



Cláudia Campos Pessoa

Licenciada em Bioquímica

**Biofortificação de Pêra Rocha em Cálcio:
Itinerário Técnico para a Produção e
Caracterização Química**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologias de Produção e Transformação Agro-Industrial

Orientador: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon,
Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo,
Professor Auxiliar com Agregação, Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa

Co-orientador: Prof.^a Doutora Maria Manuela Abreu da Silva,
GeoBiotec – Polo da FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa, Prof. Auxiliar –
FCT/UNL

Arguente: Doutor José Domingos Cochicho Ramalho, Investigador Auxiliar com
Habilitação – ISA/UL

Vogal: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon, Prof. Catedrático – FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2019

Cláudia Campos Pessoa

Licenciada em Bioquímica

**Biofortificação de Pêra Rocha em Cálcio: Itinerário Técnico
para a Produção e Caracterização Química**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologias de Produção e Transformação Agro-Industrial

Orientador: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon,

Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo,

Professor Auxiliar com Agregação, Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa

Co-orientador: Prof.^a Doutora Maria Manuela Abreu da Silva,

GeoBiotec – Polo da FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa, Prof. Auxiliar –
FCT/UNL

Arguente: Doutor José Domingos Cochicho Ramalho, Investigador Auxiliar com
Habilitação – ISA/UL

Vogal: Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon, Prof. Catedrático – FCT/UNL

© Cláudia Pessoa FCT-UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A presente dissertação foi redigida de acordo com o antigo acordo ortográfico.

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe.”

Aldous Huxley

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar, a oportunidade que me foi conferida para a realização deste projeto e pelo acompanhamento na minha jornada do meu orientador Professor Fernando Lidon e co-orientadores Professor Fernando Reboredo e Professora Maria Manuela Silva, cuja disponibilidade demonstrada permitiu uma aquisição e consolidação de conhecimentos que me acompanharão no resto do meu percurso.

Estendo os meus agradecimentos ao corpo docente do Departamento de Ciências da Terra, pela disponibilidade demonstrada e contributo para um ambiente de entreajuda e boa disposição, que se estendeu desde as saídas de campo, aos laboratórios, permitindo um conhecimento do ambiente académico para lá da “sala de aula”.

A dinâmica deste projeto, permitiu o contacto com novos ambientes para lá da Faculdade de Ciências e Tecnologia, razão pela qual gostaria de agradecer ao Sr. José Henriques e à empresa HBio Lda., pelo interesse neste projeto e conseguinte disponibilização do campo experimental, e acima de tudo, do “saber” e gosto pela produção de um produto tipicamente português.

Gostaria de agradecer à Doutora Paula Scotti, Doutor Nuno Alvarenga e Doutora Elsa Gonçalves, pelo constante apoio e disponibilidade demonstrados, revelados não só através da transmissão de conhecimentos, como através do esclarecimento de dúvidas.

Gostaria ainda de deixar um agradecimento especial à Isabel Pais que para além de colega de mestrado, se revelou um verdadeiro pilar de apoio cuja disponibilidade demonstrada, vontade de ajudar e acima de tudo ensinar, contribuíram para as recordações positivas que ficarão para sempre comigo desta fase da minha vida.

Aos meus colegas de mestrado, deixo um abraço especial pelo companheirismo e entre-ajuda dentro e fora da sala de aula, que contribuiu para a formação de um grupo unido e sempre bem-disposto.

Na duração deste projeto, senti que cresci enquanto pessoa, razão pela qual gostaria de deixar um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório, que sem dúvida estarão presentes nas minhas memórias. O constante bom ambiente, com os sorrisos, gargalhadas e acima de tudo apoio demonstrado nos momentos mais difíceis, contribuiu para um crescimento académico, mas ao mesmo tempo pessoal.

Para finalizar gostaria de agradecer à minha família pelo constante apoio e preocupação. Ao meu pai, pela preocupação e suporte demonstrados. Por último, gostaria de deixar um beijinho muito especial à minha mãe, sendo ela para mim a pessoa mais importante da minha vida, cujo apoio e acompanhamento demonstrado não conseguirão nunca ser descritos em palavras, pois para além do apoio e felicidade demonstrado nas situações de sucesso, posso afirmar que foi nas situações mais difíceis da minha vida que nunca me deixou sozinha, permitiu sim o meu crescimento facultando-me as “ferramentas” necessárias para me conseguir voltar a erguer e aproveitar cada momento da minha vida com um sorriso no rosto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, quero deixar o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A biofortificação visa o aumento dos teores de um dado nutriente-alvo nas partes edíveis das plantas, para colmatar défices nutricionais na dieta do Homem que podem resultar no desenvolvimento de patologias. Por sua vez, a pêra Rocha destaca-se como um produto tipicamente português cuja produção média anual atinge as 173000 ton.

Neste enquadramento, o objetivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de um itinerário técnico de biofortificação agronómica com recurso a aplicações foliares, visando a obtenção de pêra Rocha biofortificada em cálcio, cujo processamento, possibilitará a obtenção de alimentos funcionais.

O ensaio decorreu no campo experimental da HBio Lda. (coordenadas GPS 39° 23' 29,675''N; 9° 4' 52,396''O), localizado na região Oeste em Portugal. Efetuaram-se 7 aplicações foliares entre Maio e Agosto de 2018: as duas primeiras aplicações com recurso a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 (nas seguintes concentrações: 0 kg ha⁻¹, 0,1 kg ha⁻¹, 0,3 kg ha⁻¹, 0,6 kg ha⁻¹ e 0 kg ha⁻¹, 0,4 kg ha⁻¹, 0,8 kg ha⁻¹, 1,6 kg ha⁻¹ respetivamente), a partir da terceira aplicação aplicou-se apenas CaCl_2 em todas as árvores, primeiro com 4 kg ha⁻¹ e as restantes quatro aplicações com 8 kg ha⁻¹.

Inicialmente, procedeu-se à caracterização do campo experimental com análises ao solo e qualidade da água. Posteriormente realizaram-se análises aos frutos e folhas, obtidos nas 5 recolhas realizadas, nomeadamente: (1) no caso das folhas: parâmetros colorimétricos e quantificação de elementos minerais por Fluorescência de Raios-X; (2) no caso dos frutos: aspetos relacionados com a sua morfometria e colorimetria, quantificação de elementos minerais, e características físicas, químicas e organolépticas da polpa de pêra de cada tratamento.

Relativamente aos aspectos edafoclimáticos, apesar do ensaio experimental ter decorrido num ano de clima atípico, o solo e água do campo experimental evidenciaram-se compatíveis com a prática agrícola. A ausência de aspectos fitotóxicos nas folhas, indicam a ausência de danos resultantes da biofortificação na cultura das pereiras, não condicionado a absorção de Ca pela via foliar. Face ao itinerário de biofortificação aplicado, constataram-se teores superiores de Ca com acumulação heterogénea nas peras sujeitas a biofortificação, oscilando globalmente entre 3,6 e 14,3 %, prevalecendo no plano equatorial do fruto, teores que oscilam entre 33 e 67 %. A morfometria e colorimetria dos frutos, e por conseguinte, as propriedades físicas, químicas e organolépticas das polpas de pêra Rocha não foram afetadas pelo processo de biofortificação.

O processo de biofortificação agronómica foi bem-sucedido, pois não alterou os parâmetros de qualidades da pêra Rocha, solidificando o seu potencial com o aumento efetivo dos teores de Ca no fruto.

Palavras-chave: Biofortificação agronómica; Cálcio; Composição nutricional da pêra Rocha; *Pyrus communis* L. var. Rocha.

ABSTRACT

Biofortification aims to increase the levels of a given target nutrients in the edible parts of plants in order to suppress nutritional deficits in the human diet that may result in the development of pathologies. Rocha pear stands out as a typical portuguese product, whose average annual production reaches 173000 tons.

Under this background, this study consisted in the development of a technical itinerary of agronomic biofortification with the use of foliar applications, aiming to obtain Rocha pear biofortified in calcium, whose processing, will enable the food industry to develop functional foods.

The field trial was carried out in the orchard of HBio Lda. (GPS coordinates 39° 23' 29,675''N; 9° 4' 52,396''W), located in the west region of Portugal. Seven foliar applications were carried out between May and August 2018: the first two applications employed the use of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and CaCl_2 (in the following concentrations: 0 kg ha⁻¹, 0.1 kg ha⁻¹, 0.3 kg ha⁻¹, 0.6 kg ha⁻¹ and 0 kg ha⁻¹, 0.4 kg ha⁻¹, 0.8 kg ha⁻¹, 1.6 kg ha⁻¹ respectively), from the third application only CaCl_2 was applied in all the trees, first with 4 kg ha⁻¹ and the remaining four applications with 8 kg ha⁻¹.

Initially, the experimental field was characterized with soil and water quality analysis. Afterwards, the fruits and leaves picked five times along the productive cycle of this trees, were analyzed: (1) for leaves: colorimetric parameters and quantification of mineral elements by X-Ray Fluorescence; (2) for fruits: aspects related to their morphometry and colorimetry, quantification of mineral elements, and physical, chemical and organoleptic characteristics of the pear pulp for each treatment.

Regarding the edaphoclimatic aspects, although the experimental trial was carried out in a year of atypical climate, both soil and water of the experimental field were compatible with agricultural practice. The absence of phytotoxic aspects on leaves, indicates the absence of damage resulting from biofortification in the pear crop, not conditioning the Ca absorption by the leaf pathway. The biofortification of Rocha pear was successful, and for both quantification techniques, higher levels of calcium were observed in pears subjected to biofortification in relation to control pears, varying between 3,6 and 14,3 %, and in the equatorial section of the fruit, between 33 and 67 %. The morphometry and colorimetry of fruits, and therefore the physical, chemical and organoleptic properties of Rocha pear pulps weren't affected by the biofortification process.

The agronomic biofortification process was successful, because it didn't alter the quality parameters of Rocha pear, solidifying its potential with the increase of Ca levels in the fruit.

Keywords: Agronomic biofortification; Calcium; Nutritional composition of Rocha pear; *Pyrus communis* L. var. Rocha.

Índice de Matérias

Agradecimentos	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas	XIX
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	XXIII
1. Introdução	1
1.1 Pêra Rocha em Portugal e no Mundo	1
1.2 Biofortificação	6
1.2.1 Tipos de Biofortificação	9
1.3 Cálcio	14
1.3.1 Na Planta	14
1.3.2 No Homem	15
2. Materiais e Métodos	19
2.1 Localização do Campo Experimental	19
2.2 Monitorização das Condicionantes Meteorológicas	19
2.3 Adubação e Fitossanidade	19
2.3.1 Itinerário de Biofortificação Implementado no Campo Experimental	21
2.3.2 Fitofármacos, Fertilizantes e Fertirega do Campo Experimental	22
2.4 Recolha de Amostras de Solo	24
2.4.1 Determinação da Humidade e Matéria Orgânica do Solo	24
2.4.2 Determinação do pH e Condutividade Eléctrica do Solo	24
2.5 Qualidade da Água de Irrigação	25
2.6 Material Vegetal, Medição da Altura e Diâmetro, Densidade e Percentagem de Peso Seco dos Frutos	25
2.7 Determinação dos Elementos Minerais no Solo, Folhas e Frutos	26
2.7.1 Quantificação por Fluorescência de Raios-X	26
2.7.2 Quantificação por Absorção Atómica	26
2.8 Determinação dos Parâmetros Colorimétricos	26
2.8.1 CieLab	26
2.8.2 Colorímetro Espectrofotométrico de Varrimento	27
2.9 Determinação da Dureza, Teor de Sólidos Solúveis Totais e Acidez dos Frutos	27
2.10 Tratamento Térmico da Polpa de Pêra Rocha: Características Físicas, Químicas e Análise Sensorial	27
2.10.1 Processamento das Polpas	28
2.10.2 Avaliação do Comportamento Reológico das Polpas	28
2.10.3 Determinação dos Parâmetros Colorimétricos das Polpas	29
2.10.4 Determinação do pH e Teor de Sólidos Solúveis Totais das Polpas	29
2.10.5 Análise Sensorial	29
2.11 Análise Estatística	30
3. Resultados e Discussão	31
3.1 Caracterização do Campo Experimental e Meteorologia Durante o Ciclo de Produção	31
3.1.1 Caracterização do Solo	31
3.1.2 Propriedades da Água de Irrigação	37
3.1.3 Caracterização das Condições Meteorológicas	39
3.2 Quantificação de Cálcio e Restantes Elementos Minerais	42
3.2.1 Folhas	42
3.2.1.1 Monitorização Durante o Desenvolvimento Fenológico do Fruto	42

3.2.2 Frutos	46
3.2.2.1 Monitorização Durante o Desenvolvimento Fenológico do Fruto	46
3.2.2.2 Definição do Índice de Biofortificação em Cálcio do Fruto e Interações Nutricionais	49
3.2.2.2.1 Quantificação por Fluorescência de Raios-X	49
3.2.2.2.2 Quantificação por Espectrofotometria de Absorção Atómica	50
3.3 Morfometria e Colorimetria dos Frutos	51
3.3.1 Altura, Diâmetro, Densidade e Peso Seco	51
3.3.2 Dureza, Sólidos Solúveis Totais e Ácido Málico	54
3.3.3 Índices Colorimétricos	56
3.4 Características Físicas, Químicas e Organolépticas das Polpas de Pêra	62
4. Conclusões	65
5. Referências Bibliográficas	69
6. Anexos	77
Anexo I - Área Geográfica de Produção de Pêra Rocha do Oeste - DOP	77
Anexo II – Estados Fenológicos da Pereira	78
Anexo III – Micro - e Macronutrientes Necessários para a Manutenção do Bem-estar do Homem	79
Anexo IV – Esquema das Aplicações Foliaves Aplicadas no Campo HBio Lda.	80
Anexo V – Esquema de Amostragem de Solo no Campo Experimental da HBio Lda.	81
Anexo VI – Explicação do Diagrama de Piper e de Wilcox e do Índice de Langelier	82
Anexo VII - Funcionamento do Aparelho de Fluorescência por Aplicação de Raios-X	85
Anexo VIII - Soluções Padrão para Obtenção das Retas de Calibração dos Diferentes Elementos Analisados por Absorção Atómica	86
Anexo IX – Determinação de Índices Colorimétricos	87
Anexo X – Modelo Utilizado para a Realização da Análise Sensorial	88
Anexo XI – Efeitos do pH do Solo, na Disponibilidade de Vários Elementos Minerais para as Plantas	89
Anexo XII – Boxplot dos Diferentes Minerais Presentes nas Amostras de Solo Recolhidas do Campo HBio Lda.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Exemplar da Pêra Rocha.	2
Figura 1.2 - Área e Produção de Pêra (atualizado a agosto de 2018).	3
Figura 1.3 - Produção de pêra no mundo, numa base percentual, entre os anos de 2000 - 2017.	5
Figura 1.4 - Ilustração simplificada do melhoramento convencional, genético e biofortificação agronómica.	9
Figura 1.5 - Percentagem de diferentes grupos alimentares onde se recorre ao melhoramento genético e convencional (tipicamente associados à biofortificação genética).	11
Figura 1.6 - Percentagem de diferentes grupos alimentares onde se recorre a biofortificação agronómica.	13
Figura 1.7 - Metabolismo do cálcio.	18
Figura 2.1 - Localização do campo experimental HBio Lda. (coordenadas GPS: 39° 23' 28.997''N; 9° 4' 52.483''O) e pontos de amostragem de solo.	19
Figura 2.2 - Visualização de alguns aspectos do ciclo produtivo do pomar do campo experimental da HBio Lda. (em: A- 27/3/2018; B- 4/5/2018; C- 19/6/2018; D- 28/6/2018; E- 4/9/2018).	20
Figura 2.3 - Esquema da metodologia aplicada para a obtenção de duas polpas de pêra. Uma obtida a partir de amostras de pêra controlo (não sujeitas a nenhum tratamento de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou CaCl_2) e outras a partir de peras biofortificadas com CaCl_2 (tratadas inicialmente com CaCl_2 1,6 kg ha ⁻¹).	28
Figura 2.4 - Visualização da preparação de polpa de pêra Rocha submetida a tratamento térmico: (A) Controlo; (B) Biofortificadas com CaCl_2 (tratadas inicialmente com CaCl_2 (1,6 kg ha ⁻¹)).	28
Figura 3.1 - Boxplots da (A) Humidade do solo, (B) Matéria Orgânica, (C) pH e (D) Condutividade Eléctrica das amostras de solo (amostras colectadas a uma profundidade entre 0 - 30 cm; 600 – 1000 g) do campo experimental da HBio Lda., em 27 de Março de 2018 (n = 16).	31
Figura 3.2 - Amostras de solo provenientes do campo experimental da HBio Lda., após saída da estufa a 105 °C, durante 24 h, para subsequente cálculo do teor em humidade.	33
Figura 3.3 - (A) Projeção da composição da água do campo HBio Lda. em diagrama de Piper. (B) Projeção da composição da água do campo HBio Lda. em diagrama de Wilcox e classificação para uso agrícola, na classe C3S1. S1, S2, S3 e S4, representam, respectivamente, o perigo de alcalinidade baixo, médio, alto ou muito alto. C1, C2, C3 e C4, representam, respectivamente, o perigo de salinidade baixo, médio, alto e muito alto. Diagramas obtidos com AquaChem 2014.2.	38
Figura 3.4 - Temperaturas máxima e mínima diárias registadas em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental da HBio Lda.	39
Figura 3.5 - Humidade máxima e mínima diária registada em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental da HBio Lda.	39
Figura 3.6 - Precipitação acumulada diária em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental HBio Lda.	40
Figura 3.7 - Clima de Portugal Continental, segundo a classificação de Koppen.	40
Figura 3.8 - Aspecto visual das árvores e frutos da pêra Rocha no campo experimental, no dia 4 de Setembro (à colheita).	53
Figura 3.9 - Valores médios da dureza (n = 60), °Brix (n = 20) e acidez (n = 4) em sumo de pêra Rocha, de frutos de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda., obtidas à colheita, e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a, b, c, d indicam	

as diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).	55
Figura 3.10 - Média da transmitância colorimétrica ($n = 4$), na banda dos 450 – 650 nm, na epiderme (A) e na polpa (B) de frutos de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita).	62
Figura 3.11 - Resultados médios da análise sensorial das amostras de polpa de pêra Rocha controlo (a azul) e de polpa biofortificada inicialmente com CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$) (a vermelho).	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Concelhos produtores de Pêra Rocha do Oeste DOP.	2
Tabela 1.2 - Área e Produção de Pêra em Portugal (atualizado a agosto de 2018).	3
Tabela 1.3 - Principais 10 destinos de saídas de pêra em 2016 (atualizado a Agosto de 2018).	4
Tabela 1.4 - Características atribuídas aos frutos da variedade pêra Rocha.	6
Tabela 1.5 - Necessidades diárias de cálcio para cada faixa etária, gravidez e lactação.	17
Tabela 2.1 - Descrição das diferentes etapas de fertilização foliar, do ensaio implementado no campo experimental da HBio Lda., explicitando as fases, número de aplicações foliares, respetivas datas de aplicação e tratamentos aplicados.	21
Tabela 2.2 - Informação relativa à aplicação de fitofármacos em todos os tratamentos, durante o ciclo de produção no campo experimental da HBio Lda.	22
Tabela 2.3 - Informação relativa à aplicação de fertilizantes no solo e em sistema fertirrega no campo experimental da HBio Lda.	24
Tabela 3.1 - Caracterização sumária do solo (amostras colectadas a uma profundidade entre 0 - 30 cm; 600 – 1000 g) do campo experimental da HBio Lda., em 27 de Março de 2018 (n = 16).	31
Tabela 3.2 - Valores médios (n = 3) e respetivo erro padrão (E.P.) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo) da 1ª determinação efetuada no solo, registada após a determinação da percentagem de humidade. As letras a, b, c, indicam diferenças significativas de cada amostra de solo (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). As amostras A1, A2, A3 e A4, foram obtidas na linha A; B1, B2, B3 e B4, obtidas na linha B; C1, C2, C3 e C4, obtidas na linha C; e D1, D2, D3, D4, obtidas na linha D.	34
Tabela 3.3 - Valores médios (n = 3) e respetivo erro padrão (E.P.) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo) da 2ª determinação efetuada no solo, registada após a determinação da percentagem da matéria orgânica. As letras a, b, c, d, indicam diferenças significativas de cada amostra de solo (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). As amostras A1, A2, A3 e A4, foram obtidas na linha A; B1, B2, B3 e B4, obtidas na linha B; C1, C2, C3 e C4, obtidas na linha C; e D1, D2, D3, D4, obtidas na linha D.	35
Tabela 3.4 - Valores médios (n = 16) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo). A 1ª determinação foi registada após a aferição da percentagem de humidade, e a 2ª quantificação foi registada após determinação da percentagem da matéria orgânica.	35
Tabela 3.5 - Quantificação de elementos minerais constituintes do solo do campo experimental da HBio Lda.	36
Tabela 3.6 - Valores limite (em ppm) de metais pesados (Zn, Pb e Cu), em solos a diferentes pH.	37
Tabela 3.7 - Parâmetros físicos e químicos da água subterrânea, captada em furo profundo no campo experimental da empresa HBio Lda. (amostragem em 10 de Agosto de 2018).	38
Tabela 3.8 - Número de horas de frio entre 01 de Outubro de 2017 e 28 de Fevereiro de 2018 na região Oeste (análise do modelo numérico Aladin).	41
Tabela 3.9 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018 (após 2ª pulverização) e respetivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).	43
Tabela 3.10 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 15/6/2018 (após 3ª pulverização) e respetivo erro padrão (E.P.). As letras a, b,	

- c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 44
- Tabela 3.11** - Teor médio ($n = 3$) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 10/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 44
- Tabela 3.12** - Teor médio ($n = 3$) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 20/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 45
- Tabela 3.13** - Níveis de macro e micro-nutrientes em folhas de pereira colhidas no terço médio dos lançamentos do ano, na época usual de colheita (entre os 100 e os 110 dias após plena floração). Valores referidos à matéria seca a 100 - 105 °C. 46
- Tabela 3.14** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018 (após 2ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 47
- Tabela 3.15** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 15/6/2018 (3ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 47
- Tabela 3.16** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 10/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 48
- Tabela 3.17** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 20/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 48
- Tabela 3.18** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d, e indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 49
- Tabela 3.19** - Teor médio ($n = 3$) de macroatómos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 50
- Tabela 3.20** - Média ($n = 4$) da altura e diâmetro de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2ª, 3ª, e 4ª adubação foliar) e 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 52
- Tabela 3.21** - Média ($n = 4$) da densidade e do peso seco de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a indica ausência de diferenças significativas de cada

- parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 54
- Tabela 3.22** - Médias ($n = 4$) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – Luminosidade / brilho, a^* verde – vermelho e b^* azul – amarelo), utilizando o iluminante D_{65} de folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2^a, 3^a e 4^a adubação foliar) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 57
- Tabela 3.23** - Médias ($n = 4$) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – Luminosidade / brilho, a^* verde – vermelho e b^* azul – amarelo), utilizando o iluminante D_{65} , de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2^a, 3^a e 4^a adubação foliar) e 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 59
- Tabela 3.24** - Média da transmitância colorimétrica ($n = 4$), na banda dos 450 – 650 nm, na epiderme e na polpa de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a indica ausência de diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos a cada comprimento de onda (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 61
- Tabela 3.25** - Médias das características A) físicas - parâmetros colorimétrico ($n = 5$) CIELab (L – Luminosidade / brilho, a^* verde – vermelho e b^* azul – amarelo), utilizando o iluminante C, e viscosidade (índice de consistência, k; índice de escoamento, n) ($n = 3$) e B) químicas - pH e °Brix ($n = 3$), todas relativas à da polpa ($n = 3$) de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha (Controlo e Tratamento inicial com 1,6 kg ha⁻¹ de CaCl₂), do campo experimental da HBio Lda., submetida a tratamento térmico (90 °C / 10 min) e respectivo erro padrão (E.P.) As letras a, b indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). 63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP – Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha

APOROS - Associação Nacional contra a Osteoporose

CE – Condutividade Eléctrica

CIE – *Comission Internationale de Éclairage*

DOP – Denominação de Origem Protegida

e.g. – *Exempli gratia* (por exemplo)

E.P – Erro Padrão

FAO – Organização para a Alimentação e Agricultura / *Food and Agricultural Organization*

i.e – *id est* (isto é)

INE – Instituto Nacional de Estatística

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ISL – Índice de Saturação de Langelier

k – Índice de consistência

n – Índice de escoamento

pHe – pH de equilíbrio

SAR – Índice de Adsorção de Sódio

XRF – Fluorescência de Raios-X

1. INTRODUÇÃO

A sociedade atual debate-se com diversos problemas, relacionando-se um deles com o crescimento exponencial da população até 2050, ano em que se estima que a população mundial atinja os 9,1 mil milhões (FAO, 2009). Este aumento demográfico deverá ocorrer sobretudo nos países em desenvolvimento, a par do aumento da população urbana relativamente às zonas rurais, podendo ocorrer em paralelo com o aumento do poder de compra (FAO, 2009). Esta possibilidade poderá conduzir ao aumento do consumo de carne, frutas e vegetais, por comparação com outros produtos alimentares nomeadamente cereais, o que resultará num aumento de cerca 50 % do consumo de produtos agrícolas por comparação com o ano de 2013 (FAO, 2017).

Neste âmbito, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) destaca algumas questões fundamentais a serem consideradas pelas gerações atuais, para garantir não só o respectivo bem-estar mas também o das gerações futuras. Estas questões relacionam-se com a capacidade dos sistemas alimentares da atualidade satisfazerem as necessidades futuras da população mundial, e ainda se será possível atingir os valores pretendidos, tendo em conta o agravamento das alterações climáticas, aliado a crescentes pressões sobre os recursos terrestre e hídrico cada vez mais escassos (FAO, 2017). Perante este cenário, maximizar a eficácia das práticas agrícolas e minimizar o desperdício alimentar desde a matéria-prima até ao consumidor final adquire um valor acrescido.

Por outro lado, tem-se verificado, por parte da população uma preocupação crescente no momento da compra dos alimentos, decorrente de uma maior consciencialização na procura de produtos cujo o valor nutricional permita preservar o seu bem-estar. Esta consciencialização vai de encontro ao conceito de “*food security*”, visto por alguns autores como um dos maiores problemas da sociedade atual, sendo a respetiva ausência uma das principais causas de doenças e morte. Este passa não só por garantir o acesso de toda a população a quantidades suficientes de alimentos, mas que simultaneamente estes alimentos detenham elevado valor nutritivo e visem a satisfação das necessidades do indivíduo e garantam o seu bem-estar (Rao e Annadana, 2017). Desta forma, será determinante um combate à “fome escondida”, através do aumento da “*food security*” e o melhoramento dos níveis nutricionais dos alimentos ingeridos, permitindo em última análise, uma diminuição de custos relacionados principalmente com o setor da saúde (FAO, 2017; Sharma *et al.*, 2017).

Para a manutenção do bem-estar do ser humano são necessários no organismo 22 elementos minerais que podem ser obtidos através da dieta praticada pelo indivíduo (White e Broadley, 2009). A ocorrência de patologias envolvendo défices nutricionais é uma realidade que a sociedade atual tem de enfrentar, sendo que numa população de 6 mil milhões se observam deficiências de minerais, nomeadamente Fe (atingindo 60 % da população), Zn e I (30 %), e Se (15 %), sendo comum, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, deficiências de Ca, Mg e Cu.

O principal objetivo deste estudo, consiste no desenvolvimento de um itinerário técnico de biofortificação agronómica com recurso a aplicações foliares, para obtenção de pêra Rocha biofortificada em cálcio. Este trabalho visa permitir não só a obtenção de uma matéria-prima de valor acrescentado, como também possibilitar a obtenção de alimentos funcionais por parte da indústria alimentar. Este tipo de produtos, podem auxiliar na prevenção de doenças tais como a osteoporose, satisfazendo desta forma as necessidades de competitividade da cadeia agro-industrial nacional nos mercados internacionais.

1.1 Pêra Rocha em Portugal e no Mundo

Foi na Região Oeste, mais precisamente no concelho de Sintra, que em 1836 se identificou na Fazenda Rocha uma pereira com características distintas das restantes, sendo a partir dessa árvore que a variedade se espalhou pela Região Oeste de Portugal e mais tarde além-fronteiras (ANP, 2019).

Em 2003, foi conferida a Denominação de Origem Protegida (DOP) à Pêra Rocha do Oeste (ANP, 2019), fazendo desta a única variedade portuguesa com esta denominação (Salvador, 2015). Segundo a CODIMACO (2015), a Denominação de Origem Protegida é definida como “Nome de uma região ou de um determinado local que serve para designar um Produto agrícola ou um género alimentício. A produção, transformação, e elaboração do produto assim designado, ocorre na região geográfica delimitada e a sua qualidade ou características devem-se essencialmente ou exclusivamente ao meio geográfico.”



Figura 1.1 - Exemplar da Pêra Rocha. Fonte: ANP, 2019.

A produção de Pêra Rocha do Oeste DOP encontra-se delimitada a 29 concelhos, (**Tabela 1.1**) (**Anexo I**), atingindo cerca de 11 mil hectares (ANP, 2019).

Tabela 1.1 - Concelhos produtores de Pêra Rocha do Oeste DOP. Fonte: CODIMACO, 2015; PTQC, 2019.

Área Geográfica		
Alcanena	Ferreira do Zêzere	Rio Maior
Alcobaça	Leiria	Santarém
Alenquer	Lourinhã	Sintra
Arruda dos Vinhos	Mafra	Sobral de Monte Agraço
Azambuja	Marinha Grande	Tomar
Batalha	Nazaré	Torres Novas
Bombarral	Óbidos	Torres Vedra
Cadaval	Peniche	Vila Franca de Xira
Caldas da Rainha	Pombal	Vila Nova de Ourém
Cartaxo	Porto de Mós	----

A sua cultura é considerada como permanente, sendo definida segundo o INE (Instituto Nacional de Estatística) (2018a), como “culturas que ocupam a terra durante um longo período e fornecem

repetidas colheitas, não entrando em rotações culturais”. Para além de não se incluírem os prados e pastagens permanentes, no caso das árvores de fruto só são considerados os povoamentos que apresentem uma densidade mínima de 100 árvores.

Ao nível taxonómico, a pereira Rocha pertence ao reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Rosaceae*, género *Pyrus* e variedade “Rocha” (Naturdata, 2018). As árvores que permitem a obtenção desta variedade caracterizam-se pelo seu porte ereto, vigor médio e necessidade de polinizadoras, apresentando no período de Outubro a Fevereiro exigência de frio, precisando de uma exposição a cerca de 550 horas de frio com temperaturas inferiores a 7 °C.

Relativamente ao seu desenvolvimento fenológico, é possível observar os gomos de Inverno entre os meses de Novembro a Fevereiro, seguindo-se no período de Março a Abril, a ocorrência da floração após aparecimento dos botões florais. Nos finais de Abril ocorre a queda das pétalas, seguindo-se em Maio o vingamento (transformação da flor em fruto) do fruto. Posteriormente, em Junho e Julho ocorre o crescimento do fruto, iniciando-se o período de colheita em Agosto, geralmente a partir da segunda semana na região Oeste, podendo estender-se até Outubro (Agriw, 2017; ANP, sem data). **(Anexo II)**

Em Portugal, existem cerca de 5 000 produtores de pêra Rocha e durante a época de colheita participam nela diariamente cerca de 15 000 trabalhadores. Em Portugal, a produção média anual atinge as 173 000 toneladas de pêra Rocha (ANP, 2019).

Tabela 1.2 - Área e Produção de Pêra em Portugal (atualizado a agosto de 2018). Fonte: GPP, 2016.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Área (ha)	11 746	11 579	11 403	11 202	11 015	10 954	10 971	11 226	12 014	12 007	12 115	12 618	12 564
Produção (t)	129 316	174 554	140 441	172 199	200 040	176 764	230 447	116 287	202 483	210 009	141 186	137 805	202 277

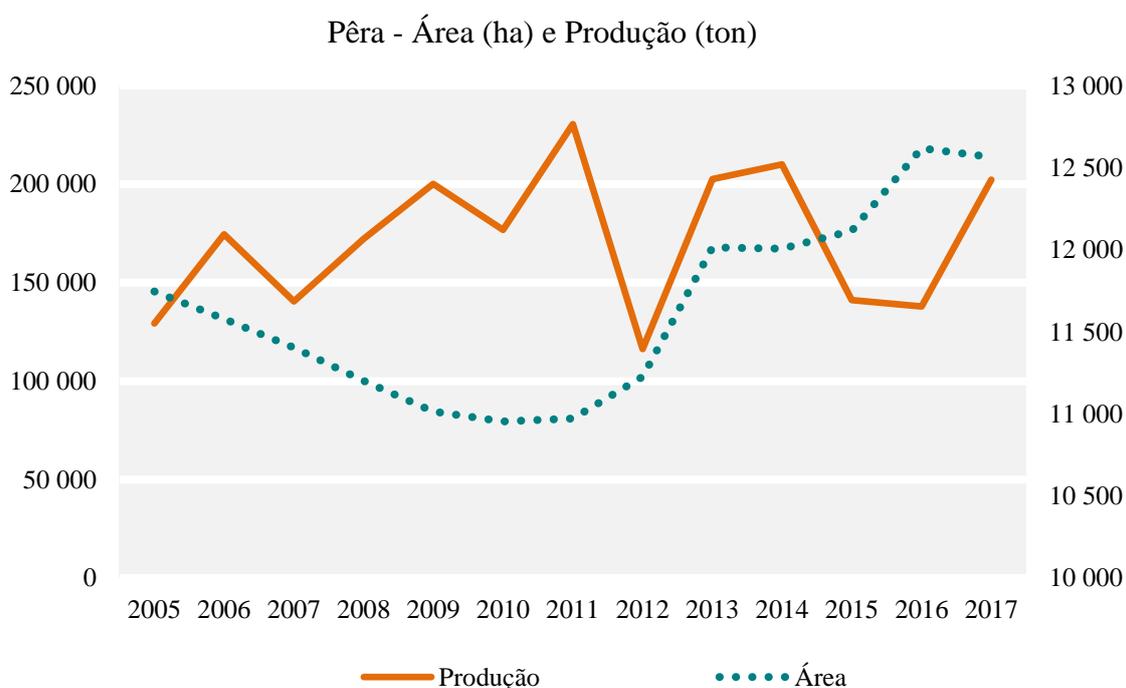


Figura 1.2 - Área e Produção de Pêra (atualizado a agosto de 2018). Fonte: GPP, 2016.

Após obtenção de matéria-prima de boa qualidade, a manutenção da mesma deve ser equacionada devendo a fase da colheita ser ponderada e realizada de forma cuidada, uma vez que a chegada das peras às câmaras de frio deve de ocorrer num período máximo de 24 horas. A data de colheita é ainda determinada com base nos seguintes parâmetros: Dureza da polpa (devendo obter-se valores entre 5,5 - 6,5 kg / 0,5cm²); Índice refratométrico (11 - 13 °Brix); Acidez (2 - 3 g L⁻¹ de ácido málico); Número de dias após plena floração (135 - 140 dias) e Cor das sementes (ANP, sem data).

Os produtores e comerciantes de pêra Rocha, orgulham-se da sua resistência ao manuseamento e transporte, conferindo a esta variedade a capacidade de permanecer no mercado durante praticamente todo o ano, sendo que, quando colocadas à temperatura ambiente, podem permanecer prontas para consumo durante 5 a 8 dias. Para tal, são aplicados fortes cuidados na colheita deste fruto e respetiva conservação. A título de exemplo salientam-se recipientes / caixas adequadas para a recolha e transporte, assim como técnicas adequadas de colheita que visem minimizar ferimentos na fruta. Na chegada à central fruteira, o armazenamento das peras deve de ser realizada em câmaras frigoríficas apresentando estas temperaturas entre -0,5 °C e 1 °C, com uma humidade mínima de 95 %. Quando o tempo de conservação ultrapassa 5 meses recorre-se a câmaras frigoríficas de atmosfera controlada em detrimento da atmosfera normal (ANP, sem data).

No caso de frutas cuja intenção seja uma comercialização a 2 - 3 meses após a colheita, justifica-se a aplicação de tratamentos pós-colheita (sendo autorizados: cloreto de cálcio, imazanil, iprodiona, ortofenilfenol e tiabendazol) que assegurem a manutenção das características organolépticas (ANP, sem data), devendo o modo de utilização e as doses respeitar as instruções presentes no rótulo.

Salienta-se a respetiva importância ao nível dos mercados externos, como sendo um dos produtos agrícolas nacionais mais exportados, destinando-se 60 % da produção nacional para os mercados internacionais. A exportação prevalece para a Alemanha, Brasil, França Reino Unido ou Marrocos (ANP, 2019).

Tabela 1.3 - Principais 10 destinos de saídas de pêra em 2016 (atualizado a Agosto de 2018). Fonte: GPP, 2016.

Principais países de destino	Quantidade (tonelada)
Brasil	30 252
Reino Unido	11 693
França	8 350
Alemanha	5 255
Espanha	4 456
Polónia	2 971
Irlanda	1 673
Canadá	1 126
Marrocos	762
Itália	731

Com base na **Figura 1.3**, podemos observar que no período compreendido entre 2000 e 2017, foi no continente asiático que se observou a maior produção de pêra, sendo a China o principal produtor mundial. Em seguida, surge o continente Europeu, onde a Itália se apresenta como o principal produtor deste fruto, sendo neste período o quarto maior produtor mundial.

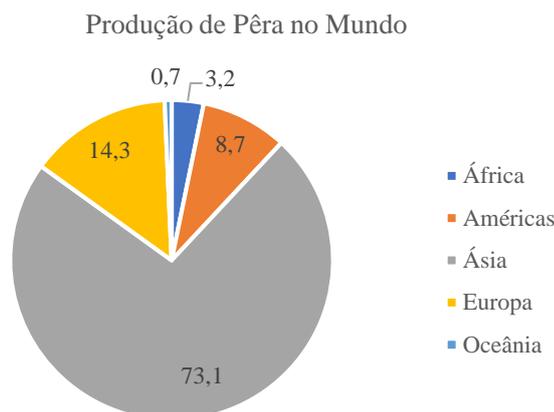


Figura 1.3 - Produção de pêra no mundo, numa base percentual, entre os anos de 2000 - 2017. Fonte: FAO, 2019.

Devido às suas características gerais, a pêra Rocha destaca-se ainda na indústria alimentar, podendo ser utilizada para a obtenção de sumos, batidos, néctares, licores, doces ou compotas, bolos, salada, fruta desidratada ou como acompanhamento de diversos pratos (ANP, 2019). No setor hortofrutícola, a indústria transformadora adquire um papel relevante, uma vez que labora com matérias-primas de origem perecível. Pode assim ocorrer um aproveitamento de frutos de menor calibre, após exclusão da comercialização em fresco, permitindo desta forma não só aumentar a diversidade da oferta de derivados de hortofrutícolas no mercado, como também, contribui para a diminuição do desperdício através do reaproveitamento, fator este com cada vez mais importante nos dias de hoje (Moraes, 2006).

As polpas de fruta, podem assim ser um produto derivado facilmente consumido por pessoas de todas as faixas etárias, sendo por sua vez considerado de “mais prático” consumo no dia-a-dia. Definem-se como a “parte comestível de frutos inteiros, eventualmente descascados ou sem sementes, podendo apresentar-se cortada em rodela ou esmagada, mas não reduzida a polme” (Decreto-lei 230/2003, de 27 de Setembro). Os polmes são semelhante às polpas, contudo são “reduzidas a polme por peneiração ou processo similar”, não apresentando assim pedaços (Decreto-lei 230/2003, de 27 de Setembro).

Como fruto, a pêra pode ser definida como um “fruto fresco, isento de qualquer alteração, com todos os seus componentes essenciais e no estado de maturação apropriado, depois de submetidos às operações de limpeza e de escolha” (Decreto-lei 230/2003, de 27 de Setembro). Em Portugal, a pêra apresenta-se como um fruto predileto, sendo consumido anualmente em média 6,2 kg por habitante (ANP, 2019).

Segundo a PortFIR (Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar) (2019), a pêra (tendo por base 5 variedades), pode apresentar uma parte edível de 78 %. Ao nível da sua composição (g / 100 g), em média a água destaca-se como componente maioritário (85,1 g), seguindo-se os glúcidos (9,4 g), fibras alimentares (2,2 g), lípidos (0,4 g), proteínas (0,3 g) e ácidos gordos (0,1 g). Outros componentes perfazem os restantes 2,5 g, nomeadamente vitaminas e minerais. Relativamente aos minerais destaca-se o K (150 mg), seguindo-se o P (10 mg), o Ca e o Mg (9 mg) e o Na (8 mg); no caso das vitaminas salienta-se a presença de vitamina C (3 mg). Por sua vez, segundo a ANP (2019), a pêra Rocha é constituída (valores médios por 100 g) na sua maioria por água (85,5 g), seguindo-se os hidratos de carbono (7,6 g), fibras dietéticas (1,7 g) e proteínas (0,2 g) apresentando apenas vestígios de gordura.

A pêra da variedade Rocha apresenta um formato oval e piriforme, um calibre dominante de 55 - 65 mm, uma polpa branca e uma epiderme fina e lisa. Esta exhibe uma cor predominantemente amarela ou verde clara. Apresenta uma carepa típica à volta do pedúnculo, sendo esta menos acentuada na zona apical, e possui suaves pontuações dispersas pela superfície do fruto (ANP, 2019).

Tabela 1.4 - Características atribuídas aos frutos da variedade pêra Rocha. Fonte: Adaptado de ANP, sem.data.

Características	
Forma	Variável (predominando: redonda ovada; redonda piriforme; piriforme ovada e oblonga piriforme); Fossa basilar inexistente (excepto na forma oblonga piriforme ovalada, em que se nota, embora pouco pronunciada); Fossa apical (muito pouca pronunciada com a coroa clara, de superfície lisa e roseta divergente).
Pedúnculo (médio)	Pode variar entre 28 - 33 mm. Lenhoso e fino.
Carepa	Característica típica desta variedade, presente independentemente da forma da pêra, variando a percentagem e concentração conforme as condições climáticas do ano. A carepa apresenta-se unida na base, dispersando-se irregularmente por toda a superfície, tendendo a concentrar-se na fossa apical.
Superfície	Lisa.
Cor da epiderme	Amarela e / ou verde claro (no lado exposto ao sol é possível o aparecimento de manchas ligeiramente rosadas). Pontuações evidentes da cor da carepa.
Calibre médio	Encontra-se entre os 60 – 65 mm, contudo pode variar entre 55 – 75 mm; Peso médio de 130 g.
Polpa	Branca, macia-fundente, granulosa, doce, não ácida, sumarenta. Muito sucosa e de perfume ligeiramente acentuado.
Poder de conservação	Excelente (por comparação com outras variedades).

1.2 Biofortificação

O recurso a uma dieta diversificada, suplementos nutricionais, alimentos fortificados ou biofortificados são quatro estratégias apontadas para o combater os défices de micronutrientes (Díaz-Gómes *et al.*, 2017).

Nos países desenvolvidos, a prática de uma dieta diversificada é facilitada e decorre de uma oferta variada, sendo que o nível de vida da maioria da população destes países permite ter acesso a escolhas variadas. Esta prática permite aumentar o número de fontes nutricionais e, idealmente, contribui para atingir os valores ideais dos diferentes nutrientes necessários ao bom funcionamento do ser humano. Contudo, nos países em desenvolvimento, a oferta alimentar é mais limitada, e as culturas locais por si só, podem não apresentar os teores nutricionais necessários para satisfazer as necessidades destas populações. Assim, as três estratégias restantes surgem como opções viáveis, razão pela qual se torna importante definir e distinguir os restantes três conceitos.

Segundo Díaz-Gómes *et al.* (2017), a fortificação é definida como “a prática para aumentar deliberadamente o conteúdo de um micronutriente essencial, melhorando assim a qualidade nutricional dos alimentos”. Esta constitui uma prática onde se recorre à adição de nutrientes aos produtos alimentares, sendo principalmente praticada pela indústria alimentar, nomeadamente na fase de transformação das matérias-primas para obtenção de um produto alimentar fortificado.

A fortificação configura uma das estratégias mais rentáveis a longo prazo (Singh *et al.*, 2016), sendo o custo associado à adição de um nutriente semelhante aos custos implicados aquando da aplicação de mais que um nutriente. Assim, o custo propriamente dito relaciona-se com a aquisição destes nutrientes, não com a operação de “adição” (desde de que se encaixe na lógica de um fluxograma). A utilização desta estratégia, prende-se assim, muitas vezes, com a perda destes nutrientes (originalmente presentes na matéria-prima) ao longo dos fluxogramas de fabrico, predominantemente devido ao uso de temperaturas elevadas no processamento dos alimentos.

Algumas das desvantagens associadas à fortificação encontram-se relacionados com a estabilidade limitada dos aditivos. Na indústria alimentar é possível a adição de substâncias a um dado alimento, contudo algumas destas podem ser termolábeis ou tornarem-se solúveis com o aumento de temperatura. Esta é uma questão a considerar sobretudo aquando da confeção de alimentos (*e.g.*, cozedura) por parte do consumidor. A degradação de aditivos pode ainda afetar as características organolépticas dos alimentos aos quais são adicionados, por exemplo através de reações de oxidação. Por último, mas não menos importante, a fortificação pode ser um método adequado para países desenvolvidos com acesso facilitado à tecnologia e a infraestruturas adequadas. Em contrapartida, nos países em desenvolvimento em que a alimentação se desenvolve em torno da agricultura de subsistência, o acesso, produção e distribuição destes produtos é dificultada (Singh *et al.*, 2016; Díaz-Gómez *et al.*, 2017).

A fortificação distingue-se assim como uma das formas disponíveis para combater as deficiências nutricionais nos países desenvolvidos. Contudo, a sua dependência do mercado acaba por excluir os indivíduos cuja disponibilidade financeira não lhes permite a aquisição de alimentos nestes canais de comercialização, não oferecendo uma solução a médio prazo. A biofortificação é assim apontada como uma estratégia complementar à fortificação (Singh *et al.*, 2016).

Ainda segundo Díaz-Gómez *et al.* (2017), a suplementação consiste na “entrega por via oral de micronutrientes na forma de comprimidos, ou formulações em pó que são dissolvidos antes da administração”, apresentando-se esta como a melhor solução a curto-prazo. Esta evidência resultada relativamente imediatos após o início do seu consumo, demonstrando uma eficácia superior quando correlacionado com outros tipos de intervenções na saúde das crianças e grávidas (Singh *et al.*, 2016).

A suplementação é utilizada nos países desenvolvidos para colmatar deficiências existentes em nichos da população, geralmente decorrentes de problemas específicos de saúde. Pelo contrário, nos países em desenvolvimento, é comum a existência destas deficiências sendo inclusive consideradas crónicas, razão pela qual a suplementação é incentivada nestes países. Porém deve considerar-se que apesar dos investimentos nesta estratégia se apresentarem inicialmente insignificantes por comparação com o benefício para a saúde, a implementação desta prática a longo prazo para populações, muitas das vezes marginalizadas, pode revelar-se insustentável. Aconselha-se nestes casos a implementação de estratégias de fortificação logo que possível.

Ambas estão dependentes dos investimentos governamentais na criação de infraestruturas e estratégias tendo em vista o melhoramento geral da saúde das populações. Porém a suplementação depara-se com mais um contratempo por comparação com a fortificação. A necessidade da toma dos comprimidos em intervalos regulares, poderá apresentar uma maior resistência por parte dos indivíduos, por comparação com a ingestão de alimentos fortificados (Singh *et al.*, 2016). Assim, a suplementação consiste, cada vez mais, num método usado em grávidas e crianças, para prontamente abordar e prevenir a ocorrência de défices, não sendo necessário o recurso à mesma durante longos períodos de tempo.

No caso da fortificação e suplementação, verifica-se um forte controlo das doses, para evitar situações de toxicidade. Perante este cenário, um dos problemas com o qual a biofortificação se depara, passa pela dificuldade em controlar a dose efetivamente fornecida ao indivíduo (Díaz-Gómez *et al.*, 2017).

Por outro lado, a biofortificação pode ser definida como “o processo através do qual ocorre o aumento da qualidade nutricional da cultura, através de práticas agronómicas, melhoramento convencional ou processos biotecnológicos modernos” (Díaz-Gómez *et al.*, 2017). Englobam-se assim processos que visem um aumento dos teores dos minerais como a sua presença nas partes edíveis das culturas-alvo (Singh *et al.*, 2016). Salienta-se ainda que esta prática não deve ter impacte negativo, no desempenho agronómico da planta e nas características que a tornam o produto apelativo perante os consumidores (Sharma *et al.*, 2017).

A otimização dos métodos de biofortificação podem constituir uma mais valia para as empresas do setor alimentar, permitindo a obtenção de matérias-primas biofortificadas. Estas possibilitam a confeção de produtos funcionais, com efeitos fisiológicos benéficos para a saúde, contribuindo para a

redução do risco de desenvolvimentos de doenças; ou relevante para a melhoria do estado de saúde ou bem-estar. Este aspecto pode incentivar o consumo por parte dos consumidores, indo de encontro à fusão da nutrição com o bem-estar do indivíduo, tendência cada vez mais prevaiente nos anos presentes.

Assim, tem-se verificado nos últimos anos um aumento da utilização de sistemas de biofortificação na agricultura, podendo consistir numa prática adequada para os países em desenvolvimento, cujo acesso a alimentos fortificados ou suplementos se apresenta dificultado. Uma vez obtida a cultura, nalguns casos não se verifica um aumento significativo dos custos recorrentes, para além daqueles associados à agricultura convencional, adequando-se nestes casos às zonas rurais onde a prática de uma agricultura de subsistência ainda é dominante (Díaz-Gómez *et al.* 2017).

A biofortificação está predominantemente centrada no enriquecimento vitamínico (*i.e.*, vitamina A) e micronutrientes (tais como Fe, I, Se, Zn, entre outros), decorrente de uma má-nutrição devido à baixa ingestão destes micronutrientes, sobretudo nos países em vias de desenvolvimento.

O HarvestPlus, é um exemplo de um programa de investigação e desenvolvimento que visa melhorar a nutrição e, por conseguinte, a saúde pública, promovendo culturas biofortificadas em vitaminas e minerais, tais como Zn, Fe e vitamina A, de forma a combater a denominada “fome escondida”. Esta é uma problemática predominante nos países em desenvolvimento, nomeadamente nas suas populações rurais (presentes nas áreas mais isoladas de África e a sul da Ásia) cujas possibilidades económicas condicionam o acesso à suplementação e a produtos fortificados, sendo a sua dieta dependente da agricultura de subsistência (HarvestPlus, 2019). Estes alimentos apresentam défices ao nível de vitaminas e minerais essenciais, devido às próprias culturas e / ou as condições edáficas locais, conduzindo a situações de subnutrição que podem levar a situações graves de saúde, incluindo cegueira, dificuldades de aprendizagem, morte prematura, entre muitas outras (HarvestPlus, 2019).

A biofortificação apresenta-se assim como um conceito que se distingue da fortificação, tendo por base a obtenção de culturas que apresentem teores superiores de vitaminas ou minerais, evitando ainda a necessidade de aumentar os mesmos na fase de processamento das matérias-primas. Este método pode ainda minimizar o uso de suplementos, necessários para suprimir as necessidades humanas, decorrentes de uma ingestão deficitária de certos nutrientes, que podem comprometer o correto funcionamento do organismo. Esta evidência permite assim utilizar a biofortificação em zonas rurais, por não estar diretamente dependente do desenvolvimento e presença de infraestruturas urbanas e da economia, ao contrário das outras duas (Singh *et al.*, 2016).

A biofortificação de culturas vegetais deve de ter em conta a presença de substâncias intituladas de “anti-nutrientes” como os fitatos ou oxalatos. Compostos naturalmente presentes nas plantas, que podem interferir com a biodisponibilidade dos nutrientes, podendo diminuir ou até mesmo inibir a sua absorção por parte do organismo (Sharma *et al.*, 2017). As estratégias de biofortificação devem assim passar pela minimização da concentração destas substâncias e ao mesmo tempo visar o aumento de substâncias “promotoras”, substâncias estas que estimulam a absorção dos minerais (nomeadamente, as vitaminas E, D, e provitamina A, auxiliam na absorção de nutrientes minerais como o Se, Ca, P, Fe e Zn) (Sharma *et al.*, 2017).

A par da anterior, algumas limitações com as quais a biofortificação se pode deparar encontram-se relacionadas com a susceptibilidade às alterações climáticas e processamento das matérias-primas pela indústria alimentar. No 1º caso, melhorar a produção e rendimento das culturas em cenários de escassez de água, preservando a qualidade da matéria-prima, apresenta-se cada vez mais como uma prioridade. No 2º caso facultar-se o exemplo dos cereais, onde os processos de moagem e polimento podem levar à perda de minerais essenciais como o Zn, Fe e Cu, que tendem a apresentar-se em maiores concentrações no farelo (Garg *et al.*, 2018). Adicionalmente, equacionando-se as necessidades dos países em desenvolvimento, devem efetuar-se estudos prévios que identifiquem as principais culturas desses países, “personalizando” os programas de biofortificação às necessidades reais da população e facilitando o enquadramento das mesmas nas suas práticas agrícolas do dia-a-dia (Díaz-Gómez *et al.*, 2017) e nas condições edafo-climáticas locais.

1.2.1 Tipos de Biofortificação

A biofortificação apresenta-se assim como uma alternativa viável e sustentável relativamente aos métodos de fortificação e suplementação. Esta permite não só minimizar custos ao nível industrial e dos sistemas de saúde, como o acesso das populações a produtos biofortificados, obtidos a partir de práticas agrícolas existentes nas regiões (Díaz-Gómez *et al.*, 2017).

Perante o objetivo de aumentar a quantidade de um nutriente-alvo nos alimentos visando melhorar a situação nutricional das populações-alvo, podem adoptar-se diferentes estratégias. Estas podem passar pelo uso de fertilizantes aos quais foi adicionado o nutriente em questão; ou melhorar o conteúdo nutricional das plantas com recurso a técnicas de melhoramento convencionais, combinando-a com técnicas de manipulação de DNA para obtenção de genótipos “feitos à medida” das necessidades (Sharma *et al.*, 2017). Dentro da biofortificação, podemos assim identificar três tipos: biofortificação agronómica, melhoramento genético e melhoramento convencional; envolvendo respetivamente o uso de fertilizantes, biotecnologia e cruzamentos de plantas (D’Imperio *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016; Garg *et al.*, 2018).

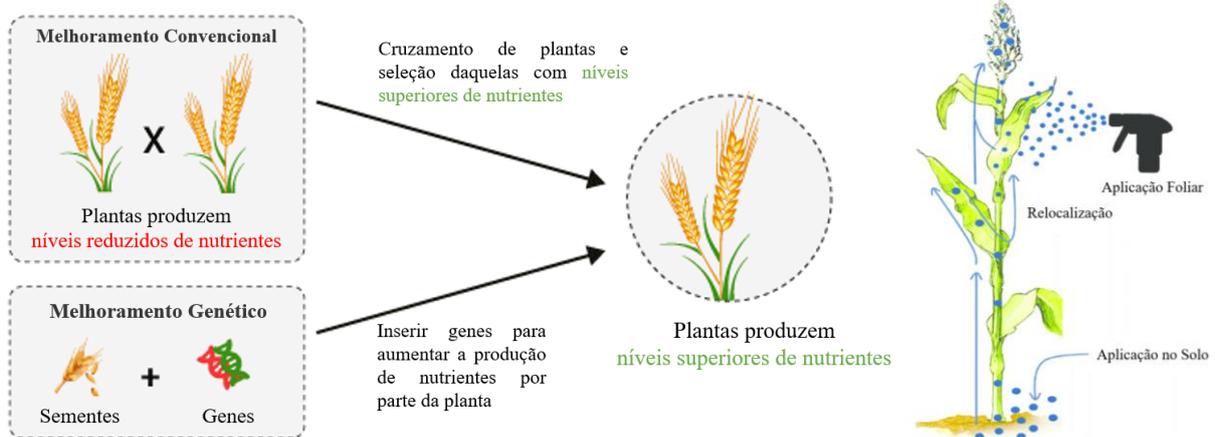


Figura 1.4 - Ilustração simplificada do melhoramento convencional, genético e biofortificação agronómica. Fonte: Adaptado de BY JUS, 2019; de Valenca *et al.*, 2017.

O melhoramento genético, assim como o convencional, podem por vezes ser englobados no termo “biofortificação genética”, pois ambos se baseiam no uso do material genético da planta para atingir o objetivo da biofortificação. Porém, como em seguida se encontra indicado (e com base na **Figura 1.4**), observa-se uma clara divergência entre estas duas formas de melhoramento (Garg *et al.*, 2018).

O melhoramento genético apoia-se fortemente nas novas tecnologias relacionadas com a manipulação do DNA, podendo recorrer à inserção destes mesmos genes (sem necessidade de serem da mesma variedade da cultura-alvo) alterando o código genético da cultura em estudo. Estas alterações podem passar por diferentes estratégias, tais como: o aumento de transportadores envolvidos nos processos de assimilação do nutriente em causa, levando ao incremento da eficiência dos processos bioquímicos; fomentar a redistribuição tecidual do nutriente escolhido; ou aumentar a concentração do mesmo nas partes edíveis da planta. Esta alteração do código genético da variedade em estudo, a fim desta expressar uma nova característica, contribui assim para o uso recorrente do termo “transgénico” na bibliografia (Garg *et al.*, 2018).

Perante a ausência natural de certos micronutrientes numa dada cultura-alvo, o recurso ao melhoramento genético é apontado como a única estratégia para a ocorrência do processo de biofortificação. Porém, para além de se observar a incorporação de genes a fim de aumentar as concentrações de certos nutrientes, outras variantes também podem ser contempladas por esta estratégia, abordando a questão da sua biodisponibilidade, e diminuição da presença de anti-nutrientes tal como referido mais à frente (Garg *et al.*, 2018).

Um maior investimento é observado na fase da investigação e desenvolvimento do produto. Contudo, posteriormente e a longo prazo, é apontada como uma das estratégias de biofortificação mais eficientes. Permite, por exemplo no caso dos cereais, o fornecimento de sementes o que viabiliza a sua implementação nos países em desenvolvimento por não exigir custos adicionais no seu cultivo (Garg *et al.*, 2018). Alguns autores salientam, porém, que estudos devem de ser efetuados em culturas transgênicas para garantir que a homeostase dos minerais, tomando por exemplo o Ca não é afetada, o que em última análise poderia resultar numa fragilidade da resposta da planta a certos stresses e conseguinte tolerância por parte da mesma (Dayod *et al.*, 2010; Hocking *et al.*, 2016).

Os alimentos transgênicos foram inicialmente apontados como uma das formas de diminuir a fome escondida, demonstrando casos de sucesso como o *golden rice* (abordando a deficiência em pró-vitamina A). Contudo, o facto de diferentes países terem optado por diferentes formas de regulamentação, constitui uma limitação para as culturas obtidas com base neste método. Por sua vez, observa-se ainda uma ligeira relutância por parte do consumidor, quando perante a opção de compra de um alimento transgénico. Nos países desenvolvidos, é mais notável esta tendência, decorrente não só dos possíveis efeitos que estes poderão originar na saúde do indivíduo (sendo uma descoberta relativamente recente, ainda não existe uma resposta definitiva referente a esta problemática), como das possíveis resistências e susceptibilidades a pragas que estes poderão apresentar. Desta forma, tratando-se de uma tecnologia “relativamente recente”, a ênfase nos estudos e acompanhamento a longo prazo deve de ser priorizada (Garg *et al.*, 2018).

O melhoramento convencional visa a melhoria de uma característica recorrendo a processos de cruzamento entre gerações iniciais e híbridos, e tirando proveito da variação genotípica da característica em estudo (Sharma *et al.*, 2017).

Esta apresenta-se como uma alternativa viável a outras estratégias, podendo tirar-se partido desta variabilidade para aumentar as concentrações de vitaminas e minerais na cultura. À semelhança do método anterior, os custos iniciais relacionados com a investigação e desenvolvimento são superiores, porém após o seu fornecimento aos agricultores, não é expectável a existência de custos adicionais para a manutenção da cultura. O programa HarvestPlus referido anteriormente utiliza esta estratégia de biofortificação para obtenção das suas culturas (Garg *et al.*, 2018).

Algumas desvantagens apontadas ao uso da técnica de melhoramento convencional, passam principalmente pelo tempo necessário para o desenvolvimento destes programas uma vez que tem de respeitar o ciclo vegetativo da cultura, razão pela qual se investe na tecnologia como forma de “acelerar” este processo. As fases iniciais deste tipo de projetos são realizadas em ambientes controlados a fim de minimizar as variáveis, e apenas posteriormente se procede à sua transferência para o campo. Outra limitação passa pela ausência de uma grande variabilidade genética de genes referentes a uma dada característica, dificultando e por vezes impossibilitando o uso deste método, sendo necessário o recurso ao melhoramento genético (cite-se a título de exemplo, o caso das oleaginosas) (Sharma *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2018).

O melhoramento genético e o melhoramento convencional, demonstram uma tendência para abordar a problemática da biodisponibilidade, recorrendo a duas linhas de atuação: uma visa a seleção a manipulação genética destas culturas para reduzir ou eliminar por completo os anti-nutrientes, enquanto a segunda se foca na seleção de genótipos com baixa concentração destes mesmos nutrientes (Sharma *et al.*, 2017). A comparação destas duas estratégias de biofortificação, advém do facto de ambas se basearem na alteração do genótipo da cultura-alvo, sendo também esta uma diferença para com a biofortificação agronómica. Da mesma forma se observa, que apenas a biofortificação agronómica não

é capaz de abordar a questão da biodisponibilidade dos minerais, focando-se principalmente no aumento das concentrações destes nas partes edíveis das plantas (Singh *et al.*, 2016).

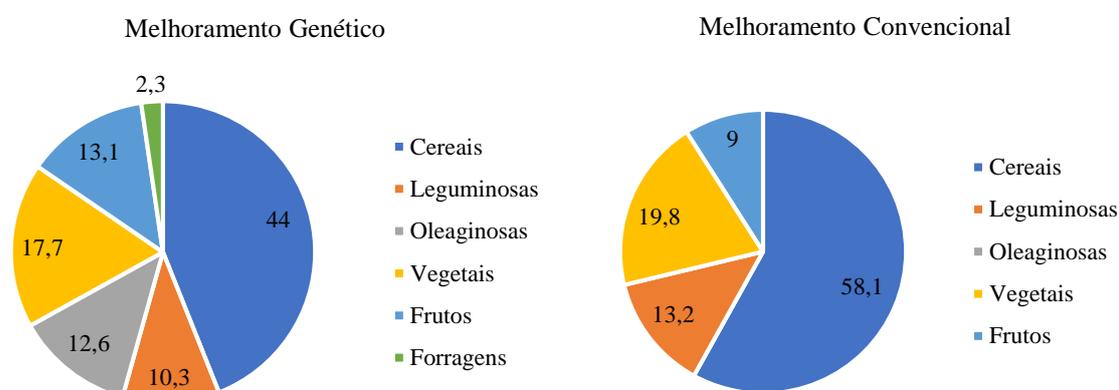


Figura 1.5 - Percentagem de diferentes grupos alimentares onde se recorre ao melhoramento genético e convencional (tipicamente associados à biofortificação genética). Fonte: Adaptado de Garg *et al.*, 2018.

Os cereais destacam-se como o principal alvo, quer do melhoramento genético, quer do melhoramento convencional, pois na sua maioria são culturas consumidas, a nível mundial, pela maioria da população (note-se que o arroz, trigo e milho são os mais abordados por ambos os melhoramentos). Seguem-se os vegetais, sendo um exemplo do melhoramento genético a mandioca, e do convencional a couve-flor. Posteriormente o melhoramento genético debruça-se sobre os frutos (sendo indicados a título de exemplo o tomate, maçã e banana) oleaginosas, leguminosas e forragens, enquanto o convencional apresenta trabalhos relacionados com as leguminosas e frutos (tomate, banana, manga e uva) (Garg *et al.*, 2018) (**Figura 1.5**).

A biofortificação agronómica por sua vez, recorre ao uso de aplicações foliares e / ou adubações de solo do elemento (ou mais) com que se pretende biofortificar a planta, de forma a que esta numa primeira fase os absorva e posteriormente canalize para os órgãos edíveis da planta, a fim de poderem ser encaminhados para o consumo humano (D'Imperio *et al.*, 2016). A biofortificação agronómica por recorrer ao uso de fertilizantes e aplicações foliares, vai implicar alguns custos relacionados com a sua aplicação, necessitando de mão-de-obra para o efeito, sendo uma desvantagem em comparação com os métodos de melhoramento genético e convencional. No caso particular dos fertilizantes, estes podem originar algumas preocupações, quer no processo de aquisição (não sendo muitas vezes acessíveis a população dos países em desenvolvimento, decorrente das questões económicas) conduzindo ao eventual aumento dos preços dos alimentos, quer nos impactes que estes podem ter no solo e por conseguinte, no ambiente (Singh *et al.*, 2016).

No entanto, a manutenção das culturas ao longo do seu ciclo vegetativo é uma das principais preocupações dos agricultores, a fim de garantir a qualidade dos seus produtos. A aplicação de nutrientes como forma de auxiliar a produção, visando a prevenção de défices de nutrientes na planta, é um dos motivos que conduziu ao uso de fertilizantes na agricultura. A aplicação de fertilizantes no solo é a prática mais comum, contudo identificam-se algumas limitações tais como: a presença de nutrientes complexados no solo, que originam formas insolúveis não permitindo a sua absorção por parte da planta, podendo conduzir à sua fixação no solo (sendo exemplos o P e K assim como a maioria dos micronutrientes tais como o Fe e Zn). Por outro lado, o N é um exemplo de um nutriente que sendo mais solúvel que os anteriores, fica sujeito a processos de lixiviação podendo afetar a sua disponibilidade nas áreas de absorção das raízes (Alshaal e El-ramady, 2017). Porém, o uso de fertilizantes pode constituir

uma vantagem da biofortificação agronômica face à biofortificação genética, pois pode auxiliar na minimização de défices identificados em solos pobres em certos minerais.

As aplicações foliares surgiram como uma opção aos fertilizantes aplicados nos solos, decorrendo da capacidade das plantas poderem absorver nutrientes através das folhas, e desta forma absorver mais nutrientes a partir da chuva. Assim, a aplicação de nutrientes pode passar não só a ser realizada de forma radicular, mas também de forma foliar, sendo considerado atualmente como um método comumente utilizado no fornecimento de nutrientes, beneficiando do facto da absorção nas folhas ser mais rápida e eficiente do que através das raízes (Alshaal e El-ramady, 2017).

Este tipo de “fertilização” encontra-se assim mais vocacionado para suprimir as necessidades da planta sem sobrecarregar o solo onde a mesma se encontra. Atribuem-se-lhe vantagens que se estendem desde a rapidez e eficiência de absorção (podendo ser 8 - 20 vezes mais eficiente que aplicações no solo), que para além de suprimir necessidades imediatas com vista a maximizar o crescimento e produção, pode minimizar efeitos negativos decorrente de défices observados; passando pela necessidade de menores concentrações dos produtos aplicados por não ter o solo como “intermediário”, evitando-se possíveis situações de fitotoxicidade decorrentes da aplicação de micro ou macronutrientes (Alshaal e El-ramady, 2017).

Para além da rapidez de absorção, permite ainda reduzir o tempo entre aplicações, sendo fundamental sobretudo na fase de rápido crescimento das plantas. Por outro lado, a aplicação foliar é apontada como economicamente viável em culturas arvenses ou vinhas, podendo ser inclusive utilizada em cereais (Taiz e Zeiger, 2003).

Na prática, ocorre a pulverização da parte aérea da planta, com uma solução na qual se encontra diluído um ou mais nutriente de interesse. O facto da maior parte dos nutrientes serem solúveis em água, contribui para uma nutrição mais personalizada, feita para colmatar as necessidades da planta, baseando-se a sua aplicação nos sintomas visuais ou análises realizadas aos tecidos foliares (ao contrário dos fertilizantes aplicados nos solos cujo o uso se baseia na análise do solo e não da planta) (Alshaal e El-ramady, 2017).

Perante o uso deste tipo de nutrição mineral, para que ocorra um processo de biofortificação eficiente, devem equacionar-se alguns fatores, nomeadamente: os períodos de aplicação, destacando-se o período de crescimento, que se apresenta fundamental para a máxima eficácia da aplicação foliar (uma vez que défices resultantes de stresses podem influenciar a mobilização dos recursos ao dispor da planta); relativamente aos fatores endógenos, salienta-se a estrutura anatómica da folhas, via pela qual ocorre a absorção; os fatores exógenos relacionam-se principalmente com o solo onde a cultura se encontra, tais como o seu tipo / componentes e pH; ou ambientais. Devem-se priorizar condições estáveis aquando da aplicação, sendo este período apontado na bibliografia como as primeiras horas da manhã (antes das 9 h) e posteriormente à tarde (após as 18 h), com vista a minimizar a evaporação da solução e conseguinte dificuldade de absorção (Taiz e Zeiger, 2003; Alshaal e El-ramady, 2017).

O cálcio à semelhança do Mn pode demorar cerca de um a dois dias para que ocorra uma absorção de 50 % através da folha, enquanto outros nutrientes como N ou K podem demorar respetivamente entre meia hora a 2 horas ou 10 a 24 horas, podendo inclusive atingir períodos de 10 a 20 dias como é o caso do Fe ou Mo (Alshaal e El-ramady, 2017). As aplicações foliares ou de fertilizantes contendo o ião Ca^{2+} , podem não só prevenir a ocorrência de défices de Ca na planta como auxiliar na prevenção de doenças, sendo que nas fases de pós-colheita permitem aumentar o “tempo de vida” (*shelf life*) do produto retardando por exemplo a perda de firmeza dos frutos, e conseguinte susceptibilidade à disseminação de doenças, contribuindo para a legitimação do uso deste método como instrumento de biofortificação (Dayod *et al.*, 2010).

Deve, contudo, salientar-se que, perante plantas que já apresentem um elevado valor nutricional, o recurso a aplicações foliares poderá tornar o alimento num produto de valor acrescentado, não apresentando necessariamente vantagens ao nível da qualidade e produção. Contudo, se por outro lado se recorrer às aplicações foliares como forma de obter culturas biofortificadas em micronutrientes que são deficitários na dieta humana, surge um produto funcional que pode justificar o custo empregue,

tendo em conta os benefícios que poderão advir para a saúde humana (Alshaal e El-ramady, 2017). A extrapolação desta forma de manejo da cultura para os macrominerais apresenta-se assim exequível, adquirindo uma importância ao nível do auxílio na prevenção de doenças decorrentes do défice de nutrientes.

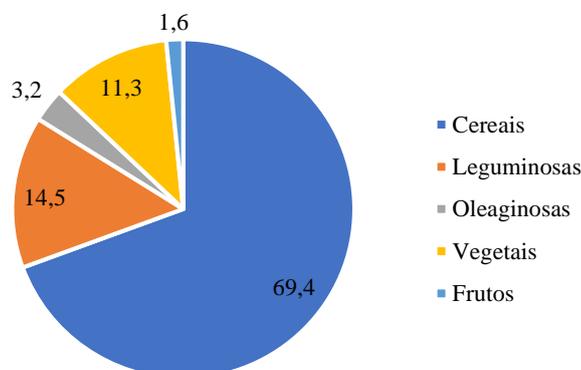


Figura 1.6 - Percentagem de diferentes grupos alimentares onde se recorre à biofortificação agronómica. Fonte: Adaptado de Garg *et al.*, 2018.

À semelhança dos dois métodos anteriores (**Figura 1.5**), ocorre uma forte aposta da biofortificação agronómica nos cereais como trigo, arroz, milho e cevada, relativamente a diferentes elementos, tais como Fe, Se, Zn, entre outros (Mourinho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Pataco *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2018; Lidon *et al.*, 2018; Manguenze *et al.*, 2018). No caso das leguminosas como a soja, feijão, ervilhas e grão-de-bico observam-se trabalhos de biofortificação com os minerais referidos anteriormente, destacando-se ainda trabalhos em vegetais como a batata, batata-doce, cenoura e alface (Garg *et al.*, 2018) (**Figura 1.6**). Os grupos das oleaginosas e das frutas apresentam respetivamente as menores percentagens, sendo que no caso da fruta, se destaca o tomate (Garg *et al.*, 2018). Contudo observam-se outros trabalhos com a uva (Bonomelli e Ruiz, 2010), sendo que foram inclusive efetuados estudos em maçãs relativamente à sua biofortificação em cálcio, obtendo-se resultados positivos, tornando credível a possibilidade da biofortificação de pêra Rocha em cálcio (Lidon *et al.*, 2014; Reboredo *et al.*, 2014). Alguns trabalhos relacionados com a aplicação de Ca na fase de pré-colheita em peras e a influência desta nas suas propriedades já indicam que pode ocorrer não só a acumulação de Ca no fruto (Gąstoł e Domagała-Świątkiewicz, 2009; Wójcik *et al.*, 2014), como também uma minimização da deterioração do mesmo numa fase de pós-colheita, conseguindo-se a extensão do tempo de preservação do fruto (Wang *et al.*, 2018), aliado a alterações positivas nas suas propriedades organolépticas, (*e.g.*, aroma) (Wei *et al.*, 2017).

A par da incapacidade de abordar as situações de biodisponibilidade por comparação com o melhoramento genético e convencional, a escolha da cultura a biofortificar agronomicamente adquire uma responsabilidade acrescida (uma vez que nem todas as culturas respondem da mesma forma aos programas de biofortificação), constatando-se uma quantidade reduzida de estudos com culturas arvenses. As limitações da biofortificação agronómica passam assim pelo seu sucesso variável, decorrente de uma dependência da mobilidade, e acumulação de minerais (distintas de cultura para cultura), e por vezes a própria composição do solo onde a cultura se encontra instalada (salientando-se o caso das culturas permanentes). Por outro lado, a necessidade da monitorização e utilização regular de fertilizantes ou aplicações foliares torna-a um método com um maior custo e mão-de-obra associado, podendo tornar este método inapropriado para populações de países em desenvolvimento. Por outro lado, existe a possibilidade da acumulação dos elementos minerais ocorrer noutras partes da planta que não as edíveis. Razão pela qual se sugere fortemente a implementação de estudos de monitorização, a fim de otimizar o binómio mineral escolhido e cultura-alvo (Garg *et al.*, 2018).

1.3 Cálcio

Perante o crescente interesse demonstrado na obtenção de produtos funcionais que auxiliem na prevenção de doenças no ser humano, a biofortificação de alimentos de origem vegetal (particularmente das suas partes edíveis) com nutrientes minerais, assume-se como sendo uma opção viável para atingir este objetivo.

A ingestão de nutrientes é essencial para que o organismo possa assegurar a sua formação, crescimento, reprodução, trabalho e manutenção fisiológica. É possível identificar dois grupos de nutrientes: macronutrientes, que são necessários em grandes quantidades por parte do organismo (grupo que integra glícidos, proteínas e lípidos, apresentando-se como nutrientes capazes de fornecer energia ao organismo); micronutrientes, necessários em baixas quantidades (dos quais fazem parte as vitaminas e minerais, destacando-se pelo seu papel de regulação do organismo) (APN, 2019; FAO, sem data).

O organismo humano, por sua vez, necessita dos minerais em diferentes quantidades, razão pela qual podemos identificar dois grupos: no grupo dos macrominerais, encontram-se aqueles cujo o organismo necessita em maior quantidade, exigindo valores superior a 100 mg / dia, sendo o Ca, P, K, Na, Mg e Cl, alguns exemplos; por sua vez, os microminerais são exigidos em menor quantidade, com valores inferiores a 100 mg / dia, destacando-se a título de exemplo minerais como o Zn, Cu, Fe, Se e I (APN, 2019; FAO, sem data).

Dos 16 minerais essenciais (**Anexo III**), cinco deles (I, Fe, Zn, Ca e Se) apresentam-se em quantidades limitadas na maioria dos alimentos, pelo que uma dieta pouco variada pode facilmente originar deficiências nutricionais. Apesar de ser nos países em desenvolvimento que se verifica a prevalência deste tipo de deficiências, no caso do Ca, também nos países desenvolvidos se observa a mesma (Singh *et al.*, 2016).

Neste âmbito, o Ca apresenta-se como um macromineral essencial não só para as plantas como para os animais, evidenciando funções fundamentais quer a nível estrutural quer de sinalização (Dayod *et al.*, 2010; Hocking *et al.*, 2016), apresentando-se como um dos elementos mais abundantes no corpo humano (EFSA NDA Panel, 2015; Singh *et al.*, 2016).

1.3.1 Na Planta

Os elementos essenciais podem ser definidos como “aqueles cuja ausência impede a planta de completar o seu ciclo de vida” (Taiz e Zeiger, 2003). Tal como referido anteriormente, o Ca é um macromineral fundamental para as plantas, sendo os seus íons utilizados para manter a estabilidade das membranas e parede celular (permitindo a manutenção da integridade da célula), assim como participar nalguns processos de sinalização intracelular (Dayod *et al.*, 2010).

Desta forma, o défice deste nutriente na planta pode diminuir não só a tolerância a stresses bióticos (patogénios) e abióticos (*e.g.*, frio, salinidade, regulando situações de aclimação com recurso a sinalização, ou na prevenção da integridade das paredes celulares perante situações de salinidade elevada), como também pode induzir necrose (nomeadamente nos tecidos com menor transpiração) e uma diminuição da qualidade e produtividade da cultura em causa (Dayod *et al.*, 2010). Quando as deficiências advêm de um elemento essencial que tende a ser imóvel, é nas folhas mais recentes que se observam os primeiros sinais de alarme. Portanto quando o elemento é relativamente móvel, estas alterações evidenciam-se nas folhas mais antigas (Taiz e Zeiger, 2003). Por outro lado, excessos de Ca podem originar toxicidade ao nível celular ou uma rigidez excessiva das paredes celulares (Hocking *et al.*, 2016).

Nos solos, o Ca apresenta-se como o terceiro nutriente disponível mais importante (D'Imperio *et al.*, 2016), sendo a calcite, dolomite e gesso indicadas como a sua principal fonte (Kabata-Pendias,

2011). O cálcio pode assim ser absorvido a partir do solo pela raiz através de diversos canais permeáveis ao Ca^{2+} , quando este se encontra na forma de ião solúvel Ca^{2+} , sendo nesta fase que a água se torna o meio que possibilita a sua absorção (fundamental no caso do Ca por comparação com outros nutrientes) (Dayod *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2017).

A planta encontra-se constantemente absorvendo e perdendo água, sendo a sua maioria usada nas folhas através do processo de transpiração, que constitui um meio da planta dissipar calor. Por outro lado, o fluxo transpiratório estimula a absorção de água e nutrientes minerais na zona das raízes, assim como a sua translocação para todas as partes da planta. A água apresenta-se assim como um dos recursos necessários para o crescimento e funcionamento da planta, assim como para a produtividade (Taiz e Zeiger, 2003). Reforça-se assim que aquando do uso de fertilizantes, deve-se equacionar o uso de sistemas de rega a fim de maximizar a eficácia da absorção dos nutrientes-alvo. Por outro lado, no caso das aplicações foliares devem evitar-se os períodos do dia em que a evaporação da solução aplicada seja alta.

Após contacto com as células da raiz, o ião (Ca^{2+}) pode atingir o xilema por via simplástica ou apoplástica, sendo que neste último caso, as bandas de Caspari bloqueiam esta via de absorção (Sharma *et al.*, 2017) (**Anexo IV**). Posteriormente, verifica-se a tendência para 1) tecidos que sejam principalmente irrigados pelo xilema e apresentem taxas de transpiração mais elevadas (como é o caso das folhas), apresentam concentrações mais elevadas de Ca e 2) tecidos onde predomine a irrigação do floema (tecidos responsáveis pela translocação da seiva elaborada, ou seja, dos produtos resultantes da fotossíntese das folhas maduras para locais de crescimento ou armazenamento) e taxas de transpiração inferiores (como é o caso dos frutos) demonstrem menores concentrações de Ca (Taiz e Zeiger, 2003; Dayod *et al.*, 2010; Pinto e Ferreira, 2015; Hocking *et al.*, 2016). Aquando da entrada do Ca^{2+} nas células, este é encaminhado para diferentes organelos, de entre os quais se destaca o vacúolo (Taiz e Zeiger, 2003; Dayod *et al.*, 2010).

Contudo, quando o Ca passa para as células, a sua remobilização não é imediata, apresentando-se como um ião relativamente imóvel, sobretudo quanto mais afastado estiver dos locais de transpiração, podendo não ser imediatamente transportado das partes mais maduras da planta para os locais de crescimento, originando défices “locais” apesar da sua eventual abundância (Taiz e Zeiger, 2003; Dayod *et al.*, 2010).

Os frutos são o órgão das plantas aos quais se confere mais atenção, uma vez que constituem uma das matérias-primas de elevado interesse na indústria alimentar, razão pela qual se deve efetuar uma monitorização atenta do mesmo. No decorrer do desenvolvimento do fruto, o fornecimento de água e nutrientes sofre alterações (Hocking *et al.*, 2016). Este apresenta-se como um tecido onde a taxa de transpiração é reduzida, e observamos que à medida que os frutos se desenvolvem, a funcionalidade do xilema nestes tecidos tende a diminuir, passando a predominar o floema. A fraca mobilidade de Ca^{2+} no floema pode originar situações de défice deste ião no fruto. Perante este cenário, a fim de aumentar a concentração de Ca nos frutos, seria de priorizar a aplicação de Ca nas fases iniciais do desenvolvimento do fruto, de forma a usufruir do Ca transferido através do xilema (Dayod *et al.*, 2010; Hocking *et al.*, 2016).

1.3.2 No Homem

No organismo humano, o Ca desempenha funções relacionadas com a massa óssea do indivíduo, assumindo inclusivamente um papel estrutural relacionado com a rigidez, força e elasticidade dos tecidos, sendo por isso considerado um dos minerais mais importantes para o organismo humano. Encontra-se na sua maioria (99 % do total de Ca corporal) nos ossos e dentes, constituindo um componente integral do esqueleto humano, razão pela qual o osso é considerado um “reservatório de cálcio”, contribuindo para a homeostase mineral do organismo decorrente de processos de formação e reabsorção óssea (EFSA NDA Panel, 2015; PNPAS, 2019).

O restante 1 % do total de Ca corporal destaca-se como mensageiro intracelular, sendo fundamental ao nível das funções fisiológicas relacionadas com a regulação de processos metabólicos (tais como: contração vascular e muscular, vasodilatação, ativação enzimática, e função hormonal), apresentando-se igualmente necessário ao nível da coagulação sanguínea e transmissão do impulso nervoso (EFSA NDA Panel, 2015; PNPAS, 2019).

Verifica-se que os processos de absorção e reabsorção óssea variam ao longo do ciclo de vida do indivíduo, constatando-se uma taxa de formação / deposição superior à de reabsorção nos primeiros anos de vida, resultando numa deposição de tecido ósseo auxiliando a fase de crescimento. Por sua vez, com o avançar da idade, este processo tende a alterar-se passando a reabsorção óssea a ser superior à formação, observando-se a tendência para o aumento do risco de fraturas (nos indivíduos em faixas etárias mais avançadas) (EFSA NDA Panel, 2015). Os défices de Ca encontram assim fortemente associados ao aparecimento de diferentes patologias (Gharibzahedi e Jafari, 2017).

As deficiências de Ca são cada vez mais apontadas como um problema de saúde que se evidencia, não só em países em desenvolvimento, mas também nos países desenvolvidos (Sharma *et al.*, 2017). Os défices deste macromineral no organismo podem decorrer de uma ingestão insuficiente do mesmo ou de uma absorção deficitária ao nível gastrointestinal. Como forma de salvaguardar o bom funcionamento do organismo, ocorre uma reabsorção do Ca depositado nos ossos. Estas situações podem induzir o desenvolvimento de patologias como a osteopenia e osteoporose, ambas decorrentes da diminuição da massa óssea, encontrando-se a primeira associada a uma densidade mineral óssea inferior ao normal precedendo a osteoporose (EFSA NDA Panel, 2015), enquanto a segunda, segundo a Direção Geral de Saúde (DGS) (2008), consiste “numa doença esquelética sistémica, que se caracteriza pela diminuição da massa óssea com consequente aumento do risco de fraturas”. Esta situação está identificada como um distúrbio prevalente nos países ocidentais, onde Portugal se inclui com cerca de meio milhão de pessoas a sofrerem com esta patologia.

Segundo a Associação Nacional contra a Osteoporose (APOROS) (2012), a osteoporose não pode ser encarada como uma consequência do envelhecimento, mas pode e deve ser vista como uma doença que poderá ser prevenida e não só tratada, sendo uma alimentação cuidada e equilibrada essencial no contexto da prevenção.

Sabe-se que a osteoporose é uma doença com maior prevalência no sexo feminino (3 mulheres para cada homem) após o período pós-menopáusic. No entanto, se existem fatores de risco que não podem ser alterados, outros existem que resultam de comportamentos desviantes nomeadamente, o tabagismo, vida sedentária, consumo excessivo de álcool entre outros (APOROS, 2012).

Actualmente um tratamento adequado pressupõe um correto diagnóstico, no entanto este decorre muitas das vezes de um diagnóstico tardio, resultante de uma fratura. Assim, pode inferir-se que este se apresenta como um importante problema de saúde pública (DGS, 2008), representando um grande encargo social e económico. Reconhecendo-se que a osteoporose se apresenta como uma morbilidade em crescimento, resultante do aumento de esperança média de vida, torna-se urgente a tomada de medidas eficazes de prevenção (Marques *et al.*, 2016), reforçado pelo conhecimento de que muitos dos fatores de risco se iniciam muito precocemente no contínuo de vida do indivíduo.

O facto da falta de Ca afetar a densidade óssea e simultaneamente o correto crescimento do osso, pode originar um crescimento anómalo do indivíduo. Esta situação desperta a atenção redobrada para os cuidados, nas crianças e nas grávidas, a fim de auxiliar no desenvolvimento da estrutura óssea do feto. Assim, a promoção da saúde junto das grávidas e crianças / jovens é uma necessidade emergente.

As escolas são assim um local privilegiado pelo contacto com estes jovens e, conseqüentemente, com as suas famílias, para implementar mudança nos comportamentos alimentares, promovendo-se escolhas adequadas e saudáveis até ao momento do seu consumo (PNPAS, 2019). Por sua vez, a gravidez é um período do ciclo de vida da mulher em que esta se encontra mais receptiva à mudança de comportamentos tendo em vista o bem-estar do seu bebé. Surge assim uma oportunidade para a indústria, no desenvolvimento de produtos alimentares que vão de encontro a esta mudança de hábitos de alimentares a fim de promover não só o bem-estar da grávida como da criança.

Reconhecendo-se que o Ca auxilia no desenvolvimento da estrutura óssea do indivíduo, o respetivo défice durante o pico de formação na infância e a adolescência, condiciona a saúde do adulto / idoso, uma vez que não alcançou a maior densidade mineral óssea. (**Tabela 1.5**)

Tabela 1.5 - Necessidades diárias de cálcio para cada faixa etária, gravidez e lactação. Fonte: APN (2016).

Idade	0-6 meses	6-12 meses	1-3 anos	4-8 anos	9-18 anos (M/F)	19-50 anos (M/F)	51-70 anos (M)	51-70 anos (F)	>70 anos (M/F)	Gravidez 14-18 anos 19-50 anos	Lactação 14-18 anos 19-50 anos
Ca (mg/d)	200	260	700	1000	1300	1000	1000	1200	1200	1300; 1000	1300; 1000

A dose diária recomendada de Ca para um adulto é em média 1000 mg (PNPAS, 2019), podendo variar num intervalo entre os 800 mg e os 1300 mg consoante as necessidades específicas do indivíduo, sendo a idade e o sexo, tal como referido anteriormente, exemplos de fatores condicionantes (Dayod *et al.*, 2010; D'Imperio *et al.*, 2016). A ingestão e absorção de Ca inferior aos valores recomendados, é apontado como origem de elevados custos económicos e de saúde (Dayod *et al.*, 2010).

Como o organismo humano não pode sintetizar Ca, a sua quantidade (no organismo humano) está dependente da alimentação ou suplementação (APOROS, 2012). A dieta praticada pelo indivíduo pode assim influenciar o balanço de Ca presente no organismo, quer de forma positiva (decorrente da ingestão de frutas, vegetais, vitaminas D ou K entre outras), quer de forma negativa (através da ingestão de sódio, fitatos, entre outros) (EFSA NDA Panel, 2015).

Os produtos lácteos (leite e seus derivados como queijos e iogurtes) são a principal fonte de Ca da dieta humana, apresentando uma biodisponibilidade superior (sendo mais facilmente absorvido pelo organismo) por comparação com outros alimentos (Dayod *et al.*, 2010; PNPAS, 2019). Por exemplo, relativamente à quantidade de Ca absorvido, no caso do leite podem atingir-se valores de 30 % enquanto que no caso dos espinafres se atingem valores de apenas 5 % (D'Imperio *et al.*, 2016), razão pela qual se opta principalmente pela ingestão dos produtos lácteos.

Contudo as preferências alimentares ou eventuais intolerâncias por parte de alguns consumidores devem de ser tidos em conta, uma vez que estes apresentam um consumo reduzido de produtos lácteos, privando-se da ingestão de Ca em quantidades adequadas (Dayod *et al.*, 2010). A lactose é um dos componentes do leite e apresenta-se como um dissacarídeo (junção de dois monossacáridos glicose e galactose), e para poder ser utilizado pelo organismo, deve de ocorrer a sua divisão nas suas unidades básicas através da ação da lactase (APN, 2016). A intolerância à lactose surge assim como resultado da deficiência (ou ausência) desta enzima, podendo originar diarreia, flatulência, dor ou desconforto abdominal. Uma intolerância alimentar, segundo Nunes *et al.* (2012), caracteriza-se assim “por uma reação adversa, reprodutível, que ocorre após a exposição a um determinado alimento, mas que ao contrário da alergia alimentar não envolve o sistema imunológico”.

Produtos de origem vegetal adquirem assim uma importância significativa, podendo fornecer o Ca necessário a estes indivíduos, sendo indicados como potenciais fornecedores deste macromineral. Contudo deve equacionar-se não só a ocorrência de uma biodisponibilidade inferior por comparação com os produtos de origem animal, como o baixo conteúdo de Ca por parte de alguns grupos vegetais (Dayod *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2017).

Apesar dos cereais (nomeadamente, arroz, milho e trigo) se encontrarem na maioria das dietas da população mundial, estes constituem na sua maioria um exemplo de culturas com teores de Ca reduzidos. As frutas, legumes / vegetais (sobretudo de folhas verde-escuras como brócolos, agrião e espinafres) e frutos secos (*e.g.*, figos) podem ser equacionados como uma alternativa por apresentarem níveis de Ca superiores aos cereais (Dayod *et al.*, 2010; PNPAS, 2019).

A presença de “anti-nutrientes” como os oxalatos, fitatos, polifenóis entre outros nos alimentos, podem não só reduzir (oxalatos) como inibir (*e.g.*, fitatos) a absorção do Ca ou outros nutrientes por parte do organismo, uma vez que se combinam com o Ca e originam complexos insolúveis (Dayod *et al.*, 2010; Díaz-Gómez *et al.*, 2017). Os vegetais que apresentam concentrações de oxalato inferiores, revelam uma biodisponibilidade de Ca superior (D’Imperio *et al.*, 2016). Segundo Díaz-Gómez *et al.* (2017), a biodisponibilidade consiste assim na “quantidade de um nutriente ingerido que está disponível para utilização ou armazenamento, incluindo a digestão gastrointestinal, absorção, metabolismo, distribuição tecidual e bioatividade”, o que significa que a quantidade de Ca presente no alimento não é necessariamente igual à quantidade que é absorvida pelo organismo.

Os produtos de origem vegetal apresentam um intervalo largo relativamente à concentração de Ca, com os frutos e batatas a apresentarem resultados inferiores (cerca de 10 mg de Ca 100 g⁻¹ de matéria fresca) em comparação com vegetais como o espinafre (que atingem 78 mg de Ca 100 g⁻¹ de matéria fresca) (D’Imperio *et al.*, 2016).

O metabolismo do Ca é complexo e encontra-se relacionado com o fosfato e a vitamina D. A absorção do Ca ocorre no principalmente no duodeno, seguindo-se o jejuno e íleo (de uma forma passiva quando as quantidades de Ca são elevadas e o tempo de permanência no duodeno não foi suficiente) (Gharibzahedi e Jafari, 2017) onde é absorvido na sua forma solúvel. Perante uma ingestão de Ca insuficiente, a concentração plasmática deste tende a diminuir, razão pela qual ocorre o estímulo da produção da hormona PTH, à qual se atribui um papel fundamental no controlo da homeostase do Ca. Esta vai atuar sobre o osso que funciona como o principal “reservatório” do organismo, induzindo a libertação de Ca do mesmo; aumentar a reabsorção de Ca nos rins, mas excreção do fosfato (em quantidades superiores à absorvida no intestino); ou ativar a síntese de vitamina D (cujos precursores são sintetizados na pele a partir da exposição solar) que irá resultar num aumento da absorção do Ca e fosfato ao nível intestinal. À medida que os níveis de Ca vão aumentando, ocorre a inibição da produção da hormona PTH (Díaz-Gómez *et al.*, 2017).

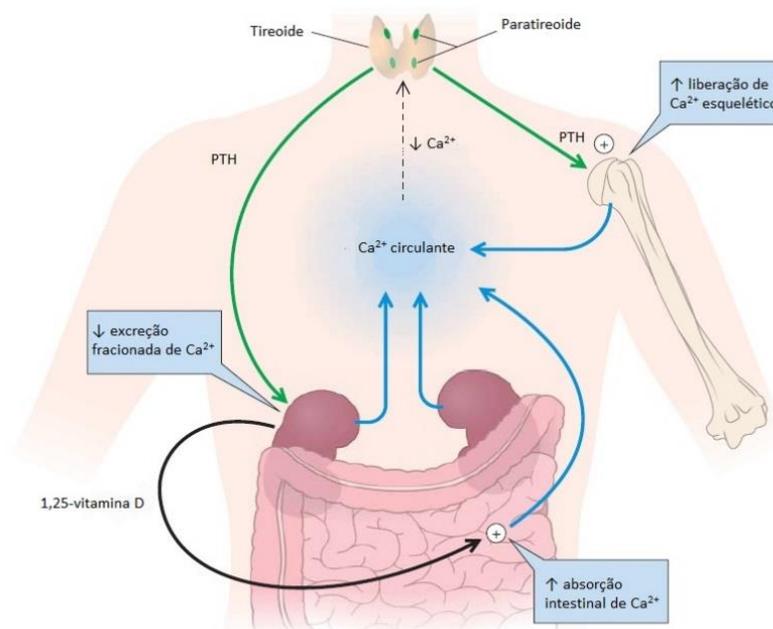


Figura 1.7 - Metabolismo do cálcio. Fonte: MedicinaNET, sem data.

2. Materiais e Métodos

2.1 Localização do Campo Experimental

O ensaio foi implementado no campo experimental da HBio Lda. (coordenadas GPS: 39° 23' 28.997''N; 9° 4' 52.483''O) numa parcela de 20 x 25 m (com cerca de 500 m²), situada nas proximidades das Caldas da Rainha - Distrito de Leiria – Portugal, para subsequentes análises de solo, água de rega, de folhagem, e peras Rocha submetida ao itinerário técnico de biofortificação em cálcio (**Figura 2.1**).



Figura 2.1 - Localização do campo experimental HBio Lda. (coordenadas GPS: 39° 23' 28.997''N; 9° 4' 52.483''O) e pontos de amostragem de solo.

2.2 Monitorização das Condicionantes Meteorológicas

As condições meteorológicas associadas ao ciclo de produção de pêra Rocha, do campo experimental da HBio Lda., foram registadas pela estação meteorológica localizada na Base Aérea de Monte Real (coordenadas GPS: 39° 49' 41.293''N; 8° 52' 52.427''O). Os dados desta estação medeiam entre Janeiro de 2018 e Dezembro de 2018 (dados diários).

2.3 Adubação e Fitossanidade

O itinerário técnico de biofortificação em cálcio adoptou o conjunto de acções usuais nos pomares de pêra Rocha (**Figura 2.2**), mas adicionalmente compreendeu 3 fases distintas.



Figura 2.2 - Visualização de alguns aspectos do ciclo produtivo do pomar do campo experimental da HBio Lda. (em: A- 27/3/2018; B- 4/5/2018; C- 19/6/2018; D- 28/6/2018; E- 4/9/2018).

2.3.1 Itinerário de Biofortificação Implementado no Campo Experimental

A biofortificação agronómica da pêra Rocha em cálcio, tem por objectivo incrementar a concentração deste elemento mineral nos frutos, promovendo-se a adubação foliar das árvores. A biofortificação compreendeu assim 3 fases distintas (**Tabela 2.1**): no período compreendido entre o vingamento e até o fruto atingir cerca de 30 mm, efectuaram-se as duas primeiras aplicações foliares (em 12/5/2018 e 25/05/2018), com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 . As concentrações aplicadas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ expressas em kg ha^{-1} foram: 0; 0,1; 0,3 e 0,6. Paralelamente, no caso das concentrações aplicadas de CaCl_2 foram as seguintes (também expressas em kg ha^{-1}): 0; 0,4; 0,8 e 1,6. Cada tratamento foi aplicado na totalidade dos frutos de 4 pereiras. Portanto, 4 concentrações com 4 replicados por tratamento. O conjunto de acções adoptadas, teve então por objectivo, na 1ª fase dos tratamentos, verificar se a acção dos diferentes tratamentos com CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ seria potencialmente tóxica.

Numa segunda fase, realizou-se uma única aplicação com CaCl_2 (4 kg ha^{-1}) (em 15/6/2018) para todas as pereiras tratadas inicialmente com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou CaCl_2 , não se aplicando no controlo. Desta vez pretendeu-se verificar, numa única aplicação foliar, se o acréscimo dos teores de CaCl_2 em 2,5 vezes (face ao teor máximo anteriormente aplicado) teria uma acção potencialmente tóxica. Face à ausência de sintomas de toxicidade, iniciou-se então um processo de biofortificação uniforme para os diferentes tratamentos.

A última fase compreendeu as restantes 4 aplicações tendo-se utilizado o CaCl_2 (8 kg ha^{-1}) (em 29/6/2018; 23/07/2018; 10/8/2018 e 25/8/2018). A colheita no campo experimental da HBio Lda. efectuou-se em 4/9/2018 (**Anexo IV**).

Tabela 2.1 - Descrição das diferentes etapas de fertilização foliar, do ensaio implementado no campo experimental da HBio Lda., explicitando as fases, número de aplicações foliares, respectivas datas de aplicação e tratamentos aplicados.

Fase	Aplicação	Data	Tratamentos	
1ª	1	12/05/2018	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,1; 0,3; 0,6 kg ha^{-1}	CaCl_2 0,4; 0,8; 1,6 kg ha^{-1}
	2	25/05/2018		
2ª	3	15/06/2018	CaCl_2 4 kg ha^{-1}	
3ª	4	29/06/2018	CaCl_2 8 kg ha^{-1}	
	5	23/07/2018		
	6	10/08/2018		
	7	25/08/2018		

Assim, embora nas tabelas dos resultados se diferenciem os tratamentos, considerando diferentes concentrações de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 , os mesmos devem ser analisados considerando essencialmente o estudo comparativo entre o controlo e todos os restantes tratamentos (*i.e.*, considerando-os como um todo).

2.3.2 Fitofármacos, Fertilizantes e Fertirega do Campo Experimental

Nos diferentes tratamentos aplicaram-se ainda fitofármacos com acção bactericida, herbicida, fungicida e acaricida ao longo do ciclo de produção no campo experimental da empresa HBio Lda. (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Informação relativa à aplicação de fitofármacos em todos os tratamentos, durante o ciclo de produção no campo experimental da HBio Lda.

Nº Tratamento	Justificação Técnica	Ataque Observado	Data de Aplicação	Condições Meteorológicas na Aplicação	Produto		Concentração (g/hL ou mL/hL)		Fertilizante Foliar	Concentração (g ou mL/hL)
					Nome Comercial	Substância Activa				
1	Cancro	Ramos com sintomas	08-02-2018	Tempo nublado sem chuva	Cobre 50	Oxicloreto Cobre	500	g		
1	Infestantes Linha	Muitas infestantes	12-02-2018	Sol	Dakar	Oxifluorfena	750	mL		
2	Formas hibernantes	30% inflorescências ovos	31-03-2018	Tempo nublado sem chuva	Baikal	Piriproxifena	50	mL		
2	Cancro	Alguns sintomas	31-03-2018	Tempo nublado sem chuva	Cobre 50	Oxicloreto Cobre	500	g		
3	Pedrado	CCF	09-04-2018	Sol	Miltane Micro	Mancozebe	200	g	Borpec 21%	300
4	Pedrado	CCF	18-04-2018	Sol	Invictus	Difeconazol	15	mL		
5	Pedrado / Estenfiliose	CCF	28-04-2018	Sol	Luna Experience	Fluopirame + Tebuconazol	75	mL	Borpec 21%	300
5	Psila	40 rebentos com ninfas	30-04-2018	Sol	Kraft Advance	Abamectina	75	mL		
6	Pedrado	CCF	11-05-2018	Sol	Miltane Micro	Mancozebe	200	g		
7	Pêra Rocha	Pedrado / Podridões	23-05-2018	Sol	Bellis	Boscalide + Piraclorobina	80	g	Calpec 18% Ca	300
7	Bichado	14 Machos/Semana	23-05-2018	Sol	Calypso	Tiaclopride	20	mL		
8	Pedrado	CCF	01-06-2018	Sol	Fernide WG	Tirame	200	g	Cloro de Cálcio	300
9	Estenfiliose	CCF	14-06-2018	Sol	Tebutop	Tebuconazol	75	g		
9	Infestantes Linha	Muitas infestantes	15-06-2018	Sol	Glufostar	Glufosinato amónio	500	mL		
10	Pedrado	CCF	26-06-2018	Sol	Fernide WG	Tirame	200	g	Cloro de Cálcio	400
11	Pedrado	CCF	17-07-2018	Sol	Flint	Trifloxistribina	10	g	Cloro de Cálcio	400

Um controlo fitossanitário racional e eficaz permite o controlo de pragas e doenças, podendo assegurar a manutenção da sustentabilidade das produções agrícolas. Os produtos fitofarmacêuticos consistem, segundo a ANIPLA (2016) em: “produtos naturais ou obtidos a partir de síntese, destinados a proteger as plantas de doenças, pragas ou infestantes, mantendo-as saudáveis para que estas possam exprimir todo o seu potencial produtivo, tanto no que se refere à quantidade como no que respeita à qualidade dos produtos agrícolas”.

No decorrer do ciclo de produção no campo experimental da HBio Lda., aplicaram-se diferentes fitofármacos, para minimizar ou controlar doenças, como o pedrado e estenfiliose, ataques de insetos ou infestantes de linha.

O Cobre 50 foi aplicado nos primeiros dois tratamentos. Este produto consiste num fungicida cúprico, que apresenta uma acção preventiva, podendo ser aplicado perante doenças como o cancro (sendo este provocado por um fungo cuja acção infecciosa pode ocorrer durante o período de queda da folha, originando feridas, podendo a chuva frequente e as temperaturas amenas durante o período de Outono-Inverno potenciar danos severos) (Selectis, 2019a). A observação em campo de alguns sintomas nomeadamente nos ramos das pereiras justificou o seu uso.

A par deste produto, aplicou-se apenas uma vez no primeiro tratamento o Dakar, herbicida com acção de contacto durante a emergência de infestantes, sendo a sua utilização justificada pela presença de infestantes de linha, que podem provocar desequilíbrios na cultura, por competirem com as pereiras pelos nutrientes e água disponíveis, ou permitirem o desenvolvimento de doenças ou pragas (Selectis,

2019b). De forma semelhante, no nono tratamento, utilizou-se o Glufostar, herbicida não seletivo que atua sobretudo por contacto, destruindo temporariamente as partes aéreas das infestantes, não atuando nos seus órgãos subterrâneos (Epagro, 2016).

O pedrado consiste numa das doenças prevalentes em pomóideas de todo o mundo. Hibernando durante o período de Outono, origina uma infeção primária pela ação da chuva e temperaturas entre os 15 - 25 °C. Este fungo pode infetar folhas, flores entre outros, conduzindo a sintomas que se manifestam sob a forma de manchas com aspeto aveludado castanho-esverdeado, evoluindo para negro. É nestas manchas que se desenvolvem os esporos responsáveis pelas infeções secundárias, dispersos novamente pela ação da chuva ou orvalho (Selectis, 2019c). Os tratamentos desde o terceiro ao décimo primeiro, excluindo o novo encontraram-se relacionados com esta doença, tendo-se aplicado Miltane Micro, Invictus, Luna Experience, Bellis, Fernide WG, e Flint para a combater.

O Miltane Micro foi aplicado duas vezes (3º e 6º tratamento) e consiste num fungicida de superfície com atividade preventiva (inibindo a germinação dos esporos), com uma persistência biológica entre os 7 e os 10 dias (Selectis, 2019d). Cerca de 10 dias depois do primeiro tratamento, aplicou-se o Invictus, um fungicida sistémico (proteção completa de todos os órgãos da planta), que apresenta uma ação preventiva, curativa e anti-esporulante, penetrando rapidamente nas folhas (1 a 2 horas após aplicação), persistindo entre 10-12 dias (Selectis, 2019e).

De forma semelhante, 10 dias depois, aplicou-se Luna Experience, um fungicida sintético utilizado para controlo do pedrado e estenfiliose, demonstrando uma ação preventiva e curativa, incidindo ao nível da respiração mitocondrial, afetando a energia necessária para o fungo se desenvolver e multiplicar (Crop Science Portugal, 2019a). O Tebutop, aplicado no nono tratamento, à semelhança do Luna Experience atua sobre fungos, afetando neste caso o desenvolvimento dos esporos e o crescimento do micélio, visando o controlo da estenfiliose. Doença esta que infeta maioritariamente as pereiras, resultando em pequenas manchas arredondadas de contorno avermelhado, que eventualmente evoluem para necroses escuras. No caso dos frutos, a colonização destas manchas por parte de fungos pode originar podridões (Selectis, 2019f). No ano de 2018, registaram-se alguns pomares ataques de estenfiliose, que chegou a impedir a colheita de mais de 1/3 da sua produção (INE, 2018b).

No sétimo tratamento, aplicou-se Bellis, um fungicida sistémico de ação preventiva que, tal como o Luna Experience, atua no pedrado e estenfiliose, bloqueando a respiração (processo metabólico essencial à sobrevivência dos fungos), podendo inclusive, quando aplicado tardiamente na cultura, auxiliar no controlo de doenças de conservação (*e.g.*, *Penicillium spp*) (BASF, 2017). Aproximadamente uma semana mais tarde, aplicou-se no oitavo e posteriormente no décimo tratamento, Fernide WG, um fungicida de superfície com atividade preventiva, utilizado para as mesmas doenças que o Bellis, inibindo vários processos metabólicos (SIPCAM Portugal, 2018). O Flint foi aplicado sensivelmente 20 dias depois, consistindo no último tratamento antes da colheita. Este apresenta-se como um fungicida com elevada afinidade para a superfície das plantas (Crop Science Portugal, 2019b).

Os restantes tratamentos apresentavam ação inseticida: o Baikal foi utilizado num segundo tratamento decorrente da manifestação de formas hibernantes. Este consiste num inseticida regulador do crescimento que perturba o processo de desenvolvimento do inseto, evitando que estes cheguem à fase adulta (Selectis, 2019g); o Kraft Advance (5º tratamento), consiste num inseticida e acaricida de origem natural que foi utilizado para combater a psila, um inseto picador-sugador que como resultado da sua alimentação conduz à desvitalização dos órgãos da planta, podendo as folhas no seu limite secar e cair, provocando perdas de vigor e redução de produção afetando a colheita (Selectis, 2019h); o Calypso foi aplicado no sétimo tratamento, e consiste num inseticida sistémico, podendo ser usado contra o afídeos, bichado, entre outros, atuando por contacto e ingestão, afetando os insetos ao nível do seu sistema nervoso. O controlo do bichado (duas a três gerações por ano) é fundamental uma vez que se apresenta como uma das pragas mais relevantes das pomóideas, podendo levar à destruição de grande parte da produção (Crop Science Portugal, 2019c).

Adicionalmente, aplicaram-se ainda fertilizantes no solo e fertirrega (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3 - Informação relativa à aplicação de fertilizantes no solo e em sistema fertirrega no campo experimental da HBio Lda.

Produto	Número	Data de Aplicação	Orgânico ou Inorgânico	Solos ou Fertirrega	Método Aplicado	Dosagem kg ha ⁻¹	Unidades					
							N	P	K	Mg	S	Ca
Adubo Fuerza 6-8-18	1	06-03-2018	Inorgânico	Solo	Adubador	300	18	24	54	0	0	0
Entec Nitrofoska 14-7-17+2Mg-22,5S	1	06-03-2018	Inorgânico	Solo	Adubador	250	35	17,5	42,5	6	67,5	-
Ca(NO ₃) ₂ 15,5N + 27,5Ca	2	14-6-2018 a 20-7-2018	Inorgânico	Fertirrega	Rega	40	6,2	-	-	-	-	11
Unidades/hectare							59,2	41,5	96,5	6	67,5	11

Os fertilizantes inorgânicos foram aplicados numa fase inicial e diretamente no solo (em Março de 2018), sendo posteriormente aplicados entre meados de Junho e finais de Julho em sistema de fertirrega.

Em Março procedeu-se à aplicação no mesmo dia de Adubo Fuerza 6-8-18 e de Entec Nitrofoska 14-7-17+2Mg-22,5S, ambos adubos NPK, sendo que o primeiro possui enxofre, e o segundo apresenta um inibidor de nitrificação e alguns micronutrientes (EuroChem Agro, 2014; Vitas Portugal, 2017). Relativamente ao Ca(NO₃)₂, o mesmo é um adubo sólido solúvel com azoto nítrico e cálcio, apresentando uma ação rápida, devendo a adubação terminar duas a três semanas antes da colheita (ADP Fertilizantes, 2019).

2.4 Recolha de Amostras de Solo

No campo experimental da HBio Lda., em Março (27/03/2018), e numa fase precedente ao início das aplicações foliares, foram colectadas 16 amostras de solo numa amostragem em grelha rectangular (5,70 X 4 m). Todas as amostras foram limpas de detritos e plantas (**Anexo V**). As amostras de solo foram colectadas da superfície até uma profundidade de 30 cm (entre 600 - 1000 g), e colocadas em sacos de polietileno para transporte e armazenamento para análise no laboratório.

2.4.1 Determinação da Humidade e Matéria Orgânica do Solo

Cerca de 100 g de solo de cada amostra foram peneirados, utilizando uma peneira (com malha de 2,0 mm) para remoção de pedras, materiais grosseiros e outros detritos. O peso da amostra foi registado, e após secagem a 105 °C durante 24 horas (colocando no exsiccador durante aproximadamente 1 hora, até temperatura ambiente), determinou-se a massa seca e a percentagem de humidade (Embrapa, 1997).

Posteriormente, as amostras foram colocadas na mufla a 550 °C, durante 4 horas (até peso constante). As amostras de solo foram posteriormente removidas da mufla a 100 °C (e colocadas no exsiccador até temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora). Procedeu-se então à determinação percentagem de matéria orgânica (Margesin e Schinner, 2005).

2.4.2 Determinação do pH e Condutividade Eléctrica do Solo

Após aferição da percentagem de humidade do solo, determinou-se o pH e a condutividade eléctrica do mesmo segundo o método descrito por Pessoa *et al.* (2016).

Resumidamente, numa proporção de 1 : 2,5 g mL⁻¹ de água milli-Q, após uma hora de agitação, e permanecendo a 25 °C por 30 minutos em banho termal, com recurso a um potenciómetro portátil, determinou-se o pH do solo e a condutividade eléctrica após decantação do sobrenadante.

2.5 Qualidade da Água de Irrigação

Foram recolhidas amostras de água do campo experimental da HBio Lda., para determinação de parâmetros físicos (pH, temperatura e condutividade eléctrica) e químicos (bicarbonato, sulfato, cloreto, sódio, cálcio, magnésio, potássio, nitrato e fosfato).

A condutividade eléctrica (CE) e o pH foram determinados com um analisador multiparamétrico da Consort (C 6030) e eléctrodos SP21 (pH) e SK20T (CE).

Por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de troca iónica, foram quantificados os iões cálcio, sódio, potássio e magnésio, com cromatógrafo da Metrohm (Modelo 761 Compact IC) equipado com coluna e pré-coluna (Metrosep cation 1-2, 6.1010.000), segundo o método descrito no *Application Bulletin, No.257/1e*, da Metrohm (eluente 4mM tartaric acid/1mM dipicolinic acid, Flow 1.00 mL/min, Volume 10,0 µL) (Metrohm, sem data).

A alcalinidade / bicarbonato foi determinada por titulação, considerando 100 mL de amostra de água e ácido clorídrico 0,1 N como titulante, na presença do indicador alaranjado de metilo a 0,1 %, segundo o método descrito por Rodier *et al.* (2009) em *L'Analyse De L' Eau*.

Por fotometria foram quantificados os iões cloreto, sulfato, nitrato e fosfato com aparelho *Spectroquant, NOVA 60*, da Merck, e Kits de teste fotométricos da Merck com referências: 1.14897; 1.14779. 1.14773 e 1.14842.

A água do solo do campo experimental foi assim classificada em termos de iões dominantes, segundo a metodologia proposta por Piper. Foi determinado o índice SAR (índice de adsorção de sódio) e classificada a água, relacionando este com a condutividade eléctrica, nas classes C e S (**Anexo VI**). Também foi estimado o índice de saturação de Langelier (ISL), a partir do pHe (pH de equilíbrio), com vista à determinação do poder incrustante ou de agressividade da água em relação ao carbonato de cálcio.

Os diagramas de Piper e de Wilcox foram obtidos com recurso ao programa AquaChem 2014.2

$$\text{SAR} = \frac{\text{Na}^+}{\sqrt{\frac{(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})}{2}}} \text{ (meq/L)}; \text{ ISL} = \text{pH} - \text{pHe}$$

2.6 Material Vegetal, Medição da Altura e Diâmetro, Densidade e Percentagem de Peso Seco dos Frutos

Procedeu-se à recolha de pêra Rocha (*Pyrus communis* L. var. Rocha) do campo experimental HBio Lda. (Concelho Alcobaça, Distrito Leiria, Portugal), em 5 períodos distintos do ano de 2018: 08/06/2018, 15/06/2018, 10/07/2018, 20/07/2018 e 04/09/2018 (data correspondente à colheita). As folhas das pereiras foram colhidas em iguais períodos referidos anteriormente, exceptuando a data da colheita.

Aquando da receção das amostras biológicas para análise laboratorial, procedeu-se à medição da altura e diâmetro de 4 peras do controlo e de cada um dos tratamentos. Para a determinação da densidade, procedeu-se ao corte e pesagem de 4 peras do controlo e de cada um dos tratamentos, e após

pesagem, com recurso a uma proveta, verificou-se a variação do volume de água. Para a determinação do peso seco, procedeu-se ao corte e pesagem (peso fresco) de 4 peras do controlo e de cada um dos tratamentos, sendo estas em seguida transferidas para a estufa a 60 °C até atingirem peso constante, efetuando-se uma nova pesagem após saída da estufa.

$$\text{Densidade} \left(\frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Massa (g)}/1000}{\text{Volume (mL)} \times 10^{-6}} ; \% \text{Peso seco} = \frac{100\% \times \text{Peso seco (g)}}{\text{Peso fresco (g)}}$$

2.7 Determinação dos Elementos Minerais no Solo, Folhas e Frutos

2.7.1 Quantificação por Fluorescência de Raios-X

Na determinação de elementos minerais em amostras de: 1) Solos, procedeu-se ao aquecimento das mesmas a 550 °C, durante 4 horas (até peso constante) e, após arrefecimento, cada amostra foi peneirada numa peneira (malha de 200 µm), para homogeneizar a granulometria. Procedeu-se então à análise dos elementos minerais utilizando um analisador de raio-X (*Niton Thermal Scientific*, modelo XL3t 950 He GOLDD +) sob atmosfera de Hélio, de acordo com o método descrito por Pelica *et al.* (2018) (**Anexo VII**); 2) Nas folhas e nos frutos (obtidos nas 5 recolhas), procedeu-se à respectiva secagem a 60 °C (até peso constante), sendo posteriormente moídos e transformados em pastilhas.

Nas amostras de folhas e frutos procedeu-se então à análise dos elementos minerais utilizando um analisador de raio-X (*Niton Thermal Scientific*, modelo XL3t 950 He GOLDD +) sob atmosfera de Hélio, de acordo com o método descrito por Reboredo *et al.* (2018) para amostras biológicas.

2.7.2 Quantificação por Absorção Atómica

Nos frutos obtidos à colheita, os elementos minerais foram analisados de acordo com a metodologia reportada por Reboredo *et al.* (2018). Aproximadamente 1 g de cada amostra foi pesado e colocado num erlenmeyer de 50 mL. Após adição de 10 mL de ácido nítrico, esta preparação foi aquecida a 100 – 150 °C até evaporação total, adicionando-se então uma solução de HNO₃: HClO₄ (2 : 3 mL). Após novo aquecimento até evaporação total, o precipitado foi diluído numa solução de HCl a 2 % e filtrado (*Whatman* nº4) para um balão volumétrico de 50 mL. O branco constituiu a solução de HCl a 2 % e realizaram-se diferentes soluções padrão para a obtenção das diferentes retas de calibração (**Anexo VIII**).

A absorvência foi então registada por espectrofotometria de absorção atómica, utilizando um espectrofotómetro de Absorção Atómica (modelo *Perkin Elmer AAnalyst 200*), com o programa de *software AA WinLab*, após a extração dos elementos minerais das amostras dos diferentes tratamentos.

2.8 Determinação dos Parâmetros Colorimétricos

2.8.1 CieLab

A determinação dos parâmetros colorimétricos do solo, peras, e folhas com utilização de comprimento de onda fixo, adoptou a metodologia descrita por Bicho *et al.* (2014). Com algumas modificações, os parâmetros de cor, luminosidade / brilho (L) e cromaticidade (coordenadas a^* e b^*) (**Anexo IX**) foram obtidos com um colorímetro Minolta CR 300 (Minolta Corp., Ramsey, NJ, Estados Unidos) acoplado a um recipiente para amostras sólidas (CR-A504), sendo a sua calibração efectuada a partir do padrão branco de referência ($L = 85,5$; $a^* = 0,3185$; $b^* = 0,3356$). As medições foram realizadas para o iluminante D_{65} com base no sistema L, a^* , b^* , da *Commission Internationale d'Éclairage* (CIE).

Os parâmetros colorimétricos foram medidos em triplicado ou quadruplicado para cada amostra de: 1) Solo ($n = 3$) em dois períodos diferentes: a primeira, antes das amostras irem para a mufla a 550°C e a segunda análise colorimétrica foi realizada após as amostras saírem da mufla, depois de arrefecidas e do cálculo da percentagem da matéria orgânica; 2) Frutos: Os parâmetros colorimétricos das peras ($n = 4$) foram medidos na epiderme de peras frescas durante o desenvolvimento fenológico (cinco recolhas), sendo que à colheita também se efetuaram medições na polpa; 3) Folhas: Os parâmetros colorimétricos das folhas ($n = 4$) foram medidos nos mesmos períodos de recolha dos frutos ocorridos no decorrer do desenvolvimento fenológico, excepto na colheita.

2.8.2 Colorímetro Espectrofotométrico de Varrimento

Realizou-se mais uma análise colorimétrica nas peras frescas ($n = 4$) obtidas à colheita, nomeadamente na epiderme e polpa, com um colorímetro espectrofotométrico de varrimento (Agrosta, União Europeia). Este distingue-se do anterior pois o seu sensor fornece uma detecção half-max de largura total de 40 nm e cobre toda a área visível. Este sensor possui 6 fototransistores, cada um com sensibilidade num comprimento de onda específico, a 380 (Violeta) 450 (Azul), 500 (Verde), 570 (Amarelo), 600 (Laranja) e 670 (Vermelho) nm. A luz é fornecida com um LED branco com um amplo espectro em toda a área visível.

2.9 Determinação da Dureza, Teor de Sólidos Solúveis Totais e Acidez dos Frutos

Nos frutos obtidos à colheita, procedeu-se à determinação dos teores de sólidos solúveis totais, dureza e acidez, segundo os métodos descritos em Soares *et al.* (2001).

A dureza dos frutos foi avaliada num total de 20 frutos por tratamento, efetuando-se três medições em cada fruto (obtendo-se um total de 60 leituras), em pontos equidistantes na zona equatorial mais larga do fruto. Utilizou-se um penetrómetro tipo Bellevue e ponteiro com diâmetro de 8 mm ($0,5\text{ cm}^2$) com profundidade de 1 cm, sendo os valores expressos em kg.

A partir dos três furos do penetrómetro por fruto (triplicados), determinou-se o teor de sólidos solúveis totais, num total de 20 frutos por tratamento, com recurso a um refractómetro digital Atago (Atago, Tóquio, Japão), sendo os valores expressos em $^{\circ}\text{Brix}$.

Os 20 frutos de cada tratamento foram em seguida separados em 4 grupos com 5 frutos cada um. A acidez foi quantificada nos 4 sumos obtidos por tratamento, procedendo-se a uma titulação do tipo ácido-base, utilizando hidróxido de sódio 0,1 N e um potenciómetro (sendo os valores expressos em grama de ácido málico por litro).

2.10 Tratamento Térmico da Polpa de Pêra Rocha: Características Físicas, Químicas e Análise Sensorial

2.10.1 Processamento das Polpas

A partir de amostras de pêra Rocha controlo e biofortificada com CaCl_2 (tratadas inicialmente com $1,6 \text{ kg ha}^{-1}$ de CaCl_2), foram desenvolvidas polpas de acordo com a seguinte metodologia (**Figura 2.3**):

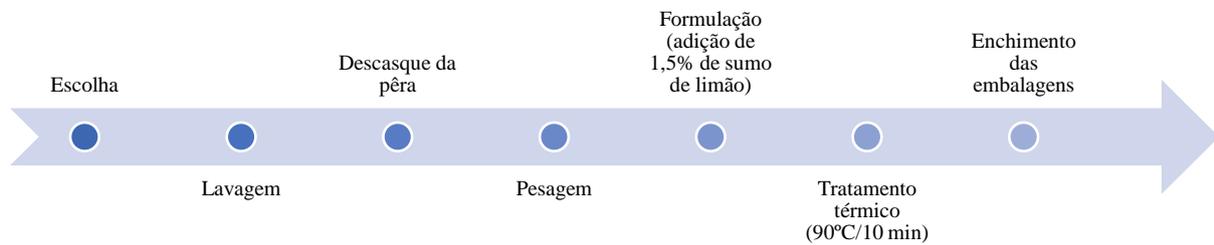


Figura 2.3 - Esquema da metodologia aplicada para a obtenção de duas polpas de pêra. Uma obtida a partir de amostras de pêra controlo (não sujeitas a nenhum tratamento de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou CaCl_2) e outras a partir de peras biofortificadas com CaCl_2 (tratadas inicialmente com CaCl_2 $1,6 \text{ kg ha}^{-1}$).

O processo iniciou-se com a escolha das peras, seguindo-se a lavagem e descasque das mesmas, pesagem e formulação (tendo-se adicionado 1,5 % de sumo de limão). As polpas foram tratadas termicamente no termomix, seguindo o binómio temperatura e tempo estipulado ($90 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min) (**Figura 2.4_{A,B}**). De seguida procedeu-se ao enchimento das embalagens utilizando frascos de vidro com tampa (higienizados) e tubos de plástico com tampa. Para o efeito, colocaram-se as polpas em banho-maria (nas mesmas condições de temperatura e tempo estipuladas). Como resultado, obteve-se uma amostra de “polpa controlo” e uma amostra de “polpa biofortificada” em triplicado.

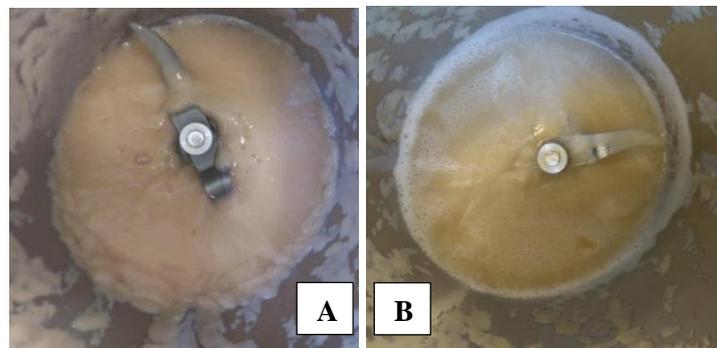


Figura 2.4 - Visualização da preparação de polpa de pêra Rocha submetida a tratamento térmico: (A) Controlo; (B) Biofortificadas com CaCl_2 (tratadas inicialmente com CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)).

2.10.2 Avaliação do Comportamento Reológico das Polpas

A avaliação do comportamento reológico das polpas, seguiu o método descrito por Figueiredo (2012).

Para avaliação do comportamento reológico da polpa, o índice de consistência ($k \cdot \text{Pa}\cdot\text{s}^n$) foi determinado a partir dos valores de viscosidade aparente obtidos das polpas controlo e sujeitas a tratamento inicial com CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), tendo-se realizado 3 determinações por amostra.

Utilizou-se um viscosímetro Brookfield (modelo RVT) (com spindle 5), nas velocidades de rotação de 2, 4, 10 e 20 rpm, em condições de temperatura controlada (20 ± 1 °C) e à pressão ambiente para a avaliação da viscosidade aparente das polpas (sendo os valores expressos em Pa.s). Os resultados obtidos no viscosímetro foram transformados em medidas reológicas: velocidade de deformação (s^{-1}) e viscosidade aparente (Pa.s), que se usaram na elaboração das curvas de fluência. Por fim a partir da lei de potência obtiveram-se os valores de índice de consistência (k) e índice de escoamento (n).

2.10.3 Determinação dos Parâmetros Colorimétricos das Polpas

A determinação dos parâmetros colorimétricos das polpas, seguiu o método descrito por Figueiredo (2012).

Utilizou-se um colorímetro Minolta CR 300 (Osaka, Japão) no sistema CIELab (iluminante C) para a determinação dos parâmetros da cor das polpas, sendo a sua calibração efectuada a partir do padrão branco de referência ($L = 97,10$; $a^* = 0,19$; $b^* = 1,95$). Realizaram-se 5 determinações por amostra para obtenção do valor médio. Os parâmetros L, a^* e b^* , obtiveram-se por leitura direta no aparelho.

O parâmetro L representa a luminosidade / brilho, traduzindo a variação da tonalidade entre escuro e claro, podendo os seus valores variarem entre 0 (preto) e 100 (branco). Relativamente aos parâmetros a^* e b^* , estas coordenadas traduzem respectivamente variações de cor: entre vermelho (+60) e verde (-60); e entre amarelo (+60) e azul (-60). A aproximação destas coordenadas ao valor nulo traduz cores neutras (branco, cinzento e preto).

2.10.4 Determinação do pH e Teor de Sólidos Solúveis Totais das Polpas

A determinação do pH e do teor de sólidos solúveis totais das polpas, seguiu o método descrito por Figueiredo (2012).

Para a determinação do pH utilizou-se um potenciómetro Crison Micro pH 2001 (Crison Instrumentes, Espanha). Efectuaram-se 3 determinações por amostra, mergulhando a sonda directamente nas polpas.

O teor de sólidos solúveis foi determinado com recurso a um refractómetro (DR-A1, ATAGO Co Ltd., Japão), a partir de sumo obtido directamente da filtração da polpa. Efectuaram-se 3 determinações por amostra, sendo os resultados expressos em °Brix, representando a percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto.

2.10.5 Análise Sensorial

Para a avaliação sensorial utilizou-se um painel semi-treinado de provadores ($n = 19$). A execução das provas de análise sensorial foi realizada com os provadores localizados individualmente em cabines, segundo a NP 4258:1993 (ISO 8589:1988).

As amostras foram fornecidas a cada provador, aos quais foi pedido que classificassem as amostras atribuindo nota aos atributos sensoriais presentes na ficha de prova (**Anexo X**), aparência, cor, consistência, aroma/sabor e apreciação global com base numa escala hedónica de 5 pontos pré-estabelecida variando gradativamente desde “Desgostei muito” a “Gostei muito”.

2.11 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados experimentais obtidos, foi efetuada com recurso ao programa IBM SPSS Statistics 20, sendo utilizada a análise da variância (ANOVA) com uma variável, tendo-se usado o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para estudo comparativo das médias.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização do Campo Experimental e Meteorologia Durante o Ciclo de Produção

3.1.1 Caracterização do Solo

Considerando que as características dos solos podem interferir directamente no processo de biofortificação dos frutos, efectuou-se a respectiva caracterização, considerando os teores de humidade, matéria orgânica, pH, condutividade eléctrica, índices colorimétricos, micro e macro elementos numa fase prévia à implementação do itinerário de biofortificação (*i.e.*, em 27 de Março de 2018). Constatou-se assim (**Tabela 3.1**) que, no campo experimental da HBio Lda., os valores de humidade, matéria orgânica, pH e condutividade eléctrica variaram entre 15,5 - 22,0 %, 3,27 - 5,02 %, 7,6 - 8,1 e 245 - 659 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 3.1 - Caracterização sumária do solo (amostras colectadas a uma profundidade entre 0 - 30 cm; 600 - 1000 g) do campo experimental da HBio Lda., em 27 de Março de 2018 (n = 16).

Campo Experimental		Humidade (%)	Matéria orgânica (%)	pH	Condutividade Eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
HBio Lda.	Mínimo	15,5	3,27	7,6	245
	Mediana	18,0	4,39	7,99	388
	Média	17,9	4,28	7,94	390,1
	Máximo	22,0	5,02	8,1	659

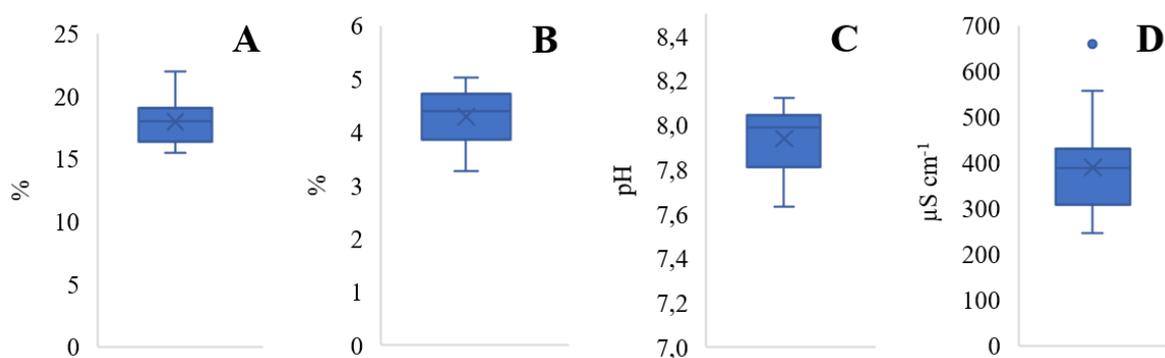


Figura 3.1 - Boxplots da (A) Humidade do solo, (B) Matéria Orgânica, (C) pH e (D) Condutividade Eléctrica das amostras de solo (amostras colectadas a uma profundidade entre 0 - 30 cm; 600 - 1000 g) do campo experimental da HBio Lda., em 27 de Março de 2018 (n = 16).

A caracterização do solo adquire cada vez mais importância na agricultura de precisão, pois é a partir do solo que ocorre a absorção de água e nutrientes que contribuem para o normal desenvolvimento fenológico do fruto. Neste estudo, a caracterização dos parâmetros do solo (**Figura 3.1**) foram efetuados antes do início das aplicações foliares, para identificar possíveis factores de desequilíbrio no terreno que pudessem vir a condicionar os resultados a obter, relativamente à biofortificação da pêra Rocha em Ca.

O parâmetro da humidade do solo por vezes sofre oscilações, pois relaciona-se com a taxa de precipitação, irrigação aplicada no campo, drenagem e evapotranspiração da própria planta (Silva *et al.*, 2015). Este parâmetro relaciona o fator hídrico, com a mobilização de nutrientes presentes no solo para

a planta, devendo ser monitorizado para garantir rendimento na produção e boa qualidade do fruto, razão pela qual se recomenda a rega do pomar (DGADR, 2012), sendo esse o caso verificado no campo experimental.

A variação em cerca de 7 % da humidade do solo entre amostras sugere uma dotação de rega relativamente homogênea na parcela analisada, indicando um bom escoamento superficial de água, ou um sistema de drenagem adequado, evitando a acumulação de água e consequente encharcamento (DGADR, 2012).

Os solos de Portugal geralmente apresentam um baixo teor de matéria orgânica (DGADR, 2012), com tendência para a sua diminuição progressiva, em resultado de condições climáticas favoráveis à sua decomposição (nomeadamente nas zonas do Sul da Europa), assim como de práticas culturais, sem reposição adequada dos seus níveis (EIP-AGRI, 2016).

A matéria orgânica presente no solo constitui a componente orgânica do mesmo, resultante de plantas, animais ou material convertido pela ação dos microorganismos no decorrer do processo de decomposição (EIP-AGRI, 2016). É apontado como um dos principais indicadores da qualidade do solo, sendo responsável por influenciar diversas propriedades do mesmo, tais como a suplementação de nutrientes, infiltração ou retenção de água, cor, entre outras (Margesin e Schinner, 2005).

O aumento da matéria orgânica, encontra-se relacionado com o aumento dos nutrientes minerais disponíveis (como o N, P, K, Ca e Mg) no solo e com a respectiva capacidade de retenção de água, levando não só ao aumento da produtividade das plantas, como também, evita em simultâneo a perda de sedimentos e erosão do solo (auxiliando na manutenção da sua estrutura) (Teixeira *et al.*, 2011; EIP-AGRI, 2016). Neste enquadramento constatou-se que o teor de matéria orgânica no campo experimental da HBio Lda. vai de encontro a valores de matéria orgânica obtidos noutros estudos. Mendes (2017) obteve valores de matéria orgânica entre 2,46 % e os 4,68 %, numa análise de oito pomares de produção de pêra Rocha (localizados nas Caldas da Rainha, Rio Maior e Cadaval). O teor de matéria orgânica do campo experimental HBio Lda., não constituiu assim um fator limitante à absorção de nutrientes por parte da planta.

Constatou-se ainda que, neste campo experimental, o solo é ligeiramente básico, situando-se no intervalo de pH 7 – 8 (**Tabela 3.1 e Figura 3.1**), enquadrando-se nos solos áridos ou semi-áridos, característicos das zonas mediterrâneas da Europa que tipicamente são alcalinos (Läuchli e Grattan, 2012).

O intervalo de valores obtido vai de encontro à faixa considerada ideal para a agricultura / silvicultura, situando-se entre pH 6 - 8 (Läuchli e Grattan, 2012), pois neste intervalo os nutrientes podem ser facilmente absorvidos pelo coberto vegetal, ou seja, na solução do solo.

O pH do solo é um parâmetro importante, uma vez que os nutrientes não são igualmente disponíveis ao longo do espectro do pH (**Anexo XI**). O Ca, K, P e Fe, são nutrientes minerais susceptíveis a anomalias de pH nos solos, o que poderia levar a situações como baixa disponibilidade destes nutrientes para as plantas. Em última análise, poderia originar uma ausência de balanço entre os nutrientes, não só no solo como na planta (Läuchli e Grattan, 2012). No caso do Ca e S, a sua disponibilidade é ligeiramente inferior nos solos mais ácidos, aumentando a sua disponibilidade com o aumento do pH.

Tendo em conta o pH ligeiramente básico do solo, alguns dos respectivos micronutrientes (tais como Fe, Cu, Mn e Zn), poderiam ficar menos disponíveis para a planta (Costa *et al.*, 2014). Porém, o facto do solo do campo experimental da HBio Lda. se enquadrar no intervalo de pH recomendado para a agricultura, sugere um balanço adequado entre os nutrientes, não subsistindo possíveis défices nutricionais que pusessem em causa o correto desenvolvimento do fruto.

Processos de evapotranspiração, transpiração por parte das plantas e uso de fertilizantes originam uma acumulação gradual de iões no solo. Um aumento da salinidade nos solos também implica um maior dispêndio de energia por parte da planta para absorver água e consequentes nutrientes por esta transportados (Visconti e de Paz, 2016). A condutividade elétrica do solo consiste na sua habilidade de

conduzir corrente elétrica, sendo muito utilizada para a medição da salinidade do mesmo. Contudo, a condutividade elétrica depende de outras propriedades do solo, como a sua humidade, textura, estrutura, mineralogia e salinidade, podendo dificultar a interpretação dos resultados (Visconti e de Paz, 2016).

Relativamente à condutividade elétrica do campo experimental, exceptuando o valor máximo de $659 \mu\text{S cm}^{-1}$, obtido numa das amostras (C1) à entrada do campo experimental (que se apresenta anómala por comparação com as restantes), no geral constataram-se valores que apontam para um teor de sais que, independentemente do grau de tolerância da espécie vegetal em causa, não implicam um maior dispêndio de energia para conseguir absorver água (efeito osmótico), evitando assim prejuízos dos seus processos metabólicos essenciais. A condutividade elétrica manteve-se no geral inferior a $600 \mu\text{S cm}^{-1}$, indo de encontro ao valor recomendado para a condutividade de solos onde se pretendam implementar culturas de pomóideas (DGADR, 2012).

A determinação do índice colorimétrico obedeceu à escala CIELab (L – brilho, a^* verde – vermelho e b^* azul – amarelo), após remoção da humidade (*i.e.*, 1ª determinação - 24 horas após manutenção em estufa a 105°C e, subsequente, manutenção num exsiccador durante 1 hora) (**Figura 3.2**) e da matéria orgânica (*i.e.*, 2ª determinação - após manutenção a 550°C , durante 6 horas e subsequente manutenção num exsiccador durante 1 hora), verificando-se valores distintos perante a remoção de matéria orgânica (**Tabela 3.4**).



Figura 3.2 - Amostras de solo provenientes do campo experimental da HBio Lda., após saída da estufa a 105°C , durante 24 h, para subsequente cálculo do teor em humidade.

Com base no **Anexo V**, efetuou-se a análise dos parâmetros colorimétricos das amostras de solo. Relativamente aos parâmetros colorimétricos medidos, antes da queima da matéria orgânica e após a remoção da humidade, observou-se pela análise da **Tabela 3.2**, que o parâmetro L não apresentava diferenças significativas nos diferentes pontos de amostragem, evidenciando valores positivos que apontam para uma maior contribuição do branco. Relativamente aos parâmetros a^* e b^* , observou-se para todas as amostras uma prevalência do vermelho relativamente ao verde, e do amarelo relativamente ao azul, respetivamente. A ausência do verde é justificada pela limpeza das amostras de detritos mais grosseiros.

Fazendo uma análise longitudinal da parcela, onde decorreu a amostragem, relativamente aos parâmetros a^* e b^* , as amostras obtidas na linha C e D, à semelhança das restantes, evidenciam valores positivos, contudo, não apresentam diferenças significativas entre si. As linhas A e B evidenciam diferenças significativas entre si, nomeadamente, entre as amostras à entrada do pomar (A1 e B1) e as outras recolhidas no seu interior (A4 e B4), considerando o parâmetro a^* . Para o parâmetro b^* , apenas

se identificou uma diferença significativa na fila B, entre a amostra B2 e B1. Realizando uma análise no plano equatorial, observou-se que a amostra B2 para o parâmetro a*, se apresentou significativamente diferente da amostra C2 e D2. As amostras A1 e B1 para o parâmetro a*, evidenciaram-se significativamente distintas da amostra C1 e D1; para o parâmetro b*, A1 apesar de não ser significativamente diferente de B1 e D1, o mesmo não se verificou por comparação com a amostra C1.

Perante esta informação, as amostras recolhidas à entrada do pomar à esquerda (A1, B1), apresentam uma cor ligeiramente distinta relativamente ao resto da parcela.

Tabela 3.2 - Valores médios (n = 3) e respetivo erro padrão (E.P.) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo) da 1ª determinação efetuada no solo, registada após a determinação da percentagem de humidade. As letras a, b, c, indicam diferenças significativas de cada amostra de solo (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). As amostras A1, A2, A3 e A4, foram obtidas na linha A; B1, B2, B3 e B4, obtidas na linha B; C1, C2, C3 e C4, obtidas na linha C; e D1, D2, D3, D4, obtidas na linha D.

Amostras de solo	1ª Determinação: Após a determinação da percentagem de humidade					
	L	E.P	a*	E.P	b*	E.P
A1	40,81a	±0,44	6,68c	±0,12	13,83c	±0,20
A2	43,25a	±3,34	7,37a,b,c	±0,04	14,77a,b,c	±0,21
A3	41,24a	±0,92	7,39a,b,c	±0,06	14,83a,b,c	±0,18
A4	40,66a	±1,86	7,73a	±0,15	15,15a,b,c	±0,42
B1	40,35a	±1,46	6,72c	±0,15	14,19b,c	±0,39
B2	42,10a	±1,38	6,85b,c	±0,29	15,65a	±0,31
B3	41,78a	±0,88	7,66a,b	±0,12	15,42a,b	±0,22
B4	40,28a	±0,74	7,84a	±0,11	15,22a,b,c	±0,22
C1	41,64a	±0,07	7,67a,b	±0,15	15,37a,b	±0,11
C2	41,69a	±0,37	7,88a	±0,19	15,54a,b	±0,17
C3	42,31a	±0,35	8,01a	±0,02	15,76a	±0,08
C4	40,36a	±1,05	7,71a	±0,18	15,22a,b,c	±0,24
D1	40,25a	±0,52	7,69a	±0,17	15,22a,b,c	±0,23
D2	41,75a	±0,61	7,83a	±0,15	15,51a,b	±0,25
D3	40,78a	±0,16	7,56a,b	±0,09	15,17a,b,c	±0,10
D4	39,22a	±1,77	7,79a	±0,28	15,13a,b,c	±0,53

Com base na **Tabela 3.3**, após a queima, o parâmetro L evidenciou diferenças significativas entre as amostras A4 e C3 e D4, indicando uma ligeira diferença no brilho / luminosidade após a extração da matéria orgânica nas amostras retiradas nos pontos da parcela localizados no interior do pomar. À semelhança do que foi dito anteriormente para o parâmetro a*, observaram-se diferenças significativas entre a amostra A1 e A4, B1 e B4, enquanto que para o parâmetro b* apenas se observou o mesmo para o primeiro caso anteriormente indicado.

Tabela 3.3 - Valores médios (n = 3) e respetivo erro padrão (E.P.) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo) da 2ª determinação efetuada no solo, registada após a determinação da percentagem da matéria orgânica. As letras a, b, c, d, indicam diferenças significativas de cada amostra de solo (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$). As amostras A1, A2, A3 e A4, foram obtidas na linha A; B1, B2, B3 e B4, obtidas na linha B; C1, C2, C3 e C4, obtidas na linha C; e D1, D2, D3, D4, obtidas na linha D.

Amostras de solo	2ª Determinação: Após a determinação da percentagem de matéria orgânica					
	L	E.P	a*	E.P	b*	E.P
A1	41,97a,b	±0,14	15,93d	±0,15	18,28b	±0,10
A2	43,68a,b	±0,72	16,70b,c,d	±0,14	19,28a,b	±0,20
A3	42,98a,b	±0,70	16,70b,c,d	±0,22	19,06a,b	±0,25
A4	44,59a	±1,80	17,13a,b,c	±0,12	19,31a	±0,13
B1	41,82a,b	±0,49	16,50c,d	±0,49	18,93a,b	±0,38
B2	41,15a,b	±0,80	17,25a,b,c	±0,17	19,18a,b	±0,26
B3	41,62a,b	±0,63	17,44a,b,c	±0,05	19,42a	±0,14
B4	40,76b	±0,19	17,86a	±0,21	19,38a	±0,10
C1	41,14a,b	±0,85	17,63a,b	±0,09	19,29a,b	±0,12
C2	41,16a,b	±0,64	17,68a,b	±0,18	19,40a	±0,19
C3	39,95b	±0,41	17,33a,b,c	±0,16	19,05a,b	±0,18
C4	40,90a,b	±0,47	17,28a,b,c	±0,29	19,26a,b	±0,16
D1	41,97a,b	±0,82	17,54a,b,c	±0,29	19,65a	±0,33
D2	41,98a,b	±0,44	17,42a,b,c	±0,10	19,55a	±0,10
D3	41,30a,b	±0,12	17,69a,b	±0,18	19,58a	±0,07
D4	40,55b	±0,62	17,97a	±0,05	19,51a	±0,04

Desta forma, e tendo por base a informação das **Tabelas 3.2 e 3.3**, as filas A e B evidenciaram diferenças entre a extremidade à entrada do pomar e o seu interior. Estas diferenças podem relacionar-se com uma maior susceptibilidade deste local, por se apresentar menos protegido pela cultura arvense, e onde ocorrer o movimento mais frequente das máquinas agrícolas.

Tabela 3.4 - Valores médios (n = 16) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo). A 1ª determinação foi registada após a aferição da percentagem de humidade, e a 2ª quantificação foi registada após determinação da percentagem da matéria orgânica.

Campo Experimental	1ª Determinação			2ª Determinação		
	L	a*	b*	L	a*	b*
HBio Lda.	41,2	7,5	15,1	41,7	17,3	19,3

Considerando que na escala CIELab, a coordenada L representa a luminosidade / brilho (*i.e.*, contribuição do preto ou do branco, podendo variar entre 0 e 100), e que o a^* e o b^* traduzem, respectivamente, a contribuição do verde ou vermelho (conforme o valor é negativo ou positivo) e do azul ou amarelo (quando é negativo ou positivo), verificou-se que após remoção da humidade do solo, a ausência de matéria orgânica proporcionou um aumento de todos os parâmetros analisados, exceptuando o parâmetro L, destacando-se uma diferença superior no caso dos parâmetros a^* , b^* , e L, respectivamente. Isto indicou que a presença de matéria orgânica nos solos (na ausência de humidade) diminui maioritariamente a contribuição do vermelho, seguindo-se o amarelo, ainda que com menor alteração. A contribuição do branco (L), não parece variar com a presença ou ausência de matéria orgânica.

A análise do teor em elementos minerais no solo do campo experimental (**Tabela 3.5; Anexo XII**) revelou teores superiores de Fe, K e Ca.

Tabela 3.5 - Quantificação de elementos minerais constituintes do solo do campo experimental da HBio Lda.

Campo Experimental		Elementos minerais no solo (0 – 30 cm de profundidade)										
		Ca	K	Mg	P	Fe	S	Zn	Mn	Pb	As	Cu
		%					ppm					
HBio Lda.	Mínimo	1,19	2,67	0,35	0,14	2,46	65,4	35,3	380	13,7	12,7	28,0
	Q1	1,28	2,71	0,39	0,15	2,87	69,7	44,6	447	15,6	12,9	33,2
	Mediana	1,32	2,76	0,42	0,17	3,17	72,1	50,7	492	16,6	13,4	40,4
	Média	1,33	2,75	0,42	0,19	3,07	71,4	50,3	481	17,2	13,5	41,9
	Q3	1,40	2,78	0,45	0,21	3,35	73,4	56,1	523	19,0	14,1	48,9
	Máximo	1,51	2,84	0,50	0,35	3,56	76,7	62,5	554	20,6	15,0	60,9

A análise com recurso à fluorescência por aplicação de raios-X, para além de não ser um método destrutivo, permite a análise de diversos elementos.

Os elementos minerais considerados essenciais para um normal crescimento das plantas, nomeadamente N, P e K, a par do Ca, Mg e S, que também apresentam uma importância relevante, devem ser analisados para aferição da disponibilidade, visando obviar a ocorrência de défices. No campo experimental, em Março, observaram-se valores elevados destes elementos, relacionados com a aplicação de adubos (**Tabela 2.3**), situação que permitiu uma correta nutrição da planta. O Ca é o terceiro elemento mais abundante (**Tabela 3.5**), tendo sido apenas suplementado através de rega no período final de produção das peras (Junho e Julho). Tal sugere que os níveis de Ca no solo no início da produção eram ideais, não se tendo visualizado evidências macroscópicas de um possível défice nas plantas.

O Fe revela uma abundância média nos solos que oscila em torno de 3,5 %, podendo inclusive a cor dos solos relacionar-se com a sua presença nos mesmos. No campo experimental, o valor médio encontra-se ligeiramente abaixo da referência (Kabata-Pendias, 2011).

Os valores de Zn variam entre 60 – 89 ppm, e o valor médio de Pb presente em solos de diferentes países varia entre 18 – 32 ppm. Os valores médios do campo experimental encontram-se ligeiramente inferiores aos valores referência (50,3 e 17,2 ppm respectivamente) (Kabata-Pendias, 2011).

A absorção de Mn por parte da planta resulta principalmente do seu conteúdo presente no solo. A nível mundial, os valores de Mn no solo variam entre 411 – 550 ppm. No caso do campo experimental, observamos que os valores médios (**Tabela 3.5**) se inserem neste intervalo (481 ppm) (Kabata-Pendias,

2011). No caso do Cu, este varia entre 14 – 109 ppm e, à semelhança do Mn, os valores obtidos no campo experimental encontravam-se de acordo com os valores referência (Kabata-Pendias, 2011).

No caso dos metais pesados como o Zn, Pb e Cu, obtiveram-se valores médios inferiores aos valores limite indicados em DGADR (2012) (**Tabela 3.6**).

Tabela 3.6 - Valores limite (em ppm) de metais pesados (Zn, Pb e Cu), em solos a diferentes pH. Fonte: Adaptado de DGADR, 2012.

Elementos Minerais	Valores limite nos solos		
	pH ≤ 5,5	5,5 < pH ≤ 7	pH > 7
Zn	60	150	200
Pb	50	70	100
Cu	20	50	100

O As é um elemento poluente podendo acumular-se nas camadas mais superficiais do solo, sendo o respectivo valor médio para diferentes tipos de solo 6,83 ppm (Kabata-Pendias, 2011). O valor médio obtido no campo experimental (13,5 ppm) é assim elevado, contudo os países localizados no centro e sul da Europa evidenciam valores superiores de As por comparação com os países do Norte (Tóth *et al.*, 2016). Na União Europeia, nos diferentes solos agrícolas não se devem exceder valores entre os 15 – 20 ppm (Kabata-Pendias, 2011), pelo que, os valores de As no campo experimental não excederam o intervalo indicado.

3.1.2 Propriedades da Água de Irrigação

A composição física e química da água de rega deve ser encarada em termos dos seus efeitos no solo (impermeabilização e / ou alcalinização) e nas culturas (toxicidade), bem como os cuidados a ter com os equipamentos utilizados na irrigação (incrustações e corrosão). Com base nestes pressupostos efectuou-se a classificação da água de irrigação no campo experimental HBio Lda. (**Tabela 3.7**), em termos de iões dominantes.

Verificou-se que a água de rega do campo experimental é de origem subterrânea, de fácies hidroquímica bicarbonatada cálcica sódica (**Tabela 3.7; Figura 3.3A**), com salinidade alta (concentração de sais avaliados em termos de condutividade eléctrica, entre 750 e 2250 $\mu\text{S cm}^{-1}$, a 20 °C) (Richards, 1954). Pertence à classe C3S1, com índice SAR 2,1 (exibindo uma baixa concentração de iões Na^+ face aos iões Ca^{2+} e Mg^{2+}) (**Figura 3.3B**).

Esta informação sugere que a água de rega do campo HBio Lda., não representa perigo de alcalinização do solo (S1), por possuir baixa concentração de iões Na^+ em relação aos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} , podendo ser utilizada em quase todo o tipo de solo. Porém devido à elevada concentração de sais (C3) não é recomendada a sua utilização em solos com drenagem deficiente e, mesmo com drenagem adequada, pode ser necessário aplicar medidas especiais para controlo da salinização (Richards, 1954). Só deve ser servir para irrigação de culturas tolerantes aos sais (como é o caso da pêra Rocha).

Segundo a DGADR (2012), recomenda-se que a água de rega utilizada nas culturas pomóideas, apresente um valor de condutividade eléctrica inferior a 3000 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e uma concentração de iões cloreto inferior a 355 mg L^{-1} , encontrando-se os valores obtidos (1467 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e 113 mg L^{-1}), em conformidade com os valores de referência (DGADR, 2012).

Tabela 3.7 - Parâmetros físicos e químicos da água subterrânea, captada em furo profundo no campo experimental da empresa HBio Lda. (amostragem em 10 de Agosto de 2018).

Parâmetro	HBio Lda.	
Condutividade eléctrica (CE)	1467 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20 °C	
pH	7,3	
Ca ²⁺	94,9 mg/L	4,7 (meq/L)
Mg ²⁺	37,8 mg/L	3,1 (meq/L)
Na ⁺	99,5 mg/L	4,3 (meq/L)
K ⁺	2,8 mg/L	0,07 (meq/L)
HCO ₃ ⁻	312,3 mg/L	5,1 (meq/L)
Cl ⁻	113 mg/L	3,2 (meq/L)
SO ₄ ²⁻	48 mg/L	1,0 (meq/L)
NO ₃ ⁻	5,5 mg/L	0,08 (meq/L)
PO ₄ ³⁻	0,4 mg/L	0,01 (meq/L)

Trata-se de uma água subsaturada em carbonato de cálcio, com tendência corrosiva quando circular em canalizações com esta composição, apresentando pHe (pH de equilíbrio) igual a 7,6, e ISL (Índice de Saturação de Langelier) de - 0,30, à temperatura de referência de 20 °C, sugerindo uma tendência, tendo em conta este valor, não incrustante, com leve ação para dissolução (Granjeiro *et al.*, 2009).

Perante estes dados, a água do campo experimental pode ser utilizada como água de rega, não evidenciando toxicidade para o pomar, nem danificando o solo onde este se encontra instalado, contudo aconselha-se a monitorização e manutenção dos equipamentos de rega.

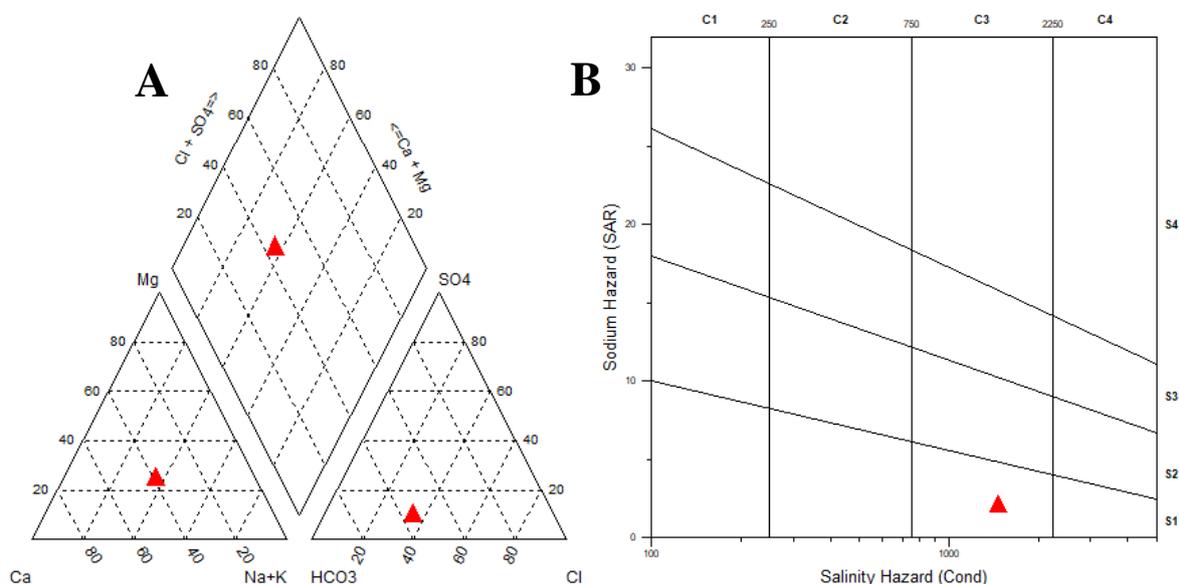


Figura 3.3 - (A) Projeção da composição da água do campo HBio Lda. em diagrama de Piper. (B) Projeção da composição da água do campo HBio Lda. em diagrama de Wilcox e classificação para uso agrícola, na classe C3S1. S1, S2, S3 e S4, representam, respectivamente, o perigo de alcalinidade baixo, médio, alto ou muito alto. C1, C2, C3 e C4, representam, respectivamente, o perigo de salinidade baixo, médio, alto e muito alto. Diagramas obtidos com AquaChem 2014.2.

3.1.3 Caracterização das Condições Meteorológicas

O período de ensaio, que decorreu entre 12 de Maio a 4 de Setembro, caracterizou-se por uma temperatura média máxima de 23 °C, e média mínima de 15 °C, correspondendo o valor máximo e mínimo registado a 41 °C e 6 °C, respectivamente (**Figura 3.4**). O relatório do IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.), para o período de Primavera, reportou valores da temperatura média do ar inferiores ao normal, sendo o mês de Julho o mais frio desde 2000. O mês de Agosto foi o 2º mais quente dos últimos 88 anos (depois de 2003), sendo o dia 4 de Agosto o mais quente do século XXI. Nesse dia foram excedidos os extremos absolutos da temperatura máxima e ultrapassados os maiores valores da temperatura mínima.

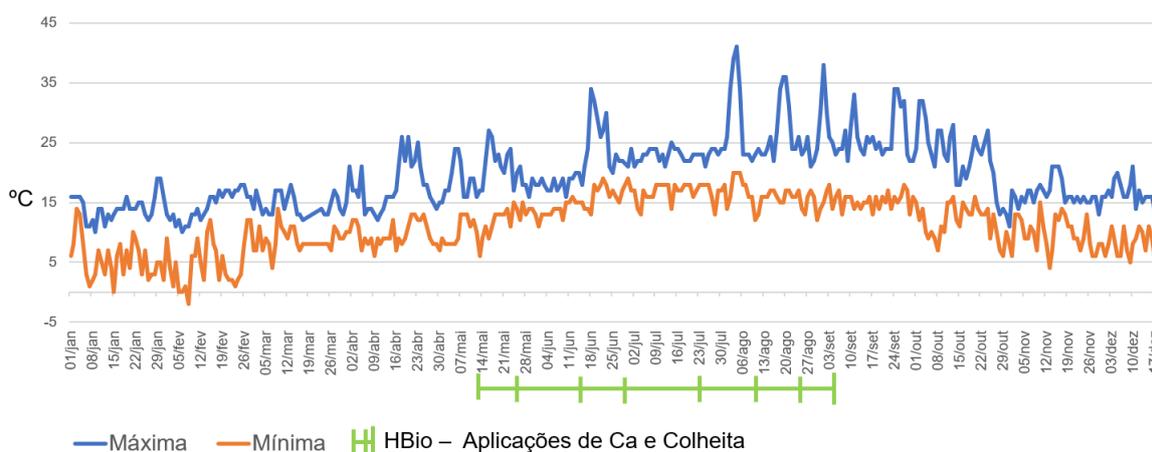


Figura 3.4 - Temperaturas máxima e mínima diárias registadas em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental da HBio Lda.

No decurso do período experimental a humidade máxima e mínima do ar atingiu 100 % e 8 %, sendo a média dos valores máximos e mínimos 96 % e 53 % (**Figura 3.5**).

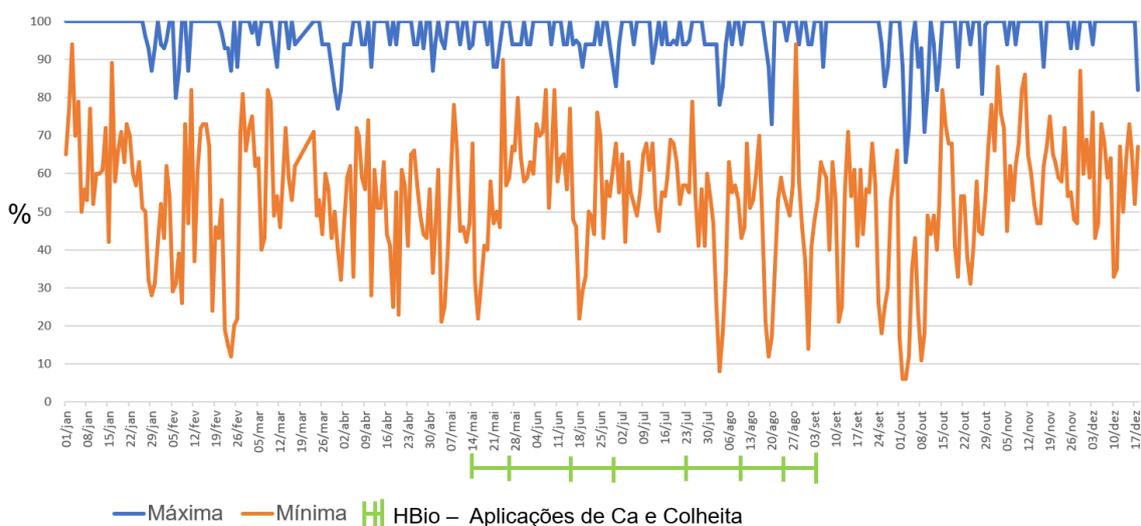


Figura 3.5 - Humidade máxima e mínima diária registada em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental da HBio Lda.

As pulverizações iniciaram-se em meados de Maio, verificando-se, de acordo com o boletim meteorológico do IPMA (e tal como se percebe na **Figura 3.6**), que a quantidade de precipitação ocorrida entre Março e Maio, correspondeu a 429 mm, equivalendo a cerca de 200 % do valor médio (*i.e.*, foi a 3ª Primavera mais chuvosa desde 1931, depois de 1936 e 1956). De registar a ausência de seca meteorológica em Portugal Continental no final da Primavera. A nível nacional, Junho de 2018 foi o 2º mês de Junho mais chuvoso desde 2000, tendo durante esse mês ocorrido aguaceiros por todo o território, que foram localmente fortes, de granizo e acompanhados de trovoadas. No entanto, a média registada no decurso do período experimental correspondeu a 0,41 mm, com um máximo diário de 18,03 mm de precipitação e uma acumulação de 60,4 mm.

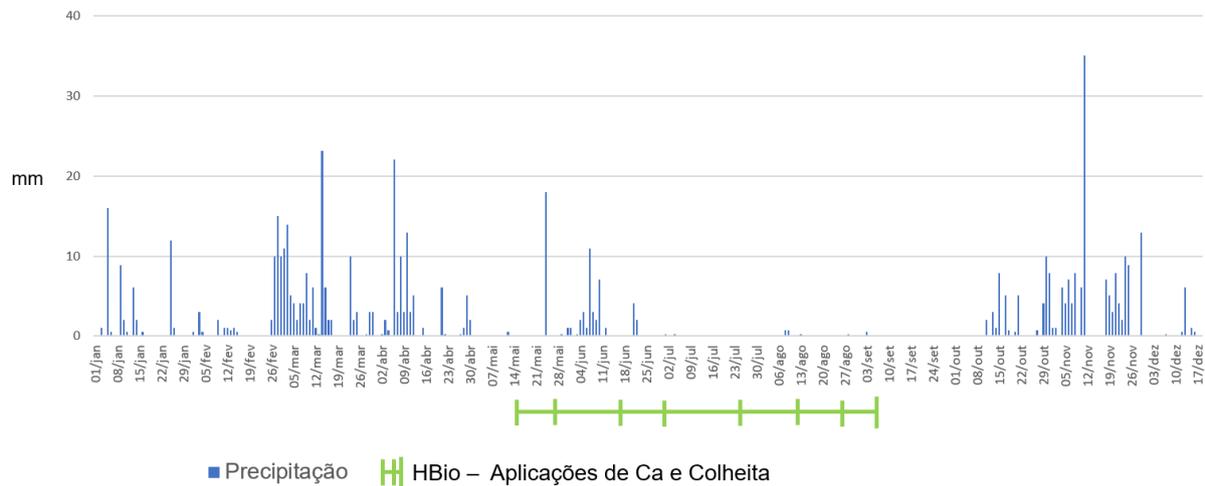


Figura 3.6 - Precipitação acumulada diária em 2018 na estação meteorológica da Base Aérea de Monte Real. Assinalam-se ainda os dias de aplicação foliar e colheita no campo experimental HBio Lda.

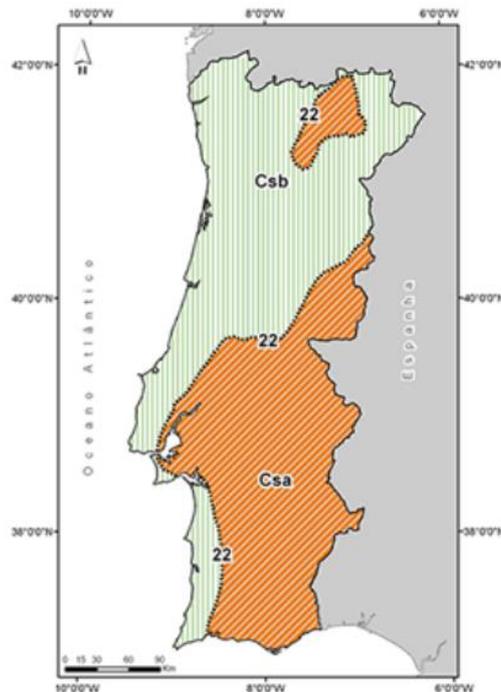


Figura 3.7 - Clima de Portugal Continental, segundo a classificação de Koppen. Fonte: IPMA, 2019.

Segundo o IPMA (2019) em Portugal Continental, segundo a classificação de Köppen (dividindo o clima da terra em 5 regiões: tropical húmido, seco, polar, e temperado com Inverno suave ou rigoroso), identificam-se dois climas ligeiramente distintos (**Figura 3.7**), ambos climas temperados com Inverno suave (Cs), podendo classificar-se ainda como Csa, indicando um clima temperado com Inverno chuvoso, seguido de Verão seco e quente; ou Csb, de clima temperado com Inverno chuvoso, com Verão seco mas pouco quente.

O campo experimental localiza-se numa zona onde o clima é classificado com Csb. Neste enquadramento (**Figuras 3.4 a 3.6**), o ano de 2018 pode ser considerado atípico, ao nível da temperatura e precipitação, o que eventualmente poderia ter conduzido a alterações do ciclo de produção de pêra Rocha devido a condicionantes térmicas (temperaturas demasiado elevadas) mas não hídricas.

A árvores produtoras desta variedade de pêra, são mediamente exigentes em frio, necessitando de 550 horas de frio Invernal, o que corresponde a temperaturas abaixo de 7 °C entre Outubro e Fevereiro (ANP, sem data). Com base na **Tabela 3.8**, podem observar as horas de frio para a pêra Rocha, estimadas para os concelhos da região Oeste, indicando os oito maiores valores médios do número de horas de frio. Verificou-se assim que o valor médio destes oito concelhos foi acima das 550 horas necessárias.

Tabela 3.8 - Número de horas de frio entre 01 de Outubro de 2017 e 28 de Fevereiro de 2018 na região Oeste (análise do modelo numérico Aladin). Fonte: IPMA, 2018.

Concelho	Média de horas de frio
Porto de Mós	1052
Batalha	1030
Leiria	910
Alcobaça	807
Santarém	753
Rio Maior	753
Marinha Grande	751
Cadaval	750

Em Março verificou-se o fim da situação de seca meteorológica que ocorria há onze meses consecutivos em Portugal (desde abril de 2017), sendo por isso categorizado como um mês extremamente chuvoso e muito frio. Contudo, os trabalhos agrícolas normais para esta época do ano foram afetados, originando entre outros, atrasos nas podas de vinhas e pomares (INE, 2018c). Como a floração das pereiras ocorre entre meados de Março e Abril (ANP, sem data), o ciclo de produção defrontou-se assim com os primeiros obstáculos.

Em Julho de 2018, já se previa a diminuição da produtividade da pêra Rocha (cerca de 10 %), decorrente de condições meteorológicas menos favoráveis na fase da floração / vingamento dos frutos, por comparação com igual período do ano anterior (INE, 2018d), resultando em efeitos negativos, nomeadamente, na quantidade de flores viáveis e na carga de frutos vingados (INE, 2018b).

A ocorrência de um mês de Junho chuvoso acompanhado por vezes de granizo, seguindo-se a passagem do mês de Julho mais frio desde o ano 2000, e posteriormente do Agosto mais quente dos últimos 88 anos, conduziu a extremos de temperatura que influenciaram o ciclo de produção de pêra Rocha, decorrente da sua proximidade com o período típico de colheita da mesma, sendo esta feita na região Oeste geralmente na segunda semana de Agosto.

A onda de calor que se fez sentir em três dias consecutivos de Agosto (2 - 4 de Agosto) em praticamente todo o território nacional, afetou a capacidade produtiva das culturas, quer por dessecação das plantas (estado de extrema secura, nomeadamente das plantas hortícolas), quer por desidratação / secagem dos frutos, verificando-se a paragem do crescimento dos mesmos e a ocorrência generalizada de escaldões nos pomares, queimando os frutos mais expostos e aumentando as quebras de produtividade para os 20 % face a 2017 (INE, 2018b; INE, 2018e).

A colheita da pêra iniciou-se assim na penúltima semana de Agosto, e terminou no final de Setembro, tendo surgido a necessidade de reforçar as equipas de campo, para minimizar a exposição prolongada dos frutos às temperaturas elevadas (*i.e.*, de forma a não comprometer a conservação). Nas fruteiras, verificou-se que, apesar da existência de calibres heterogéneos (contabilizando-se muita fruta que não atingiu os padrões mínimos de comercialização), originando uma redução da produção para as 162 mil toneladas, em termos de qualidade, os frutos apresentaram boas características organolépticas (INE, 2018d; INE, 2018f).

3.2 Quantificação de Cálcio e Restantes Elementos Minerais

No campo experimental da HBio Lda., pretendeu-se incrementar naturalmente a concentração de Ca nos frutos, através da adubação foliar das árvores por pulverização foliar. Nesse âmbito, efectuou-se a monitorização da cinética de acumulação de Ca e de outros elementos minerais durante o desenvolvimento dos frutos e nas folhas (considerando-se neste caso a mobilização dos elementos minerais para os frutos).

3.2.1 Folhas

3.2.1.1 Monitorização Durante o Desenvolvimento Fenológico do Fruto

A monitorização da acumulação de macronutrientes nas folhas das árvores, no campo experimental, foi efectuada sem extracção prévia dos elementos minerais, recorrendo à análise de fluorescência por aplicação de raios-X, com recurso a um analisador de raios-X *Niton Thermal Scientific*.

Efectuou-se uma recolha inicial de folhas (8/6/2018), após a 2ª pulverização com CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (**Tabela 3.9**), tendo-se verificado um aumento significativo nos teores de Ca apenas no tratamento CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), comparativamente aos tratamentos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$) e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$).

Relativamente a P e K também os teores mais elevados foram identificados no tratamento CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), ainda que não fossem significativamente diferentes do controlo. No caso do S, os teores mais elevados foram observados nos tratamentos CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), ainda que também não fossem significativamente diferentes do controlo. O Zn revelou teores significativamente mais baixos nos tratamentos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$), porém os teores do controlo não foram significativamente diferentes relativamente aos demais tratamentos.

Com esta análise foi possível verificar que, independentemente das concentrações aplicadas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou CaCl_2 , não subsistiam aspectos fitotóxicos, muito embora já fossem evidentes algumas alterações induzidas pelo Ca sobre a cinética de acumulação dos restantes elementos minerais.

Tabela 3.9 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018 (após 2ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K		Zn		Mn		Mg	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	2,81a,b	±0,062	0,26a,b	±0,015	0,66a,b	±0,024	3,26a,b	±0,116	54,33a	±1,431	256a	±6,7	711a,b,c	±62,7
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	2,70a,b	±0,140	0,23b	±0,004	0,59a,b	±0,014	3,09b	±0,017	47,95a,b,c	±2,161	225a,b,c	±10,0	642b,c	±155,5
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	2,35b	±0,043	0,22b	±0,011	0,57a,b	±0,012	2,86b	±0,068	45,86a,b,c	±3,269	215a,b,c	±15,4	554c	±45,0
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	2,43b	±0,128	0,24b	±0,016	0,56a,b	±0,040	3,11b	±0,154	42,39b,c	±1,936	199b,c	±8,9	500c	±250,0
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	2,49b	±0,100	0,22b	±0,011	0,53b	±0,019	2,76b	±0,047	41,14c	±0,579	193c	±2,84	587c	±250,0
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	2,85a,b	±0,254	0,29a,b	±0,034	0,70a	±0,076	3,32a,b	±0,271	53,10a,b	±3,951	250a,b	±19,18	1306a	±53,4
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	3,25a	±0,053	0,32a	±0,015	0,72a	±0,017	3,87a	±0,025	54,17a	±1,273	256a	±5,98	1253a,b	±240,6

A monitorização da acumulação de macronutrientes (com destaque para o Ca), no campo experimental persistiu com uma nova recolha de folhas (15/6/2018), após a 3ª pulverização, agora unicamente com CaCl_2 (4 kg ha⁻¹), tendo-se verificado (**Tabela 3.10**) níveis de Ca que embora apresentando alguma variação estatística não revelavam um incremento apreciável relativamente ao controlo.

Estes valores sugerem uma mobilização deste elemento mineral para o fruto (**Tabela 3.15**), o qual nesta fase já apresentava um incremento dos teores de Ca relativamente ao controlo. Os níveis de P, tal como se verificou nos frutos, não variaram de forma significativa ao longo dos diferentes tratamentos (**Tabela 3.10**), o que sugere uma baixa mobilização deste elemento para o fruto.

Nas folhas também os níveis de Mg não variaram ao longo dos tratamentos, possivelmente porque estarão envolvidos maioritariamente na síntese de fotoassimilados, actuando como co-factor de activação da ATP sintetase (Igamberdiev e Kleczkowski, 2015). O S e o K revelaram valores significativamente mais baixos no tratamento CaCl_2 (1,6 kg ha⁻¹), a par de valores máximos no controlo. Genericamente, neste estado fenológico dos frutos esta tendência parece sugerir a prevalência de um antagonismo na cinética de acumulação destes elementos com o Ca. O Zn e o Mn também revelaram, relativamente ao controlo, valores significativamente inferiores no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,3 kg ha⁻¹) e superiores no tratamento CaCl_2 (1,6 kg ha⁻¹).

Tabela 3.10 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 15/6/2018 (após 3ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K		Zn		Mn		Mg	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	3,64a	±0,166	0,25a	±0,004	0,88a,b	±0,032	3,49a,b	±0,074	76,4b,c	±1,95	362b,c	±9,3	905a	±138
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	3,55a	±0,203	0,26a	±0,007	0,95a	±0,070	3,44a,b	±0,087	82,2b	±2,66	389b	±12,4	1003a	±174
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	3,42a,b	±0,067	0,25a	±0,003	0,82a	±0,005	3,24b	±0,064	62,1d	±0,18	293d	±0,8	1194a	±215
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	3,25a,b	±0,099	0,25a	±0,013	0,78b	±0,012	3,63a	±0,060	63,9c,d	±1,64	302c,d	±8,0	737a	±43
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	3,38a,b	±0,046	0,23a	±0,014	0,88a,b	±0,014	3,56a,b	±0,062	84,7b	±2,30	401b	±10,7	978a	±217
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	3,74a	±0,056	0,24a	±0,005	0,79b	±0,015	3,23b	±0,100	78,8b	±1,32	373b	±6,3	921a	±180
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	2,96b	±0,088	0,24a	±0,011	0,56c	±0,018	2,80c	±0,034	117,7a	±6,28	554a	±29,4	1147a	±180

A monitorização da acumulação de macronutrientes, no campo experimental persistiu com uma nova recolha de folhas (10/7/2018), após a 4ª pulverização, nesta fase unicamente com CaCl₂ (8 kg ha⁻¹). Nesta fase (**Tabela 3.11**), a aplicação foliar de teores de Ca continuaram a não variar de forma significativa relativamente ao controlo (excepto no tratamento de 0,3 kg ha⁻¹ que decresce). Estes valores reforçam a perspectiva de que neste estado fenológico do fruto persiste a mobilização deste elemento mineral para esse órgão (**Tabela 3.16**), o qual nesta fase mantinha o incremento dos teores de Ca relativamente ao controlo. Os teores de P, S, K e Mg não apresentaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, persistindo assim a tendência observada em 8/6/2018 para o P e Mg, enquanto que nesta fase também K e o S evidenciam uma baixa mobilidade para o fruto. O Zn apenas apresentou valores significativamente mais elevados no tratamento CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹).

Tabela 3.11 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 10/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K		Zn		Mg	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	3,36a	±0,126	0,25a	±0,006	0,61a	±0,022	2,85a	±0,049	56,4b	±3,266	935a	±228
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	3,17a,b	±0,052	0,23a	±0,017	0,70a	±0,063	2,73a	±0,089	62,7a,b	±3,303	579a	±65
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	2,75b	±0,030	0,29a	±0,014	0,61a	±0,036	3,08a	±0,034	62,8a,b	±0,498	883a	±211
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	3,00a,b	±0,071	0,28a	±0,005	0,65a	±0,017	2,90a	±0,034	65,0a,b	±1,838	924a	±177
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	3,01a,b	±0,156	0,30a	±0,048	0,70a	±0,050	3,04a	±0,178	63,0a,b	±1,130	1094a	-----
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	3,14a,b	±0,070	0,31a	±0,014	0,69a	±0,013	2,93a	±0,026	68,07a	±2,328	1053a	±97
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	3,17a,b	±0,084	0,30a	±0,018	0,61a	±0,029	2,87a	±0,112	60,6a,b	±2,004	1208a	±297

A monitorização da acumulação de macronutrientes, no campo experimental persistiu com uma nova recolha de folhas (20/7/2018), ainda após a 4ª pulverização, novamente, unicamente com CaCl₂ (8 kg ha⁻¹). Nesta fase (**Tabela 3.12**), os teores de Ca nas folhas não foram significativamente diferentes entre o controlo e os restantes tratamentos (excepto no tratamento CaCl₂ de 0,4 kg ha⁻¹), o que é justificado pela mobilidade deste elemento para o fruto (**Tabela 3.17**). O P, S, K e Mg também não variaram significativamente (relativamente ao controlo) (**Tabela 3.14**), persistindo também a ausência de interacção entre o Ca e a cinética de translocação para o fruto destes elementos. Para o Zn não persistiram variações apreciáveis entre o controlo e os restantes tratamentos, contudo os teores mais elevados deste elemento foram significativos no tratamento Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹).

Tabela 3.12 - Teor médio (n = 3) de elementos minerais (considerando o peso seco como referencial) em folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 20/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Tratamentos	Ca		P		S		K		Zn		Mg	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	4,77a	±0,043	0,24a,b,c	±0,006	0,77a,b	±0,019	2,83a,b	±0,113	78,7b,c,d	±1,65	1597a	±115
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	4,60a,b	±0,022	0,23b,c	±0,010	0,90a	±0,013	3,13a	±0,040	87,1a,b	±1,01	1724a	±157
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	4,22a,b	±0,021	0,25a,b	±0,014	0,88a	±0,000	3,02a,b	±0,035	88,6a	±1,10	1442a	±178
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	4,43a,b	±0,060	0,21c	±0,005	0,85a,b	±0,016	2,92a,b	±0,091	84,3a,b,c	±1,02	1377a	±137
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	4,04b	±0,060	0,27a	±0,010	0,78,b	±0,061	2,97a,b	±0,091	73,4d	±2,95	1080a	±241
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	4,42a,b	±0,180	0,21c	±0,002	0,71b	±0,011	2,85a,b	±0,034	75,9c,d	±1,30	1181a	±124
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	4,60a,b	±0,277	0,23b,c	±0,001	0,88a	±0,043	2,66b	±0,123	84,0 a,b,c	±2,48	1102a	±195

O recurso a aplicações foliares como forma de atingir o objetivo de biofortificação, determinou a monitorização dos teores minerais nas folhas, pois é através destas que pode ocorrer a mobilização do Ca para as partes edíveis (fruto). Caso contrário, o acumular de Ca nas folhas, ou a sua deslocação para tecidos de outros órgãos, além do fruto não apresenta benefícios para a obtenção de uma matéria-prima biofortificada para os consumidores, ou para a indústria de transformação alimentar.

A 1ª recolha efetuada após as duas primeiras adubações, onde se recorreu a dois tipos de tratamentos diferentes (Ca(NO₃)₂ e CaCl₂), com diferentes concentrações, revelou a ausência de fitotoxicidade nas folhas por parte de ambos os tratamentos. Observou-se um aumento de Ca no tratamento CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹), acompanhado de incrementos noutros minerais como o K, P e S, sem se observarem simultaneamente interações negativas nos níveis de Zn, Mn e Mg.

O Ca(NO₃)₂ foi utilizado como alternativa à aplicação de CaCl₂, caso este último se apresentasse demasiado agressivo para as plantas ao ponto resultar em fitotoxicidade. A ausência de toxicidade, aliada ao facto do CaCl₂ apresentar indícios de uma absorção superior por parte das folhas, permitiu descartar a utilização do Ca(NO₃)₂ nas aplicações foliares seguintes. Neste enquadramento, aponte-se ainda que, os nitratos despoletam uma preocupação acrescida, uma vez que se apresentam mais danosos para o ser humano (ASAE, 2007).

A 2ª recolha ocorreu no dia da 3ª aplicação com 4 kg ha⁻¹ de CaCl₂, podendo não ter conferido tempo suficiente para a ocorrência de uma absorção total do produto aplicado. A ausência de diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo sugere e reforça a hipótese da mobilização do Ca para o fruto, indicando que o mesmo não se acumula nas folhas. O Ca parece não afetar a mobilização de P e

Mg, contudo observaram-se situações de antagonismo com o S e K. Por outro lado, o Zn e o Mn no geral apresentaram valores superiores ao controlo.

A 3ª e 4ª colheitas foram efetuadas após a aplicação de CaCl_2 (8 kg ha^{-1}), tendo-se verificado que a mobilização de Ca para o fruto não interferiu com a mobilização do P, S, K, Mg ou Zn. Uma concentração mais elevada (4 kg ha^{-1}) relativamente às anteriores, pareceu conduzir a uma maior translocação deste mineral para fora da folha.

Os dados obtidos sugerem assim que em fases mais avançadas do desenvolvimento fenológico do fruto, a mobilização de Ca para o fruto não afeta significativamente a mobilização dos restantes minerais. Tal sugere que se deve prestar mais atenção às fases iniciais da mobilização de Ca, onde para concentrações superiores de CaCl_2 (4 kg ha^{-1}), se verificaram valores de S e K inferiores ao controlo, indicando uma situação de antagonismo, relação típica entre o K e o Ca (Ranade-Malvi, 2011). Contudo, com o aproximar da fase de colheita este tipo de interações cessou, sugerindo a adaptação da planta.

Em Julho, os teores de Ca, P, S, K, apresentaram valores superiores aos valores de referência dos nutrientes à colheita (em Agosto) (Tabelas 3.12 e 3.13), justificando-se o valor do Ca com as aplicações foliares contendo este mineral. Os valores de Zn encontram-se no intervalo de referência, porém os valores de Mg são inferiores (DGADR, 2012).

Tabela 3.13 - Níveis de macro e micro-nutrientes em folhas de pereira colhidas no terço médio dos lançamentos do ano, na época usual de colheita (entre os 100 e os 110 dias após plena floração). Valores referidos à matéria seca a $100 - 105 \text{ }^\circ\text{C}$. Fonte: Adaptado de DGADR, 2012.

Elemento	Ca	P	S	K	Zn	Mg
	%				ppm	
Intervalo	1,25 - 2,10	0,14 - 0,18	0,20 - 0,30	0,90 - 1,60	25 - 100	2000 - 5000

3.2.2 Frutos

3.2.2.1 Monitorização Durante o Desenvolvimento Fenológico do Fruto

A monitorização da acumulação de macronutrientes, no campo experimental HBio Lda., foi efectuada sem extracção prévia dos elementos minerais, recorrendo à análise de fluorescência por aplicação de raios-X (com recurso a um analisador de raios-X *Niton Thermal Scientific*).

Efectuou-se uma recolha inicial de frutos (8/6/2018), após a 2ª pulverização com CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Tabela 3.14), tendo-se verificado valores tendencialmente mais baixos face à aplicação de CaCl_2 . Comparando todos os tratamentos, verificou-se ainda que apenas o tratamento com CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) apresentou um teor de Ca significativamente mais elevado. Relativamente aos teores de P, os valores significativamente mais elevados foram detectados nos tratamentos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$), CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$), CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), enquanto que os menores teores ocorreram no controlo e nos tratamentos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,1 \text{ kg ha}^{-1}$) e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$). Relativamente às concentrações de S, todos os tratamentos com CaCl_2 e o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$) apresentaram valores mais elevados. Os teores de K também se destacaram nos tratamentos CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) (significativamente mais elevados) e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$) (significativamente mais baixos).

Nesta fase, independentemente das variações detectadas para todos estes elementos minerais, não se constataram acumulações fitotóxicas (*i.e.*, as variações detectadas integram-se na elasticidade metabólica intra-específica, razão porque também não se visualizaram sintomas de toxicidade associados à morfologia externa dos frutos nesta fase do desenvolvimento).

Tabela 3.14 - Teor médio (n = 3) de macroelementos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018 (após 2ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.
Controlo	0,17a,b	±0,005	0,26b	±0,002	0,27a,b	±0,002	3,04b,c	±0,054
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	0,16b	±0,006	0,27a,b	±0,007	0,24c	±0,002	2,99b,c	±0,018
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	0,16b	±0,004	0,27b	±0,002	0,25b,c	±0,001	2,83c	±0,017
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	0,18a,b	±0,006	0,29a,b	±0,007	0,27a	±0,006	3,02b,c	±0,082
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	0,17a,b	±0,009	0,29a,b	±0,007	0,28a	±0,007	3,13a,b	±0,065
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	0,20a	±0,003	0,30a	±0,010	0,28a	±0,006	3,29a	±0,044
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	0,17a,b	±0,006	0,30a	±0,009	0,28a	±0,005	3,16a,b	±0,002

A monitorização da acumulação de macronutrientes (com destaque para o Ca), persistiu com uma nova recolha de frutos (15/6/2018), após a 3ª pulverização, desta vez unicamente com CaCl₂ (4 kg ha⁻¹), tendo-se verificado (**Tabela 3.15**) valores de Ca mais baixos no controlo (com excepção do tratamento com Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)), que foram significativos relativamente aos tratamentos Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹) e CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹). Os teores de S revelaram valores significativamente mais elevados no controlo e mínimos nos tratamentos CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹) e CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹). O K apresentou níveis significativamente mais elevados no controlo e mínimos nos tratamentos CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹) e CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹). Os teores de P não variaram de forma significativa entre os tratamentos. Nesta fase, independentemente das variações detectadas para todos estes elementos minerais, continuaram a não se constatar acumulações fitotóxicas, aspecto que determinou o incremento das pulverizações foliares para 8 kg ha⁻¹ de CaCl₂.

Tabela 3.15 - Teor médio (n = 3) de macroelementos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 15/6/2018 (3ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.
Controlo	0,18c	±0,007	0,33a	±0,006	0,30a	±0,004	3,33a	±0,085
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	0,20b,c	±0,003	0,30a	±0,000	0,27b,c	±0,004	3,22a,b	±0,033
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	0,24a	±0,004	0,32a	±0,008	0,29a,b,c	±0,001	3,06a,b	±0,049
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	0,15d	±0,001	0,33a	±0,002	0,29a,b	±0,003	3,06a,b	±0,029
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	0,19c	±0,009	0,32a	±0,003	0,28a,b,c	±0,005	2,97b	±0,070
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	0,18c	±0,010	0,30a	±0,017	0,26c	±0,013	3,00b	±0,076
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	0,22a,b	±0,000	0,32a	±0,002	0,21c	±0,002	3,18a,b	±0,054

A monitorização da acumulação de macronutrientes, no campo experimental persistiu com uma nova recolha de frutos (10/7/2018), após a 4ª pulverização, unicamente com CaCl₂ (8 kg ha⁻¹). Nesta fase (**Tabela 3.16**), a aplicação foliar de teores substancialmente mais elevados de CaCl₂ neutralizou as

diferenças significativas relativamente à acumulação de Ca dos vários tratamentos (*i.e.*, previamente tratados com CaCl₂ ou Ca(NO₃)₂), porém verificaram-se níveis de P, S e K mais baixos no tratamento Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹). Paralelamente, os níveis de P permaneceram significativamente mais elevados nos tratamentos Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹) e CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹). Também nesta fase do desenvolvimento vegetativo não se detectaram acumulações fitotóxicas ou sintomas visuais de toxicidade.

Tabela 3.16 - Teor médio (n = 3) de macroelementos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 10/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Tratamentos	Ca		P		S		K	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.
Controlo	0,22b	±0,00	0,21b,c	±0,016	0,18a,b	±0,011	2,64b	±0,100
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	0,33a	±0,03	0,28a	±0,022	0,20a,b	±0,017	2,77a	±0,152
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	0,30a	±0,05	0,19c	±0,019	0,16b	±0,001	2,15b	±0,100
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	0,35a	±0,04	0,24a,b,c	±0,011	0,19a,b	±0,009	2,72a	±0,114
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	0,43a	±0,02	0,24a,b,c	±0,004	0,20a,b	±0,009	2,79a	±0,076
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	0,42a	±0,03	0,29a	±0,018	0,23a	±0,010	2,99a	±0,073
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	0,31a	±0,03	0,27a,b	±0,013	0,21a,b	±0,010	2,84a	±0,089

A monitorização da acumulação de macronutrientes, no campo experimental persistiu com uma nova recolha de frutos (20/7/2018), após a 4ª pulverização, nesta fase também com CaCl₂ (8 kg ha⁻¹). Nesta fase (**Tabela 3.17**), os valores de Ca, P e S (excepto no tratamento CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)) foram substancialmente inferiores no controlo, comparativamente a todos os tratamentos. Relativamente ao K, todos os tratamentos (com excepção do CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)) também foram substancialmente mais elevados do que o controlo. Também nesta fase não se visualizaram sintomas de toxicidade.

Tabela 3.17 - Teor médio (n = 3) de macroelementos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 20/7/2018 (após 4ª pulverização) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Tratamentos	Ca		P		S		K	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.
Controlo	0,23d	±0,005	0,14d	±0,004	0,14b	±0,003	2,10b,c	±0,031
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	0,33a,b,c	±0,013	0,19a,b	±0,002	0,16a,b	±0,003	2,38a,b	±0,090
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	0,27c,d	±0,013	0,22a	±0,006	0,164a,b	±0,006	2,34a,b,c	±0,056
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	0,38a,b	±0,029	0,18b,c	±0,001	0,15a,b	±0,004	2,30 a,b,c	±0,027
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	0,41a	±0,028	0,20a	±0,011	0,17a	±0,007	2,24a,b,c	±0,057
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	0,32b,c,d	±0,012	0,19a,b	±0,004	0,15a,b	±0,003	2,39a	±0,072
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	0,31b,c,d	±0,010	0,16c,d	±0,005	0,14b	±0,002	2,07c	±0,050

Tal como referido anteriormente, caso não ocorra a biofortificação das partes edíveis das plantas, o objetivo proposto neste trabalho não seria alcançado, razão pela qual a monitorização dos minerais presentes no fruto não só à colheita, mas no decorrer do seu desenvolvimento fenológico seria fundamental no acompanhamento do processo de biofortificação com recurso a aplicações foliares.

A partir da 2ª recolha, observamos que os valores de Ca apresentam no geral uma tendência para que os frutos cujas árvores foram sujeitas a biofortificação, demonstrem valores de Ca superiores aos frutos das árvores controlo, solidificando o potencial da biofortificação decorrente do incremento deste mineral nas partes edíveis.

3.2.2.2 Definição do Índice de Biofortificação em Cálcio do Fruto e Interações Nutricionais

3.2.2.2.1 Quantificação por Fluorescência de Raios-X

A acumulação de elementos minerais, nos frutos produzidos no campo experimental, à colheita (em 4/9/2018) revelou (**Tabela 3.18**) teores de Ca significativamente mais baixos no controlo, face aos restantes tratamentos. Neste enquadramento, o índice de biofortificação em Ca oscilou entre 33 e 67 %. Os níveis de S apresentaram valores mínimos no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,3 kg ha⁻¹), que foram significativamente diferentes dos tratamentos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,1 kg ha⁻¹), CaCl_2 (0,4 kg ha⁻¹) e CaCl_2 (1,6 kg ha⁻¹). O K, comparativamente aos restantes tratamentos, revelou valores significativamente mais elevados no controlo. O Zn revelou teores significativamente mais elevados no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,1 kg ha⁻¹), apresentando o tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,3 kg ha⁻¹) o valor significativamente mais baixo.

Tabela 3.18 - Teor médio (n = 3) de macroatominais minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d, e indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		P		S		K		Zn	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	0,06e	±0,001	0,07c,d	±0,003	0,07a,b	±0,001	2,04a	±0,011	13,9b	±0,849
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	0,09d	±0,000	0,09b	±0,002	0,08a	±0,003	1,88b	±0,001	22,8a	±1,762
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	0,10a	±0,002	0,05e	±0,001	0,06b	±0,002	1,17e	±0,001	4,8d	±0,290
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	0,09b	±0,002	0,06e	±0,001	0,07a,b	±0,001	1,20e	±0,007	6,9c,d	±1,291
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	0,09b	±0,001	0,10a	±0,003	0,09a	±0,001	1,84b	±0,007	11,0b,c	±1,240
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	0,08b,c	±0,000	0,08b,c	±0,001	0,06a,b	±0,001	1,45c	±0,008	10,4b,c	±0,164
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	0,08c	±0,001	0,07d	±0,003	0,08a	±0,001	1,30d	±0,011	14,3b	±2,187

3.2.2.2 Quantificação por Espectrofotometria de Absorção Atômica

A análise das amostras dos diferentes tratamentos, após extracção dos elementos minerais, à colheita revelou (**Tabela 3.19**), comparativamente ao controlo, teores de Ca mais elevados em todos os tratamentos (significativos em CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$)), com excepção do tratamento CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$). Assim, estes valores apontaram para um índice de biofortificação em Ca que oscilou entre 3,6 e 14,3 %. O Na revelou concentrações significativamente mais elevadas no controlo e mínimas no tratamento CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$). Os níveis de K aumentaram de forma progressiva a partir do controlo, ocorrendo valores significativamente diferentes em todas as árvores sujeitas a biofortificação. Os níveis de Mg, P, Fe, Zn, Cu não apresentaram variações significativas.

Tabela 3.19 - Teor médio ($n = 3$) de macroelementos minerais (considerando o peso seco como referencial) na pêra Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada elemento mineral entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Ca		K		P		Mg	
	%	E.P.	%	E.P.	%	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	0,028a,b	$\pm 0,001$	0,26d	$\pm 0,001$	0,23a	$\pm 0,226$	487a	$\pm 3,302$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,1 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,031a,b	$\pm 0,000$	0,29c	$\pm 0,004$	0,19a	$\pm 0,185$	494a	$\pm 14,833$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,029a,b	$\pm 0,000$	0,30c	$\pm 0,003$	0,03a	$\pm 0,015$	466a	$\pm 26,773$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,031a,b	$\pm 0,000$	0,31c	$\pm 0,002$	0,19a	$\pm 0,157$	489a	$\pm 13,766$
CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,030a,b	$\pm 0,000$	0,32b,c	$\pm 0,003$	0,02a	$\pm 0,023$	492a	$\pm 25,948$
CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,032a	$\pm 0,001$	0,35a,b	$\pm 0,010$	0,20a	$\pm 0,199$	460a	$\pm 35,718$
CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,027b	$\pm 0,001$	0,36a	$\pm 0,013$	0,365a	$\pm 0,166$	490a	$\pm 36,429$
Tratamentos	Fe		Cu		Zn		Na	
	ppm	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.	ppm	E.P.
Controlo	2,96a	$\pm 0,592$	3,57a	$\pm 1,832$	34,44a	$\pm 1,938$	10,48a	$\pm 0,515$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,1 \text{ kg ha}^{-1}$)	2,28a	$\pm 0,654$	0,52a	$\pm 0,515$	26,66a	$\pm 0,965$	8,64a	$\pm 0,632$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,75a	$\pm 0,136$	1,77a	$\pm 1,500$	27,96a	$\pm 0,978$	8,65a	$\pm 0,534$
$\text{Ca(NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,96a	$\pm 0,140$	1,54a	$\pm 1,370$	15,16a	$\pm 7,327$	9,85a	$\pm 0,945$
CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$)	0,87a	$\pm 0,118$	3,73a	$\pm 1,577$	21,96a	$\pm 2,996$	5,43a	$\pm 0,343$
CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$)	1,23a	$\pm 0,194$	3,28a	$\pm 1,832$	19,61a	$\pm 4,763$	9,47a	$\pm 0,160$
CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)	2,222a	$\pm 1,160$	2,180a	$\pm 2,180$	20,790a	$\pm 5,413$	7,99a	$\pm 2,111$

Ambas as técnicas (**Tabela 3.18** e **Tabela 3.19**), evidenciaram um aumento dos teores de Ca nas peras sujeitas a biofortificação relativamente ao controlo. A análise de fluorescência por aplicação de raios-X, evidenciou teores superiores (entre 33 e 67 %) por comparação com a análise de espectrofotometria de absorção atómica (entre 3,6 e 14,3 %). O primeiro método permite efetuar uma caracterização parcial, ficando sujeita a acumulações heterogéneas, não se obtendo o valor total no fruto. O segundo método, por sua vez permite a obtenção de um valor global independente da distribuição. Assim sendo, nas fatias de pêra (corte equatorial), a acumulação num dado ponto apresentou valores superiores. Por sua vez, uma análise global confirma a ocorrência efetiva de biofortificação, mas indica um aumento menor dos teores de Ca.

Estas discrepâncias podem ainda decorrer da preparação das amostras para análise, recorrendo-se no caso da fluorescência por aplicação de raios-X, a um processo de desidratação (onde apenas se promove a saída de água da amostra) e no caso da espectrofotometria de absorção atómica a uma digestão ácida (a fim de se obter apenas a fração mineral da amostra, eliminando-se a componente orgânica da amostra).

Por outro lado, tratando-se de um ensaio de campo, o fator “heterogeneidade” no processo de enriquecimento das amostras em Ca (que irão determinar diferentes índices nas relações sinérgicas e antagónicas nos elementos minerais das amostras), não pode ser descurado, uma vez que durante o processo de pulverização, a quantidade de CaCl_2 total que incide nas folhas e em cada fruto poderá variar de forma substancial (determinando teores parcialmente diferenciados nas amostras do mesmo tratamento, que serão detectados durante os processos de quantificação). Tratando-se de um processo realizado de forma manual, a dificuldade acresce com o facto de se fazer uma pulverização com uma crescente dificuldade na distribuição homogénea do pulverizante numa cultura de grande porte (árvores) em detrimento de outras de menor porte (como por exemplo os cereais).

Acresce que no campo, os fatores climáticos como já foram referidos anteriormente, condicionam a absorção de Ca (enunciando-se a título de exemplo o vento, temperatura, radiação solar, humidade do ar, entre outros). Diferentes graus de exposição das amostras de cada tratamento a estes factores abióticos (localização no interior ou exterior da árvore), pode favorecer a desidratação da calda de CaCl_2 pulverizada numas amostras em detrimento de outras (num mesmo tratamento), condicionando assim a absorção de Ca.

Relativamente aos restantes elementos, o facto da espectrofotometria de absorção atómica se tratar de um método destrutivo apresenta-se como uma diferenciação relativamente ao outro método. A relação entre o Ca e o K pode relacionar-se com a detecção de teores inferiores na da espectrofotometria de absorção atómica por comparação com a fluorescência por aplicação de raios-X, uma vez que a mesma tendência se verificou para o caso do Ca. Aponte-se ainda que no caso do Zn e do P, os teores obtidos pela análise de espectrofotometria de absorção atómica foram superiores à fluorescência por aplicação de raios-X.

3.3 Morfometria e Colorimetria dos Frutos

3.3.1 Altura, Diâmetro, Densidade e Peso Seco

Nas várias recolhas efectuadas ao longo do desenvolvimento dos frutos submetidos aos diferentes tratamentos, relativamente ao controlo, não se detectaram variações significativas na altura (excepto em 15/6/2018, tratamentos CaCl_2 ($0,4 \text{ kg ha}^{-1}$), CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)) e diâmetro dos frutos (**Tabela 3.20**). À colheita, a altura dos frutos oscilou entre 72,2 - 84,4 mm, tendo o diâmetro oscilado entre 61,4 - 70,0 mm.

Tabela 3.20 - Média (n = 4) da altura e diâmetro de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2ª, 3ª, e 4ª adubação foliar) e 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Altura (mm)		Diâmetro (mm)	
	Média	E.P.	Média	E.P.
1ª Recolha – 8/6/2018				
Controlo	38,0a	±0,44	22,6a	±0,40
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	36,6a	±0,61	21,4a,b	±0,31
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	36,0a	±1,12	20,6b	±0,43
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	37,3a	±0,84	21,3a,b	±0,45
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	35,0a	±0,85	20,7a,b	±0,49
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	36,5a	±0,77	21,4a,b	±0,43
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	38,2a	±0,91	22,17 a,b	±0,51
2ª Recolha – 15/6/2018				
Controlo	49,9a	±0,99	31,1a,b	±1,10
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	47,2a,b	±0,85	30,4a,b	±0,52
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	47,6a,b	±1,06	33,2a	±1,35
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	46,3a,b,c	±0,95	30,9a,b	±0,71
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	42,6c	±0,93	28,4b	±0,62
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	44,0b,c	±0,75	29,2b	±0,66
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	44,0b,c	±0,53	29,2b	±0,46
3ª Recolha – 10/7/2018				
Controlo	49,3a	±1,46	37,8a,b	±0,91
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	48,2a	±2,18	38,9a	±0,74
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	49,6a	±1,54	38,5a	±0,78
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	46,3a	±0,96	37,1a,b	±0,56
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	47,3a	±0,86	36,4a,b	±0,89
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	47,6a	±1,28	34,5b	±1,07
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	49,5a	±0,57	35,8a,b	±0,70
4ª Recolha – 20/7/2018				
Controlo	55,2a	±1,20	45,8a	±1,33
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	56,6a	±1,75	46,4a	±1,24
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	56,2a	±1,24	45,5a	±0,88
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	56,5a	±1,43	45,8a	±0,68
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	57,4a	±1,95	48,5a	±2,06
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	56,8a	±0,70	45,6a	±1,02
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	55,6a	±1,05	43,4a	±1,36
Colheita – 4/9/2018				
Controlo	72,2a	±3,94	62,6a,b	±1,33
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	75,4a	±1,36	64,8a,b	±0,92
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	84,4a	±4,56	69,6a,b	±2,38
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	81,0a	±3,16	68,8a,b	±1,07
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	80,6a	±3,47	70,0a	±2,47
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	72,2a	±3,22	61,4b	±1,89
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	76,2a	±2,13	63,2a,b	±2,15

No decorrer do processo de monitorização, com o decorrer do ensaio observou-se (**Tabela 3.20**) o aumento tanto da altura como do diâmetro dos frutos em todos os tratamentos. Neste enquadramento, aponte-se que para efeitos de comercialização, o calibre dos frutos é utilizado como elemento diferenciador de preço perante a venda ao consumidor, razão pela qual se impõem limites mínimos de comercialização.

O calibre consiste no diâmetro máximo da secção equatorial (ANP, 1997) e à colheita, a variedade Rocha caracteriza-se por apresentar um calibre médio de 60 – 65 mm, (ANP, sem data). Os valores de calibragem obtidos à colheita, vão de encontro aos valores obtidos por Salvador (2015), com as peras controlo e as inicialmente tratadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,1 \text{ kg ha}^{-1}$), CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$), se enquadradas no calibre médio referido, enquanto os restantes tratamentos obtiveram valores no intervalo de 65 - 70 mm. Tal significa que se estaria perante dois grupos distintos para venda ao público, pois numa mesma embalagem as diferenças de calibres não podem ser superiores a 5 mm (ANP, sem data). Por sua vez, à data da colheita, todas as peras (do controlo e restantes tratamentos) atingiram o calibre mínimo de 55 mm para serem comercializadas, não descartando o seu encaminhamento para o processamento industrial (ANP, sem data). O facto de se atingirem ainda calibres entre 65 - 75 mm, é um forte indicador da correta instalação do pomar e das boas práticas agrícolas, como a poda, monda, fertilização e irrigação (Soares *et al.*, 2001).

À colheita também a densidade e o peso seco não apresentaram variações significativas entre o controlo e os tratamentos de biofortificação, com valores oscilando em torno de $1029 - 1109 \text{ kg m}^{-3}$ para a densidade e entre 13,18 - 14,59 % para o peso seco (**Figura 3.8; Tabela 3.21**), verificando-se assim que o processo de biofortificação não afeta estes dois parâmetros.



Figura 3.8 - Aspecto visual das árvores e frutos da pêra Rocha no campo experimental, no dia 4 de Setembro (à colheita).

Tabela 3.21 - Média (n = 4) da densidade e do peso seco de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a indica ausência de diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, $P \leq 0,05$).

Tratamentos	Densidade (kg m ⁻³)		Peso seco (%)	
	Média	E.P.	Média	E.P.
Controlo	1029a	±15	13,39a	±0,22
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	1064a	±20	13,99a	±0,35
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	1037a	±13	14,05a	±0,47
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	1050a	±5	13,18a	±0,36
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	1056a	±2	14,49a	±0,44
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	1072a	±26	14,59a	±0,21
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	1109a	±6	13,77a	±0,26

No geral, os valores indicam que perante a adoção de técnicas de biofortificação, não serão necessários ajustes ao nível do transporte, armazenamento e embalagem da fruta, tendo por base o parâmetro densidade. De facto, este aspecto poderá ser particularmente relevante, tendo em consideração a necessidade, não só de um transporte rápido a partir do momento em que se faz a colheita até ao local de armazenamento, como também considerando o comércio desta variedade durante praticamente todo o ano.

Relativamente à percentagem de peso seco, podemos ainda constatar que as peras podem apresentar perdas de humidade que rondam os 85 %, indo de encontro aos valores obtidos para a componente da água (maioritário) presentes nos perfis nutricionais, com valores de 85,1 g e 85,5 g (ANP, 2019; PortFIR, 2019). Os valores de humidade à colheita, estão em linha com os valores reportados noutros trabalhos (Salvador, 2015).

3.3.2 Dureza, Sólidos Solúveis Totais e Ácido Málico

A par de outros testes de maturação, como a análise do calibre dos frutos, aponte-se que a dureza da polpa, o índice refractométrico e a acidez total auxiliam a determinação do momento óptimo da colheita (Soares *et al.*, 2001).

Os frutos do campo experimental, com tratamento inicial de Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹), revelaram um aumento da dureza. Pelo contrário, o tratamento inicial com CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹) mostrou uma redução do valor da dureza. Não se observaram alterações em relação ao teor de sólidos solúveis totais, para qualquer dos tratamentos com CaCl₂ ou Ca(NO₃)₂, porém todas as modalidades apresentaram valores mais altos de acidez relativamente aos frutos controlo (**Figura 3.9**).

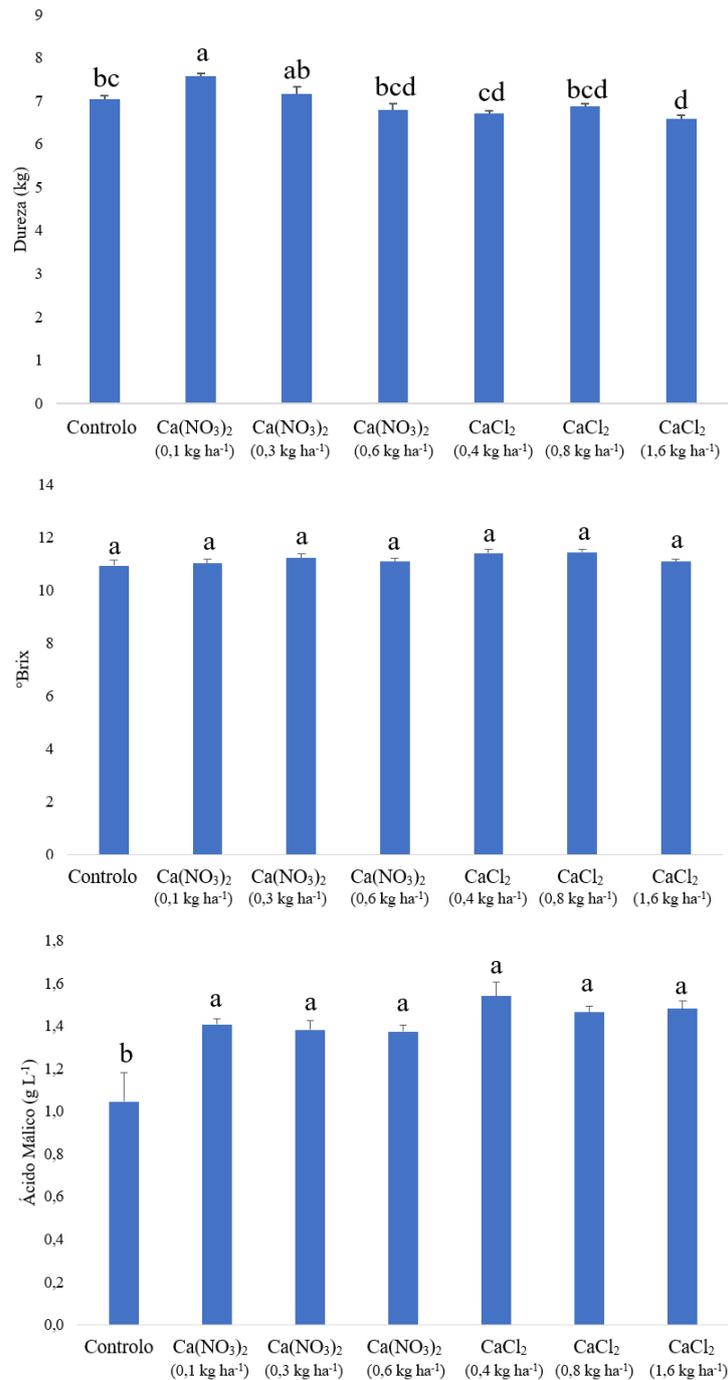


Figura 3.9 - Valores médios da dureza (n = 60), °Brix (n = 20) e acidez (n = 4) em sumo de pêra Rocha, de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda., obtidas à colheita, e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a, b, c, d indicam as diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

A determinação da dureza da polpa é um dos métodos mais utilizados em peras, permitindo uma aferição rápida do respectivo estado de maturação. No decorrer deste período, a hidrolisação progressiva das protopectinas conduz a uma perda de dureza (Soares *et al.*, 2001). As protopectinas (insolúveis em água) encontram-se presentes nos frutos verdes que tenham atingido o pleno desenvolvimento, sendo que após o subsequente amadurecimento, estas são hidrolisadas a pectina (solúvel em água).

A dureza da polpa deve situar-se entre 5,5 - 6,5 kg / 0,5 cm² (ANP, sem data). Os nossos valores, quer do controlo quer dos diferentes tratamentos de biofortificação situaram-se ligeiramente acima deste intervalo, com valores oscilando entre 6,5 – 7,5 kg / 0,5 cm². Situação semelhante foi verificada por Carvalho (2011), que também obteve valores de dureza à colheita acima do intervalo de referência (6,5 - 7 kg), tendo este decrescido no período de conservação.

O índice refractométrico permite evidenciar o teor em sólidos solúveis totais (°Brix) presentes nos frutos, onde dominam os açúcares simples. Os frutos têm tendência para apresentar quantidades superiores de açúcares e ácidos quando as temperaturas de Verão são mais elevadas, e não ocorre excesso de água (decorrentes quer da chuva, quer da água de rega). Por sua vez, a presença de açúcares relaciona-se fortemente com as características organolépticas da pêra (Soares *et al.*, 2001).

Observou-se que tanto as peras controlo, como todas as peras biofortificadas, apresentaram valores semelhantes de teores de sólidos solúveis totais entre 11 e 11,5 °Brix, portanto dentro do intervalo considerado de referência (11-13 °Brix) (ANP, sem data). Assim, a biofortificação não alterou o teor de sólidos solúveis totais. Dessa forma, será expectável a ausência de interferências no sabor das peras e respetivos produtos que possuam as mesmas como matéria-prima, indo de encontro ao objectivo de obtenção de alimentos funcionais na indústria alimentar. À semelhança dos nossos valores, Carvalho (2011), Salvador (2015) e Pereira (2017), também obtiveram valores à colheita que se enquadram no intervalo de referência.

A determinação da acidez total tem por base uma reação ácido-base, sendo o ácido málico, o ácido orgânico mais abundante na pêra (Soares *et al.*, 2001; Lucas, 2012). A par dos açúcares, a quantidade de ácido e o balanço destes dois componentes podem originar uma pêra de qualidade superior, quanto maior forem os valores destes parâmetros. Porém deve salientar-se que ao longo do período de conservação em câmaras frigoríficas, o teor de ácido tende a diminuir (Soares *et al.*, 2001).

Os valores de ácido málico também auxiliam na escolha da data de colheita, devendo situar-se entre 2 e 3 g L⁻¹ (ANP, sem data), com Soares *et al.* (2001), a apontar o valor de 2,2 g por litro de sumo. As peras do controlo apresentaram (**Figura 3.9**) os valores mais baixos (ligeiramente acima do valor de 1 g L⁻¹), mas as peras de todos os tratamentos de biofortificação apresentaram valores de acidez superiores ao controlo (perto de 1,5 g L⁻¹) encontrando-se mais próximas dos valores de referência, com potencial para promover uma melhoria da qualidade. Noutros trabalhos com pêra Rocha, proveniente de diferentes concelhos da região Oeste, também se obtiveram valores semelhantes. Carvalho (2011), obteve à colheita valores variáveis de acidez titulável, com um valor mínimo de 1,4 g L⁻¹, tendo atingido num dos campos o valor máximo de 3,3 g L⁻¹ (pomares do Cadaval). Salvador (2015) obteve valores entre 0,7 g L⁻¹ e 1 g L⁻¹ (pomares localizados em Alcobaça, Mafra e Lourinhã), e Pereira (2017) obteve valores à colheita de 1,2 g L⁻¹ (em peras provenientes de Mafra e Bombarral).

3.3.3 Índices Colorimétricos

A análise colorimétrica (escala CIELab) das folhas no decurso do desenvolvimento dos frutos (**Tabela 3.22**) evidenciou a ocorrência de variações na luminosidade / brilho que não foram significativas em 8/6/2018 e 10/7/2018. Em 15/6/2018 e em 20/7/2018, de modo geral a luminosidade / brilho aumentou (excepto no caso CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹) a 20/7/2018) nos diferentes tratamentos (relativamente ao controlo). Relativamente ao índice a*, a componente do vermelho aumentou (excepto no tratamento Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹) em 15/6/2018) em todos os tratamentos (relativamente ao controlo, em 8/6/2018 e 15/6/2018), mas permaneceu sem alterações significativas (excepto no tratamento Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹) em 20/7/2018) em 10/7/2018 e 20/7/2018. O índice b*, em 8/6/2018, revelou um aumento significativo nos tratamentos Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹) e Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹) (incremento do índice amarelo), porém em 15/6/2018 e 10/7/2018 não subsistiram variações entre os diferentes

tratamentos. No dia 20/7/2018 o índice b*, apresentou valores mínimos (componente do amarelo) no controlo.

Tabela 3.22 - Médias (n = 4) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – Luminosidade / brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo), utilizando o iluminante D₆₅ de folhas de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2^a, 3^a e 4^a adubação foliar) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Tratamentos	L		a*		b*	
	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.
1ª Recolha – 8/6/2018						
Controlo	18,86a	±1,18	1,01c	±0,21	5,93b,c	±0,06
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	20,68a	±0,04	1,80a	±0,02	6,53a	±0,12
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	18,77a	±0,03	1,59a,b	±0,01	5,81c	±0,02
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	20,84a	±0,00	1,63a,b	±0,01	6,45a	±0,01
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	19,53a	±0,00	1,66a,b	±0,01	5,65c	±0,23
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	19,12a	±0,00	1,36b,c	±0,01	5,84c	±0,01
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	20,72a	±0,00	1,50a,b	±0,06	6,37a,b	±0,01
2ª Recolha – 15/6/2018						
Controlo	18,50b	±0,28	1,07a,b	±0,08	5,90a,b	±0,17
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	18,60b	±0,17	1,40a,b	±0,05	5,77b	±0,02
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	22,44a	±0,59	0,92b	±0,03	7,11a	±0,19
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	20,62a,b	±0,32	1,57a	±0,04	6,37a,b	±0,07
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	22,42a	±0,72	1,13a,b	±0,23	6,32a,b	±0,39
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	20,63a,b	±1,14	1,41a,b	±0,11	6,60a,b	±0,23
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	20,32a,b	±1,31	1,25a,b	±0,18	6,22a,b	±0,50
3ª Recolha – 10/7/2018						
Controlo	18,75a	±1,95	1,42a	±0,20	5,77a	±0,50
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	19,53a	±1,67	1,34a	±0,05	5,79a	±0,25
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	18,61a	±1,57	1,33a	±0,05	5,46a	±0,33
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	17,83a	±0,66	1,32a	±0,06	5,45a	±0,17
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	18,02a	±1,21	1,34a	±0,02	5,41a	±0,18
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	18,77a	±0,44	1,34a	±0,02	5,64a	±0,04
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	18,30a	±0,84	1,31a	±0,09	5,42a	±0,17
4ª Recolha – 20/7/2018						
Controlo	22,40c,d	±0,63	1,37a	±0,13	6,46c	±0,19
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	24,98b	±0,17	1,40a	±0,03	7,74b	±0,04
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	23,81b,c	±0,02	1,58a	±0,02	7,20b	±0,01
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	26,94a	±0,17	0,74b	±0,05	8,41a	±0,06
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	21,97d	±0,41	1,60a	±0,12	6,26c	±0,13
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	23,81b,c	±0,35	1,46a	±0,07	7,36b	±0,14
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	23,10c,d	±0,15	1,75a	±0,12	6,55c	±0,10

No decorrer do período de monitorização das folhas, verificou-se que no parâmetro a* predominaram sempre valores positivos, que no geral se apresentaram superiores ao controlo até à 2ª recolha e, posteriormente na 4ª. Apenas na 3ª recolha, a 10/07/2018, se observou um valor do controlo superior aos tratamentos, acompanhado de um maior erro padrão. Contudo, apesar das diferenças significativas no início do processo de monitorização, na fase final não se verificaram diferenças significativas (exceptuando o tratamento com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$)), indicando a ausência de stresses na folha ao nível macroscópico.

No parâmetro b*, observaram-se valores positivos (predominância do amarelo) ao longo do processo de monitorização. Quantificaram-se apenas diferenças significativas entre o controlo e os restantes tratamentos no início do processo (8/6/2018) para os tratamentos iniciais com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, e no final (20/7/2018), para os mesmos tratamentos e no CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$). Nesta última análise, praticamente todos os tratamentos apresentaram valores superiores ao controlo, com os tratamentos com uso inicial de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a destacarem-se. A 3ª recolha (10/7/2018) demonstrou uma ligeira diminuição de valor por comparação com a recolha anterior, contudo foi detetada tanto para os tratamentos como para o controlo.

Para o parâmetro L, obtiveram-se valores máximos na 4ª recolha, não se observando diferenças significativas entre as folhas do controlo e as folhas sujeitas desde o início do ensaio a tratamentos com CaCl_2 . À semelhança do parâmetro b*, na 3ª recolha (10/7/2018) verificaram-se valores ligeiramente inferiores relativamente às restantes adubações. Tal diminuição coincide com a aplicação da dose mais elevada de CaCl_2 (8 kg ha^{-1}) em todos os tratamentos, podendo eventualmente sobrepor-se com uma adaptação por parte da planta à disponibilização foliar de Ca. Porém, o aumento dos valores na 4ª recolha, apontam para a ausência de eventuais stresses resultantes da aplicação das soluções de biofortificação.

Relativamente à análise dos índices colorimétricos, saliente-se novamente que a análise da cor das folhas foi realizada após uma desidratação em estufa a 60°C e posterior homogeneização, razão pela qual não serão perceptíveis os esperados valores negativos do parâmetro a* (indicando cor verde). Observaram-se efetivamente valores de L baixos, acompanhados de componentes a* e b* que favorecem ligeiramente, os vermelhos e amarelos respetivamente. A ausência de valores de L mais baixos poderão ser um indicador da ausência de toxicidade nas folhas, que a ser observadas, se manifestariam macroscopicamente na forma de manchas escuras (necrose) nas folhas.

A medição dos índices colorimétricos dos frutos, corresponde a outro teste de maturação, baseado na determinação da cor da epiderme da pêra. No decorrer do desenvolvimento fenológico, reporta-se uma evolução progressiva dos tons de verde (resultantes da presença de clorofila), para os tons de amarelo, devendo a colheita iniciar-se quando se observa uma predominância de uma cor verde clara (Soares *et al.*, 2001). Este parâmetro por sua vez, encontra-se dependente das oscilações entre as temperaturas diurnas e nocturnas registadas no decorrer do período de desenvolvimento do fruto (Soares *et al.*, 2001).

A análise colorimétrica da epiderme dos frutos no decurso do seu desenvolvimento, relativamente ao controlo, apenas revelou (**Tabela 3.23**), no parâmetro luminosidade / brilho, valores significativamente inferiores no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,1 \text{ kg ha}^{-1}$), em 15/6/2018 e 10/7/2018 e a 20/7/2018 em todos os tratamentos (excepto $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,6 \text{ kg ha}^{-1}$) e CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)). Neste dia (20/7/2018), os valores mais elevados ocorreram no controlo.

À colheita (4/9/2018), na epiderme e na polpa, de modo geral, o brilho / luminosidade não apresentou variações significativas entre os tratamentos. Até 10/7/2018, o parâmetro a* apresentou valores mais elevados no controlo, mas em 20/7/2018, não subsistiram variações significativas entre os tratamentos, e à colheita (4/9/2018) apenas ocorreu uma variação no tratamento CaCl_2 ($0,8 \text{ kg ha}^{-1}$) na epiderme (sem variações significativas na polpa). Relativamente à componente b*, subsistiram sempre valores mais elevados no controlo até 20/7/2018 (excepto no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,3 \text{ kg ha}^{-1}$) a 15/6/2018), porém à colheita (4/9/2018) na epiderme e na polpa não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 3.23 - Médias (n = 4) dos parâmetros colorimétricos CIELab (L – Luminosidade / brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo), utilizando o iluminante D₆₅, de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 8/6/2018, 15/6/2018, 10/7/2018, 20/7/2018 (após a 2^a, 3^a e 4^a adubação foliar) e 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos de cada período temporal (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Tratamentos	L		a*		b*	
	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.
1^a Recolha – 8/6/2018						
Controlo	42,10a	±0,45	6,14a	±0,09	15,71a	±0,23
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	42,22a	±0,55	5,98a,b	±0,08	15,54a	±0,15
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	43,16a	±0,31	5,86a,b	±0,18	15,78a	±0,29
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	43,45a	±1,17	5,61b	±0,13	15,52a	±0,39
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	33,63a	±0,02	4,66b	±0,02	12,34b	±0,01
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	35,26a	±0,02	5,01b	±0,02	12,94b	±0,01
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	34,86a	±0,01	4,85b	±0,01	12,66b	±0,00
2^a Recolha – 15/6/2018						
Controlo	50,48a,b	±0,17	4,87a	±0,00	17,75a	±0,04
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	44,06c	±0,10	4,82a	±0,14	16,41a,b	±0,58
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	53,07a	±0,49	3,31d	±0,09	17,87a	±0,04
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	50,42a,b	±0,36	4,87a	±0,07	16,87a,b	±0,03
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	46,34b,c	±1,61	3,97b,c	±0,18	15,89b	±0,52
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	47,34b,c	±0,56	4,44a,b	±0,04	16,27a,b	±0,09
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	46,42b,c	±1,67	3,82c,d	±0,18	15,73b	±0,49
3^a Recolha – 10/7/2018						
Controlo	47,09a,b	±0,73	4,27a	±0,08	16,48a,b	±0,20
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	40,62c	±0,96	3,77a,b	±0,10	13,84b	±0,20
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	49,92a	±0,98	4,25a	±0,11	17,48a	±0,36
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	45,16a,b	±0,37	4,29a	±0,11	15,75a,b	±0,09
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	42,32b,c	±1,93	3,54b,c	±0,23	14,05b	±0,69
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	45,38a,b	±1,38	3,78a,b	±0,13	15,18b,c	±0,49
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	41,94b,c	±1,53	2,95c	±0,08	13,84b	±0,49
4^a Recolha – 20/7/2018						
Controlo	54,15a	±0,31	3,77b	±0,06	18,02a	±0,25
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	50,29b	±0,69	3,79b	±0,11	17,21a,b	±0,26
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	48,38b	±0,31	4,10a,b	±0,04	16,46b,c	±0,13
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	51,48a,b	±0,82	3,77b	±0,03	17,67a,b	±0,36
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	48,00b	±0,33	3,96b	±0,12	16,21b,c	±0,16
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	41,61c	±1,31	4,51a	±0,07	15,25c	±0,48
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	51,41a,b	±0,92	3,95b	±0,16	17,32a,b	±0,35
Colheita – 4/9/2018 (Epiderme)						
Controlo	58,22a	±1,14	-13,04b	±0,12	24,71a	±0,50
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	59,23a	±0,60	-12,94b	±0,52	26,45a	±0,32
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	58,34a	±2,42	-11,99b	±0,77	25,74a	±0,48
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	58,33a	±0,66	-13,27b	±0,47	26,19a	±0,17
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	58,32a	±1,70	-11,09a,b	±0,51	25,05a	±0,68
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	53,86a	±3,87	-8,88a	±0,85	24,43a	±1,45
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	56,94a	±0,36	-12,90b	±0,41	25,84a	±0,20
Colheita – 4/9/2018 (Polpa)						
Controlo	73,87a	±1,11	-1,85a	±0,23	9,67a	±0,29
Ca(NO ₃) ₂ (0,1 kg ha ⁻¹)	74,67a	±0,62	-2,26a	±0,69	11,29a	±0,39
Ca(NO ₃) ₂ (0,3 kg ha ⁻¹)	75,64a	±0,70	-1,61a	±0,31	9,92a	±0,84
Ca(NO ₃) ₂ (0,6 kg ha ⁻¹)	73,57a	±1,28	-2,24a	±0,26	10,91a	±0,80
CaCl ₂ (0,4 kg ha ⁻¹)	73,72a	±1,05	-2,11a	±0,29	9,65a	±0,43
CaCl ₂ (0,8 kg ha ⁻¹)	76,34a	±0,10	-1,97a	±0,10	10,05a	±1,00
CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)	72,97a	±0,53	-1,96a	±0,12	10,19a	±0,94

À semelhança das folhas, procedeu-se à monitorização das peras no decorrer do seu desenvolvimento. Relativamente ao parâmetro L, verificou-se que, no geral, o valor teve tendência a aumentar desde o início até ao final do ensaio, implicando um “aumento do branco”. Na 1ª recolha (8/6/2018), após aplicação dos diferentes tratamentos de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 , não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos.

No caso da 2ª e 3ª recolha, encontrando-se já todas as pereiras sujeitas ao tratamento com CaCl_2 de 4 e 8 kg ha^{-1} , não se verificam diferenças significativas. Contudo as peras sujeitas inicialmente a tratamentos com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ((0,1 kg ha^{-1}) e (0,3 kg ha^{-1})) apresentaram o valor mais baixo e mais elevado. No caso da 4ª recolha, verificou-se que apenas não existem diferenças significativas para os tratamentos iniciais de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 sujeitos às maiores concentrações. Contudo, à colheita não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e os restantes tratamentos, constatando-se que à data de colheita, o processo de biofortificação não afetou a luminosidade / brilho das peras, quer ao nível da epiderme, quer ao nível da polpa. Entre estas, constatou-se que a polpa apresentou valores superiores do parâmetro L, eventualmente decorrente da sua respectiva cor típica branca (ANP, sem data).

No caso do parâmetro a^* , observou-se uma tendência geral para a diminuição dos valores, passando inclusive estes de positivos para negativos, indicando uma transição dos tons avermelhados para os esverdeados, encontrando-se de acordo com o esperado uma vez que à colheita, as peras da variedade Rocha apresentam uma epiderme amarela e / ou verde claro (ANP, sem data).

À semelhança do parâmetro L, inicialmente observaram-se valores inferiores dos tratamentos de CaCl_2 , relativamente ao controlo, contudo com a aplicação geral de CaCl_2 (4 kg ha^{-1}) e CaCl_2 (8 kg ha^{-1}), observou-se que à colheita apenas o tratamento CaCl_2 (0,8 kg ha^{-1}) apresentou diferenças significativas no controlo. À colheita, a polpa apresentou por sua vez, valores negativos, indicando uma ligeira predominância do verde relativamente ao vermelho, mas mantendo valores negativos superiores à epiderme, evidenciando-se a diferença entre a cor verde da epiderme e a cor branca da polpa.

Analisando-se o parâmetro b^* , observou-se uma tendência para o aumento dos valores subsistindo um aumento da componente amarela com o desenvolvimento fenológico. Novamente, e de acordo com o parâmetro a^* , a epiderme apresentou a cor esperada à colheita. Com tendências semelhantes às descritas no parâmetro a^* entre o controlo e os restantes tratamentos. À colheita, tanto a epiderme como a polpa não apresentaram diferenças significativas, prevalecendo na polpa valores inferiores da componente amarela, aproximando-a da cor branca.

Os valores colorimétricos à colheita da epiderme, nomeadamente, os parâmetros L e b^* positivos, acompanhados de um a^* negativo, vão de encontro aos valores obtidos por outros autores (Carvalho, 2011).

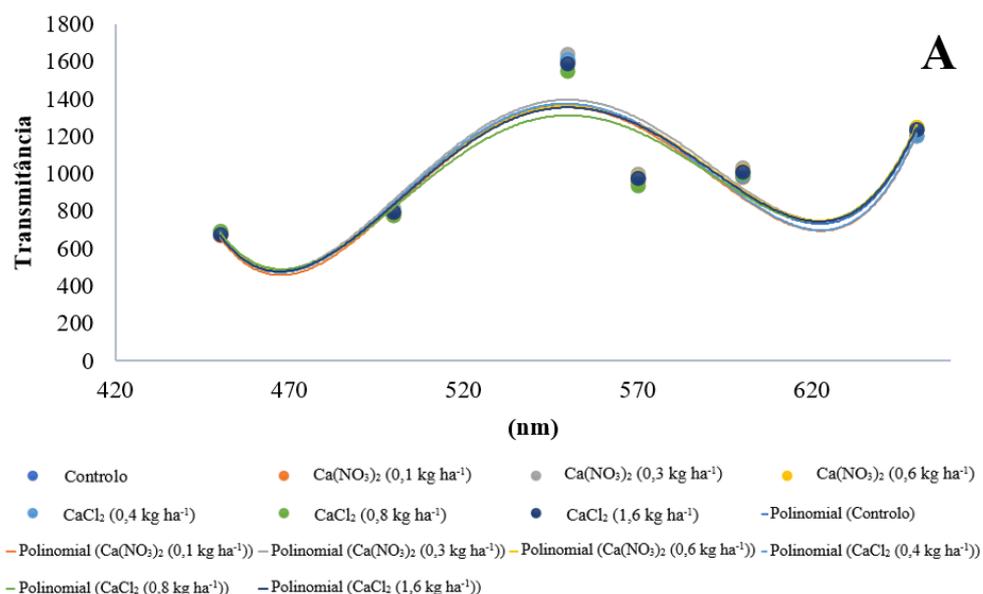
Assim, através da análise da **Tabela 3.23**, constata-se que o parâmetro da cor do fruto, muitas vezes um dos fatores mais importantes para qualquer consumidor aquando da compra de qualquer fruta, não mostrou impacto significativo do processo de biofortificação. A obtenção de frutos com as características esperadas, não afeta o encaminhamento destes para a venda ao público, ou para processamento industrial. No caso do processamento da matéria-prima, o facto da polpa ir de encontro à cor esperada, apresenta uma importância mais relevante por comparação com a epiderme, uma vez que geralmente se recorre ao descasque da pêra nos passos iniciais do processamento para obtenção dos produtos finais.

A cor também pode constituir um indicador relativamente a possíveis danos, uma vez que as doenças observadas, tanto na epiderme, como na polpa, podem conferir uma cor acastanhada que irá influenciar os parâmetros colorimétricos, afastando-os dos valores tipicamente obtidos nesta variedade.

Efectuando a análise colorimétrica de varrimento na região espectral do visível (450 - 650 nm), também não se quantificaram, no espectro de radiação do visível, variações apreciáveis na transmitância colorimétrica entre os diferentes tratamentos (*i.e.*, na epiderme e na polpa dos frutos), verificando-se (**Tabela 3.24; Figura 3.10_{A,B}**) um pico de absorvência nos 550 nm. Aponte-se, contudo, que este pico de absorvência foi substancialmente mais elevado na polpa dos frutos.

Tabela 3.24 - Média da transmitância colorimétrica (n = 4), na banda dos 450 – 650 nm, na epiderme e na polpa de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita) e respectivo erro padrão (E.P.). A letra a indica ausência de diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos a cada comprimento de onda (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Transmitância colorimétrica na epiderme de frutos de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha												
Tratamentos	450 nm		500 nm		550 nm		570 nm		600 nm		650 nm	
	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.	Média	E.P.
Controlo	674a	±8,66	796a	±20,48	1606a	±39,88	975a	±25,15	1008a	±19,15	1232a	±18,34
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	667a	±13,38	779a	±17,05	1591a	±40,13	957a	±24,32	977a	±27,54	1198a	±25,24
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	689a	±15,88	813a	±31,34	1638a	±64,25	995a	±44,91	1031a	±57,10	1248a	±49,51
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	682a	±8,19	796a	±5,04	1597a	±8,09	977a	±5,90	1016a	±23,96	1249a	±35,51
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	679a	±19,81	800a	±34,92	1610a	±60,48	973a	±43,21	984a	±50,22	1203a	±48,45
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	691a	±17,42	775a	±27,63	1545a	±50,97	934a	±33,91	994a	±38,14	1237a	±31,78
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	675a	±10,53	792a	±25,89	1585a	±57,03	973a	±35,98	1009a	±36,50	1235a	±31,34
Tratamentos	Transmitância colorimétrica na polpa de frutos de <i>Pyrus communis</i> L. var. Rocha											
Controlo	1264a	±18,66	1395a	±20,11	2735a	±58,28	1532a	±28,32	1729a	±40,24	1897a	±24,64
Ca(NO₃)₂ (0,1 kg ha⁻¹)	1328a	±16,70	1464a	±21,07	2831a	±49,87	1593a	±23,64	1771a	±31,50	1940a	±34,44
Ca(NO₃)₂ (0,3 kg ha⁻¹)	1252a	±12,73	1373a	±12,60	2689a	±29,51	1504a	±14,19	1703a	±19,81	1886a	±25,54
Ca(NO₃)₂ (0,6 kg ha⁻¹)	1277a	±62,62	1399a	±49,03	2775a	±60,29	1537a	±39,50	1746a	±43,51	1890a	±38,16
CaCl₂ (0,4 kg ha⁻¹)	1245a	±20,76	1380a	±32,92	2713a	±44,84	1515a	±34,12	1692a	±31,65	1852a	±45,37
CaCl₂ (0,8 kg ha⁻¹)	1262a	±45,81	1398a	±33,24	2769a	±38,49	1551a	±23,79	1744a	±30,85	1899a	±36,01
CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹)	1265a	±9,21	1396a	±17,37	2757a	±25,16	1540a	±17,42	1742a	±2,03	1907a	±7,75



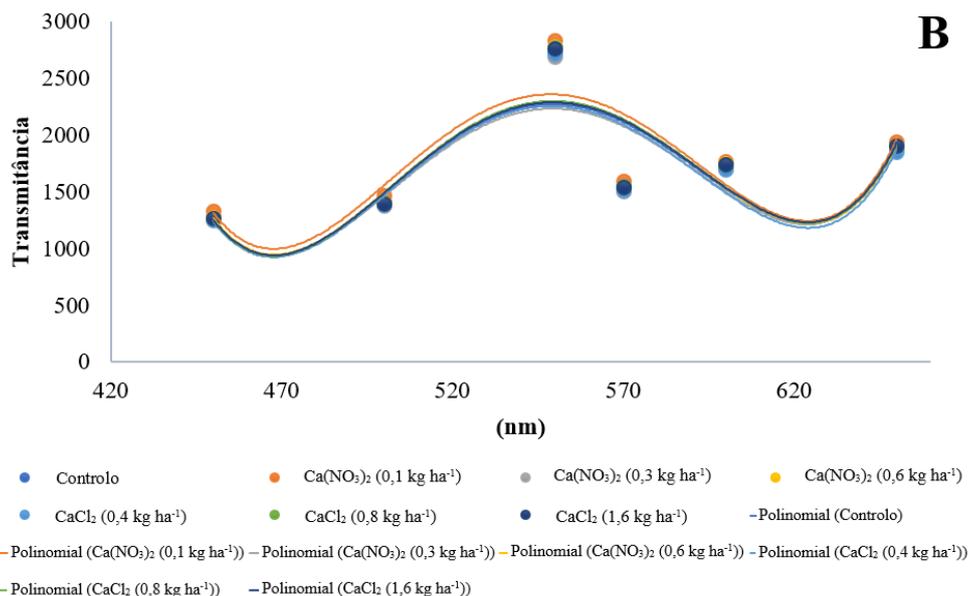


Figura 3.10 - Média da transmitância colorimétrica (n = 4), na banda dos 450 – 650 nm, na epiderme (A) e na polpa (B) de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha do campo experimental da HBio Lda. em 4/9/2018 (à colheita).

O espectro eletromagnético pode ser dividido em bandas, sendo que no caso dos humanos, os olhos são sensíveis a uma das bandas denominada de espectro visível que pode variar entre 350 nm e 700 nm, contudo neste espectro não é possível identificar todas as cores visíveis, uma vez que existem mais cores visíveis do que cores espectrais, resultando as cores não espectrais da mistura de luzes com diferentes comprimentos de onda (Lopes, 2013).

O colorímetro de varrimento efetuou leituras entre os 450 nm e os 650 nm, e apresentou um pico máximo nos 550 nm, comprimento de onda correspondente aos tons de verde, encontrando-se de acordo com a cor típica da epiderme da pêra Rocha. No caso da polpa, também se verificou um pico aos 550 nm, apresentando inclusive um valor de transmitância superior aos valores da epiderme, contudo é de salientar que a polpa da pêra Rocha apresenta tipicamente uma cor branca, cor esta que não corresponde a nenhum comprimento de onda preciso, resultando da deteção em simultâneo de radiação visível de diferentes comprimentos de onda.

A ausência de diferenças significativas nos diferentes comprimentos de onda entre o controlo e os restantes tratamentos, indica que o processo de biofortificação não afetou a transmitância quer da epiderme quer da polpa.

3.4 Características Físicas, Químicas e Organolépticas das Polpas de Pêra

As polpas de pêra Rocha controlo e biofortificadas submetida a tratamento térmico (90 °C durante 10 minutos) revelaram um pH, parâmetros colorimétricos e um teor em sólidos solúveis totais semelhantes. A exceção verificou-se no controlo, que apresentou uma consistência mais elevada (Tabela 3.25).

Tabela 3.25 - Médias das características A) físicas - parâmetros colorimétrico (n = 5) CIELab (L – Luminosidade / brilho, a* verde – vermelho e b* azul – amarelo), utilizando o iluminante C, e viscosidade (índice de consistência, k; índice de escoamento, n) (n = 3) e B) químicas - pH e °Brix (n = 3), todas relativas à da polpa (n = 3) de frutos de *Pyrus communis* L. var. Rocha (Controlo e Tratamento inicial com 1,6 kg ha⁻¹ de CaCl₂), do campo experimental da HBio Lda., submetida a tratamento térmico (90 °C / 10 min) e respetivo erro padrão (E.P.) As letras a, b indicam diferenças significativas de cada parâmetro entre os tratamentos (análise estatística com recurso à aplicação de teste ANOVA de factor único, P ≤ 0,05).

Parâmetros	Controlo		Tratamento inicial com CaCl ₂ (1,6 kg ha ⁻¹)		
	Média	E.P.	Média	E.P.	
pH	4,58a	±0,081	4,66a	±0,001	
°Brix	11,53a	±0,308	11,10a	±0,135	
Parâmetros Colorimétricos	L	35,61a	±0,356	34,67a	±0,009
	a*	2,69a	±0,479	1,25a	±0,297
	b*	3,65a	±0,024	3,44b	±0,029
Viscosidade	k (Pa.s ⁿ)	5459a	±296	3118a	±1215
	n	0,23a	±0,04	0,20a	±0,001

Segundo Figueiredo (2012), um pH ácido nas polpas de frutos é desejável para preservar a segurança alimentar do produto, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos patogénicos, apontando-se desta forma, como ideal um pH inferior a 4,5. Sendo um pH de 4,5 indicado como o valor usual para a pêra, os resultados obtidos vão de encontro aos obtidos por Figueiredo (2012), já que os valores de pH de ambas as polpas foram semelhantes, sendo 4,58 para controlo e 4,66 para o tratamento inicial com CaCl₂ (1,6 kg ha⁻¹), pelo que o processo de biofortificação não afeta o pH das polpas aquando do processamento destes frutos de forma perceptível para o consumidor.

Tal como referido anteriormente, o índice refractrométrico da pêra Rocha deveria de apresentar um valor entre 11 - 13 °Brix (ANP, sem data). Contudo, perante o seu processamento em polpa, apesar de não existir um valor estipulado, é preferível que o valor não seja inferior a 10 °Brix (Figueiredo, 2012). Mesmo após a transformação em polpa, e submissão a tratamento térmico, os valores permanecem acima dos 10 °Brix, variando entre 11,1 – 11,6 °Brix, constituindo um bom referencial para a indústria alimentar, e reforçando o processo de biofortificação como um processo não influenciador na obtenção de produtos alimentares com características organolépticas distintas e dissuasoras da compra.

Relativamente à análise colorimétrica, verificou-se que todos os parâmetros são positivos. O valor de L destaca-se como o mais elevado em ambos os casos, indicando a prevalência de uma luminosidade / brilho inferior à polpa do fruto à colheita (**Tabela 3.23**). Relativamente aos parâmetros a* e b*, observou-se um predomínio das cores de vermelho e amarelo, respetivamente.

O parâmetro b* revelou diferenças significativas, com as peras biofortificadas a evidenciarem uma menor contribuição do amarelo, ainda que estas ligeiras diferenças não sejam percepcionadas pelo olho humano. Tal foi comprovado pela realização da análise sensorial onde, apesar de se verificar uma ligeira diferença, os valores obtidos não foram discrepantes ao ponto de ser necessário equacionar medidas adicionais de processamento relativo a uma modificação da cor do produto. Assim, a biofortificação não afetou os parâmetros colorimétricos da polpa, indo de encontro ao objetivo de obtenção, por parte da indústria, de um produto funcional feito a partir de matéria-prima biofortificada.

A viscosidade dos alimentos apresenta-se como uma propriedade de transporte que não deve ser descurada, assim como se evidencia relevante na determinação dos fluxogramas de fabrico dos alimentos. As polpas são alimentos fluídos, sendo sujeitos a alguma heterogeneidade. Assume-se que os concentrados ou sumos de frutas comportam-se como fluídos não newtonianos (Krokida *et al.*, 2001).

Os valores de viscosidade aparente (medida de atrito interno que traduz a resistência ao escoamento que se desenvolve no seio do fluído), permitiram a caracterização do comportamento

reológico das polpas, recorrendo à determinação dos índices de consistência (k) e escoamento (n) (Bourne, 2002). Estando perante um fluido não newtoniano, o valor de n inferior a 1, indica que estamos perante um fluido reofluidificante.

Tendo em conta o desvio padrão dos valores de ambas as polpas, constatamos que para os valores quer de consistência, quer de escoamento, não evidenciam diferenças significativas sugerindo que à semelhança dos restantes parâmetros analisados, a biofortificação não teve influências negativas nas polpas de pêra Rocha. A caracterização das polpas de pêra Rocha, foi de encontro aos resultados obtidos por Figueiredo (2012), que também obteve valores para as polpas de pêra Rocha, que as caracterizavam como fluidos não newtonianos reofluidificantes.

A realização de uma análise sensorial depende da informação que se pretende adquirir relativamente ao produto alimentar, sendo considerada um passo fundamental por permitir uma avaliação das características organolépticas do produto. Optou-se pela prova hedónica, que consiste na resposta a questões de preferência, focando-se na medição do grau de satisfação de certos parâmetros organolépticos com recurso a uma escala.

A análise sensorial das amostras de polpa de pêra Rocha (controlo e tratamento com CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$)), revelou que todos os parâmetros apresentaram valores semelhantes entre as polpas de peras controlo e de peras biofortificadas, constatando-se uma ligeira tendência para uma maior aceitabilidade no geral, dos parâmetros “Aparência” e “Cor” da polpa controlo. A análise sensorial revelou ainda, uma menor aceitabilidade do parâmetro “Consistência” independentemente do processo de biofortificação, mas mantendo-se acima do valor 3, com os restantes parâmetros a obterem classificações perto de 4. O parâmetro do aroma / sabor evidenciou os valores mais elevados. Em termos gerais, pode aferir-se que as amostras no plano sensorial foram semelhantes, não tendo a biofortificação influenciado a aceitabilidade das mesmas (**Figura 3.11**).

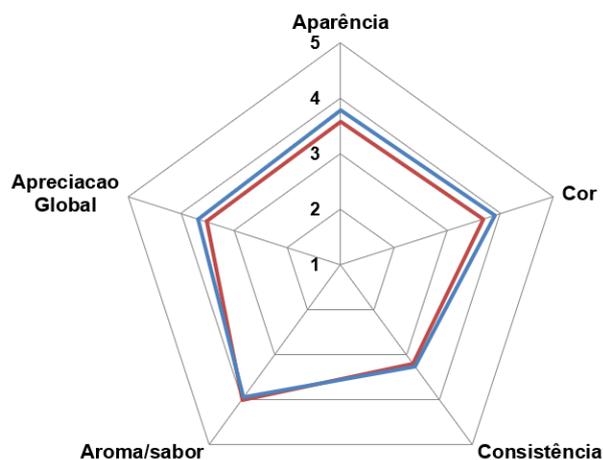


Figura 3.11 - Resultados médios da análise sensorial das amostras de polpa de pêra Rocha controlo (—) e de polpa biofortificada inicialmente com CaCl_2 ($1,6 \text{ kg ha}^{-1}$) (—).

Tal como referido, os parâmetros da cor e aparência, apresentaram valores ligeiramente inferiores nas polpas obtidas a partir de peras biofortificadas, contudo apesar da cor ser um dos principais fatores considerados pelo consumidor aquando da compra, a pouca diferença evidenciada pelos parâmetros da cor analisados na **Tabela 3.25**, não implicam preocupações adicionais por parte da indústria.

4. Conclusões

As condições edáficas refletem-se nas culturas, podendo limitar a produção. Desta forma justifica-se a necessidade de caracterizar o solo, para eventual limitação de carências no mesmo, ou evitar o seu aparecimento no decorrer do ciclo de produção. Tratando-se a pereira de uma cultura permanente, a composição / fertilidade do solo constitui um fator a considerar para maximizar a produção de matéria-prima mantendo a sua qualidade.

No solo do campo experimental da HBio Lda. constatou-se a ocorrência de teores elevados de Ca, K, Mg, P, S. Outros elementos como o Fe, Zn, revelaram teores ligeiramente deficitários, ainda que não implicando a necessidade de medidas corretivas. Os valores de Mn e Cu encontraram-se no intervalo de valores esperado. Detectaram-se teores relativamente elevados dos contaminantes Pb e As no campo experimental, com o As a despertar alguma preocupação, não excedendo, contudo, o valor máximo indicado pela União Europeia para solos agrícolas.

O teor em matéria orgânica do campo experimental, sugere a ausência de limitações na disponibilização dos nutrientes e contraria a tendência verificada em Portugal, indicando uma correta prática de adubação. Este parâmetro (na ausência de humidade) influenciou os índices colorimétricos do solo, nomeadamente a contribuição do vermelho e amarelo, aparentando não afetar o parâmetro L. O pH deste campo é ligeiramente básico, porém, insere-se na faixa ideal, favorecendo a absorção da maioria dos nutrientes. Aponte-se ainda que a condutividade eléctrica do solo apresentou valores que poderiam apontar para um teor de sais que, independentemente do grau de tolerância da espécie vegetal em causa, não implicaria um maior dispêndio de energia para conseguir absorver água (efeito osmótico), evitando prejuízos dos processos metabólicos essenciais.

O fator hídrico é fundamental para a assimilação de um nutriente por parte de qualquer cultura. A humidade do solo do campo experimental sugere uma dotação de rega homogénea na parcela, indicando um bom escoamento superficial de água, ou um sistema de drenagem adequado, evitando a acumulação de água e o conseguinte encharcamento que poderia originar danos na raiz. A água de rega deste campo pode ser utilizada, não evidenciando toxicidade para o pomar, nem danificando o solo onde este se encontra instalado, contudo aconselha-se a monitorização e manutenção dos equipamentos de rega. A nível complementar aponta-se ainda que, relativamente às características físicas e químicas da água, o teor em Ca^{2+} da água no campo experimental é dos mais elevados.

As condições edafoclimáticas devem ser equacionadas em ensaios de campo, por apresentarem um número crescente de variáveis. Ventos fortes, humidades reduzidas e temperaturas elevadas, contribuem para uma dificuldade na absorção de Ca pela via foliar. Considerando a influência do clima no processo de biofortificação em Ca, no campo experimental subsistiram factores atípicos na região, não sendo de excluir algum efeito prejudicial no metabolismo de acumulação de Ca nos frutos. Aponte-se que durante a Primavera de 2018 a temperatura média do ar foi inferior ao normal, tendo-se ainda constatado que o mês de Julho foi o mais frio desde 2000 e Agosto o 2º mais quente dos últimos 88 anos (depois de 2003). Note-se, contudo, que tendo-se iniciado as pulverizações em meados de Maio, a quantidade de precipitação entre Março e Maio, foi de 429 mm (*i.e.*, cerca de 200 % do valor médio), sendo a 3ª Primavera mais chuvosa desde 1931 (depois de 1936 e 1956).

Com vista ao desenvolvimento de um processo tecnológico para possível implementação nos pomares de qualquer produtor, o itinerário técnico de biofortificação em cálcio adoptou o conjunto de acções usuais nos pomares de pêra Rocha, mas adicionalmente, compreendeu 3 fases distintas. Inicialmente (1ª fase) efectuaram-se 2 aplicações foliares distintas: uma com CaCl_2 (0, 0,4, 0,8 e 1,6 kg ha^{-1}) e outra com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0, 0,1, 0,3 e 0,6 kg ha^{-1}) para limitar a potencial ocorrência de fitotoxicidade após o vingamento (*i.e.*, fruto com *ca.* 30 mm). Verificou-se então que nesta fase, as acumulações dos diferentes elementos minerais não induziram toxicidade, quantificando-se algumas variações nos diferentes tratamentos que terão decorrido da elasticidade metabólica intra-específica, razão porque também não se visualizaram sintomas de toxicidade associados à morfologia externa dos frutos nesta fase do desenvolvimento. A subsequente aplicação única com CaCl_2 (4 kg ha^{-1}) (2ª fase), e

posteriormente de mais quatro aplicações com CaCl_2 (8 kg ha^{-1}) (3ª fase), também não revelou uma pronunciada acção potencialmente tóxica.

Com a pulverização das folhas das árvores, teve início a mobilização de Ca na parte aérea das árvores, tendo subsistido alterações na cinética de translocação / mobilização de macro e microelementos minerais nos frutos, que apresentaram diferentes taxas de acumulação ao longo do desenvolvimento fenológico do fruto. Estas alterações, foram naturalmente condicionadas pelas interações sinérgicas e antagónicas do metabolismo do Ca relativamente aos diferentes elementos minerais e ainda, eventualmente pelos factores edafoclimáticos prevaletentes a nível local.

Nos frutos, no decurso das pulverizações também não foram detectados sintomas acentuados de toxicidade, porém à colheita o índice de biofortificação em Ca no campo experimental oscilou entre 33 e 67 % e com a absorção atómica oscilou entre 3,6 e 14,3 %. Salienta-se que as diferentes concentrações obtidas para os diferentes elementos minerais quando se utilizam técnicas de fluorescência por raios-X ou espectrofotometria de absorção atómica, resultaram essencialmente de quatro factores: a) Diferentes métodos de preparação das amostras (desidratação ou digestão ácida) para subsequente quantificação dos elementos; b) Heterogeneidade no processo de enriquecimento das amostras em Ca (que irão determinar diferentes índices nas relações sinérgicas e antagónicas nos elementos minerais das amostras), pois durante o processo de pulverização, a quantidade de CaCl_2 total que incide em cada fruto poderá variar de forma substancial (o que determinará teores parcialmente diferenciados nas amostras do mesmo tratamento, e que assim irão ser detectados durante o processo de quantificação); c) Estando a absorção de Ca condicionada pelos factores ambientais (vento, temperatura, radiação solar, humidade do ar, etc.), diferentes graus de exposição das amostras de cada tratamento a estes factores abióticos, pode favorecer a desidratação da calda de CaCl_2 pulverizada numas amostras em detrimento de outras (num mesmo tratamento), condicionando assim a absorção de Ca; d) Diferentes limites de detecção e quantificação em cada uma das técnicas utilizadas. Relativamente aos restantes micro e macroelementos nutricionais subsistiram ainda variações apreciáveis na acumulação tecidular nos frutos.

Equacionando as características físicas e químicas dos frutos à colheita, verificou-se que no campo experimental a altura e o diâmetro foram de 72,2 – 84,4 mm e 61,4 - 70,0 mm, respectivamente, contudo não subsistiram variações significativas entre o controlo e os frutos biofortificados. Relativamente à densidade ($1029 - 1109 \text{ kg m}^{-3}$) e peso seco (13,18 – 14,59 %), não se detetaram anomalias, não se tendo observado variações significativas entre o controlo e os tratamentos de biofortificação. A dureza dos frutos também não sofreu alterações relevantes. Os graus Brix nos frutos apresentaram uma gama semelhante de valores e não parecem variar de modo significativo com a biofortificação em Ca inserindo-se no intervalo de valores indicados para a pêra Rocha à colheita (11 – 13 °Brix). Os teores de ácido málico, foram mais baixos no controlo, por comparação com as peras biofortificadas, porém os valores das peras sujeitas a aplicações foliares aproximam-se mais dos valores indicados na literatura do que o controlo, sugerindo que a eventual acção da biofortificação neste parâmetro não é prejudicial para o consumidor ou indústria alimentar, não colocando em causa as características organolépticas das peras.

Relativamente aos parâmetros colorimétricos das folhas, ao longo do desenvolvimento fenológico dos frutos, os parâmetros L, a^* e b^* revelaram uma acentuada heterogeneidade no campo experimental. Aponte-se, contudo, que eventualmente estas variações nas folhas poderão decorrer, não de factores de stress mineral envolvendo a aplicação foliar de Ca, mas da senescência natural das folhas ao longo do ciclo vegetativo / reprodutivo das árvores, salientando que a análise foi realizada em folhas após desidratação ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) e trituração das mesmas, justificando a ausência dos valores de a^* negativos esperados (contribuição do verde). Nos frutos não subsistiram variações nos parâmetros colorimétricos (L, a^* e b^* - escala CIELab) na polpa dos frutos controlo e biofortificados em Ca, com os parâmetros a^* e b^* a indicarem a predominância à colheita de tons verdes e amarelos típicos da epiderme desta variedade. Constatando-se ainda em todos os tratamentos um pico de transmitância máxima nos 550 nm.

Equacionando o efeito térmico (*i.e.*, cozedura) sobre a polpa dos frutos biofortificados, constatou-se que as alterações verificadas foram residuais, podendo assumir-se que a biofortificação em Ca não afecta as mesmas. Em termos gerais, pode aferir-se que as amostras no plano sensorial foram

semelhantes, não tendo a biofortificação influenciado a aceitabilidade das mesmas, salvaguardando a hipótese do desenvolvimento de um produto para consumo humano com características funcionais no plano fisiológico.

O processo de biofortificação agronômica foi bem-sucedido, pois não alterou os parâmetros de qualidades da pêra Rocha, solidificando o seu potencial com o aumento efetivo dos teores de Ca no fruto (não se descartando a otimização das doses aplicadas que permitam uma acumulação de Ca superior).

No seguimento do estudo desenvolvido e relativamente ao ensaio de campo, sugere-se que no ano seguinte, se efetue a otimização das concentrações de CaCl_2 a aplicar, assim como do número de aplicações foliares necessárias e respetivos períodos de análise laboratorial. Por outro lado, tendo por base os objetivos da indústria alimentar, sugere-se o acompanhamento da confeção dos produtos que se pretendem fazer, tendo como matéria-prima, a pêra biofortificada em cálcio, para monitorizar as possíveis perdas que podem ocorrer no decorrer dos fluxogramas de fabrico.

Por sua vez, tendo-se verificado efetivamente a biofortificação da matéria-prima, permitindo a obtenção de produtos biofortificados, deve assegurar-se: não só que o produto obtido é estável, assim como a efetiva absorção de cálcio por parte do organismo.

A estabilidade do produto poderá necessitar de testes utilizando aditivos alimentares, não só para evitar a ocorrência de reações que alterem as características organolépticas do produto, como também utilizar componentes que permitam intensificar por exemplo o seu sabor e aroma a fim de se tornarem ainda mais apelativos para o consumidor. Desta forma incrementar-se-á o objetivo que envolve a obtenção de um produto diferenciado relativamente aos restantes já existentes no mercado.

Perante um aumento da disponibilidade de Ca presente no produto final, propõe-se a realização de testes que confirmem a efetiva absorção do mesmo por parte do organismo humano. Sugerem-se testes que utilizem células Caco-2 a fim de simular a absorção do cálcio através das membranas celulares. As células Caco-2 (linha de células de carcinoma do cólon humano), seriam utilizadas de forma a simular um sistema modelo de transporte epitelial intestinal. Os produtos alimentares como por exemplo produtos decorrentes da digestão das polpas de pêra, seriam colocadas em contacto com estas células tumorais. Ao longo do tempo, proceder-se-ia à monitorização do Ca presente no interior destas mesmas células.

5. Referências Bibliográficas

Artigos e Livros

Alshaal, T. e El-Ramady, H. (2017). Foliar application: From plant nutrition to biofortification. *The Environment, Biodiversity & Soil Security*, 1, 71-83. <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2017.1089.1006>

ANP. (1997). *Caderno de Especificações de Pera Rocha do Oeste – Denominação de Origem Protegida*. Cadaval: ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. p.29.

Bicho, N. Leitão, A. Ramanho, J. e Lidon, F. (2014). Application of colour parameters for assessing the quality of Arabica and Robusta green coffee. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(1), 9-17. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i1.17190>

Bonomelli, C. e Ruiz, R. (2010). Effects of foliar and soil calcium application on yield and quality of table grape CV. “Thompson seedless.”. *Journal of Plant Nutrition*, 33(3), 299-314. <https://doi.org/10.1080/01904160903470364>

Costa, M. de Queiroz, D. Pinto, F. Reis, E. e Santos, N. (2014). Moisture content effect in the relationship between apparent electrical conductivity and soil attributes. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(4), 395-401. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i4.18342>

Dayod, M. Tyerman, S. Leigh, R. e Gilliam, M. (2010). Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma*, 247(3), 215-231. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0182-0>

de Valença, A. Bake, A. Brouwer, I. e Giller, K. (2017). Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Global Food Security*, 12, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.12.001>

Díaz-Gómez, J. Twyman, R. Zhu, C. Farré, G. Serrano, J. Portero-Otin, M. Muñoz, P. Sandmann, G. Capell, T. e Christou, P. (2017). Biofortification of crops with nutrients: factors affecting utilization and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.12.002>

D’Imperio, M. Renna, M. Cardinali, A. Buttarò, D. Serio, F. e Santamaria, P. (2016). Calcium biofortification and bioaccessibility in soilless “baby leaf” vegetable production. *Food Chemistry*, 213, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.071>

DGS. (2008). *Orientação Técnica para a utilização da absorciometria radiológica de dupla energia (DEXA)*. Lisboa: Ministério da Saúde. p.3.

EFSA NDA Panel. (2015). Scientific opinion on dietary reference values for calcium. *EFSA Journal*, 13(5), 1-82. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4101>

FAO. (2017). *The future of food and agriculture – Trends and challenges*. Rome: FAO. p.163. ISBN 978-92-5-109551-5.

Garg, M. Sharma, N. Sharma, S. Kapoor, P. Kumar, A. Chunduri, V. e Arora, P. (2018). Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. *Frontiers in Nutrition*, 5, 1-33. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00012>

Gąstoł, M. e Domagała-Świątkiewicz, I. (2009). Mineral composition of “Conference” pears as affected by different foliar sprays. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18, 739-742.

Gharibzahedi, S. e Jafari, S. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>

- Granjeiro, M. Santiago, M. Silva, C. Frischkorn, H. Teixeira, Z. e Mendes Filho, J. (2009). Razões iônicas e índices de langelier e larsen no estudo hidrogeoquímico das águas subterrâneas no município de Quixeré - Ceará. p.1-16. Em: XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Campo Grande: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/9216>
- Hocking, B. Tyerman, S. Burton, R. e Gilliam, M. (2016). Fruit calcium: Transport and physiology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00569>
- Igamberdiev, A. e Kleczkowski, L. (2015). Optimization of ATP synthase function in mitochondria and chloroplasts via the adenylate kinase equilibrium. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00010>
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018a). Estatísticas Agrícolas 2017. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN: 0079-4139.
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018b). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – Novembro 2018. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 1647-1040
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018c). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – Abril 2018. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 1647-1040.
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018d). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – Julho 2018. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 1647-1040.
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018e). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – Setembro 2018. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 1647-1040.
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2018f). Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – Outubro 2018. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN 1647-1040.
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace elements in soils and plants* (4^a ed.). Boca Raton: CRC Press. p.505. ISBN 978-1-4200-9368-1
- Krokida, M. Maroulis, Z. e Saravacos, G. (2001). Rheological properties of fluid fruit and vegetable puree products: Compilation of literature data. *International Journal of Food Properties*, 4(2), 179-200. <https://doi.org/10.1081/JFP-100105186>
- Läuchli, A. e Grattan, S. (2012). Plant Stress Physiology. Em S, Shabala (Ed.). *Soil pH extremes* (pp. 194-209). Cambridge: CAB International.
- Lidon, F. Ribeiro, V. Reboledo, F. Pessoa, M. Santos, M. Ramos, P. e Sánchez, C. (2014). Calcium biofortification of apples: Interaction with Macronutrients. p.102-103. Em: COST Action Project FA 0905 – “Mineral-Improved Crop Production for Healthy Food and Feed” Final Conference Proceeding Book. Antalya-Belek: Cemil Baski Cozumleri, Orhanli, Tuzla. ISBN: 978-605-4348-72-5
- Lidon, F. Oliveira, K. Ribeiro, M. Pelica, J. Pataco, I. Ramalho, J. Leitão, A. Almeida, A. Campos, P. Ribeiro-Barros, A. Pais, I. Silva, M. Pessoa, M. e Reboledo, H. (2018). Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. *Journal of Cereal Science*, 81, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.03.010>
- Mangueze, A. Pessoa, M. Silva, M. Ndayiragije, A. Magaia, H. Cossa, V. Reboledo, F. Carvalho, M. Santos, J. Guerra, M. Ribeiro-Barros, A. Lidon, F. e Ramalho, J. (2018). Simultaneous zinc and selenium biofortification in rice. Accumulation, localization and implications on the overall mineral content of the flour. *Journal of Cereal Science*, 82, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.005>
- Margesin, R. e Schinner, F. (Eds.). (2005). *Manual of Soil Analysis – Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer. p. 366. <https://doi.org/10.1007/3-540-28904-6>
- Marques, A. Rodrigues, A. Romeu, J. Ruano, A. Barbosa, A. Simões, E. Águas, F. Canhão, H. Alves, J. Lucas, R. Branco, J. Lafins, J. Mascarenhas, M. Simões, S. Tavares, V. Lourenço, Ó. e da Silva, J. (2016). Recomendações multidisciplinares portuguesas sobre o pedido de DXA e indicação de

tratamento de prevenção das fraturas de fragilidade. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, 32, 425-441.

Mourinho, M. Pataco, I. Oliveira, K. Santos, C. Pelica, J. Ramalho, J. Leitão, A. Pais, I. Campos, P. Lidon, F. Reboredo, F. e Pessoa, M. (2015). Zinc biofortification in *Triticum aestivum* L. - from grains to bakery products. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(2), 164-170. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i2.19469>

Oliveira, K. Pataco, I. Mourinho, M. Santos, C. Pelica, J. Ramalho, J. Leitão, A. Pais, I. Campos, P. Lidon, F. Reboredo, F. e Pessoa, M. (2015). Selenium biofortification in rice - A pragmatic perspective. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(3), 231-241. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i3.19285>

Pataco, I. Mourinho, M. Oliveira, K. Santos, C. Pelica, J. Pais, I. Ramalho, J. Leitão, A. Campos, P. Lidon, F. Reboredo, F. e Pessoa, M. (2015). Durum wheat (*Triticum durum*) biofortification in iron and definition of quality parameters for the industrial production of pasta - A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(3), 242-249. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i3.19284>

Pelica, J. Barbosa, S. Reboredo, F. Lidon, F. Pessoa, F. e Calvão, T. (2018). The paradigm of high concentration of metals of natural or anthropogenic origin in soils – the case of Neves-Corvo mine area (southern Portugal). *Journal of Geochemical Exploration*, 186, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.11.021>

Pessoa, F. Scotti-Campos, P. Pais, I. Feteiro, A. Canuto, D. Simões, M. Pelica, J. Pataco, I. Ribeiro, V. Reboredo, F. Ramalho, J. e Lidon, F. (2016). Nutritional profile of the Portuguese cabbage (*Brassica oleracea* L var. *costata*) and its relationship with the elemental soil analysis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 28(6), 381-388. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-338>

Pessoa, F. (2018a). Protocolo – Análise de elementos minerais em alimentos por espectrometria de fluorescência de raios-X. Monte de Caparica: Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Código 920.

Pessoa, F. (2018b). Protocolo prático N°2 – Determinação da cor em alimentos. Monte de Caparica: Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Código 920.

Pinto, E. e Ferreira, I. (2015). Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. *Journal of Plant Physiology*, 179, 64-82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.010>

Ranade-Malvi, U. (2011). Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 24(1), 106-109.

Rao, C. e Annadana, S. (2017). Phytonutritional Improvement of Crops. Em N, Benkeblia (Ed.). *Nutrient biofortification of staple food crops: Technologies, products and prospects* (pp. 113-183). Hoboken: Wiley Blackwell.

Reboredo, F. Sánchez, C. Santos, M. Ramos, P. Rodrigues, C. Ribeiro, V. Pessoa, M. e Lidon, F. (2014). Calcium biofortification of apples: Implications on fruit quality parameters. p.52-53. Em: COST Action Project FA 0905 – “Mineral-Improved Crop Production for Healthy Food and Feed” Final Conference Proceeding Book. Antalya-Belek: Cemil Baski Cozumleri, Orhanli, Tuzla. ISBN: 978-605-4348-72-5

Reboredo, F. Pelica, J. Lidon, F. Ramalho, J. Pessoa, M. Calvão, T. Simões, M. e Guerra, M. (2018). Heavy metal content of edible plants collected close to an area of intense mining activity (southern Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(8), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6844-7>

Richards, L. (Ed.). (1954). *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils - Agriculture Handbook n°60*. Washington: United States Department of Agriculture. p 159.

Rodier, J. Legube, B. e Merlet, N. (2009). *L'Analyse de l'eau* (9ª ed.). Paris: Dunod. p.1600. ISBN ISBN: 9782100072460.

Sharma, D. Jamra, G. Singh, U. Sood, S. e Kumar, A. (2017). Calcium biofortification: Three pronged molecular approaches for dissecting complex trait of calcium nutrition in Finger Millet (*Eleusine coracana*) for devising strategies of enrichment of food crops. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02028>

Silva, B. Santos, W. Oliveira, G. Lima, J. Curi, N. e Marques, J. (2015). Soil moisture space-time analysis to support improved crop management. *Ciência e Agrotecnologia*, 39(1), 39-47. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000100005>

Singh, U. Praharaaj, C. Chaturvedi, S. e Bohra, A. (2016). Biofortification of food crops. Em U. Singh, C. Praharaaj, S. Singh, N. Singh (Eds.). *Biofortification: Introduction, approaches, limitations, and challenges* (pp. 3-18). New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2716-8>

Soares, J. Silva, A. e Alexandre, J. (2001). *O Livro da Pera Rocha. 1º vol.: Contributo para uma produção integrada*. Cadaval: ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. p.184. ISBN 972-95557-3-7.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2003). *Plant Physiology* (3ª ed.). Sunderland: Sinauer Associates. p.690. ISBN: 0878938230

Teixeira, R. Domingos, T. Costa, A. Oliveira, R. Farropas, L. Calouro, F. Barradas, A. e Carneiro, J. (2011). Soil organic matter dynamics in Portuguese natural and sown rainfed grasslands. *Ecological Modelling*, 222, 993-1001. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.11.013>

Tóth, G. Hermann, T. Silva, M. e Montanarella, L. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International*, 88, 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>

Visconti, F. e de Paz, J. (2016). New trends and developments in metrology. L. Cocco (Ed.). *Electrical conductivity measurements in agriculture: The assessment of soil salinity* (pp. 99-126). Londres: IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/62741>

Wang, Y. Zhang, X. Wang, Y. Yang, S. e Qu, H. (2018). The changes of intracellular calcium concentration and distribution in the hard end pear (*Pyrus pyrifolia* cv. “Whangkeumbae”) fruit. *Cell Calcium*, 71, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.11.002>

Wei, S. Qin, G. Zhang, H. Tao, S. Wu, J. Wang, S. e Zhang, S. (2017). Calcium treatments promote the aroma volatiles emission of pear (*Pyrus ussuriensis* “Nanguoli”) fruit during post-harvest ripening process. *Scientia Horticulturae*, 215, 102-111. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.008>

White, P. e Broadley, M. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182, 49-84. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x>

Wójcik, P. Skorupińska, A. e Filipczak, J. (2014). Impacts of preharvest fall sprays of calcium chloride at high rates on quality and “Conference” pear storability. *Scientia Horticulturae*, 168, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.017>

Dissertações

Carvalho, A. (2011). Aplicação de smartFresh™ em pêra “Rocha” eficácia de concentrações e modalidades de armazenamento na qualidade e na incidência de escaldão superficial e acastanhamento interno. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10400.5/4487>

Figueiredo, T. (2012). Desenvolvimento tecnológico de polpas refrigeradas de pêra Rocha e outros hortofrutícolas. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10400.5/5342>

Lucas, S. (2012). *Pyrus communis* L.: Caracterização de cultivar, avaliação dos voláteis do fruto e optimização das condições de micropropagação. Dissertação de mestrado. Escola Superior Agrária de Santarém. Instituto Politécnico de Santarém. Acedido em: https://repositorio.ipsantarem.pt/bitstream/10400.15/1343/1/Susana_Lucas_Mestrado.pdf

Mendes, R. (2017). Pools de nutrientes em pomares e sua relação com a incidência de acastanhamentos internos em pera Rocha. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10400.5/14841>

Pereira, C. (2017). Monitorização da conservação de pera Rocha: avaliação de características de qualidade. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10400.5/15118>

Salvador, A. (2015). Influência do local de produção de pera Rocha armazenada em atmosfera controlada, na incidência de desordens de escurecimento interno e na aptidão para consumo em fresco e processado. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10400.5/11110>

Portais de Internet

Agriw, 2017. Estado Fenológico da Pereira. Acedido em 17-04-2019: <https://www.agrozapp.pt/multimedia/Infografias/estados-fenologicos-pereira>

ADP Fertilizantes, 2019. Nitrato de Cálcio Rega. Acedido em 04-04-2019: <https://www.adp-fertilizantes.pt/pt/agricultura/produtos/categorias/fertirrigacao/fertiberia-tech/linha-soluteck/soluteck-nitrato-de-calcao-rega/>

ANP (Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha), 2019. Pera Rocha, Sabor de Portugal. Acedido em 05-02-2019: <http://perarocha.pt/>

ANP (Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha), sem data. Caderno de Especificações de Pera Rocha D.O.P. p.13. Acedido em 17-02-2019: http://primofruta.pt/ficheiros/especificacoes/pera_rocha_caderno_especificacoes.pdf

ANIPLA (Associação Nacional da Indústria para a Proteção das Plantas), 2016. Manual de boas práticas para o uso seguro e sustentável dos produtos fitofarmacêuticos de âmbito profissional. p.58. Acedido em 01-04-2019: https://www.anipla.com/docs/brochuras/Manual_cultivar_seguranca_2016.pdf

APN (Associação Portuguesa dos Nutricionistas), 2016. Conhecer o leite, Coleção E-books APN: N°41. Porto: Associação Portuguesa dos Nutricionistas. ISBN: 978-989-8631-31-2. Acedido em: https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook_Conhecer_o_Leite_Final.pdf

APN (Associação Portuguesa dos Nutricionistas), 2019. Saiba mais sobre Nutrição. Acedido em 12-05-2019: <https://www.apn.org.pt/ver.php?cod=0E0C>

APOROS (Associação Nacional contra a Osteoporose), 2012. Sem Título. Acedido em 05-05-2019: <http://www.aporos.pt/>

ASAE, 2007. Nitratos. Acedido em 16-6-2019: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos.aspx>

BY JU`S, 2019. Biofortification. Acedido em 09-05-2019: <https://byjus.com/biology/biofortification/>

- BASF, 2019. Bellis. Acedido em 01-04-2019: https://www.agro.basf.pt/agroportal/pt/pt/crop_protection/crop_protectionproduct_catalogue/product_details_1499.html
- CODIMACO, 2015. Guia para a avaliação e certificação de pera Rocha do oeste-DOP. p.7. Acedido em 06-02-2019: <http://www.codimaco.pt/guias/GuiaPeraRocha.pdf>
- Crop Science Portugal, 2019a. Luna Experience. Acedido em 01-04-2019: https://cropscience.bayer.pt/internet/produtos/produto.asp?id_produto=256#header
- Crop Science Portugal, 2019b. Flint. Acedido em 01-04-2019: https://cropscience.bayer.pt/internet/produtos/produto.asp?id_produto=145
- Crop Science Portugal, 2019c. Calypso. Acedido em 01-04-2019: https://cropscience.bayer.pt/internet/produtos/produto.asp?id_produto=163
- DGADR (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural), 2012. Normas técnicas para a produção integrada de pomóideas (Volume II). p.253. Acedido em 16-04-2019: https://www.dgadr.gov.pt/component/jdownloads/send/8-protacao-e-producao-integradas/46-normas-tecnicas-para-producao-integrada-de-pomoideas?option=com_jdownloads
- EIP-AGRI (European Innovation Partnership for Agricultural Productivity and Sustainability), 2016. Soil organic matter matters – Investing in soil quality for long-term benefits. p.8. Acedido em: 15-05-2019: https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/eip-agri_brochure_soil_organic_matter_matters_2016_en_web.pdf
- Embrapa, 1997. Manual de métodos de análise de solo (2ª ed.). p.212. Acedido em 12-03-2019: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+de+Metodos_000fzvhotqk02wx5ok0q43a0ram31wtr.pdf
- Epagro, 2016. Glufostar - Herbicida de Contacto Contra Infestantes em Diversas Culturas. p.4. Acedido em 01-04-2019: <https://epagro.pt/wp-content/uploads/2016/04/FT-GLUFOSTAR.pdf>
- EuroChem Agro, 2014. ENTEC Nitrofoska 14. p.1. Acedido em 04-04-2019: https://pt.eurochemagro.com/uploads/product/entec-nitrofoska-14/ENTEC_Nitrofoska_14_PT.pdf
- FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura), 2009. How to feed the world in 2050. p.35. Acedido em 13-02-2019: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura), 2019. FAOSTAT – Crops: Dados de Produção no período de análise. Acedido em 04-05-2019: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>
- FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura), sem data. Macronutrients and micronutrients. p.1. Acedido em 12-05-2019: http://www.fao.org/elearning/Course/NFSLBC/en/story_content/external_files/Essential_Nutrients.pdf
- Golden Software Support, 2018. What is a piper plot (trilinear diagram)? . Acedido em 11-06-2019: <https://support.goldensoftware.com/hc/en-us/articles/115003101648-What-is-a-piper-plot-trilinear-diagram->
- GPP (Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral), 2016. Informação sobre produtos - Pera. Acedido em 08-02-2019: <http://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos>
- HarvestPlus, 2019. HarvestPlus Better Crops - Better Nutrition. Acedido em 21-04-2019: <https://www.harvestplus.org/>
- IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera), 2018. Boletim Meteorológico para a agricultura. N°86. p.15. Acedido em 09-03-2019:

https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20180322/sKgutEQKgiHPE_TNIKPX/agr_20180201_20180228_bag_3d_co_pt.pdf

IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera), 2019. Área Educativa – Clima de Portugal Continental. Acedido em 06-06-2019: <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/>

Lopes, J. (2013). Cor e Luz - Computação Gráfica. p.45. Acedido em 20-05-2019: <http://disciplinas.ist.utl.pt/leic-cg/textos/livro/Cor.pdf>

MedicinaNET, sem data. Doenças do metabolismo do cálcio e doença óssea metabólica (imagem). Acedido em 09-05-2019: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5371/doencas_do_metabolismo_do_calcio_e_doenca_ossea_metabolica_-_carolyn_becker.htm

Metrohm, sem data. Application Bulletin No.257/1e. p.10. Acedido em 03-05-2019: <https://www.metrohm.com/en/applications/AB-257?fromProductFinder=true>

Moraes, I., 2006. Dossiê técnico – Produção de polpa de fruta congelada e suco de frutas. Acedido em 17-05-2019: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTE3>

Naturdata, 2018. *Pyrus-communis*. Acedido em 28-05-2019: <https://naturdata.com/especie/Pyrus-communis/3544/0/>

Nunes, M. Barros, R. Moreira, P. Moreira, A. e Almeida, M., 2012. Alergia Alimentar. Lisboa: Ministério da Educação e Ciência, e Ministério da Saúde. p.21. Acedido em 13-02-2019: https://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files_mf/1444902010AlergiaAlimentar.pdf

PNPAS (Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável), 2019. Alimentação Saudável. Acedido em 09-02-2019: <https://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/>

PortFIR (Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar), 2019. Composição de Alimentos – Pera (5 variedades). Acedido em 04-05-2019: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?747>

PTQC (Produtos Tradicionais de Qualidade na Região Centro), 2019. Pêra Rocha do Oeste – DOP. Acedido em 08-02-2019: http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/pera_rocha_oeste.htm

Selectis, 2019a. Cobre 50 Selectis. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/fungicidas/cobre-50/>

Selectis, 2019b. Dakar. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/herbicidas/dakar/>

Selectis, 2019c. Cultura da Pereira. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/culturas/pereira/>

Selectis, 2019d. Miltane Micro. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/fungicidas/miltane-micro/>

Selectis, 2019e. Invictus. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/fungicidas/invictus/>

Selectis, 2019f. Tebutop. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/fungicidas/tubetop/>

Selectis, 2019g. Baikal 501. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/insecticidas/baikal-501/>

Selectis, 2019h. Kraft Advance. Acedido em 31-03-2019: <http://www.selectis.pt/produtos/insecticidas/kraft-advance/>

SIPCAM Portugal, 2018. Fernide WG. Acedido em 01-04-2019: https://www.sipcam.pt/index.php?id_product=32&controller=product

Vitas Portugal, 2017. D-Coder. Acedido em 04-04-2019: <http://www.vitas.pt/index.php/empresa/timac-agro/nutricao-vegetal/12-nutricao-vegetal/61-d-coder>

Normas e Legislação

Decreto-lei 230/2003 de 27 de Setembro. Doces e geleias de frutos, citrinadas e creme de castanha, destinados à alimentação humana. Diário da República I Série A, de 27 de Setembro de 2003, pp. 6323-6327.

NP 4258: 1993 (ISO 8589:1988). Análise Sensorial. Directivas gerais para a concepção dos locais apropriados para análise.

6. Anexos

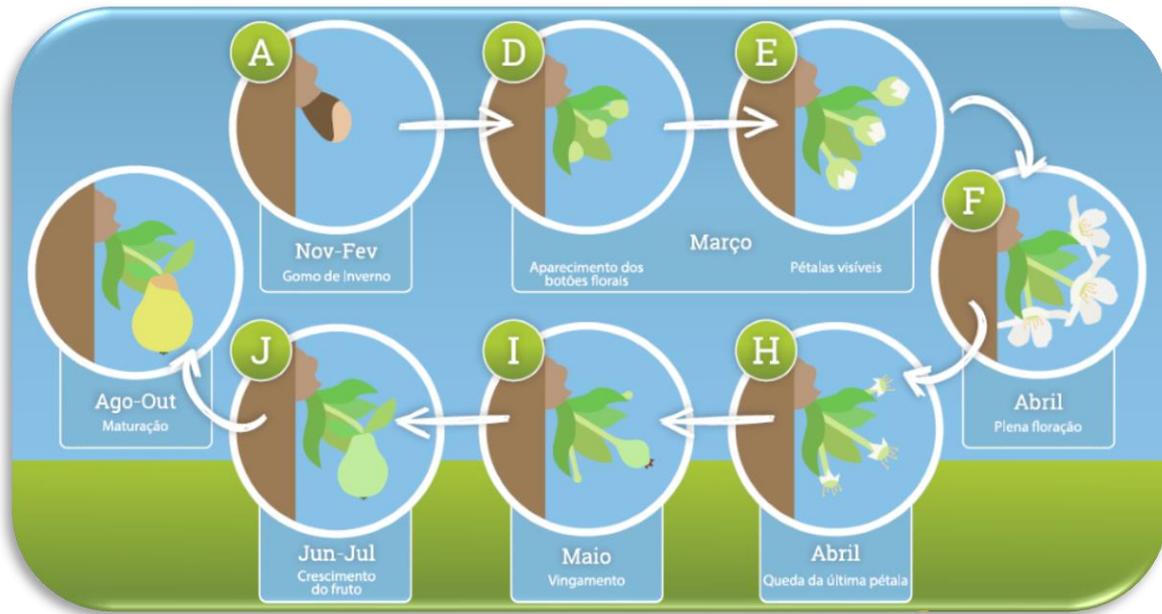
ANEXO I - Área Geográfica de Produção de Pêra Rocha do Oeste - DOP

Fonte: PTQC, 2019.

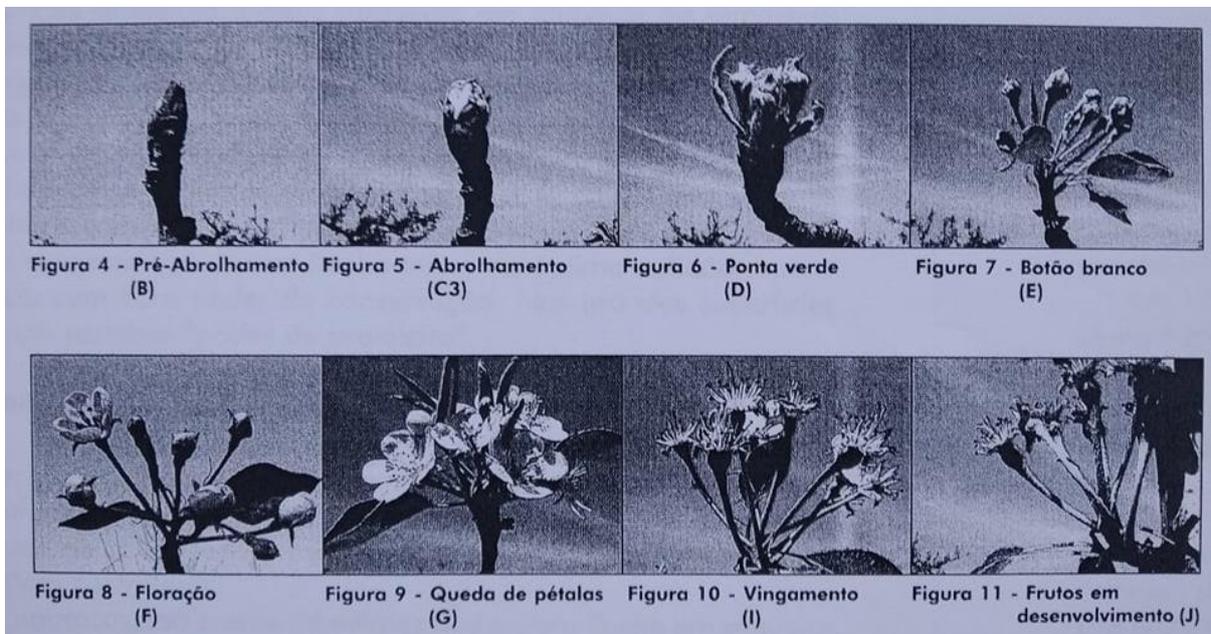


ANEXO II – Estados Fenológicos da Pereira

Fonte: Agriw, 2017.



Fonte: Soares *et al.*, 2001.

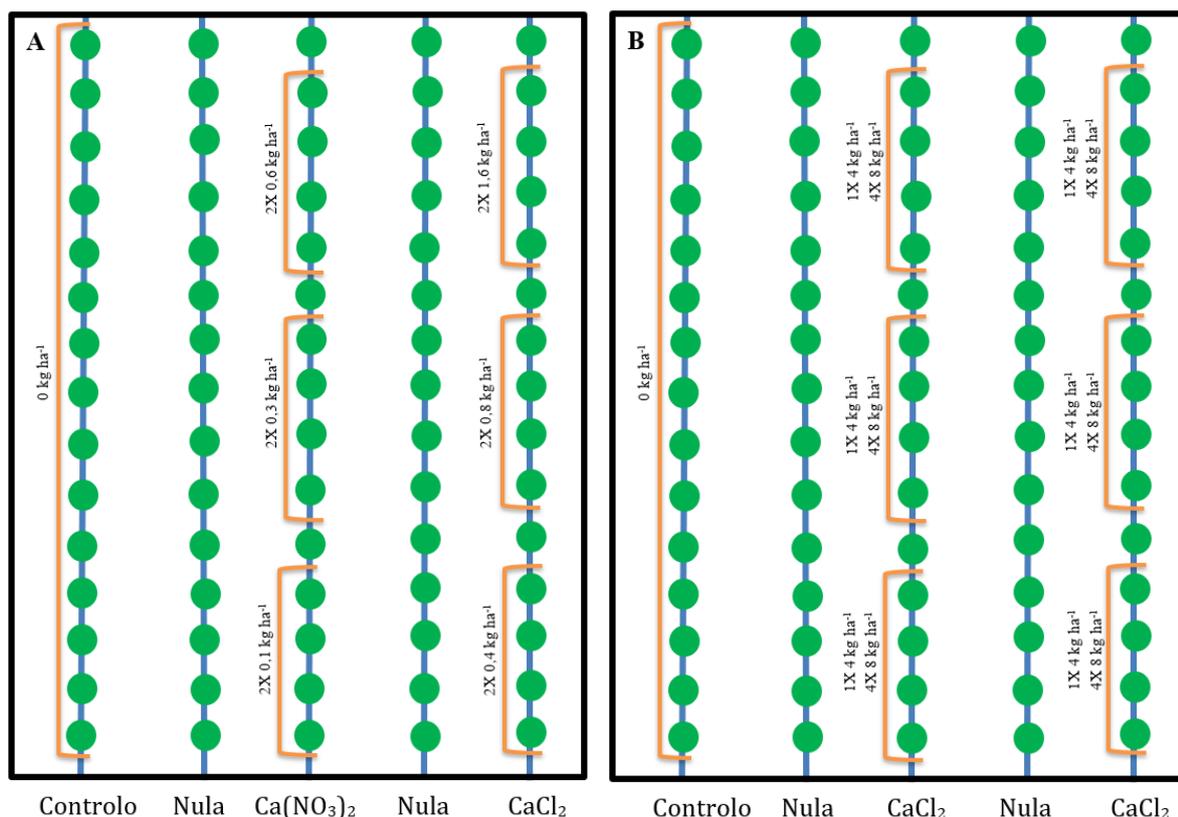


ANEXO III – Micro - e Macronutrientes Necessários para a Manutenção do Bem-estar do Homem

Fonte: Adaptado de Garg *et al.*, 2018.

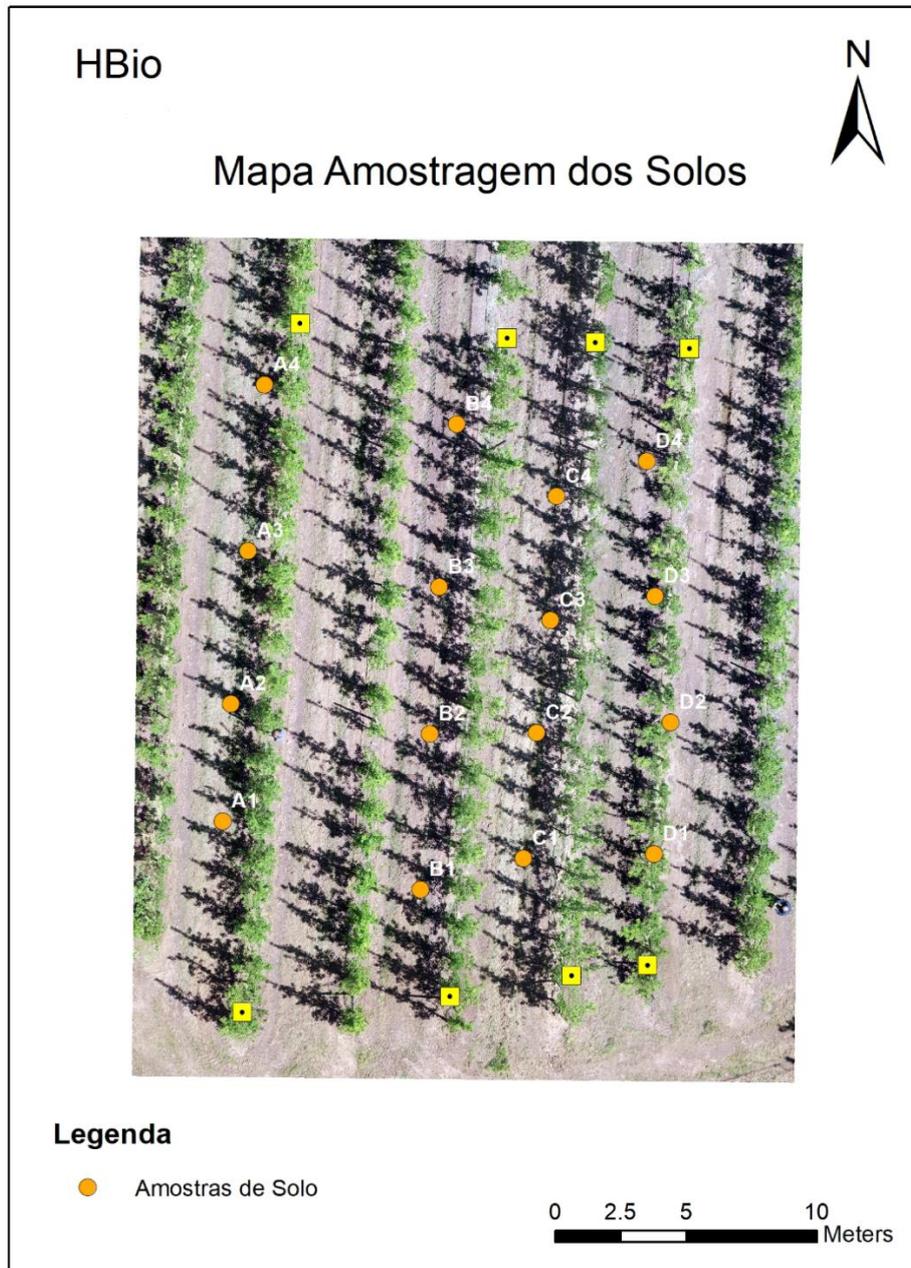
Micronutrientes		Macronutrientes		
Micro-minerais	Vitaminas	Aminoácidos	Ácidos gordos (essenciais)	Macro-minerais
Fe	A (Retinol)	Histidina	Ácido	K
Zn	D (Calciferol)	Isoleucina	linoleico	Ca
Cu	E (α -Tocoferol)	Leucina	Ácido	Mg
Mn	K (Filoquinona)	Lisina	linolénico	S
I	C (Ácido ascórbico)	Metionina		P
Se	B1 (Tiamina)	Fenilalanina		Na
Mo	B2 (Riboflavina)	Treonina		Cl
Co	B3 (Niacina)	Triptofano		
Ni	B5 (Ácido pantoténico)	Valina		
	B6 (Piridoxina)			
	B7 (Biotina)			
	B9 (Ácido Fólico, folacina)			
	B12 (Cobalamina)			

ANEXO IV – Esquema das Aplicações Foliares Aplicadas no Campo HBio Lda.



Legenda - (A) No período compreendido entre o vingamento e o fruto atingir cerca de 30 mm, efectuaram-se as duas primeiras aplicações foliares (em 12/5/2018 e 25/05/2018) com Ca(NO₃)₂ (nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,3 e 0,6 kg ha⁻¹ - portanto 4 concentrações, com 4 replicados). Paralelamente noutras árvores, efectuaram-se também duas aplicações iniciais com CaCl₂ (nas seguintes concentrações: 0; 0,4; 0,8 e 1,6 kg ha⁻¹ - portanto 4 concentrações, com 4 replicados). (B) Posteriormente, após as duas pulverizações iniciais (e para todos os tratamentos com CaCl₂ e Ca(NO₃)₂) efectuou-se uma aplicação unicamente com CaCl₂ (4 kg ha⁻¹) (em 15/6/2018), seguindo-se então mais quatro aplicações com CaCl₂ (8 kg ha⁻¹) (em 29/6/2018; 23/07/2018; 10/8/2018 e 25/8/2018).

ANEXO V – Esquema de Amostragem de Solo no Campo Experimental da HBio Lda.

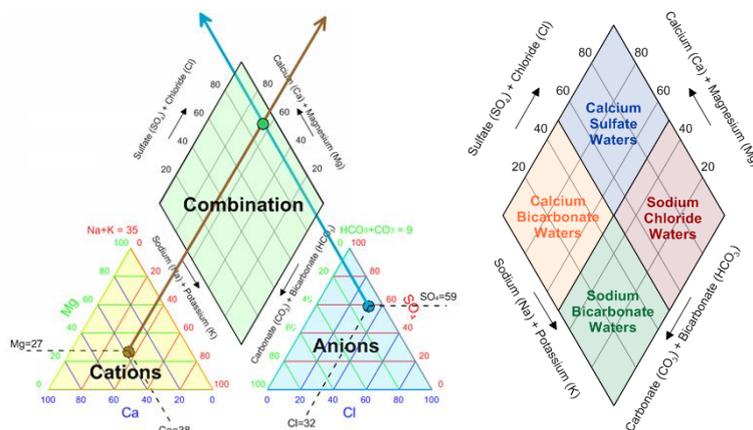


ANEXO VI – Explicação do Diagrama de Piper e de Wilcox e do Índice de Langelier

Fonte: Golden Software Support, 2018.

Diagrama de Piper

Os gráficos de Piper, são ferramentas utilizadas para visualizar a abundância relativa em percentagem, de iões maiores em amostras de água. Este gráfico é composto por três componentes: um diagrama ternário no canto inferior esquerdo que representa os catiões (magnésio, cálcio, sódio e potássio); um diagrama ternário no canto inferior direito que representa os aniões (cloreto, sulfato, carbonato e bicarbonato); um diagrama superior onde se projetam os pontos obtidos nos diagramas ternários. Cada amostra é normalizada para 100 % (soma de catiões = 100 % e soma de aniões = 100 %).



Legenda: Projeção em Diagrama de Piper e respectiva classificação iónica da água.

As amostras podem ser classificadas consoante a dominância dos aniões e / ou catiões em: bicarbonatadas, sulfatadas e/ou cloretadas, cálcicas, sódicas e/ou magnesianas.

Fonte: Richards, 1954.

Classificação das Águas de Irrigação para Uso Agrícola e Diagrama de Wilcox

Perigo de Salinidade (C)

A água divide-se em quatro classes: salinidade baixa, salinidade média, salinidade alta e salinidade muito alta, sendo os pontos divisórios entre classes 250, 750 e 2250 $\mu\text{S} / \text{cm}$.

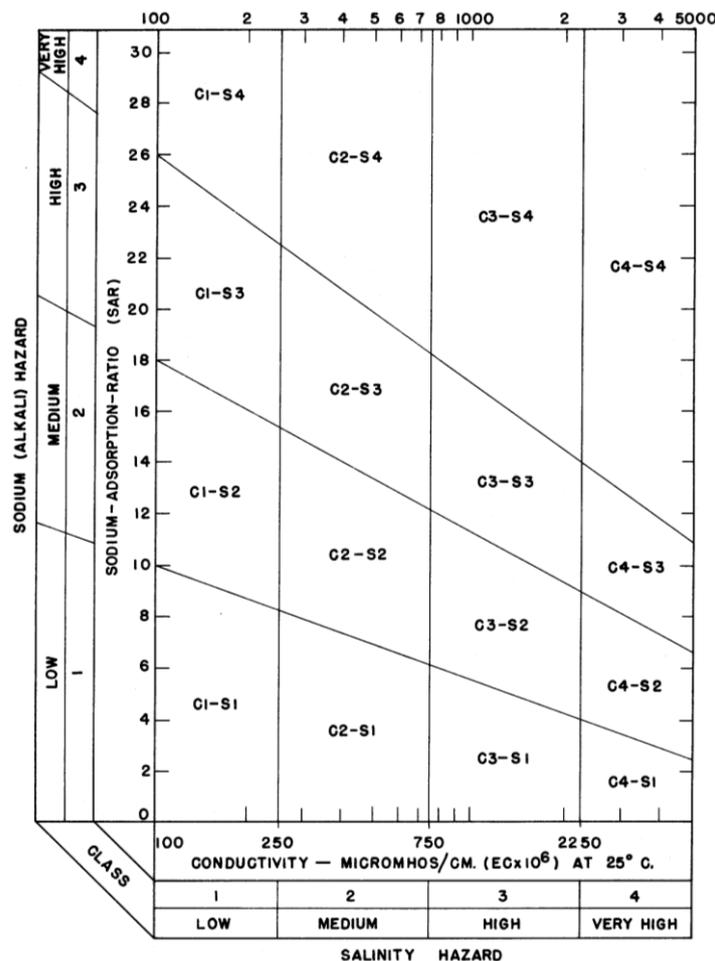
- C1 ($EC < 250 \mu\text{S}/\text{cm}$) - Água de baixa salinidade: Significa que pode ser usada para irrigação na maioria das cultivares, e em quase todos os tipos de solo, com pouca probabilidade de desenvolver problemas de salinidade.
- C2 ($250 < EC < 750 \mu\text{S}/\text{cm}$) - Água de salinidade média: Indica que pode ser usada sempre que houver um grau moderado de lixiviação. Plantas com tolerância moderada aos sais podem ser cultivadas, em muitos dos casos, sem necessidade de práticas especiais de controlo da salinidade;
- C3 ($750 < EC < 2250 \mu\text{S}/\text{cm}$) - Água com alta salinidade: Significa que não pode ser usada em solos com drenagem deficiente, e mesmo com drenagem adequada, podem ser necessárias práticas especiais para controlar a salinidade, só devendo de ser aplicada para irrigação de plantas tolerantes aos sais;

- C4 ($EC > 2250 \mu\text{S/cm}$) - Água com salinidade muito alta: Indica que não pode ser usada em condições normais, podendo ser apenas usada ocasionalmente, em circunstâncias muito especiais, tais como: em solos que se evidenciem muito permeáveis e optando por culturas altamente tolerantes aos sais.

Perigo de Sodificação (Alcalinização) (S)

A água divide-se em quatro classes: baixo teor de sódio, teor médio, teor alto e teor muito alto, sendo os pontos divisórios entre classes 10, 18 e 26.

- S1 (SAR: 0-10) - Água com baixo teor de sódio: Indica que esta pode ser usada em praticamente todos os solos, com escassas possibilidades de alcançar concentrações tóxicas de íons sódio;
- S2 (SAR: 10-18) - Água com teor médio de sódio: Significa que pode representar um perigo quando utilizada em solos de textura fina (ex: argiloso) com elevada capacidade para trocas iônicas. Esta água pode servir para irrigar solos de textura arenosa/grossa ou orgânicos que com boa permeabilidade;
- S3 (SAR: 18-26) - Água com alto teor de sódio: Significa que pode originar níveis tóxicos de sódio trocável na maioria dos solos, necessitando de práticas especiais de manejo, sugerindo-se a título de exemplo: drenagem e aplicação de matéria orgânica;
- S4 (SAR: > 26) - Água com teor muito alto de sódio: Significa que geralmente é uma água inadequada para irrigação. Excepções podem ser feitas quando a salinidade for baixa (C1) ou média (C2), ou quando o uso de corretivos ou gesso possibilite o uso desta água.



Legenda: Diagrama de Wilcox para classificação de águas para irrigação. (Fonte: Richards, 1954)

Fonte: Granjeiro *et al.*, 2009.

Índice de Langelier

A capacidade de incrustação da água está diretamente associada ao seu pH. Uma das maneiras de verificar a tendência incrustante que a água apresenta em relação ao carbonato de cálcio é através do Índice de Langelier. Esse índice compara o pH da água de interesse com o pH da água de saturação (pH_s) para o carbonato de cálcio. A determinação do pH_s é feita conhecendo os seguintes parâmetros: temperatura, sólidos totais dissolvidos (STD), dureza e alcalinidade total.

O índice de Langelier é expresso por:

$LSI = pH - pH_s$, onde, pH é o pH da água medida e pH_s é o pH de saturação.

Tabela 1 – Faixas do Índice de Langelier

ISL	Possível tendência da água
3	Incrustação extremamente severa
1	Incrustação severa
0,5	Incrustação moderada
0	Estável
-0,5	Sem incrustação, leve tendência para dissolver
-1	Sem incrustação, tendência moderada para dissolver
-3	Sem incrustação, tendência muito forte para dissolver

ANEXO VII - Funcionamento do Aparelho de Fluorescência por Aplicação de Raios-X

Fonte: Pessoa, 2018a.

O método de análise de elementos minerais por espectrometria de fluorescência de Raios-X (XRF) baseia-se na especificidade de cada elemento químico ao ser excitado por radiação. A incidência da radiação na amostra, faz com que os átomos passem do estado fundamental para o excitado, levando os electrões a afastarem-se do núcleo, provocando assim um espaço vazio. Esse espaço vazio é rapidamente preenchido por outro electrão vindo das camadas mais externas da nuvem electrónica. Neste processo, o electrão emite radiação. Essa radiação detectada é específica de cada elemento químico e permite quantificar a sua proporção na amostra. A figura 1 esquematiza este processo.

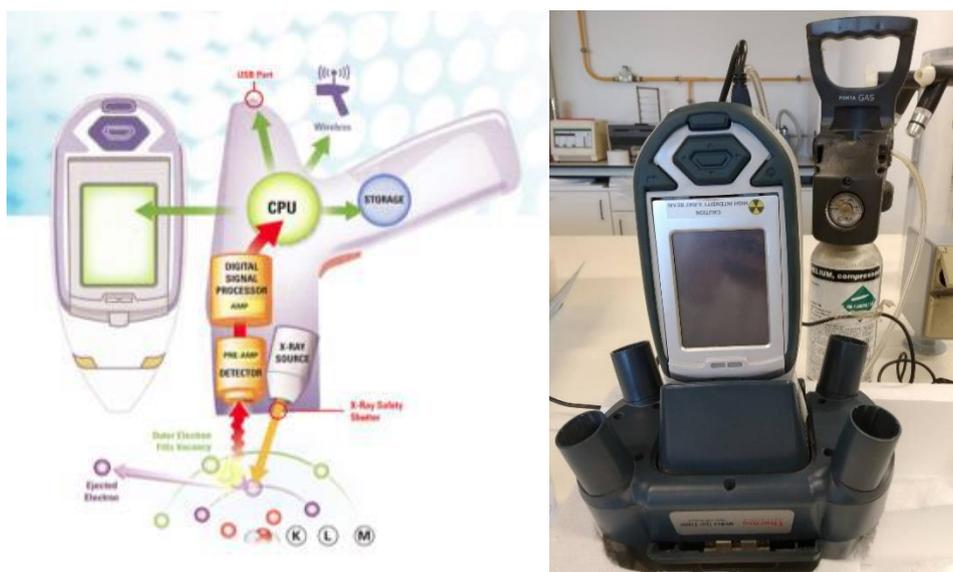


Figura 1. Esquema do processo de análise de elementos minerais por um equipamento XRF utilizado no presente trabalho.

Este aparelho é, assim, constituído por uma ampola de Raios-X que irradia sobre a amostra, excitando todos os átomos; e um detetor que deteta o comprimento de onda de emissão desses átomos ao voltarem ao seu estado fundamental.

A intensidade de cada sinal detetado é diretamente proporcional à concentração de cada elemento químico presente na amostra. As curvas de calibração introduzidas no software do equipamento, permitem uma leitura quase instantânea dessas mesmas concentrações. As amostras analisadas podem encontrar-se no estado sólido ou líquido (quando devidamente acondicionadas em cuvetes específicas e isoladas com o filme protetor).

Tem a vantagem de fazer a leitura da amostra sem que a mesma seja deteriorada, e não necessidade de uma digestão ácida da amostra (processo moroso e dispendioso). A sua utilização é relativamente pouco dispendiosa, por comparação com à Espectrofotometria de Absorção Atómica. Pode funcionar por controlo remoto (ligado a um computador que tenha instalado o software específico) utilizando a aplicação NDTR.

Foi desenvolvido para pesquisa mineira para detecção de metais nobres e de interesse industrial e permite a quantificação de inúmeros elementos químicos (42) como: o Bário (Ba), o Níquel (Ni), o Cobalto (Co), o Zircónio (Zr), o Estrôncio (Sr), o Urânio (U), o Rubídio (Rb), o Tálho (Th), o Ouro (Au), o Tungsténio (volfrâmio-W), o Titânio (Ti), o Escândio (Sc), o Césio (Cs), o Vanádio (V), o Antimónio

(Sb), a Prata (Ag), o Paládio (Pd), o Nióbio (Nb), o Bismuto (Bi), o Rénio (Re), o Tálho (Ta) e o Háfio (Hf).

O modelo utilizado neste trabalho não permite a quantificação de alguns elementos químicos de número atômico mais baixo, como é o caso: do Sódio (Na), Carbono (C), Oxigênio (O), Azoto (N), estes três últimos presentes em grande concentração nos alimentos. Também não detecta o Lítio (Li), berílio (Be), Boro (B) e Flúor (F).

No entanto, consegue quantificar macronutrientes essenciais como o Cloro (Cl), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Silício (Si), os micronutrientes como o Ferro (Fe), o Cobre (Cu), o Zinco (Zn), o Molibdênio (Mo), o Selênio (Se), o Crómio (Cr) e o Manganês (Mn) assim como os potenciais elementos contaminantes ou tóxicos como o Chumbo (Pb), Estanho (Sn), Alumínio (Al), Arsénio (As), Cádmio (Cd) e Mercúrio (Hg).

Os resultados são tratados com recurso ao software NITON Data Transfer – XL 3t-36653 (NDT), estando disponibilizados em formato Excel, após transferência dos mesmos para o computador através da aplicação.

ANEXO VIII - Soluções Padrão para Obtenção das Retas de Calibração dos Diferentes Elementos Analisados por Absorção Atômica.

Elemento	Concentrações (ppm)
Ca; Mg; Na; Fe	2,5; 5; 10; 15; 20
Cu	2,5; 5; 7; 10; 12
P	10; 20; 30; 40
Zn	0,5; 1; 1,5; 2; 2,5
K	1; 2; 5; 10; 15

ANEXO IX – Determinação de Índices Colorimétricos

Fonte: Pessoa, 2018b.

A cor de um objecto é determinada pela frequência de onda que esse objecto reflecte, ou seja, um objecto terá determinada cor, se não absorver os comprimentos de onda que correspondem àquela cor. Como exemplo, um objecto vermelho (tomate maduro) absorve preferencialmente as frequências fora do vermelho. O branco é o resultado do reflexo de todas as frequências e por isso as vestes brancas são frescas. Já o preto é uma cor subtractiva, ou seja, absorve todas as frequências e por isso é considerada uma “cor quente”.

Ao considerar-se as cores como luz, a cor branca resulta da sobreposição de todas as cores primárias (vermelho, amarelo e azul), enquanto que o preto é a ausência de luz. O arco-íris, por exemplo, resulta da decomposição da luz branca pelas gotículas de água, que funcionam como prismas. As cores primárias são as cores indecomponíveis (vermelho, amarelo e azul).

A Cor de um objecto, pode constituir um parâmetro de qualidade. Nos alimentos, por exemplo, a cor é um dos atributos que fazem com que o Consumidor tenha vontade ou não de adquirir determinado género alimentício.

Em tecnologia dos alimentos, é importante analisar a cor de uma forma científica. Não basta dizer que determinado alimento é vermelho, vermelho mais escuro ou vermelho mais claro. É necessário especificar essa cor, num espaço cromático tridimensional.

Para análise visual, utiliza-se as coordenadas cromáticas do sistema CIELab, que são as seguintes: L^* , a^* e b^* . L^* diz respeito à luminosidade e varia do 0 (preto) a 100 (branco); a^* varia do verde (-), a vermelho (+); b^* estende-se do azul (-) ao amarelo (+). Sendo assim, a três dimensão CIE $L^* a^* b^*$ do espaço de cor, representam as cores visíveis ao olho humano (figura 1).

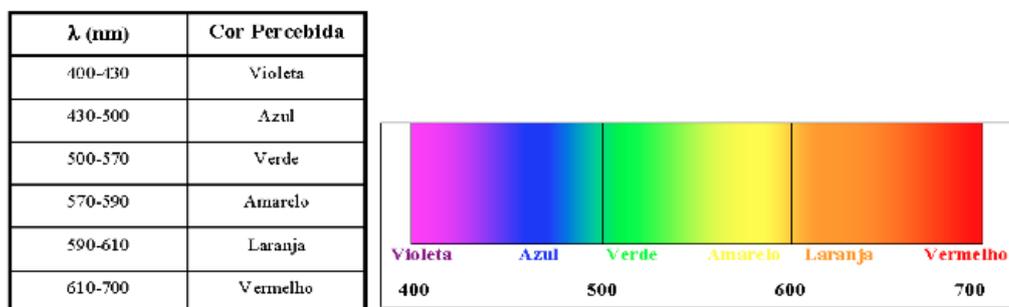


Figura 1. Espectro de cor na banda do visível (em nanómetros).

Num espaço tridimensional, as dimensões separam a luz ambiente, ou a luminosidade (L^*) num eixo vertical e a cromaticidade num plano horizontal (xy) (figura 2).

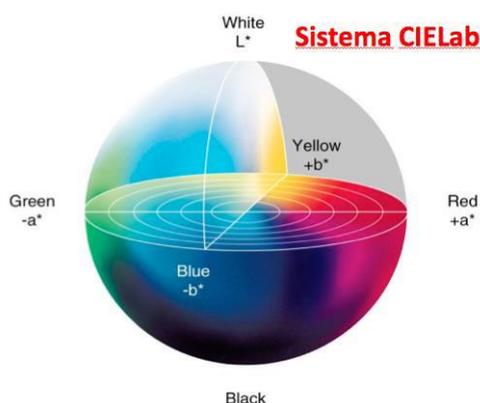


Figura 2. Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIELab: L^* representa a escala de cor entre o preto (0) e o branco (100); a^* varia entre o verde (-) e o vermelho (+); b^* varia entre o azul (-) e o amarelo (+).

ANEXO X – Modelo Utilizado para a Realização da Análise Sensorial

FICHA DE PROVA HEDÓNICA

NOME:

DATA:

Por favor, avalie as amostras de polpas utilizando a escala abaixo, em relação aos seguintes atributos.

Escala:

1--Desgostei muito

2--Desgostei

3--Não gostei nem desgostei

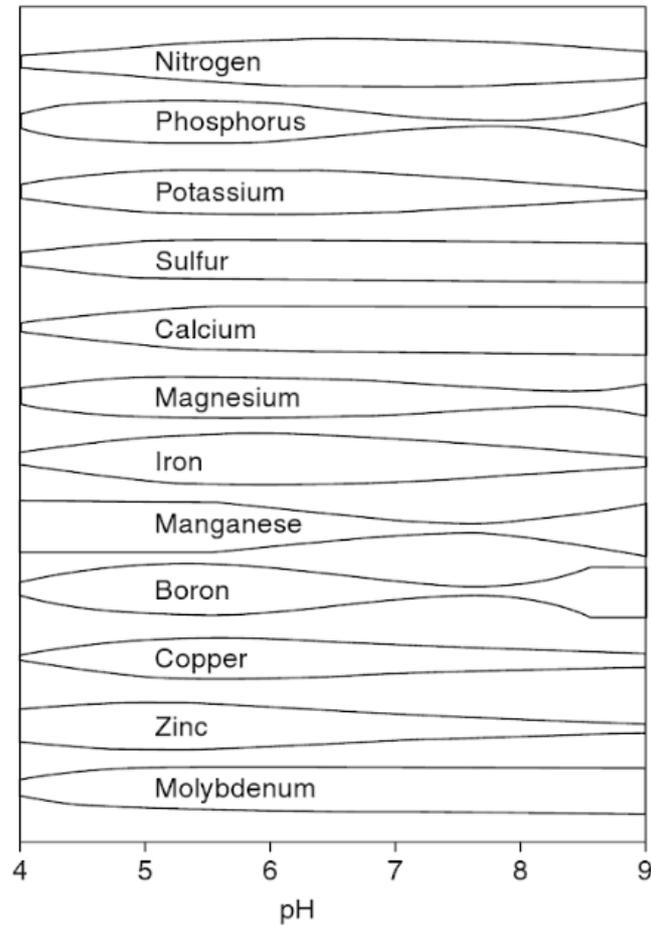
4--Gostei

5--Gostei muito

	Amostra	Código:
Características sensoriais		
Aparência		
Cor		
Consistência		
Aroma/sabor		
Apreciação Global		

ANEXO XI – Efeitos do pH do Solo, na Disponibilidade de Vários Elementos Minerais para as Plantas

Fonte: Läuchli e Grattan, 2012.



Legenda: Efeitos do pH do solo, na disponibilidade de vários elementos minerais para as plantas. Uma menor disponibilidade do elemento mineral para um determinado intervalo de pH, implica uma faixa mais estreita.

ANEXO XII – Boxplot dos Diferentes Minerais Presentes nas Amostras de Solo Recolhidas do Campo HBio Lda.

