meio LB líquido, num tubo de polipropileno, e mantido em agitação (200 rpm, Certomat BS 3) a 30 °C, durante a noite. No dia seguinte, a absorvância foi lida a 600 nm e, num tubo de polipropileno novo, preparada uma mistura com meio LB fresco acertando para uma absorvância (a 600 nm) de cerca de 0,1. Quando esta nova amostra atingiu os 0,4 (fase exponencial) foi colocada em gelo sendo posteriormente preparada uma diluição seriada até 10⁻⁶ com água. Após isto, foram pipetados 20 µL destas diluições para placas de meio LB sólido com AH e SH (250, 500, 750, ou 1000 µ/mL) e para placas controlo (só meio LB, ou meio LB com solvente). A Figura 8 representa um exemplo de disposição de inóculos em placa de Petri. As culturas foram posteriormente cultivadas a 30 °C ao abrigo da luz e, após 48 h, foi contado o número de colónias, de forma a determinar-se a percentagem de inibição comparativamente com o controlo, utilizando-se a Equação 11 (com o número de colónias presente nas placas controlo e nas placas com extrato).

% inibição = ((N° Colónias no controlo - N° colónias com extrato) / N° Colónias no controlo) *100

Equação 11

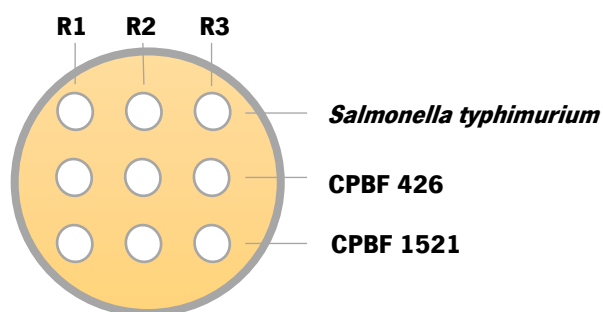


Figura 8. Representação exemplificativa de uma placa do ensaio antibacteriano. Os círculos brancos representam as gotas de inóculo de suspensão bacteriana. As colunas representam as réplicas (total de 3) e as linhas representam inóculos de suspensões de diferentes espécies (*Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola* (estirpes CPBF 426 e 1521)).

2.5 – Questionário

Paralelamente, e de forma a avaliar as perceções do público sobre compostagem e agricultura em modo orgânico em Portugal, bem como a valorização de produtos oriundos deste tipo de agricultura, foi elaborado e aplicado um questionário recorrendo à plataforma Google Forms. O Formulário encontra-se em anexo (Apêndice 1), tendo este sido distribuído por email e respondido voluntariamente.

2.6 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao Graphpad Prism versão 6 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Verificadas a distribuição normal e variância igual das variáveis (teste Bartlett), os dados foram analisados correndo os testes one-way (quando analisada apenas uma variável) ou two-way ANOVA (quando comparadas duas variáveis). Sempre que o efeito dos fatores foi significativo procedeu-se a uma análise *post-hoc* de comparações múltiplas (Tukey). Os resultados estatísticos foram identificados por letras, sendo que valores médios com letras diferentes são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$).

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Avaliação do efeito de compostos orgânicos em ensaio de campo

De forma a avaliar o efeito dos 4 compostos estudados nas duas culturas vegetais de relevância alimentar e económica seleccionadas - alface e morangueiro - foram realizados dois ensaios de campo, em 2018 e 2019. Nestes ensaios, e assim como especificado na Tabela 5, foram avaliados parâmetros de produtividade, fisiológicos e de qualidade nestes vegetais.

No primeiro ensaio (2018) foi avaliado o efeito dos compostos Guano à concentração de 5 ton/ha (G5) e Resíduos urbanos a concentrações de 5 ton/ha e 10 ton/ha (N5 e N10, respetivamente) em alfaces e morangueiros, ao longo de 6 e 11 semanas respetivamente. Já em 2019 foi avaliado à escala de campo o possível efeito em diversos parâmetros do uso dos compostos Resíduos urbanos a concentrações de 0,15 e 0,35 Kg/m² (N0,15 e N0,35), Guano a concentrações de 0,3 e 0,5 Kg/m² (G0,3 e G0,5), Vermicomposto à concentração 1,53 Kg/m² (VC1,53) e Composto de Algas a 2,55 kg/m² (CA 2,55), em alfaces ao longo de 6 semanas.

3.1.1 – Produtividade de alface e morango em 2018 e 2019

Tendo em consideração que, no caso da alface, o valor económico da cultura reside na parte vegetativa e, no caso do morangueiro, reside no fruto, para avaliar o efeito no desenvolvimento e produtividade das alfaces determinou-se o número de folhas, a área foliar, a biomassa da parte aérea, analisando-se ainda o sistema radicular; e para avaliar o efeito nos morangueiros determinou-se o número e o volume dos frutos. Estes critérios foram definidos tendo em consideração os componentes de produtividade e qualidade mais importantes para o agricultor e o consumidor; e também outros estudos semelhantes onde também se avaliem efeitos de compostos na produtividade destas duas espécies (Ayesha *et al.*, 2011; Cabilovski *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2014; Hossain e Ryu, 2018).

3.1.1.1 – Ensaio 2018

Na Figura 9 podemos ver o efeito dos compostos G e N na produtividade aérea da alface. No que diz respeito aos compostos, podemos verificar que, de uma forma geral, as plantas que crescem sob efeito do composto N, apresentaram uma maior produtividade que as crescidas com G (Figura

9). Relativamente ao número de folhas verificam-se diferenças entre as condições N10 e G5 no final das 6 semanas (Figura 9.A). Quanto à biomassa fresca e seca, as plantas tratadas com N, em qualquer das concentrações testadas apresentam valores significativamente mais elevados que as alfaces tratadas com G a 5 ton/ha (Figura 9.B). De modo semelhante, alfaces crescidas com composto N a 5 ton/ha, apresentaram folhas de maiores dimensões (171 cm²) comparativamente a alfaces crescidas com G a 5 ton/h com (116 cm²) (Figura 9.C). Relativamente ao efeito da concentração, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos de N com 5 e 10 ton/ha no que se refere a estes parâmetros de produtividade.

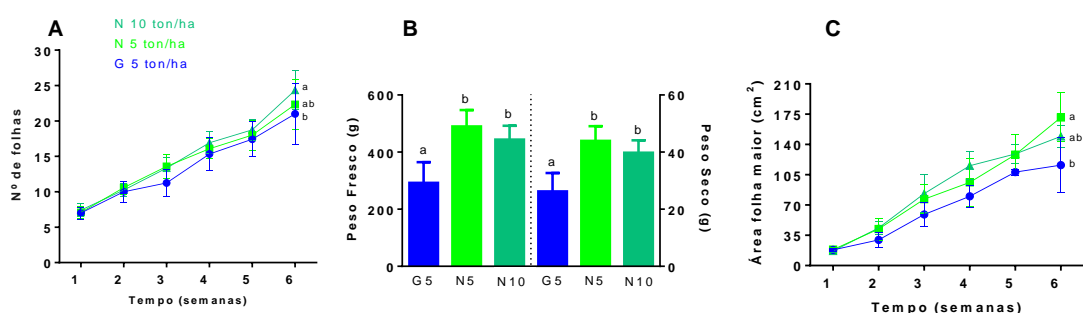


Figura 9. Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N), a concentrações de 5 e 10 ton/ha, nos parâmetros de produtividade: número de folhas (A), biomassa da parte aérea (B) e área foliar da maior folha (C) da alface no ensaio de 2018. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Estes resultados vão de encontro aos reportados por Moreira e colegas (2014), no qual diferentes fertilizantes orgânicos apresentaram diferentes efeitos na produção de alface e, em que o fertilizante com origem na compostagem apresentou melhores resultados que fertilizantes provenientes de esterco animal (caso do composto G) no que diz respeito ao tamanho e número de folhas e biomassa da parte aérea e da radicular (Moreira *et al.*, 2014).

Os resultados aqui obtidos não podem ser explicados por diferenças no teor de substâncias húmicas dado que o composto G apresenta maior quantidade de SH que N (Tabela 2) e, por outro lado, não houve diferenças significativas quando se aumentou a quantidade aplicada do composto N de 5 para 10 ton/ha (Figura 9). Este resultado foi também observado por Hossain e Ryu (2018). Dado que alguns dos restantes componentes dos compostos (como a percentagem em N, P, Na e K) (Tabela 2) também são aparentemente diferentes, resta-nos deduzir que o efeito presente se deve à qualidade da matéria orgânica em questão, ou a outros fatores não determinados. Pode também colocar-se a hipótese, do composto ter tido um efeito no crescimento da raiz promovendo,

assim, o melhor desenvolvimento da parte aérea das alfaces. Seria também interessante verificar o efeito dos compostos nas características do solo, não só em termos químicos, como o conteúdo de nitrogénio e pH; mas também físicos, tais como temperatura e a capacidade em retenção de água; e em termos de populações microbianas, com presença ou ausência de espécies patogénicas e mutualistas, tal como realizado por Hossain e Ryu (2018) e Moreira e colaboradores (2014).

No caso do morangueiro, o número (Figura 10.A e 10.B) e o volume dos de frutos (Figura 10.C) foram os parâmetros de produtividade avaliados semanalmente durante 11 semanas. Durante o período de ensaio, aparentam haver diferenças na produção semanal de morangos entre os morangueiros cultivados com composto N e com o composto G (Figura 10.A). Algo que se salienta na média de morangos produzidos por semana, que é significativamente maior em morangueiros crescidos com composto N (Figura 10.B), tendo havido uma produção total de 315 morangos nos morangueiros crescidos com N5, 294 nos crescidos com N10 e 200 nos crescidos G5. Não se verificaram, contudo, diferenças no volume dos frutos (Figura 10.C).

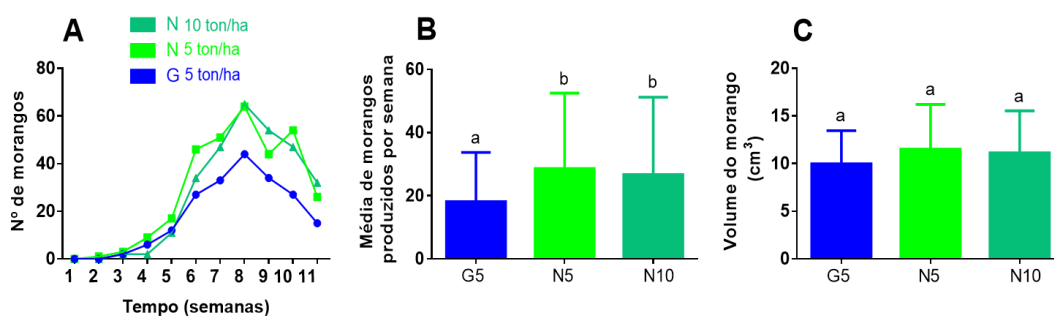


Figura 10. Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N), a concentrações de 5 e 10 ton/ha, nos parâmetros de produtividade: número de morangos produzidos semanalmente (A); a média de morangos produzidos por semana (B); e o volume do fruto em cm³ (C) do morangueiro no ensaio de 2018. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 11$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Estes resultados podem ter, certamente, um enorme valor prático e económico para um produtor. Fazer uma escolha racional do composto, bem como da quantidade adequada a aplicar, poderá significar aumentos de produtividade bastante relevantes. Por exemplo, se um produtor de morangos utilizasse normalmente o composto G a 5 ton/ha e produzisse em média cerca de 1000 morangos anualmente, ao mudar para o composto N a 5 ton/ha produziria 1575 morangos, ou seja, um aumento de cerca de 50 % na produção. Também na literatura este tipo de efeito foi verificado. Ayesha e colaboradores (2011), verificaram que fertilizantes orgânicos de origem

vegetal promovem maior produtividade em morangueiros, em termos de número de frutos gerados, que fertilizantes orgânicos de origem animal (Ayesha *et al.*, 2011). A origem destas diferenças pode basear-se, como no caso da alface, da qualidade do composto em questão, cuja presença pode afetar propriedades químicas, físicas e biológicas do solo a curto e a longo prazo, tendo isso depois impacto na produtividade dos morangueiros (Reganold, *et al.*, 2010; Cabilovski *et al.*, 2014; Pokhrel *et al.*, 2015).

3.1.1.2 – Ensaio 2019

Neste ensaio, o efeito dos compostos Resíduos urbanos a concentrações de 0,15 e 0,35 Kg/m² (N0,15 e N0,35), Guano a concentrações de 0,3 e 0,5 Kg/m² (G0,3 e G0,5), Vermicomposto à concentração 1,53 Kg/m² (VC1,53) e Composto de Algas a 2,55 kg/m² (CA 2,55) foi avaliado determinando o número de folhas e biomassa da parte aérea (Figura 11), mas agora também a área foliar total (Figura 12) e analisando o sistema radicular (Figura 13). O número de folhas aumentou todas as semanas, em todas as condições, destacando-se as alfaces que cresceram com CA2,55 a partir da terceira semana (Figura 11.A). No final do ensaio (sexta semana), contudo, as alfaces CA2,55, tal como as G0,5, apenas mostraram um número médio de folhas significativamente superior às crescidas na condição controlo ou com VC1,53 (Figura 11.B). Relativamente à biomassa fresca da parte aérea, também as alfaces crescidas em CA2,55 e G0,5 se distinguiram significativamente das restantes, contudo, para este parâmetro, as primeiras apresentaram cerca do dobro da massa das segundas (189,6 g *vs* 96,6 g) (Figura 11.C).

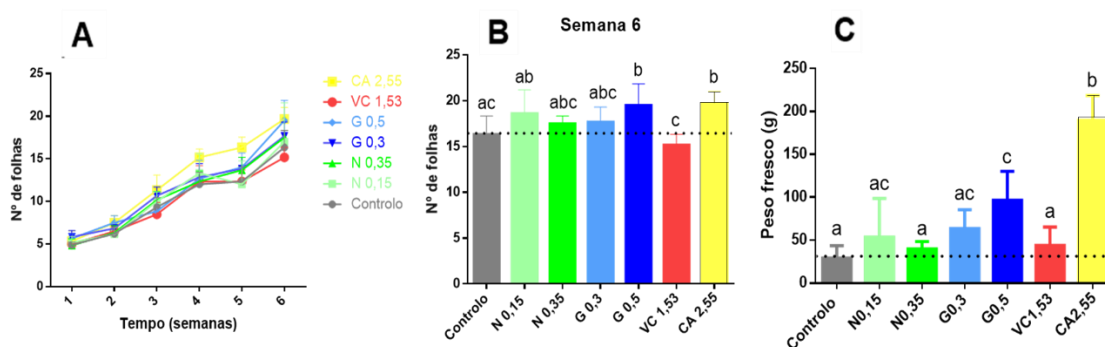


Figura 11. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) nos parâmetros de produtividade: número de folhas produzidos ao longo do ensaio (A); número de folhas produzidos no último dia do ensaio (B); e biomassa da parte aérea (C) da alface no ensaio de 2019. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Este efeito do composto CA2,55 também foi muito evidente na área foliar total das alfaces (Figura 12), sendo evidente não só no final do ensaio (semana 6), mas logo na semana 3, com valores significativamente distintos dos obtidos com as restantes condições. Estes resultados mostram que o aumento promovido na biomassa da parte aérea foi causado mais por um aumento da área das folhas do que pelo número de folhas por alface. Pode ainda constatar-se que, depois de CA, o composto G, na dose mais elevada, promoveu uma área foliar significativamente maior que as restantes combinações testadas e que as duas doses testadas de N não produziram efeitos significativamente diferentes entre si (Figura 12).

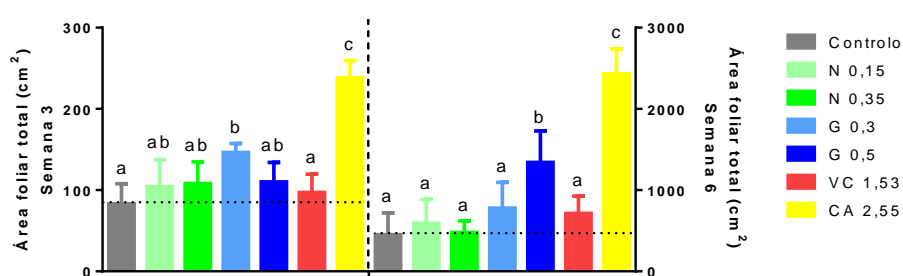


Figura 12. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) na área foliar total da alface, medidas no final da semana 3 (lado esquerdo) ou no final do final do ensaio (lado direito), no ensaio de 2019. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Os resultados da análise do sistema radicular (comprimento da raiz mais longa, peso fresco e seco total, e número de raízes em três classes de calibre) encontram-se representados na Figura 13. Também na parte radicular os diferentes compostos/doses promoveram resultados distintos nas variáveis analisadas e que acompanharam os obtidos na parte aérea da alface. O comprimento da raiz foi maior em alfaces que se desenvolveram com CA2,55, quando comparadas com a das condições controlo, N0,15 e VC1,53 (Figura 13.A). Além de raízes mais compridas, o composto CA também produziu significativamente maior biomassa radicular fresca e seca que as restantes condições (Figura 13.B), à semelhança do que havia acontecido para a biomassa fresca da parte aérea (Figura 11.C). Por sua vez, e depois de CA, também o composto G produziu, de um modo geral, maiores raízes que as restantes condições e maior biomassa radicular fresca e seca, neste caso sem diferença entre doses testadas (Figura 13.B). Relativamente ao n° de raízes por alface em cada classe de calibre, pode verificar-se que não houve diferenças no n° de raízes finas (Figura 13.C, gráfico do lado direito), o composto CA também produziu mais raízes grossas

comparativamente com o controlo (Figura 13.C, gráfico do lado esquerdo); e de calibre intermédio relativamente às condições N0,15 e VC1,53 (Figura 13.C, gráfico central).

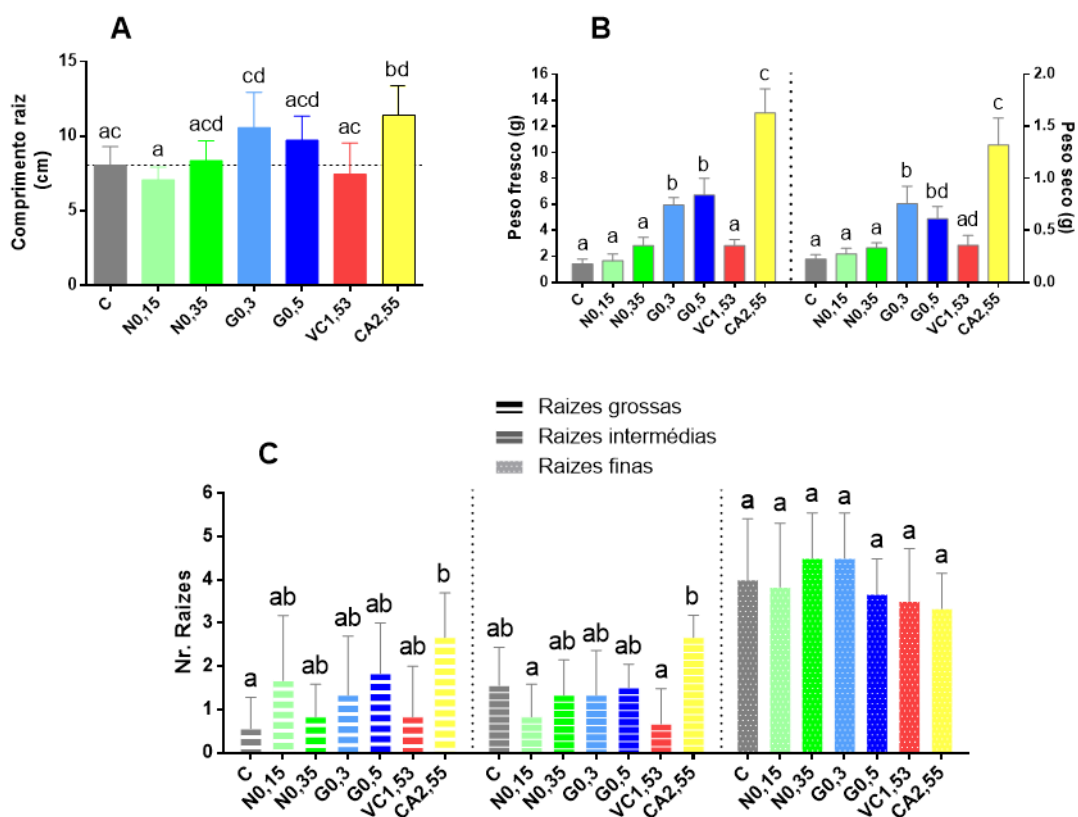


Figura 13. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²) no sistema radicular de Alface no ensaio de 2019. Neste critério foram analisados o comprimento da raiz (A); o peso fresco e peso seco da raiz (B); e o número de raízes grossas, intermédias e finas (C). Encontram-se representados valores médios (n≥6) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Tal como no ensaio de 2018, também neste se verificaram efeitos significativos relativos ao tipo de compostos orgânicos e doses testados. Primeiramente, vemos que a utilização de um composto orgânico, mesmo no solo fértil, promoveu maior produtividade que a situação controlo (sem fertilização), que está em linha com o que é descrito na literatura (Pavlou *et al.*, 2007, Santos *et al.*, 2016). De uma forma geral, o composto CA na dose recomendada (2,55 kg/m²), mostrou ser a melhor opção para um aumento da produtividade deste tipo de espécie hortícola (Figuras 11, 12 e 13), nomeadamente da parte vegetativa comestível, produzindo mais e maiores folhas.

Os resultados obtidos sugerem que o aumento da produtividade da alface depende mais da qualidade do composto do que da quantidade introduzida, dentro das doses recomendadas. De facto, pode-se constatar que para os compostos N e G, com os quais se testaram as doses mínima

e máxima, os resultados não foram significativamente distintos para as variáveis analisadas (Figuras 11, 12 e 13), à exceção de G para área foliar total (Figura 12).

Em comparação com o ensaio das alfices de 2018, assistimos a uma mudança de paradigma. Visto que, no primeiro ensaio o composto N apresenta maior produtividade aérea que o composto G (Figura 9); e no de 2019, o composto G consegue igualar, tanto no número de folhas como na biomassa aérea (Figura 11.B e 11.C). Tendo em consideração que a espécie era a mesma, as concentrações eram praticamente iguais (N5 e G5; e N0,35 e G0,3) e os compostos vieram da mesma meda (excluindo a possibilidade de haver diferença de qualidade das diferentes medas, devido também a diferentes produtos orgânicos utilizados), a explicação pode vir da diferença das características do local e do solo de cada ensaio, tendo este sido diferente (Tabela 4); e da diferença na qualidade dos compostos depois de armazenados. Além disto, e à semelhança das perspectivas futuras do ensaio de 2018, seria também de interesse verificar o efeito que os novos compostos aqui utilizados tiveram no solo a nível químico, físico e biológico.

3.1.2 – Parâmetros fisiológicos em alface em 2018 e 2019

Em ambos os ensaios de campo, também alguns parâmetros fisiológicos foram analisados, como o conteúdo relativo em água das folhas (RWC, do inglês *Relative Water Content*) e o teor de pigmentos fotossintéticos. O RWC, ao traduzir o conteúdo em água dos tecidos, pode dar uma indicação do seu estado hídrico, se a planta está, por exemplo, a conseguir repor adequadamente, através do sistema radicular, a água perdida por transpiração. Já o teor de pigmentos clorofilinos, não só traduz a atividade fotossintética como, ao contribuir para a coloração da folha, pode também ser visto como um parâmetro de qualidade (Ferrante e Maggiore, 2007; Agüero *et al.*, 2008; Arjenaki *et al.*, 2012). Ambos os parâmetros podem traduzir, portanto, duas características importantes a nível comercial, tais como a textura da folha e o seu aspeto visual, respetivamente, podendo valores elevados de RWC e pigmentos clorofilinos tornar uma alface mais “apetitosa” para o consumidor; mas também a nível produtivo, já que melhores capacidades de retenção de água e maiores conteúdos em clorofila revelam-se importantes na produtividade e na resistência a stresses (Schonfeld *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 2008; Arjenaki *et al.*, 2012).

3.1.2.1 – Ensaio 2018

Os resultados obtidos no ensaio de 2018, realizado com os compostos G e N nas doses 5 e 10 ton/ha, para estes dois parâmetros (RWC e teor de pigmentos clorofilinos), encontram-se na Figura

14. Relativamente ao conteúdo relativo em água, os resultados revelaram que a adição do composto Resíduos urbanos produziu alfaces com valores significativamente mais elevados de RWC (Figura 14.A), sugerindo que se encontram em melhor estado hídrico. Também no teor de pigmentos fotossintéticos houve diferenças significativas entre as condições (Figura 14.B). Contudo, neste caso, foi a dose aplicada que teve efeito significativo. As alfaces crescidas com dose de composto de 5 ton/ha, quer de G quer de N, apresentaram valores semelhantes entre si e estatisticamente diferentes dos das alfaces da condição N10, para clorofila *a* e carotenóides. Parece-se assim que a aplicação de composto G e N a 5 ton/ha, promovem a produção de alfaces mais ricas em pigmentos, o que lhes proporcionaria uma maior taxa de fotossíntese e uma melhor qualidade visual e nutricional (Aguero *et al.*, 2008; Ajernaki *et al.*, 2012). Valores mais elevados de composto N (exemplo do uso de uma concentração duas vezes maior que o composto G), eventualmente com níveis supra-óptimos de matéria orgânica e Na, podem ter um impacto negativo no fenótipo fotossintético (Sayyad-Amin *et al.*, 2016). Este resultado chama ainda a atenção para a importância duma fertilização racional, tendo em conta a especificidades de cada cultura e de cada solo.

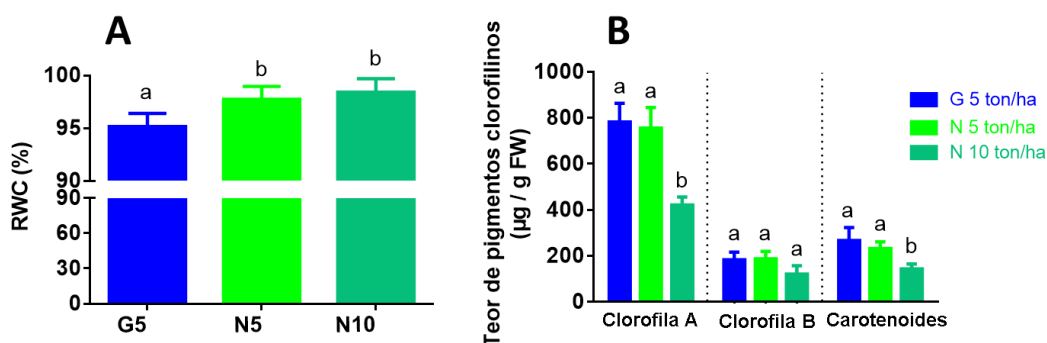


Figura 14. Efeito dos compostos Guano (G) e Resíduos urbanos (N) (a 5 e 10 ton/ha) no conteúdo relativo em água (A) e de pigmentos fotossintéticos (Clorofila A, clorofila B e Carotenoides) (B) em alfaces no ensaio de 2018 à sexta semana. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 4$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Os valores de RWC e de pigmentos fotossintéticos obtidos são semelhantes aos encontrados na literatura para a alface (Rivera *et al.*, 2006; Aguero *et al.*, 2008), embora neste trabalho, e ao contrário do reportado por Slamet e colaboradores (2017), se tenham detetado diferenças no teor de pigmentos entre diferentes fertilizantes orgânicos a diferentes concentrações (Slamet *et al.*, 2017).

3.1.2.2 – Ensaio 2019

Os resultados de RWC e da área foliar específica (AFE) de alface obtidos no ensaio de 2019 encontram-se na Figura 15. Quanto ao RWC, embora na semana 3, com a combinação N0,35, se tenha obtido valores significativamente mais elevados que no controlo (Figura 15.A), na semana 5 já não se verificam diferenças entre condições. Existe, contudo, uma diminuição geral de todos os valores de RWC da semana 3 para a 5 (Figura 15.A). Sabendo que o RWC está relacionado com o volume celular (Tanentzap *et al.*, 2015), este resultado provavelmente traduz um aumento na diminuição do volume e aumento da rigidez celulares da 3^a para a 5^a semana. Com o intuito de aprofundar este aspeto morfo-físico das folhas das alfaces, procedeu-se à análise da AFE, parâmetro que relaciona a área foliar com a sua biomassa seca. De acordo com a Figura 15.B pode verificar-se que, na semana 3, não se verificaram diferenças significativas entre condições, para além da diferença entre N0,15 e N0,35, mas, à semelhança do se tinha observado para RWC (Figura 15.A), houve um efeito muito significativo do tempo de cultura, com um decréscimo acentuado em AFE da semana 3 para a 5, o que revela um aumento na espessura e/ou densidade do mesófilo foliar.

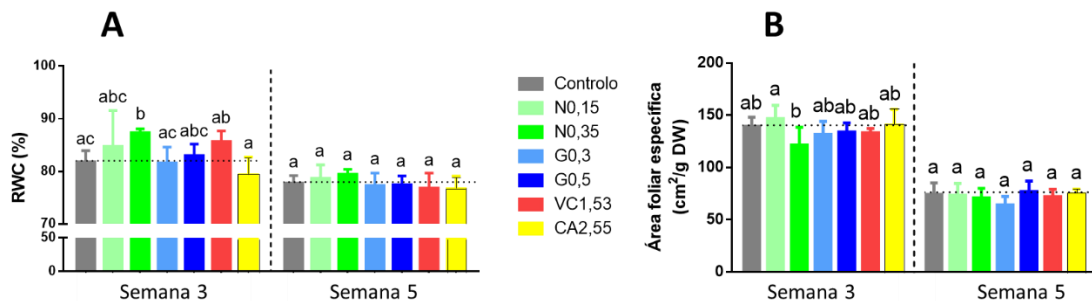


Figura 15. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²), no conteúdo relativo em água (RWC) (A), e Área foliar específica (B) em alfaces no ensaio de 2019, à terceira e quinta semana. Encontram-se representados valores médios (n≥5) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Relativamente aos pigmentos fotossintéticos, a concentração de clorofila *a* (Figura 16.A) na terceira semana), foi significativamente superior em alfaces crescidas em CA2,55 quando comparada com o controlo e a maioria das condições testadas, algo que já não se verificou perto do final do ensaio (quinta semana). Na quinta semana salienta-se que nas condições G0,3 e VC1,53, as alfaces apresentaram valores inferiores ao controlo. Nesta fase de cultura, os resultados sugerem ainda que, enquanto o composto N produziu teores de clorofila *a* semelhantes nas doses recomendadas, o composto G, na dose mais baixa é limitante (Figura 16.A). Quanto à clorofila *b* (Figura 16.B), os

resultados foram algo semelhantes, com as condições VC1,53 e G0,3 a produzirem alfaces com teores significativamente inferiores ao controlo e a verificar-se o efeito da dose apenas no composto G. Já no caso dos carotenóides (Figura 16.C), o efeito mais pronunciado é o aumento do teor da semana 3 para a semana 5, não havendo ao longo do ensaio diferenças entre os compostos comparativamente com o controlo ou entre si, com a exceção do forte efeito da dose do composto G, como verificado para os restantes pigmentos. Estes resultados estão em linha com outros estudos que reportaram diferenças na produção de clorofilas com diferentes compostos orgânicos (Coria-Cayupán *et al.*, 2009). Um dos principais contribuintes para a formação de pigmentos fotossintéticos é a presença de nitrogénio no solo (Coria-Cayupán *et al.*, 2009), contudo, no nosso caso, este parece não ter sido pelo menos o principal fator a influenciar, uma vez que a concentração de nitrogénio no composto G ser quase o dobro da de N (Tabela 2), e não se ter verificado uma tendência dependente na dose de N no teor de pigmentos fotossintéticos.

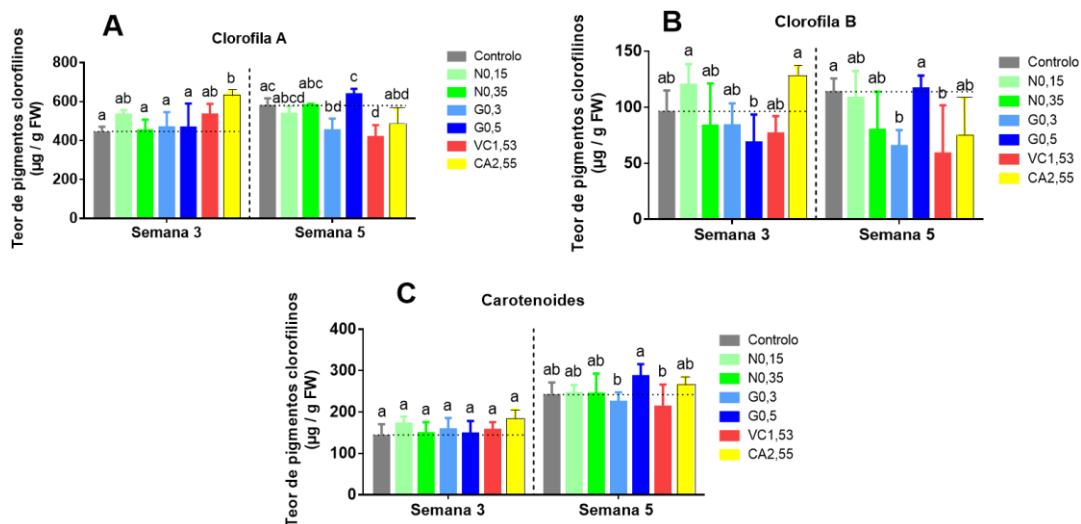


Figura 16. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de Algas (CA) a diferentes concentrações (em Kg/m²), no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Clorofila A, clorofila B e Carotenóides) de alfaces no ensaio de 2019, à terceira e quinta semanas. Encontram-se representados valores médios (n≥6) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Ao compararmos a terceira com a quinta semana, as variações nas diferenças significativas entre condições nos resultados do RWC e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos podem estar relacionadas com diferenças nas condições climáticas, quantidade de água do sol, ou no desenvolvimento foliar (Poorter, 2002; Agüero *et al.*, 2008; Ozkur *et al.*, 2009; Tanentzap *et al.*, 2015).

3.1.3 – Avaliação da qualidade nos ensaios de 2018 e 2019

3.1.3.1 – Quantificação de antocianinas e vitamina C em morangos e alfaces

Pretendeu-se com a quantificação de vitamina C e antocianinas avaliar parâmetros relacionados com a qualidade nutricional de frutos e vegetais. De forma a avaliar o efeito que diferentes compostos orgânicos têm na concentração destes compostos em alface e morango, analisaram-se as concentrações de ácido ascórbico (vitamina C) e antocianinas, encontrando-se os resultados obtidos em 2018 e 2019 nas Tabelas 8 e 9, respetivamente.

No ensaio de 2018, a aplicação de diferentes compostos/doses (N5, N10 e G5) não modificou significativamente a quantidade de vitamina C nas folhas de alface nem nos morangos. No entanto, os morangos que cresceram sob efeito dos compostos N10 e G5 apresentaram maior concentração de antocianinas (Tabela 8). Em 2019, a aplicação dos diferentes compostos/doses em alface, não resultou em alterações significativas na concentração de vitamina C, tal como em 2018, mas também não se verificaram efeitos na concentração de antocianinas (Tabela 9).

Tabela 8. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N) e Guano (G), a diferentes doses (5 e 10 ton/ha) na concentração de vitamina C e antocianinas em alface e morango, no ensaio de 2018. Resultados de vitamina C expressos em mg de ácido ascórbico/g FW; e de antocianinas em mg cianidina-3-glicósido/g FW para a alface e em mg pelargonidina-3-glicósido / g FW para o morango. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 4$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Ensaio de 2018		N5	N10	G5
Vitamina C	Alface	0,21 a ($\pm 0,038$)	0,24 a ($\pm 0,038$)	0,23 a ($\pm 0,055$)
	Morango	1,46 a ($\pm 0,203$)	1,47 a ($\pm 0,213$)	1,7 a ($\pm 0,09$)
Antocianinas	Morango	0,15 a ($\pm 0,022$)	0,21 b ($\pm 0,022$)	0,23 b ($\pm 0,037$)

Tabela 9. Efeito dos compostos Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA) a diferentes doses (Kg/m^2), na concentração de vitamina C e antocianinas em Alface, no ensaio de 2019. Resultados de vitamina C expressos em mg de ácido ascórbico/g FW; e de antocianinas em mg cianidina-3-glicósido /g FW. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 6$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Ensaio de 2019	Controlo	N0,15	N0,35	G0,3	G0,5	VC1,53	CA2,55
Vitamina C	0,29 a ($\pm 0,045$)	0,30 a ($\pm 0,007$)	0,33 a ($\pm 0,083$)	0,28 a ($\pm 0,018$)	0,23 a ($\pm 0,041$)	0,22 a ($\pm 0,050$)	0,26 a ($\pm 0,027$)
Antocianinas	0,23 a ($\pm 0,055$)	0,22 a ($\pm 0,018$)	0,24 a ($\pm 0,035$)	0,29 a ($\pm 0,030$)	0,26 a ($\pm 0,033$)	0,25 a ($\pm 0,084$)	0,30 a ($\pm 0,004$)

Este resultado não está de acordo com o reportado por Santos e colaboradores (2016), em que diferentes compostos orgânicos exerceram efeitos no nível de vitamina C e antocianinas da alface. No caso dos morangos, segundo Ayesha (2011), diferentes modos de cultivo afetam a quantidade de vitamina C. De forma geral, tendo em consideração o ensaio de 2019, não houve efeitos negativos da aplicação de composto na qualidade nutricional das espécies hortícolas. E mesmo existindo diversos fatores que podem afetar a concentração destas substâncias nestes alimentos (entre variedades, condições de cultivo, época de colheita, e condicionamento, por exemplo) todos os valores de antocianinas e vitamina C para ambas as espécies se encontram de acordo com os reportados na literatura (Gazula *et al.*, 2007; Horbowicz *et al.*, 2008; Ayesha, 2011; Pincemail *et al.*, 2012; Maksimovic *et al.*, 2014; Tonutare *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016).

3.1.3.2 – Tempo de prateleira do morango

O tempo de prateleira de um produto é também um parâmetro muito importante do ponto de vista comercial. Não só permite que comerciantes e consumidores evitem perdas monetárias como também ajuda a reduzir o desperdício alimentar. Assim, neste ensaio pretendeu-se comparar a capacidade de morangos, provenientes de morangueiros crescidos em diferentes compostos orgânicos (N5, N10, G5), manterem um aspeto saudável, com e sem refrigeração.

Na Figura 17 apresentam-se os resultados do ensaio realizado num conjunto de morangos sem cortes e num grupo de morangos ao qual foram aplicados golpes. Podemos verificar que no dia 2, os morangos G5 são os primeiros a mostrar perda de qualidade. No dia 3, a diferença entre morangos sem e com cortes continua visível, contudo, os G5 (visivelmente escurecidos) e os N10 (inícios de infeção fúngica) mostram-se mais deteriorados que os N5. No dia 4, e último, existem indícios claros de infeção fúngica nos morangos G5 e N10 juntamente com uma coloração escura. No caso da Figura 18, é comparada a capacidade de conservação de morangos à temperatura ambiente e a 6 °C. De forma geral, os morangos que estiveram no frio demonstraram bom aspeto ao longo dos 4 dias, não havendo diferenças notórias entre as condições testadas de compostos/dose. Por outro lado, e assim como no ensaio dos cortes, no dia 2 os morangos G5 e N10 à temperatura ambiente revelaram deterioração em comparação com os morangos N5. Este efeito manteve-se até ao dia 4. Neste último dia, em todas as condições se verificaram infeções fúngicas e os morangos G5 e N10 uma acentuada coloração escura em comparação com os N5. Com estes ensaios foi possível concluir que o composto N, a 5 ton/ha, produziu morangos mais

resistentes a infecções fúngicas, mesmo com cortes superficiais, mas também em condições de temperatura ambiente.



Figura 17. Comparação ao longo de 4 dias, por inspeção visual, da qualidade de morangos produzidos com diferentes compostos (Resíduos urbanos (N) e Guano (G) a 5 e 10 ton/ha), com e sem cortes superficiais.

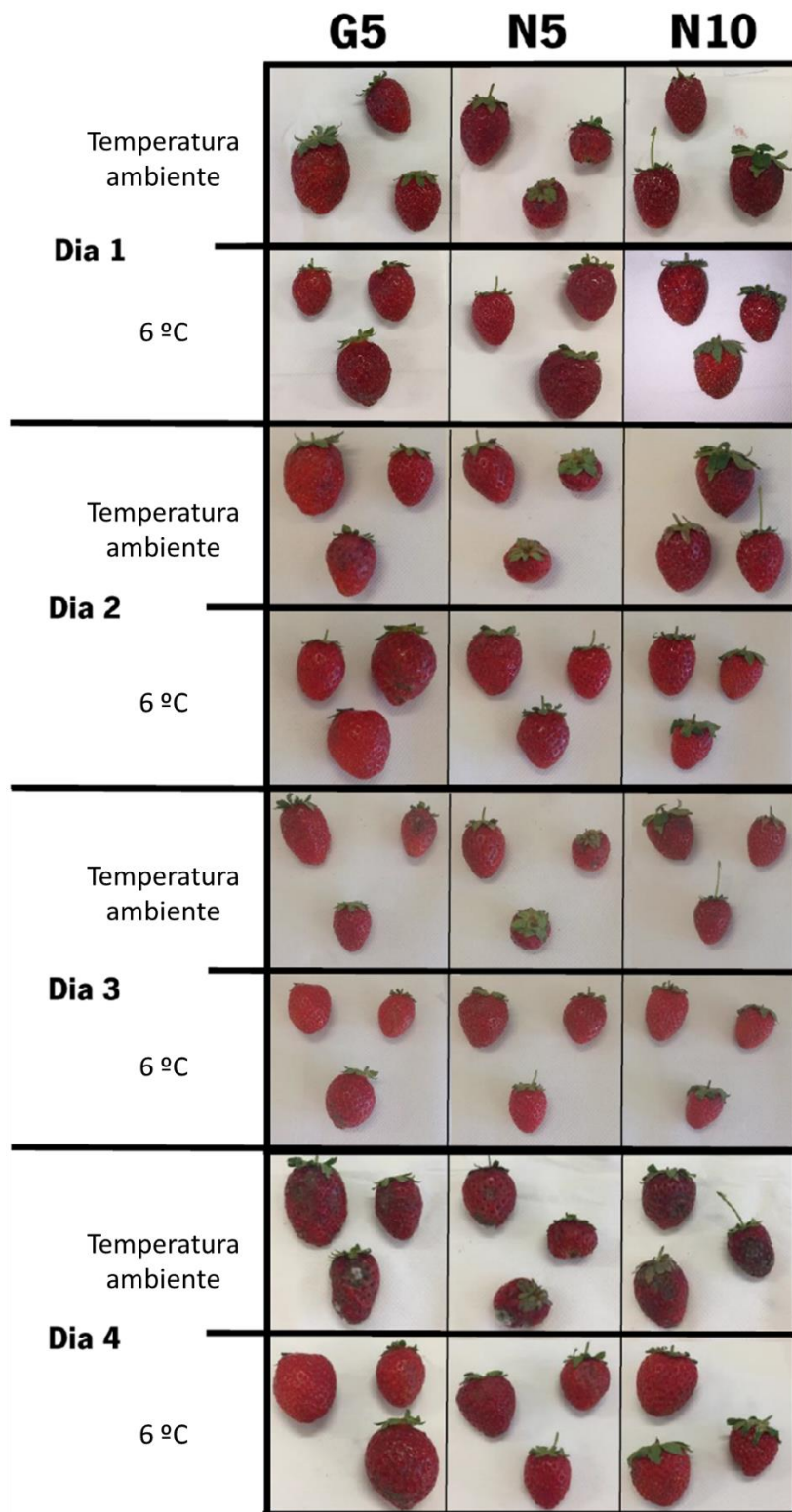


Figura 18. Comparação ao longo de 4 dias, por inspeção visual, da qualidade entre morangos produzidos com diferentes compostos (Resíduos urbanos (N) e Guano (G) a 5 e 10 ton/ha), quando sujeitos à temperatura ambiente e a 6°C.

3.2 – Avaliação da atividade de extratos húmicos e macerados de compostos em ensaios *in vitro*

3.2.1 – Efeito em variedades de alface

Avaliar o efeito de um componente dos compostos, como por exemplo substâncias húmicas, quando se comparam vários compostos de composições distintas em ensaios de campo, é uma tarefa muito difícil senão impossível, pois a tentativa de controlar o nível de uma usando doses distintas, alteraria os níveis das outras componentes dos compostos. Neste sentido, de forma a avaliar o efeito de substâncias húmicas extraídas dos compostos em estudo (N, G, VC e CA) no desenvolvimento de uma espécie vegetal, procedeu-se a um ensaio *in vitro* com culturas de alface (*Lactuca sativa* var. batávia loura), através da incorporação de extratos de ácidos húmicos, de ácidos fúlvicos, e de substâncias húmicas (mistura de ácidos húmicos e fúlvicos na mesma quantidade) em meio MS a 500, 1000 e 1500 µg/mL. Os ensaios realizados encontram-se indicados na Tabela 10. Todos os resultados são comparados com o controlo solvente, dado que este não demonstrou diferenças significativas com o controlo negativo (Apêndice 2).

Tabela 10. Resumo dos ensaios do efeito das substâncias húmicas em culturas *in vitro* de alface. Os extratos húmicos (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e mistura (substâncias húmicas)) dos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) que foram testadas, consistiram em 3 concentrações diferentes (500, 1000 e 1500 µg/mL). “X” representa a realização desse ensaio.

Compostos	Extratos húmicos		
	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos	Substâncias húmicas
N	X		X
G	X		X
VC	X		X
CA	X	X	X

Um dos parâmetros avaliados foi a percentagem de germinação ao longo do tempo, de modo a analisar o comportamento da germinação das sementes nas diferentes condições. Nenhuma das condições promoveu diferenças significativas na percentagem de germinação quando comparadas com o controlo no final do ensaio (Figura 19).

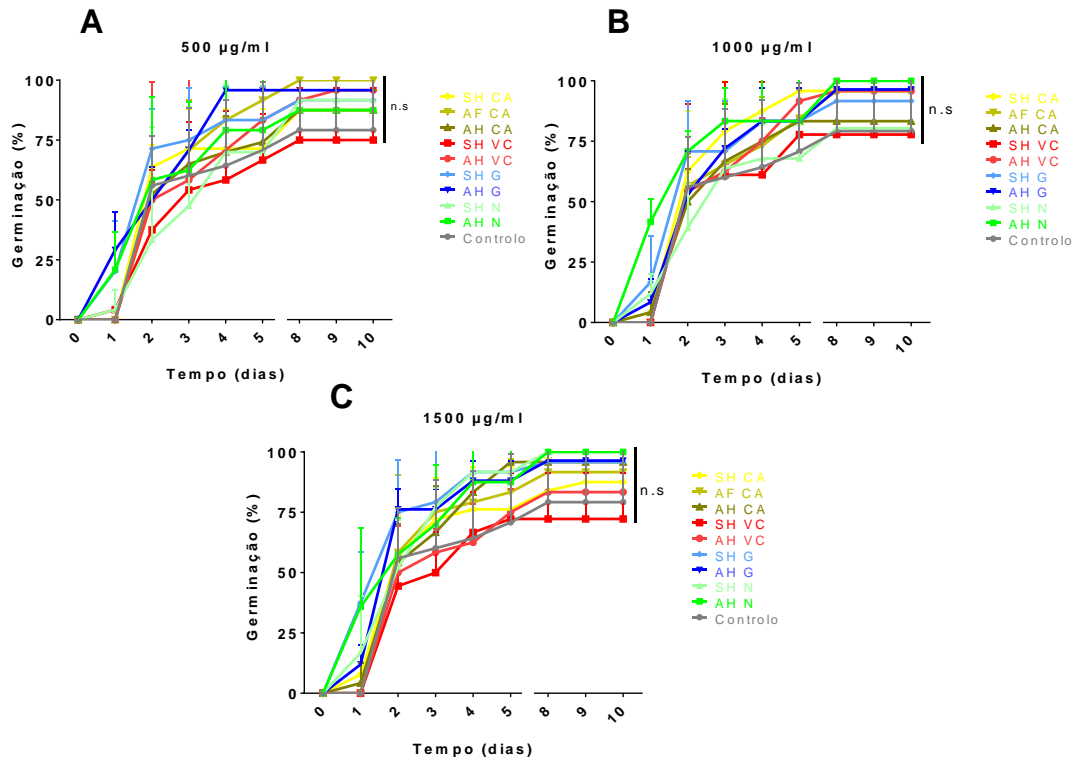


Figura 19. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, na percentagem de germinação de sementes de alfaca ao longo de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes, em comparação com o controlo ($p \leq 0,05$). Ou em caso de ausência de diferença por n.s (não significativo).

Outro parâmetro monitorizado ao longo dos 10 dias foi a percentagem de plântulas com cotilédones completamente expandidos, como medida do desenvolvimento das plântulas (Figura 20). De um modo geral não se verificam efeitos dos compostos, extratos, ou concentrações quando comparados com o controlo no final do ensaio.

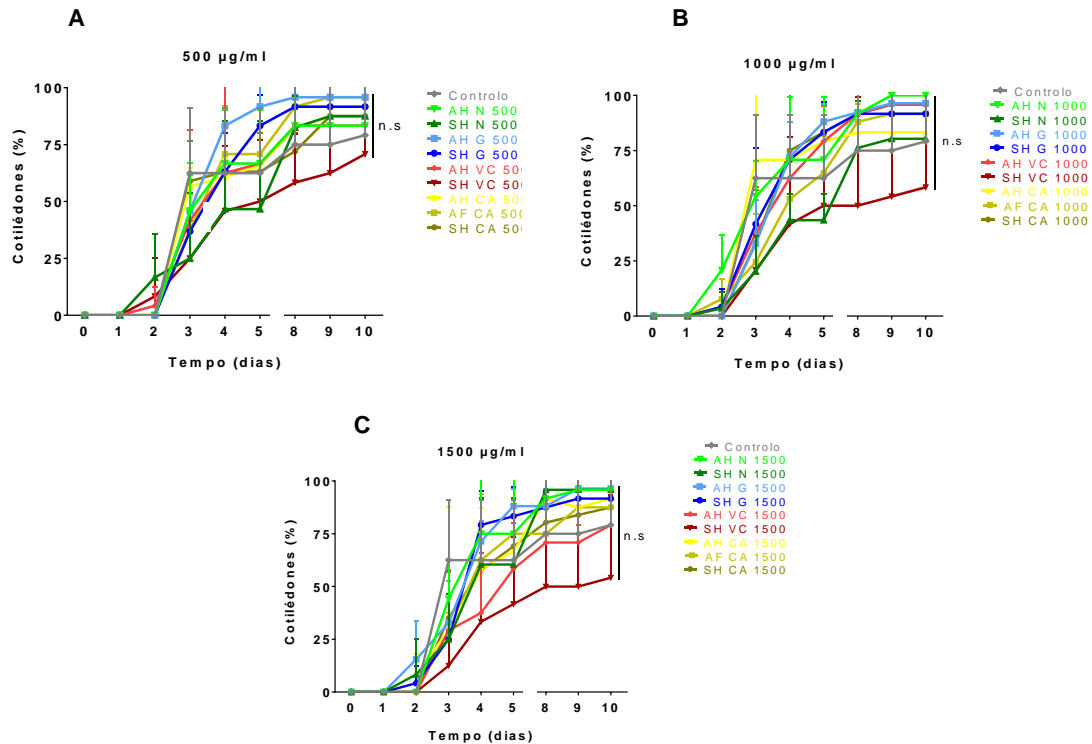


Figura 20. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, na percentagem de plântulas com cotilédones expandidos de alface ao longo de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes, em comparação com o controlo ($p \leq 0,05$). Ou em caso de ausência de diferença por n.s (não significativo).

No final do ensaio foram realizadas medições destrutivas de forma a medir o comprimento da raiz (Figura 21), da primeira folha (Figura 22) e do pecíolo (Figura 23). Globalmente, o composto de algas (CA) foi o que teve um impacto maior promovendo um maior desenvolvimento radicular, foliar e do pecíolo (Figura 21, 22 e 23). Relativamente à componente radicular foi possível verificar que, à exceção do composto N, os extratos SH promoveram um menor comprimento da raiz quando comparados com os extratos AH (Figura 21), em particular os extratos de G e VC, sugerindo que os ácidos fúlvicos (AF) possam contribuir para essa inibição. Os ácidos húmicos do composto CA, a 1000 µg/mL, promoveram raízes mais compridas que todos os restantes compostos e o controlo (Figura 21.B).

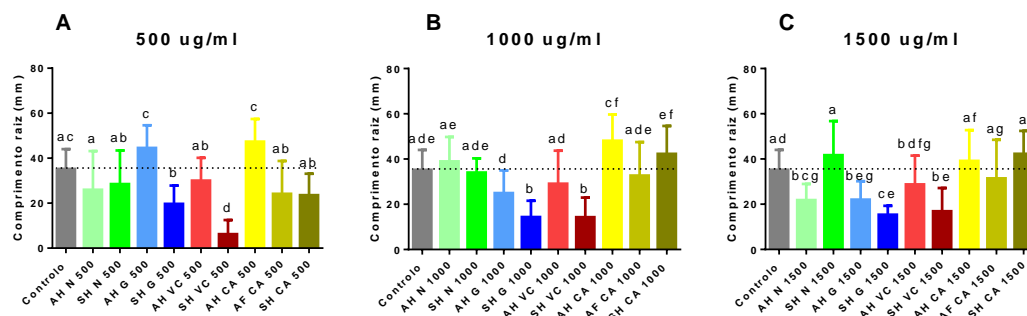


Figura 21. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, no comprimento da raiz de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Relativamente ao comprimento da primeira folha, a diferença entre AH e SH acima descrita foi novamente observada nas duas concentrações mais baixas, sendo que na concentração de 1000 µg/mL, tal como para o comprimento da raiz, com os extratos SH de G e VC produziram-se folhas mais pequenas que os controlos e restantes condições (Figura 22.B). Os extratos húmicos de N deram sistematicamente valores semelhantes ao controlo, à exceção de AH a 1500 µg/mL em que se obtiveram folhas com comprimentos inferiores ao controlo (Figura 22.C).

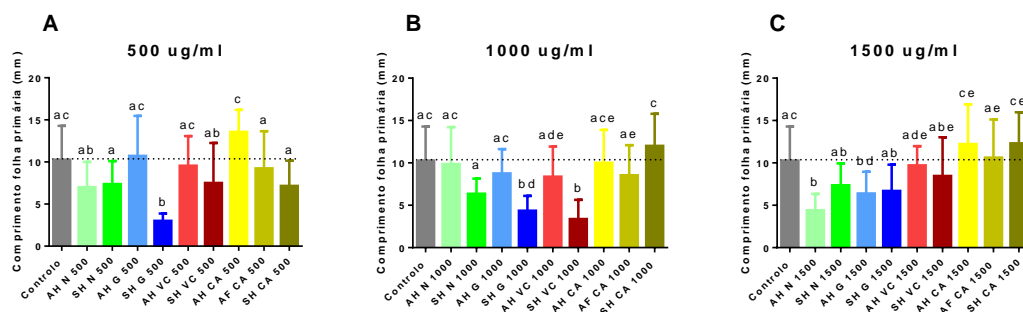


Figura 22. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, no comprimento da folha primária de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A resposta do comprimento do pecíolo acompanhou de perto o que se verificou com o comprimento da folha, sendo, no entanto, os efeitos ainda mais evidentes (Figura 23). Assim, foram diversas as condições com pecíolos com comprimentos inferiores ao controlo (a 500 µg/mL, SH de G, SH de VC e SH de CA; a 1000 µg/mL, SH de G e SH de VC; e a 1500 µg/mL, AH de N, AH de G e SH de G). Este resultado sugere que o comprimento do pecíolo, pode constituir

um parâmetro sensível para se avaliar o efeito de extratos húmicos no desenvolvimento de espécies vegetais *in vitro*.

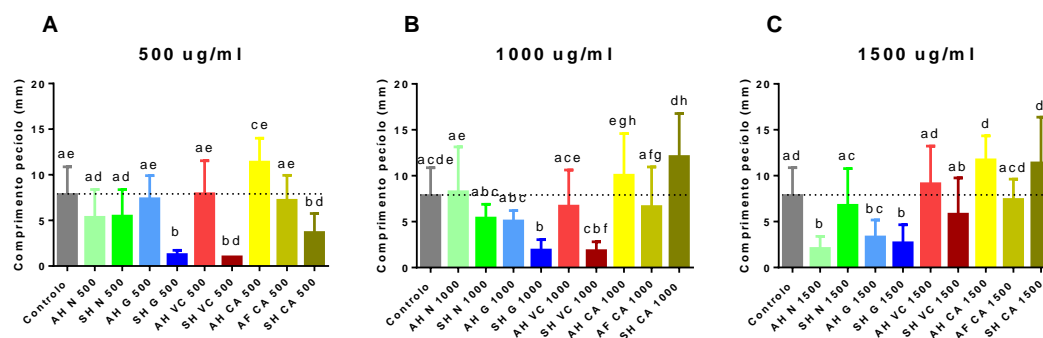


Figura 23. Efeito dos extratos de substâncias húmicas (ácidos húmicos, AH; ácidos fúlvicos, AF; e substâncias húmicas, SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) testados nas concentrações de 500 (A), 1000 (B) e 1500 (C) µg/mL, no comprimento do peciolo de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. Encontram-se representados valores médios (n≥10) ± desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤ 0,05).

Na literatura encontram-se várias referências ao efeito da aplicação de extratos húmicos em meios de propagação *in vitro* e do seu efeito positivo no crescimento das plântulas, potenciando o comprimento do caule e da raiz, assim como do número folhas (Canellas *et al.*, 2002; Obsuwan *et al.*, 2011; Jindo *et al.*, 2012). Também nestes estudos, e como foi observado neste trabalho, em certas condições os efeitos podem ser inferiores ao controlo, caso do aumento de concentração do extrato testado (Tabela 11) (Obsuwan *et al.*, 2011). Este efeito dose-resposta pode ter a ver com similaridades com a ação de auxinas, podendo haver um efeito inibitório destas substâncias a partir de uma certa concentração (Canellas *et al.*, 2002; Trevisan *et al.*, 2010; Obsuwan *et al.*, 2011; García *et al.*, 2016). Assim, como se pode ver na Tabela 11, que pretende comparar o comprimento da raiz de plântulas crescidas nas diferentes concentrações de extratos AH de cada composto, diferentes compostos podem conter composições em ácidos húmicos distintas com efeitos distintos. Enquanto o composto N e CA promovem valores máximos de comprimento de raiz a 1000 µg/mL, o composto G tem um máximo a 500 µg/mL, diminuindo significativamente para concentrações mais elevadas. Quanto ao composto VC, e nas concentrações testadas, não houve efeito da concentração no comprimento da raiz. Comparando os valores máximos de cada composto, também se constatou que as substâncias húmicas de CA e G promovem comprimentos maiores que as de N e VC (Tabela 11). Estes efeitos distintos de extratos húmicos dependentes da fonte foi também reportado na literatura (Jindo *et al.*, 2012). Este efeito pode-se dever aos

diferentes processos de humificação, que terão um impacto direto nas características conformacionais, químicas e físicas, das substâncias húmicas produzidas (Jindo *et al.*, 2012; García *et al.*, 2016).

Tabela 11. Comparação entre as diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) do mesmo composto no comprimento da raiz (expresso em mm). Efeito dos ácidos húmicos de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) a concentrações de 500, 1000 e 1500 µg/mL, no comprimento da raiz de plântulas de alface depois de 10 dias de germinação em meio MS. A negrito ressaltou-se os valores máximos. Cada valor é representado sob a forma de média ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Diferença estatística, entre concentrações do mesmo composto, representada pela diferença de letras.

Extratos AH de compostos	Concentrações		
	500 µg/mL	1000 µg/mL	1500 µg/mL
N	26,0 a ($\pm 16,79$)	39,0 b ($\pm 10,60$)	21,8 a ($\pm 6,96$)
G	44,6 a ($\pm 9,79$)	25,0 b ($\pm 9,78$)	22,0 b ($\pm 7,98$)
VC	30,0 a ($\pm 9,91$)	29,1 a ($\pm 14,27$)	28,8 a ($\pm 12,35$)
CA	47,4 a ($\pm 9,72$)	48,1 a ($\pm 11,30$)	37,4 b ($\pm 12,71$)

Estes resultados mostraram que os ensaios *in vitro* são adequados para avaliar o efeito de extratos de substâncias húmicas de compostos e fertilizantes orgânicos no desenvolvimento de plantas, podendo revelar-se uma ferramenta crucial para explicar efeitos observados em ensaios de campo. De facto, e comparativamente aos resultados de campo, também neste ensaio *in vitro*, o composto de algas mostrou ser aquele que promoveu maior desenvolvimento da alface. Tal como no ensaio de campo, este composto demonstrou ser mais eficaz do que os restantes ao produzir plantas com uma maior raiz (Figura 13 e 21) e uma maior produção na parte aérea (Figura 11 e 12, e 22 e 23). Visto que os efeitos na alface foram semelhantes ao utilizar o composto no campo e os ácidos húmicos *in vitro*, é razoável avançar com a hipótese de que os ácidos húmicos do composto foram os responsáveis pelo efeito. Contudo, mais ensaios seriam necessários para poder tirar conclusões mais robustas. Pensa-se que estas substâncias possam exercer influência na rizosfera circundante à raiz, influenciando o crescimento da planta, no crescimento da raiz através de efeitos do tipo hormonal, num maior *intake* de nutrientes e no seu metabolismo primário e secundário através da entrada das substâncias húmicas na planta (Nardi *et al.*, 2002; Loffredo *et al.*, 2005; Canellas *et al.*, 2015). É possível ainda que os efeitos possam ser indiretos, através da modificação

das comunidades microbianas da rizosfera, alterando assim as interações entre planta e os microrganismos do solo. Para testar esta ideia, foram estudados os efeitos de substâncias húmicas isoladas dos compostos em diferentes espécies de microrganismos fitopatogénicos

3.2.2 – Efeito em espécies microbianas

Também nesta vertente existe um grande potencial na utilização de extratos húmicos dos compostos e de macerados aquosos feitos diretamente a partir destes. Assim, como referido anteriormente, a utilização de pesticidas sintéticos pode ser bastante prejudicial (tanto para o ser humano como para a biodiversidade dos agrossistemas), por isso, seria de todo o interesse averiguar quais as capacidades anti e pró microbianas inerentes a estes compostos e extratos.

3.2.2.1 – Efeito de extratos húmicos no crescimento de bactérias

Bactérias dos géneros *Salmonella* e *Xanthomonas* apresentam um grande risco para nós, podendo afetar-nos direta ou indiretamente através das plantas; e afetar também a produtividade agrícola. Para avaliar a capacidade antibacteriana de extratos húmicos dos compostos orgânicos aqui em estudo, *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas arboricola* foram cultivadas em meios com ácidos húmicos ou substâncias húmicas (mistura de ácidos húmicos e fúlvicos na mesma quantidade) em diferentes concentrações (250, 500, 750 ou 1000 µl/mL), sendo depois avaliadas diferenças de crescimento entre condições e com o controlo.

De acordo com a Figura 24, vemos que de um modo geral, a grande maioria das condições induziu uma inibição do crescimento destes microrganismos. No caso de *Salmonella typhimurium*, o composto Resíduos urbanos mostrou conter ácidos húmicos (AH), que nas concentrações de 750 e 1000 µg/mL, apresentaram capacidades antibacterianas significativas, inibindo o crescimento de colónias comparativamente com o controlo até 60% (Figura 24.A). Este efeito inibitório também se observou com substâncias húmicas (SH) deste composto na maior concentração testada e de CA a 250 µg/mL (Figura 24.B).

Já em *Xanthomonas arboricola*, para ambas as estirpes estudadas, a utilização de AH isolados, demonstrou não reduzir significativamente o número de colónias em comparação com um controlo (Figura 24.C e 24.E). Embora as percentagens sejam bastante elevadas (Figura 24.E), o baixo número de colónias presente nestas condições, não permitiu que houvessem diferenças significativas em comparação com o controlo.

Contudo, enquanto com a estirpe 426, apenas as SH de G a 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provocaram uma diminuição no número de colônias (Figura 24.D), com a 1521, todas as concentrações deste composto G exerceram um efeito inibitório (Figura 24.F). Em adição ao composto Guano, também as concentrações de Composto de algas (exceção de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e Resíduos urbanos (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provaram ser eficientes na redução do número de colônias deste microrganismo (Figura 24.F).

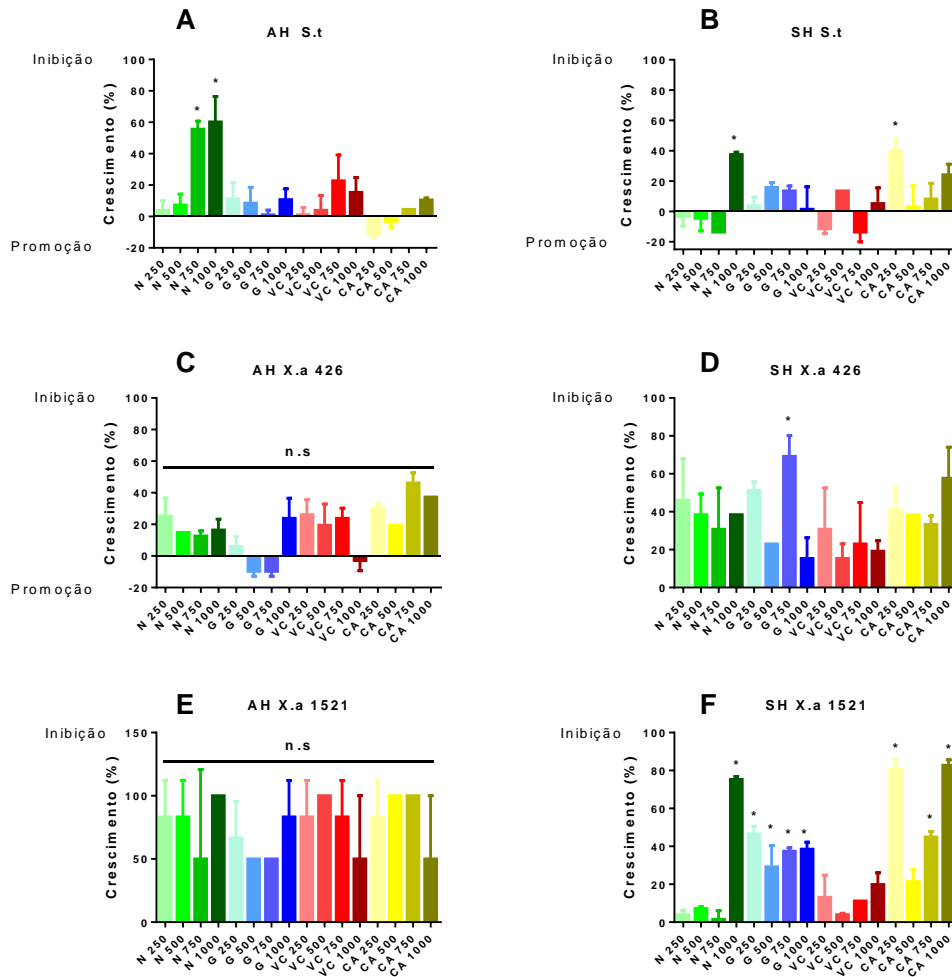


Figura 24. Percentagens de variação de crescimento (inibição ou promoção do crescimento (Equação 11)) de *Salmonella typhimurium* (S.t) e estirpes 426 e 1521 de *Xanthomonas arboricola* (X.a 426 e X.a 1521) em meios de LB com ácidos húmicos (AH) e substâncias húmicas (SH) a diferentes concentrações (250, 500, 750 ou 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provenientes de diversos compostos orgânicos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA). Encontram-se representados valores médios (n=3) \pm desvio padrão. Significância estatística presente, sob a forma de * (P < 0,05) ou n.s. (não significativo), é feita com a comparação do número de colônias entre essa condição e o controlo solvente.

Também na literatura se encontra descrito um efeito diferente de extratos húmicos de acordo com a sua origem (Feifičová *et al.*, 2005). O efeito dos extratos depende também de bactéria para

bactéria, como no caso da *Salmonella typhimurium* e da *Xanthomonas arboricola* (estirpe 426), em que nas primeiras existe um efeito antagonista das SH dos composto N e VC, mas sinérgico no caso do CA (Figura 24.A e 24.B), enquanto na 426 o efeito é sinérgico para todos os compostos (Figura 24.D).

Uma limitação neste estudo é o pouco crescimento de colónias verificado no ensaio de AH da estirpe de *X. arboricola* 1521 (Figura 24.E). As percentagens de inibição atingiram os 100% em diversos casos visto que no caso do controlo, a quantidade de colónias foi em média 5. Logo, a presença de valores inferiores a esses teriam um impacto percentual muito elevado, algo que se veio a verificar. Algo também evidenciado no caso de *X. arboricola* 426, visto que o número de colónias não foi muito elevado, mesmo havendo elevadas percentagens de inibição, o número de colónias não variou significativamente das do controlo (Figura 24.C).

Com este conhecimento é possível planear e desenvolver estratégias mais eficazes de combate a perdas de produtividade devido a fitopatogenes. De acordo com os resultados, a escolha de uma solução não só é importante para promover a maior taxa de inibição possível, mas também para impedir que haja ainda mais crescimento do agente patogénico, permitindo-nos assim, com conhecimento de qual o ponto de ataque do agente em questão, seleccionar qual o método de prevenção (*spray* de extrato, rega com macerado, aplicação de composto no solo, etc.), e determinar qual a melhor concentração e extrato/composto a aplicar. Embora a capacidade de inibir o crescimento não atinja os 100% em muitos dos casos, a inibição do crescimento presente pode determinar uma vantagem para organismos mutualistas proliferarem e/ou para as defesas da planta juntamente com fatores físico-químicos darem resposta a este ataque.

No caso da *Salmonella typhimurium*, visto que inicialmente a invasão das plantas se dá pela adesão a superfícies, é importante que os extratos se encontrem em contacto também com esses tecidos. Esta bactéria pode-se encontrar aderida às folhas ou presente na rizosfera, e posteriormente mover-se para dentro dos tecidos e frutos (Golberg *et al.*, 2011; Wiedemann *et al.*, 2015). Embora a inibição presente nestes ensaios não seja total, esta pode ser suficiente para ajudar a inibir totalmente a proliferação da bactéria. Quando estes microrganismos se encontram nas folhas, por exemplo, têm de lidar com variações na temperatura, disponibilidade de água e nutrientes e radiação, fatores que juntamente com a presença dos extratos húmicos certos podem ser cruciais a impedir a colonização nas plantas (Wiedemann *et al.*, 2015). Neste caso a aplicação foliar de ácidos húmicos extraídos de Resíduos urbanos a elevadas concentrações parecem ser a

melhor opção, através de *sprays* ou inclusão no sistema de rega, para prevenção na parte aérea da planta. Enquanto na terra, a presença deste composto N, ou CA, seria a estratégia mais apropriada, dado que num composto é mais provável haver efeito sinérgico entre AH e AF (ou seja, SH) (Figura 24.A e 24.B).

As evidências do crescimento da *Xanthomonas arboricola*, dão-se pelo aparecimento de manchas nas folhas e frutos e cancrios nos ramos e troncos e a prevenção baseia-se no uso de bacteriófagos e pesticidas que, embora eficazes, não conseguem penetrar no interior dos tecidos (Lamichhane, 2014). Para este caso, assim como no anterior, a utilização de extratos húmicos na aplicação foliar seria de interesse. Não só estes são capazes de entrar na planta, como o uso de substâncias húmicas de CA ou G poderia revelar-se eficiente (Figura 24.D e 24.F). Também neste caso, o uso destes extratos, embora não apresente uma solução final, poderia fornecer uma vantagem que com a combinação de outros fatores (microrganismos mutualistas, defesas da planta e condições físico-químicas) poderia determinar o sucesso desta intervenção.

3.2.2.2 – Efeito de extratos húmicos e macerados de compostos no crescimento de Fungos e Oomicotas

Também nesta classe de microrganismos o efeito de extratos húmicos e macerados de compostos foi avaliado. Assim como descrito anteriormente, *Diplodia corticola*, *Penicillium citrinum* e *Phytophthora cinnamomi* foram cultivados em meios onde extratos húmicos e macerados de compostos foram incorporados, sendo depois avaliados quanto à capacidade de inibição/promoção do crescimento e à morfologia do micélio.

3.2.2.2.1 – Efeito de extratos húmicos em *Phytophthora cinnamomi*

Numa primeira instância foi avaliado o efeito de diferentes combinações de extratos húmicos no crescimento de *Phytophthora cinnamomi*. De uma forma geral, para os diferentes compostos, os ácidos fúlvicos mostraram um crescimento do micélio inferior ao longo do ensaio comparativamente com o controlo e aos ácidos húmicos nas mesmas concentrações (Apêndice 3.1). Esta inibição também se prolongou durante mais tempo, dado que, ao final de 6 dias, quando o controlo atingiu o limite da placa, existem condições de AF que ainda se encontravam em crescimento.

Com os dados inerentes ao crescimento do micélio (Apêndice 3.1), foi possível determinar a percentagem de inibição de cada condição quando comparada com o controlo (Figura 25).

Na Figura 25, este efeito na diferença de crescimento entre ácidos húmicos e fúlvicos tornou-se ainda mais evidente. Todas as condições com ácidos fúlvicos (N e G a 500 e 1000 µg/mL, e VC e CA a 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) apresentaram, ao terceiro dia, inibição do crescimento do micélio (Figura 25.B); ao contrário dos ácidos húmicos, em que as condições G a 1000 µg/mL e CA a 250, 750 e 1000 µg/mL não apresentaram inibição de crescimento (Figura 25.A), efeito este também presente no sexto dia (Figura 25.C e 25.D). De entre os diferentes compostos, o VC a 1000 µg/mL apresenta os AF com as maiores percentagens de inibição, e com maior diferença para com a maioria das condições, ao longo do ensaio (Figura 25.B e 25.D). Enquanto que os ácidos húmicos de N se salientaram das restantes condições, no que diz respeito a este extrato húmico, no terceiro dia (Figura 25.A), vindo este efeito a desaparecer no sexto dia (Figura 25.C). Verificou-se também uma diferença significativa entre concentrações do mesmo extrato e composto, caso dos AF do VC tanto no dia 3 como no 6, entre a concentração de 250 e 1000 µg/mL (Figura 25.B e 25.D).

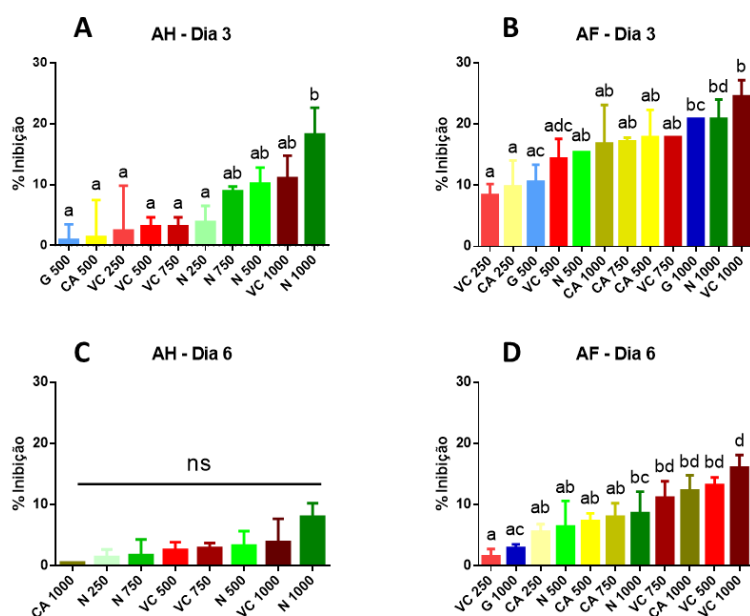


Figura 25. Percentagens de inibição, no crescimento de micélio de *Phytophthora cinnamomi*, de extratos húmicos (Ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF)) provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) por ordem crescente, no dia 3 (A e B) e 6 (C e D) do ensaio. Apenas as condições que apresentem percentagens de inibição positiva estão presentes. Encontram-se representados valores médios ($n=3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo).

No caso do uso de mistura de ácidos húmicos e fúlvicos (SH), verificou-se um atraso no crescimento nos tratamentos relativamente ao controlo, com exceção do composto de algas (Apêndice 3.2). Este atraso no crescimento revelou-se também na percentagem de inibição (Figura 26). Neste caso, o efeito da concentração na percentagem de inibição já não é tão notório, dado que não existem diferenças significativas entre as concentrações 750 e 1000 µg/mL para os diversos compostos. O composto CA, em ambas as concentrações, mostrou-se significativamente menos inibitório que o composto G a 1000 µg/mL, no terceiro dia. Contudo, existe ausência de qualquer efeito do composto de algas do quarto ao sexto dia de incubação. De uma forma geral, e assim como se verificou para os extratos húmicos isolados, as percentagens de inibição vieram a diminuir ao longo do tempo (Figura 25 e 26).

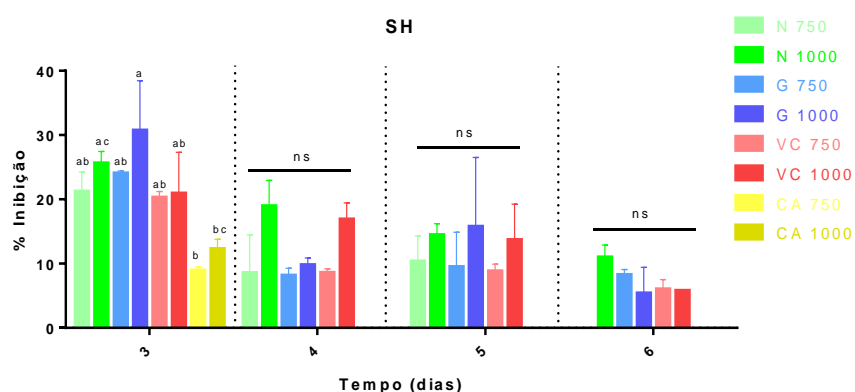


Figura 26. Percentagens de inibição, no crescimento de micélio de *Phytophthora cinnamomi*, de substâncias húmicas (SH) provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA), do dia 3 ao 6 do ensaio. Apenas as condições que apresentem percentagens de inibição positiva estão presentes. Encontram-se representados valores médios ($n=3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo).

Não só no crescimento radial do micélio, mas também na biomassa do micélio, o efeito destas substâncias é notável. Na Figura 27 pretende-se mostrar uma visão frontal do micélio do fungo cultivado em meio com SH dos diversos compostos. Embora não tenha sido quantificada a biomassa, são perceptíveis as diferenças entre micélios crescidos na presença dos extratos e no controlo relativamente à densidade do micélio, parecendo haver uma proporcionalidade inversa entre o aumento de concentração e a densidade do micélio. De entre os compostos em estudo, o VC aparenta exercer o maior efeito, ao contrário de CA, que parece produzir uma biomassa mais semelhante à do controlo. Este ensaio indica que, mesmo havendo uma ocupação da superfície do meio igual entre tratamentos e controlo, os fungos que crescem com SH atingem tal ponto com

uma menor biomassa. Seria de interesse, para perspetiva futura, quantificar esta diferença de densidade nos micélios e fazer uma análise morfológica do fungo.

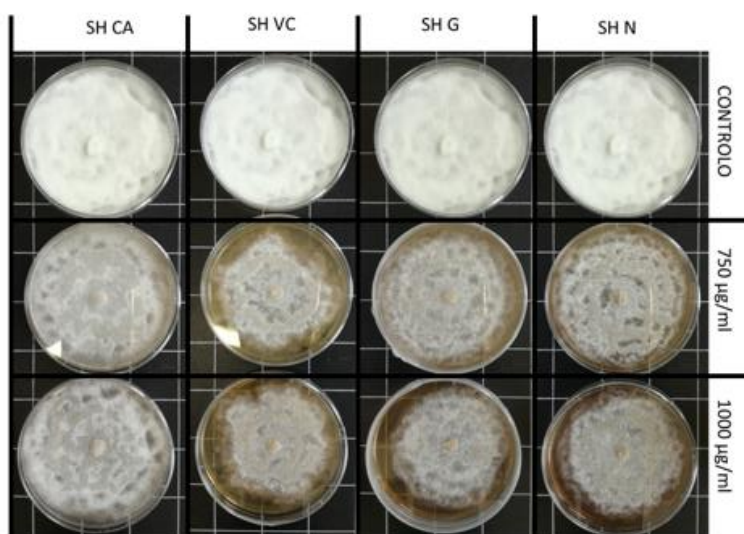


Figura 27. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de *Phytophthora cinnamomi*, em meio PGA (contolo) ou em meio PGA suplementado com substâncias húmicas (SH) de composto Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA) nas concentrações de 750 e 1000 µg/mL; ao sexto dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 6 dias a 25 °C na ausência de luz.

De forma a estudar se o efeito inibitório no crescimento do fungo em meio com extrato, se manteria em gerações futuras, procedeu-se à repicagem de micélios que cresceram sob efeito de SH (a concentrações de 750 e 1000 µg/mL) para placas com meio PGA. De facto, o crescimento destes fungos não se mostrou diferente das placas controlo ao longo do tempo e entre concentrações (Figura 28), sugerindo que o uso deste tipo de extratos não é genotóxico e qualquer efeito inibitório exercido afeta unicamente o fungo em contacto com a mesma.

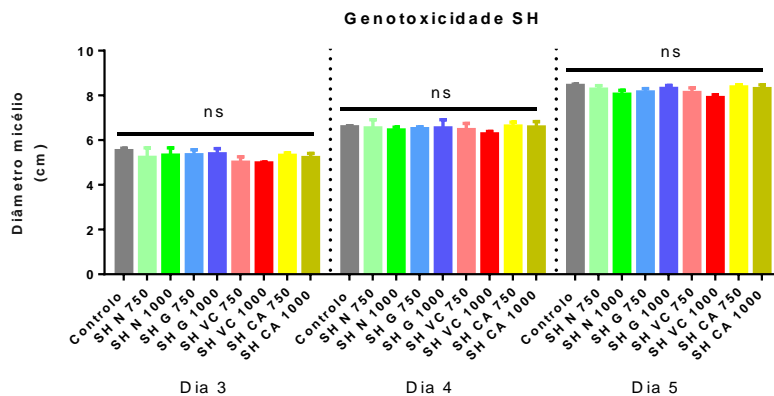


Figura 28. Análise do crescimento do micélio de *Phytophthora cinnamomi* cultivado em meio PGA, após ser transferido de placas com meio PGA e substâncias húmicas (SH) de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) e concentrações (750 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do terceiro ao quinto dia. Encontram-se representados valores médios ($n=3$) \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), ou ausência de diferença representada por ns (não significativo).

Em suma, este ensaio mostra que existe uma eficiência geral dos extratos, independentemente da fonte, na inibição deste agente patogénico. Existem, contudo, diferenças inerentes ao tipo de extrato húmico, à sua origem e à sua concentração. Os ácidos húmicos mostram-se menos eficazes que os ácidos fúlvicos e a mistura destes; as concentrações mais elevadas (neste caso, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraram maior efeito em comparação com as mais baixas (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); e existe uma perda geral de eficácia ao longo do tempo. As substâncias húmicas apresentam um efeito superior em estágios mais precoces, ao contrário dos fúlvicos que são mais constantes ao longo do ensaio. Este efeito sinérgico aparenta variar consoante a origem dos extratos; mostrando-se positivo no caso do Guano, ao contrário do Vermicomposto, que consegue obter melhores resultados com apenas ácidos fúlvicos isolados. Também se verificou, além da influência no crescimento do micélio, uma diminuição na densidade do micélio por parte das substâncias húmicas comum aos compostos N, G e VC. Além disto, também existe uma ausência de efeito genotóxico, em fungos que cresceram sob influência de substâncias húmicas. De entre os compostos, o Resíduos urbanos e o Vermicomposto apresentam as maiores percentagens de inibição e, em casos de atividade antifúngica, salientam-se como os principais candidatos a ter em consideração.

3.2.2.2.2 – Efeito de macerados de compostos em *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola* e *Penicillium citrinum*

Numa situação real de aplicação de composto no solo, é a água (proveniente da chuva ou da rega) que poderá dissolver e arrastar substâncias presentes no composto, nomeadamente substâncias húmicas. Substâncias estas que poderão exercer efeitos nas plantas e no solo, como o controlo de microrganismos. Com o intuito de avaliar o efeito destes lixiviados no crescimento de microrganismos foi utilizado um macerado dos compostos previamente utilizados (N, G, VC e G), na preparação dos meios onde foram cultivados diferentes fungos. Estes compostos foram deixados em agitação com água, sendo depois filtrados e centrifugados, de forma a preparar-se concentrações de 25 e 50 g de fertilizante por litro de água. Com a incorporação destes macerados em meio PGA, foi então avaliado o crescimento do micélio (Figura 29 e Tabela 12) e a densidade do mesmo (Figura 30 e 31) para *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola* e *Penicillium citrinum*.

De uma forma geral, verificou-se que estes macerados demonstraram atividades anti e pró-fúngicas (Figura 29). Relativamente a *Phytophthora cinnamomi* (Figura 29.A), observou-se um efeito inibitório com todos os compostos. O macerado feito com Guano na concentração mais elevada demonstrou exercer a maior percentagem de inibição, chegando a atingir uma inibição de 54% ao terceiro dia, vindo depois este efeito a atenuar-se ao longo do ensaio (Figura 29.A e Tabela 12). Quanto a *Diplodia corticola* (Figura 29.B), verificou-se também um efeito muito reduzido por parte do Composto de algas e do Resíduos urbanos, e uma maior taxa de inibição apresentada pelo Guano, embora neste caso a diferença entre concentrações não seja tão notória. Contudo, o Vermicomposto salienta-se neste fungo pela negativa, visto que aparenta promover o crescimento deste fungo patogénico no início do ensaio. Todos os compostos acabam eventualmente por diminuir o seu efeito para praticamente zero ao longo do ensaio. No caso do *Penicillium citrinum* (Figura 29.C), todos os compostos aparentam exercer um efeito positivo no crescimento deste fungo mutualista. O Guano, em ambas as concentrações testadas, assim como o Vermicomposto na concentração mais elevada, apresentou-se de forma consistente ao longo do ensaio como o maior promotor do crescimento deste fungo (Figura 29.C e Tabela 12).

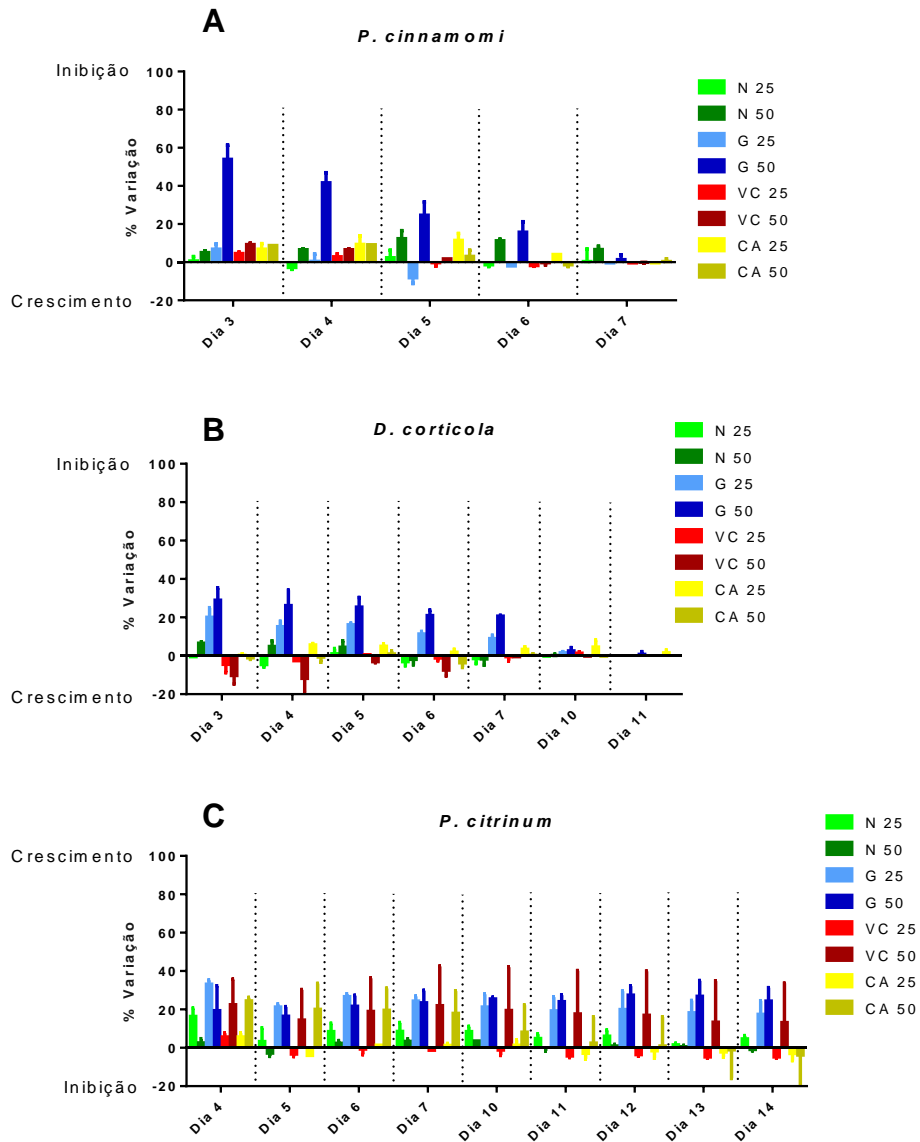


Figura 29. Percentagens na variação do crescimento (inibição ou promoção do crescimento) de *Phytophthora cinnamomi* (A), *Diplodia corticola* (B) e *Penicillium citrinum* (C) sob efeito de macerados de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) incorporados a concentrações de 25 e 50 g de composto por Litro de água em meio PGA.

De facto, o uso destes macerados mostrou ser uma mais valia no combate a agentes patogénicos e na promoção de crescimento de fungos mutualistas. Entre todas as condições, o macerado de Guano, numa concentração de 50 g/L, revelou-se como o mais eficiente no controlo destes microrganismos, chegando a apresentar a maior promoção, de forma consistente, de crescimento de *P. citrinum* na totalidade do ensaio; e mostrando-se como o maior inibidor do crescimento de *P. cinnamomi* e *D. corticola* (Tabela 12).

Tabela 12. Média de percentagem de variação (inibição ou promoção), por ordem decrescente, no crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola* e *Penicillium citrinum* sob efeito de meios com macerados de compostos na totalidade do ensaio. Os macerados são provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos, N; Guano, G; Vermicomposto, VC; e Composto de algas, CA) e foram incorporados em meio PGA a concentrações de 25 e 50 g de composto por Litro de água. Cada valor é representado sob a forma de média ($n \geq 10$) \pm desvio padrão. Diferença estatística, entre concentrações do mesmo composto, representada pela diferença de letras

Ensaio Macerados	Organismos	Ranking			
		1°	2°	3°	4°
Percentagem de inibição (%)	<i>P. cinnamomi</i>	G 50 30,8 a ($\pm 19,30$)	N 50 8,1 b ($\pm 3,25$)	CA 25 6,6 b ($\pm 4,57$)	CA 50 4,0 b ($\pm 4,35$)
	<i>D. corticola</i>	G 50 17,8 a ($\pm 11,51$)	G 25 10,5 b ($\pm 7,20$)	CA 25 3,2 c ($\pm 2,28$)	N 50 1,8 c ($\pm 3,70$)
Percentagem de promoção de crescimento (%)	<i>P. citrinum</i>	G 50 23,2 a ($\pm 5,89$)	G 25 21,7ab ($\pm 6,68$)	VC 50 17,6 ab ($\pm 16,64$)	CA 50 10,6 b ($\pm 13,75$)

Na inibição de crescimento da *Phytophthora cinnamomi*, comparativamente com o uso de extratos, também com o macerado, o composto Guano se mostrou superior aos restantes numa fase inicial, vindo depois a sua eficácia a diminuir ao longo do tempo (Figura 26 e 29.A). Esta consistência pode levar a presumir que o efeito destes macerados se possa dever à presença destas substâncias húmicas. No que se refere à densidade do micélio destes organismos, em comparação com o uso de extratos húmicos, o efeito dos macerados não é tão evidente no caso da *Phytophthora cinnamomi* (Figura 30). O macerado do Guano a 50 g/L aparenta ser o que mais diminui a densidade do micélio, enquanto as restantes condições não apresentam diferenças substanciais quando comparadas com o controlo.

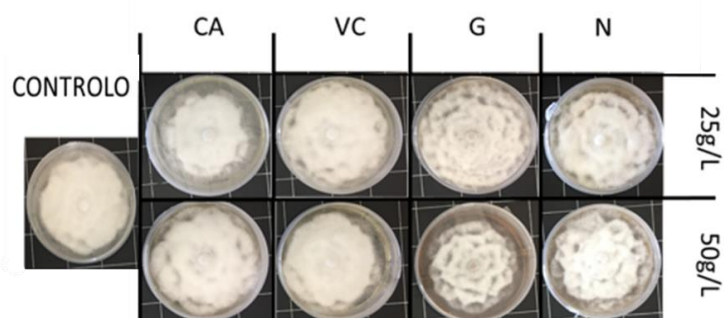


Figura 30. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de *Phytophthora cinnamomi*, em meio PGA (controlo) ou em meio PGA suplementado com macerados de diversos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) nas concentrações de 25 e 50 g/L; ao sexto dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 6 dias a 25 °C na ausência de luz.

No caso de *Penicillium citrinum*, no dia 7 (Figura 31.A) e no dia 14 (Figura 31.B), são visíveis as diferenças de tamanho de micélio (maior crescimento) entre algumas condições e o controle. Em adição a isto também se nota a presumível exudação de extrólitos nos micélios crescidos em algumas condições. O caso mais evidente é o das placas com composto G, especialmente a 50 g/L, onde na superfície do micélio se encontram uns pontos amarelos, que, em princípio, correspondem à produção de extrólitos (Houbraken *et al.*, 2010).

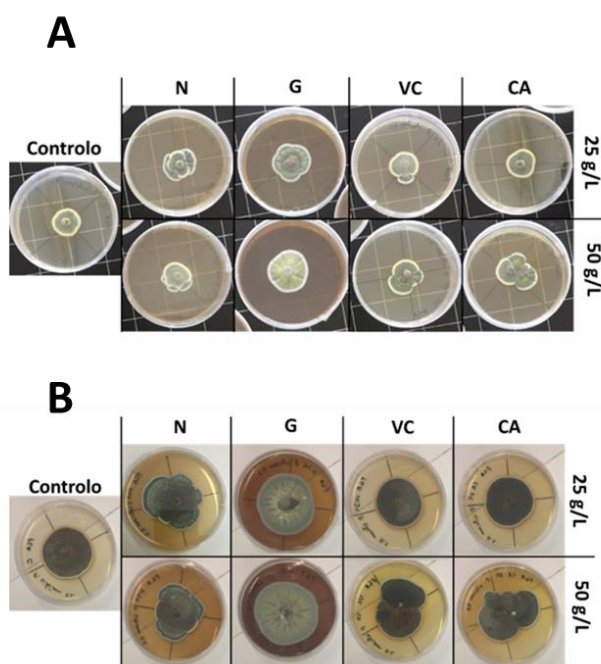


Figura 31. Visão da superfície frontal de placas de Petri com culturas de *Penicillium citrinum* em meio PGA (contolo) ou em meio PGA suplementado com macerados de diversos compostos (Resíduos urbanos (N), Guano (G), Vermicomposto (VC) e Composto de algas (CA)) nas concentrações de 25 e 50 g/L; ao sétimo (A) e ao décimo quarto (B) dia de inoculação. As placas foram inoculadas com um disco de micélio de uma placa de PGA e foram incubadas 14 dias a 25 °C na ausência de luz.

Na literatura são também reportados casos de inibição de crescimento de agentes patogénicos filamentosos através do uso de extratos húmicos, com origem em fertilizantes orgânicos. Nos estudos de Moliszewska e Pisarek (1996) e Wu e colaboradores (2016), e assim como foi aqui observado, ácidos húmicos e fúlvicos e a sua mistura exercem, de uma forma geral, um efeito inibitório no crescimento de fungos fitopatogénicos, variando esta sensibilidade à inibição entre espécies de organismos, entre tipos e origem do extrato e com o tempo. Além disso, também a eficácia dos macerados se encontra de acordo com a literatura (El-Masry *et al.*, 2002), promovendo em ensaios *in vitro* e no campo, a inibição do crescimento de diversos fungos patogénicos a nível da biomassa e crescimento do micélio e no desenvolvimento de hifas (El-Masry *et al.*, 2002).

Segundo Wu e colaboradores (2016), as inerentes diferenças estruturais destes extratos é a base destes diferentes efeitos inibitórios. Além disto, a alteração na estrutura química de cada um destes extratos ao longo do tempo é o que também promove o decréscimo da capacidade inibitória ao longo do tempo (Wu *et al.*, 2016). Em adição a esta ideia, também diversos fungos já demonstraram capacidade de degradar substâncias húmicas, podendo aqui também haver esse tipo de efeito (Grinhut *et al.*, 2007).

Em comparação, os fertilizantes de origem animal e vegetal apresentaram efeitos semelhantes no crescimento de organismos filamentosos. Embora o Guano não sofra um processo de compostagem e não exista um processo de humificação completo, também este tipo de reutilização apresenta valor na formação de um pesticida orgânico, principalmente quando utilizado em macerado (Kerkeni *et al.*, 2007; Alrefai *et al.*, 2015). Na prática, a aplicabilidade de produtos originários de compostos orgânicos (macerados ou extratos húmicos) em plantas no combate a doenças provocadas por agentes filamentosos é algo possível e eficiente (El-Masry *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016). Não só a presença destes compostos no solo, ricos nestes extratos húmicos, pode promover a inibição de fungos patogénicos (Wu *et al.*, 2016), mas também a aplicação foliar de *spray* com extratos húmicos já se mostrou eficiente no combate a agentes do género *Phytophthora*, e na promoção do crescimento de plantas (Brownel *et al.*, 1987; El-Mohamedy e Abd-El-Hatif, 2015).

Tendo estes resultados em consideração, já podemos supor métodos hipoteticamente mais eficientes no controlo destes organismos. Relativamente a *Diplodia corticola*, a aplicação de um macerado líquido à base de Guano nas zonas afetadas (ramos, folhas) poderá ser a melhor estratégia visto que estes afetam principalmente zonas aéreas, levando assim à substituição dos fungicidas comumente usados (Martin e Munck, 2017). Enquanto que em *Phytophthora cinnamomi*, a presença de composto Guano no solo ou de um vermicomposto, especialmente rico em ácidos fúlvicos, certamente seria uma vantagem na defesa ao principal ponto de ataque, que é a raiz (Jung *et al.*, 2013). No que se refere a *Penicillium citrinum*, a produção de extrólitos e a morfologia irregular do micélio encontra-se de acordo com a literatura; e embora não haja uma caracterização dos extrólitos aqui produzidos (possível objetivo de perspetivas futuras), o mais provável é que correspondam à citrinina (Houbraken *et al.*, 2010). A produção deste tipo de metabolitos varia entre espécies de *Penicillium*, mas, visto que se utilizou o mesmo fungo nas

diferentes condições, pode inferir-se que as diferenças na produção destes extrólitos se deveram à qualidade do macerado (Houbraken *et al.*, 2010). Este fungo, encontra-se maioritariamente presente no solo, pelo que neste caso este poderá beneficiar da presença do composto G. Além disto, a aplicação deste tipo de composto em solos áridos poderá ser uma mais valia, visto ajudar no crescimento deste fungo que por sua vez influencia positivamente o crescimento da planta (Khan *et al.*, 2008). Algo a ter em conta em locais onde o solo não é necessariamente fértil e existe maior produção animal que de excedentes vegetais.

3.3 – Inquérito online sobre compostagem: perceções e motivação da população portuguesa

Todos os resultados aqui presentes apontam para que o uso de compostos orgânicos seja uma mais valia em termos económicos e de sustentabilidade alimentar e ambiental, aumentando a produtividade agrícola e ajudando no combate a doenças, mas também reaproveitando os excedentes orgânicos, que comumente acabam em aterro, podendo ainda causar outros impactos ambientais e sociais, como é o caso das queimadas. Contudo, qual seria a possibilidade de disseminar esta prática pela população portuguesa, e qual seria a aceitação do consumidor a produtos com este tipo de origem?

Num inquérito (Apêndice 1) respondido por 318 pessoas com idades compreendidas entre os 18 e os 58 anos, naturais de diversos pontos do país e com habilitações académicas entre o ensino secundário e o doutoramento, foi possível aferir alguns factos e opiniões acerca deste tema. Com o intuito de estimar para a população total portuguesa (assumindo uma população de 10 milhões de pessoas), com um total de 318 respostas e com um grau de confiança de 95%, a margem de erro é de 5,5% (Raosoft, 2019).

Analisando os resultados, temos a ideia de que uma grande parte da população está ciente do conceito de compostagem (89%) e, destes, a maioria conhece alguém que já a faz (58,3%), estando também conscientes dos benefícios que a sua prática traz. Os principais motivos para que 89 das 318 pessoas pratiquem a compostagem são a gestão dos desperdícios com intuito de formar um fertilizante e a consciência dos problemas ambientais que acarreta a não valorização destes desperdícios orgânicos. Contudo, o destino da grande maioria dos resíduos orgânicos produzidos

em casa (restos de fruta e comida, excedentes de jardinagem, etc...) dos inquiridos, continua a ser o lixo comum (71,4%), seguido pelo uso em compostagem doméstica (28 %) e pela alimentação de animais (26,4%). Dos inquiridos, 5,3% faz entrega de resíduos orgânicos/verdes para compostagem industrial.

No que diz respeito a hábitos de consumo, ao comparar duas frutas ou legumes no momento da compra, os inquiridos mostram-se particularmente sensíveis ao fator preço, sendo este o fator mais levado em conta (215), seguido do aspeto (206), da origem orgânica (153), dos benefícios para a saúde (141) e do aroma (82). Embora o preço seja o fator mais importante no dia a dia, este perde importância em detrimento duma origem ambientalmente sustentável do produto, já que 58,2% dos inquiridos prefere pagar mais se isso significar que o que compram tem uma produção mais amiga do ambiente. Pelo contrário, 57,5% da amostra prefere escolher um produto mais barato, se a o facto da sua origem ser orgânica tiver influência no aumento do preço, preferindo assim pagar menos por um produto de produção convencional.

Em suma, este inquérito permitiu concluir que:

- O conceito de compostagem e os seus benefícios são amplamente conhecidos;
- A compostagem está presente num número significativo das casas portuguesas;
- A população que foi objeto de estudo é ambientalmente consciente, a maior parte preferindo pagar mais (fator este mais levado em conta no momento da compra) por um produto cuja origem seja mais amiga do ambiente.

Os resultados deste inquérito vão de encontro com os dados da Agência Portuguesa do Ambiente (2018) relativos ao aproveitamento de resíduos pelas entidades responsáveis pela gestão dos resíduos urbanos. Segundo eles, em 2015, das 5000 toneladas de resíduos urbanos, apenas 10% foram direcionados para a compostagem, sendo a grande maioria depositada em aterros (57%). Contudo, a quantidade de instalações com a capacidade de realizar o aproveitamento de resíduos biológicos está a aumentar, e a deposição em aterros a diminuir. Estes factos demonstram que, não só socialmente, mas também politicamente já se encontram passos a ser dados no sentido de aumentar práticas mais sustentáveis relacionadas com a gestão de resíduos biológicos.

Com este inquérito foi gerada informação que mostra que a disseminação da prática da compostagem não seria complicada, visto as pessoas já reconhecerem os seus benefícios, a sua prática já seja relativamente comum. Assim, pensamos que, uma sensibilização para a

compostagem seria útil e eficaz, visto ser um conceito muito bem aceite pelos consumidores que se encontram motivados por uma prática alimentar cada vez mais saudável e ambientalmente consciente. Esta informação também seria de interesse para os produtores, que teriam menos desperdício para dispor, uma melhor produtividade agrícola e um produto com maior interesse comercial.

4 – Conclusões e perspectivas futuras

A produção agrícola a nível mundial tem-se debatido com diferentes problemas e uma melhor adaptação das plantações a solos pouco férteis e o combate a agentes patogénicos deveria ser uma estratégia a aprofundar. Neste sentido, e assim como foi objetivo deste trabalho, destaca-se a valorização da reutilização de excedentes orgânicos e da prática da compostagem.

Ao longo deste trabalho demonstrou-se o benefício inerente aos compostos orgânicos na produção de culturas vegetais mais produtivas e do valor das substâncias húmicas neles presentes no desenvolvimento das plantas, no combate a agentes patogénicos e na estimulação de crescimento de microrganismos mutualistas.

Em ensaios de campo verificou-se a importância na seleção do composto e da dose aplicada. Ao nível de produtividade do morango, um composto de base vegetal como o Resíduos urbanos, apresentou resultados superiores comparativamente a um de origem animal (como o Guano), aumentando o número de morangos produzidos e o tempo de prateleira. No caso da alface, composto de algas destacou-se dos restantes ao produzir alfaces maiores, com mais e maiores folhas, com maior conteúdo em pigmentos fotossintéticos e com raízes mais longas e robustas. De uma forma geral verificou-se que a presença de um fertilizante orgânico é mais vantajosa que a ausência deste.

Já em ensaios *in vitro*, salientou-se o efeito que a origem do composto tem na qualidade dos extratos e nos seus efeitos. Quando avaliado o seu efeito direto em espécies vegetais (alface), os extratos húmicos do composto de algas tiveram uma influência muito positiva na produção de plântulas com maior desenvolvimento caulinar e radicular, e altas percentagens de germinação, algo paralelo ao observado no ensaio de campo. Salienta-se também, a interação por vezes negativa (antagonismo) da adição de ácidos fúlvicos (AF) com ácidos húmicos (AH); e da promoção de maior crescimento demonstrada pelos AH, assim como da sua similaridade de ação com a auxina no desenvolvimento radicular. Também se demonstrou a capacidade antimicrobiana contra agentes patogénicos como *Salmonella typhimurium*, *Xanthomonas arboricola*, *Diplodia corticola* e *Phytophthora cinnamomi*; e ao mesmo tempo promotora de crescimento de microrganismos mutualistas como *Penicillium citrinum* quer de extratos húmicos isolados, quer de macerados

aquosos dos compostos. Mais ainda, estes apresentaram influência no crescimento e na densidade do micélio, mas não apresentaram efeitos genotóxicos.

Este tipo de produtos não só já tem uma aplicabilidade comprovada em todos os critérios aqui analisados, como também ajudaria a produzir alimentos pelos quais o consumidor estaria disposto a pagar. A disseminação da prática de compostagem entre a população portuguesa não seria difícil, visto que uma boa parte desta já a pratica, reconhece os seus benefícios e é ambientalmente consciente, havendo um clima de motivação para maior adesão à prática. Deste modo, uma maior prática da compostagem seria de grande mais valia para a sociedade, ao levar a uma diminuição da deposição em aterros e diminuição do risco de incêndios em Portugal, contribuindo ao mesmo tempo positivamente para os agricultores que a pratiquem, com poucos custos associados. Prova-se assim, ser uma fonte de investimento viável a nível ambiental, social e económico.

Como perspetivas futuras, salientam-se diversas análises de interesse que ajudariam a compreender melhor os resultados aqui presentes, e a desvendar outros efeitos do uso destes compostos, macerados e extratos. No que toca ao ensaio de campo, a caracterizações do solo onde houve efeito dos compostos orgânicos usados, relativamente a mudanças físico-químicas e biológicas (microbiota) do mesmo, poderia ajudar a compreender melhor o efeito que estes compostos exercem nas alfaces e nos morangueiros. Em adição a isto, uma análise do efeito dos 4 compostos, nos parâmetros já vistos, e nos níveis de açúcar em morangos (tanto analiticamente como através testes de sabor com provas cegas), também seriam relevantes em avaliar fatores comerciais importantes para este fruto. Quanto aos ensaios *in vitro*, também seria de interesse avaliar possíveis efeitos dos macerados em culturas vegetais *in vitro* e em bactérias; quantificar a diminuição na densidade do micélio dos organismos filamentosos; e identificar os extrólitos produzidos por *Penicillium citrinum*. Além disto, de forma a averiguar a veracidade das estratégias aqui expostas para o combate aos agentes patogénicos descritos, poderiam estas ser testadas em situações de campo/ *in vitro*.

Este estudo foi importante porque, ao salientar os benefícios da utilização de fertilizantes orgânicos e de frações de substâncias que os compõem (extratos húmicos e macerados), procedendo a uma extensa avaliação do seu efeito em diferentes espécies de plantas e de microrganismos, ajudou a perceber que estes compostos e frações ativas constituem uma mais valia para a conceção e

implementação de estratégias eficazes para o aumento de produtividade vegetal, da qualidade alimentar e no combate a pragas e doenças e de um modo ambientalmente seguro.

Torna-se assim imperativo melhorar as atuais práticas agrícolas e a forma como encaramos o desperdício. É imperativo focar a nossa atenção na reutilização. E se assim for, no final do túnel, a luz de um futuro mais ecológico, pode vir de uma pilha de compostagem.

5 – Referências

- Abakumov, E. (2010). The sources and composition of humus in some soils of West Antarctica. *Eurasian Soil Science*, 43(5), 499-508.
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2018). Resíduos Urbanos Relatório Anual 2017. Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. Departamento de Resíduos.
- Afrin, S., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giampieri, F. Battino, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4435-4449.
- Agüero, M. V., Barg, M. V., Yommi, A., Camelo, A., Roura, S. I. (2008). Postharvest changes in water status and chlorophyll content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and their relationship with overall visual quality. *Journal of food science*, 73(1), S47-S55.
- Alavanja, M. C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., Knott, T., Hoppin, J.A., Barker, J., Coble, J. (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American journal of epidemiology*, 157(9), 800-814.
- Al-Faiyz, Y. S. S. (2017). CPMAS 13 C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 839–S853.
- Alrefai, J., Rovira, P., Alsewailem, F., Abaalkheel, I., Alsolami, A., Albishi, H., Alfantokh, S. (2015). Uncomposted sheep and cow manures as a source of commercial humic amendments: an exploratory study. *Communications in soil science and plant analysis*, 46(9), 1137-1156.
- Alvarez-Puebla, R. A., Valenzuela-Calahorro, C., Garrido, J. J. (2006). Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation. *Science of The Total Environment*, 358(1-3), 243–254.
- Arjenaki, F. G., Jabbari, R., Morshedi, A. (2012). Evaluation of drought stress on relative water content, chlorophyll content and mineral elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(11), 726-729.
- Ayesha, R., Fatima, N., Ruqayya, M., Qureshi, K. M., Hafiz, I. A., Khan, K. S., Kamal, A. (2011). Influence of different growth media on the fruit quality and reproductive growth parameters of strawberry (*Fragaria ananassa*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(26), 6224-6232.
- Barr, H.D., Weatherley, P.E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15, 413-428.
- Barradas, C., Phillips, A. J. L., Correia, A., Diogo, E., Bragança, H., Alves, A. (2016). Diversity and potential impact of Botryosphaeriaceae species associated with Eucalyptus globulus plantations in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 146(2), 245–257.
- Barreto, M., Critchley, A. T., Straker, C. J. (2002). Extracts from seaweeds can promote fungal growth. *Journal of Basic Microbiology*, 42(5), 302–310.

- Biondi E., Dallai D., Brunelli A., Bazzi C., Stefani E., (2009). Use of a bacterial antagonist for the biological control of bacterial leaf/fruit spot of stone fruits. IOBC/WPRS Bulletin, 43: 277-281.
- Bogaard, A., Fraser, R., Heaton, T., Wallace, M., Vaiglova, P., Charles, M., Jones, G., Evershed, R., Styring, A., Andersen, N., Arbogast, R., Bartosiewicz, L., Gardeisen, A., Kanstrup, M., Maier, U., Marinova, E., Ninov, L., Schafer, M., Stephan, E. (2013). Crop manuring and intensive land management by Europe's first farmers. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(31), 12589-12594.
- Bollag, J.M., Dec, J., Huang, P.M. (1997). Formation Mechanisms of Complex Organic Structures in Soil Habitats. Advances in Agronomy, (63), 237–266.
- Boudon, S., Manceau, C., Nottéghem, J.-L. (2005). Structure and Origin of *Xanthomonas arboricola* pv. pruni Populations Causing Bacterial Spot of Stone Fruit Trees in Western Europe. Phytopathology, 95(9), 1081–1088.
- Brownell, J. R., Nordstrom, G., Marihart, J., Jorgensen, G. (1987). Crop responses from two new leonardite extracts. Science of the Total Environment, 62, 491-499.
- Burdon, J. (2001). Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic?. Soil Science, 166(11), 752-769.
- Buzby, J.C., Wells, H.F., Hyman, J. (2014). The Estimated Amount, Value, and Calories of Postharvest Food Losses at the Retail and Consumer Levels in the United States. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Cabilovski, R., Manojlovic, M., Bogdanovic, D., Magazin, N., Keserovic, Z., Sitaula, B. K. (2014). Mulch type and application of manure and composts in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) production: impact on soil fertility and yield. Zemdirbyste-Agriculture, 101(1), 67-74.
- Cahill, D., Rookes, J., Wilson, B., Gibson, L., McDougall, K. (2008). *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. Australian Journal of Botany, 56, 279.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Façanha, A. L., Façanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. Plant physiology, 130(4), 1951-1957.
- Canellas, L.P., Martínez-Balmori, D., Médici, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C., Façanha, A., Olivares, F.L. (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). Plant Soil, 366, 119–132.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. Scientia Horticulturae, 196, 15-27.

- Canellas, L.P., Silva, S.F., Olk, D., Olivares, F.L. (2015). Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 13, 146–153.
- Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety, *Food and Energy Security*, 6, 48-60.
- Cheng, D.M., Pogrebnyak, N., Kuhn, P., Krueger, C.G., Johnson, W.D., Raskin, I. (2015). Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties. *PLoS One* 9(3): e91571.
- Coria-Cayupán, Y. S., Sánchez de Pinto, M. I., Nazareno, M. A. (2009). Variations in Bioactive Substance Contents and Crop Yields of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Cultivated in Soils with Different Fertilization Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10122–10129.
- Crump, J. A., Luby, S. P., Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346–353.
- Danthurebandara, M., Passel, S.V., Nelen, D., Tielemans, Y., Acker, K.V. (2012). Environmental and socio-economic impacts of landfills. *Linnaeus ECO-TECH 2012*, 40-52.
- Davies, G., Fataftah, A., Cherkasskiy, A., Ghabbour, E. A., Radwan, A., Jansen, S. A., Kolla, S., Paciolla, M.D., Sein, L.T., Buermann, W., Balasubramanian, M., Budnick, J., Xing, B. (1997). Tight metal binding by humic acids and its role in biomineralization †. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (21), 4047–4060.
- Diaz, L. F., De Bertoldi, M. (2007). History of composting. In *Waste Management Series*, Elsevier, 8, 7-24.
- Ekin, Z. (2019). Integrated Use of Humic Acid and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Ensure Higher Potato Productivity in Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 11(12), 3417.
- Elgailani, I., Elkareem, M., Noh, E., Adam, O., Alghamdi, A. (2017). Comparison of Two Methods for The Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) in Some Fruits. *American Journal of Chemistry*, 2(1), 7.
- El-Masry, M. H., Khalil, A. I., Hassouna, M. S., Ibrahim, H. A. H. (2002). In situ and in vitro suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 551-558.
- El-Mohamedy, R. S., Abd-El-Atif, F. M. (2015). Field application of humic acid and thyme essential oil for controlling late blight disease of tomato plants under field conditions. *Asian J Plant Pathol*, 9(4), 167-174.
- Eng, S.K., Pusparajah, P., Mutalib, N.S., Ser, H.L., Chan, K.G., Lee, L.H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.
- EPA. (2018). *Advancing Sustainable Materials Management: 2015 Tables and Figures. Assessing Trends in Material Generation, Recycling, Composting, Combustion with Energy*

Recovery and Landfilling in the United States. United States Environmental Protection Agency.

- Epstein, E. (1997). *The science of composting*. Routledge.
- FAO. (2003). *On-Farm composting methods*. Land and Water paper discussion, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO. (2017). *The future of food and agriculture – Trends and challenges*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Feifičová, D., Šnajdr, J., Siglová, M., Čejková, A., Masák, J., Jirků, V. (2005). Influence of humic acids on the growth of the microorganisms utilizing toxic compounds (comparison between yeast and bacteria). *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 59(10), 749-752.
- Félix, C., Pinto, G., Amaral, J., Fernandes, I., Alves, A., Esteves, A. C. (2017). Strain-related pathogenicity in *Diplodia corticola*. *Forest Pathology*, 47(6), e12366.
- Ferrante, A., Maggiore, T. (2007). Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of Valeriana leafy vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 73–80.
- García, A., Santos, L., Izquierdo, F., Sperandio, M., Castro, R., Berbara, R. (2012). Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, 47, 203-208.
- García, A.C., Souza, L.G.H., Pereira, M.G., Castro, R.N., García-Mina, J.M., Zonta, E., Lisboa, F.J.G., Berbara, R.L.L. (2016). Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Nature Scientific Reports*, 6, 20798.
- Gazula, A., Kleinhenz, M. D., Scheerens, J. C., Ling, P. P. (2007). Anthocyanin levels in nine lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars: Influence of planting date and relations among analytic, instrumented, and visual assessments of color. *HortScience*, 42(2), 232-238.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9–19.
- Gilliom, R., Barbash, J., Crawford, C., Hamilton, P., Martin, J., Nakagaki, N., Nowell, L., Scott, J., Stackelberg, P., Thelin, G., Wolock, D. (2006). *The Quality of Our Nation's Waters—Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992–2001*. U.S. Geological Survey Circular.
- GISD. (2019). *Global Invasive Species Database*. [online] Disponível em: http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php [Visitado a 24 Julho, 2019].
- Giusti, M., Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), Units F1.2.1-F1.2.13.

- Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., Sela, S. (2011). *Salmonella Typhimurium* internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 250–257.
- Goudeau, D. M., Parker, C. T., Zhou, Y., Sela, S., Kroupitski, Y., Brandl, M. T. (2012). The *Salmonella* Transcriptome in Lettuce and Cilantro Soft Rot Reveals a Niche Overlap with the Animal Host Intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 250–262.
- Grinhut, T., Hadar, Y., Chen, Y. (2007). Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews*, 21(4), 179–189.
- Gu, G., Cevallos-Cevallos, J. M., Vallad, G. E., Van Bruggen, A. H. C. (2013). Organically Managed Soils Reduce Internal Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Phytopathology*, 103(4), 381–388.
- Guo, X., Liu, H., Wu, S. (2019). Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. *Science of The Total Environment*, 662, 501-510.
- Hardham, A. R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 589–604.
- Hardham, A., Blackman, L. (2017). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 19, 260-285.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., Dębski, H. (2008). Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 68(1), 5–22.
- Hossain, M., Ryu, K. (2018). Effects of organic and inorganic fertilizers on lettuce (*Lactuca sativa* L.) and soil properties. *SAARC Journal of Agriculture*, 15(2), 93-102.
- Houbraken, J. A. M. P., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44(1), 117–133.
- Huang, P. M., Hardie, A. G. (2009). Formation mechanisms of humic substances in the environment. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter, in Environmental Systems* (Eds N. Senesi, B. Xing, PM Huang), 41-109.
- INE. (2018). *Estatística agrícola 2017*. Instituto nacional de estatística, ISSN 0079-4139.
- Jindo, K., Martim, S. A., Navarro, E. C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., Aguiar, N.O., Canellas, L. P. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil*, 353(1-2), 209–220.
- Jung, T., Colquhoun, I. J., Hardy, G. E. S. J. (2013). New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathology*, 43(4), 266–288.
- Kamel, S. M., Afifi, M., Elshoraky, F. S., Elsayy, M. M. (2014). Fulvic acid: A tool for controlling powdery and downy mildews in cucumber plants. *International Journal of Phytopathology*, 3, 101–108.

- Katsumi, N., Yonebayashi, K., Okazaki, M. (2016). Effects of heating on composition, degree of darkness, and stacking nanostructure of soil humic acids. *Science of The Total Environment*, 541, 23–32.
- Kerkeni, A., Daami-Remadi, M., Tarchoun, N., Khedher, M. B. (2007). In vitro assessment of the antifungal activity of several compost extracts obtained from composted animal manure mixtures. *International Journal of agricultural research*, 2(9), 786-794.
- Khan, S., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H., Suh, S., Hwang, S., Kim, J., Lee, I., Choo, Y., Yoon, U., Kong, W., Lee, B., Kim, J. (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology*, 8(1), 231.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19–34.
- Kleber, M., Johnson, M. G. (2010). Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter. *Advances in Agronomy*, 106, 77–142.
- Ko, W. H., Chang, H. S., Su, H. J. (1978). Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Transactions of the British Mycological Society*, 71(3), 496–499.
- Kolokassidou, C., Pashalidis, I., Costa, C. N., Efstathiou, A. M., Buckau, G. (2007). Thermal stability of solid and aqueous solutions of humic acid. *Thermochimica Acta*, 454(2), 78–83.
- Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease*, 98(12), 1600–1610.
- Lee J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269–1278.
- Lee, J.H., Felipe, P., Yang, Y.H., Kim, M.Y., Kwon, O.Y., Sok, D.E., Kim, H.C., Kim, M.R. (2009). Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*, 101 (8), 1246–1254.
- Leitão, A.L., 2009. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4), 1393–1417.
- Leitão, A., Enguita, F. (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological Research*, 183, 8-18.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology Series* (Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan), Academic Press, S. Diego, 148, 350.
- Linaldeddu, B. T., Scanu, B., Maddau, L., Franceschini, A. (2013). *Diplodia corticola* and *Phytophthora cinnamomi*: the main pathogens involved in holm oak decline on Caprera Island (Italy). *Forest Pathology*, 44(3), 191–200.

- Loffredo, E., Monaci, L., Senesi, N. (2005). Humic substances can modulate the allelopathic potential of caffeic, ferulic, and salicylic acids for seedlings of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9424-9430.
- Loffredo, E., Berloco, M., Casulli, F., Senesi, N. (2007). In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum*. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), 759-769.
- López, O., Hernández, A. F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Parrón, T., Villanueva, E., Pla, A. (2007). Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology letters*, 171(3), 146-153.
- Lynch, S. C., Eskalen, A., Zambino, P., Scott, T. (2010). First report of bot canker caused by *Diplodia corticola* on coast live oak (*Quercus agrifolia*) in California. *Plant Disease*, 94, 1510.
- Maksimovic, I., Putnik-Delic, M., Ilin, Z., Adamovic, B. (2014). The effect of storage conditions on concentration of vitamin C in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Research Journal of Agricultural Science*, 46 (2), 147-151.
- Marín, F., Santos, M., Diáñez, F., Carretero, F., Gea, F. J., Yau, J. A., Navarro, M. J. (2013). Characters of compost teas from different sources and their suppressive effect on fungal phytopathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1371-1382.
- Martin, D., Munck, I. (2017). *Diplodia corticola* "Bot Canker" of Oak. Pest Alert, United States Department of Agriculture.
- Moghadam, H., (2015). Humic acid as an Ecological Pathway to Protect Corn Plants against Oxidative Stress. *Biological Forum – An International Journal*, 7(1), 1704-1709.
- Moliszewska, E., Pisarek, I. (1996). Influence of humic substances on the growth of two phytopathogenic soil fungi. *Environment International*, 22(5), 579–584.
- Moreira, M., Santos, C., Lucas, A., Bianchini, F., Souza, I., Viégas, P. (2014). Lettuce production according to different sources of organic matter and soil cover. *Agricultural Sciences*, 05(02), pp.99-105.
- Mozumder, P., Berrens, R. P. (2007). Inorganic fertilizer use and biodiversity risk: An empirical investigation. *Ecological Economics*, 62(3-4), 538–543.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.
- Obsuwan, K., Namchote, S., Sanmanee, N., Panishkan, K., Dharmvanij, S. (2011). Effect of various concentrations of humic acid on growth and development of eggplant seedlings in tissue cultures at low nutrient level. *World academy of science, engineering and technology*, 80, 276-278.
- Oerke, E. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.

- Olivares, F., Busato, J., de Paula, A., da Silva Lima, L., Aguiar, N. Canellas, L. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 30.
- Our World in Data. (2019). Our World in Data. [online] Disponível em: <https://ourworldindata.org/> [Visitado a 2 Abril, 2019].
- Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M., Turkan, I. (2009). Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 487–492.
- Park, S.Y., Kim, R., Ryu, C.M., Choi, S.K., Lee, C.H., Kim, J.G., Park, S.H. (2008). Citrinin, a mycotoxin from *Penicillium citrinum*, plays a role in inducing motility of *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 229–237.
- Pavlou, G. C., Ehaliotis, C. D., Kavadias, V. A. (2007). Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 111(4), 319–325.
- Peña-Méndez, E., Havel, J., Patočka, J. (2005). Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 3(1), 13-24.
- Pepe, G., Sommella, E., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G.C., Scopa, A., Sofo, A., Marzocco, S., Adesso, S., Novellino, T., Campiglia, P. (2015). Evaluation of antiinflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; var. Maravilla de Verano). *Food Chemistry*. 167, 153–161.
- Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J. S. C. (1997). Reduction in soil loss from erosion-susceptible soils amended with humic substances from oxidized coal. *Soil Technology*, 10(3), 235–245.
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166(11), 810-832.
- Pincemail, J., Kevers, C., Tabart, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J. (2012). Cultivars, Culture Conditions, and Harvest Time Influence Phenolic and Ascorbic Acid Contents and Antioxidant Capacity of Strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Food Science*, 77(2), C205–C210.
- Pokhrel, B., Laursen, K. H., Petersen, K. K. (2015). Yield, Quality, and nutrient concentrations of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Sonata') grown with different organic fertilizer strategies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(23), 5578-5586.
- Poorter, H. (2002). Plant Growth and Carbon Economy. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Pope, F. D., Harper, L., Dennis-Smith, B. J., Griffiths, P. T., Clegg, S. L., Cox, R. A. (2010). Laboratory and modelling study of the hygroscopic properties of two model humic acid aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 41(5), 457–467.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, C., Ehlenfeldt, N., Kalt, M., Krewer, G., Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total

Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686–2693.

- Raosoft. (2019). Sample size calculator. [online] Disponível em: <http://www.raosoft.com/samplesize.html> [Visitado a 20 Setembro, 2019].
- REA. (2019). Incêndios florestais. Relatório do Estado do Ambiente. [online] Disponível em: <https://rea.apambiente.pt/content/inc%C3%AAndios-florestais> [Visitado a 2 Abril, 2019].
- Reganold, J. P., Andrews, P. K., Reeve, J. R., Carpenter-Boggs, L., Schadt, C. W., Aldredge, J. R., Ross, C.F., Davies, N.M., Zhou, J. (2010). Fruit and Soil Quality of Organic and Conventional Strawberry Agroecosystems. *PLoS ONE*, 5(9), e12346.
- Rivera, J. R. E., Stone, M. B., Stushnoff, C., Pilon-Smits, E., Kendall, P. A. (2006). Effects of ascorbic acid applied by two hydrocooling methods on physical and chemical properties of green leaf lettuce stored at 5 C. *Journal of Food Science*, 71(3), S270-S276.
- Roselló, M., Santiago, R. (2012). Current status of bacterial spot of stone fruits and almond caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 94,(Supplement 1) S1.15–S1.21.
- Santos, F. T., Goufo, P., Santos, C., Botelho, D., Fonseca, J., Queirós, A., Costa, M., Trindade, H. (2016). Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. *Food chemistry*, 209, 293-301.
- Sayyad-Amin, P., Jahansooz, M. R., Borzouei, A., Ajili, F. (2016). Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress. *Journal of biological physics*, 42(4), 601-620.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36, 662–669.
- Schoebitz, M., López, M. D., Serri, H., Martínez, O., Zagal, E. (2016). Combined application of microbial consortium and humic substances to improve the growth performance of blueberry seedlings. *Journal of soil science and plant nutrition*, 16(4), 1010-1023.
- Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., Mornhinweg, D. W. (1988). Water Relations in Winter Wheat as Drought Resistance Indicators. *Crop Science*, 28(3), 526.
- Senesi, N. (1992). Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of The Total Environment*, 123-124, 63–76.
- Seo, S., Aramaki, T., Hwang, Y., Hanaki, K. (2004). Environmental Impact of Solid Waste Treatment Methods in Korea. *Journal of Environmental Engineering*, 130(1), 81-89.
- Shahid, M., Duma, C., Silvestre, J., Pinelli, E. (2012). Effect of fulvic acids on lead-induced oxidative stress to metal sensitive *Vicia faba* L. plant. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 689–697
- Sharma, N., Singhvi, R. (2017). Effects of Chemical Fertilizers and Pesticides on Human Health and Environment: A Review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(6), 675.

- Silva, E.F., Lemos, L.T., Nunes, O.C., Cunha-Queda, A.C. (2014). Influence of the composition of the initial mixtures on the chemical composition, physicochemical properties and humic-like substances content of composts. *Waste Management*, 34, 21–27.
- Sinkpehoun, T., Yönter, G. (2018). Effects of Liquefied Humic Substances on Runoff, Soil Losses by Runoff and by Splash under Artificial Rainfall Conditions. *The Journal of Ege University Faculty of Agriculture*, 55(1), 59-65.
- Slamet, W., Purbajanti, E. D., Darmawati, A., Fuskhah, E. (2017). Leaf area index, chlorophyll, photosynthesis rate of lettuce (*Lactuca sativa* L) under N-organic fertilizer. *Indian Journal of Agricultural Research*, 51(4), 365-369.
- Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., Hettiarachchi, G. M. (2010). Fertilizer-Borne Trace Element Contaminants in Soils. *Trace Elements in Soils*, 135–154.
- Stefani E., 2010. Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 92, S1.99-103.
- Stenmarck, A., Jensen, C., Quested, T., Moates, G., (2016). Estimates of European food waste levels. *FUSIONS, Reducing food waste through social innovation*. European Commission.
- Stevenson, F. (1982). *Humus chemistry*. New York: Wiley.
- Strange, R. N., Scott, P. R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116.
- Stuthman, D. D., Leonard, K. J., Miller-Garvin, J. (2007). Breeding Crops for Durable Resistance to Disease. *Advances in Agronomy*, 319–367.
- Sundström, J., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases – a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*, 6(2), 201-215.
- Taiwo, A. (2011). Composting as A Sustainable Waste Management Technique in Developing Countries. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 93-102.
- Tanentzap, F. M., Stempel, A., Ryser, P. (2015). Reliability of leaf relative water content (RWC) measurements after storage: consequences for in situ measurements. *Botany*, 93(9), 535-541.
- Tikhonov, V., Yakushev, A., Zavgorodnyaya, Y., Byzov, B. Demin, V. (2010). Effects of humic acids on the growth of bacteria. *Eurasian Soil Science*, 43(3), 305-313.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292, 281–284.
- Tonutare, T., Moor, U., Szajdak, L. (2014). Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method—how to get true results. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 13(3), 35-47.

- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 635–643.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2010). Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12(4), 604-614.
- Udeigwe, T., Teboh, J., Eze, P., Hashem Stietiya, M., Kumar, V., Hendrix, J., Mascagni, H., Ying, T., Kandakji, T. (2015). Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. *Journal of Environmental Management*, 151, 267-279.
- United Nations. (2017). *World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables*. Department of Economic and Social Affairs, Population Division.
- Valdrighi, M. M., Pera, A., Agnolucci, M., Frassinetti, S., Lunardi, D., Vallini, G. (1996). Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 58(2-3), 133–144.
- WHO/FAO. (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*. WHO Technical Report Series, No. 916, Geneva.
- Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A.M., Schikora, A., Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 791.
- Wu, M., Song, M., Liu, M., Jiang, C., Li, Z. (2016). Fungicidal activities of soil humic/fulvic acids as related to their chemical structures in greenhouse vegetable fields with cultivation chronosequence. *Nature Scientific reports*, 6, 32858.
- WWF. (2012). *The 2050 Criteria: Guide to Responsible Investment in Agricultural, Forest, and Seafood Commodities*. World Wild Life (WWF) report.
- Xu, D., Deng, Y., Xi, P., Yu, G., Wang, Q., Zeng, Q., Jiang, Z., Gao, L. (2019). Fulvic acid-induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in table grapes may be mediated by regulating phenylpropanoid metabolism. *Food chemistry*, 286, 226-233.
- Zeng, K., Hwang, H., Yu, H. (2002). Effect of dissolved humic substances on the photochemical degradation rate of 1-aminopyrene and atrazine. *International Journal of Molecular Sciences*, 3(10), 1048–1057.

6 – Apêndice

6.1 - Apêndice 1 - **Planificação do questionário**

Sustentabilidade Agrícola

Olá! O meu nome é Celso Santos e estou de momento a realizar a tese de mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas, com o tema "Avaliação do efeito de compostos e respetivos extratos enriquecidos em substâncias húmicas e fúlvicas em ensaios à escala de campo e à escala laboratorial in vitro".

Com este questionário pretendo averiguar se a compostagem é conhecida do público e a frequência com que é praticada, assim como analisar alguns hábitos de compras.

Agradeço desde já a sua participação, está garantido o anonimato de todas as respostas. Não existem respostas certas ou erradas.

SEGUINTE

Página 1 de 6

Nunca envie palavras-passe através dos Google Forms.

Apêndice 1.1. Secção 1 do questionário.

Sustentabilidade Agrícola

Dados pessoais

Idade

A sua resposta

Género

Masculino

Feminino

Naturalidade

A sua resposta

Habilitações académicas

12º Ano ou inferior

Curso Técnico/Profissional

Licenciatura

Pós-Graduação

Mestrado

Doutoramento

Outra: _____

ANTERIOR

SEGUINTE

Página 2 de 6

Nunca envie palavras-passe através dos Google Forms.

Apêndice 1.2. Secção 2 do questionário.

Sustentabilidade Agrícola

*Obrigatório

Compostagem

Está familiarizado com o conceito de compostagem? *

- Sim
 Não

Qual o destino dos resíduos orgânicos produzidos em sua casa (restos de fruta e comida, excedentes de jardinagem, etc...)? *

- Compostagem doméstica
 Entrega de resíduos orgânicos/verdes para compostagem industrial
 Lixo comum
 Alimentação de animais
 Outra: _____

ANTERIOR SEQUINTE

Página 3 de 6

Nunca envia pesquisas através dos Google Forms.

Apêndice 1.3. Secção 3 do questionário.

Sustentabilidade Agrícola

*Obrigatório

Compostagem

Conhece alguém que faça compostagem? *

- Sim
 Não

Caso faça compostagem, qual a sua motivação?

À sua resposta

Enumere alguns benefícios inerentes à prática da compostagem.

À sua resposta

ANTERIOR SEQUINTE

Página 4 de 6

Nunca envia pesquisas através dos Google Forms.

Apêndice 1.4. Secção 4 do questionário.

Sustentabilidade Agrícola

*Obrigatório

Seleção de frutas e legumes

Quando compra frutas e legumes, qual/quais destes factores considera mais importantes? *

- Preço
- Aspeto
- Aroma
- Benefícios para saúde
- Origem/modo de produção orgânicos
- Outra: _____

Imagine que tem de escolher entre dois morangos de origens/modos de produção distintos. Um de origem orgânica, mas mais caro, e outro de modo de produção convencional e mais barato. Por qual dos dois optaria? *

- Mais caro
- Mais barato

Assumindo que os seus efeitos na saúde são idênticos, a produção do mais caro é ambientalmente mais sustentável. Por qual dos dois optaria? *

- Mais caro
- Mais barato

ANTERIOR SEQUINTE Página 5 de 6

Nunca envia pelos nossos e-mails da Google Forms.

Apêndice 1.5. Secção 5 do questionário.

Sustentabilidade Agrícola

Obrigado pela sua participação!

Reservamos este espaço para poder deixar eventuais observações, comentários, ou opiniões.

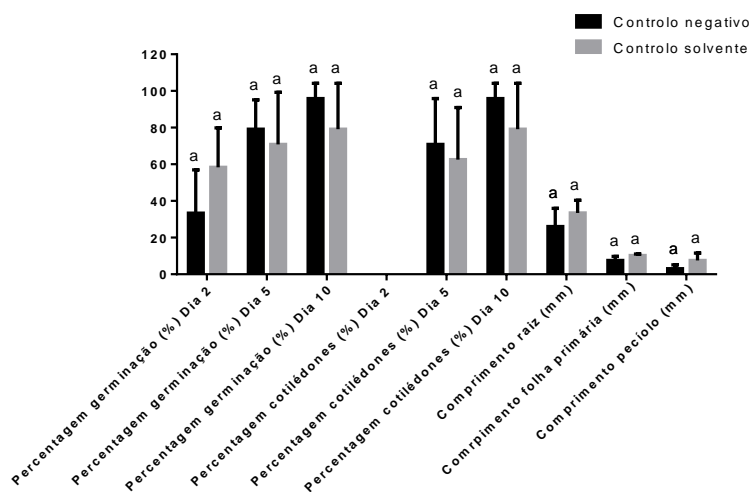
A sua resposta _____

ANTERIOR SUBMITER Página 6 de 6

Nunca envia pelos nossos e-mails da Google Forms.

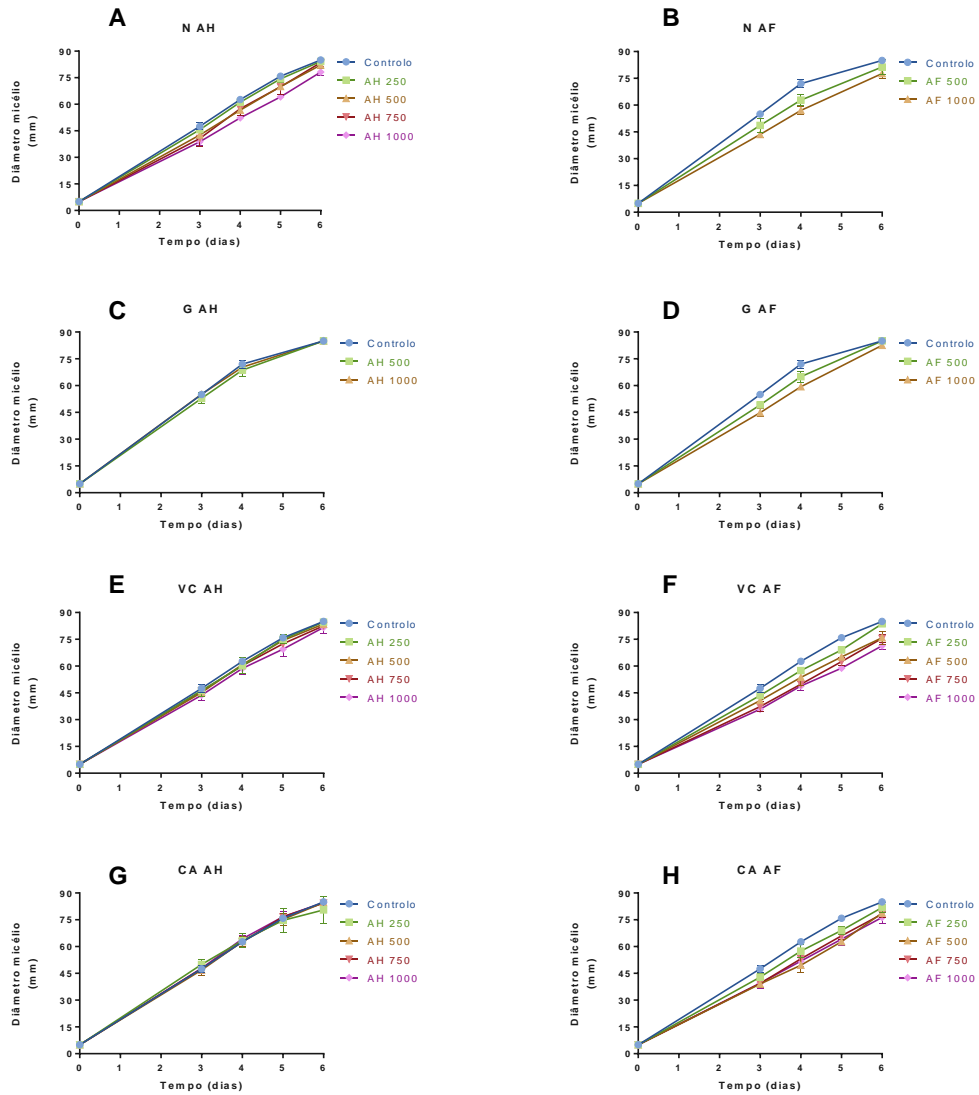
Apêndice 1.6. Secção 6 do questionário

6.2 - Apêndice 2 – Avaliação do efeito de diferentes controlos no crescimento de sementes de alface no ensaio *in vitro*

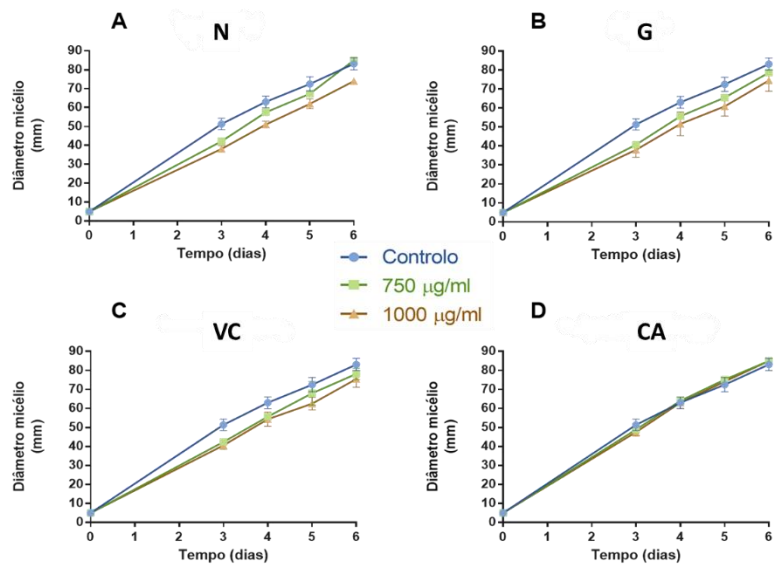


Apêndice 2. Comparação entre controlo negativo (apenas meio MS) e controlo solvente (meio MS + quantidade de solvente (NaOH 0,1 M) utilizada para dissolver os extratos à maior concentração) nos diferentes parâmetros avaliados (Porcentagem de germinação e de presença de cotilédones no dia 2, 5 e 10; e no comprimento da raiz, folha primária e pecíolo), em sementes de Alface cultivadas em meio MS no ensaio *in vitro*. Cada valor é representado sob a forma de média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas são representadas pela diferença de letras.

6.3 - Apêndice 3 – Avaliação do efeito de extratos húmicos em microrganismos



Apêndice 3.1. Crescimento do micélio de *Phytophthora cinnamomi* em meios de PGA com ácidos húmicos (AH) ou ácidos fúlvicos (AF), provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos (A e B), Guano (C e D), Vermicomposto (E e F) e Composto de Algas (G e H)) a diferentes concentrações (250, 500, 750 e 1000 µg/mL) em comparação com um controle.



Apêndice 3.2. Crescimento do micélio de *Phytophthora cinnamomi* em meios de PGA com substâncias húmicas (SH), provenientes de diferentes compostos (Resíduos urbanos (A), Guano (B), Vermicomposto (C) e Composto de Algas (D)) a diferentes concentrações (750 e 1000 µg/mL) em comparação com um controlo