



Colóquio Nacional da **Produção de Pequenos Frutos**

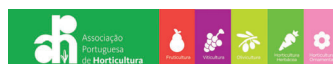
"Alterações climáticas e a produção de pequenos frutos"

41 Actas Portuguesas
de Horticultura



Oeiras
2025

Organização



Apoio



MUNICÍPIO OEIRAS

Actas

41 Actas Portuguesas de Horticultura

VII Colóquio Nacional
da **Produção de**
Pequenos Frutos

25 e 26 Set
2025



Organização



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.



Apoio



MUNICÍPIO OEIRAS

Ficha Técnica:

Título: VII Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos

Coleção: Actas Portuguesas de Horticultura nº 41

Propriedade e Edição: Associação Portuguesa de Horticultura

Editores:

Ana Cristina Ramos

Ana Rita Varela

Cláudia Santos

Elisabete Figueiredo

Henrique Ribeiro

Susana Carvalho

Pedro Brás de Oliveira

Composição e Grafismo: Francisco Barreto

Grafismo da capa: Paulo Jorge de Jesus Carvalho

ISBN: 978-972-8936-58-7

Data de publicação: maio, 2026



Organização



Comissão Organizadora

- ❖ Adriana Guerreiro (UALg/APH)
- ❖ Ana Cristina Ramos (INIAV, I.P./APH)
- ❖ Ana Paula Nunes (COTHN-CC)
- ❖ Francisco Luz (INIAV, I.P./Beirabaga)
- ❖ Frederico Preza (INIAV, I.P.)
- ❖ Helder Coelho (COTHN-CC)
- ❖ Manuel Roque (INIAV, I.P./MadreFruta)
- ❖ Pedro Brás de Oliveira (INIAV, I.P.)
- ❖ Rosa Guilherme (CCDR/APH)
- ❖ Teresa Valdivieso (INIAV, I.P.)

Comissão Científica

- ❖ Ana Cristina Ramos (INIAV, I.P./APH)
- ❖ Ana Rita Varela (INIAV, I.P.)
- ❖ Cláudia Santos (NIMSB, UNL)
- ❖ Elisabete Figueiredo (ISA)
- ❖ Henrique Ribeiro (ISA)
- ❖ Pedro Brás de Oliveira (INIAV, I.P.)
- ❖ Susana Carvalho (FCUP/GreenPorto)

Secretariado

- ❖ Francisco Barreto (INIAV, I.P.)
INIAV, I.P. – Oeiras, Av. da República, Nova Oeiras, 2784-505 Oeiras
Tel.: 21 440 35 00
Correio eletrónico: VIICNPPF@gmail.com



Prefácio

O VII Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos, uma organização conjunta do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), da Associação Portuguesa de Horticultura (APH) e do Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional – Centro de Competências (COTHN-CC), constituiu mais um enorme sucesso da fileira dos Pequenos Frutos. Realizado no Tagus Park em Oeiras, contou com mais de 150 participantes entre investigadores, técnicos e produtores. Tal como foi expresso pelos organizadores, adaptar a produção dos pequenos frutos às alterações climáticas com sistemas de cultivo de baixo impacto e melhorar a qualidade dos frutos para atrair o consumidor, são os grandes desafios desta fileira que continua a crescer e a inovar em Portugal.

A produção de pequenos frutos em Portugal continua a ser uma história de sucesso com uma forte dinâmica empresarial. O país passou, em dez anos, de 212 para 6125 hectares plantados (2009/2019) fruto do investimento no setor a que não estão dissociadas as sete edições dos Colóquios nacionais. A framboesa continua a ser o pequeno grande fruto com mais de 226 milhões de euros exportados em 2024. A amora quase duplicou o valor exportado num ano de 37 para 62 milhões de euros entre 2023 e 2024. O mirtilo já representava 54 milhões de euros em 2024.

A produção intensiva de pequenos frutos aumentou acentuadamente, nomeadamente para a cultura em substrato, o que obrigou à implementação de novas metodologias que devem ser divulgadas e discutidas para uma melhor utilização sustentável dos recursos. Neste contexto, a edição deste Colóquio foi dedicada ao tema “Alterações climáticas e a produção de pequenos frutos” e teve quatro sessões com o objetivo de analisar e debater áreas fundamentais para a sustentabilidade da produção intensiva de pequenos frutos. O Colóquio contou com um painel de oradores nacionais e estrangeiros de reconhecido mérito e com apresentação de vários trabalhos desenvolvidos de norte a sul, nomeadamente de empresas produtoras, das universidades, dos laboratórios e centros de investigação.

No primeiro dia foram apresentadas 24 comunicações orais e 30 comunicações em painel, repartidas pelas quatro sessões temáticas do colóquio: Melhoramento, técnicas biotecnológicas e avaliação de variedades; Tecnologias de produção face às alterações climáticas; Ecossistemas e sanidade vegetal; Qualidade e benefícios para a saúde. No segundo dia decorreu a visita técnica à empresa produtora de mirtilos Logofruits em Almogrove e ao Polo de Inovação da Fataca, também em Odemira. Esta edição das Actas Portuguesas de Horticultura nº 41 inclui 31 trabalhos das 54 comunicações apresentadas no evento.

O Colóquio foi um enorme sucesso e só exequível devido ao empenho e resiliência de todos, a quem gostaríamos de deixar uma palavra especial de reconhecimento, à Comissão organizadora e ao Secretariado, aos oradores, aos patrocinadores, parceiros e *media partners*, sem esquecer todos os participantes.

Ana Cristina Ramos, Ana Paula Nunes e Pedro Brás de Oliveira

Índice

Prefácio	5
-----------------------	----------

Sessão I - Melhoramento, técnicas biotecnológicas e avaliação de variedades

Estudo da transferibilidade de marcadores moleculares para <i>crumbly</i> entre cultivares de <i>Rubus idaeus</i> L.	13
Melissa Y. Oliveira, Francisco Luz, Cândida S. Trindade, Teresa Valdivieso, Pedro B. Oliveira, Amílcar Duarte, Ana Rita Varela	
O impacto da micropropagação e da micorrização na sustentabilidade de <i>Arbutus unedo</i>	23
Andreia Afonso, Ana Catarina Ribeiro, Fátima Oliveira	
Produção de framboesas sob painéis fotovoltaicos: contributo para a transição agroenergética em Portugal	31
Alexandre Penicheiro, Raquel Martins, Ana Néri, Anabela M. Ramos, Cristina Galhano, Helena Coimbra, Miguel Valério, Daniela Santos, Filomena Miguéns, Manuel Nunes, Luís Coelho, Rui Amaro, Marta Lopes	
O impacto da micropropagação na conservação e valorização de <i>Corema album</i>	41
Ana Catarina Ribeiro, Fátima Oliveira, Rose Sousa, Andreia Afonso, Teresa Valdivieso, Pedro B. Oliveira	
Desempenho germinativo de diferentes linhas segregantes de amora em métodos <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i>	49
Francisco Reigada, Manuel F. Roque, Teresa Valdivieso, Patrick Materatski, Carla Varanda, Pedro B. Oliveira	

Sessão II - Tecnologias de produção face às alterações climáticas

Estudo da redução da dotação de rega e do reaproveitamento da água de drenagem, no cultivo de framboesa em substrato	59
Jéssica Gomes, Henrique Ribeiro, Pedro B. Oliveira	
Potencial de produção de <i>Corema album</i> sob rega moderada	69
Pilar Pineda-Balbuena, Antonio José León González, Carmen Martín Cordero, María Cruz Díaz-Antunes Barradas, María Zunzunegui, Leonor Álvarez-Cansino	
Avaliação do efeito da micorrização na cultura de mirtilo	75
Daniel Vieira, Andreia Afonso, Ana Catarina Ribeiro, Fátima Oliveira	
Proposta de sistemas de condução em camarinha para produção de fruto	83
João Jacinto, Teresa Valdivieso e Pedro B. Oliveira	
O projeto Emc² ‘Explorar Matos de Camarinha da Costa’: principais resultados da sensibilização ambiental e conservação de camarinhas	91
M. Alexandra Abreu Lima, Lia Vasconcelos, Pedro B. Oliveira, Teresa Valdivieso, José Gualdino Correia	

Sessão III - Ecossistemas e sanidade vegetal

SustainGrowth: sistema de certificação da produção nacional rumo à intensificação sustentável da agricultura	103
Bruno Magalhães, Cristina Ascenso, Livia Pian, Maria do Carmo Martins, José Costa Gomes, Margarida Luis, José Silvestre	
Estratégias ecológicas para o controlo de <i>Scirtothrips aurantii</i> e <i>Scirtothrips dorsalis</i> (Insecta: Thysanoptera), em framboesa e mirtilo, em Portugal	111
Frederico Preza, Pedro B. Oliveira, José Carlos Franco, Célia Mateus	
Avaliação do efeito de bioestimulantes na produtividade e qualidade dos frutos de três variedades de mirtilo	121
Diogo Machado, Ana Paula Silva, Jorge Carvalho, Berta Gonçalves	
Projeto ACROPICS – estratégias de co-inovação em sustentabilidade	129
Daniel McGuire, Márcia Santos, Frederico Preza, Eugénio Diogo, Pedro Naves, Lurdes Inácio, Célia Mateus, Leonor Cruz, Pedro B. Oliveira	
Primeiro registo de ‘<i>Candidatus Phytoplasma rubi</i>’ associado à doença “<i>Rubus stunt</i>” a infetar <i>Rubus occidentalis</i> L. em Portugal	139
Mónica Rodrigues, Melissa Oliveira, Margarida Teixeira Santos, Pedro B. Oliveira, Diogo Mendonça, Esmeraldina Sousa	
Pequenos frutos e polinizadores: uma dependência crescente em território nacional	145
Míriam Cavaco, Pedro B. Oliveira, Teresa Valdivieso, João Jacinto	
Avaliação de um bioestimulante microbioano a nível comercial no controlo de doenças fúngicas: metodologia e constrangimentos	153
Miguel G. Santos, Rosa M.N. Ricardo, Andreia Garrido, Tânia R. Fernandes, Susana M.P. Carvalho	
Aplicação de exsudados de leveduras endofíticas como uma estratégia sustentável para o controlo de doenças fúngicas em morangueiro	161
Andreia Garrido, Tânia R. Fernandes, Inês Moura, Miguel G. Santos, Pedro R.P. Lourenço, Susana M.P. Carvalho	

Sessão IV - Qualidade e benefícios para a saúde

Avaliação exploratória dos voláteis de partes aéreas em floração de <i>Corema álbum</i>	175
João Jacinto; Cristina Máguas; Carla Alegria; Ana Rita Varela; Mari Cruz Díaz-Barradas; Ana Cristina Figueiredo	
Bagas vermelhas mascaradas de branco. O exemplo da camarinha	185
Díaz-Barradas, M.C.; Martín-Cordero, C.; León-González, A.; Zunzunegui, M.; Pineda-Balbuena, P.; Álvarez-Cansino, L.	
Biocontroladores verdes como estratégia para melhorar a qualidade nutricional de pequenos frutos	193
Carlo Bravo, Andreia Garrido, Tânia Fernandes, Miguel Santos, Susana Carvalho, Susana Soares, Victor de Freitas	
Pequenos frutos e a doença de Parkinson: uma abordagem alimentar para proteger o cérebro e o intestino	201
Carlos Pita, Rafael Carecho, Catarina Pinto, Natasa Loncarevic-Vasiljkovic, María Ángeles Ávila-Gálvez, Pedro B. Oliveira, Cláudia Nunes dos Santos	
Suplementação da dieta com pequenos frutos altera a microbiota intestinal	211
Catarina J. G. Pinto, David Berry, Pedro Moura-Alves, Pedro B. Oliveira, Cláudia Nunes dos Santos	

Avaliação preliminar da eficácia de revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de mirtilos	219
Clara Silva, Mafalda Silva, Ana Cristina Ramos, Pedro B. Oliveira, Elsa M. Gonçalves	
Resposta diferencial dos mirtilos à aplicação de inoculantes bacterianos para melhorar o rendimento, as qualidades organolépticas e a concentração de compostos bioativos	227
José David Flores-Félix, Ana Carolina Gonçalves, Sara Meirinho, Ana Raquel Nunes, Gilberto Alves, Cristina Garcia-Viguera, Diego A. Moreno, Luís R. Silva	
Efeito de extratos ricos em fenólicos de <i>Rubus fruticosus</i>, <i>R. ulmifolius</i> e <i>Morus nigra</i> no stresse oxidativo e na inibição do crescimento das Caco-2	235
Ana C. Gonçalves, Mariana S. Martins, Márcio Rodrigues, José David Flores-Félix, Cristina Garcia-Viguera, Diego A. Moreno, Gilberto Alves, Luís R. Silva	
Lista de Participantes	245



Sessão I

Melhoramento, técnicas biotecnológicas e
avaliação de variedades

Estudo da transferibilidade de marcadores moleculares para *crumbly* entre cultivares de *Rubus idaeus* L.

Melissa Y. Oliveira¹, Francisco Luz¹, Cândida S. Trindade², Teresa Valdivieso², Pedro B. Oliveira², Amílcar Duarte³, Ana Rita Varela^{2,4}

¹Beirabaga, Polo de Inovação da Fataca, 7630-580, São Teotónio, Odemira;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras;

³UALG – Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro;

⁴MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora.

Resumo

A framboesa (*Rubus idaeus* L.) é um fruto de elevado valor comercial e crescente relevância no mercado português. A sua produção pode ser severamente comprometida pela ocorrência do *crumbly*, uma desordem fisiológica caracterizada pela desagregação das drupéolas e consequente desintegração do fruto durante a colheita, mesmo quando este aparenta normalidade externa. Apesar do seu impacto significativo, as suas causas permanecem pouco compreendidas. A existência de hereditariedade dos sintomas sugere que esta desordem tem uma componente genética, mas a variação na sua expressão indica a influência de fatores ambientais.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente uma coleção de génotipos de framboesa em relação ao *crumbly* e avaliar a utilidade de marcadores moleculares SSR e SNP para prever a ocorrência deste fenótipo. Foram analisados 34 génotipos, dos quais 7 apresentavam caracterização fenotípica confirmada quanto à presença ou ausência do *crumbly*.

A fenotipagem foi realizada por observações morfológicas da estrutura interna dos frutos, recorrendo a uma lupa estereoscópica Leica MZ8 (Leica Microsystems, Alemanha). As amostras foram fotografadas para documentar a homogeneidade das drupéolas e a presença de tricomas entre elas, auxiliando na distinção entre frutos normais e afetados.

Na análise molecular, foram analisadas oito regiões genómicas contendo marcadores do tipo SSR e SNP que foram previamente associados ao fenótipo *crumbly* em populações provenientes do cruzamento dos génotipos ‘Latham’ × ‘Glen Moy’. Além disso, foram identificados novos marcadores correlacionados com a variação do fenótipo, reforçando a ligação destas regiões à manifestação da desordem *crumbly*, revelando o seu potencial para estudos de seleção assistida por marcadores.

A inclusão de um número superior de cultivares e uma fenotipagem mais detalhada deverá aumentar a robustez das análises de correlação, contribuindo para esclarecer a relação entre os novos marcadores e o *crumbly*. Este trabalho representa um avanço no entendimento da base genética da desordem e na criação de ferramentas para a identificação precoce de plantas resistentes ou suscetíveis.

Palavras-chave: *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Simple Sequence Repeat* (SSR), Eletroforese capilar, Sequenciação Sanger, Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

Abstract

The raspberry (*Rubus idaeus* L.) is a fruit of high commercial value and growing relevance in the Portuguese market. However, its production can be severely affected by the occurrence of crumbly, a physiological disorder characterized by the disaggregation of drupelets and consequent fruit disintegration during harvest, even when the external appearance seems normal. Despite its significant impact, the causes of this disorder remain poorly understood. The heritability of this disorder suggests it is, at least in part, genetically determined; but the variation observed in symptoms expression also indicates the influence of environmental factors.

This study aimed to systematically characterize the phenotype of this condition in *R. idaeus*, to enable quantification of disease severity; and to evaluate the applicability of SSR and SNP molecular markers for predicting the occurrence of the diseased phenotype. A total of 34 genotypes were analyzed, seven of which had confirmed phenotypic characterization for crumbly.

Phenotyping was carried out through morphological observations of the internal fruit structure using a Leica MZ8 stereomicroscope (Leica Microsystems, Germany). Samples were photographed to document drupelet homogeneity and the presence of trichomes between them, assisting in distinguishing normal from affected fruits.

In the molecular analysis, eight genomic regions containing SSR and SNP markers previously associated with crumbly in populations derived from the ‘Latham’ × ‘Glen Moy’ cross were investigated. Additionally, new markers were identified showing strong correlation with phenotypic variation, reinforcing the association of these regions with the manifestation of the disorder and revealing potential for marker-assisted selection studies.

Subsequent analyses that include a larger number of cultivars, and performing more detailed phenotyping is expected to increase the robustness of correlation analyses, contributing to clarify the relationship between genetic markers and crumbly. This work represents a step forward in understanding the genetic basis of the disorder and in developing tools for the early identification of resistant or susceptible plants.

Keywords: Single Nucleotide Polymorphism (SNP); Simple Sequence Repeat (SSR); Capillary Electrophoresis; Sanger Sequencing; Principal Coordinates Analysis (PCoA).

Introdução

A framboeseira (*Rubus idaeus* L.) pertence ao género *Rubus* (família Rosaceae), um dos mais diversos do reino vegetal, compreendendo aproximadamente 500 espécies distribuídas por 12 subgéneros (Gradziel, 2009; Kole, 2013). Trata-se de uma cultura de grande importância económica a nível mundial. A produção global ronda as 947.852 toneladas, sendo a Europa responsável por cerca de 65% do total (FAO, 2024).

Entre os fatores que afetam a qualidade do fruto da framboesa, um dos mais relevantes do ponto de vista económico é o fenómeno conhecido como *crumbly fruit*. Ao contrário de outras deformações do fruto, o *crumbly* é mais complexo e ocorre em diferentes graus entre as cultivares de framboesa. É considerado um sinal de falha parcial nos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento do fruto (Scolari *et al.*, 2021), resultando num menor número de drupéolas, ainda que de maior tamanho. Esta condição conduz a uma fraca coesão das drupéolas, provocando a desintegração do fruto durante a colheita (Scolari *et al.*, 2021).

Vários fatores - isoladamente ou em combinação - podem contribuir para a ocorrência de *crumbly*: má polinização (ou seja, poucos ovários fertilizados), danos nas flores (por exemplo, causados por visitas excessivas de polinizadores), condições ambientais adversas durante fases críticas do desenvolvimento floral e do fruto (como dias curtos e baixas temperaturas que promovem a expressão de flores femininas), práticas intensivas de cultura de tecidos (ciclos repetidos de micropropagação), predisposição genética, ausência de frio adequado, presença de fitoplasmas e excesso de néctar floral (Scolari, 2020). Infecções virais, como o *Raspberry Bushy Dwarf Virus* (RBDV), o *Raspberry Leaf Mottle Virus* (RLMV) e o *Raspberry Latent Virus* (RpLV), isoladamente ou em conjunto, também estão associadas a sintomas severos de *crumbly* (Quito-Avila *et al.*, 2014).

A severidade do *crumbly* varia consoante a cultivar de framboesa. Quando o fruto é afetado, torna-se comercialmente inviável, resultando em perdas significativas de produção (Scolari *et al.*, 2021). Algumas cultivares parecem mais suscetíveis do que outras; no entanto, quando as condições ambientais se desviam do padrão sazonal, os sintomas podem surgir de forma imprevisível em cultivares anteriormente não afetadas (Graham *et al.*, 2015).

Embora *crumbly* seja um termo genérico que descreve um fenótipo específico do fruto, podem distinguir-se duas categorias com base na severidade dos sintomas: a *Crumbly Fruit Condition* (CFC), em que todos os frutos de uma planta são sintomáticos em todas as estações, e a *Malformed Fruit Disorder* (MFD), caracterizada por sintomas intermitentes dentro de um mesmo ano ou entre anos, variando de ligeiros a severos. Enquanto a CFC é geneticamente determinada, a MFD depende das condições ambientais que afetam a expressão dos sintomas, sendo de maior preocupação para os produtores devido à sua imprevisibilidade, dificultando a identificação de material sintomático antes da propagação (Scolari *et al.*, 2021).

A fenotipagem do *crumbly* teve início com estudos sobre o desenvolvimento do fruto numa população proveniente do cruzamento entre a cultivar europeia de framboesa vermelha ‘Glen Moy’ e a cultivar norte-americana ‘Latham’ (uma família de irmãos completos), que permitiram identificar QTLs associados à maturação do fruto (Graham *et al.*, 2009). Estudos posteriores com a mesma população, avaliados sob diferentes condições (campo e túnel) ao longo de sete épocas de crescimento, revelaram fatores sazonais, ambientais e genéticos associados ao fenótipo *crumbly*. Estes estudos estabeleceram uma ligação entre o atraso no desenvolvimento do fruto e a ocorrência dos sintomas — quanto mais lento o desenvolvimento, maior a probabilidade da condição. Assim, Graham *et al.* (2015) identificaram dois QTLs associados ao fenótipo *crumbly*, localizados nos grupos de ligação 1 (LG1) e 3 (LG3).

Em 2018, Hackett *et al.* geraram um novo mapa de ligação utilizando *Genotyping-by-Sequencing* (GbS). Com base nesse mapa atualizado, Scolari *et al.* (2021) reanalisaram os dados fenotípicos da mesma população ‘Latham’ × ‘Glen Moy’ e identificaram um novo QTL associado ao traço *crumbly*, confirmando simultaneamente os dois previamente relatados por Graham *et al.* (2015). Em paralelo, uma análise transcriptómica da mesma população revelou genes diferencialmente expressos dentro das regiões dos QTLs, relacionados com formação de pólen, alongação do tubo polínico e interação pólen-óvulo. Os marcadores moleculares localizados nessas regiões genómicas foram posteriormente investigados, abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias de controlo e possível erradicação da desordem.

Os marcadores SSR identificados por Graham *et al.* (2015) foram ERubLR_SQ05.3_D11AOC a 121 cM no LG1 e RUB256e a 101 cM no LG3.

Posteriormente, Scolari *et al.* (2021) identificaram Rub2a1 a 62,4 cM como o marcador SSR mais representativo dentro do locus cr_JHI_3–20 no LG3.

Relativamente aos marcadores SNP, Scolari *et al.* (2021), utilizando o mapa de ligação revisto, selecionaram regiões não codificantes (*gene tags*) s3407_p12510_R23 a 7,1 cM e s182_p91185_R6 a 106,4 cM, localizadas nos loci cr_JHI_1–15 no LG1 e cr_JHI_3–15 no LG3, respetivamente. Além disso, três regiões codificantes foram selecionadas: MOY_34151 no LG1 e MOY_36258 e MOY_35728 no LG3.

Embora os marcadores moleculares associados a regiões genómicas ligadas ao *crumbly* já tenham sido descritos por Scolari *et al.* (2021), a sua aplicabilidade e transferibilidade entre diferentes cultivares de framboesa ainda requerem investigação e validação adicionais.

Neste ensaio, avaliou-se a transferibilidade dos marcadores SSR e SNP previamente identificados, aplicando-os a uma população de framboesiras distinta daquela em que foram originalmente estudados.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram selecionadas 34 cultivares de *R. idaeus* da coleção de germoplasma do Programa de Melhoramento do INIAV/Beirabaga (Polo de Inovação da Fataca, Odemira, 37°34'56''N; 8°44'28''W) para o estudo de marcadores moleculares dos tipos SNP e SSR associados ao fenótipo *crumbly fruit*. A lista de acessos incluiu cultivares comerciais e não comerciais, bem como tipos de frutificação remontante e não remontante. Cada cultivar representa uma linha de plantas geneticamente idênticas, propagadas vegetativamente; assim, foi utilizada uma planta representativa por acesso para extração de DNA e genotipagem. Três folhas totalmente expandidas foram colhidas de cada clone e conservadas a –80 °C até à extração do DNA. Para a fenotipagem, foram recolhidos entre 10 a 20 frutos por genótipo para a análise de sintomas.

Fenotipagem

Para a fenotipagem, recorreu-se a análise morfológica da estrutura interna dos frutos, com uma lupa estereoscópica Leica MZ8 (Leica Microsystems, Alemanha). As amostras foram fotografadas para documentar a homogeneidade das drupéolas e a presença de tricomas entre elas, auxiliando na distinção entre frutos normais e *crumbly* (fig.1)

Extração de DNA e controlo de qualidade

O material vegetal foi moído num almofariz com azoto líquido. Aproximadamente 100 mg do pó obtido foram utilizados para extração de DNA por colunas, com o kit DNeasy Plant Mini Kit (ID: 69104, Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada num espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

Marcadores SSR e SNP

Para analisar as regiões genómicas associadas a marcadores moleculares SSR previamente descritos na literatura como associados ao fenótipo *crumbly* em *R. idaeus* (Graham *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2013; Scolari, 2020), foram adquiridos à STABVida (Caparica, Portugal) os *primers* flanqueadores presentes na literatura.

Em todas as cultivares, cada região foi amplificada por PCR em reações de 25 µL, utilizando o Qiagen Multiplex Kit (Ref. 206143, Qiagen, Alemanha), 5 µM de albumina

de soro bovino (BSA, Invitrogen, REF. 2614G1, EUA), 0,2 μM de cada *primer* e aproximadamente 100 ng de DNA molde.

Os PCR consistiram em ciclos térmicos de desnaturação e ativação enzimática inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguidas de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 segundos, *annealing* a 59 °C durante 90 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto. Foi realizada uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

O sucesso da amplificação por PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose (2%, 150V, 30 min).

A presença de SSR foi analisada por eletroforese capilar conforme descrito em Brás de Oliveira *et al.* (2024).

Marcadores SNP

Para analisar as regiões genómicas associadas a marcadores moleculares do tipo SNP correlacionados com o fenótipo *crumbly* em *R. idaeus* (Scolari *et al.*, 2021; Scolari, 2020), foram adquiridos à STABVida (Caparica, Portugal) os *primers* flanqueadores descritos em Scolari (2020).

Com o objetivo de identificar novos SNPs, foram ainda desenhados *primers* para amplificar regiões adjacentes às originalmente descritas. Para isso, utilizaram-se dados genómicos públicos de cultivares de *R. idaeus* ('Anitra', 'Autumn Bliss', 'Maling Jewel' e 'JoanJ'; <https://www.rosaceae.org/species/rubus/all>). Obtiveram-se sequências de cerca de 2000 pb abrangendo as regiões analisadas por Scolari (2020), nas quais se desenharam *primers* para amplificação de fragmentos não sobrepostos com os originais, utilizando o Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Priorizaram-se regiões contendo *Open Reading Frames* (ORFs), previamente identificadas com o ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) com parâmetros padrões.

Todos os *primers* foram testados no Primer-BLAST e comparados com genomas publicados de *R. idaeus* para verificar a especificidade da amplificação.

Cada amostra foi amplificada em reações de PCR de 25 μL , utilizando 5 μM de *Readymix* (FastGene, NIPPON Genetics Europe, LS29), 0,5 μM de cada *primer* e aproximadamente 100 ng de DNA, utilizando um ciclo térmico constituído por desnaturação e ativação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, *annealing* à temperatura específica de cada *primer* durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto. Foi efetuada uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

O sucesso das reações de PCR foi verificado por eletroforese em gel como indicado anteriormente. Os produtos de PCR foram purificados com Illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) antes de enviados para sequenciação Sanger nos dois sentidos na STABVida (Caparica, Portugal).

Análise estatística

A distribuição das amostras com base na presença dos marcadores moleculares em estudo e inferir possíveis relações entre elas, foi estudada com recurso a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando o GenAlEx (v6.501).

Resultados e Discussão

Análise dos marcadores SNP

A análise da relação entre os marcadores do tipo SNP e a prevalência do fenótipo *crumbly* em *R. idaeus* foi feita por amplificação e sequenciação de regiões genómicas previamente associadas ao fenótipo em Scolari (2020; *et al.*, 2021). A comparação das

sequências obtidas permitiu a identificação de SNPs que não coincidiram com as posições descritas pelo autor. Foram observadas substituições em regiões circundantes às descritas originalmente, sugerindo a ocorrência de polimorfismos distintos, possivelmente específicos das cultivares analisadas neste trabalho.

Uma vez que Scolari (2020; *et al.*, 2021) utilizou unicamente populações derivadas do cruzamento ‘Latham’ × ‘Glen Moy’, o presente estudo incluiu cultivares de origens genéticas diversas pertencentes à coleção de germoplasma do programa de melhoramento do INIAV/Beirabaga, hipotetiza-se que a diferença de ocorrência de SNPs pode refletir a variabilidade genética das populações estudadas.

Apesar dessas variações, foi possível identificar polimorfismos com padrão de distribuição consistente entre indivíduos afetados e não afetados, sugerindo uma possível relação entre certos SNPs e a expressão do *crumbly* (fig. 2).

Análise dos marcadores SSR

Para os marcadores do tipo *Simple Sequence Repeat* (SSR), também foram observadas diferenças em relação aos alelos previamente descritos (Graham *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2013; Scolari, 2020). As bandas amplificadas não apresentaram o mesmo perfil eletroforético das populações descritas por estes autores, indicando a existência de novos alelos.

Foi possível confirmar a partilha e transmissão de alguns alelos SSR entre indivíduos pertencentes à mesma família (fig. 3), confirmando a sua heritabilidade e estabilidade na geração subsequente. Essa consistência sugere que tais marcadores têm potencial para serem utilizados em estudos de associação genética, mesmo que as variantes observadas não sejam idênticas às previamente relatadas.

Apesar dessas variações, assim como os SNPs, foi possível identificar diferentes alelos entre indivíduos de fenótipo *crumbly* contrastante, sugerindo uma possível relação entre certos SSRs e a expressão do *crumbly* (fig. 4).

Conclusões

Neste estudo verificou-se que os marcadores moleculares SSR e SNP descritos como associados ao fenótipo *crumbly* em *R. idaeus* em estudos prévios, não apareceram no painel de genótipos estudados e por isso não podem ser considerados universais para a espécie.

As diferenças detetadas nas posições dos SNPs e nos perfis alélicos dos SSRs sugerem a existência de polimorfismos específicos das cultivares avaliadas, refletindo a diversidade genética presente na espécie.

Apesar disso, foi possível identificar nas zonas genómicas analisadas alguns marcadores moleculares SNPs e SSRs cuja presença se correlacionou com a variação fenotípica observada (*crumby*-não *crumbly*), indicando que estas regiões podem estar associadas à manifestação do *crumbly*.

A análise dos SSRs evidenciou padrões de transmissão alélica consistentes entre indivíduos pertencentes à mesma família, o que confirma a sua herança mendeliana e sustenta o potencial destes marcadores para estudos de ligação genética. No entanto, a confirmação da correlação entre os marcadores identificados e o fenótipo *crumbly* requer a ampliação da amostragem e a inclusão de um número mais representativo de genótipos, todos rigorosamente caracterizados quanto à intensidade e frequência da desordem. A utilização de populações segregantes quanto ao fenótipo permitirá a validação estatística dessas associações e a identificação de *loci* de interesse com maior precisão.

Este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre a base genética da desordem *crumbly* em *R. idaeus*, fornecendo evidências da variação genética entre populações, de potencial utilidade para programas de melhoramento. A identificação e validação de novos marcadores associados ao fenótipo poderá, futuramente, apoiar o desenvolvimento de estratégias de seleção assistida por marcadores (MAS), favorecendo a identificação precoce de genótipos resistentes e a redução de perdas associadas à desintegração do fruto.

Referências Bibliográficas

- Brás de Oliveira, P., Varela, A. R., Nóbrega, F., *et al.* (2024). Assessment of genetic diversity and population structure of *Corema album* accessions from the Atlantic coastal dunes of Portugal. *Tropical Plant Research*, 14(4). <https://doi.org/10.1177/18785093241290056>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Gradziel, T. M. (2009). Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species. In *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1>
- Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., & Powell, W. (2004). The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 740–749. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1687-8>
- Graham, J., & Woodhead, M. (2009). Genetics and Genomics of Rosaceae. In K. M. Folta & S. E. Gardiner (Eds.), *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6>
- Graham, J., Smith, K., McCallum, S., Hedley, P. E., Cullen, D. W., Dolan, A., Milne, L., McNicol, J. W., & Hackett, C. A. (2015). Towards an understanding of the control of ‘crumbly’ fruit in red raspberry. *SpringerPlus*, 4(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1010-y>
- Hackett, C. A., Milne, L., Smith, K., Hedley, P., Morris, J., Simpson, C. G., Preedy, K., & Graham, J. (2018). Enhancement of Glen Moy x Latham raspberry linkage map using GbS to further understand control of developmental processes leading to fruit ripening. *BMC Genetics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0666-z>
- Kole, C. (2013). *Fruits and Nuts: Genome Mapping And Molecular Breeding In Plants* (Vol. 4). Springer.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Paterson, A., Kassim, A., McCallum, S., Woodhead, M., Smith, K., Zait, D., & Graham, J. (2013). Environmental and seasonal influences on red raspberry flavour volatiles and identification of quantitative trait loci (QTL) and candidate genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(1), 33–48. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1957>
- Quito-Avila, D. F., Lightle, D., & Martin, R. R. (2014). Effect of *Raspberry bushy dwarf virus*, *Raspberry leaf mottle virus*, and *Raspberry latent virus* on Plant Growth and Fruit Crumbliness in ‘Meeker’ Red Raspberry. *Plant Disease*, 98(2), 176–183. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0562-RE>
- Scolari, M. L. (2020). *Understanding the genetic and physiology controls of “crumbly” fruit in red raspberry (Rubus idaeus)* [Heriot Watt University]. <http://hdl.handle.net/10399/4284>

Scolari, L. M., Hancock, R. D., Hedley, P. E., Morris, J., Smith, K., & Graham, J. (2021). Combining QTL Mapping and Gene Expression Analysis to Elucidate the Genetic Control of ‘Crumbly’ Fruit in Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Agronomy*, 11(4), 794. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040794>

Quadros e Figuras

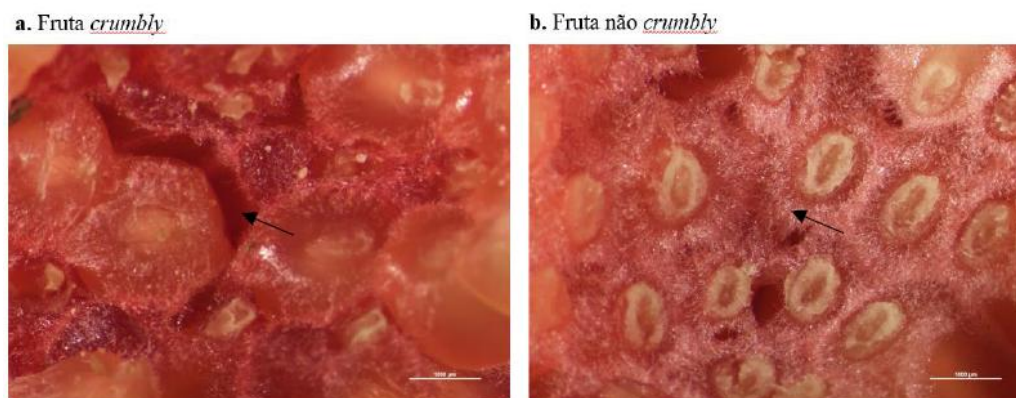


Figura 1 - Parte interna da framboesa, zona de ligação ao recetáculo, observada sob lupa. (a) Fruto com fenótipo *crumbly* (b) Fruto não *crumbly*. As setas indicam drupéolas com pelos internos que contribuem para a coesão e estrutura regular do fruto, presentes no fruto sem *crumbly* e ausentes no fruto *crumbly*.

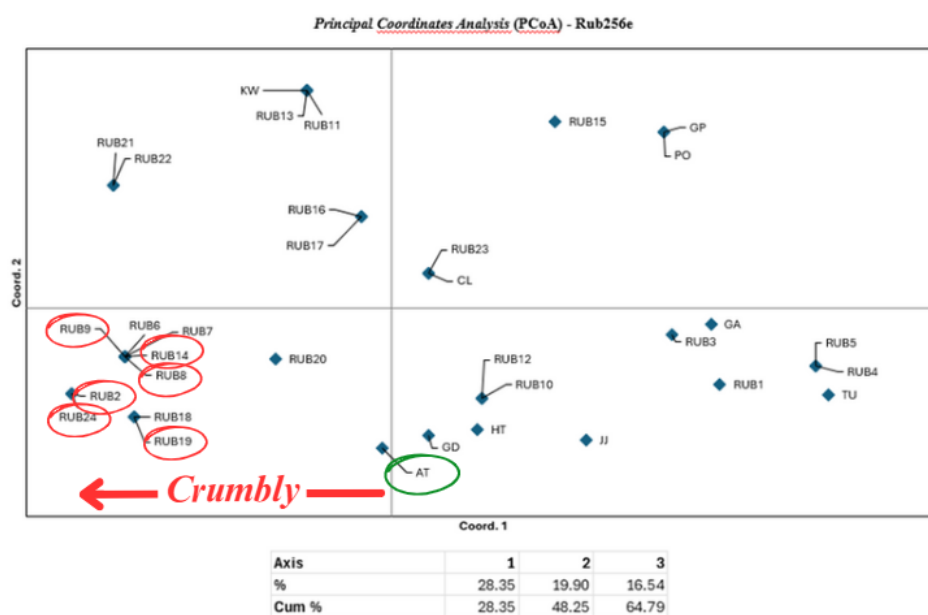


Figura 2 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os marcadores molecular SSR na região Rub256e descrita por Scolari (2020).

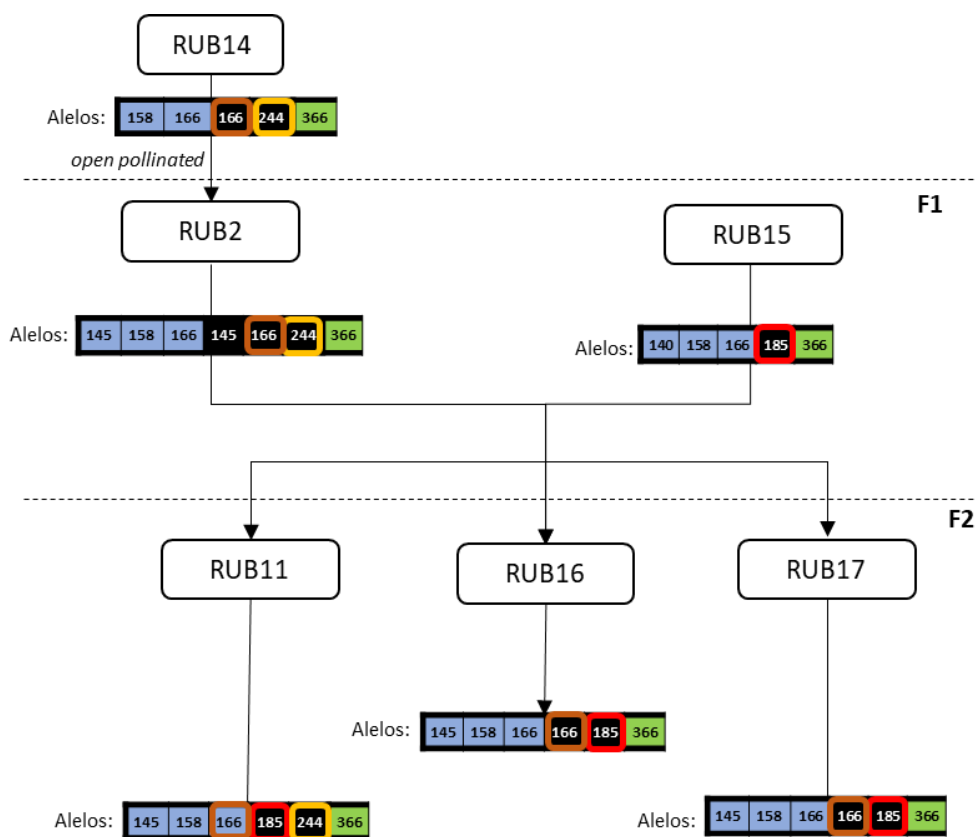


Figura 3 - Herança de alelos identificados por análise de SSR. Os alelos estão representados pelas cores: azul (região Rub2a), preto (região Rub256e) e verde (região D11AOC). Os alelos 166, 244 e 185 (laranja, amarelo, vermelho, respetivamente) mostraram ser transmissíveis à descendência.

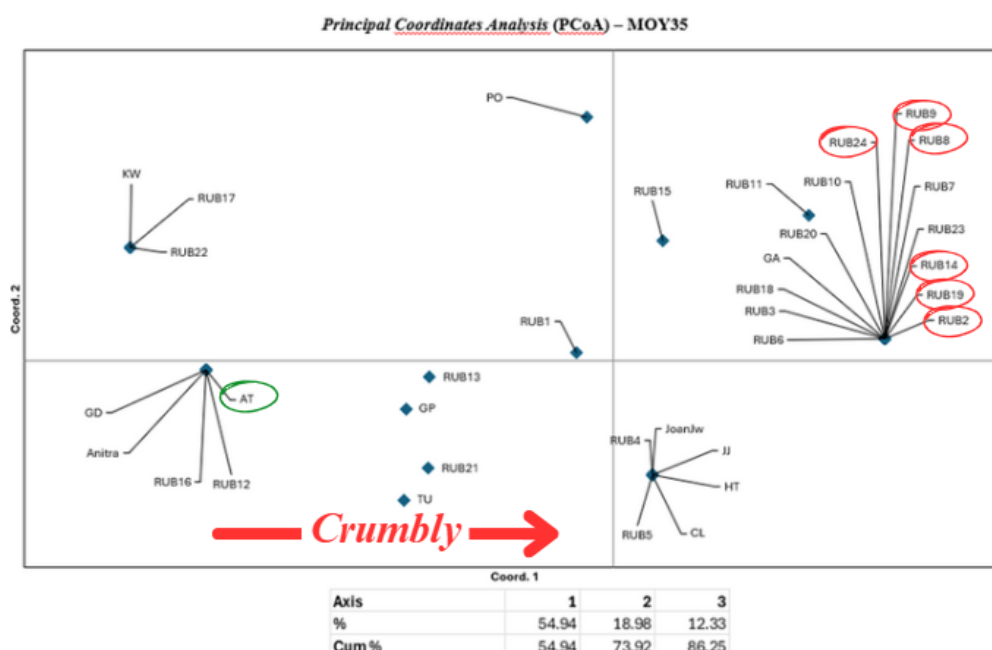


Figura 4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para a presença/ausência dos marcadores moleculares SNP na região MOY35 descrita por Scolari (2020).

O impacto da micropropagação e da micorrização na sustentabilidade de *Arbutus unedo*

Andreia Afonso, Ana Catarina Ribeiro, Fátima Oliveira

Deifil Technology Lda., Rua do Talho 80 – Serzedelo, 4830-704 Póvoa de Lanhoso.

Resumo

Arbutus unedo L. (*A. unedo*), vulgarmente designado de medronheiro, é um arbusto frutífero e ornamental, cuja resiliência é uma das características de maior destaque. O crescente interesse nesta cultura tem incentivado estudos para a seleção das plantas mais promissoras nas diferentes regiões da Península Ibérica, e consequentemente o desenvolvimento de protocolos de cultura *in vitro*, que asseguram a conservação de génotipos de interesse e a qualidade fitossanitária. Face às alterações climáticas, torna-se essencial complementar estas abordagens com estratégias naturais, como a micorrização, que contribuem para aumentar a resiliência das plantas, e assim, mitigar os impactos negativos na produtividade dos pomares. Neste âmbito, a Deifil, desenvolveu novas técnicas que combinam micropropagação e micorrização, para produzir os melhores clones e reduzir o stresse de plantação em campo.

Desde 2014, foi recolhido material vegetal de 29 plantas-mãe de 9 regiões distintas da Península Ibérica. O desenvolvimento de um protocolo de micropropagação eficaz permitiu, até ao momento, a produção e comercialização em larga escala de 11 génotipos. No seguimento deste trabalho, um génotipo de *Arbutus unedo* foi inoculado com micélio de *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*. Após 1, 2 e 3 meses da inoculação, avaliou-se a sobrevivência, taxa de micorrização, crescimento da parte aérea e desenvolvimento radicular. Nos ensaios com *Boletus edulis* e *Paxillus involutus* observou-se maior percentagem de sobrevivência, maior tamanho do caule e raízes mais alongadas, enquanto que *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* induziram uma maior taxa de micorrização. A associação micorrízica foi conseguida para todas as espécies de fungos testadas e foram observados, de uma forma geral, efeitos positivos.

Estes resultados, para além de demonstrarem o potencial da micropropagação e da micorrização na sustentabilidade, rentabilidade e conservação da cultura do medronheiro, resultaram também num produto micorrízico adaptado às suas necessidades.

Palavra-chave: Biotecnologia, cultura *in vitro*, micélio, pequenos frutos, resiliência.

Abstract

Arbutus unedo L. (*A. unedo*), commonly known as the strawberry tree, is a fruit and ornamental crop whose resilience is one of its most notable characteristics. The growing interest in this crop has encouraged studies aimed at selecting the most promising plants in different regions of the Iberian Peninsula, and consequently, the development of *in vitro* culture protocols that ensure the conservation of genotypes of interest and phytosanitary quality.

In the face of climate change, it is essential to complement these approaches with natural strategies, such as mycorrhization, which contribute to increasing plant resilience

and mitigate negative impacts on orchard productivity. In this context, Deifil has developed new techniques that combine micropropagation and mycorrhization to produce higher quality clones and reduce planting stress in the field.

Since 2014, plant material has been collected from 29 mother plants from nine regions of the Iberian Peninsula. The development of an effective micropropagation protocol has, to date, enabled the large-scale production and commercialization of 11 genotypes. Following this work, an *Arbutus unedo* genotype was inoculated with mycelium from *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Pisolithus arhizus* and *Paxillus involutus*. After 1, 2, and 3 months of inoculation, survival, mycorrhization rate, shoot growth, and root development were evaluated. In the trials with *Boletus edulis* and *Paxillus involutus*, a higher survival rate, larger stem size, and more elongated roots were observed, while *Paxillus involutus* and *Pisolithus arhizus* induced a higher mycorrhization rate. The mycorrhizal association was achieved for all fungal species tested, and positive effects were generally observed. These results, in addition to demonstrating the potential of micropropagation and mycorrhization in the sustainability, profitability and conservation of strawberry tree crops, also resulted in a mycorrhizal product adapted to their needs.

Keywords: Biotechnology, *in vitro* cultivation, mycelium, small fruits, resilience.

Introdução

Arbutus unedo L. (*A. unedo*), é uma espécie arbustiva de elevado valor frutícola e ornamental. Os seus frutos são amplamente utilizados na produção de compotas e, sobretudo, de aguardente, constituindo um importante recurso económico em várias regiões de Portugal, em particular no Algarve, onde representa a quarta espécie mais relevante no setor agrícola. Apesar do seu potencial, a produção nacional de medronho permanece limitada, com valores anuais médios entre 500 e 700 toneladas, para cerca de 500 ha de área de plantação, grande parte ainda em fase não produtiva (Fernandes, 2019). A resiliência do medronheiro, associada à sua rápida regeneração após incêndios, ao contributo para a conservação da fauna, à prevenção da erosão dos solos e ao potencial ornamental, confere-lhe um papel relevante tanto do ponto de vista ambiental como socioeconómico. No entanto, o setor enfrenta diversos constrangimentos: escassez de informação técnica e científica acessível aos produtores, fraca qualidade das plantas, insuficiência de plantas disponíveis para instalação de pomares e reduzida oferta de fruto fresco para o mercado alimentar. Aliado a estas problemáticas, acresce os diversos efeitos das alterações climáticas.

Neste contexto, surge a necessidade de investir em soluções inovadoras que permitam ultrapassar estas limitações. A micropropagação apresenta-se como uma ferramenta promissora, assegurando a produção de plantas com qualidade fitossanitária, bem como, a conservação de características e de génotipos de interesse. Por sua vez, a micorrização consiste no estabelecimento de associações mutualísticas, altamente evoluídas, entre fungos do solo e raízes das plantas (Martins, 1997). Estas são consideradas os órgãos envolvidos na absorção de nutrientes da maioria das plantas terrestres (Harley e Harley, 1987; Buscot et al., 2000). Através da sua extensa rede de hifas, os fungos micorrízicos facilitam o acesso a nutrientes e elementos essenciais para o crescimento das plantas (Vasilikiotis et al., 2020), ajudando na captação de água em condições de escassez hídrica e na mitigação da toxicidade em solos contaminados por metais pesados (Sarra Ouledali et al., 2018), na melhoria da tolerância à salinidade e no

controlo de pragas e doenças (Hassena et al., 2021). Deste modo, a micorrização contribui para minimizar os impactos negativos que as alterações climáticas têm na produtividade dos pomares (Gomes et al., 2013; Molina & Trappe, 1982). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo a seleção, recolha e estabelecimento *in vitro* de material vegetal de *A. unedo* proveniente de regiões distintas da Península Ibérica, privilegiando os génotipos com melhores características agronómicas e adaptativas. Paralelamente, considerando o papel das micorrizas na adaptação das plantas a condições de stresse, foi estudada a micorrização *in vitro* de *A. unedo* com diferentes espécies de fungos micorrízicos, nomeadamente *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*. Algumas destas espécies estão descritas na bibliografia como estabelecendo associação simbiótica com o medronheiro e, simultaneamente, foram selecionadas tendo em consideração as espécies disponíveis na micoteca da Deifil e a experiência interna.

Material e Métodos

O trabalho iniciou-se com a seleção e recolha de material vegetal de *A. unedo*. Para tal, foram realizadas várias recolhas em 10 regiões distintas da Península Ibérica, nomeadamente Pontevedra, Gerês, Amieiros, Pampilhosa da Serra, Alcobaça, Portel, Odemira, Ourique, Silves e Tavira. No total, foram selecionadas 29 plantas-mãe. A seleção das plantas-mãe focou-se essencialmente no potencial frutícola, e teve como critérios agronómicos a produtividade, calibre e forma do fruto e época de frutificação. Paralelamente, foram também selecionadas plantas-mãe com interesse ornamental, neste caso com base no porte arbustivo. Após otimização dos protocolos de micropropagação, isto é, da otimização do meio de cultura, e conseqüentemente da produção em larga escala de *A. unedo*, foi possível introduzir plantas no mercado com garantia de qualidade genética e fitossanitária, contribuindo simultaneamente para a conservação de material vegetal de interesse. Posteriormente, após a obtenção das plantas e com o objetivo de promover a sustentabilidade nos pomares, foram aplicadas técnicas modernas de biotecnologia, como a micorrização, para o desenvolvimento de novos ensaios. Neste ensaio, utilizaram-se 4 espécies de fungos micorrízicos, nomeadamente *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*. Estas espécies foram previamente recolhidas de sotos, montados, pinhais, etc e isolados internamente *in vitro*, fazendo atualmente parte da micoteca da Deifil. Os fragmentos de micélio foram inoculados em placas de *Petri* contendo meio de cultura de enraizamento específico para *A. unedo* e, em seguida, foram introduzidas plântulas de medronheiro da fase II da micropropagação *in vitro* - enraizamento. O ensaio foi realizado com 25 réplicas por condição, e como controlo, mantiveram-se placas com plântulas sem inóculo, nas mesmas condições de crescimento. Ao longo do tempo, após 1, 2 e 3 meses da inoculação, avaliou-se a parte aérea e radicular da planta, bem como a taxa de micorrização. Relativamente à parte aérea, registou-se o comprimento do caule, número e cor das folhas em função do momento inicial (T0). Por sua vez, a taxa de micorrização foi determinada pela proporção de raízes micorrizadas relativamente ao número total de raízes.

Resultados e Discussão

Com o objetivo de garantir a conservação de génotipos de interesse, desde 2014, recolheu-se material vegetal de 29 plantas-mãe de 10 regiões distintas da Península Ibérica (fig. 1). Após introdução do material *in vitro*, procedeu-se ao desenvolvimento de um protocolo de micropropagação eficaz que permitiu, até ao momento, a produção e comercialização em larga escala de 11 génotipos. Os restantes génotipos encontram-se na

fase de multiplicação *in vitro* com a finalidade de aumentar as quantidades e posteriormente, os introduzir no mercado. No entanto, tal como referido anteriormente, para além da produção e comercialização de plantas com qualidade fitossanitária, torna-se igualmente relevante explorar estratégias complementares e naturais, como a micorrização, capaz de aumentar a sua resiliência em campo e assim mitigar os problemas de produtividade nos pomares.

Assim, focando nestes aspetos, plantas de um genótipo de *A. unedo* foram inoculadas com fragmentos de micélio de *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*. A avaliação foi realizada aos 1, 2 e 3 meses após a inoculação, considerando o desenvolvimento da parte aérea e radicular, a taxa de micorrização e a percentagem de sobrevivência. Relativamente ao comprimento do caule (Figura 2a), não se observaram diferenças significativas na condição controlo ao longo do tempo, nem nas plantas inoculadas com *Lactarius deliciosus* e *Pisolithus arhizus*. A ausência de crescimento da parte aérea pode ser explicada pelas características destes fungos, uma vez que tendem a influenciar predominantemente o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes, sem promover obrigatoriamente o alongamento do caule a curto prazo, conforme descrito por Smith & Read (2010). Por sua vez, o efeito benéfico da presença do fungo foi evidente na micorrização com *Boletus edulis* e *Paxillus involutus*, dado que estas espécies promoverem um crescimento bastante significativo da parte aérea. Estas espécies estão descritas por desempenharem um papel na produção de hormonas que favorecem o desenvolvimento do caule, e na mobilização de nutrientes para a planta, como já observado em estudos reportados na bibliografia (Molina & Trappe, 1982; Gomes et al., 2013).

Em relação ao desenvolvimento da parte radicular (Figura 2b), destaca-se a inoculação com *Boletus edulis*, *Paxillus involutus*, e *Lactarius deliciosus*, uma vez que promoveu um aumento do comprimento da raiz a partir dos 2 meses. Para estas espécies, observou-se o aparecimento e desenvolvimento mais rápido da parte radicular comparativamente ao controlo (fig. 3). Esta observação corrobora com o anteriormente referido, isto é, *Lactarius deliciosus* tende a influenciar predominantemente o desenvolvimento radicular. Adicionalmente, verificou-se que o número de folhas (dados não apresentados) manteve-se semelhante em todas as condições, sem diferenças significativas entre plantas inoculadas com fungo e o controlo.

Estes resultados poderão indicar que os efeitos da micorrização sobre a produção foliar podem ser mais lentos não se refletindo neste período experimental inicial, mas sim quando a planta estiver mais desenvolvida.

Para além dos resultados obtidos, ainda se procedeu à avaliação da cor das plantas ao longo do tempo, com base numa escala desenvolvida internamente de 0 a 100%, em que 0% correspondia a coloração verde e 100% a uma coloração completamente avermelhada (fig. 4). De modo geral, a intensidade da coloração avermelhada foi maior nas plantas inoculadas com fungos micorrízicos, sendo predominante na presença de *Pisolithus arhizus* (fig. 5). Pretende-se posteriormente avaliar se existe alguma relação entre a coloração e os compostos fenólicos.

Por fim, a observação microscópica confirmou a presença de estruturas micorrízicas em todas as espécies de fungos testadas (fig. 6). Estes resultados corroboram com o referido na literatura, nomeadamente, Gomes et al. (2013) que descreveram a formação de micorrizas entre *Pisolithus arhizus* e *A. unedo*, enquanto Molina & Trappe (1982) relataram micorrização de *Pisolithus tinctorius* em *Arbutus menziesii*, evidenciando que espécies do género *Pisolithus* estabelecem associações simbióticas com plantas de *Arbutus*. Adicionalmente, Molina & Trappe (1982) observaram associações

simbióticas de *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* e *Paxillus involutus* com *Arbutus menziesii*, corroborando a capacidade destas espécies fúngicas se associarem às raízes das plantas de *Arbutus* sp.

Conclusões

Foi realizado um ensaio de micorrização *in vitro* em *A. unedo* utilizando isolados de 4 espécies de fungos micorrizicos, descritas pela sua capacidade de estabelecer associações simbióticas: *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*. O ensaio foi seguido por 3 meses, ao longo do qual se monitorizaram os parâmetros comprimento do caule, número e cor das folhas em função do momento inicial (T0), bem como, a taxa de micorrização foi determinada pela proporção de raízes micorrizadas relativamente ao número total de raízes.

Em suma, os fungos *Boletus edulis* e *Paxillus involutus* induzem um melhor desenvolvimento das plantas e garantem o enraizamento total de todas as plantas ao segundo mês, enquanto que a inoculação com *Lactarius deliciosus* e *Pisolithus arhizus* estimulou um enraizamento mais rápido na fase inicial. A inoculação com os fungos primários, nomeadamente *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* resultou numa maior percentagem de plântulas micorrizadas.

Estes ensaios prosseguiram para a fase de aclimatização, evidenciando que a formação de micorriza, seja *in vitro*, é fundamental para aumentar a sobrevivência das plantas em condições *ex vitro*. Além deste ensaio, foram realizados outros ensaios em condições *ex vitro*, evidenciando também que a micorrização na fase de envasamento ajuda na sobrevivência das plantas. Estes resultados são promissores em relação ao impacto da micorrização no vigor, desenvolvimento, resiliência e adaptação da planta, apresentando-se como uma estratégia para aumentar a resistência das plantas a condições climáticas extremas. Por este motivo, as plantas de medronheiro comercializadas pela Deifil encontram-se previamente micorrizadas e acrescenta-se ainda que como resultado de todo o trabalho desenvolvido, a Deifil lançou para o mercado um produto micorrízico para medronheiro que se encontra disponível em duas gamas, nomeadamente, gama *first* composta por espécies de fungos pioneiros e indicado para culturas jovens e a gama *advanced*, constituída por espécies tardias, e indicada para plantas com mais de 3 anos após plantação.

Referências Bibliográficas

- Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset J.Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 24: 601–614
- Fernandes, F. S. (2019). Plantações de medronho chegam aos 500 hectares. Portugal pode tornar-se o primeiro produtor mundial. *ECO*.
- Gomes, et al. (2013). Mycorrhizal Synthesis between *Pisolithus arhizus* and Adult Clones of *Arbutus unedo* in vitro and in nursery
- Harley, J.L., Harley, E.L. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol* 105: 1–102
- Hassena, A., Ben, Zouari, M., Trabelsi, L., Decou, R., Amar, F., Ben, Chaari, A., Soua, N., Labrousse, P., Khabou, W., & Zouari, N. (2021). Potential effects of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the salinity of treated wastewater in young olive plants (*Olea europaea* L. cv. Chetoui). *Agricultural Water Management*, 245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106635>

- Martins, A. (1997) Micorrização *in vitro* de plantas micropropagadas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill), Instituto Politécnico de Bragança.
- Molina & Trappe (1982). Lack of Mycorrhizal Specificity by the Ericaceous Hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*.
- Ouledali, Sarra., Ennajeh, M., Zrig, A., Gianinazzi, S., & Khemira, H. (2018). Estimating the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to drought tolerance of potted olive trees (*Olea europaea*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(5). <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2656-1>
- Smith & Read (2010). *Mycorrhizal Symbiosis* (3ª edição)
- Vasilikiotis, C., Li, M., Schmidt, J. E., Azimi, A., Garcia, J., Volder, A., Lampinen, B., & Gaudin, A. C. M. (2020). Orchard management practices affect arbuscular mycorrhizal fungal root colonisation of almond. *Biological Agriculture and Horticulture*, 36(4), 230–248. <https://doi.org/10.1080/01448765.2020.1802777>

Quadros e Figuras



Figura 1 - Identificação das regiões da Península Ibérica onde se realizou a recolha de material vegetal de *Arbutus unedo* para a micropropagação.

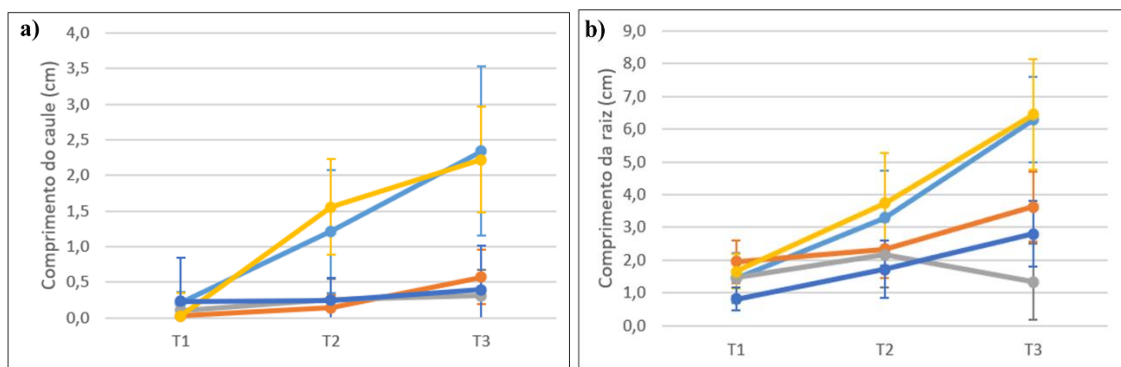


Figura 2 - Efeito da micorrização *in vitro* com *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* no comprimento da parte aérea (a) e comprimento da raiz (b). A linha azul escura (---) representa a condição controlo, azul claro (---) representa *Boletus edulis*, laranja (---) *Lactarius deliciosus*, a cor cinzento (---) representa *Pisolithus arhizus* e por fim, amarelo (---) representa *Paxillus involutus*. Os resultados são expressos como média \pm EP ($n \geq 20$).

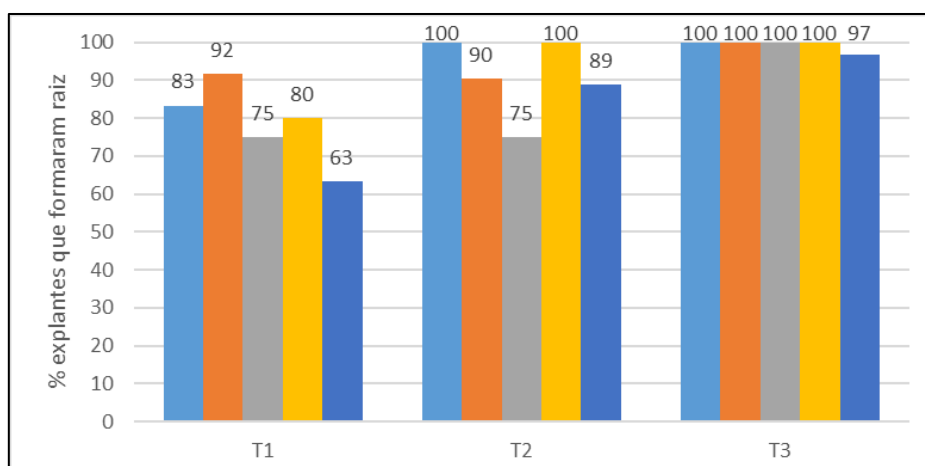


Figura 3 - Efeito da micorrização *in vitro* com *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* no aparecimento e desenvolvimento radicular, ao longo dos 3 meses de ensaio. A linha azul escura (---) representa a condição controlo, azul claro (---) representa *Boletus edulis*, laranja (---) *Lactarius deliciosus*, a cor cinzenta (---) representa *Pisolithus arhizus* e por fim, amarelo (---) representa *Paxillus involutus*.

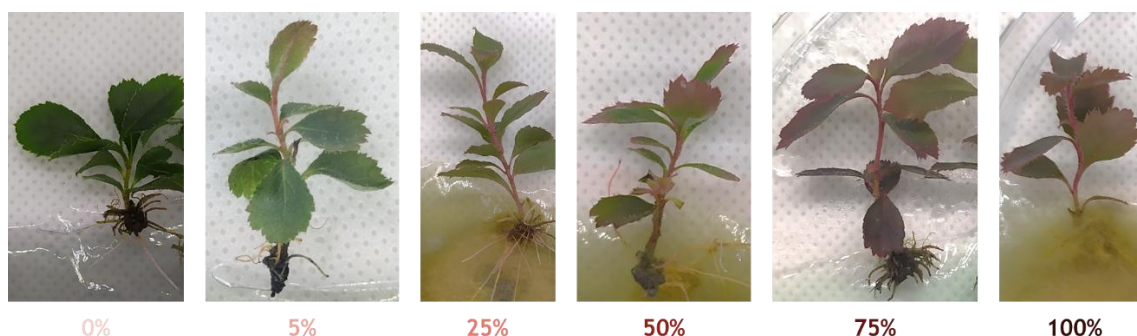


Figura 4 - Escala de coloração para avaliação do efeito da micorrização nas plantas de medronheiro.

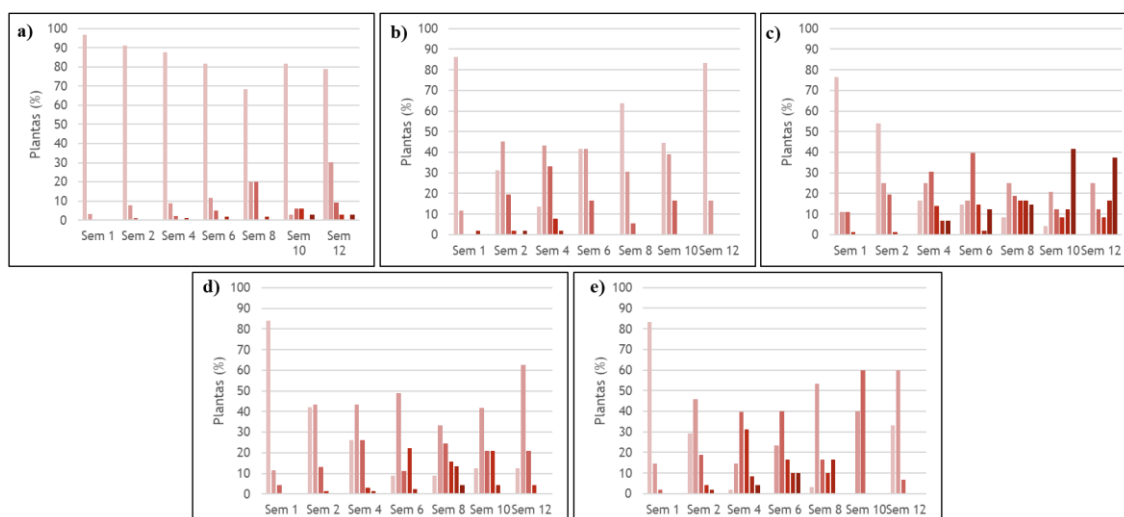


Figura 5 - Avaliação da coloração das plantas ao longo dos 3 meses de ensaio, em que (a) representa a condição controlo, (b) *Paxillus involutus*, (c) *Pisolithus arhizus*, (d) *Lactarius deliciosus* e (e) *Boletus edulis*. A escala de coloração corresponde à indicada na Figura 4.

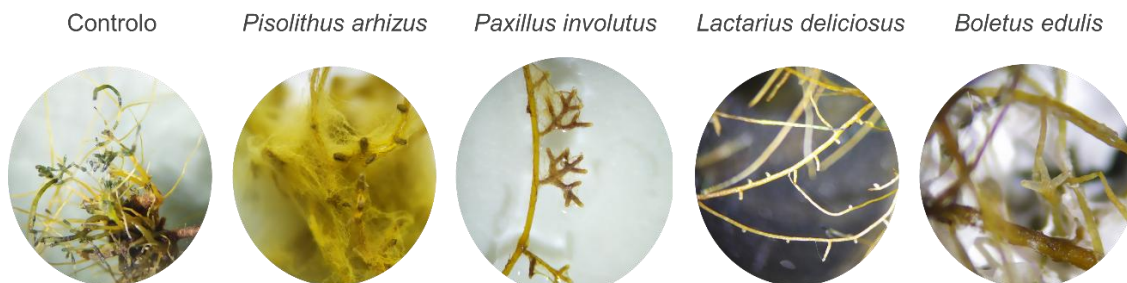


Figura 6 - Evidência da presença de estruturas micorrízicas para todas as condições inoculadas com as espécies fúngicas, como resultado da associação simbiótica entre fungo e a planta *Arbutus unedo*.

Produção de framboesas sob painéis fotovoltaicos: contributo para a transição agroenergética em Portugal

Alexandre Penicheiro¹, Raquel Martins^{1,2}, Ana Néri³, Anabela M. Ramos⁴, Cristina Galhano³, Helena Coimbra³, Miguel Valério³, Daniela Santos³, Filomena Miguéns³, Manuel Nunes³, Luís Coelho³, Rui Amaro³, Marta Lopes^{2,3}

¹Instituto Politécnico de Coimbra, Instituto de Investigação Aplicada, Rua da Misericórdia, Lagar dos Cortiços – S. Martinho do Bispo, 3045-093 Coimbra;

²INESC Coimbra - Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores de Coimbra, Pólo II, R. Sílvio Lima, 3030-290 Coimbra;

³Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3045-601 Coimbra;

⁴Instituto Politécnico da Guarda, Av. Dr. Francisco de Sá Carneiros, 50 6300-559 Guarda.

Resumo

A crescente necessidade de soluções agrícolas resilientes e sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrovoltáicos, capazes de integrar produção agrícola e geração de energia no mesmo espaço. Esta abordagem contribui para a sustentabilidade do uso do solo, a adaptação às alterações climáticas e a transição energética. As framboesas vermelhas (*Rubus idaeus* L.), amplamente cultivadas em zonas temperadas do hemisfério norte, apresentam características que as tornam particularmente adequadas a sistemas com sombreamento parcial, como os agrovoltáicos.

No âmbito do projeto AgriFLEX (PRR-C05-i03-I-000214), foi implementado um sistema agrovoltáico piloto na área de produção agrícola biológica da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra (ESAC-IPC). A estrutura consiste numa cobertura em capela instalada sobre solo agrícola, com duas linhas paralelas de framboeseiras. Cada linha está dividida em duas metades de 10 metros: a primeira metade é coberta por 20 painéis fotovoltaicos bifaciais semitransparentes (40% de transparência), com uma potência total instalada de 6,2 kWp, e a segunda por rede de sombreamento (cenário tradicional). Este sistema visa avaliar o impacto da integração fotovoltaica na produção de framboesa em modo biológico.

De forma geral, os resultados preliminares indicaram que a produção total de framboesas foi semelhante nos dois sistemas. Contudo, os frutos obtidos sob os painéis fotovoltaicos apresentaram maior volume e formato mais alongado do que os produzidos sob rede de ensombramento, sugerindo um efeito positivo da cobertura fotovoltaica em certos atributos de qualidade.

Palavras-chave: Agrovoltáicos; agricultura biológica; pequenos frutos; produtividade agrícola; qualidade do fruto.

Abstract

The growing need for resilient and sustainable agricultural solutions has driven the development of agrivoltaic systems, which integrate agricultural production and energy generation within the same area. This approach contributes to sustainable land use, climate change adaptation, and the energy transition. Red raspberries (*Rubus idaeus* L.), widely cultivated in temperate regions of the Northern Hemisphere, present characteristics that make them particularly suitable for partially shaded systems such as agrivoltaics.

Within the scope of the AgriFLEX project (PRR-C05-i03-I-000214), a pilot agrivoltaic system was implemented at the organic farming area of the Coimbra Agriculture School of the Polytechnic Institute of Coimbra (ESAC-IPC). The structure consists of a chapel-shaped cover installed over agricultural soil, with two parallel rows of raspberry plants. Each row is divided into two 10 m halves: one covered by 20 bifacial semitransparent photovoltaic panels (40% transparency), with a total installed capacity of 6.2 kWp, and the other by shading net (traditional scenario). The aim of this system is to evaluate the impact of photovoltaic integration on organic raspberry production.

Overall, preliminary results indicated that total raspberry yield was similar in the two systems. However, fruits grown under photovoltaic panels were larger in volume and more elongated than those produced under shading net, suggesting a positive effect of photovoltaic coverage on specific fruit quality attributes.

Keywords: Agrivoltaics; organic farming; small fruits; crop productivity; fruit quality.

Introdução

A crescente necessidade de promover sistemas agrícolas resilientes e ambientalmente sustentáveis tem conduzido à procura de estratégias inovadoras que conciliem a produção alimentar com a mitigação das alterações climáticas. Entre estas estratégias destacam-se os sistemas agrovoltaicos, que integram a produção agrícola e a geração de energia renovável num mesmo espaço, constituindo uma abordagem com elevado potencial para contribuir para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), nomeadamente o ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), o ODS 7 (Energia Limpa e Acessível) e o ODS 13 (Ação Climática) (United Nations, 2015).

O uso simultâneo de terrenos agrícolas para a produção de culturas e geração de energia fotovoltaica é viabilizado por estruturas que permitem preservar a atividade agrícola e manter a possibilidade de operações mecanizadas, assegurando a multifuncionalidade do espaço rural (Dupraz et al., 2011; Marrou, Guillioni, et al., 2013; Trommsdorff et al., 2022). Este conceito tem vindo a ganhar relevo na literatura científica e nas políticas de sustentabilidade, dado o seu contributo para a eficiência do uso do solo e para a resiliência dos sistemas de produção.

As framboesas vermelhas (*Rubus idaeus* L.) constituem uma cultura de elevado valor económico, amplamente cultivada em regiões temperadas do hemisfério norte, com destaque para a Europa e para a América do Norte (Oliveira, 2007). Esta espécie é caracterizada pela sua sensibilidade à radiação solar e às condições microclimáticas, sendo, por isso, considerada apropriada para cultivo em sistemas de sombreamento parcial, como os agrovoltaicos. Contudo, estudos prévios indicam que a interação entre coberturas fotovoltaicas e parâmetros do microclima, como temperatura, humidade do solo e disponibilidade de radiação, pode influenciar características fisiológicas e produtivas das culturas (Barron-Gafford et al., 2019; Valle et al., 2017).

Neste contexto, o presente estudo insere-se no âmbito do projeto AgriFLEX (PRR-C05-i03-I-000214) e tem como objetivo avaliar o impacto de um sistema agrovoltaico piloto sobre a produção de framboesa em modo biológico. Para tal, analisaram-se parâmetros fenológicos, produtivos, morfológicos e edafoclimáticos, comparando a produção sob painéis fotovoltaicos bifaciais semitransparentes e sob rede de ensombramento tradicional.

Materiais e Métodos

Descrição do sistema experimental

O ensaio piloto foi conduzido em framboeseiras gentilmente fornecidas por um dos parceiros do projeto, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), instaladas em maio de 2024, numa área experimental composta por duas linhas paralelas de plantas com 20 m de comprimento cada. O compasso de plantação foi de 0,25 m, garantindo densidade uniforme ao longo das linhas (fig. 1).

Cada linha foi subdividida em duas parcelas de 10 m, correspondendo aos dois sistemas de cobertura avaliados:

- **Rede de ensombramento (NET):** cobertura tradicional em rede, utilizada como sistema de referência.
- **Painéis fotovoltaicos (PV):** módulos bifaciais de vidro, com 40% de transparência, dispostos em estrutura elevada que permitiu a manutenção das operações culturais e mecanizadas. O conjunto instalado correspondeu a 24 módulos de 340 Wp cada, perfazendo uma potência total de 8,16 kWp.

Para a monitorização dos fatores edafoclimáticos, foram instalados dois piranómetros a 1,2 m da superfície do solo (um sob cada cobertura) e um terceiro a 5 m de altura, em zona descoberta, para registo da radiação de referência. Adicionalmente, recorreu-se a duas sondas de medição periódica e automática, colocadas a 30 cm de profundidade, para registo contínuo de temperatura, humidade e condutividade elétrica do solo em cada sistema.

O delineamento do ensaio permitiu a comparação direta dos efeitos das duas coberturas sobre o desenvolvimento da cultura e os parâmetros produtivos e fisiológicos, assegurando simultaneamente a avaliação das condições microclimáticas específicas de cada ambiente.

Recolha de dados

As colheitas foram realizadas de acordo com a disponibilidade de frutos maduros. Em cada data de colheita procederam-se a pesagens e contagens do total de frutos por planta dentro da área experimental. Para a caracterização morfológica, foi selecionado aleatoriamente um fruto por planta em cada colheita, no qual se mediram o comprimento e o diâmetro, permitindo posteriormente calcular parâmetros de calibre e forma.

Os dados recolhidos foram organizados em folhas de cálculo no Microsoft Excel e, posteriormente, tratados e analisados em ambiente estatístico utilizando o software RStudio, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

As variáveis edafoclimáticas apresentaram diferenças consistentes, mas relativamente pequenas, entre os dois sistemas de cobertura, durante o tempo em que foram monitorizadas, desde 1 de janeiro de 2025 até 1 de setembro de 2025. No sistema fotovoltaico (PV), registou-se um valor de energia radiativa total de 302,675 kW/h/m², tendo, sob rede de sombreamento (NET), sido registado um valor de 305,368 kW/h/m². Quando comparados com o valor de referência de 755,827kW/h/m², obtido através de medições de radiação incidente a 5 metros de altura sem sombreamento, compreende-se que a diferença entre os valores de ambos os sistemas são reduzidos. Esta atenuação luminosa coincidiu com uma diminuição de 6,34% da humidade relativa do solo, assim como um aumento de 3,4% da temperatura e de 11,51% da condutividade do solo no sistema PV em relação ao sistema NET, sugerindo que a cobertura PV influenciou de forma diferenciada o microclima da parcela (Tabela 1). Estes resultados podem estar

relacionados com o facto de os painéis fotovoltaicos gerarem uma recondução completa da água da chuva, ao contrário da cobertura com rede, assim como com a possível retenção de calor sob os painéis.

No que diz respeito ao ciclo fenológico das framboesas, não se observaram diferenças relevantes no abrolhamento, que ocorreu com pouca diferença temporal em ambos os sistemas: 11 de abril de 2025 em PV e 13 de abril de 2025 em NET. Contudo, a floração revelou um ligeiro desfasamento, tendo 50% das plantas em PV atingido este estado fenológico a 12 de maio e em NET a 16 de maio. No entanto, o surgimento dos primeiros frutos em NET coincidiu com o registo de 50% de floração, enquanto, em PV, só foi detetada frutificação no dia 30 do mesmo mês. Estes resultados apontam para uma influência do sombreamento diferenciado na fenologia da cultura, ainda que sem impactos expressivos no calendário global da colheita.

Em termos produtivos, no período estudado, até 1 de setembro de 2025, a variável “sistema” não apresentou efeito significativo sobre a produção total de framboesas, quer em peso (kg/m²), quer em número de frutos por planta. (fig. 2 e 3). A produção ao longo da campanha apresentou padrões semelhantes nos dois sistemas, indicando que a presença dos painéis fotovoltaicos não terá comprometido a produtividade global (fig. 4). A produção acumulada revelou valores absolutos superiores em PV (+6,5%), no entanto, a diferença de produção não foi estatisticamente significativa quando se considerou a produção por planta (9,676 kg em PV e 9,086 kg em NET).

A análise do peso médio dos frutos também não indicou diferenças significativas entre sistemas, tanto quando considerado o peso médio por fruto ao longo da campanha (fig. 5), como quando analisado por data de colheita (fig. 6). Assim, a variável “sistema” não condicionou este parâmetro de qualidade.

Por outro lado, foram detetadas diferenças significativas noutros atributos morfológicos dos frutos. O volume médio dos frutos foi superior no sistema PV em relação ao NET, indicando que as framboesas produzidas sob painéis apresentaram maior calibre (figs. 7 e 8). Adicionalmente, a relação comprimento/diâmetro também mostrou valores mais elevados em PV, traduzindo frutos mais alongados em comparação com os obtidos sob rede (figs. 9 e 10). Estes resultados sugerem que, embora a quantidade produzida não tenha sido afetada, a cobertura fotovoltaica influenciou estas características morfológicas associadas à qualidade comercial do fruto.

Estes efeitos poderão estar associados a modificações microclimáticas provocadas pela cobertura, que poderão ter condicionado o desenvolvimento dos frutos, sendo necessária uma análise mais aprofundada da relação entre as variáveis edafoclimáticas e as respostas fisiológicas da cultura.

Para além destes resultados, a produção de framboesas em sistema agrovoltáico poderá beneficiar de uma posição própria no mercado, tendo em conta o carácter sustentável do processo de produção, que deverá ser devidamente identificado. Adicionalmente, os apoios associados à produção de energia a partir de fontes renováveis poderão contribuir para a sustentabilidade financeira da produção de framboesas em agrovoltáicos em Portugal.

Os resultados obtidos estão em consonância com estudos anteriores sobre a produção de frutos em sistemas agrovoltáicos. Tal como observado por Udrea et al. (2023), o sombreamento moderado associado aos painéis fotovoltaicos não comprometeu significativamente o rendimento das culturas de pequenos frutos, podendo até melhorar certos parâmetros de qualidade. No presente ensaio, a produção total de framboesas foi semelhante entre sistemas (9,676 kg/planta em PV e 9,086 kg/planta em NET), com +6,5 % em PV, diferença não significativa — tendência também relatada por Helsen et al.

(2024), que observaram reduções de radiação até 50 % sem perdas expressivas de biomassa ou produção em framboesas e morangos. No presente estudo, embora a quantidade produzida não tenha sido afetada, registaram-se frutos de maior volume e alongamento sob PV, em linha com relatos de melhoria morfológica sob sombreamento parcial. Assim, confirma-se que a integração fotovoltaica pode coexistir com a produção de framboesas, mantendo a produtividade e influenciando positivamente certos atributos de qualidade.

Conclusões

Em síntese, os resultados obtidos até à data indicam que a produção total de framboesas não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois sistemas. Contudo, os frutos produzidos sob a instalação agrovoltaica revelaram ser ligeiramente mais volumosos e alongados do que aqueles produzidos sob rede de ensombramento, apresentando características visuais valorizadas pelos consumidores. Adicionalmente, a produção de framboesas em sistema agrovoltaico poderá beneficiar de uma posição própria no mercado, tendo em conta o carácter sustentável do processo de produção, que deverá ser devidamente identificado. Por fim, os apoios associados à produção de energia a partir de fontes renováveis poderão contribuir para a sustentabilidade financeira da produção de framboesas em agrovoltaicos em Portugal, reforçando o potencial económico da produção agrovoltaica de pequenos frutos.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto AgriFlex (PRR-C05-i03-I-000214-LA11.2), financiado pelo Plano de Recuperação e Resiliência (PRR). Os autores agradecem o apoio institucional e científico de todos os parceiros envolvidos no projeto, cujo contributo foi essencial para a implementação e acompanhamento do ensaio. Um agradecimento especial é também dirigido à equipa AgriFLEX no seu todo, pelo trabalho articulado, conjunto e colaborativo, sempre orientado para a obtenção de resultados claros e úteis.

Referências Bibliográficas

- Barron-Gafford, G. A., Pavao-Zuckerman, M. A., Minor, R. L., Sutter, L. F., Barnett-Moreno, I., Blackett, D. T., ... & Macknick, J. E. (2019). Agrivoltaics provide mutual benefits across the food–energy–water nexus in drylands. *Nature Sustainability*, 2(9), 848–855. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0364-5>
- Dupraz, C., Marrou, H., Talbot, G., Dufour, L., Nogier, A., & Ferard, Y. (2011). Combining solar photovoltaic panels and food crops for optimising land use: Towards new agrivoltaic schemes. *Renewable Energy*, 36(10), 2725–2732. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.03.005>
- Helsen, H., Maestrini, B., Meijers, E., Hermelink, M., de Vries, W., Balk, P., & de Ruijter, F. J. (2022). Crop response to agrivoltaics in soft fruit production. *Lisbon: Agrivoltaics*.
- Marrou, H., Guilioni, L., Dufour, L., Dupraz, C., & Wery, J. (2013). Microclimate under agrivoltaic systems: Is crop growth rate affected in the partial shade of solar panels? *Agricultural and Forest Meteorology*, 177, 117–132. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2013.04.012>
- Oliveira, P. B. (2007). *Framboesa: cultura, colheita e pós-colheita*. Oeiras: Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (INIAP).

- Trommsdorff, M., Kang, J., Reise, C., Schindele, S., Bopp, G., Ehmann, A., ... & Högy, P. (2022). Combining food and energy production: Design and performance of a bifacial agrivoltaic system. *Applied Energy*, 326, 119602. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2022.119602>
- Udrea, L.-M., Călinescu, M. F., Mazilu, I. C., Chițu, E., & Plăiașu, F. (2025). The effect of photovoltaic systems on berries production: A review. *Scientific Papers Series B: Horticulture*, LXIX(1), 223-235. <https://www.itia.ntua.gr/en/getfile/2290/1/documents/land-12-01069.pdf>
- United Nations. (2015). *Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development*. United Nations. <https://sdgs.un.org/2030agenda>
- Valle, B., Simonneau, T., Sourd, F., Pechier, P., Hamard, P., Frisson, T., ... & Christophe, A. (2017). Increasing the total productivity of a land by combining mobile photovoltaic panels and food crops. *Applied Energy*, 206, 1495–1507. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.09.113>

Quadros e Figuras



Figura 1 - Piloto de framboesas em agrovoltaiico localizado no AgroBioTech, ESAC-IPC

Tabela 1 - Dados edafoclimáticos por sistema: painel fotovoltaico (PV) rede de sombreamento (NET), valor de energia radiativa total e diferença percentual dos valores, temperatura, humidade e condutividade do solo.

	PV	Net	Referência exterior
Energia radiativa acumulada (KW/h/M ²)	302,6751	305,3684	755,8266
Temperatura do solo (°C)	17,8	17,2	
Humidade do solo (%)	31,7	33,8	
Condutividade do solo (s/m)	0,010269265	0,00920924	

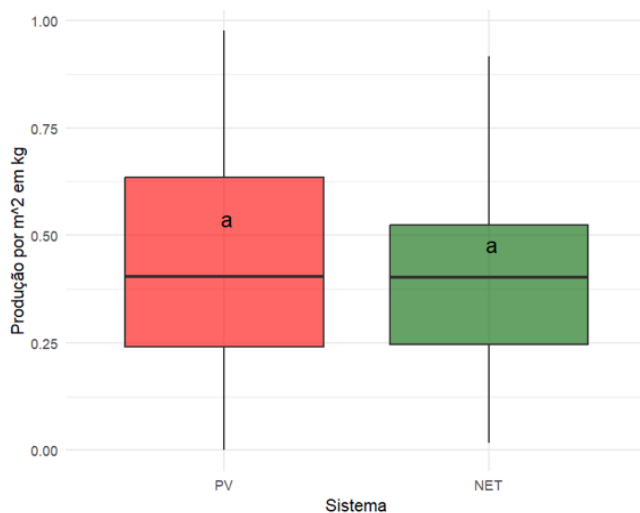


Figura 2 - Produção acumulada de framboesas ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$) por sistema - sob painéis fotovoltaicos (PV) e sob rede de ensombramento (NET). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão, com base em 2849 frutos no sistema PV e 3065 frutos no sistema NET. Colunas com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

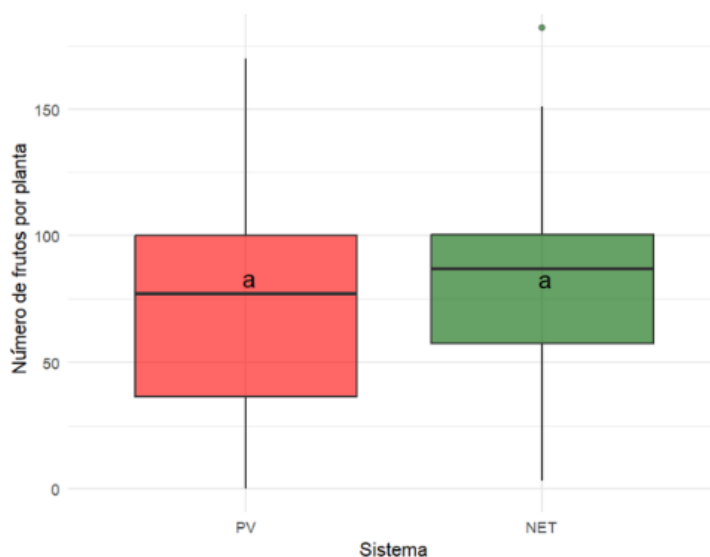


Figura 3 - Número de frutos por planta por sistema - sob painéis fotovoltaicos (PV) e sob rede de ensombramento (NET). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão, com base em 2849 frutos no sistema PV e 3065 frutos no sistema NET. Colunas com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

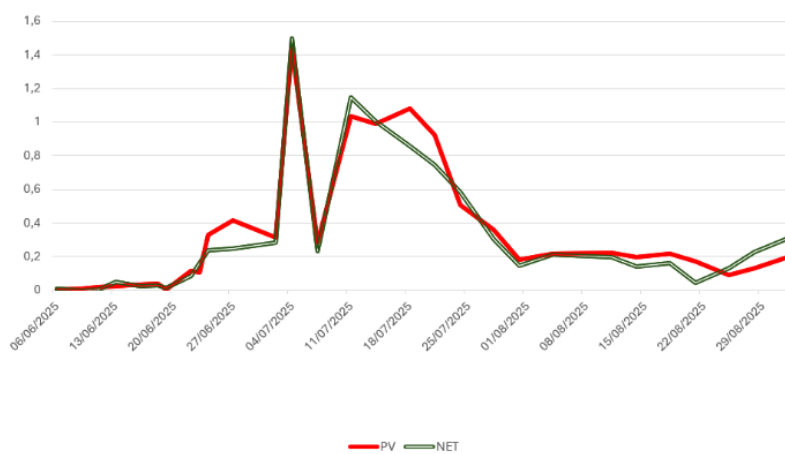


Figura 4 - Curva de produção por sistema - painéis fotovoltaicos (PV) e rede de ensombramento (NET).

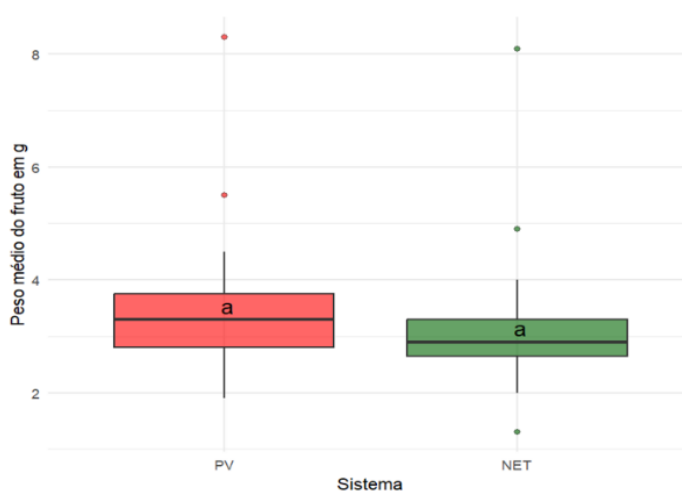


Figura 5 - Peso dos frutos por sistema - sob painéis fotovoltaicos (PV) e sob rede de ensombramento (NET). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão, com base em 2849 frutos no sistema PV e 3065 frutos no sistema NET. Colunas com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

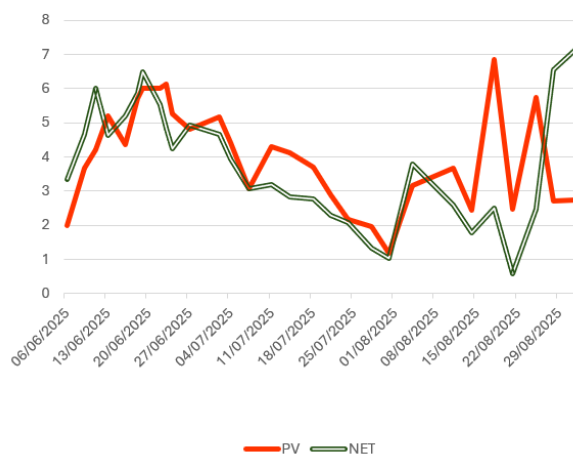


Figura 6 - Peso do fruto, nas diferentes datas de colheita, por sistema - painéis fotovoltaicos (PV) e rede de ensombramento (NET). Os resultados são médias do peso dos frutos colhidos.

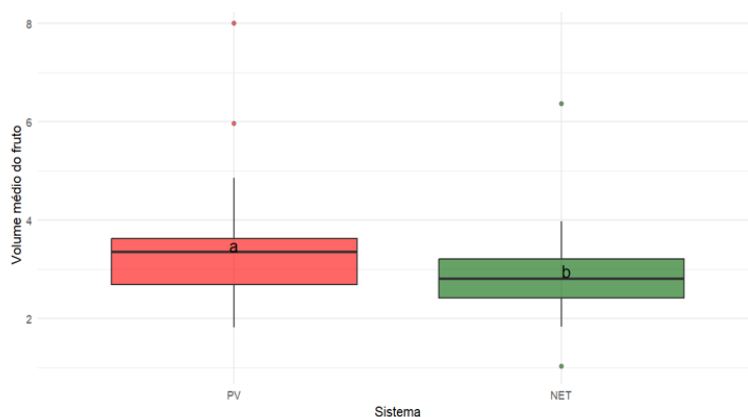


Figura 7 - Volume do fruto (cm^3) por sistema - painéis fotovoltaicos (PV) e rede de ensombramento (NET). Os resultados são médias \pm desvio padrão do volume de 1 fruto por planta por colheita, ou seja, 400 frutos em PV e 465 frutos em NET no total (colunas com letra diferente, apresentam diferenças estatisticamente significativas)

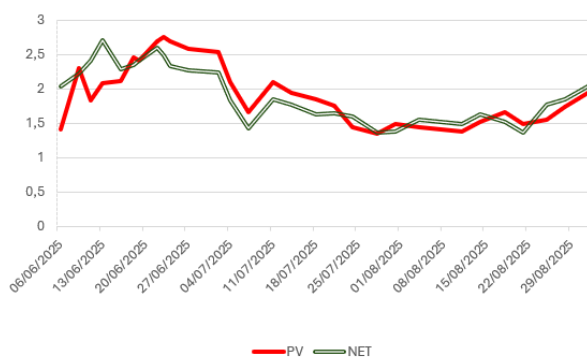


Figura 8 - Volume médio por fruto por cm³ por sistema ao longo do tempo.

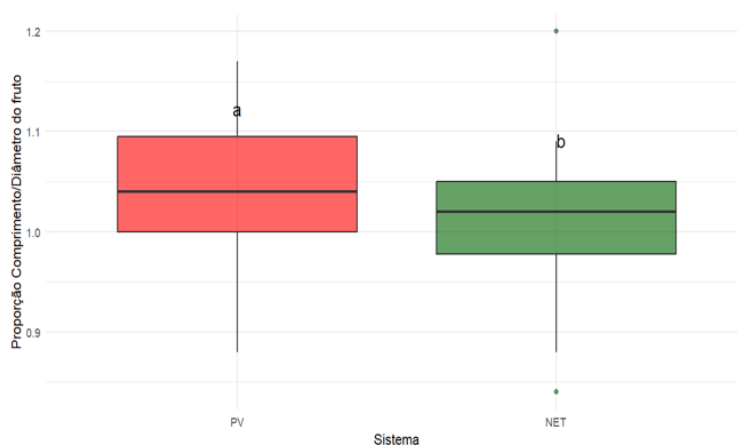


Figura 9 - Relação entre comprimento e diâmetro do fruto por - painéis fotovoltaicos (PV) e rede de ensombramento (NET). Os resultados são médias \pm desvio padrão de 400 frutos em PV e 465 frutos em NET (colunas com letra diferente, apresentam diferenças estatisticamente significativas).

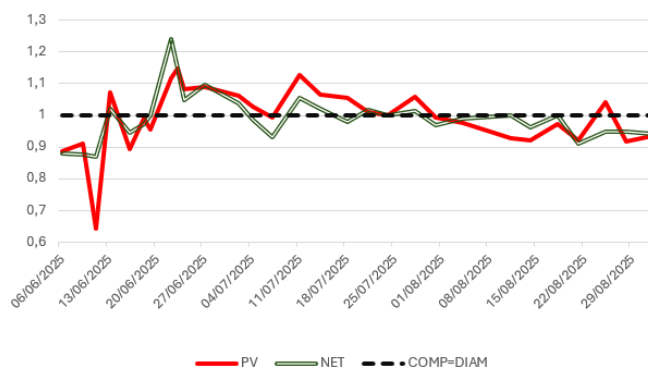


Figura 10 - Relação entre comprimento e diâmetro do fruto, ao longo do tempo, por sistema - painéis fotovoltaicos (PV) e rede de ensombramento (NET). Os resultados são médias de 400 frutos em PV e 465 frutos em NET. Valores superiores a 1 representam frutos mais alongados. Números inferiores a um representam frutos mais achatados.

O impacto da micropropagação na conservação e valorização de *Corema album*

Ana Catarina Ribeiro¹, Fátima Oliveira¹, Rose Sousa¹, Andreia Afonso¹, Teresa Valdiviesso², Pedro B. Oliveira²

¹Deifil Technology Lda., Rua do Talho 80 – Serzedelo, 4830-704 Póvoa de Lanhoso;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. - Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras.

Resumo

Corema album (L) D. Don, é um arbusto selvagem que cresce em habitats costeiros ao longo da costa atlântica da Península Ibérica. É uma espécie importante nos ecossistemas dunares, desempenhando um papel ecológico essencial na conservação das paisagens. Para além do seu potencial como planta ornamental, apresenta ainda potencial como pequeno fruto considerando as suas bagas comestíveis. No entanto, vários fatores dificultam a regeneração natural de *C. album*, tornando-a uma espécie vulnerável. As sementes apresentam baixa taxa de germinação e dormência morfo-fisiológica, sendo também elevada a taxa de mortalidade de plântulas de *C. album*, em condições naturais. Além disso, a destruição e degradação do habitat e o impacto de espécies invasoras levaram a um declínio notável no tamanho e número de populações. Deste modo, torna-se necessário desenvolver métodos alternativos para a propagação e conservação desta espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo o estabelecimento *in vitro* de *C. album* para posterior desenvolvimento de um protocolo eficaz de micropropagação. Foram efetuadas 2 recolhas de material vegetal, em 6 locais distintos, tendo-se selecionado no total 112 genótipos para recolha. Posteriormente, deu-se o estabelecimento *in vitro* do material vegetal, tendo-se estabelecido um total de 9159 explantes. Para a fase de multiplicação passaram 19 genótipos, dos quais se destacam: SJ18♀, SJ29♀, SJD1♀, VR5♀. Na fase seguinte, foram realizados ensaios de enraizamento nos genótipos CL11♀ e FL5♀. Os resultados obtidos indicam uma resposta positiva com formação de raízes (3 a 4 raízes por plântula) em 36% dos explantes de FL5 e 31% de CL11.

Os resultados obtidos garantem a conservação da espécie, dada a dimensão do território abrangido nas recolhas de material vegetal. Além disso, parte dos genótipos selecionados apresentam excelentes características como material de base para um programa de melhoramento genético da camarinha, com vista a valorizar e potenciar o seu fruto.

Palavras-chave: Camarinha, cultura *in vitro*, espécies autóctones, resiliência, sustentabilidade.

Abstract

Corema album (L) D. Don is a wild shrub that grows in coastal habitats along the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. It is an important species in dune ecosystems, playing a key ecological role in landscape conservation. In addition to its potential as an ornamental plant, it also has potential as a small fruit, given its edible berries. However, several factors hinder the natural regeneration of *C. album*, making it a vulnerable species. The seeds have a low germination rate and morfo-physiological dormancy, and the mortality rate of *C. album* seedlings is also high under natural conditions. Furthermore,

habitat destruction and degradation and the impact of invasive species have led to a notable decline in population size and numbers. Thus, it is necessary to develop alternative methods for the propagation and conservation of this species.

Therefore, this work aimed to establish *in vitro* *C. album* for subsequent development of an effective micropropagation protocol. Two plant material collections were conducted at six different locations, resulting in a total of 112 genotypes being selected for collection. Subsequently, the plant material was established *in vitro*, yielding a total of 9159 explants. 19 genotypes were selected for the multiplication phase, standing out: SJ18♀, SJ29♀, SJD1♀, and VR5♀. In the next phase, rooting tests were performed on the genotypes CL11♀ and FL5♀. The results indicate a positive response, with root formation (3 to 4 roots per seedling) in 36% of the FL5 explants and 31% of the CL11 explants.

These results ensure the conservation of the species, given the size of the territory covered by the plant material collections. Furthermore, some of the selected genotypes present excellent characteristics as basic material for a genetic improvement program for the camarinha, with a view to enhancing its fruit.

Keywords: Camarinha, *in vitro* cultivation, native species, resilience, sustainability.

Introdução

Corema album (L.) D. Don, vulgarmente designada de camarinha, é um arbusto endémico da Península Ibérica, característico dos ecossistemas dunares atlânticos. Para além do seu valor ecológico, esta espécie teve, no passado, elevada importância económica e cultural, quando as suas bagas eram consumidas frescas e comercializadas em mercados locais (Simões, 2018). Atualmente, o interesse pela cultura tem vindo a aumentar, não só pelo potencial ornamental e frutícola, mas também pelas propriedades bioativas das suas folhas, ricas em polifenóis, associados a atividades antioxidantes e anti-inflamatórias e mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neurodegeneração (Gonçalves, 2019).

Apesar da sua importância, *C. album* encontra-se em declínio notável no tamanho e número de populações, devido a múltiplos fatores, nomeadamente a degradação dos habitats costeiros, o impacto de espécies invasoras e as dificuldades inerentes à regeneração natural, devido à baixa taxa de germinação, dormência morfo-fisiológica das sementes e à elevada mortalidade das plântulas em solos arenosos (Calviño-Cancela, 2005, Nunes et al., 2022; Santos et al., 2014). Acrescenta-se ainda, que a disponibilidade de plantas no mercado é reduzida devido às limitações dos métodos convencionais de propagação (Gonçalves, 2019). Vários estudos tentaram superar estas limitações através germinação desta espécie, recorrendo à escarificação química e tratamentos térmicos e ainda, através da propagação vegetativa por estacaria. Contudo, estes métodos apresentam baixa eficiência e não garantem uniformidade genética nem a qualidade fitossanitária das plantas (Nunes et al., 2022; Rosado da Luz et al., 2020;).

Neste contexto, a cultura *in vitro* e a micropropagação surgem como alternativas promissoras, capazes de assegurar a conservação da diversidade genética e, simultaneamente, potenciar a seleção de genótipos com características agronómicas e produtivas superiores (Gonçalves et al., 2019). Assim, a Deifil em parceria com o INIAV efetuou 2 recolhas de material vegetal, em 6 locais distintos, tendo selecionado 112 genótipos para estabelecimento *in vitro* de material vegetal. Este trabalho teve como objetivo desenvolver protocolos eficientes de micropropagação de *C. album*, de modo a

garantir tanto a conservação da espécie como a valorização do seu potencial económico e ecológico.

Material e Métodos

O trabalho iniciou-se com a seleção e recolha de material vegetal de *C. album*. Foram realizadas duas recolhas em seis locais distintos da costa portuguesa: Dunas de S. Jacinto (SJ), Quiaios (Q), Costa de Lavos (CL), Praia do Samouco (S) Foz do Lizandro (FL) e Vila Real de S. António (VR). No total, foram selecionados 112 genótipos, 100 na primeira recolha e 12 genótipos na segunda, sendo que esta última foi direcionada para a seleção de indivíduos que se destacassem dos restantes. Os critérios de seleção utilizados incluíram o vigor da planta, calibre e forma do fruto, facilidade de colheita, homogeneidade de maturação e intensidade de cor e sabor.

Posteriormente, procedeu-se ao estabelecimento *in vitro* do material vegetal recolhido. Para tal foram testados vários protocolos de desinfeção, tendo sido introduzidos *in vitro* 9159 explantes (5910 da primeira recolha e 3249 da segunda). A percentagem média de sucesso no primeiro estabelecimento foi bastante reduzida, de 3,58%, e no segundo estabelecimento de 54%. Após esta fase, 19 genótipos apresentaram desenvolvimento adequado e ausência de contaminação, e como tal, passaram a fase de multiplicação.

Na fase de multiplicação e enraizamento, foram realizados ensaios para otimização do meio de cultura, com o objetivo de determinar as formulações mais adequadas para o desenvolvimento dos diferentes genótipos. Na fase de multiplicação avaliou-se a taxa de multiplicação, o aspeto geral da planta e o desenvolvimento da parte aérea, enquanto que na fase de enraizamento, quantificou-se a presença de estruturas radiculares por explante, e a percentagem de explantes enraizados. Para além dos ensaios de enraizamento *in vitro*, realizaram-se ainda ensaios de enraizamento *ex vitro*, recorrendo a diferentes substratos, com o objetivo de avaliar o sucesso da fase de aclimatização das plantas obtidas.

Resultados e Discussão

Tal como referido anteriormente, apesar das múltiplas características de interesse que esta cultura apresenta, a disponibilidade de plantas no mercado é muito reduzida devido à grande dificuldade na sua propagação pelos métodos convencionais (Gonçalves, 2019; Magalhães, 2015). Foram já realizados alguns estudos com o objetivo de desenvolver um protocolo de micropropagação para a *C. album* (Gonçalves et al, 2019), no entanto, é necessário desenvolver protocolos eficazes e eficientes na multiplicação *in vitro* e posteriormente desenvolver metodologias que permitam obter uma elevada taxa de sucesso na fase de aclimação das plantas. Assim, a Deifil em parceria com o INIAV efetuou 2 recolhas de material vegetal, em 6 locais distintos (Figura 1), tendo selecionado 112 genótipos para estabelecimento *in vitro* de material vegetal. Inicialmente, na primeira recolha, foram selecionados 100 genótipos e estabelecidos *in vitro* 5910 explantes. Apesar dos esforços realizados, a % média de sucesso no estabelecimento foi bastante reduzida (3,58%), evidenciando a necessidade de otimização do protocolo de desinfeção. Esta etapa é considerada a mais crítica da micropropagação, devido às elevadas taxas de contaminação observadas. No caso específico de *C. album*, o desafio é acrescido, uma vez que os contaminantes tendem a acumular-se na face inferior das folhas, dificultando a sua eliminação. Além disso, por se tratar de uma espécie adaptada a ecossistemas dunares, o material vegetal recolhido junto à superfície arenosa, que por vezes é o único material existente, dado o estado degradado das plantas-mãe, acumula ainda mais

contaminantes, aumentando a probabilidade de insucesso desta fase. Importa ainda salientar que, nesta recolha, a estratégia passou por recolher o maior número de genótipos possível, mas consequentemente um menor número de material vegetal para estabelecimento. Assim, após estes resultados, realizou-se uma segunda recolha, tal como referido, em que a estratégia foi direcionada para a seleção de indivíduos que se destacassem dos restantes, ou seja, pela seleção de um menor número de indivíduos e pela recolha de uma maior quantidade de material vegetal para estabelecimento. Foram selecionados 12 genótipos e foram estabelecidos *in vitro* 3249 explantes. A % média de sucesso desta fase e para esta recolha foi de 54%, ou seja, bastante superior à obtida anteriormente. Pela análise da figura 2, onde se encontra representada a % de sucesso de estabelecimento para os 19 genótipos que passaram da fase do estabelecimento para a de multiplicação, observa-se que estes valores variam consideravelmente entre os diferentes genótipos e entre genótipos do mesmo local, evidenciando diferenças no comportamento inicial do material vegetal. O estabelecimento corresponde à fase mais crítica da micropropagação. Além disso, os genótipos provenientes de determinados locais apresentaram maior % de sucesso, o que também pode estar associado a fatores intrínsecos, como o estado fisiológico da planta-mãe. Estes resultados confirmam a variabilidade genotípica previamente descrita por Nunes et al. (2022), reforçando a necessidade de protocolos ajustados a diferentes origens genéticas.

Posteriormente, na fase de multiplicação, *C. album* caracterizou-se por ser uma planta de desenvolvimento gradual, dado que apenas após as 12 semanas é que se observa um aumento exponencial do material vegetal (fig. 3). De uma forma geral, os genótipos apresentaram taxas de multiplicação distintas, destacando-se desde a primeira recolha o genótipo SJ29♀, tanto pelo seu desempenho na multiplicação como pelo porte arbustivo mais vigoroso (fig. 3). Para além deste genótipo, na segunda recolha CL11♀, FL5♀, SJ18♀ apresentaram os melhores resultados, com médias de 3 a 4 rebentos por explante (Tabela 1). Estes resultados sugerem que estes genótipos possuem maior aptidão para micropropagação, podendo constituir material de base promissor para programas de conservação e melhoramento. Por outro lado, alguns clones revelaram taxas de multiplicação reduzidas, demonstrando que a resposta ao meio de cultura não é homogénea entre diferentes genótipos, tal como já observado em outros ensaios descritos na literatura (Rosado da Luz et al., 2020). Em suma, a otimização desta fase exigiu inúmeros testes de meios de cultura envolvendo diferentes formulações, tendo-se observado que a formulação ótima para o desenvolvimento desta cultura *in vitro* corresponde a uma reduzida concentração de hormonas, sais minerais e fontes de carbono. Este resultado reflete a adaptação natural de *C. album* a habitats dunares, caracterizados por elevada salinidade, baixa disponibilidade de água e escassez de nutrientes. Assim, meios de cultura excessivamente enriquecidos induziram fenómenos de vitrificação, demonstrando que formulações mais simples se adequam melhor às exigências fisiológicas desta espécie.

Relativamente à fase de enraizamento *in vitro*, mais recentemente foram realizados 2 ensaios de enraizamento recorrendo aos clones CL11♀ e FL5♀. Num primeiro ensaio foi mantida a composição base do meio de multiplicação sem incorporação de fitoreguladores mas com aplicação de um choque de auxina (ácido indolbutírico) aquando da introdução dos explantes no meio de cultura. Num segundo ensaio, explantes dos mesmos clones foram inoculados em meio de cultura com metade da concentração de macronutrientes, suplementado com ácido indolbutírico e carvão ativado. Os resultados obtidos no final do ciclo de enraizamento, embora ainda preliminares, indicam uma resposta positiva com promoção da formação de raízes (3 a 4

raízes por plântulas) em 36% dos clones de FL5♀ e 31% dos clones de CL11♀. As raízes formadas são pouco ramificadas e finas embora bastante compridas (fig. 4). Este padrão é semelhante ao observado nas plantas no seu habitat natural, onde, devido à escassez de água e nutrientes e à elevada salinidade, a espécie depende de sistemas radiculares longos para explorar o solo e garantir a aquisição eficiente dos recursos necessários à sua sobrevivência.

Estes resultados evidenciam o potencial de enraizamento *in vitro* de *C. album* e reforçam a necessidade de otimizar protocolos específicos para esta fase, para assim aumentar a % de sucesso da fase de aclimatização. Tal como observado na multiplicação, é expectável que cada genótipo apresente respostas fisiológicas distintas, o que justifica a realização de novos ensaios com os mesmos e com outros genótipos.

De forma complementar aos ensaios de enraizamento *in vitro*, foram também realizados ensaios de enraizamento *ex vitro*, nos quais plantas provenientes da multiplicação foram transferidas para diferentes substratos e sujeitas a diferentes choques de auxina (ácido indolbutírico) (Tabela 2). Entre as condições testadas, a condição 3 apresentou uma percentagem de sucesso mais elevada (29%) e, tal como observado no enraizamento *in vitro*, verificou-se uma grande variabilidade entre genótipos, com % de enraizamento que oscilaram entre 1% e 50%. Neste ensaio, os clones SJ30♀ (29,7%) e Q6♀ (51,6%) destacaram-se dos restantes dado que demonstraram maior capacidade de adaptação às condições *ex vitro*. Estes resultados sugerem que, apesar das limitações *in vitro*, determinados genótipos podem apresentar melhor resposta em substrato.

Conclusões

De forma geral, os resultados obtidos demonstram que a micropropagação de *C. album* é uma estratégia viável e promissora, ainda que necessite de mais otimização, sobretudo nas fases iniciais de estabelecimento e no enraizamento. Os resultados obtidos garantem a conservação da espécie, dada a dimensão do território abrangido nas recolhas de material vegetal. Além disso, parte dos genótipos selecionados apresentam excelentes características como material de base para um programa de melhoramento genético da camarinha, com vista a valorizar e potenciar o seu fruto.

Referências Bibliográficas

- Calvino-Cancela, M. (2005). Fruit consumers and seed dispersers of the rare shrub *Corema album*, Empetraceae in coastal sand dunes. <https://doi.org/10.3406/revec.2005.1249>
- Gonçalves, J. C. (2019). Micropropagação de *Corema album*: primeiros resultados. Agrotec - Revista Técnico-Científica Agrícola
- Magalhães, T.T. (2015). Propagação e fenologia da *Corema album* (L.) D. Don. Ensaio de propagação vegetativa por estaca. Caracterização fenológica e proposta de escala BBCH. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, 80pp.
- Nunes, A. P., Trindade, C. S., Palha, M. G., Oliveira, P. B., & Valdivieso, T. (2022). Tecnologias de produção de pequenos frutos para produção fora da época (I. P. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, Ed.).
- Rosado da Luz, F., Valdivieso, T., & Oliveira, P.B. (2020). Propagação vegetativa e seminal em *Corema album* (L.) D. Don. <https://www.researchgate.net/publication/340507634>
- Santos, M.S., Oliveira, C.M., Valdivieso, T. & Oliveira, P.B. (2014). Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. Journal of Berry Research 4: 183–192. DOI:10.3233/JBR-140079

Quadros e Figuras



Figura 1 - Identificação das zonas dunares onde se realizou a recolha de material vegetal de *Corema album* para micropropagação.

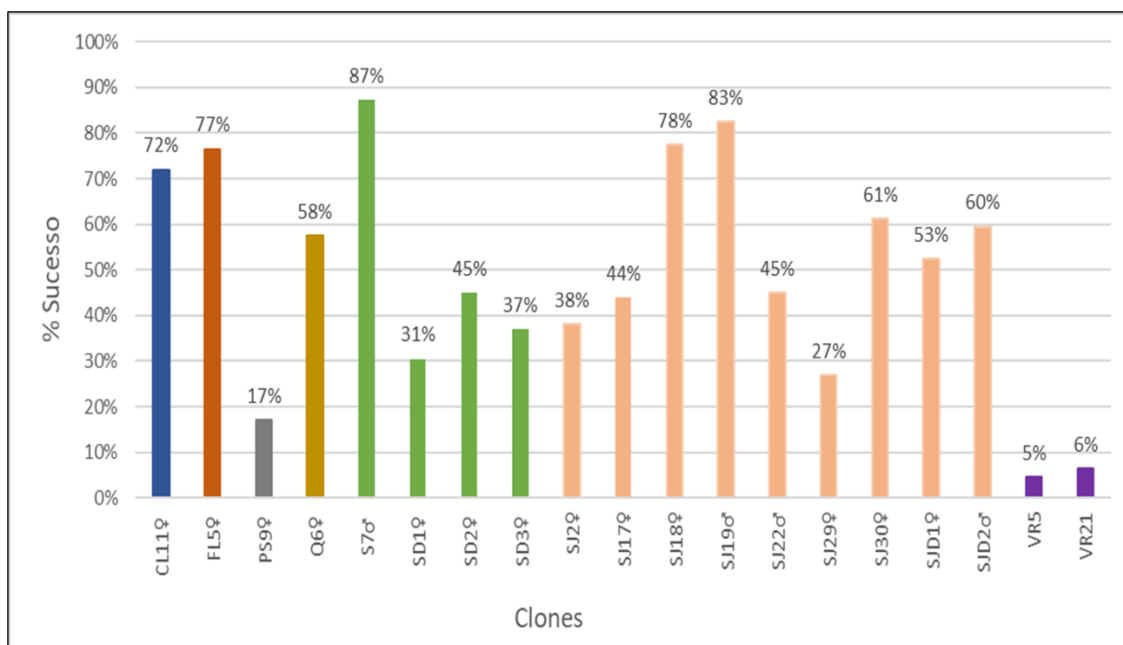


Figura 2 - Percentagem (%) de sucesso no estabelecimento dos 19 genótipos de *C. album* que passaram para a fase de multiplicação. A designação dos genótipos provem do local de recolha, nomeadamente Costa de Lavos (CL), Foz do Lizandro (FL), Praia do Samouco (PS), Quiaios (Q), Samouco (S), Dunas de S. Jacinto (SJ) e Vila Real de Santo António (VR).

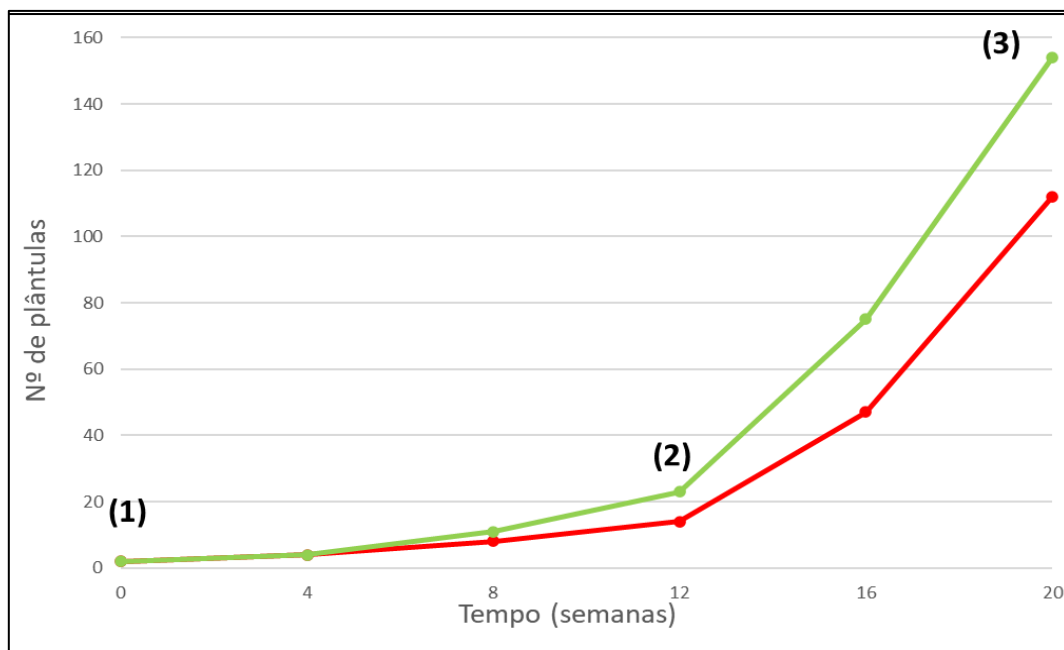


Figura 3 - Diferentes fases da multiplicação para os genótipos VR5♀ e SJ29♀, em que (1) representa a fase inicial, em que o número de explantes é reduzido, (2) corresponde à fase das 0-12 semanas, onde há um aumento gradual no número de plântulas e por fim (3) corresponde ao período de 12-20 semanas onde se verifica um aumento exponencial do número de explantes (taxa de multiplicação elevada).

Tabela 1 - Identificação dos 19 genótipos que tiveram sucesso na fase de estabelecimento e passaram para a fase de multiplicação, bem como, a respetiva taxa média de multiplicação.

Genótipos	Taxa média de multiplicação	Genótipos	Taxa média de multiplicação
CL11♀	6,18	SJD2♂	2,5
Q6♀	5,16	SJ2♀	2,4
SJD1♀	5,0	SJ22♂	2,32
VR5♀	4,0	SJ17♀	0,72
SJ19♂	3,9	SD3♀	0,8
SJ29♀	3,7	S7♂	0,6
SJ18♀	3,68	SD1♀	0,5
FL5♀	3,50	SD2♀	0,5
VR21	3,3	SJ30♀	0,5
PS9♀	2,71		



Figura 4 - Raízes obtidas no segundo ensaio de enraizamento para os genótipos CL11♀ e FL5♀.

Tabela 2 - Percentagem (%) média de sucesso por condição e por genótipo, nos diferentes testes de enraizamento *ex vitro*. A negrito encontra-se destacado a condição e os genótipos com maior % de enraizamento.

Genótipos	Condição 1	Condição 2	Condição 3	% média p/genótipo
SJD2♂	0,0	30,8	27,9	16,2
SJ29♀	6,1	24,7	10,0	12,0
SJ2♀	0,0	-	-	0,0
SJ19♂	1,6	15,6	52,5	9,7
SJ18♀	1,5	20,0	27,5	7,0
SJ22♂	15,6	2,2	20,0	13,9
SJD1♀	10,5	0,0	25,0	10,9
SJ30♀	28,2	20,0	47,5	29,7
S7♂	16,8	-	-	16,8
Q6♀	12,8	68,9	70,0	51,6
SD1♀	0,0	0,0	18,6	5,6
FL5♀	7,7	0,0	1,4	4,9
SD2♀	19,2	13,3	31,4	26,1
SD3♀	10,3	2,2	50,0	17,5
CL11♀	14,5	11,7	21,3	15,5
PS9♀	4,4	1,7	2,5	3,1
% média p/condição	9,0	15,0	29,0	

Desempenho germinativo de diferentes linhas segregantes de amora em métodos *ex vitro* e *in vitro*

Francisco Reigada¹, Manuel F. Roque^{2,3,4}, Teresa Valdiviesso², Patrick Materatski^{1,5,6}, Carla Varanda^{1,5,6}, Pedro B. Oliveira²

¹Escola Superior Agrária de Santarém (ESAS), Quinta do Galinheiro, 2001-904, Santarém, Portugal;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras;

³Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche 10, 60131 Ancona, Italy;

⁴Madre Fruta, Polo de Inovação da Fataca, 7630-580, São Teotónio, Portugal;

⁵MED—Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, Largo dos Colegiais 2, 7004-516 Évora, Portugal;

⁶Centro de Estudos de Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS), Instituto Politécnico de Santarém, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001-904 Santarém, Portugal

Resumo

No âmbito de programas de melhoramento genético de amora (*Rubus* subg. *Rubus* Watson), a eficiência germinativa constitui um fator limitante para a obtenção de génotipos em número suficiente para expressar o potencial genético da família a avaliar. O presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência germinativa e o desenvolvimento inicial de plântulas de diferentes linhas segregantes, recorrendo a dois métodos de germinação: *ex vitro* e *in vitro*. Foram avaliadas 18 linhas no método *ex vitro* e 6 linhas no método *in vitro*, sendo as famílias C12 e C15 comuns a ambos os métodos. No método *ex vitro*, as sementes foram submetidas a escarificação química com ácido sulfúrico (96%, 30 min), seguida de estratificação a 4 °C durante seis semanas e sementeira em substrato constituído por turfa e perlite (2:1, v/v). No método *in vitro*, as sementes foram esterilizadas numa solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v), escarificadas mecanicamente por corte transversal e semeadas em diferentes meios de cultura (½ MS, MS, B5, QL e DKW). Após 30 dias em câmara de crescimento, determinaram-se as taxas de germinação e parâmetros de desenvolvimento das plântulas. O método *in vitro* promoveu maior desenvolvimento radicular e emissão foliar mais precoce, mas com elevada variabilidade entre génotipos. Em contraste, o método *ex vitro* apresentou crescimento mais uniforme e menor variabilidade entre linhas, evidenciando maior consistência para aplicações em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Rubus*; eficiência germinativa; melhoramento genético; germinação.

Abstract

Within blackberry (*Rubus* subg. *Rubus* Watson) breeding programs, germination efficiency is a limiting factor for obtaining an adequate number of genotypes for evaluation. This study compared germination efficiency and early seedling development of different segregating lines using *ex vitro* and *in vitro* methods. Eighteen lines were evaluated *ex vitro* and six *in vitro*, with genotypes C12 and C15 common to both methods. *Ex vitro* seeds were chemically scarified with sulphuric acid (96%, 30 min) and cold stratified at 4 °C for six weeks. *In vitro* seeds were sterilized with sodium hypochlorite (1%), mechanically scarified and sown on different culture media (½ MS, MS, B5, QL and DKW). After 30 days, germination rates and seedling development parameters were

assessed. The *in vitro* method promoted greater root development and earlier leaf emergence, but with high variability between genotypes. In contrast, the *ex vitro* method showed more uniform growth and less variability between segregating lines, demonstrating greater consistency for applications in genetic improvement programs.

Keywords: *Rubus*; germination efficiency; plant breeding; seed germination

Introdução

O género *Rubus* assume crescente importância económica e agronómica no setor dos pequenos frutos, tendo a amora um grande potencial em programas de melhoramento genético (Roque et al., 2025). A obtenção de novos génotipos visa, entre outros objetivos, o aumento da produtividade, a melhoria da qualidade do fruto e a adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, contribuindo para a sustentabilidade e competitividade do setor (Finn & Clark, 2017).

Nos programas de melhoramento genético, a propagação por via seminal é essencial para a obtenção de populações segregantes com elevada variabilidade genética. Contudo, a germinação das sementes de *Rubus* é frequentemente limitada pelo seu estado de dormência, o que compromete a eficiência germinativa (Wada, 2011).

A utilização de técnicas como a escarificação química, a estratificação a frio e a germinação *in vitro* tem sido adotada para ultrapassar esta limitação (Mendes, 2022). A germinação *ex vitro* apresenta vantagens operacionais, enquanto a germinação *in vitro* permite maior controlo das condições ambientais, podendo favorecer taxas de germinação mais elevadas, um desenvolvimento inicial mais rápido das plântulas e uma maior uniformidade fisiológica nas fases iniciais de crescimento (Roque et al., 2025).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência germinativa e o desenvolvimento inicial de plântulas de diferentes linhas segregantes de amora, recorrendo a métodos de germinação *ex vitro* e *in vitro*, contribuindo para a otimização de protocolos aplicáveis a programas de melhoramento genético.

Material e Métodos

As sementes utilizadas foram obtidas a partir de diferentes linhas segregantes de amora provenientes do programa de melhoramento do INIAV, I.P/ Madre Fruta. A referência - A, representa linhas descendentes de polinização livre de variedades comerciais, a referência - C representa linhas proveniente de cruzamentos controlados entre variedades comerciais e a referência - W refere-se a linhas resultantes de polinização livre de amoras silvestres. Foram avaliadas 18 linhas no método *ex vitro* e 6 linhas no método *in vitro*, sendo as famílias C12 e C15 comuns a ambos os métodos.

No método *ex vitro*, as sementes foram submetidas a escarificação química com ácido sulfúrico (H₂SO₄, 96%) durante 30 minutos, seguidas de lavagem abundante com água destilada. Posteriormente foram estratificadas durante seis semanas a 4 °C, com humidade relativa próxima de 100%. Após a estratificação, as sementes foram semeadas em cusetes contendo uma mistura de turfa e perlite e mantidas em câmara de crescimento a 24 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro.

No método *in vitro*, as sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaOCl, 1% (v/v)) durante 24 horas, seguidas de enxaguamento com água destilada esterilizada. A escarificação foi realizada mecanicamente por corte transversal do tegumento. As sementes foram colocadas em placas de *Petri* contendo meios de cultura previamente autoclavados durante 20 minutos, a 121 °C e 1,1 psi. Foram utilizados os

meios MS (Murashige & Skoog, 1962), ½ MS (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg, 1968), QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) e DKW (Driver & Kuniyuki Walnut, 1984), todos suplementados com 30 g/L de sacarose e 7 g/L de Agar. Após a sementeira, as placas de *Petri* foram colocadas numa câmara de crescimento a 24 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Após 30 dias, avaliaram-se a taxa de germinação (%), o comprimento da parte radicular (cm), o comprimento da parte aérea (cm) e o número de folhas verdadeiras (nº) (fig. 1).

Para a análise estatística foram realizadas análises univariadas para detetar as diferenças significativas nos diferentes tratamentos. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software PRIMER v6 (Clarke & Warwick, 2001) com o *software* complementar PERMANOVA (Anderson et al., 2008). A análise PERMANOVA foi conduzida em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis (Clarke & Green, 1988). A hipótese nula foi rejeitada a um nível de significância <0.05 (se o número de permutações fosse menor que 150, uma permutação de Monte Carlo p foram usadas). Sempre que foram detetadas interações significativas nos efeitos dos fatores (Tratamentos), estas foram examinadas usando comparações *a posteriori* (par a par), usando 9.999 permutações sob um modelo reduzido.

Resultados e Discussão

A análise comparativa da capacidade germinativa evidenciou uma acentuada variabilidade genotípica (fig. 2). As famílias provenientes de cruzamentos controlados (C), apresentaram as maiores taxas de germinação. Com uma taxa máxima de 51% destacam-se as famílias C12, C26 e C27, contrastando com os valores inferiores observados nas famílias W e CW.

A aplicação do método *in vitro* promoveu um aumento significativo da taxa de germinação, comprovando que o corte físico da semente é eficaz na redução da dormência mecânica das sementes. Embora tenha apresentado uma maior taxa de germinação, estes valores foram inferiores às taxas registadas por Roque *et al.* (2025). A presença de contaminação microbiológica observada em algumas famílias contribuiu para esta redução, uma vez que a utilização de sementes já contaminadas antes da extração, se traduziu diretamente em menores taxas de germinação.

A família C16 destacou-se ao apresentar uma taxa de germinação de 73%, considerando todos os meios de cultura utilizados, sendo a família com a maior taxa apresentada. Este resultado evidencia a importância do controlo das condições ambientais e da composição nutricional do meio na otimização da germinação.

Entre as famílias C12 e C15, ambas avaliadas nos dois métodos, destaca-se a família C12, que se demonstrou ser superior em ambos os métodos, demonstrando uma maior aptidão germinativa independente do método utilizado.

Relativamente aos parâmetros biométricos (fig. 3), as plântulas obtidas por germinação *ex vitro* apresentaram maior alongamento vegetativo, traduzido em maiores comprimentos da parte aérea e do sistema radicular.

O método *in vitro* destacou-se por promover um maior número de folhas verdadeiras devido ao reduzido alongamento dos entrenós, observado ao longo da germinação. Adicionalmente, as plântulas obtidas por este método apresentaram um comprimento radicular inferior quando comparadas com as germinadas *ex vitro*, o que pode ser explicado pela menor disponibilidade de espaço para o crescimento das raízes (*in vitro*: placas de Petri; *ex vitro*: cuvettes) e pela composição dos diferentes meios de cultura.

Ao contrário do que se verificou nas germinações *ex vitro*, W7 apresentou um comprimento radicular maior, com 7,03 cm, devido à baixa densidade de raízes. No método *in vitro* a família C29 destacou-se com um comprimento médio de 5,39 cm. De entre os meios de cultura testados, B5 e MS revelaram-se os mais favoráveis ao desenvolvimento radicular.

Na biometria da parte aérea *ex vitro*, a família W9 foi significativamente o maior comprimento médio (1,71 cm). No método *in vitro*, a família C29 destacou-se novamente, com um comprimento médio da parte aérea de 0,83 cm, sendo o meio ½MS o que promoveu melhores resultados.

Quanto ao número de folhas verdadeiras, no método *ex vitro* não se observaram diferenças significativas entre famílias. Em contraste, no método *in vitro* as famílias C15, C24 e C29 apresentaram um maior número de folhas verdadeiras, (6 folhas) sendo o meio DKW o que mais contribuiu para este parâmetro.

Conclusões

A eficiência germinativa e o desenvolvimento inicial das plântulas de amora dependem do método de germinação e do genótipo avaliado, podendo dizer-se que ambos os métodos são aplicáveis em programas de melhoramento genético. O método *ex vitro* apresentou maior uniformidade entre os cruzamentos, embora associado a uma menor eficiência germinativa e à necessidade de um elevado número de sementes. Por sua vez, o método *in vitro* revelou-se vantajoso quando se dispõe de um número reduzido de sementes e quando se pretende maximizar as taxas de germinação e o vigor inicial das plântulas. No entanto, este método é mais dispendioso e requerer maior especialização técnica quando comparado com o método *ex vitro*.

Referências Bibliográficas

- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods*. PRIMER-E.
- Clarke, K. R., & Green, R. H. (1988). Statistical design and analysis for a “biological effects” study. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 213–226. <https://doi.org/10.3354/meps046213>
- Clarke, K. R., & Warwick, R. M. (2001). *Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation* (2nd ed.). PRIMER-E.
- Driver, J. A. & Kuniyuki, A. H. (1984) *In Vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience*, 19, 507-509.
- Finn, C. E., & Clark, J. R. (2017). *Cultivar development and selection*. CABI.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Mendes, C. I. D. (2022). *Germinação in vitro de sementes de framboesa e camarinha* [Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 473-497.
- Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 78: 437-442.
- Roque, M. F., Sabbadini, S., Valdivieso, T., Mota, M., Oliveira, P. B., & Mezzetti, B. (2025). Estabelecimento *in vitro* de espécies de amora silvestre e framboesa preta. *Vida Rural*, 46-54.

Wada, S., Kennedy, J. A., & Reed, B. M. (2011). Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*, 130: 762-768. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.023>

Quadros e Figuras



Figura 1 - Obtenção dos resultados de germinação no método *ex vitro*. Medição do comprimento radicular e da parte aérea e contagem do número de folhas verdadeiras nos diferentes métodos, após 30 dias.

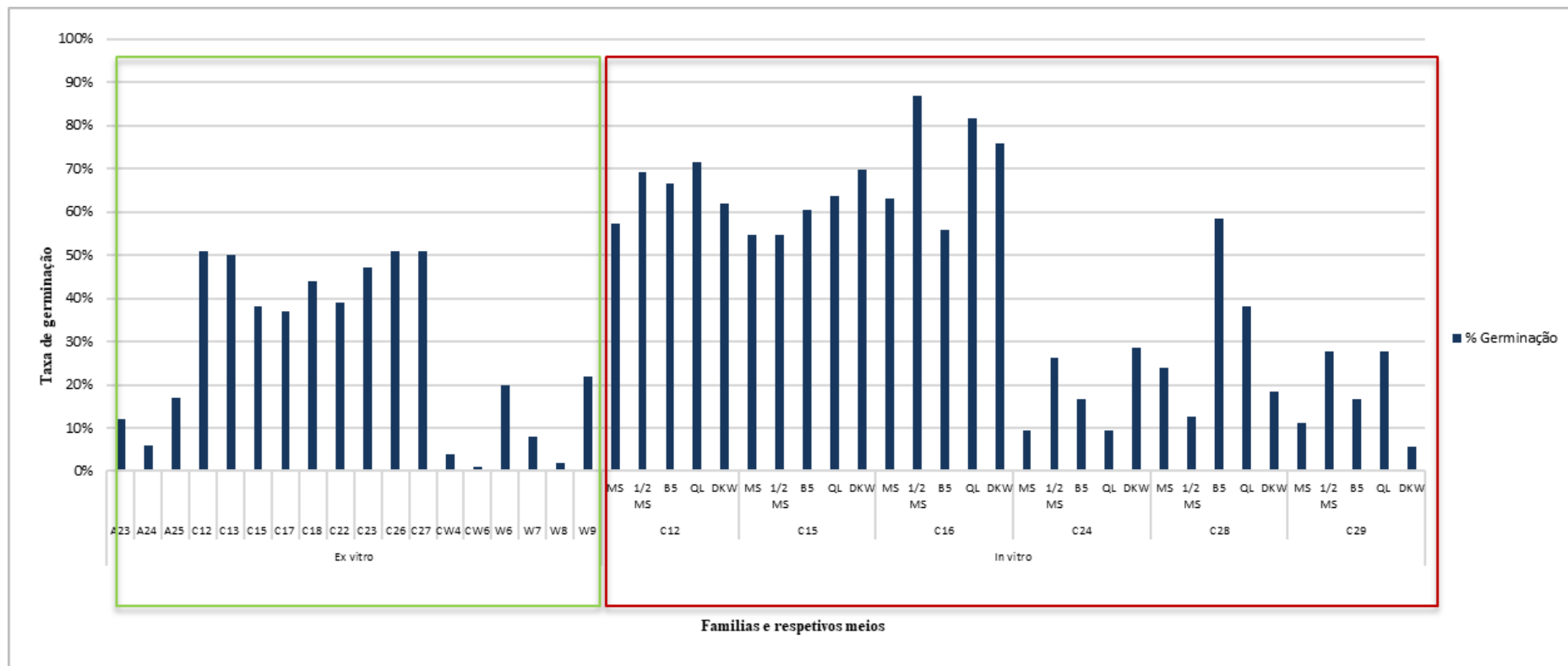


Figura 2 – Taxas de germinação obtidas nas diferentes famílias e meios, no método *ex vitro* e *in vitro*.

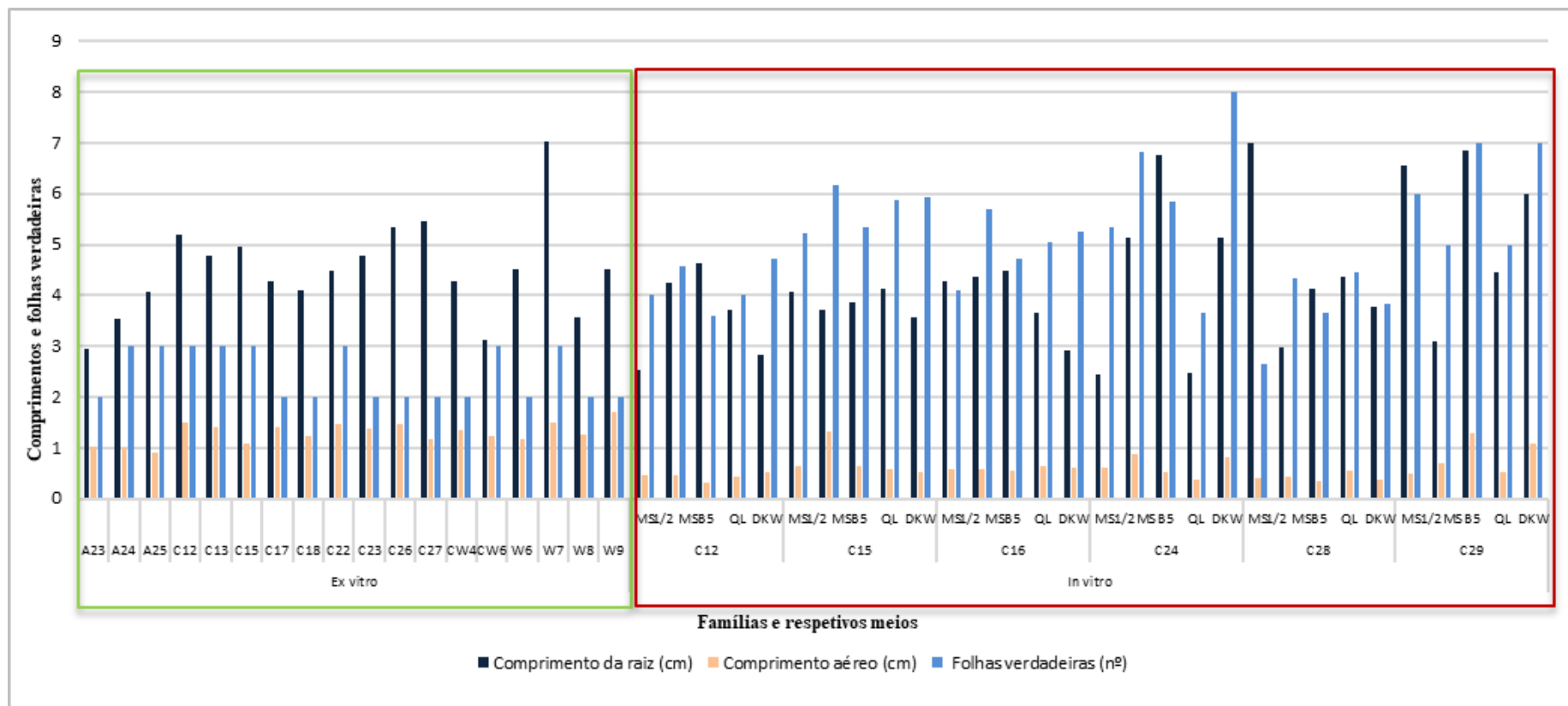


Figura 3 - Comprimento e número de folhas verdadeiras obtidos nas diferentes famílias e meios, no método *ex vitro* e *in vitro*.



Sessão II

Tecnologias de produção face às alterações climáticas

Estudo da redução da dotação de rega e do reaproveitamento da água de drenagem, no cultivo de framboesa em substrato

Jéssica Gomes¹, Henrique Ribeiro¹, Pedro B. Oliveira^{1,2}

¹Centro de Investigação LEAF, Laboratório Associado TERRA, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras.

Resumo

Este estudo propõe duas estratégias para reduzir o volume de água de rega no cultivo de framboesa (*Rubus idaeus* L.) em substrato (fibra de coco), sem comprometer a produtividade das plantas. Avaliou-se a biometria e a produção das plantas submetidas às modalidades: Controlo (fertirrega com o volume usual de solução nutritiva), Corte (fertirrega com redução de 30% do volume de solução nutritiva), e Recirculada (fertirrega com substituição de 30% da solução nutritiva por drenados). Além disso, analisou-se a composição das soluções drenadas em cada modalidade.

Os resultados mostraram que as plantas da modalidade Corte foram mais eficientes no uso dos nutrientes, enquanto as soluções drenadas da modalidade Recirculada apresentaram condutividades elétricas (CE) mais elevadas. No entanto, o crescimento vegetativo das plantas foi semelhante em todas as modalidades, com produção igual de matéria seca. Embora tenha havido diferenças na produção total estimada, o Índice de Colheita (IC) indicou que as plantas mostraram a mesma eficiência na conversão de matéria seca em produto comercializável.

Palavras-chave: Corte, recirculada, fertirrega, solução nutritiva, drenados.

Abstract

This study proposes two strategies to reduce the volume of irrigation water in raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivation in substrate (coconut fiber) without compromising plant productivity. The biometry and production of plants subjected to the following modalities were evaluated: Control (fertigation with the usual volume of nutrient solution), Cut (fertigation with a 30% reduction in the volume of nutrient solution), and Recirculated (fertigation with 30% of the nutrient solution replaced by drained water). In addition, the composition of the drained solutions in each treatment was analyzed.

The results showed that plants in the Cut treatment were more efficient in their use of nutrients, while the drained solutions from the Recirculated treatment had higher electrical conductivities (EC). However, the vegetative growth of the plants was similar in all modalities, with equal dry matter production. Although there were differences in estimated total production, the Harvest Index (HI) indicated that the plants showed the same efficiency in converting dry matter into marketable products.

Keywords: Cut, recirculated, fertigation, nutrient solution, drained.

Introdução

Os pequenos frutos produzidos no Sudoeste Alentejano, Algarve e Ribatejo, têm condições edafoclimáticas, que são fortemente marcadas pela influência atlântica, altamente favoráveis à produção de fruta de alta qualidade e intenso sabor (Lusomorango, s. d.).

A gestão eficiente e eficaz da rega é fundamental em todas as culturas agrícolas regadas, e em particular na framboesa devido ao seu ciclo de desenvolvimento muito rápido e elevadas exigências hídricas, sobretudo nas fases de floração e frutificação (Roseiro, 2017, citado por AJAP, 2017).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar estratégias para reduzir o volume de água na rega da cultura da framboesa em substrato (fibra de coco), mantendo o crescimento, o desenvolvimento vegetativo, a produção e a qualidade das framboesas obtidas. Para tal as duas estratégias em estudo são: redução em 30% do volume de água aplicado durante todo o ciclo cultural da framboesa face à prática atual; reincorporar um volume de água de drenagem correspondente a 30% do consumo atual de água da cultura, reduzindo, assim, as necessidades de água “fresca”. Nesta estratégia, pretende-se, ainda, demonstrar que a recolha e o reaproveitamento da água de drenagem e dos nutrientes nela contidos, permite reduzir o consumo de adubos químicos.

Materiais e Métodos

O ensaio realizou-se no Centro de Investigação para a Sustentabilidade, Polo de Inovação da Fataca, na região de Odemira, no litoral alentejano (37°34'55.4''N 8°44'22.6''W). Foram utilizadas plantas de framboesa remontante da cultivar Reyna™ da Driscoll's®, que foram cultivadas em túnel no ciclo de primavera, em vasos de 7 L de capacidade contendo fibra de coco, com sistema de rega gota a gota (1 gotejador por vaso com um débito de 3 L/h) e aplicação de nutrientes através da água de rega (fertirrega automatizada pelo software de programação KNITINK).

Para desenvolver este ensaio foram usados 3 túneis, cada um com 3 linhas referente a cada uma das 3 modalidades de estudo:

- “Controlo”, fertirrega com o volume usual de solução nutritiva;
- “Corte”, fertirrega com redução de 30% do volume de solução nutritiva. Uma rega deficitária controlada, estabelecida em função da fenologia da cultura, dos aspetos fisiológicos da resposta das plantas ao défice hídrico e do clima (temperatura e HR);
- “Recirculada”, fertirrega com substituição de 30% da solução nutritiva por drenados. Estabeleceu-se como limiar o valor de 4 mol L⁻¹ de cloro (Cl) e de sódio (Na), a fim de determinar o volume de água dos drenados filtrada a ser reintegrada no sistema.

Análise da água de rega da solução nutritiva e dos drenados

Para as análises estabeleceu-se a recolha de amostras aquando da mudança da solução nutritiva (SN), tendo-se recolhido amostras: da água da charca; da água do reservatório de drenados geral filtrada; das soluções nutritivas injetadas por modalidade; das soluções drenadas por modalidade (3 dias seguidos).

Os bicarbonatos (HCO₃⁻) foram quantificados por volumetria, com titulação com HCl 0,05 M (Almeida, 2010). Os cloretos foram quantificados pelo método de Mohr (Almeida, 2010). A quantificação do azoto nítrico (NO₃⁻) e do azoto amoniacal (NH₄⁺) foi feita por espectrofotometria de absorção molecular num espectrofotómetro de fluxo segmentado (SKALAR, SANplus System, Holanda). Os restantes elementos foram

quantificados por espectrofotometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), num ICP-OES de marca Unicam, modelo iCAP7000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachuset, Estados Unidos).

Biometria e análise de produção

Realizaram-se análises biométricas periódicas das plantas, desde a transplantação até à colheita. Na primeira análise recolheram-se 10 plantas, à transplantação. Posteriormente recolheram-se 3 vasos por modalidade, de forma aleatória, na fase vegetativa (em 28/05 e 2/07) e na queda da pétala (06/08). Contabilizaram-se apenas como laterais as ramificações com mais de 20 cm de comprimento.

A colheita teve início no dia 22 de agosto e foi realizada diariamente. Para estimar a produção, recolheram-se 3 vasos por modalidade no dia 10 de setembro e procedeu-se à contagem do número de botões, flores, frutos e frutos colhidos, tanto do caule principal como das ramificações laterais, e registou-se o peso fresco de 20 frutos (g).

Com o objetivo de avaliar a produção potencial, foi calculado o índice de colheita (IC, adimensional), obtido dividindo o rendimento das estruturas reprodutivas (botões, flores, frutos e frutos colhidos) pela biomassa total (Donald & Hamblin, 1976; Hay, 1995; Sinclair, 1998, citado por Asefa, 2019).

Delineamento experimental e análise estatística

O ensaio foi delineado em blocos causalizados, os dados obtidos sujeitos a análise de variância (ANOVA) e, quando se revelou significativa, submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$) através do software Statistix 9 (Analytical Software, EUA).

Resultados e Discussão

Consumos de água

O ensaio decorreu entre 17 de abril e 16 de setembro. No Quadro 1 verifica-se que, nas três modalidades, o volume de água previsto para este ensaio foi atingido. Os volumes mensais de água drenada por modalidade mostram que o volume drenado é maior na modalidade Controlo em comparação com a modalidade Corte, como esperado. Mesmo com a redução do volume de água na modalidade Corte, ainda ocorre perda por drenagem. Na modalidade Recirculada, os volumes drenados são superiores aos do Controlo.

Durante o ensaio, conseguiu-se reduzir em 23% o volume de água aplicado ao longo de todo o ciclo cultural da framboesa e substituir 30% do volume usual de solução nutritiva por drenados. No decorrer do período de estudo, observou-se uma percentagem de solução drenada de 25%.

Composição das soluções drenadas

Nas soluções drenadas (Quadro 2), observou-se uma tendência de redução do pH na modalidade Recirculada, com diferenças significativas para as modalidades Controlo e Corte, na amostragem de 10 de agosto. Esta redução poderá ter sido devida à tendência para um menor teor de bicarbonatos na modalidade Recirculada.

A condutividade elétrica (CE) é uma medida indireta da salinidade (Louro & Reis, 2020). No Quadro 2, observa-se que a CE das soluções drenadas aumentou ao longo do ciclo da cultura da framboesa. Na modalidade Recirculada, como parte da solução nutritiva foi sendo substituída por drenados, a CE foi, significativamente mais alta nas

duas últimas amostragens. No final do ensaio, registou-se salinidade elevada nas três modalidades, o que pode dificultar a absorção de água pelas plantas.

Por último, verifica-se no Quadro 2 que, nas duas últimas fases do ensaio, os teores de Na e Cl aumentaram em todas as modalidades, com valores tendencialmente superiores na modalidade Recirculada (significativo em 7 de julho), contribuindo para o aumento da salinidade do substrato.

Segundo Oliveira (2021), a framboesa prefere o azoto na forma de ião de nitrato (NO_3^-) em vez de ião de amónio (NH_4^+), pelo que os teores mais elevados de N-NO_3^- nas soluções drenadas apresentadas no Quadro 3 devem-se ao seu maior teor nas soluções nutritivas.

No Quadro 3, observam-se teores mais elevados de ião de nitrato na modalidade recirculada, que, por sua vez, apresenta o maior volume de solução drenada (Quadro 1), e maior concentração de nitrato na solução nutritiva devido à injeção de drenados. Assim, embora o NO_3^- esteja mais disponível para as plantas, também é o mais suscetível a ser perdido por lixiviação (Oliveira, 2021). O mesmo se verifica em relação aos restantes macronutrientes.

Na modalidade Corte, os teores de nutrientes são geralmente semelhantes aos de Controlo, especialmente para fósforo (P) e potássio (K), sem diferenças significativas, exceto na última data de amostragem, em que a modalidade Corte apresentou teores significativamente mais baixos de P e K (Quadro 3). Contudo, a modalidade Corte é também a que apresenta menores volumes de solução drenada (Quadro 1), mas a solução drenada desta modalidade não apresentou maior concentração de nutrientes, indicando que as plantas da modalidade Corte utilizaram melhor os nutrientes, com menor perda nos drenados.

Avaliação do crescimento das plantas

O crescimento das plantas foi avaliado em função do diâmetro, comprimento e número de laterais das plantas, bem como do diâmetro e o comprimento das ramificações laterais.

Na amostragem de 17 de abril (à transplantação), o desvio padrão do diâmetro e do comprimento das plantas, revela homogeneidade inicial das plantas (Quadro 4).

A análise estatística dos dados indicou, ainda, que as modalidades não influenciaram significativamente o crescimento vegetativo das plantas (Quadro 4). A exceção foi a 28 de maio, com o comprimento do lançamento principal das plantas da modalidade Recirculada a ser superior ao do controlo. Nessa fase, as plantas da modalidade Recirculada estavam a receber o mesmo volume de água, mas uma maior concentração de nutrientes.

De modo geral, a 2 de julho o diâmetro das plantas atingiu cerca de 10 mm, nas três modalidades, aumentando para 16-18 mm à queda da pétala. O comprimento do lançamento principal a 2 de julho foi de cerca de 0,8 m, atingindo 1,7-1,9 m na queda da pétala, podendo chegar aos 2 m de altura (Oliveira *et al.*, 2007). O número de lançamentos laterais foi semelhante entre as modalidades, atingindo 8 a 10 laterais por planta na queda da pétala, com diâmetros entre 5 e 6 mm e comprimentos entre 0,5 e 0,6 m (Quadro 4). Assim, apesar da redução de 41,4 m³ no volume de água na modalidade Corte (Quadro 1), com 19 m³ reduzidos em agosto, período de maior exigência hídrica (Roseiro, 2017, citado por AJAP, 2017), e apesar das soluções nutritivas mais concentradas na modalidade Recirculada, não houve impacto significativo no crescimento vegetativo das plantas. Ambas as modalidades (Corte e Recirculada) desenvolveram-se de forma semelhante ao Controlo.

Pesos secos da parte aérea e radicular

Na primeira avaliação na fase vegetativa (fig. 1), as plantas da modalidade Recirculada apresentaram pesos secos ligeiramente superiores nas folhas, caule/lançamentos e raiz, possivelmente devido à maior concentração de nutrientes. Isso resultou em maior biomassa acumulada. As plantas da modalidade Corte, embora em stress, mostram pesos secos ligeiramente superiores nas folhas e no caule/lançamentos em comparação com o Controlo. Apesar de uma altura ligeiramente superior (Quadro 4), os caules eram mais finos e maiores nas plantas de corte, enquanto no controlo, os caules eram menores e mais grossos. Assim, as plantas da modalidade Corte conseguiram manter um bom desenvolvimento foliar e radicular. Na segunda avaliação na fase vegetativa (fig. 1), as raízes das plantas do Controlo e Corte alcançaram o peso seco das plantas da modalidade Recirculada.

À queda da pétala (fig. 2), os pesos secos foram semelhantes entre as modalidades. O parâmetro dos botões, flores e frutos foi ligeiramente inferior nas plantas da modalidade Controlo, possivelmente devido ao facto de as plantas estarem ainda numa fase mais vegetativa em comparação com as de Corte e Recirculada, que estavam mais avançadas.

Ao longo do ciclo, as diferenças entre modalidades diminuíram e, como não houve diferenças significativas, conclui-se que as plantas das três modalidades produziram quantidades semelhantes de matéria seca.

Avaliação da produção potencial estimada

Embora a modalidade Controlo tenha apresentado mais botões, flores, e frutos, teve o menor número de frutos colhidos, possivelmente devido ao atraso fenológico já mencionado (Quadro 5). A modalidade Corte mostrou o menor número de frutos potenciais, com menos frutos nas plantas, enquanto a recirculada teve um número de frutos potenciais ligeiramente superior à modalidade Corte, mas com menos botões e flores nas plantas. No entanto, o número total de estruturas não diferiu significativamente entre as modalidades.

Quanto ao peso fresco por fruto (Quadro 5) foi igual nas modalidades Controlo e Corte, e ligeiramente inferior na modalidade Recirculada, mas sem diferenças significativas. A produção total estimada foi de 18,7 t/ha no controlo, na corte houve uma redução de 10% na produção, com 16,8 t/ha, e na recirculada uma produção de 15,9 t/ha, com uma redução de 15% em relação ao controlo.

O índice de colheita (IC) foi semelhante entre as três modalidades, com uma ligeira redução na modalidade Corte, mas sem diferenças significativas (Quadro 6). Isso indica que a proporção entre a produção seca total e a biomassa seca total foi mantida de forma semelhante. O índice de colheita descreve a capacidade da planta de alocar os assimilados nas partes reprodutivas formadas (Wnuk et al., 2013). Além disso, pode ser definido como a eficiência fisiológica e a capacidade de uma cultura de converter a matéria seca total em rendimento económico (Lashkari et al., 2011). Assim, um IC de aproximadamente 0,6 sugere que as plantas direcionaram grande parte da matéria assimilada para a formação de partes reprodutivas (Wnuk *et al.*, 2013), investindo mais na produção reprodutiva do que no crescimento vegetativo no final do ensaio. Embora tenha havido diferenças na produção total estimada, o IC mostra que as plantas foram igualmente eficientes na conversão da matéria seca em produto comercializável.

Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que as duas estratégias de redução do consumo de água no cultivo de framboesa são viáveis. Tanto a redução de 23% na dotação total de rega (modalidade Corte), como a substituição de 30% da solução nutritiva por drenados (modalidade Recirculada), permitiram manter o crescimento e a produção, tendo, assim, um impacto significativo ao nível da sustentabilidade na produção de framboesa.

São estratégias que contribuem para a redução do consumo de um recurso escasso, a água, o decréscimo do uso de adubos químicos e a diminuição do risco de contaminação das “massas de água” naturais com as águas de drenagem.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Investigação para a Sustentabilidade a utilização do campo experimental para a realização deste ensaio.

Referências Bibliográficas

- AJAP. (2017). Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes. *Pensar Global pela Competitividade, Ambiente e Clima*, pp. 12-34.
- Almeida, O. Á. (2010). Qualidade da Água de Irrigação. pp. 148-154.
- Asefa, G. (2019). The Role of Harvest Index in Improving Crop Productivity: A Review. *Journal of Natural Sciences Research* 9: 6, 24-28.
- Lashkari, M., Madani, H., Ardakani, M. R., Golzardi, F., & Zargari, K. (2011). Effect of Plant Density on Yield and Yield Components of Different Corn (*Zea mays* L.) Hybrids. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 10: 3, 450-457.
- Louro, M., & Reis, M. (2020). *Manual de Cultivo sem solo*. Porto: Quântica Editora.
- Lusomorango. (s. d.). *A organização*. Obtido de Lusomorango: <https://lusomorango.pt/quem-somos/>
- Oliveira, P. B. (2021). *Manual de Boas Práticas de Fruticultura, 7.º Fascículo / Framboesa*. Frutas legumes e Flores em parceria com INIAV, I.P. (Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade) e COTR.
- Oliveira, P. B., Valdivieso, T., Esteves, A., Mota, M., & Fonseca, L. L. (2007). A planta de framboesa Morfologia e fisiologia . *Folhas de Divulgação AGRO 556 N° 1 (INRB / ex-EAN/DPA)*.
- Wnuk, A., Górný, A. G., Bocianowski, J., & Kozak, M. (2013). Visualizing harvest index in crops . *Communications in Biometry and Crop Science* 8: 2, 48-59.

Quadros e Figuras

Quadro 1 - Volumes mensais do consumo de água (m³) do objetivo e medido para as três diferentes modalidades (Controlo, Corte e Recirculada), nas distintas fases fenológicas, de 17 de abril a 16 de setembro; a água drenada injetada (%) na modalidade Recirculada; e os volumes dos drenados (m³) para as três modalidades durante o período mencionado.

Modalidade		Controlo			Corte			Recirculada			
		Consumo (m ³)		Drenados (m ³)	Consumo (m ³)		Drenados (m ³)	Consumo de drenados (%)	Consumo (m ³)		Drenados (m ³)
Fenologia	Mês	Objetivo	Medido		Objetivo	Medido			Objetivo	Medido	
Vegetativo	Abril	4,33	4,75	1,48	4,06	4,28	1,08	40%	5,13	4,66	1,48
	Mai	7,14	9,92	5,35	6,97	7,29	2,44	30%	17,05	17,23	9,73
	Junho	23,02	21,76	6,22	19,97	20,02	3,79	20%	25,02	25,00	11,11
Botão	Julho	71,34	67,62	16,07	48,35	50,08	12,75	30%	51,10	50,26	16,39
Queda da Pétala	Agosto	84,09	80,36	15,76	65,87	61,32	9,47	30%	79,28	73,88	17,35
Colheita	Setembro	35,21	34,01	6,89	25,75	26,20	4,21	30%	34,52	38,43	8,65
Total		225,13	218,43	51,77	170,97	169,20	33,73	-	212,10	209,46	64,71

Quadro 2 - Valores médios do pH, da condutividade elétrica (CE, mS/cm), dos bicarbonatos (HCO₃⁻, mg/L), dos cloretos (Cl⁻, mg/L) e do sódio (Na, mg/L) nas soluções drenadas nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada) em 4 datas de amostragens.

Data	Modalidade	pH	CE (mS/cm)	HCO ₃ ⁻ (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	Na (mg/L)
05/mai	Controlo	6,47	0,76	20,01	25,81	14,48
	Corte	6,46	1,03	18,18	57,78	26,82
	Recirculada	6,29	1,57	23,93	59,77	40,97
03/jun	Controlo	6,41	1,43	27,33	85,34	55,78
	Corte	6,32	1,72	27,19	101,01	63,77
	Recirculada	6,40	1,60	20,64	85,59	58,72
07/jul	Controlo	6,74	1,68 B	40,93	165,15 B	106,75 B
	Corte	6,69	2,01 B	50,87	199,98 B	124,28 B
	Recirculada	6,47	3,55 A	51,52	330,42 A	209,23 A
19/ago	Controlo	6,48 A	2,75 AB	64,07	241,27	155,66
	Corte	6,36 A	2,12 B	50,08	252,69	160,12
	Recirculada	6,03 B	3,47 A	44,69	334,27	209,74

Em cada data e em cada coluna, valores com letra diferente diferem significativamente entre si (Teste de Tukey com $\alpha = 0,05$).

Quadro 3 - Valores médios da concentração (mg/L) de macronutrientes (Azoto, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻; Fósforo, P; Potássio, K; Cálcio, Ca; Magnésio, Mg; Enxofre, S) nas soluções drenadas das três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada) em 4 datas de amostragens.

Data	Modalidade	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	S (mg/L)
05/mai	Controlo	2,12	68,52 B	18,47	88,55	51,89	18,00	30,22
	Corte	2,43	99,01 AB	21,52	138,41	77,71	26,33	41,08
	Recirculada	4,24	148,11 A	27,07	160,10	122,17	36,58	66,23
03/jun	Controlo	6,46	65,88	16,39	157,00	84,16	36,87	50,31
	Corte	3,76	81,73	17,79	205,18	79,16	40,46	51,79
	Recirculada	5,58	74,35	14,91	152,75	91,54	37,99	56,65
07/jul	Controlo	1,17	48,15 B	20,69	153,56	80,88 B	40,75 B	76,60
	Corte	1,11	65,07 B	24,84	182,59	103,22 B	47,83 B	82,63
	Recirculada	1,47	143,48 A	33,84	325,54	208,67 A	79,75 A	135,98
19/ago	Controlo	0,17	74,89 B	30,40 A	202,88 A	172,12	90,49	149,87
	Corte	0,17	45,84 C	16,59 B	83,20 B	116,35	68,20	108,70
	Recirculada	0,17	100,66 A	20,08 B	246,88 A	197,57	87,97	143,67

Em cada data e em cada coluna, valores com letra diferente diferem significativamente entre si (Teste de Tukey com $\alpha = 0,05$).

Quadro 4 - Valores médios do diâmetro (\emptyset , mm), comprimento (L, m) e número de laterais (Nº laterais) do lançamento principal e valores médios do diâmetro (\emptyset , mm) e do comprimento (L, m) dos laterais, nas 4 datas de amostragem e nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada).

Fase Fenológica	Data	Modalidade	Lançamento principal			Lançamentos laterais	
			\emptyset (mm)	L (m)	Laterais (número)	\emptyset (mm)	L (m)
Plantação	17/abr*	Tamponização	1,68	0,11	-	-	-
		σ	0,42	0,02	-	-	-
Vegetativo	28/mai	Controlo	3,75	0,12 B	-	-	-
		Corte	4,11	0,16 AB	-	-	-
		Recirculada	4,68	0,18 A	-	-	-
Vegetativo	02/jul	Controlo	10,46	0,88	2,67	5,89	0,30
		Corte	10,62	0,87	2,67	6,90	0,43
		Recirculada	9,54	0,82	2,67	6,08	0,33
Queda da Pétala	06/ago	Controlo	18,26	1,91	8,50	6,57	0,65
		Corte	18,67	1,80	8,67	6,64	0,53
		Recirculada	16,62	1,73	10,17	6,11	0,54

Em cada data e em cada coluna, valores com letra diferente diferem significativamente entre si (Teste de Tukey com $\alpha = 0,05$).

*Não foi realizado teste estatístico, sendo apresentados as médias e os desvios padrão do diâmetro (\emptyset , mm) e do comprimento (L, m) de 10 plantas obtidas à transplantação, não estando sob os efeitos das modalidades.

Quadro 5 - Valores médios por planta do número de botões e flores, de frutos, de frutos colhidos e de frutos potenciais, do peso fresco do fruto (g/fruto) e da produção total estimada (ton/ha) a 10/09/2025, durante a fase de produção, nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada).

Modalidade	Botões e Flores (número)	Frutos (número)	Frutos colhidos (número)	Frutos potenciais (número)	P _{fresco} fruto (g/fruto)	Produção total estimada (ton/ha)
Controlo	311	246	40	596	4,2	18,7
Corte	272	199	63	534	4,2	16,8
Recirculada	247	236	69	552	3,9	15,9

Em cada coluna não se observaram diferenças significativas entre modalidades (ANOVA com $p > 0,05$).

Quadro 6 - Valores médios do peso seco do fruto (g/fruto), do peso seco total (g/planta) e do índice de colheita (IC, adimensional) a 10/09/2025, durante a fase de produção, nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada).

Modalidade	P _{seco} fruto (g/fruto)	P _{seco} Total (g/planta)	IC
Controlo	0,55	515,65	0,62
Corte	0,58	496,48	0,59
Recirculada	0,51	459,00	0,62

Em cada coluna não se observaram diferenças significativas entre modalidades (ANOVA com $p > 0,05$).

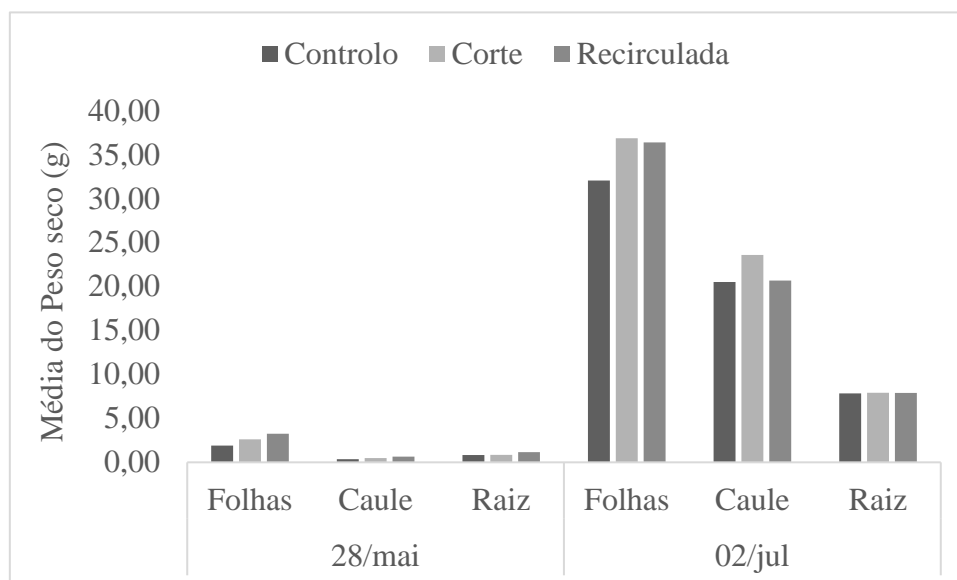


Figura 1 - Valores médios dos pesos secos (g) das folhas, do caule e da raiz nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada) na fase vegetativa, a 28 de maio e a 2 de julho de 2025 (em cada data e para cada componente da biomassa - folhas, caule ou raiz - não se observaram diferenças significativas entre modalidades (ANOVA com $p > 0,05$)).

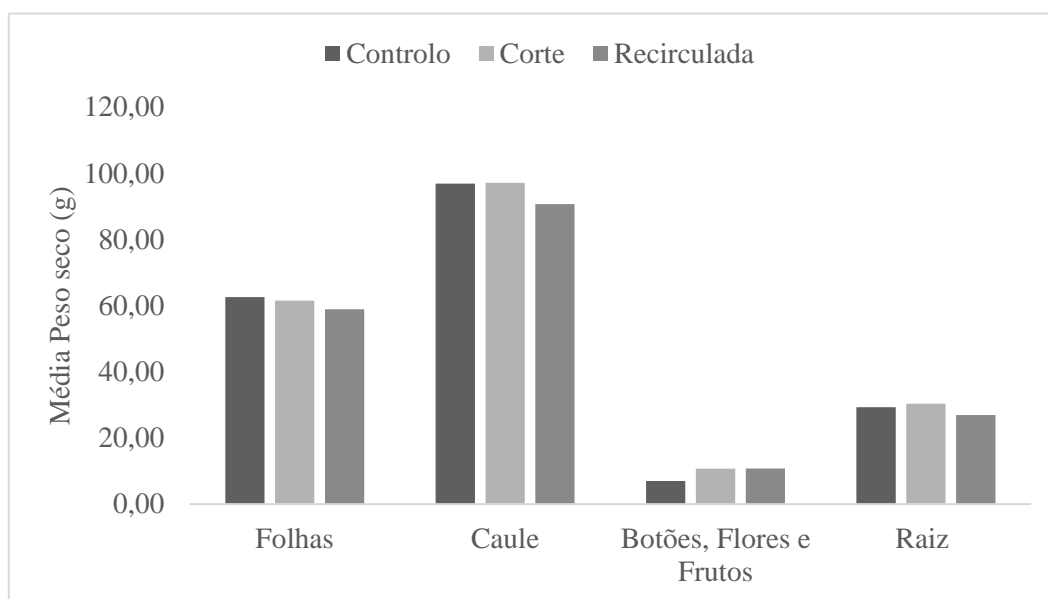


Figura 2 - Valores médios dos pesos secos (g) das folhas, do caule e dos botões, flores e frutos, e da raiz nas três modalidades (Controlo, Corte e Recirculada) na queda da pétala, a 6 de agosto de 2025 (em cada data e para cada componente da biomassa - folhas, caule, botões, flores e frutos ou raiz - não se observaram diferenças significativas entre modalidades (ANOVA com $p > 0,05$)).

Potencial de produção de *Corema album* sob rega moderada

Pilar Pineda-Balbuena¹, Antonio José León González², Carmen Martín Cordero², María Cruz Díaz-Antunes Barradas¹, María Zunzunegui¹, Leonor Álvarez-Cansino¹

¹Department of Plant Biology and Ecology, Faculty of Biology, University of Sevilla – Avenida Reina Mercedes 6 41012 Sevilla, Spain;

²Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla – Avenida Reina Mercedes 6 41012 Sevilla, Spain.

Resumo

Corema album, um arbusto dioico endémico da Península Ibérica, produz pequenas bagas brancas com elevado valor nutricional e farmacêutico. Apesar de ainda pouco explorada comercialmente, a espécie tem vindo a atrair atenção como cultura alternativa aos pequenos frutos tradicionais, especialmente em regiões mediterrânicas onde a escassez de água é cada vez mais preocupante. Isto é particularmente relevante em zonas como Doñana (sul de Espanha), onde o uso de água para rega está a ser progressivamente restringido devido a preocupações ambientais e às alterações climáticas. Compreender as respostas desta espécie à limitação hídrica é fundamental para avaliar o seu potencial agrícola em cenários climáticos futuros.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e de crescimento de *C. album* à rega moderada, em comparação com uma rega abundante, durante o período de crescimento ativo.

Realizámos uma experiência em estufa com plantas em vaso sujeitas a tratamentos de rega controlada gravimetricamente, com fornecimento de água moderado e abundante de março a junho. Mediram-se parâmetros fotossintéticos (Φ PSII, Fv/Fm, taxa fotossintética líquida, taxa de transpiração, condutância estomática e eficiência do uso da água), crescimento vegetativo, teor total de compostos fenólicos e flavonoides, potencial hídrico da planta, potencial osmótico e rácios de isótopos estáveis.

As variáveis fisiológicas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de rega, indicando uma elevada capacidade da espécie para manter o desempenho fotossintético e o estado hídrico sob uma menor disponibilidade de água. Curiosamente, o crescimento vegetativo foi superior nas plantas com rega moderada, sugerindo uma possível resposta compensatória ao nível do crescimento. No que diz respeito aos compostos bioquímicos, não se observaram diferenças significativas na produção de fenóis ou flavonoides entre os tratamentos.

Estes resultados evidenciam o potencial de *Corema album* como cultura resiliente para a produção de pequenos frutos sob regimes de rega moderada. Apoiam, assim, a sua adequação para uma agricultura adaptada às alterações climáticas, particularmente em regiões mediterrânicas com crescente escassez de água e restrições ao uso de rega. A promoção de espécies alternativas como esta poderá contribuir para a diversificação e adaptação dos sistemas de produção de pequenos frutos num contexto de mudança ambiental.

Palavras-chave: Agricultura mediterrânica, cultura resiliente, rega restrita, cultivo sustentável, cultura alternativa de pequenos frutos.

Abstract

Corema album, a dioecious shrub endemic to the Iberian Peninsula, produces small white berries with high nutritional and pharmaceutical value. Although still underexploited commercially, it is gaining attention as an alternative crop to traditional red berries, particularly in Mediterranean regions facing increasing water scarcity. This is especially relevant in areas such as Doñana (southern Spain), where water use for irrigation is increasingly restricted due to environmental concerns and climate change. Understanding the water limitation responses of this species is crucial to assess its agricultural potential under future climatic conditions.

The main objective of this study was to assess the physiological, biochemical, and growth responses of *C. album* to moderate water irrigation compared to abundant irrigation during the active growing season.

We conducted a greenhouse experiment using potted plants subjected to gravimetrically controlled irrigation treatments, applying moderate and abundant water supply from March to June. We measured photosynthetic parameters (Φ PSII, Fv/Fm, net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, and water-use efficiency), vegetative growth, total phenolic and flavonoid content, plant water potential, osmotic potential, and stable isotope ratios.

Physiological variables showed no significant differences between the moderate and abundant irrigation treatments, indicating a high capacity for maintaining photosynthetic performance and water status under reduced water input. Notably, vegetative growth was greater in moderately irrigated plants, suggesting a possible compensatory growth response. Regarding biochemical traits, no significant differences were observed in the production of phenolic or flavonoid compounds between treatments.

These findings highlight the potential of *Corema album* as a resilient crop suitable for small fruit production under moderate irrigation regimes. This supports its suitability for climate-resilient agriculture, particularly in Mediterranean regions facing increasing water scarcity and irrigation restrictions. The promotion of such alternative species could contribute to the diversification and adaptation of berry production systems under changing environmental conditions.

Keywords: Mediterranean agriculture, resilient crop, restricted irrigation, sustainable cultivation, alternative berry crop

Introdução

O Parque Nacional de Doñana (Huelva, sudoeste de Espanha) é um ecossistema emblemático e altamente protegido, considerado uma das mais valiosas zonas húmidas da Europa. No entanto, a sua hidrologia é complexa e tem sido fortemente modificada pela intervenção humana ao longo do último século. Além disso, prevê-se que o aquecimento global agrave o problema da escassez de água nas regiões mediterrânicas, devido à diminuição da quantidade e frequência de precipitação e ao aumento da temperatura média (2–4°C) (Christensen et al., 2007; IPCC, 2013).

A nível global, a agricultura representa cerca de 70% do consumo de água doce disponível (FAO, 2021). Em áreas de clima mediterrânico, a irrigação desempenha um papel fundamental na manutenção de rendimentos adequados e na garantia de elevada qualidade das culturas (Cahn & Johnson, 2017). Huelva é reconhecida como a principal produtora de morango da Europa e a sexta a nível mundial. No entanto, desde a década de 1990 que existe um debate na região sobre como conciliar a produção agrícola com a

conservação ambiental (Ojeda & del Moral, 2004; CAGPDS, 2022). Neste contexto, a investigação sobre as respostas das plantas à seca tornou-se cada vez mais relevante na última década, salientando a necessidade de explorar alternativas que envolvam culturas resilientes, capazes de enfrentar os impactos de eventos extremos associados às alterações climáticas.

Corema album (L.) D. Don. (Ericaceae) é um arbusto dioico endémico da Península Ibérica. Distribui-se ao longo de toda a costa atlântica, desde o noroeste de Espanha (Galiza) até ao Estreito de Gibraltar, no Sul, com uma das suas populações mais abundantes localizada em Doñana (Valdés et al., 1987; Díaz-Barradas et al., 2000; Álvarez-Cansino et al., 2013). É uma espécie de elevado valor ecológico, capaz de se adaptar a uma ampla gama de temperaturas e condições ambientais, e os seus frutos possuem também um importante valor farmacológico e nutricional (Fuentealba et al., 2011; León et al., 2013; Alegria et al., 2022). Contudo, *C. album* está classificada como espécie vulnerável na Lista Vermelha regional das plantas vasculares ameaçadas da Andaluzia (Cabezudo et al., 2005). Este estatuto de conservação, aliado ao reconhecido valor nutricional e farmacológico dos seus frutos, aumentou o interesse científico nos últimos anos, com o objetivo de desenvolver protocolos eficazes de multiplicação para a sua regeneração e gestão sustentável.

Material e Métodos

O ensaio foi realizado na estufa do Centro de Investigação, Tecnologia e Inovação da Universidade de Sevilha (CITIUS) com 35 plantas adultas de *Corema album* com três anos, cultivadas em vasos de 5 L com substrato turfa:areia (2:1). Em março de 2024, as plantas foram distribuídas em dois tratamentos de irrigação: irrigação abundante (18 plantas, regadas até à capacidade de campo) e irrigação restrita (17 plantas, regadas a 4% da capacidade de campo durante 42 dias, seguidos de 3% durante 26 dias). Os volumes de água foram calculados gravimetricamente, pesando cada vaso e ajustando para o conteúdo relativo de água desejado (Sack, 2004).

As medições foram realizadas durante a época de crescimento e floração (março–junho). O estado fisiológico dos indivíduos foi avaliado semanalmente através de trocas gasosas, fluorescência e crescimento vegetativo. No final do ensaio, analisaram-se o potencial hídrico, potencial osmótico, composição isotópica e o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides para avaliar o estado hídrico e metabólico das plantas.

Todas as medições fisiológicas e bioquímicas foram realizadas com instrumentos e métodos padronizados. As trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram medidas com um analisador de trocas gasosas IRGA LI-6800 equipado com fluorómetro (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). O crescimento dos rebentos foi avaliado com um calibre em ramos marcados. Os conteúdos fenólicos e flavonóides foram determinados pelo método Folin–Ciocalteu (Waterhouse, 2009) e pela técnica de Lamaison & Carnat (Lamaison & Carnat, 1990), respetivamente. O potencial hídrico dos rebentos foi medido com câmara de pressão de Scholander, o potencial osmótico com osmómetro, e as análises de composição isotópica foram realizadas pelo Serviço Analítico do CITIUS.

Resultados e Discussão

O rendimento quântico máximo (F_v/F_m) não apresentou diferenças significativas entre irrigação moderada e abundante, nem ao meio-dia nem antes do amanhecer na ausência de luz (Wilcoxon, $p > 0,05$). Durante o ensaio, as plantas exibiram bom desempenho fisiológico, indicando funcionamento ótimo do aparelho fotossintético, com valores de F_v/F_m próximos do ótimo teórico de 0,83 e Φ_{PSII} entre 0,65 e 0,75,

consistentes com resultados prévios em várias espécies vegetais (Maxwell e Johnson, 2000).

De forma semelhante, as medições da taxa fotossintética líquida (A), taxa de transpiração (E) e eficiência no uso da água (WUE) não revelaram diferenças significativas entre tratamentos (Wilcoxon, $p > 0,05$), sugerindo que *C. album* mantém estas funções fisiológicas sob limitação hídrica moderada. Estes resultados são consistentes com investigações anteriores que documentaram a capacidade das espécies de plantas lenhosas mediterrânicas de manter função fotossintética estável sob stress (García-Plazaola et al., 2003; Flexas et al., 2002).

O estado hídrico das plantas, avaliado através dos potenciais hídrico (Ψ_w) e osmótico (Ψ_s), manteve-se semelhante entre tratamentos. Apesar de se esperar que a irrigação restrita conduzisse a valores mais negativos e induzisse stress hídrico, Ψ_w e Ψ_s foram comparáveis aos das plantas bem regadas, indicando que *C. album* mantém hidratação estável sob limitação hídrica moderada.

Em contraste, o crescimento dos ramos no final do ensaio mostrou diferenças significativas entre tratamentos, com maior crescimento vegetativo observado nas plantas submetidas a irrigação restrita (fig. 1). Isto poderá dever-se à capacidade compensatória de algumas plantas mediterrânicas, que aumentam o crescimento sob stress hídrico moderado para maximizar a captação de recursos, fenómeno conhecido como "compensação de crescimento" (Chaves et al., 2003; Valladares et al., 2005).

A análise de compostos bioativos foliares, incluindo flavonóides e fenóis, não revelou diferenças significativas entre tratamentos, indicando que a irrigação moderada não afetou a sua produção. Embora se esperasse que as plantas submetidas a stress hídrico acumulassem maiores níveis destes metabólitos como resposta defensiva, o conteúdo de flavonóides e fenóis manteve-se estável (Chaves et al., 2009; Munné-Bosch e Alegre, 2000). De forma semelhante, o conteúdo de carbono e azoto, assim como os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, sugerindo que *C. album* mantém alocação de biomassa, utilização de nutrientes e eficiência no uso da água sob limitação hídrica moderada, evidenciando a sua resiliência fisiológica e bioquímica.

Conclusões

A irrigação moderada não afetou negativamente *C. album*. Melhorou o crescimento vegetativo, manteve os níveis de flavonóides e fenóis e não alterou significativamente a composição isotópica nem o conteúdo elementar. Estes resultados destacam o elevado potencial de *C. album* como cultura resiliente e sustentável, capaz de se adaptar a condições de disponibilidade hídrica limitada.

Estas características reforçam o potencial desta espécie endémica ibérica como cultivo resistente em regiões mediterrânicas afetadas pelas alterações climáticas, com possíveis benefícios para a saúde humana, tornando *C. album* uma espécie de interesse tanto agrícola como farmacológico. Estudos futuros sob regimes de irrigação reduzida, incluindo secas mais longas ou intensas, ou combinadas com diferentes temperaturas e estádios fenológicos, são necessários para compreender melhor as respostas da espécie à seca e apoiar a sua conservação e gestão sustentável em habitats ameaçados.

Referências Bibliográficas

- Alegria, C., Jacinto, J., Giovanetti, M., Brás de Oliveira, P., Valdivieso, T., & Máguas, C. (2022, December). A camarinha foi para o campo, mas o sabor ficou na praia? En VI Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos, Oeiras, Portugal.

- Álvarez-Cansino, L., Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M. C., Correia, O., & Esquivias, M. P. (2013). Effects of temperature and rainfall variation on population structure and sexual dimorphism across the geographical range of a dioecious species. *Population Ecology*, 55, 135–146.
- Cabezudo, B., Talavera, S., Blanca, G., Salazar, C., Cueto, M., Valdés, B., Hernández Bermejo, J. E., Herrera, C. M., Rodríguez, D., Navas, D., & Valle, F. (2005). *Lista Roja de la Flora Vasculare de Andalucía*. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- CAGPDS (2022). Síntesis final de campaña. Frutos rojos. Campaña 2021/22. Observatorio de Precios y Mercados. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Junta de Andalucía.
- Cahn, M.D., Johnson, L.F., 2017. New approaches to irrigation scheduling of vegetables. *Horticulturae* 3, 28.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551-560.
- Christensen, J., Hewitson, B., Busuioc, A., Chen, A., Gao, X., Held, I., ... Whetton, P. (2007). Regional climate projections. In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, & K. Averyt (Eds.), *Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the Fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. xxx-xxx). Cambridge University Press.
- Díaz-Barradas, M. C., Correia, O., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Clavijo, A., Silva, P., Ferreira, S. (2000). Distribuição de sexos na espécie *Corema album* ao longo de um gradiente climático. *Revista de Biologia*, 18, 7–22.
- FAO (2021). WASAG Strategy for 2021 to 2024 - Turning water scarcity into opportunities for sustainable agriculture, food security and nutrition. Rome.
- Flexas, J., Escalona, J. M., & Medrano, H. (2002). Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Functional Plant Biology*, 29(4), 461-471.
- Fuentealba, J., Dibarrart, A. J., Fuentes-Fuentes, M. C., Saez-Orellana, F., Quiñones, K., Guzmán, L., Perez, C., Becerra, J., Aguayo, L. G. (2011). Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *Journal of Neuroscience Research*, 89, 1499–1508.
- García-Plazaola, J. I., Faria, T., Abadia, A., Abadia, J., Chaves, M. M., & Pereira, J. S. (2003). Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*, 54(388), 645-654.
- IPCC. (2013). Summary for Policymakers. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.*
- Lamaison J, Carnat A. Levels of principal flavonoids in flowers and leaves of *Crataegusmonogyna* Jacq and *Crataeguslaevigata* (Poiret) Dc (Rosaceae) *Pharm Acta Helv.* 1990; 65:315–20.

- León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Diaz Barradas, M. C., & Martín-Cordero, C. (2013). Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 58–63.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925–931.
- Ojeda, J.F., del Moral, L., 2004. Percepciones del agua y modelos de su gestión en las distintas fases de la configuración de Doñana. *Invest. Geográficas* 35, 25–44.
- Sack, L. (2004). Responses of temperate woody seedlings to shade and drought: do trade-offs limit potential niche differentiation? *Oikos*, 107(1), 110–127.
- Valdés, B., Talavera, S., & Fernández-Galiano, E. (1987). *Flora vascular de Andalucía occidental*. Ketres Editora.
- Valladares, F., & Percy, R. W. (2005). Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell & Environment*, 20(1), 25–36.
- Waterhouse, A. (2009). Folin–Ciocalteu micro method for total phenol in wine. Retrieved July 16, 2012.

Quadros e Figuras

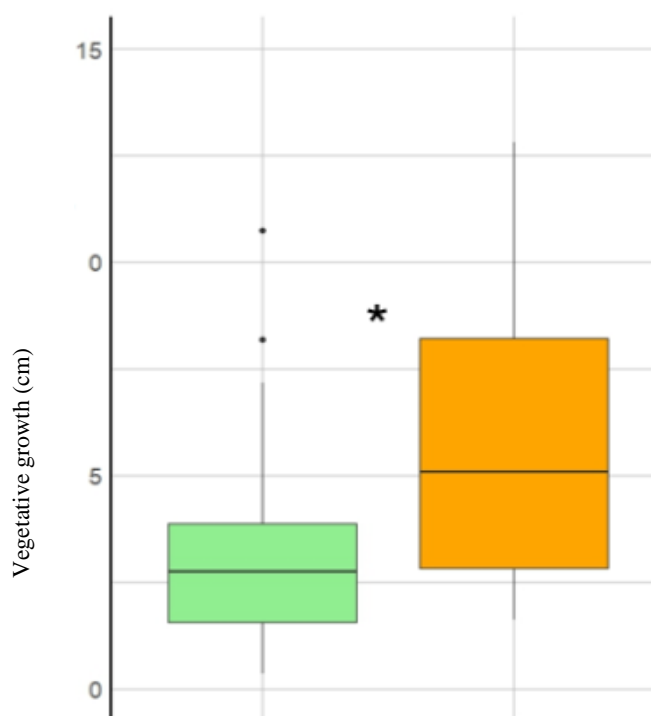


Figura 1 - Crescimento vegetativo em centímetros para os tratamentos de rega abundante e rega restrita.

Avaliação do efeito da micorrização na cultura de mirtilo

Daniel Vieira¹, Andreia Afonso², Ana Catarina Ribeiro², Fátima Oliveira²

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta dos Prados, 5000-801 Vila Real;

²Deifil Technology Lda., Rua do Talho 80 – Serzedelo, 4830-704 Póvoa de Lanhoso.

Resumo

O mirtilo é um fruto altamente valorizado devido às suas características morfológicas e elevado teor de compostos antioxidantes. Porém, esta cultura tem enfrentado desafios crescentes associados às alterações climáticas e ao empobrecimento dos solos, o que compromete o seu desenvolvimento em campo e consequentemente a sua produtividade. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias biológicas, como a micorrização, assume elevada relevância. As micorrizas aumentam a capacidade de absorção e assimilação de água e nutrientes por parte da planta, promovendo um crescimento mais vigoroso e aumentando o potencial produtivo. Para além de aumentar a resistência a stresses abióticos, aumentam ainda a tolerância a agentes patogénicos.

Neste âmbito, pretendeu-se avaliar o efeito da micorrização em plantas de mirtilo, com diferentes espécies fúngicas, com o objetivo de identificar qual delas promove um melhor desenvolvimento e adaptabilidade da cultura. Assim, plantas de mirtilo foram inoculadas, *in vitro*, com fragmentos de micélio de *Pisolithus capsulifer*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma bovista*, *Scleroderma citrinum* e *Scleroderma geoster*. Realizaram-se 3 ensaios cada um com 10 placas de *Petri* por condição sendo que, por cada placa de *Petri* colocaram-se 4 plantas e 4 inóculos. O desenvolvimento das plantas foi determinado ao fim de 4 semanas. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de folhas, tamanho do caule, cor das folhas, número de raízes e seu tamanho e a presença de micorrizas.

Foram observadas micorrizas nos ensaios com *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma geaster*. A presença dos inóculos promoveu um maior crescimento apical da planta, maior número de folhas e maior tamanho de raízes.

Estes resultados são extremamente promissores, levando assim à realização de ensaios *ex vitro* (ainda a decorrer) para validar o efeito benéfico da micorrização em plantas de mirtilo como solução para promover o aumento da resiliência da planta face às alterações climáticas.

Palavra chave: Alterações climáticas, cultura *in vitro*, fungos micorrízicos, micorrizas, *Vaccinium corymbosum*.

Abstract

Blueberries are highly valued fruits due to their morphological characteristics and high content of antioxidant compounds. However, this crop has faced increasing challenges associated with climate change and soil nutrient depletion, which compromises its development in the field and consequently productivity. In this context, the development of biological strategies, such as mycorrhization, is highly relevant. Mycorrhizae increase the plant's ability to absorb and assimilate water and nutrients, promoting more vigorous growth and increasing productive potential. In addition to increasing resistance to abiotic stresses, they also increase tolerance to pathogens.

In this work, it was intended to evaluate the effect of mycorrhization on blueberry plants, with different fungal species, in order to identify which, one promotes a better development and adaptability of the crop. Thus, blueberry plants were inoculated *in vitro* with mycelium fragments of *Pisolithus capsulifer*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma bovista*, *Scleroderma citrinum* and *Scleroderma geaster*. 3 trials were carried out each with 10 Petri dishes per condition, and for each Petri dish 4 plants and 4 inoculums were placed. Plant development was determined after 4 weeks. The following parameters were evaluated: number of leaves, stem size, leaf color, number of roots and their size, and the presence of mycorrhizae.

Mycorrhizae were observed in the trials with *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius* and *Scleroderma geaster*. The presence of inoculums promoted greater apical growth of the plant, greater number of leaves and greater root size.

These results are extremely promising, thus leading to *ex vitro* trials (still ongoing) to validate the beneficial effect of mycorrhization in blueberry plants as a solution to promote increased plant resilience to climate change.

Keywords: Climate change, *in vitro* culture, mycorrhizal fungi, mycorrhizae, *Vaccinium corymbosum*.

Introdução

As alterações climáticas causam stresse ambiental na maioria das culturas. Ao longo dos anos, perderam-se muitas terras agrícolas devido à subida do nível do mar, à erosão, à desertificação e à salinização. Estas perdas de terra levam à necessidade de preservar e garantir os solos remanescentes existentes, com os microrganismos a desempenhar um papel extremamente importante nessa missão (Rodríguez e Redman 2008).

Neste contexto, os fungos micorrízicos desempenham um papel crucial, estabelecendo relações simbióticas que auxiliam o desenvolvimento e a adaptação das plantas face às alterações climáticas. Esta simbiose promove na planta uma maior absorção de nutrientes e de água, aumentando a tolerância ao stresse abiótico e permitindo uma maior tolerância contra microrganismos patogénicos (Smith e Read 2008).

Na cultura de mirtilo já foram observadas associações com fungos micorrízicos ericoídes, no entanto novos estudos já revelam a eficiência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), principalmente em solos agrícolas (Singh et al. 2024; Smith et al. 2009; Scagel et al. 2005). Esta simbiose entre a planta de mirtilo e os fungos micorrízicos contribuiu para a sustentabilidade da cultura, levando a uma redução na utilização de adubos minerais e fitofármacos, melhorando assim a qualidade dos solos e promovendo uma agricultura mais sustentável (Berruti et al. 2016).

Deste modo, pretende-se com este trabalho avaliar a influência dos fungos micorrízicos no desenvolvimento das plantas de mirtilo, como um complemento natural aos produtos de síntese química, que promova a produtividade e qualidade da cultura.

Material e Métodos

Para a realização deste trabalho e com o intuito de avaliar o efeito da micorrização em plantas de mirtilo (variedade Legacy), utilizou-se 6 espécies de fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus*, *Pisolithus capsulifer*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma bovista*, *Scleroderma citrinum* e *Scleroderma geaster*, provenientes da micoteca da Deifil, devidamente isolados e caracterizados no laboratório da mesma. As

espécies em estudo foram enviadas para Universidade de Vigo para confirmação da identificação molecular.

Num primeiro ensaio, com o objetivo de avaliar a viabilidade e crescimento destes fungos no meio de cultura, prepararam-se 21 placas de *Petri* com meio de enraizamento para a cultura de mirtilo otimizado pela Deifil, onde foi inoculado um fragmento de micélio, para cada espécie em triplicado. Foi registado semanalmente o valor do diâmetro do micélio, de todas as condições, e posteriormente, ao fim das 4 semanas foi realizada uma análise estatística para confirmar a compatibilidade e capacidade de crescimento do micélio em função do tempo.

De seguida, procedeu-se à preparação do ensaio para avaliação da influência dos fungos micorrízicos no desenvolvimento da planta de mirtilo. Para tal, prepararam-se 10 placas de *Petri* por condição, (fig. 1). Cada placa continha meio de cultura de enraizamento com uma película de celofane, de modo a induzir a planta ao stresse. Foram colocadas 4 plantas (sem raiz) com 4 inóculos da mesma espécie fúngica em cada placa de *Petri*, perfazendo um total de 280 plantas e 280 inóculos por ensaio. Este ensaio foi feito em triplicado, avaliando-se estatisticamente os resultados e a eficiência dos inóculos no crescimento e viabilidade da planta. Após as 4 semanas de crescimento, avaliou-se os parâmetros biométricos, tais como, o tamanho médio das raízes desenvolvidas por planta, o tamanho médio do caule e o número médio de folhas.

Por fim, de modo a avaliar a formação de micorrizas nas raízes da planta de mirtilo, procedeu-se a um corte da raiz junto ao colo do caule e posterior visualização à lupa e ao microscópio.

Resultados e Discussão

Em primeiro lugar, foi avaliado o crescimento das espécies fúngicas selecionadas em meio de cultura desenvolvido para o enraizamento das plantas de mirtilo, de forma a avaliar se este meio de cultura, não desenvolvido para crescimento fúngico, influenciava negativamente o crescimento das espécies em estudo. Após as 4 semanas, verificou-se um crescimento significativo de todas as espécies em estudo (fig. 2), destacando-se *Paxillus involutus* com um crescimento micelial com 8,6 cm de diâmetro. *Scleroderma geoster* apresentou um diâmetro de crescimento de 7,6 cm, enquanto as restantes espécies *Scleroderma citrinum* e *Scleroderma bovista*, apresentaram um crescimento de 3,1 cm e 1,9 cm, respetivamente. As espécies *Pisolithus capsulifer* e *Pisolithus tinctorius* apresentaram um crescimento de 3,7 cm e 6,8 cm, respetivamente. Como todas as espécies em estudo apresentaram crescimento no meio de cultura para enraizamento, utilizaram-se todas para os ensaios de micorrização.

A inoculação das diferentes espécies de fungos com a variedade em estudo foi realizada e, após as 4 semanas de ensaio, verificou-se crescimento tanto fúngico (micélio) como vegetal em todas as condições (fig. 3). A espécie *Paxillus involutus* apresentou um crescimento radicular de 1,18 cm, um crescimento apical de 0,87 cm e um crescimento médio de 3 folhas novas por ápice. As espécies *Scleroderma geoster*, *Scleroderma citrinum* e *Scleroderma bovista* apresentaram um crescimento radicular de 2,40 cm, 2,51 cm e 1,84 cm, um crescimento apical de 0,75 cm, 0,86 cm e 1,09 cm e um número médio de folhas novas de 3,4,4, respetivamente. Já as espécies *Pisolithus capsulifer* e *Pisolithus tinctorius*, apresentaram um crescimento radicular de 1,10 cm e 0,73 cm, crescimento apical de 0,84 cm e 0,70 cm com um crescimento médio de folhas novas de 3 e 2, respetivamente.

Estes resultados demonstram a influência positiva de todas as espécies em estudo no crescimento e desenvolvimento das plantas de mirtilo, com destaque para as espécies

Scleroderma bovista e *Scleroderma citrinium* que promoveram um maior crescimento radicular, (fig. 4). Apesar de *Pisolithus capsulifer* e *Pisolithus tinctorius* induzirem um crescimento radicular inferior em comparação com as restantes espécies em estudo, os resultados sugerem que o efeito mais eficiente destes fungos poderá estar associado à fase posterior do desenvolvimento da raiz. Ou seja, poderão não estimular o desenvolvimento inicial, mas sim potenciar o seu alongamento após a raiz já estar estabelecida. Nesse sentido, realizou-se um novo ensaio, no qual as plantas com raiz já desenvolvida foram inoculadas com as espécies em estudo. Os resultados observados corroboram com o referido anteriormente, isto é, ao fim das 4 semanas, as plantas apresentaram um maior crescimento apical e maior número de folhas novas, por consequência de o aumento da área radicular (resultados não publicados).

Relativamente ao crescimento apical, todas as condições mostraram um maior crescimento em comparação ao controlo. Isto deve-se ao facto dos fungos ectomicorrízicos favorecerem a capacidade de absorção de nutrientes e de água por parte das plantas, em particular de fósforo e de azoto, mas também de influenciarem a regulação de hormonas no alongamento apical (Smith e Read 2008). Por consequência, esta simbiose diminui o stresse osmótico da planta de mirtilo, promovendo assim energia para o crescimento vegetativo, como é possível observar na Figura 5 (Berruti et al. 2016).

De acordo com literatura referida anteriormente, fungos micorrízicos ericoídes e fungos micorrízicos arbusculares, apresentam a capacidade de micorrizar raízes de plantas de mirtilo. Contudo, de acordo com os resultados obtidos na avaliação microscópica, foi possível observar estruturas micorrízicas nas raízes da planta de mirtilo, comprovando assim, que fungos ectomicorrízicos também têm a mesma capacidade micorrízica (fig. 6).

Conclusões

Estes resultados demonstraram que os fungos estudados apresentaram um ótimo potencial micorrízico para a cultura do mirtilo. Foi possível comprovar que estas seis espécies de fungos ectomicorrízicos estabeleceram relações simbióticas com as raízes da planta de mirtilo, comprovando que a simbiose entre ambos teve a capacidade de induzir um melhor crescimento da planta de mirtilo *in vitro*.

Dado que estes resultados foram bastante promissores e únicos, justificam investigações adicionais, tais como, a avaliação destes fungos em condições *ex vitro*, de modo a perceber se os efeitos dos mesmos auxiliam uma melhor aclimatização, podendo influenciar o crescimento a nível morfológico, com perspetiva a futuros ensaios de campo. Assim poderá existir uma resposta mais sustentável e eficaz que auxilie os agricultores, de modo a mitigar os efeitos causados pelas alterações climáticas, preservando os solos agrícolas e promovendo uma agricultura mais sustentável.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos cofundadores da Deifil e a toda a equipa, por todo o apoio e disponibilidade para o desenvolvimento deste estudo, que em muito me ajudou a crescer a nível pessoal e científico, e também pela importância que este trabalho tem para a sociedade em especial para a sustentabilidade da agricultura.

Referências Bibliográficas

- Berruti, Andrea, Erica Lumini, Raffaella Balestrini, e Valeria Bianciotto. 2016a. «Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes». *Frontiers in Microbiology* 6 (janeiro). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>.
- Lizot, Mauro, Flavio Trojan, e Paulo Afonso. 2021. Combining Total Cost of Ownership and Multi-Criteria Decision Analysis to Improve Cost Management in Family Farming. *Agriculture* 11 (2): 139. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020139>.
- Rodriguez, R., e R. Redman. 2008. «More than 400 Million Years of Evolution and Some Plants Still Can't Make It on Their Own: Plant Stress Tolerance via Fungal Symbiosis». *Journal of Experimental Botany* 59 (5): 1109–14. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm342>.
- Scagel, Carolyn F., Adam Wagner, e Paul Winiarski. 2005. «Inoculation with Ericoid Mycorrhizal Fungi Alters Root Colonization and Growth in Nursery Production of Blueberry Plants from Tissue Culture and Cuttings». *Small Fruits Review* 4 (4): 113–35. https://doi.org/10.1300/J301v04n04_11.
- Singh, Ashutosh, Amit Kumar Pandey, Basavaraj A Dodmani, et al. 2024. «Arbuscular Mycorrhizal Fungi Efficiency on Plant Growth and Nutrient Acquisition: A Comprehensive Review». *Microbiology Research Journal International* 34 (8): 13–22. <https://doi.org/10.9734/mrji/2024/v34i81466>.
- Smith, F. Andrew, Emily J. Grace, e Sally E. Smith. 2009. «More than a Carbon Economy: Nutrient Trade and Ecological Sustainability in Facultative Arbuscular Mycorrhizal Symbioses». *New Phytologist* 182 (2): 347–58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02753.x>.
- Smith, S. E., e David J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. Academic Press.
- Souza, Vênia C. De, Ricardo A. Da Silva, Gleibson D. Cardoso, e Artur F. Barreto. 2006. «Estudos sobre fungos micorrízicos». *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 10 (3): 612–18. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662006000300011>.

Quadros e Figuras

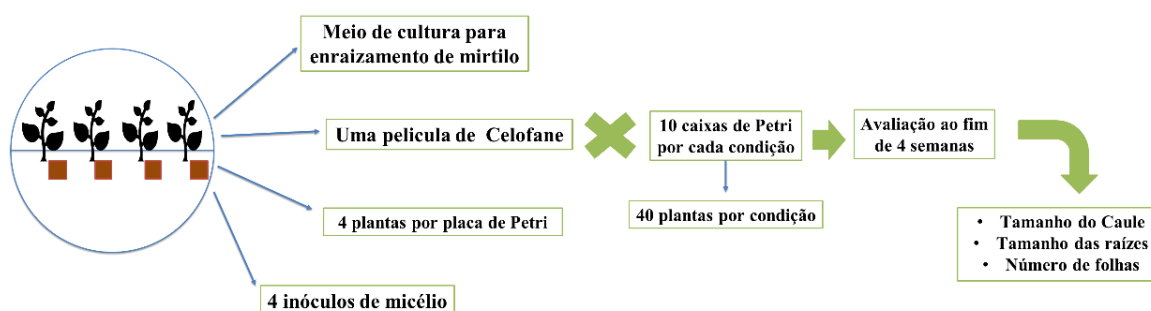


Figura 1 - Procedimento do ensaio de micorrização.

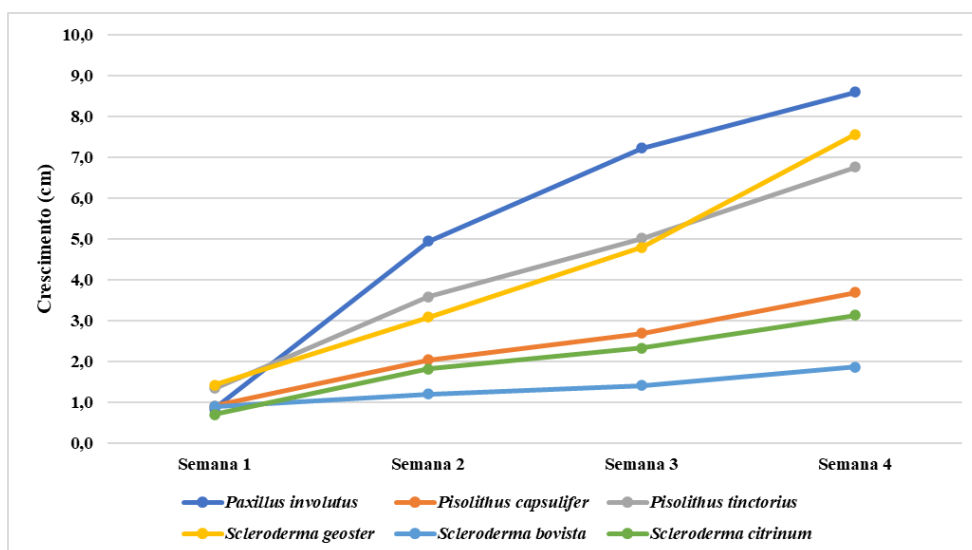


Figura 2 - Crescimento das diferentes espécies de fungos durante 4 semanas.

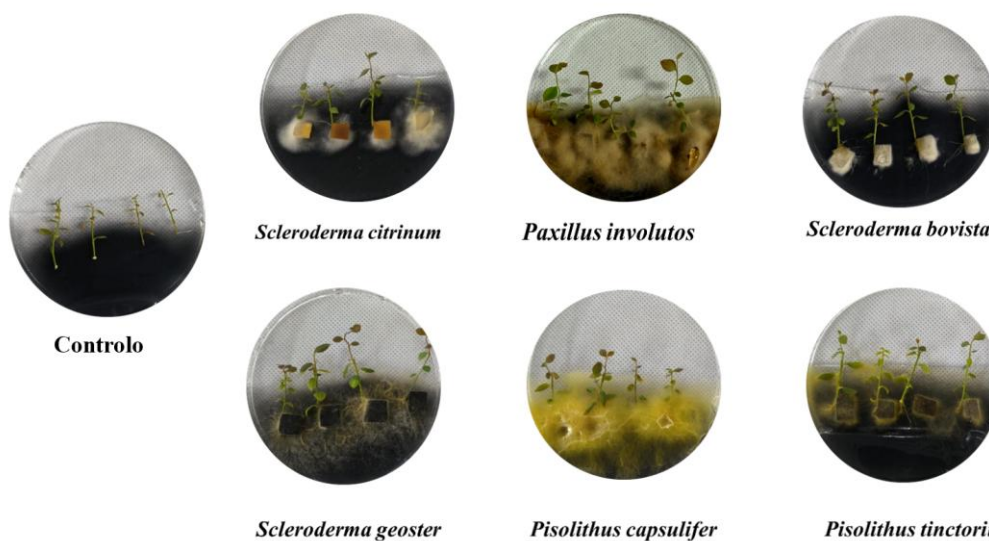


Figura 3 - Crescimento vegetal e fúngico após 4 semanas em condições ideais.

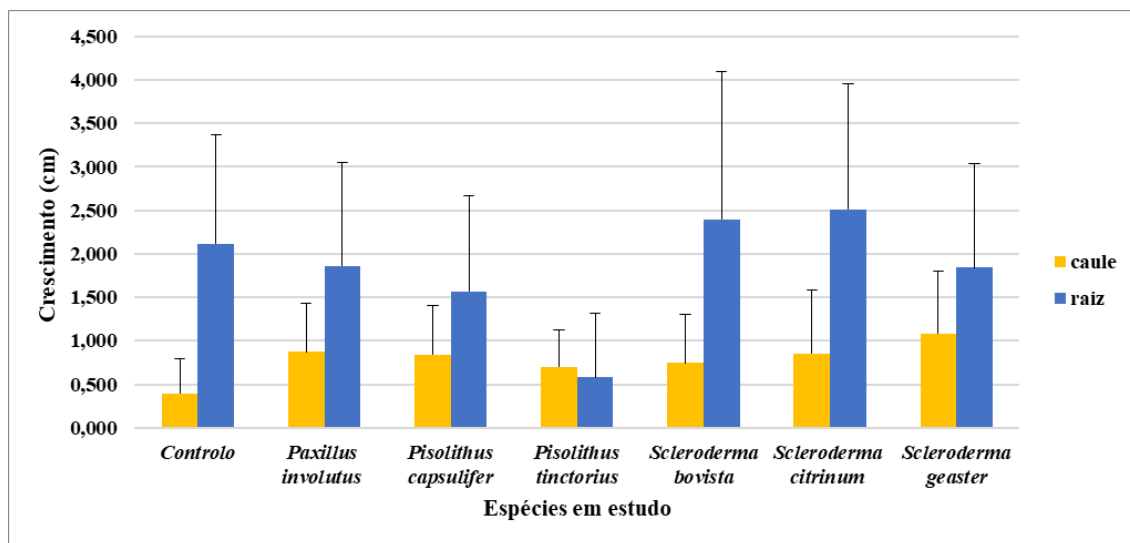


Figura 4 - Crescimento, em centímetros, do caule e raízes das plantas de mirtilo ao fim de 4 semanas de crescimento após a inoculação com as diferentes espécies de fungos.

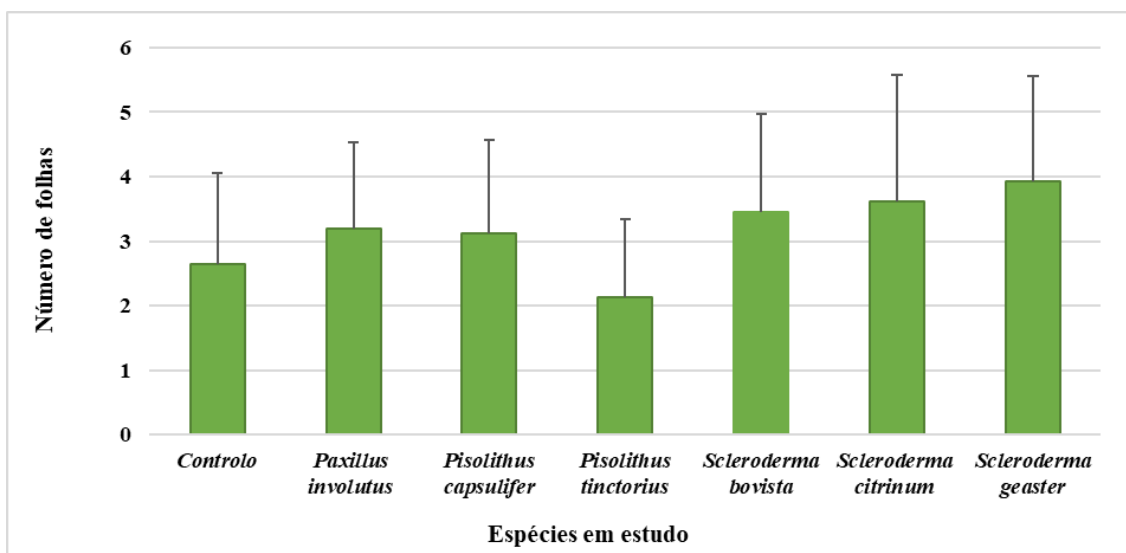


Figura 5 - Número médio de novas folhas ao fim de 4 semanas de crescimento após a inoculação com as diferentes espécies de fungos.

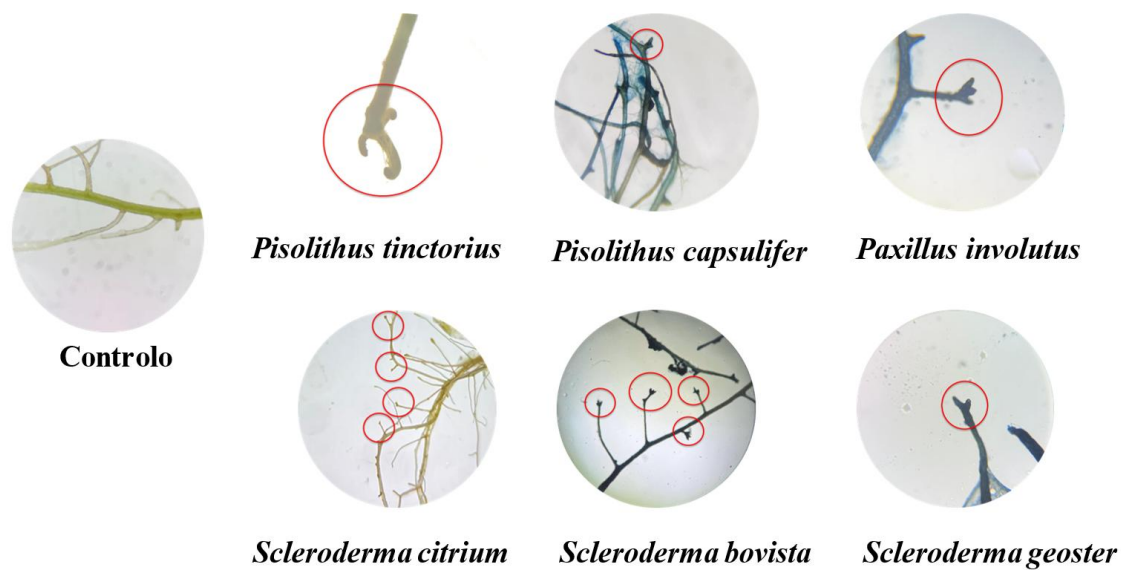


Figura 6 - Crescimento radicular e estruturas micorrízicas após 4 semanas em condições ideais.

Proposta de sistemas de condução em camarinha para produção de fruto

João Jacinto^{1,2}, Teresa Valdivieso¹, Pedro B. Oliveira¹

¹INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras;

²CE3C – Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, DBV, 1749-016 Lisboa.

Resumo

A camarinha (*Corema album*), arbusto dioico endémico da Península Ibérica e nativo de dunas litorais, apresenta um potencial promissor para a produção comercial de frutos. Com uma altura média de 70 cm, exibe grande variabilidade morfológica, desde formas eretas a indivíduos prostrados. Esta diversidade representa um desafio, mas também uma oportunidade no processo de domesticação e adaptação a sistemas produtivos. Com base nesse potencial, foi conduzido um trabalho sistemático de seleção ao longo da costa portuguesa, focado em características como biometria, qualidade e produtividade dos frutos. Paralelamente, estudou-se a variabilidade genética em oito populações distintas, criando uma base sólida para a escolha dos génotipos mais promissores. A propagação destes génotipos foi testada por via seminal e vegetativa, destacando-se a multiplicação de plantas femininas com elevada produção e qualidade de frutos, bem como de génotipos masculinos com maior produção floral, essenciais para a polinização eficaz em sistemas comerciais. Outro avanço importante foi a definição de uma escala fenológica adaptada ao ciclo anual da espécie. Apesar destes progressos, persiste uma lacuna no desenvolvimento agronómico da camarinha: a ausência de um sistema de condução adequado à produção em escala. A planta apresenta elevado número de ramificações e, após o vingamento dos frutos, um crescimento vegetativo intenso, o que dificulta a visualização e colheita, aspetos que exigem estratégias de poda e condução adequadas. Soma-se a isto a tendência natural da espécie para alternância de produção (safra e contra-safra), que pode ser mitigada com podas equilibradas. Torna-se, assim, fundamental definir sistemas de condução que favoreçam a frutificação, otimizem o uso da luz e do espaço e facilitem as operações culturais. Génotipos de porte ereto podem ser conduzidos em sebe ou estruturas verticais simples; já os de porte prostrado exigem soluções específicas que garantam uma exposição uniforme dos ramos e colheita eficiente. O desenvolvimento de um sistema de condução aliado à gestão da poda representa um passo essencial para tornar a cultura da camarinha técnica e economicamente viável.

Palavras-chave: *Corema album*; arquitetura da planta; poda; tecnologias de produção.

Abstract

The white crowberry, *Corema album*, a dioecious shrub endemic to the Iberian Peninsula and native to coastal dunes, has promising potential for commercial fruit production. Despite its average height of 70 cm, the species displays marked morphological variability, ranging from upright to prostrate forms putting both challenges and opportunities for domestication and integration into production systems. To address this, a systematic selection program was conducted along the Portuguese coast, targeting

fruit biometric traits, quality, and yield, while genetic diversity was assessed across eight populations to identify superior genotypes. Propagation trials, both sexual and vegetative, demonstrated successful multiplication of high-yielding female plants and male genotypes with enhanced floral production, crucial for efficient pollination. Additionally, a phenological scale adapted to the species' annual cycle was established. However, the lack of an appropriate training system remains a critical limitation for large-scale cultivation. The species' profuse branching and vigorous post-fruit-set growth hinder visibility and harvesting, underscoring the need for effective pruning and training strategies. Its natural alternate bearing tendency may also be mitigated by balanced pruning. Developing training systems that optimize fruiting, improve light interception and space use, and facilitate cultural practices is therefore essential. Upright genotypes are suitable for hedgerow or simple vertical systems, while prostrate types require tailored solutions to ensure uniform branch exposure and efficient harvesting. Integrating training systems with pruning management is a key step toward establishing *C. album* as a technically and economically viable crop.

Keywords: *Corema album*; plant architecture; pruning; cultivation technologies.

Introdução

Corema album (L.) D. Don, vulgarmente conhecida como camarinha, é um arbusto dioico endémico da Península Ibérica e presente também nos Açores, onde ocorre a subespécie *C. album* spp. *azoricum* (P. Silva) (Valdés et al., 1987; López-Dóriga, 2018). Esta espécie integra ecossistemas dunares e pinhais litorais, desempenhando um papel estrutural relevante em habitats costeiros frágeis (Díaz-Barradas et al., 2000; Clavijo et al., 2002; Álvarez-Cansino et al., 2012). O seu crescimento em solos pobres, oligotróficos e com baixa disponibilidade hídrica (Ulm et al., 2017; Antunes et al., 2018a) reflete adaptações ecofisiológicas notáveis, que lhe conferem resiliência a condições ambientais extremas (Martins et al., 2017; Antunes et al., 2018b; Díaz-Barradas et al., 2018).

Nas últimas décadas, a camarinha tem despertado crescente interesse agronómico e científico, não apenas pelo seu valor ecológico, mas também pelo potencial económico associado à produção de frutos. As bagas brancas, de sabor agradável, apresentam composição fitoquímica promissora, com propriedades antioxidantes, perfil fenólico caracterizado e a presença de compostos bioativos, como os ácidos ursólico e oleanólico (León-González et al., 2012; León-González et al., 2013; Pimpão et al., 2013; Díaz-Barradas et al., 2016; Andrade et al., 2017). Estudos preliminares também destacaram a variabilidade físico-química e organoléptica dos frutos em função da proveniência geográfica e do sistema de cultivo (Andrade et al., 2017b; Jacinto et al., 2021).

Apesar deste potencial, a domesticação e exploração agrícola da espécie encontram-se ainda em fase incipiente (Oliveira e Dale, 2012). Já foram realizados avanços importantes na caracterização da variabilidade genética (Jacinto et al., 2019; Oliveira et al., 2024), na definição de escalas fenológicas (Jacinto et al., 2022), bem como no desenvolvimento de métodos de propagação seminal e vegetativa (Santos et al., 2014; Magalhães, 2015; Álvarez-Cansino et al., 2017; Oliveira et al., 2020a). No entanto, o conhecimento sobre o desempenho da espécie em condições de cultivo permanece limitado (Jacinto et al., 2020 e Oliveira et al., 2020b), e a ausência de sistemas adequados de condução e poda constitui um entrave crítico para a sua integração em pomares comerciais. A arquitetura ramificada, o crescimento vigoroso após a frutificação e a

tendência para alternância de produção dificultam a colheita e reduzem a consistência produtiva.

Neste contexto, torna-se essencial desenvolver itinerários técnicos que conciliem a arquitetura da planta, a otimização da luz e do espaço e a eficiência das operações culturais. Assim, o presente trabalho propõe e discute sistemas de condução aplicáveis a diferentes genótipos de *C. album*, visando ultrapassar limitações práticas e contribuir para a viabilidade técnica e económica da sua produção frutícola.

Resultados e Discussão

Com base na avaliação do crescimento da camarinha em condições de cultura (Jacinto et al., 2020), e dos parâmetros biométricos de plantas cultivadas ao longo de dois anos, verificou-se que a média de ramos por planta duplicou, de 103 em 2015 para 201 em 2016, evidenciando a necessidade de intervenções de poda para controlo do desenvolvimento vegetativo. A partir destes dados e das características intrínsecas da espécie, são propostos três sistemas de condução em sebe: sistema livre, sistema semi-livre e sistema com suporte. Adicionalmente, considerando a dioiccia e a polinização anemófila, o compasso de plantação proposto é de 1 m na linha e 3 m entre linhas, com um rácio de 9 fêmeas por cada macho.

Face à arquitetura da planta e aos hábitos de crescimento, os sistemas propostos (fig. 1) apresentam as seguintes características e aplicações:

Sistema livre: aplicável a plantas eretas e prostradas, sem necessidade de poda de formação. Altura média das plantas $\approx 0,75$ m.

Sistema semi-livre: preferencialmente para plantas prostradas, cultivadas em camalhão de 0,50 m, com altura média de 0,75 m. Este sistema facilita a colheita devido à elevação do camalhão (1,25 m).

Sistema com suporte: adequado para plantas eretas. Requer poda de formação para estabelecimento de um eixo principal ($\geq 0,50$ m) e suporte da copa, facilitando colheita e manutenção (1,25 m).

Face ao crescimento intenso em número de ramos que ocorre na camarinha (Jacinto et al., 2020) (fig. 2), o que pode comprometer a frutificação, dado que cada ramo produz em média apenas três frutos em condições naturais (Gutián et al., 1997), a redução drástica do número de ramos (até 90%) surge como uma prática necessária em todos os sistemas de condução, potenciando a produção e o calibre dos frutos (fig. 3).

O sistema livre apresenta simplicidade de implementação, sendo o indicado para a maioria das plantas, mas pode dificultar operações culturais intensivas. O sistema semi-livre, ao incluir cultura em camalhão, poderá facilitar a colheita, sobretudo em plantas prostradas. Já o sistema com suporte, embora mais exigente em termos de poda e infraestruturas, poderá ser o mais eficiente para plantas eretas, permitindo maior organização da copa e facilidade na colheita mecanizada ou semi-mecanizada.

Estes sistemas oferecem soluções diferenciadas para a domesticação da espécie, adaptadas às suas variações morfológicas, representando um passo importante na transição da camarinha de planta silvestre para cultura agrícola de valor comercial.

Conclusões

A definição de sistemas de condução adequados para a camarinha constitui um passo essencial para a sua domesticação e valorização enquanto cultura destinada à produção de frutos. A elevada emissão de ramos exige estratégias de poda regulares para maximizar a produção. Três sistemas de condução em sebe (livre, semi-livre e com suporte) foram propostos, adaptando-se ao porte das plantas. A escolha do sistema deve

considerar o hábito de crescimento, a facilidade de colheita e os recursos disponíveis para instalação e manutenção. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento da camarinha como cultura emergente, com potencial para integrar novas fileiras de produção agrícola em Portugal.

Agradecimentos

João Jacinto agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela bolsa de doutoramento 2022.13267.BD e pelo financiamento da Unidade de Investigação Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais, CE3C, UID/00329/2025.

Referências Bibliográficas

- Álvarez-Cansino, L., Díaz-Barradas, M.C., Zunzunegui, M., Esquivias, M.P. & Dawson, T.E. 2012. Gender-specific variation in physiology in the dioecious shrub *Corema album* throughout its distributional range. *Functional Plant Biology* 39: 968-978.
- Álvarez-Cansino, L., Zunzunegui, M. & Díaz-Barradas, M.C. 2017. Germination and clonal propagation of the endemic shrub *Corema album*, a vulnerable species with conservation needs and commercial interest. *Natural product communications* 12.
- Andrade, S.C., Guiné, R.P. & Gonçalves, F.J. 2017a. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (*Corema album*). *Journal of Food Measurement and Characterization* 11: 1936-1946.
- Andrade, S.C., Gonçalves, F. & Guiné, R. 2017b. Contribution for the physical-chemical characterization of Portuguese Crowberry (*Corema album*). *International Journal of Food Science and Nutrition* 2: 9-14.
- Antunes, C., Chozas, S., West, J., Zunzunegui, M., Diaz-Barradas, M.C., Vieira, S., & Máguas, C. 2018a. Groundwater drawdown drives ecophysiological adjustments of woody vegetation in a semi-arid coastal ecosystem. *Global change biology* 24: 4894-4908.
- Antunes, C., Pereira, A.J., Fernandes, P., Ramos, M., Ascensão, L., Correia, O. & Máguas, C. 2018b. Understanding plant drought resistance in a Mediterranean coastal sand dune ecosystem: differences between native and exotic invasive species. *Journal of Plant Ecology* 11: 26-38.
- Clavijo, A., Díaz-Barradas, M.C., Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M. & Correia, O. 2002. A fragmentação como causa principal da redução do habitat de *Corema album* na sua área de distribuição. *Revista Biologia. (Lisboa)* 20: 109-120.
- Díaz-Barradas, M.C., Correia, O., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Clavijo, A., Silva, P. & Ferreira, S. 2000. Distribuição de sexos na espécie *Corema album* ao longo de um gradiente climático. *Revista de Biologia*, 18: 7-22.
- Díaz-Barradas, M.C., Costa, C., Correia, O., León-González, A.J., Navarro-Zafra, I., Zunzunegui, M., Alvarez-Cansino, L. & Martín-Cordero, C. 2016. Pentacyclic triterpenes responsible for photoprotection of *Corema album* (L.) D. Don white berries. *Biochemical systematics and ecology* 67: 103-109.
- Díaz-Barradas, M.C., Zunzunegui, M., Correia, O., Ain-Lhout, F., Esquivias, M.P. & Álvarez-Cansino, L. 2018. Gender dimorphism in *Corema album* across its biogeographical area and implications under a scenario of extreme drought events. *Environmental and Experimental Botany* 155: 609-618.
- Gutián, P., Medrano, M., & Rodríguez, M. (1997). Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula. *Acta Botanica Gallica* 144: 119-128.

- Jacinto, J., Oliveira, P.B., Valdivieso, T., Capelo, J., Arsénio, P. & Nóbrega, F. 2019. Genetic diversity assessment among *Corema album* (L.) D. Don (Ericaceae) genotypes based on ISSR markers and agro-morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* 67: 715-726.
- Jacinto, J., Valdivieso, T., Luz, F.R. & Oliveira, P.B. 2020. Avaliação do crescimento e produção de *Corema album* (L.) D. Don em condições de cultura. *Actas Portuguesas de Horticultura* 32: 44-50.
- Jacinto, J., Giovanetti, M., Oliveira, P.B., Valdivieso, T., Máguas, C. & Alegria, C. 2021. Quality attributes of cultivated white crowberries (*Corema album* (L.) D. Don) from a multi-origin clonal field. *Euphytica* 217: 1-11.
- Jacinto, J., Magalhães, T., Oliveira, P.B., Oliveira, C., Luz, F., Trindade, C.S. & Valdivieso, T. 2022. *Corema album* (L.) D. Don Phenological Growth Stages according to Extended BBCH Scale. *International Journal of Fruit Science* 22: 317-328.
- León-González, A.J., Mateos, R., Ramos, S., Martín, M.Á., Sarriá, B., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Bravo, L. & Goya, L. 2012. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. *Food research international*, 49: 728-738.
- León-González, A.J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F.A., López-Lázaro, M., Díaz-Barradas, M.C., & Martín-Cordero, C. 2013. Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 58-63.
- López-Dóriga, I.L. 2018. The archaeobotany and ethnobotany of Portuguese or white crowberry (*Corema album* (L.) D. Don). *Ethnobiology Letters* 9: 19-32.
- Martins, A., Freitas, H. & Costa, S. 2017. *Corema album*: unbiased dioecy in a competitive environment. *Plant Biology* 19: 824-834.
- Magalhães, T.T.A. 2015. Propagação e fenologia da *Corema album* (L.) D. Don. Ensaios de propagação vegetativa por estaca. Caracterização fenológica e proposta de escala BBCH. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica, ISA, ULisboa 80pp.
- Oliveira, P.B. & Dale, A. 2012. *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry - a new crop. *Journal of Berry Research* 2: 123-133.
- Oliveira, P.B., Rosado-da-Luz, F., Magalhães, T., Lisboa, A., Oliveira, C.M. & Valdivieso, T. 2020^a. Propagação vegetativa e seminal em *Corema album* (L.) D. Don. *Actas Portuguesas de Horticultura* 30.
- Oliveira, P.B., Valdivieso, T. & Rosado-da-Luz F. 2020^b. Melhoramento Genético da camarinha; Seleção e Avaliação de plantas. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 30.
- Oliveira, P.B., Varela, A. R., Silva, M. J., Guimarães, J. B., Valdivieso, T., Trindade, C. S., & Nóbrega, F. 2024. Assessment of genetic diversity and population structure of *Corema album* accessions from the Atlantic coastal dunes of Portugal. *Journal of Berry Research* 14: 249-260.
- Pimpão, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B. & Santos, C.N. 2013. Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 6: 4053-4062.
- Santos, M.S., Oliveira, C.M., Valdivieso, T. & Oliveira, P.B. 2014. Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. *Journal of Berry Research* 4: 183-192.

Ulm, F., Hellmann, C., Cruz, C. & Máguas, C. 2017. N/P imbalance as a key driver for the invasion of oligotrophic dune systems by a woody legume. *Oikos* 126: 231-240.
Valdés, B., Talavera, S., & Fernández-Galiano, E. (Eds.). 1987. Flora vascular de Andalucía occidental. (Vol. 1) Ketres.

Quadros e Figuras

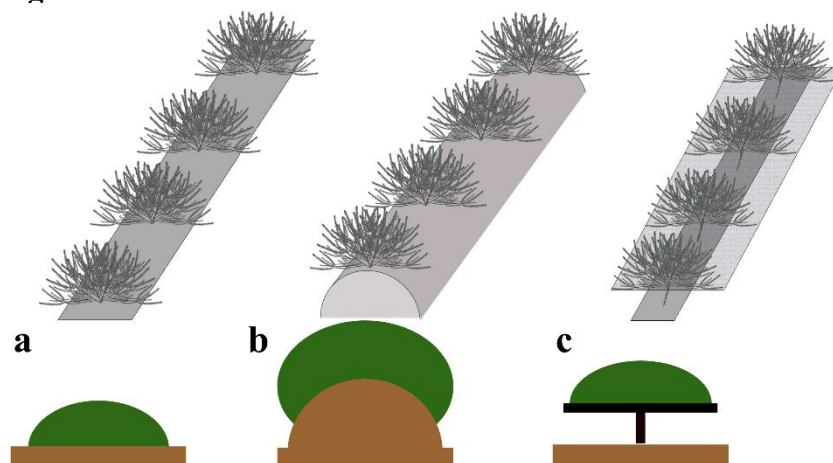


Figura 1 - Sistemas de condução propostos para *Corema album*. a: sistema livre, b: sistemas semi-livre e c: sistema com suporte.



Figura 2 - Plantação de camarinha em sistema livre no Polo de Inovação da Fataca, Odemira.



Figura 3 - A redução do número de ramos poderá levar ao aumento do número de frutos, bem como do seu calibre.

O projeto Emc² ‘Explorar Matos de Camarinha da Costa’: principais resultados da sensibilização ambiental e conservação de camarinhas

M. Alexandra Abreu Lima^{1,2}, Lia Vasconcelos², Pedro B. Oliveira¹, Teresa Valdiviesso¹, José Gualdino Correia³

¹INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras.

²MARE, Universidade Nova de Lisboa, Campus Caparica, 2829-516 Caparica

³COREMA, R. Ilídio Couto 125, 4910-206 Lanhelas.

Resumo

Os habitats costeiros com plantas endémicas - i.e. plantas que só aí existam e em mais nenhum outro lugar no mundo-, como é o caso da camarinha (*Corema album* (L.) D. Don 1830) que é um endemismo ibérico, são legados de histórias evolutivas únicas com importância em termos de conservação da biodiversidade. No entanto, estes habitats costeiros que se constituem como ‘museus naturais vivos’ possuem a sua biodiversidade ameaçada, por um ou mais fatores como: (1) fragmentação do habitat; (2) presença de espécies invasoras e (3) efeitos negativos das alterações climáticas.

O projeto Emc² ‘Explorar Matos de Camarinha da Costa’ é um projeto colaborativo de educação ambiental sobre matos de camarinhas de zonas costeiras nacionais, que visa dar a conhecer e envolver os jovens em ações sobre a camarinha, de Moledo ao Ancão, percorrendo a costa de Norte a Sul. No projeto, os alunos do Ensino Básico (1º e 2º ciclos) têm vindo a participar em atividades de ‘Visitas de Estudo’ e ‘Botânica e Arte’ descritas no Livro de Atividades (Lima e Vasconcelos, 2017). Para além das atividades nele descritas, decorre uma iniciativa centrada na recuperação de uma população de camarinhas na zona dunar da praia de Moledo (Caminha), que estava em declínio, com a propagação por estacaria com a colaboração do INIAV, I.P. (Lima et al., 2020), do Viveirista ‘Raíz da Terra’ (Caminha) e Apoio da Associação COREMA.

Apresentam-se resultados sobre a reintrodução de camarinhas em Moledo, cuja população está em recuperação com o envolvimento de jovens e entidades da sociedade civil. Analisam-se os resultados tomando em consideração, por um lado, que a Educação constitui um componente crucial da conservação de plantas, e por outro que projetos educativos sobre zonas costeiras enriquecem currículos; permitem construir pontes com a comunidade; mobilizam e capacitam os jovens para iniciativas de recuperação desses ecossistemas.

Palavras-chave: *Corema album*, camarinha, flora dunar.

Abstract

Coastal habitats with endemic plants - i.e. plants that only exist in a place and nowhere else on Earth- such as the white crowberry (*Corema album* (L.) D. Don 1830), which is an Iberian endemism, are a legacy of unique evolutionary histories with biodiversity conservation relevance. However, these coastal habitats that constitute 'living natural museums' have their biodiversity threatened by one or more factors such as: (1) habitat fragmentation; (2) invasive species and (3) impacts of climate change. The Emc² project ‘Exploring white crowberry coastal habitats’, is an ongoing collaborative environmental education project, about white crowberry plants in national coastal areas,

which aims to raise awareness and engage young people in actions about this plant, along the mainland Portuguese coastal zone, from Moledo to Ancão. In the project, students (from 1st to 6th grades) have been participating in 'Field Trips' and 'Botany and Art' activities described in the Book of Activities (Lima and Vasconcelos, 2017). In addition to the activities described in this Book, there is an initiative focused on the conservation of the white crowberry 'Foz do Minho' population, near Moledo beach dune area (Caminha), through the propagation of stem cuttings (Lima et al., 2020), with the collaboration of INIAV, I.P., the plant nursery 'Raiz da Terra' and the NGO Association COREMA. Results about the reintroduction of white crowberry plants at Moledo are discussed in terms of extirpation prevention, with engagement of young students and civil society organizations. The results are analyzed considering not only that education is a crucial component of plant conservation, but also that educational projects on coastal zones enrich curricula; allow schools to build bridges with the community; engage and train young people for conservation actions in these ecosystems.

Keywords: *Corema album*, white crowberry, dune flora.

Introdução

A Camarinha - *Corema album* (L.) D. Don – é uma planta da família *Ericaceae*, que vem descrita na Flora Ibérica (Castroviejo, 2003). O género *Corema* (L.) tem apenas duas espécies, *C. conradii* (Torr.) Torr. ex Loud., que é endémica da costa nordeste do Continente Norte Americano (litoral sudeste do Canadá - Québec, New Brunswick e Nova Scotia; e nordeste dos Estados Unidos - Maine, New York, New Jersey e Massachusetts); e *C. album* (L.) D. Don que é um endemismo da costa atlântica da Península Ibérica. Nos Açores, existe a subespécie *C. album* (L.) D. Don: - *C. album* subsp. *azoricum* Pinto da Silva. Os habitats costeiros com plantas endémicas (i.e., plantas que apenas aí existam e em nenhum outro lugar no mundo) como por ex. a camarinha - *Corema album* (L.) D. Don - (endemismo ibérico) são legados de histórias evolutivas únicas com importância na conservação da biodiversidade. Contudo, nestes 'museus naturais' existem ameaças à biodiversidade: (1) fragmentação do habitat; (2) presença de espécies invasoras; e (3) impactos das alterações climáticas. Estas três ameaças perturbam os ecossistemas dunares e têm sido objeto de estudos e projetos em Portugal e a nível global.

Dado que a educação e a sensibilização sobre a diversidade das plantas são componentes essenciais da conservação das plantas, conforme declarado na 'Estratégia Global para Conservação de Plantas 2011-2020', Objetivo IV, Meta 14 (Sharrock, 2020), o Projeto Emc² 'Explorar Matos de Camarinha da Costa' foi delineado no sentido de divulgar a camarinha aos jovens do 1º e 2º ciclos do Ensino Básico e ao público em geral. O Projeto decorre desde 2016 centrado nos matos de camarinha de habitats dunares da zona costeira de Portugal continental, com o desenvolvimento de várias iniciativas, que têm como objetivos: (1) divulgar a camarinha aos jovens e ao público; (2) enriquecer os currículos escolares; e (3) capacitar e mobilizar os alunos a agir na recuperação de populações desta espécie que estejam em declínio, em colaboração com ONG e a Sociedade Civil.

Material e Métodos

Atividades ‘Visita de Estudo’ e ‘Botânica e Arte’

A educação de jovens na natureza, em contato direto com os habitats naturais tem atualmente grande relevância devido aos fenómenos de: (1) ‘défice de natureza na infância’ (Louv, 2005); (2) ‘extinção da experiência’ (Finch, 2008) e (3) ‘desconexão da natureza’ (Navarro-Perez & Tidball, 2012). O projeto colaborativo de educação ambiental Emc² dá um contributo para minimizar estas tendências. A sua missão é a de promover iniciativas educativas em zonas costeiras, constituindo-se estas como um espaço privilegiado de ensino-aprendizagem de botânica e ciências. No projeto foi publicado um Livro de Atividades (Lima e Vasconcelos, 2017) e prosseguem, para além das atividades nele descritas de ‘Visita de Estudo’ e ‘Botânica e Arte’, uma iniciativa de recuperação da população de camarinhas da Foz do Minho, que se encontrava em declínio.

A metodologia do Projeto Emc² engloba Visitas de Estudo que em termos pedagógicos complementam o ensino em sala de aula, dado enriquecerem a aprendizagem dos alunos. Na Atividade ‘Visita de Estudo’, os estudantes vêm na duna as camarinhas (além de outras plantas) e colhem pequenos ramos para um mini- herbário (fig. 1). No local da visita os estudantes preenchem uma Ficha de atividade, na qual descrevem o local e registam o que sentem.

Após a visita os estudantes respondem a um inquérito cujos resultados principais se apresentam na discussão. Na visita é referida aos estudantes a distribuição geográfica da camarinha a nível mundial e introduzidos os conceitos de plantas endémica e invasora. Os casos de estudo incluem a camarinha como endémica e o chorão das praias – *Carpobrotus edulis* (L.) N.E.Br, como invasora (fig. 2).

Na atividade ‘Botânica e Arte’, os estudantes desenham em sala de aula as plantas e/ou paisagem que viram. Esta ficha de atividade possui uma imagem de um espécime de herbário de camarinha, anteriormente coletada na mesma zona costeira visitada no projeto Emc² (fig. 3), numa abordagem de ‘Place Based Education’ – PBE (‘Educação baseada no lugar’). A extirpação de camarinhas (ou seja, o seu desaparecimento num dado local) pode ser inferida pela análise comparativa entre os registos de coleções de herbário e a sua atual ocorrência na natureza (por ex.: em Montedor, Afife, onde atualmente não há camarinhas, há registo em herbários nacionais de exemplares aí coletados). Este é um exemplo que se deve divulgar como um alerta para se evitar a extirpação em outros locais da orla costeira.

As visitas, com duração de 2 a 3 horas, têm sido realizadas nas seguintes zonas costeiras de Portugal continental com matos de camarinha: 1) Praia de Moledo (Caminha); 2) Óbidos; 3) Praia do Seixo (Torres Vedras), 4) Praia do Moinho de Baixo (Meco); 5) Praia do Monte Velho (Sines); 6) Cabo de S. Vicente (Sagres) e 7) Ancão, conforme indicado na Figura 4. A visita realizada em Óbidos foi a única realizada com alunos de um Jardim Infantil (5 anos de idade) pelo que não preencheram Ficha de Atividade (Lima, 2025).

Atividade de ‘Recuperação da População de Camarinhas da Foz do Minho’

De todas as zonas costeiras visitadas apenas a de Moledo do Minho (onde existe parte da população de camarinhas da Foz do Minho) foi considerada estar em declínio. Deste modo, no âmbito do projeto Emc² foi decidido contribuir para a sua recuperação pela propagação de camarinhas por estacaria, em colaboração com o INIAV, I.P. A praia de Moledo do Minho situa-se no concelho de Caminha (GPS: 41°51’09” N 8°51’59” O) na proximidade do estuário do rio Minho e tem uma duna sob forte erosão (fig. 5).

Com o apoio de Investigadores do INIAV, I.P., foi iniciada em 2017, nas estufas em Oeiras, a propagação das camarinhas através do enraizamento de estacas – i.e., pedaços de caule com folhas colhidos de arbustos da duna de Moledo. A metodologia seguida foi publicada na revista Vida Rural (Lima et al., 2020). As estacas enraizadas foram sendo reintroduzidas num camalhão na Mata do Camarido, a partir novembro de 2018, com apoio da Associação COREMA, da União de Freguesias de Moledo e Cristelo e participação de estudantes do Agrupamento de Escolas Sidónio Pais (fig. 6).

Resultados e Discussão

Atividades ‘Visita de Estudo’ e ‘Botânica e Arte’

Inquérito aos alunos- Grau de conhecimento sobre a camarinha - No ano letivo de 2016/17, para os 75 estudantes que participaram no Projeto (28 de Escolas de Caminha, 28 de Escola de Oeiras e 19 de Escola de Sines), o inquérito revelou que a planta da camarinha era desconhecida para 75% dos alunos. Nos anos letivos seguintes os inquéritos também revelaram que a planta da camarinha era desconhecida da maioria dos estudantes: 1) em 2018, numa turma de Oeiras com 22 alunos, a camarinha era desconhecida para 21 alunos (95%); 2) em 2019, para duas turmas de Torres Vedras, num total de 36 alunos, a camarinha era desconhecida para 29 alunos (80%); em 2024, para 3 turmas de Sagres, Budens e Vila do Bispo, num total de 55 alunos, a camarinha era desconhecida para 48 alunos (87,3%) e em 2025, para uma turma de Almancil, num total de 23 alunos, a camarinha era desconhecida para 13 alunos (56,6%).

Inquérito aos alunos- Grau de conhecimento sobre o chorão-da-praia - No ano letivo de 2016/17, para os 75 estudantes envolvidos no projeto (28 de Caminha, 28 de Oeiras e 19 de Sines), o inquérito revelou que o ‘chorão-da-praia’ era conhecido da maioria (52 em 75, 69%) e desconhecido para 31%. Nos anos letivos seguintes, os inquéritos também revelaram que esta planta era conhecida da maioria dos estudantes. Num total de sete inquéritos realizados a 133 estudantes, esta planta invasora era conhecida de 96 estudantes (72,2%). Posteriormente, nos inquéritos realizados em 2024, para um total de 55 estudantes de Sagres, Budens e Vila do Bispo, esta planta invasora era conhecida de 39 (70,9%). O inquérito mais recente, realizado em 2025, para um total de 23 estudantes de Almancil, esta planta invasora era conhecida de 16 (69,6%).

Apesar de ser conhecida da maioria dos estudantes, o que pode indiciar ela ser frequente na zona costeira, a sua característica como planta invasora foi, de um modo geral, um dado novo para a maioria dos estudantes.

Aprender na natureza - o entusiasmo dos estudantes - O entusiasmo dos estudantes por explorar as dunas e nelas conhecerem novas plantas foi uma constante em todas as visitas como ilustram as respostas à questão sobre o que mais lhes tinha agradado. De entre várias respostas, transcrevem-se as seguintes: 1) ‘Foi explorar as dunas’ (estudante de Oeiras); 2) ‘Foi descobrir novas plantas’ (estudante de Sines); 3) ‘Ver com a lupa a camarinha e o chorão-das-praias’ (estudante de Caminha); 4) ‘Gostei particularmente de ver as camarinheiras, provar os seus frutos (camarinhas) e gostei de as ver com a lupa.’ (estudante de Torres Vedras); 5) ‘O que mais me agradou foi ir à procura da camarinheira’ (estudante de Sagres), e 6) ‘Gostei de ver as camarinhas e de estar na natureza’ (estudante de Almancil).

Atividade ‘Botânica e Arte’ - No sentido de divulgar os desenhos feitos pelos estudantes na Atividade ‘Botânica e Arte’ foram realizadas Exposições de Desenhos em várias instituições culturais ou museus de localidades próximas da zona litoral onde decorreram as visitas do projeto. Até 2025 foram organizadas as seguintes exposições:

Caminha (2016/17), Sines (2018), Oeiras (2018/19), Torres Vedras (2022), Sagres (2024) e Almancil (2025).

Inquéritos Professores - As visitas de estudo foram avaliadas por todas as Educadoras envolvidas no projeto como ‘Muito Boa’ e a sua avaliação qualitativa às visitas a zonas costeiras com camarinhas, revelou que estas são um bom ponto de contato com a natureza e um espaço privilegiado de ensino-aprendizagem de ciências e botânica.

Atividade de ‘Recuperação da População de Camarinhas da Foz do Minho’

A atividade de Recuperação da População de Camarinhas da Foz do Minho baseia-se na multiplicação por estacaria e iniciou-se em outubro de 2017 com a colheita de estacas caulinares de arbustos femininos e masculinos, com comprimentos de 7,5 a 21,0 cm. A fase seguinte foi o seu enraizamento em estufa de vidro no INIAV, I.P., (Oeiras) segundo um protocolo publicado por Lima et al. (2020). A sua posterior reintrodução na Mata do Camarido, decorreu entre 2018 e 2021, com boa adaptação das plantas e formação de frutos em várias camarinhas femininas (a partir de agosto de 2020). Estes resultados foram publicados no Portal Panorama Solutions (Lima, 2021).

Posteriormente, em 2024 procedeu-se à recolha de mais estacas de camarinhas da duna de Moledo, em colaboração com a Associação COREMA e foi realizada uma nova fase propagação por estacaria nas estufas do Viveiro ‘Raíz da Terra’, tendo as plantas já com raiz sido depois transferidas, em maio de 2025, para as Estufas do Município de Caminha e plantadas, em outubro de 2025 na Mata do Camarido com apoio de equipa do ICNF. No sentido de dar continuidade às ações para salvaguarda da população da ‘Foz do Minho’ foi estabelecido um protocolo de parceria entre todas as partes envolvidas nesta iniciativa, que tem desde 2016 envolvido a comunidade escolar de Caminha.

Atividade de recuperação de camarinhas – o entusiasmo e a capacitação dos estudantes - A recuperação da população de camarinhas da Foz do Minho (em Moledo) com a reintrodução de plantas obtidas por estacaria tem sido realizada com a participação dos estudantes (desde 2018) e de um grupo de 30 escuteiros de Seixas (desde 2025).

Um testemunho descrito no trecho de um trabalho de grupo que se transcreve, revela que esta foi uma atividade considerada muito interessante: *«Na primeira observação a planta do nosso grupo media 24 cm. Nessa observação, em novembro de 2018, vimos como as camarinhas são plantas fascinantes. Dia 28/05/2019, tivemos uma aula de campo que, a nosso ver, foi importantíssima para a nossa aprendizagem. Nós ficamos bastante satisfeitos por saber que a nossa planta que antes media 24 cm já mede 28 cm. Conclusão- foi uma atividade: 1) mais enriquecedora do que uma aula normal; 2) foi uma aula divertidíssima.»*

A ação de plantação de camarinhas decorrida em outubro de 2025 que envolveu alunos e escuteiros, foi divulgada pela comunicação social (Sequeira, 2025; Xavier, 2025) e permitiu a reintrodução de milhares de camarinhas em várias zonas da Mata do Camarido, cujo desenvolvimento será monitorizado durante os próximos anos.

Nestas atividades foi dada aos jovens e estudantes a oportunidade de serem protagonistas, capacitando-os a agir, com benefícios para a sua formação, conforme referido por diversos estudos, reveladores de que: 1) os estudantes beneficiam quando eles próprios estão envolvidos no processo de aprendizagem em vez de só receberem informação transmitida numa lição (Uno, 2009); 2) uma *«boa educação implica mais que o intelecto(...). A boa educação requer emoção»* (Gottman & DeClaire, 1999).

Sobre este último item, realce-se ainda a perspetiva de Finch (2008), segundo a qual *«Primeiro apaixonamo-nos pela natureza e depois somos motivados a aprender mais sobre ela – incluindo o que há a fazer para a proteger»*.

Conclusões

Um dos aspetos mais compensadores do projeto reside no entusiasmo dos estudantes não só na atividade de visita aos matos de camarinha como também na atividade de recuperação da população de camarinhas da Foz do Minho (Caminha) em que a reintrodução e o registo do crescimento das plantas obtidas por estacaria são feitos pelos estudantes. Embora o tamanho da amostra de inquiridos seja reduzido, é possível concluir que a planta da camarinha é um recurso silvestre ainda pouco conhecido. Nessa medida, ao longo destes anos, as atividades do projeto desenvolvidas em habitats dunares, que são um espaço privilegiado de ensino-aprendizagem sobre botânica, têm permitido um aumento do conhecimento dos estudantes sobre a camarinha como espécie endémica, sobre o chorão da praia como espécie invasora, bem como um despertar do gosto pela descoberta na natureza. Relativamente à Atividade de Recuperação da população de camarinhas de Moledo que se encontrava em declínio, a reintrodução de plantas obtidas por estacaria tem decorrido bem, com o desenvolvimento de plantas masculinas e femininas, e com a formação nestas últimas de frutos. Sobre esta atividade os testemunhos dos alunos envolvidos mostram como na natureza são favorecidas aprendizagens significativas.

Deste modo, conclui-se que o Projeto educativo Emc² tem atingido os seus objetivos, que incluem: (1) divulgar a camarinha aos jovens e ao público; (2) enriquecer os currículos escolares; e (3) capacitar e mobilizar os alunos a agir na conservação de camarinhas em colaboração com ONG e a Sociedade Civil. O Projeto prosseguirá com o estabelecimento de contatos com outras comunidades escolares com vista a divulgar a camarinha e a agir em prol da sua conservação.

Agradecimentos

A todos os Professores, Comunidades Educativas e à Associação COREMA. A todos os Municípios e outras Entidades Municipais e Nacionais envolvidas pela colaboração nas iniciativas. Aos colegas de Herbários Nacionais pela ajuda na recolha de informação.

Financiamento- projetos estratégicos [UIDB/04292/2020](#) e [UIDP/04292/2020](#) atribuídos ao MARE - Centro de Ciências do Mar e do Ambiente e o projeto [LA/P/0069/2020](#) atribuído ao ARNET - Aquatic Research Network

Referências Bibliográficas

- Castroviejo, S. 2003. Corema, pp 524-526 in Flora Iberica. Vol. IV: *Cruciferae-Monotropaceae*. 794 pp, Ed. CSIC, Madrid. ISBN: 978-84-00-07385-5. www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/04_075_01_Corema.pdf
- Finch, K. 2008. Extinction of Experience: A Challenge for Environmental Education. *New England Journal of Environmental Education*. <http://kidsandnature.org/blog/wp-content/uploads/2008/10/kenfincharticle.pdf>
- Gottman, J. & Declaire, J. 1999. *A Inteligência Emocional na Educação*. Pergaminho, Lisboa.
- Lima, M.A. & Vasconcelos, L. 2017. Projeto Emc² 'Explorar matos de camarinha da costa' Livro de Atividades, 32 pp. FCIÊNCIAS.ID Ed., Lisboa. www.mare-centre.pt/pt/sociedade/programas-educativos/emc2
- Lima, M.A.; Vasconcelos, L.T.; Brás de Oliveira, P.; Valdivieso, T. e Rosado-da-Luz; F. 2020. Camarinhas – o projeto Emc²: da educação ambiental à recuperação de uma população em declínio na zona costeira de Moledo. *Vida Rural* 1856: 42-45.

- Lima, M.A. 2021. PANORAMA Snapshot solution - Project Emc2 ‘Exploring White crowberry Coastal Habitats’. <https://panorama.solutions/en/solution/project-emc2-exploring-white-crowberry-coastal-habitats> (24 November 2021)
- Lima, A. 2025. Crianças do Jardim Infantil de Vau visitam lagoa de Óbidos para divulgar camarinhas. <https://www.regiaodeleiria.pt/2025/07/criancas-do-jardim-infantil-de-vau-visitam-lagoa-de-obidos-para-divulgar-camarinhas/>
- Louv, R. 2005. Last Child in The Woods: Saving our Children from Nature-deficit Disorder. Algonquin Books of Chapel Hill, Chapel Hill, NC.
- Navarro-Perez, M. & Tidball, K.G. 2012. Challenges of Biodiversity Education: A Review of Education Strategies for Biodiversity Education. International Electronic Journal of Environmental Education, 2(1).
- Sequeira, I. (2025). Alunos e escuteiros plantaram 3000 camarinhas para proteger espécie no Alto Minho. Wilder, <https://wilder.pt/historias/alunos-e-escuteiros-plantaram-3000-camarinhas-para-proteger-especie-no-alto-minho> (5 novembro 2025).
- Sharrock, S. 2020. Plant Conservation Report 2020: A review of progress in implementation of the Global Strategy for Plant Conservation 2011-2020. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montréal, Canada and Botanic Gardens Conservation International, Richmond, UK. Technical Series No. 95: 68 pp.
- Uno, G.E. 2009. Botanical Literacy: What and How Should Students Learn About Plants? American Journal of Botany 96(10): 1753–1759.
- Xavier, P. 2025. Camarinhas da mata do camarido reforçadas com plantação de milhares de plantas. VianaTV <https://vianatv.pt/camarinhas-da-mata-do-camarido-reforcadas-com-plantacao-de-milhares-de-plantas/> (11 novembro 2025)

Quadros e Figuras



Figura 1 - Visita a zona costeira com camarinhas e recolha de ramos para mini-herbário.



Figura 2 - Planta feminina de camarinha com frutos brancos (esquerda) e 'chorão-da-praia' - a sobrepor-se a planta de camarinha (direita)



Figura 3 - Desenhos (esquerda) e imagem de espécime de herbário de camarinha (direita).

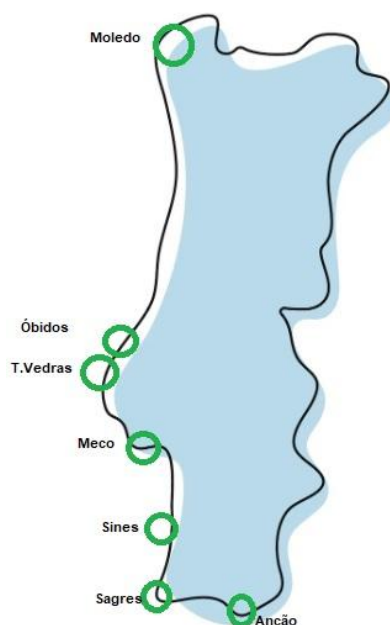


Figura 4 - Mapa de Portugal continental com zonas visitadas no projeto Emc²



Figura 5 - Duna de Moledo do Minho onde decorre a educação ambiental (esquerda); arribas de erosão em dezembro de 2019 (centro) e em agosto de 2020 (direita).



Figura 6 - Fases de recuperação da população de camarinhas da Foz do Minho: estacas no Viveiro Raíz da Terra (esquerda); frutos formados em 2021 de camarinha reintroduzida em 2018 (centro); plantação de camarinhas por alunos no Camarido, em 2025 (direita).



Sessão III

Ecosistemas e sanidade vegetal

SustainGrowth: sistema de certificação da produção nacional rumo à intensificação sustentável da agricultura

Bruno Magalhães¹, Cristina Ascenso¹, Livia Pian², Maria do Carmo Martins³, José Costa Gomes⁴, Margarida Luis⁵, José Silvestre⁵

¹ISQ - Instituto de Soldadura e Qualidade, Av. Prof. Dr. Cavaco Silva, 33, TagusPark, 2740-120 Porto Salvo;

²SFCoLAB - Associação SFCOLAB – Laboratório Colaborativo para a Inovação Digital na Agricultura, Quinta da Almoíña, 2565-191 Dois Portos;

³COTHN - Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional, R. de Leiria, 2460-059 Alcobaça;

⁴EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva, S.A, Rua Zeca Afonso, 2, 7800-522 Beja;

⁵INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Polo de Inovação de Dois Portos, Quinta da Almoíña, 2565-191 Dois Portos.

Resumo

SustainGrowth tem por objetivo desenvolver um sistema de certificação da produção intensiva sustentável, abrangendo as vertentes ambiental, económica, social e de governança, adaptado à realidade do tecido agrícola e às condições edafoclimáticas do território nacional, incidindo, entre outras, nas culturas protegidas no Aproveitamento Hidroagrícola do Mira, cumprindo o estipulado na RCM 97/2021. Este sistema visa a promoção dos produtos agroalimentares portugueses e a disponibilização de um sistema centralizado de informação de indicadores de sustentabilidade, que permita aos produtores posicionar o seu desempenho face às melhores práticas, definindo metas para melhoria contínua e, à tutela, contribuir para o desenvolvimento de políticas sustentado em informação mais fidedigna da realidade e das condicionantes das culturas a nível regional.

Palavras-chave: Culturas intensivas, avaliação da sustentabilidade, plataforma digital, indicadores, promoção dos produtos agroalimentares portugueses.

Abstract

SustainGrowth aims to develop a certification system for sustainable intensive production, encompassing environmental, economic, social, and governance dimensions. The system is tailored to the characteristics of the agricultural sector and the edaphoclimatic conditions of the national territory, focusing, among others, on protected crops within the Mira Hydro-Agricultural Development, in compliance with Resolution of the Council of Ministers n° 97/2021. The project seeks to promote portuguese agri-food products and provide a centralized information system for sustainability indicators, enabling producers to assess their performance against best practices, set continuous improvement targets, and support public authorities in developing policies based on more accurate and reliable data regarding regional crop conditions and realities.

Keywords: Intensive crops, sustainability assessment, digital platform, indicators, promotion of Portuguese agri-food products

Introdução

A região do Sudoeste Alentejano apresenta características particularmente favoráveis ao desenvolvimento agrícola dos pequenos frutos. As condições edafoclimáticas em conjugação com a disponibilidade de água proveniente do sistema de rega do Mira criam um ambiente de exceção para a horticultura e fruticultura, tanto em modo de produção ao ar livre como em culturas protegidas, integrando diversas espécies de pequenos frutos e hortícolas de elevado valor económico. O Aproveitamento Hidroagrícola do Mira (AH Mira), compreende uma área beneficiada de cerca de 12.000 hectares, distribuída maioritariamente pelo concelho de Odemira (aproximadamente 10.670 ha) e parcialmente pelo concelho de Aljezur (cerca de 1.330 ha)¹. O Perímetro de Rega do Mira, uma das áreas geográficas alvo do projeto SustainGrowth, apresentou, em 2023, 502 milhões de euros em Valor Acrescentado Bruto, ultrapassou os 130 milhões de euros em receitas fiscais, e contabilizou uma média anual de 15.228 empregos entre 2019 e 2023². Estes dados são um reflexo da sua relevância tanto a nível económico como social, mas a exploração agrícola nesta área encontra vários desafios, com destaque para os constrangimentos ao fornecimento de água, o impacto ambiental da intensificação agrícola e o impacto social da mão-de-obra imigrante³.

As estratégias de intensificação agrícola têm como principal objetivo aumentar a produtividade das explorações, porém, estão frequentemente associadas a efeitos adversos sobre os ecossistemas. Entre estes, destaca-se o risco acrescido de poluição difusa (Rodríguez Sousa et al., 2023), bem como a diminuição da diversidade biológica (Saraiva, 2022) e o maior consumo de recursos hídricos necessários para sustentar os níveis de produção intensiva. A gestão eficiente dos recursos hídricos na agricultura constitui, atualmente, um dos principais desafios à escala global, consequência do aumento contínuo da procura por água e dos efeitos agravados das alterações climáticas (Lopes, 2025). Em território português, a escassez hídrica assume-se como um dos fatores mais restritivos para o desenvolvimento das atividades agrícolas. Assim, a preservação, o armazenamento e a distribuição sustentável da água emergem como prioridades fundamentais para os diversos agentes do setor. A viabilidade futura da agricultura nacional depende, de forma direta, da qualidade e disponibilidade deste recurso, o que reforça a necessidade de adotar práticas agrícolas que assegurem um uso racional e eficiente da água (Andresen et al., 2023). Outro dos aspetos que tem assumido crescente importância no setor agrícola português é a necessidade de mão de obra, cuja procura tem aumentado de forma significativa nos últimos anos. Para responder a esta exigência, tem-se registado uma intensificação dos fluxos migratórios, com a chegada de um número crescente de trabalhadores estrangeiros destinados às atividades agrícolas.

O recrutamento destes trabalhadores é frequentemente intermediado por empresas prestadoras de serviços agrícolas, que assumem um papel central na gestão e contratação da força de trabalho migrante. (Teixeira & Carvalho, 2020). Uma parte considerável dos trabalhadores sazonais encontra-se em situação administrativa irregular, vivendo por vezes em condições socioeconómicas precárias. (Almeida, 2019).

Numa resposta ao estipulado na RCM 97/2021, que define orientações e recomendações relativas à informação e sustentabilidade da atividade agrícola intensiva

¹ <https://www.dgadr.gov.pt/pt/mira>

² <https://vozdocampo.pt/wp-content/uploads/2025/01/Apresentacao-Final-Impacto-Lusomorango.pdf>

³ <https://www.agroportal.pt/perimetro-de-rega-do-mira-gerou-mais-de-130-milhoes-de-euros-de-receitas-fiscais-em-2023/>

e que originou o presente desenvolvimento, o SustainGrowth (Cofinanciado pelo PRR – Plano de Recuperação e Resiliência; Medida RE-C05-i03 – Agenda de Investigação e Inovação para a Sustentabilidade da Agricultura, Alimentação e Agroindústria) apresenta-se como um projeto-piloto para a criação de regimes de certificação de produção sustentável englobando as vertentes ambiental, económica, social e de governança. Paralelamente à incidência nas culturas protegidas no Aproveitamento Hidroagrícola do Mira, o projeto também engloba as culturas de olival e amendoal, na Zona de Influência de Alqueva e, a cultura de abacate no Algarve.

Material e Métodos

O desenvolvimento do referencial SustainGrowth foi sustentado por uma análise de *benchmarking* abrangente, que integrou vinte e três sistemas de certificação, normas e referenciais associados à produção agrícola sustentável. Este processo baseou-se em instrumentos normativos de natureza nacional e internacional, com o propósito de promover a harmonização metodológica entre diferentes enquadramentos de sustentabilidade e, por conseguinte, potenciar o reconhecimento internacional dos produtos agrícolas portugueses. Foi dada prioridade a referenciais já implementados por produtores nacionais, de forma a otimizar a recolha e validação de dados. A análise considerou a aplicabilidade prática dos referenciais à sustentabilidade de sistemas agrícolas de carácter intensivo, englobando as dimensões ambiental, económica, social e de governança. Partindo destas quatro dimensões, foram definidos grupos e subgrupos, que, por sua vez, deram origem aos indicadores.

O SustainGrowth foi estruturado com base em dois grupos distintos de indicadores:

1. Indicadores qualitativos, associados a respostas dicotómicas (sim/não);
2. Indicadores quantitativos e de recolha de dados, baseados em respostas numéricas.

Os indicadores de recolha de dados serão inicialmente enquadrados como indicadores de resposta sim/não, à qual será adicionada informação numérica para a construção de uma base de dados consistente.

Resultados e Discussão

Entre os sistemas internacionais avaliados, destacam-se aqueles com abrangência integral das quatro dimensões da sustentabilidade, nomeadamente o LEAF e o SAFA, desenvolvido pela FAO/ONU. Em contrapartida, os referenciais GLOBALG.A.P. e Naturland evidenciam um enfoque mais pronunciado nas vertentes ambiental e social. O sistema PlanetProof distingue-se pela elevada especificidade na avaliação da sustentabilidade ambiental, sendo de relevante aporte para os indicadores quantitativos.

A análise de sistemas de certificação e referenciais de carácter nacional, utilizados fora de Portugal, possibilitou delinear as tendências e práticas predominantes em outros países, bem como recolher informações específicas relativas às dimensões de sustentabilidade consideradas.

A análise ao nível dos sistemas de certificação/referenciais de âmbito nacional evidenciou que, no domínio da sustentabilidade agrícola, os referenciais se encontram alinhados com regulamentações e sistemas de certificação de origem europeia. Em função da sua estrutura e metodologia de desenvolvimento, o Programa Alqueva Sustentável revelou-se particularmente adequado para adaptação às culturas em estudo. Por sua vez, o Plano de Sustentabilidade dos Vinhos do Alentejo apresenta elevado nível de detalhe e maturidade metodológica, sendo considerado relevante tanto pelos parâmetros avaliados

quanto pelo processo de certificação, cuja implementação está prevista numa fase subsequente.

Ao nível da caracterização da dimensão ambiental, foram inicialmente definidos 11 grupos e 26 subgrupos (tabela 1) que deram origem a 94 indicadores para a sustentabilidade ambiental.

Para a avaliação da dimensão social, foram definidos 7 grupos e 25 subgrupos (tabela 2) que deram origem a 69 indicadores.

A dimensão económica foi caracterizada com base em 4 grupos e 13 subgrupos (tabela 3) a partir dos quais foram obtidos 24 indicadores.

A caracterização da dimensão de governança compreendeu a definição de 4 grupos e 8 subgrupos (tabela 4) para os quais foram estabelecidos 15 indicadores.

Os indicadores qualitativos apresentam maior correspondência com os indicadores presentes nos referenciais analisados, enquanto os indicadores quantitativos e de recolha de dados assumem particular relevância por permitirem diferenciar este sistema de outras metodologias de avaliação da sustentabilidade agrícola. Estes indicadores viabilizam a criação de uma base de dados empírica, fundamental para a definição de valores de referência e para a caracterização das culturas em análise com base em dados observacionais. Os indicadores de recolha de dados têm como objetivo a obtenção de dados empíricos que sustentem a construção de uma base de dados representativa, viabilizando a sua utilização como indicadores quantitativos na avaliação da sustentabilidade.

No total, foram identificados 202 indicadores, dos quais 181 indicadores correspondem a variáveis qualitativas, enquanto 21 são de natureza quantitativa ou de recolha de dados. A cada indicador foi atribuída uma pontuação ponderada em função da sua relevância para a sustentabilidade agrícola. Foram ainda definidos indicadores específicos consoante a tipologia de cultura (cultivo em estufa ou em campo aberto), sendo possível classificar determinados indicadores como não aplicáveis (N/A), conforme a pertinência do contexto de análise.

Os indicadores e toda a estrutura do referencial foram transpostos para uma infraestrutura digital interativa, uma plataforma acessível via web, concebida para a autoavaliação do desempenho sustentável de entidades do setor agrícola — incluindo empresas, explorações e produtores individuais.

Conclusões

O sistema desenvolvido tem como propósito fortalecer a capacidade dos produtores agrícolas na identificação de práticas-chave associadas à intensificação sustentável da produção, enquanto fornece às entidades reguladoras ferramentas técnicas de apoio à formulação de políticas públicas e à tomada de decisão baseada em evidências empíricas.

Os indicadores que compõem o sistema SustainGrowth encontram-se em processo avançado de validação participativa com os produtores e outros atores da área agrícola que integram o consórcio do projeto. Esta etapa é conduzida através de sessões técnicas, reuniões setoriais e workshops colaborativos envolvendo o conselho consultivo e as associações representativas do setor agrícola, nos quais são discutidos aspetos críticos como a pertinência, aplicabilidade e representatividade dos indicadores face às condições reais da agricultura nacional.

A incorporação de indicadores orientados à recolha e análise de informação visa aumentar a robustez do sistema avaliativo, respondendo à atual lacuna de dados específicos sobre as culturas estudadas. A colaboração contínua com os diversos agentes

do setor agrícola tem permitido identificar necessidades emergentes, desafios operacionais e expectativas em torno do sistema de certificação. Paralelamente, encontra-se em desenvolvimento a definição estratégica do posicionamento do SustainGrowth, centrada nas prioridades dos agricultores e na comunicação transparente do impacto efetivo da intensificação agrícola sustentável. O sistema de indicadores do SustainGrowth já se encontra digitalizado e disponível para utilização, autoavaliação e testes por meio da plataforma interativa, acessível através do endereço <https://plataforma.sustainingrowth.pt/>.

Referências Bibliográficas

- Almeida, M.A. 2019. A nova paisagem rural portuguesa e o trabalho na agricultura superintensiva. Congresso Internacional da Escravidão ao Trabalho Digno. Nos 150 anos da abolição da escravidão em Portugal e nos 100 anos da criação da OIT. Centro de Investigação e Estudos de Sociologia, ISCTE-Instituto Universitário de Lisboa
- Andresen, T., Andrade, G.S., Baptista, J.M., Joanaz de Melo, J., Tarrafa, L., Araújo, M.B., Serrão, M., Santos, F.D., Castel-Branco, S., Martins, C. e Leitão, L. 2023. Reflexão sobre o nexa da Agricultura com o solo, a água e a biodiversidade. CNADS - Conselho Nacional do Ambiente e do Desenvolvimento Sustentável.
- Lopes, H.S. O uso da água no setor da agricultura: desafios e oportunidades. 2025. *Voz do Campo* 288: 88-90.
- Rodríguez Sousa, A.A., Muñoz-Rojas, J., Brígido, C., Prats, S.A. 2023. Impacts of agricultural intensification on soil erosion and sustainability of olive groves in Alentejo (Portugal). *Landsc Ecol* 38: 3479–3498. <https://doi.org/10.1007/s10980-023-01682-2>
- Saraiva, R.M.S. 2022. Efeitos da gestão na diversidade taxonómica e funcional das comunidades de plantas e do banco de sementes dos olivais do Baixo Alentejo. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal. Dissertação de Mestrado.
- Teixeira, S. e Carvalho, J. 2020. O impacto da imigração no setor agrícola: o caso do Alentejo. Centro de Investigação e Estudos de Sociologia, ISCTE-Instituto Universitário de Lisboa.

Tabelas e Figuras**Tabela 1** - Grupos e subgrupos da dimensão ambiental.

DIMENSÃO AMBIENTAL	
Grupos	Subgrupos
Biodiversidade	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão da biodiversidade e ecossistemas • Conversão de áreas agrícolas em áreas naturais
Água	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão da água • Sistema de rega • Utilização eficiente da água • Métricas de uso da água • Impactos da utilização da água
Solo e substrato	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão do solo • Conservação e melhoria do solo • Substrato
Energia	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão da energia • Eficiência energética
Gases de efeito estufa (GEE)	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação dos GEE
Resíduos	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão de resíduos • Reciclagem e valorização de resíduos • Plásticos
Fertilizantes, incluindo adubos, corretivos minerais e orgânicos e bioestimulantes	<ul style="list-style-type: none"> • Plano de fertilização • Gestão da fertilização • Fertilizantes de base orgânica
Fitofármacos	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão de fitofármacos • Métricas dos tratamentos • Controlo de risco dos fitofármacos
Proteção integrada (PI)	<ul style="list-style-type: none"> • Implementação da PI • Gestão de pragas e doenças
Material vegetal	<ul style="list-style-type: none"> • Material vegetal
Digitalização	<ul style="list-style-type: none"> • Digitalização

Tabela 2 - Grupos e subgrupos da dimensão social.

DIMENSÃO SOCIAL	
Grupos	Subgrupos
Representantes dos colaboradores	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão dos representantes dos trabalhadores • Eleição dos representantes dos trabalhadores
Procedimentos de reclamações	<ul style="list-style-type: none"> • Gestão das reclamações e sugestões
Boas práticas e benefícios sociais	<ul style="list-style-type: none"> • Declaração de boas práticas sociais e direitos humanos • Benefícios sociais adicionais • Alojamento • Satisfação • Acesso à escolaridade • Grupos vulneráveis
Regulamentação de trabalhadores e direitos laborais	<ul style="list-style-type: none"> • Subcontratação/Trabalhadores na cadeia de valor • Acesso e conhecimento dos regulamentos laborais • Contratos de trabalho • Salários e Recibos vencimento • Não emprego de menores • Horas de trabalho e pausas • Equidade • Gestão e formação de colaboradores
Higiene, Segurança e Saúde no trabalho	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação de riscos e formação • Emergências e primeiros socorros • Equipamentos de Proteção Individual (EPI) • Bem-estar dos trabalhadores
Comércio justo: Compras responsáveis, direitos dos fornecedores	<ul style="list-style-type: none"> • Preço justo • Responsabilidade social
Comunidade	<ul style="list-style-type: none"> • Atividades • Comunicação

Tabela 3 - Grupos e subgrupos da dimensão económica.

DIMENSÃO ECONÓMICA	
Grupos	Subgrupos
Investimento	<ul style="list-style-type: none"> • Investimento interno • Investimento para a comunidade • Sustentabilidade no longo prazo
Vulnerabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade da produção • Estabilidade de fornecimento • Estabilidade de mercado • Liquidez • Gestão do risco
Qualidade e informação do produto	<ul style="list-style-type: none"> • Segurança alimentar • Informação do produto
Economia local	<ul style="list-style-type: none"> • Criação de valor • Fornecedores locais

Tabela 4 - Grupos e subgrupos da dimensão da governança.

DIMENSÃO GOVERNANÇA	
Grupos	Subgrupos
Ética corporativa	<ul style="list-style-type: none"> • Missão • Responsabilidade • Transparência
Participação	<ul style="list-style-type: none"> • Partes interessadas • Procedimentos de reclamação • Resolução de conflitos
Cumprimento	<ul style="list-style-type: none"> • Legislação
Transição digital	<ul style="list-style-type: none"> • Digitalização

Estratégias ecológicas para o controlo de *Scirtothrips aurantii* e *Scirtothrips dorsalis* (Insecta: Thysanoptera), em framboesa e mirtilo, em Portugal

Frederico Preza^{1,2,3}, Pedro B. Oliveira^{1,4}, José Carlos Franco^{2,3}, Célia Mateus¹

¹INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras.

²Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa;

³CEF, Edifício Prof. Azevedo Gomes, ISA, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa;

⁴LEAF, Instituto Superior de Agronomia Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa.

Resumo

A produção de pequenos frutos em Portugal tem registado um crescimento acentuado nos últimos anos, com destaque para a framboesa, impulsionada pela elevada procura nos mercados nacional e internacional. O mirtilo também tem ganho relevância, devido às suas propriedades nutricionais e às condições edafoclimáticas favoráveis à sua produção no país. Contudo, o aumento da incidência de novas pragas e doenças nestas culturas constitui um desafio, que implica a redefinição dos sistemas de proteção atualmente adotados, nomeadamente através de estratégias de base ecológica.

No âmbito de um plano de investigação de doutoramento, estão a ser estudadas duas espécies exóticas de tripes (Thysanoptera), recentemente introduzidas em Portugal, que são pragas potenciais de pequenos frutos. *Scirtothrips aurantii*, espécie de origem africana, foi detetada pela primeira vez, no país, no final de 2022, em citrinos, e posteriormente em framboesa e amora. A presença, em Portugal, de *Scirtothrips dorsalis*, espécie nativa do sul da Ásia, foi confirmada em 2024, tendo, até ao momento, *apesar da sua elevada polifagia, sido observada*, apenas, em citrinos, *Myoporum sp. e Ricinus communis*.

Com o objetivo de mitigar o impacto de *S. aurantii* nas culturas de framboesa e mirtilo, estão em curso ensaios com infraestruturas ecológicas, nomeadamente para avaliar: (1) a eficácia de diferentes espécies de plantas, em corredores ecológicos no exterior das estufas, tendo em vista atrair inimigos naturais e fomentar o controlo biológico das populações de tripes; e (2) plantas-armadilha, no exterior e interior das estufas, para atraírem a praga e reduzirem a sua presença na cultura. Pretende-se também estudar a dinâmica de infestação de *S. aurantii*, bem como a sua distribuição espacial nas culturas, com vista à otimização das estratégias de proteção a implementar. Os estudos em curso serão adaptados e complementados para *S. dorsalis*, caso esta espécie venha a ser detetada em pequenos frutos.

Palavras-chave: Tripes, inimigos naturais, plantas-armadilha, plantas-repositório de auxiliares, controlo biológico.

Abstract

The production of berries in Portugal has grown significantly in recent years, particularly raspberries, driven by high demand in domestic and international markets. Blueberry has also gained importance due to its nutritional properties and the favourable edaphoclimatic conditions for its production in the country. However, the increasing incidence of new pests and diseases in these crops represents a major challenge, requiring

a redefinição dos atualmente adotados sistemas de proteção, nomeadamente através de estratégias baseadas em ecologia.

Dentro do âmbito de um projeto de doutoramento, duas espécies exóticas de trips (Thysanoptera), recentemente introduzidas em Portugal e consideradas pragas potenciais de frutos, estão a ser estudadas. *Scirtothrips aurantii*, uma espécie de origem africana, foi detetada no país em finais de 2022 em citrinos, e foi posteriormente registada em framboesa e mirtilo. A presença em Portugal de *Scirtothrips dorsalis*, uma espécie nativa da Ásia, foi confirmada em 2024 e, apesar da sua alta polifagia, até ao momento só foi observada em citrinos, *Myoporum* sp. e *Ricinus communis*.

Para mitigar o impacto de *S. aurantii* em framboesa e mirtilo, estão a ser realizados ensaios baseados em infraestruturas ecológicas, com o objetivo de avaliar: (1) a eficácia de diferentes espécies de plantas estabelecidas em corredores ecológicos fora das estufas para atrair inimigos naturais e melhorar o controlo biológico das populações de trips; e (2) o uso de plantas armadilha, tanto fora como dentro das estufas, para atrair a praga e reduzir a sua presença na cultura. Além disso, a dinâmica de infestação de *S. aurantii* e a sua distribuição espacial dentro das culturas estão a ser investigadas para otimizar as estratégias de proteção a implementar. Os estudos em curso serão adaptados e expandidos para *S. dorsalis* caso esta espécie seja detetada em frutos de frutos.

Palavras-chave: Trips, inimigos naturais, plantas armadilha, plantas bancárias, controlo biológico.

Introdução

Nos últimos anos, a região do Sudoeste Alentejano, especialmente o concelho de Odemira, tem-se afirmado como uma das áreas mais dinâmicas na produção de pequenos frutos, como mirtilo e framboesa (Vasconcelos, 2025). As condições edafoclimáticas desta região, influenciadas pelo clima atlântico moderado e disponibilidade de água para rega, têm-se revelado muito favoráveis para este tipo de culturas, permitindo produções contínuas, ao longo da maior parte do ano e frutos de elevada qualidade, com muita procura nos mercados internacionais (Lenehan, 2024). Em Portugal, tem-se igualmente observado um aumento do consumo destes frutos, impulsionado pelas suas propriedades nutricionais, nomeadamente elevada concentração de fibras e poder antioxidante, que contribuem para o controlo do peso corporal e para a prevenção de doenças crónicas (Cosme et al., 2022).

A expansão da área de cultivo de pequenos frutos, em conjugação com as alterações climáticas, tem contribuído de forma significativa para o aparecimento de novas espécies de insetos, com potencial estatuto de praga. Neste contexto, destacam-se duas espécies de trips recentemente introduzidas em Portugal: *Scirtothrips aurantii* e *Scirtothrips dorsalis*. A primeira, de origem africana, foi detetada no final de 2022, em citrinos, e, mais recentemente, em framboesa e mirtilo (EPPO, 2023; DGAV, 2026a). A segunda, nativa do sul da Ásia, é altamente polífaga e está referenciada como praga de pequenos frutos, nomeadamente em mirtilo, na Flórida, e framboesa, no México. A sua presença, em Portugal, foi confirmada em 2024, tendo sido, até ao momento, observada apenas em citrinos, *Myoporum* sp. e *Ricinus communis* (EPPO, 2026; DGAV, 2026a).

Scirtothrips aurantii e *S. dorsalis* apresentam tamanho reduzido e características morfológicas semelhantes, o que impede a sua diferenciação a olho nu ou mesmo com lupa de campo. Ambas as espécies variam na coloração, do amarelo-claro ao laranja-avermelhado e não evidenciam diferenças substanciais de tamanho (EFSA, 2018). A elevada semelhança morfológica reforça a necessidade de utilização de análises

microscópicas e moleculares, de modo a assegurar uma monitorização adequada e a implementação de estratégias de proteção eficazes.

Enquadramento biológico

Os estragos provocados por ambas as espécies de tripses são muito semelhantes, resultando da alimentação das larvas e dos adultos, variando apenas em função da planta hospedeira (Kumar et al., 2013; Gilbert & Samways, 2018). Em folhas de mirtilo atacadas por *Scirtothrips* spp., é frequente a observação de manchas prateadas, que podem evoluir para necrose e adquirir coloração castanha, enquanto nas folhas de framboesa, os estragos manifestam-se, maioritariamente, sob a forma de pequenas pontuações claras (fig. 1). Ao nível do caule, os estragos são semelhantes em ambas as culturas, caracterizando-se pela presença de manchas castanhas na bainha foliar, junto ao caule, as quais se expandem a partir dessa região. Relativamente ao fruto, os estragos apenas se observam no mirtilo, uma vez que, até ao momento, não foram relatados estragos causados em framboesa. No mirtilo, os estragos são marcas e cicatrizes, geralmente nas zonas de contacto entre os frutos. As plantas de mirtilo, quando observadas no campo, apresentam frequentemente coloração acastanhada, resultante das necroses ocorridas nos caules e nas folhas, podendo verificar-se, posteriormente, a sua queda prematura. Por sua vez, nas plantas de framboesa observa-se o encurtamento dos entrenós, comprometendo o desenvolvimento vegetativo e a respetiva produção.

Em resultado destes estragos, podem ocorrer prejuízos, nomeadamente devido a: redução significativa da produção, em caso de infestação severa; redução do valor comercial dos frutos, em resultado da alteração da aparência e da qualidade organolética (no caso dos mirtilos); infeção por agentes patogénicos, através das lesões provocadas pela armadura bucal dos tripses; e imposição de restrições legais ao transporte e à comercialização de frutos (apenas no caso do mirtilo) e plantas (DGAV, 2026b). Há ainda que ter em conta o risco de infeção pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), de que *Scirtothrips dorsalis* é vetor (EPPO, 2025).

A observação destes tripses na cultura é possível apenas nos estádios larvares e no adulto, uma vez que os ovos são muito pequenos e as pupas se desenvolvem no solo (Mateus, 2023; EPPO, 2026). As larvas e adultos apresentam comportamento tigmotático, assegurando a camuflagem e reduzindo o risco de predação. Se não estivermos atentos, só nos apercebemos da sua presença, quando já em elevado número e/ou os sintomas são evidentes.

Estratégias de monitorização e controlo

A sua monitorização pode ser efetuada através de armadilhas adesivas amarelas, colocadas ao nível do topo das plantas. Contudo, é preferível utilizar a técnica das pancadas em folhas jovens, flores ou frutos sobre uma taça acrílica branca, seguida da recolha dos insetos com aspirador entomológico e da sua conservação em álcool a 70 %, uma vez que os insetos capturados nas armadilhas adesivas podem ficar danificados, dificultando a identificação morfológica (DGAV, 2025a). À semelhança de outras espécies de tripses que atacam estas culturas, como *Frankliniella occidentalis*, *Thrips flavus* ou *Thrips tabaci*, as estratégias de proteção baseiam-se, predominantemente, na implementação de táticas de proteção química, nomeadamente através da realização de tratamentos fitossanitários, com inseticidas homologados, como spinosade ou ácidos gordos (sob a forma de sais de potássio) (DGAV, 2025b). Estes devem ser aplicados na parte aérea das plantas, focando-se nos estados larvares e adultos. No entanto, o sucesso do controlo depende de uma monitorização regular para deteção precoce e da integração

de táticas de proteção biológica, como largadas aumentativas de predadores, e táticas culturais, como a gestão da poda e da rega. Ressalva-se que o uso indevido de pesticidas pode comprometer a fauna auxiliar e promover resistências.

A implementação de táticas de proteção biológica permite a redução da aplicação de inseticidas de síntese, privilegiando a utilização de produtos com menor impacto ambiental. Esta abordagem oferece vantagens significativas, nomeadamente o favorecimento do estabelecimento de insetos auxiliares autóctones, o que contribui diretamente para a preservação e incremento da biodiversidade nos ecossistemas agrícolas.

As táticas de proteção biológica podem ser de três tipos: (1) importação, introdução e aclimatização de inimigos naturais exóticos num novo habitat (“luta biológica clássica”), com o objetivo de promover a sua integração permanente na fauna local para o controlo de pragas introduzidas; (2) conservação, que envolve um conjunto de medidas destinadas a preservar e fomentar as populações de inimigos naturais, através da manipulação do habitat e da modificação do ambiente, fornecendo-lhes abrigo e recursos (e.g., pólen, néctar, meladas, presas, hospedeiros, habitats de hibernação, habitats de dispersão); (3) largadas aumentativas, inoculativas ou inundativas; as inoculativas são periódicas em momentos críticos, permitindo a sua multiplicação ao longo do ciclo da cultura, ainda que sem garantir o estabelecimento permanente na área; as inundativas são largadas massivas de auxiliares, com o objetivo de controlar rapidamente a praga, funcionando de forma semelhante a um tratamento fitossanitário, sem que se espere a multiplicação ou persistência a longo prazo destes organismos no ecossistema (Amaro & Baggiolini, 1982; Franco et al., 2006).

Neste contexto, as infraestruturas ecológicas surgem como ferramentas determinantes para a promoção, incremento e manutenção dos inimigos naturais junto das culturas, no âmbito das táticas de proteção biológica de conservação. Estas infraestruturas desempenham papel fundamental na conservação da biodiversidade funcional, que está na base de serviços de ecossistema, como o controlo biológico de pragas e a polinização das culturas, reforçando a resiliência dos ecossistemas agrários.

Trabalho experimental

No âmbito de um plano de investigação de doutoramento, está a ser desenvolvido um estudo sobre infraestruturas ecológicas no Centro de Inovação para a Sustentabilidade, inserido no Polo de Inovação da Fataca, do INIAV. Esta investigação visa a conservação e o fomento de inimigos naturais que possam contribuir para o controlo biológico de *S. aurantii* e *S. dorsalis*, com particular ênfase nos predadores, como ácaros fitoseídeos, antocorídeos (*Orius* spp.) e tripes (*Aeolothrips* spp.).

Para o efeito, procedeu-se à instalação de seis corredores ecológicos no exterior de túneis destinados à produção de framboesa (fig. 2). O delineamento experimental contempla três corredores de plantas-armadilha, selecionadas pela sua elevada atratividade para *S. aurantii* e *S. dorsalis*, e três corredores de plantas-repositório de auxiliares, destinadas a atrair e fixar populações de inimigos naturais. Os corredores de plantas-armadilha são constituídos por *Lobularia maritima* (alisso), *Achillea tomentosa* (mil-folhas-lanuda) e *Tagetes patula* (cravo-túnico) (fig. 3a). Por sua vez, os corredores de plantas-repositório de auxiliares integram *Ocimum basilicum* (manjerição), *Glebionis carinata* (crisântemo-tricolor) e *Capsicum frutescens* (pimenta-malagueta) (fig. 3b). O conjunto dos três corredores de cada tipologia, plantas-armadilha e plantas-repositório de auxiliares, integra um total de 36 plantas envasadas por espécie, distribuídas por nove talhões, com quatro plantas cada, espaçados entre si por 3 m e providos de um sistema de

rega gota-a-gota. A monitorização de insetos e ácaros, em ambos os grupos de plantas, está a ser efetuada por meio de batimentos dirigidos às folhas jovens e inflorescências.

Está igualmente a ser avaliada a eficácia de *Lobularia maritima* e *Achillea tomentosa* no interior dos túneis (fig. 4). Para esse efeito, foram instaladas 12 plantas de cada espécie (fig. 5), com o objetivo de avaliar a sua capacidade de atração de tripes, em especial *Scirtothrips* spp., e inimigos naturais, e de analisar a sua influência na presença destes tripes na cultura.

As plantas-armadilha no interior dos túneis são amostradas de acordo com a mesma metodologia aplicada nos corredores ecológicos. As plantas de framboesa foram previamente selecionadas para amostragem com base em três distâncias em relação às plantas-armadilha (1, 2 e 5 metros). As plantas-testemunha, amostradas de forma aleatória, encontram-se em setores suficientemente afastados das plantas-armadilha. A amostragem das plantas de framboesa incide em três alturas da planta, com quatro batimentos em cada uma. A triagem das amostras é feita, em laboratório, separando os diferentes grupos de artrópodes referidos, devidamente identificados e armazenados em tubos Eppendorf contendo álcool a 70%, para posterior identificação morfológica e molecular.

Referências Bibliográficas

- Amaro, P. & Baggiolini, M. 1982. Introdução à Protecção Integrada. FAO/DGPPA, Lisboa, 1, 276pp.
- Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M.C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A. & Gonçalves, B. 2022. Red Fruits Composition and Their Health Benefits - A Review. *Foods* 11(644): 28p.
- DGAV. 2025a. Programas de prospeção 2025 – Quadros resumo (abril de 2025).
- DGAV. 2025b. Autorização excecional de emergência n.º 2025/09 – Art.º 53 do Regulamento (CE) n.º 1107/2009, de 21 de outubro, para utilização de produtos fitofarmacêuticos no controlo de *Scirtothrips aurantii*, em plantas hospedeiras, no contexto de um plano de contingência.
- DGAV. 2026a. Lista de vegetais hospedeiros de *Scirtothrips aurantii* Faure e de *Scirtothrips dorsalis* Hood.
- DGAV. 2026b. Despacho n.º 5/G/2024 Atualização das Zonas Demarcadas para *Scirtothrips aurantii* e *Scirtothrips dorsalis*.
- EFSA. 2018. Panel on Plant Health (PLH). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Scirtothrips aurantii* Faure (Thysanoptera: Thripidae). *EFSA Journal*, 16(3), 5188.
- EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2023. *First report of Scirtothrips aurantii in Portugal*. EPPO Reporting Service no. 02/2023, article 7518. EPPO Global Database.
- EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2024. *First report of Scirtothrips dorsalis in Portugal*. EPPO Reporting Service, no. 11/2024, article 2024/237. EPPO Global Database.
- EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2025. *Orthotospovirus tomatomaculae* (EPPO code: TSWV00) – vectors. EPPO Global Database.
- EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2026. *Scirtothrips dorsalis*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation.
- Franco, J. C., Ramos, A. P. & Moreira, I. 2006. Infra-estruturas ecológicas e proteção biológica. ISA Press, Lisboa, 176p.

- Gilbert, M. J., & Samways, M. J. 2018. Mature larval dispersal and adult emergence of the economically significant pest, *Scirtothrips aurantii* Faure (Thysanoptera: Thripidae), in commercial citrus. *Journal of Insect Science*, 18(2), 32.
- Lenehan, S. 2024. Efeito do frio em diferentes famílias de amoras produzidas em sistema *long-cane*. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. 46 p.
- Kumar, V., Kakkar, G., McKenzie, C. L., Seal, D. R., & Osborne, L. S. 2013. An overview of chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) - Biology, distribution and management. In S. Soloneski & M. Larramendy (Eds.), *Weed and Pest Control: Conventional and New Challenges* (pp. 53–77).
- Mateus, C. 2023. *Scirtothrips aurantii* chegou a Portugal. *Revista Voz do Campo* 242: 42.
- Vasconcelos, J. 2025. Lusomorango: 20 anos a construir o futuro da agricultura sustentável. *Agriterra*, Informação profissional para a agricultura portuguesa. Disponível em: <https://www.agriterra.pt/Artigos/615930-Lusomorango-20-anos-a-construir-o-futuro-da-agricultura-sustentavel.html>.

Tabelas e Figuras

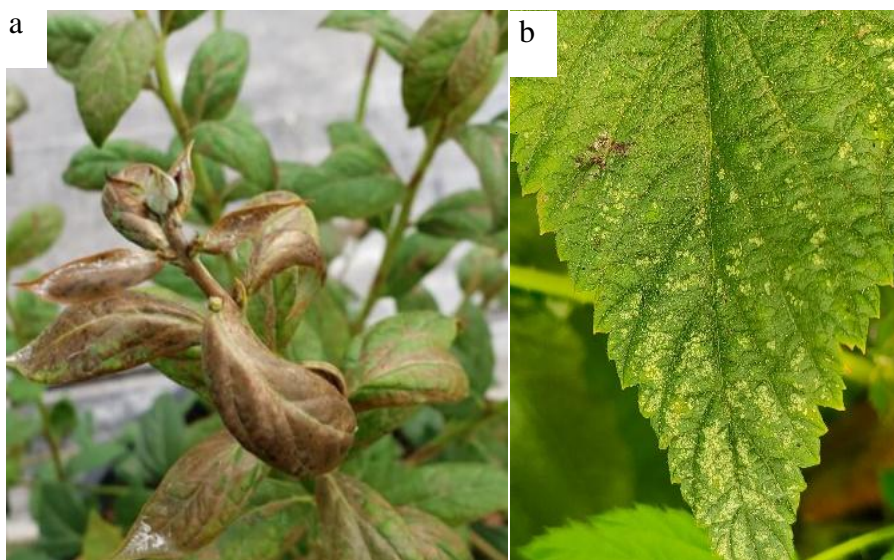


Figura 1 - Estragos observados em folhas de: a. Mirtilo; b. Framboesa.



Figura 2 - Localização dos corredores ecológicos.



Figura 3 - Corredores ecológicos em estudo: a. plantas-repositório de auxiliares; b. plantas-armadilha.



Figura 4 - *Lobularia maritima* e *Achillea tomentosa* inseridas na linha da cultura.

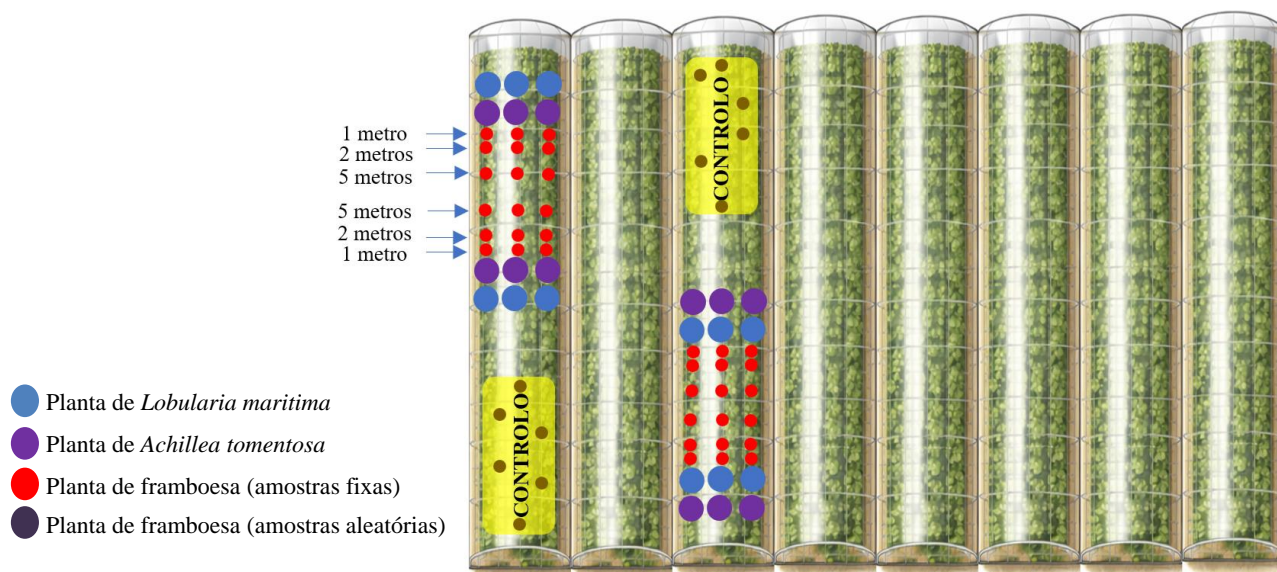


Figura 5 - Esquema do ensaio com plantas-armadilha no interior dos túneis de framboesa.

Avaliação do efeito de bioestimulantes na produtividade e qualidade dos frutos de três variedades de mirtilo

Diogo Machado^{1,3}, Ana Paula Silva^{1,2}, Jorge Carvalho³, Berta Gonçalves^{1,2}

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), 5000-801 Vila Real;

²Centro de Investigação de Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), 5000-801 Vila Real;

³Green Factor, S.A., 4730-392 Vila Verde.

Resumo

A produção de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) tem registado um crescimento expressivo a nível global, impulsionada pelo elevado valor económico e pelas reconhecidas propriedades nutricionais, nomeadamente o teor em compostos fenólicos, fibras e vitamina C. Contudo, a intensificação das alterações climáticas impõe desafios significativos para a produtividade e qualidade deste pequeno fruto. Como estratégia mitigadora surge a aplicação de bioestimulantes à base de algas, que se tem vindo a consolidar e a destacar pelo potencial em reforçar os processos fisiológicos das plantas, aumentar a tolerância a condições adversas e otimizar atributos comerciais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação foliar, em pré-colheita, de extratos de *Ecklonia maxima* (Kelpak®) e *Ascophyllum nodosum* (Cytoplant-400®), isolados e combinados, na produtividade e qualidade dos frutos das cultivares Draper, Ozarkblue e Centra Blue, em modo de produção biológico. O ensaio foi conduzido no concelho de Vila Verde, Portugal, num delineamento com seis tratamentos aplicados em três fases fenológicas distintas (plena floração, vingamento do fruto e início da coloração). Foram avaliados parâmetros biométricos e económicos. Os resultados revelaram que a dose mais elevada de *Ecklonia maxima* (4 L/ha Kelpak®) proporcionou os maiores ganhos no peso e diâmetro equatorial em todas as cultivares, com aumentos médios de até 37% no peso e ganhos superiores a 1,79 mm no calibre face ao controlo ($p < 0,05$). O Retorno sobre o Investimento (ROI) acompanhou estes resultados, atingindo 10315% na Ozarkblue, 8284% na Draper e 19062% na Centra Blue. Conclui-se que a aplicação foliar em pré-colheita de bioestimulantes à base de macroalgas é uma prática eficaz e sustentável, capaz de melhorar a produtividade, o calibre e a rentabilidade da cultura do mirtilo. Estes resultados evidenciam o potencial dos bioestimulantes como ferramenta estratégica na fruticultura, promovendo sistemas de produção mais resilientes, sustentáveis e competitivos.

Palavras-chave: Macroalgas, qualidade do fruto, stresse abiótico, sustentabilidade, *Vaccinium corymbosum*.

Abstract

Evaluation of the effect of biostimulants on productivity and fruit quality in three blueberry varieties

Blueberry production (*Vaccinium corymbosum* L.) has been experiencing significant growth worldwide, driven by its high economic value and well-known nutritional properties, particularly its content of phenolic compounds, fiber, and vitamin C. However, the intensification of climate change imposes significant challenges to the productivity and quality of this small fruit. As a mitigation strategy, the use of seaweed-

based biostimulants has gained traction, standing out for their potential to enhance plant physiological processes, increase tolerance to adverse conditions, and optimize commercial attributes. This study aimed to evaluate the effect of pre-harvest foliar application of *Ecklonia maxima* (Kelpak®) and *Ascophyllum nodosum* (Cytoplant-400®) extracts, applied individually and in combination, on the yield and fruit quality of Draper, Ozarkblue, and Centra Blue cultivars under organic production. The trial was carried out in Vila Verde, Portugal, using a design with six treatments applied at three distinct phenological stages (full bloom, fruit set, and onset of coloring). Biometric and economic parameters were evaluated. The results showed that the highest dose of *Ecklonia maxima* (4 L/ha Kelpak®) resulted in the greatest gains in fruit weight and equatorial diameter across all cultivars, with average increases of up to 37% in weight and more than 1.79 mm in size compared to the control ($p < 0.05$). Return on investment reflected these results, with ROI values of 10,315% for Ozarkblue, 8,284% for Draper, and 19,062% for Centra Blue. It can be concluded that pre-harvest foliar application of macroalgae-based biostimulants is an effective and sustainable practice capable of improving blueberry productivity, fruit size, and profitability. These findings highlight the potential of biostimulants as a strategic tool in fruit growing, promoting more resilient, sustainable, and competitive production systems

Keywords: Abiotic stress, fruit quality, macroalgae, sustainability, *Vaccinium corymbosum*.

Introdução

O mirtilo representa a quarta fruta de interesse económico a nível mundial, por um lado pelo seu alto conteúdo em antioxidantes, fibras, pectinas e vitamina C, e por outro lado, pela sua alta rusticidade, o que faz com que se adapte a condições ambientais mais adversas (Salgado-Vargas et al., 2018). São numerosos os estudos que se têm vindo a realizar relativamente aos benefícios do consumo deste fruto, o que levou a uma maior consciencialização dos consumidores sobre o valor nutricional dos mirtilos, e consequentemente, o mirtilo passou a ser reconhecido mundialmente pela sua capacidade antioxidante elevada (Prior et al., 1998; Manganaris et al., 2013).

De forma a garantir a manutenção dos parâmetros qualitativos do fruto durante o pós-colheita, torna-se essencial recorrer a práticas e estratégias que promovam a sua preservação.

A regulação do crescimento das plantas, o seu desenvolvimento e a atenuação dos efeitos negativos dos stresses ambientais são fatores importantes na determinação da produtividade das plantas cultivadas. Embora seja amplamente reconhecido que os stresses biótico e abiótico impedem praticamente todos os sistemas agrícolas de atingirem o seu potencial máximo de rendimento, a compreensão atual dos mecanismos envolvidos e das estratégias para mitigar esses efeitos ainda é limitada. Os stresses abióticos podem ser prevenidos através da otimização das condições de crescimento das plantas, bem como pelo fornecimento adequado de água, nutrientes e reguladores de crescimento vegetal. Além dessas abordagens tradicionais, os bioestimulantes estão a ser cada vez mais integrados nos sistemas de produção com o objetivo de modificar os processos fisiológicos das plantas para otimizar a produtividade (Yakhin et al., 2017).

Os extratos de algas marinhas usam-se na agricultura pelos seus compostos bioativos únicos e pelos seus efeitos, pois têm propriedades fito-estimulantes que provocam um aumento no crescimento vegetal e na produtividade de muitas culturas (Ali

et al., 2021). Os extratos de algas incluem citocininas, auxinas, giberelinas, resíduos de outros elementos e antioxidantes (Gupta et al., 2021).

O objetivo deste trabalho consiste em estudar o efeito da aplicação em pré-colheita de bioestimulantes à base de algas, um à base de *Ascophyllum nodosum* e outro à base de *Ecklonia maxima*, tanto na produtividade como na qualidade dos frutos das variedades de mirtilo Draper, Ozarkblue e Centra Blue. A aplicação dos bioestimulantes foi realizada em três estados fenológicos, mais concretamente na plena floração, no vingamento do fruto e no início da mudança de coloração dos frutos, determinando-se os seus parâmetros fisiológicos e qualitativos. Pretende-se, assim, contribuir para a adoção de práticas mais resilientes e sustentáveis na fruticultura.

Material e Métodos

O ensaio experimental foi conduzido durante a campanha de 2024 numa exploração agrícola em modo de produção biológica, localizada em Lanhas, concelho de Vila Verde, Portugal (41°39' N, 8°25' W; altitude média de 130m). O clima da região é classificado como "Csb" de acordo com o sistema de classificação de Köppen, o que indica que é um clima temperado, e os verões são moderadamente quentes e secos. De acordo com análises de solo realizadas em 2024, o solo tem uma textura franca, acidez moderada, e pH 5,4, com um teor em matéria orgânica de 3,85%. Relativamente aos teores de macronutrientes, observou-se que as quantidades de fósforo, potássio e cálcio, obtidas através do método de extração em Mehlich 3, estão em excesso, enquanto o magnésio apresenta teores médios no solo.

As variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue foram plantadas em 2013 com uma orientação norte-sul e 3m de espaçamento entre linhas e 1m entre plantas. A Draper adapta-se bem a climas temperados, especialmente em regiões onde os invernos não são excessivamente rigorosos. Esta variedade necessita de um número moderado de horas de frio para quebrar a dormência, em torno de 800 a 1000 horas (Retamales e Hancock, 2012). A variedade de mirtilo Ozarkblue foi desenvolvida pela Universidade do Arkansas, nos Estados Unidos da América, e lançada para o mercado na década de 90. Esta variedade foi desenvolvida para responder às necessidades dos produtores em terem uma variedade que pudesse prosperar em climas mais quentes, onde outras variedades highbush teriam mais dificuldades (Clark et al., 1996). A cultivar Centra Blue tem crescimentos semi-verticais, e um vigor médio comparativamente com os seus originários Rahi e Centurion. A época de floração é, geralmente, mais tardia, assim como a época de frutificação e colheita (Scalzo et al., 2009).

O pomar tem um sistema de rega automatizado, com duas linhas de gota-a-gota por camalhão com gotejadores autocompensantes espaçados 33cm entre si e um débito de 2,2L/h. Os planos de fertilização do pomar são elaborados com base em análises de solo, solução de solo, foliares e recomendações. Ao longo do ensaio, não foi aplicado nenhum tratamento fitossanitário, nem quaisquer outras aplicações externas.

Foram utilizadas formulações comerciais de bioestimulantes à base das macroalgas *Ecklonia maxima* (Kelpak®) e *Ascophyllum nodosum* (Cytoplant-400®), isoladamente e em combinação, conforme descrito no Quadro 1. O produto Kelpak é um concentrado de 100% natural de algas frescas de *Ecklonia maxima*, recolhidas nas águas da África do Sul. Contém ainda polissacáridos, ácido algínico, manitol, auxinas naturais (11ppm), outras hormonas em pequenas quantidades, micronutrientes e vitaminas, todos eles provenientes da alga. Este produto possui uma alta concentração em auxinas naturais e outras substâncias que promovem o desenvolvimento vegetal, estando totalmente isento de metais pesados. Para além do mais, o produto encontra-se certificado para a sua

utilização em modo de produção de agricultura biológica (<https://www.jovagro.pt/inovabio/fitonutricao/kelpak/>). O produto Cytoplant-400 é um produto 100% obtido da alga *Ascophyllum nodosum* tendo uma atividade citoquímica equivalente a 400ppm. Estimula a divisão celular nos órgãos em desenvolvimento aumentando assim o número e o tamanho dos frutos, mobiliza os nutrientes e reduz a dominância apical. Os tratamentos foliares foram aplicados em três momentos distintos durante o ciclo: plena floração (BBCH 65), início do vingamento do fruto (BBCH 71), e coloração do fruto (BBCH 81). As aplicações foram realizadas pelo final da tarde, cobrindo toda a copa, com condições climáticas favoráveis à mesma. Cada tratamento foi aplicado a uma linha de 30 plantas, tendo cada variedade uma amostra de 180 plantas, perfazendo um total de 540 plantas.

Os frutos das variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue foram colhidos nos dias 11 de junho, 26 de junho e 25 de julho de 2024, respetivamente. No mesmo estado de maturação, foram colhidos de forma aleatória mil frutos por tratamento e transportados para o laboratório onde se realizaram as respetivas análises.

De forma a auxiliar na interpretação dos resultados foi realizada uma análise económica através do indicador *Return On Investment* (ROI), calculado segundo a seguinte expressão: $ROI (\%) = [(Receita\ bruta\ do\ tratamento - Receita\ bruta\ do\ controlo) / Custo\ total\ do\ tratamento] \times 100$

Nesta fórmula, o aumento da receita corresponde à diferença entre a receita bruta do tratamento e a receita bruta do controlo (T0), e o custo total do tratamento corresponde à soma do custo dos produtos aplicados e do custo operacional da aplicação. O custo operacional incluiu, exclusivamente, o custo da mão-de-obra associada à preparação da calda e à aplicação foliar dos tratamentos, sendo este custo considerado também no tratamento controlo (T0), uma vez que foi realizada uma aplicação foliar com água, implicando o mesmo tempo de trabalho, utilização de equipamento e consumo de recursos humanos. Foi utilizado o preço médio de comercialização do mirtilo praticado em 2024 (5,00€/kg) na empresa Green Factor.

A produtividade apresentada corresponde ao total de fruto colhido por tratamento, não tendo sido possível desagregar estes valores em repetições experimentais independentes, uma vez que a colheita foi realizada de forma agregada por linha de tratamento, em contexto de pomar comercial. Assim, os valores de produtividade e o respetivo cálculo do ROI são apresentados de forma descritiva, não tendo sido submetidos a análise estatística inferencial.

Todos os restantes resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA, de um e dois fatores), seguida do teste de Tukey a 5% de significância para comparação das médias entre os diferentes tratamentos. Para isto, foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 29.0.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos evidenciaram que a aplicação dos bioestimulantes influenciou significativamente o peso médio dos frutos nas três variedades estudadas (fig. 1). A variedade Centra Blue apresentou os maiores aumentos, com destaque para o tratamento T5 (4 L/ha de Kelpak®), que resultou num aumento de 37% face ao controlo (T0). Também na variedade Draper, o tratamento T5 promoveu um aumento estatisticamente significativo no peso dos frutos, com uma média de 2,84g comparativamente aos 2,29g registados no controlo. Na variedade Ozarkblue, os aumentos foram mais moderados, mas ainda assim significativos, com T5 a evidenciar um aumento de, aproximadamente, 21%. Estes resultados indicam que a aplicação em

pré-colheita de *Ecklonia maxima*, especialmente em doses mais elevadas, pode potenciar ganhos biométricos relevantes. As diferenças estatísticas foram confirmadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram relatados por Lopes (2020), que constatou que a aplicação de extrato de algas, em diferentes concentrações, nas variedades de mirtilo Duke e Draper, promoveu aumentos significativos em relação ao controlo, registando-se diferenças estatísticas significativas em pelo menos um dos tratamentos. Além disso, Loyola e Muñoz (2009) observaram que houve uma tendência positiva de aumento no peso médio dos frutos com a aplicação de extratos da alga *Ascophyllum nodosum* em plantas da variedade de mirtilo O'Neal, apesar de não se ter registado diferenças estatisticamente significativas.

No que respeita ao diâmetro equatorial dos frutos (fig. 2), observou-se um padrão consistente com os resultados obtidos para o peso. Na variedade Draper, o tratamento T5 apresentou o maior valor médio (19,02mm), significativamente superior ao controlo (17,52mm). Para a variedade Ozarkblue, o diâmetro equatorial aumentou de 15,30mm (T0) para 15,77 mm (T5), enquanto na variedade Centra Blue verificou-se um aumento de 14,91mm (T0) para 16,70 mm (T5). Em todas as variedades, as diferenças observadas nos tratamentos com *Ecklonia maxima*, sobretudo na dose mais elevada, foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), evidenciando que os bioestimulantes contribuíram para o aumento do calibre dos frutos, uma característica valorizada comercialmente. Loyola e Muñoz (2009) observaram que houve aumentos estatisticamente significativos no diâmetro equatorial com a aplicação de *Ascophyllum nodosum* em plantas da variedade de mirtilo O'Neal. Num estudo de Lopes (2020), realizado na variedade Draper, os frutos tratados com o bioestimulante à base de *Ecklonia maxima*, na dose mais alta, apresentaram maior calibre, em consonância com os resultados registados neste estudo.

Foi também avaliado o retorno económico dos diferentes tratamentos, através da análise do Retorno sobre o Investimento (ROI), apresentado no Quadro 2. Em todas as variedades, os tratamentos com bioestimulantes demonstraram ROI (%) superiores ao controlo (T0), que foi usado como referência. Na variedade Draper os ganhos económicos foram evidentes com o tratamento T5, onde foi obtido um ROI de 8 284%, o que significa que por cada 1€ investido, foi obtido um retorno de 82,84€. A variedade Ozarkblue apresentou um padrão semelhante, com T5 a apresentar um ROI superior, chegando a um valor de 10 315%. Por sua vez, na variedade Centra Blue, destacou-se novamente o tratamento T5 com um ROI igual a 19 062%. Estes dados reforçam que a aplicação de bioestimulantes não só é segura e eficaz do ponto de vista produtivo, como também representa uma estratégia viável e vantajosa do ponto de vista económico.

Conclusões

As aplicações de bioestimulantes à base de *Ecklonia maxima* e *Ascophyllum nodosum* aumentaram o peso e o diâmetro dos frutos das variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue, refletindo-se também em melhorias no retorno económico. Os efeitos foram mais pronunciados nas doses mais elevadas de *Ecklonia maxima* (T5), embora as respostas tenham variado entre variedades e tratamentos, sugerindo a influência de fatores genéticos e ambientais. Estes resultados confirmam o potencial dos bioestimulantes como estratégia viável e rentável para a valorização comercial do mirtilo. Em síntese, o estudo demonstra que os bioestimulantes à base de algas constituem um recurso promissor para melhorar produtividade e qualidade dos frutos, sendo, contudo, necessárias investigações adicionais para otimizar práticas de aplicação e maximizar os benefícios agronómicos e comerciais.

Referências Bibliográfica

- Ali, O., Ramsubhag, A. and Jayaraman, J. 2021. Biostimulant properties of seaweed extracts in plants: Implications towards sustainable crop production. *Plants*, 10(3), 531 (<https://www.mdpi.com/2223-7747/10/3/531>).
- Clark, J. R., Moore, J. N. and Draper, A. D. 1996. 'Ozarkblue' Southern Highbush Blueberry. *HortScience*, 31(6), 1043–1045. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.6.1043>
- Gupta, S., Stirk, W. A., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., and Van Staden, J. 2021. Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and a seaweed extract on the growth and physiology of *Allium cepa* L.(onion). *Journal of Plant Physiology*, 262, 153437
- Lopes, T. 2020. Efeito da aplicação em pré-colheita de bioestimulantes à base de algas e glicina betaína na produtividade e qualidade do mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.). Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Loyola, N. and Muñoz, C. 2009. Effect of the biostimulant foliar addition of marine algae on o'neal *Acta Horticulturae*, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.810.94>
- Manganaris, G.A.; Goulas, V; Vicente, A.R. and Terry, L.A. 2013. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric*. 94, 825–833. DOI 10.1002/jsfa.6432
- Prior, R.L, Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C.M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686 – 2693. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf980145d>
- Retamales, J.B. and J.F. Hancock. 2012. Blueberries. CABI. ISBN 9781780647272
- Salgado-Vargas, C; Sánchez-García, P; Volke-Haller, VH and Colinas-León, MTB. 2018. Respuesta agronómica de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) al estrés osmótico. *Agrociencia* 52(2):231-239
- Scalzo, J., Miller, S., Edwards, C., Meekings, J. and Alspach, P. 2009. 'Centra Blue': new rabbiteye blueberry cultivar. *Acta Hortic*. 810, 163-166 DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.810.20>
- Yakhin, O.I.; Lubyaynov, A.A.; Yakhin, I.A.; Brown, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci*. 2017, 7, 2049

Quadros e Figuras**Quadro 1** - Modalidades do ensaio experimental.

Tratamento	Descrição
T0	Controlo (água)
T1	1,5 L/ha Kelpak® + 0,5 L/ha Cytoplant-400®
T2	1 L/ha Cytoplant-400®
T3	3 L/ha Kelpak®
T4	2 L/ha Cytoplant-400®
T5	4 L/ha Kelpak®

Quadro 2 - Cálculo do ROI dos diferentes tratamentos nas variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue.

Draper								
Tratamento	Custo Operacional	Custo dos Produtos	Custo total	Produtividade	Preço médio	Receita bruta	Aumento da receita	ROI
	€/ha	€/ha	€/ha	kg/ha	€	€/ha	€	%
T0	30,00 €	0,00 €	30,00 €	8333	5,00 €	41 665,00 €		
T1	30,00 €	53,03 €	83,03 €	9534	5,00 €	47 670,00 €	6 005,00 €	7132
T2	30,00 €	39,00 €	69,00 €	9243	5,00 €	46 215,00 €	4 550,00 €	6494
T3	30,00 €	67,05 €	97,05 €	9170	5,00 €	45 850,00 €	4 185,00 €	4212
T4	30,00 €	78,00 €	108,00 €	8733	5,00 €	43 665,00 €	2 000,00 €	1752
T5	30,00 €	89,40 €	119,40 €	10335	5,00 €	51 675,00 €	10 010,00 €	8284
Ozarkblue								
Tratamento	Custo Operacional	Custo dos Produtos	Custo total	Produtividade	Preço médio	Receita bruta	Aumento da receita	ROI
	€/ha	€/ha	€/ha	kg/ha	€	€/ha	€	%
T0	30,00 €	0,00 €	30,00 €	12033	5,00 €	60 165,00 €		
T1	30,00 €	53,03 €	83,03 €	12503	5,00 €	62 517,45 €	2 352,45 €	2733
T2	30,00 €	39,00 €	69,00 €	12301	5,00 €	61 505,00 €	1 340,00 €	1842
T3	30,00 €	67,05 €	97,05 €	13915	5,00 €	69 575,00 €	9 410,00 €	9596
T4	30,00 €	78,00 €	108,00 €	13444	5,00 €	67 220,00 €	7 055,00 €	6432
T5	30,00 €	89,40 €	119,40 €	14520	5,00 €	72 600,00 €	12 435,00 €	10315
Centra Blue								
Tratamento	Custo Operacional	Custo dos Produtos	Custo total	Produtividade	Preço médio	Receita bruta	Aumento da receita	ROI
	€/ha	€/ha	€/ha	kg/ha	€	€/ha	€	%
T0	30,00 €	0,00 €	30,00 €	12400	5,00 €	62 000,00 €		
T1	30,00 €	53,03 €	83,03 €	12996	5,00 €	64 980,00 €	2 980,00 €	3489
T2	30,00 €	39,00 €	69,00 €	13196	5,00 €	65 980,00 €	3 980,00 €	5668
T3	30,00 €	67,05 €	97,05 €	14058	5,00 €	70 290,00 €	8 290,00 €	8442
T4	30,00 €	78,00 €	108,00 €	14589	5,00 €	72 945,00 €	10 945,00 €	10034
T5	30,00 €	89,40 €	119,40 €	16976	5,00 €	84 880,00 €	22 880,00 €	19062

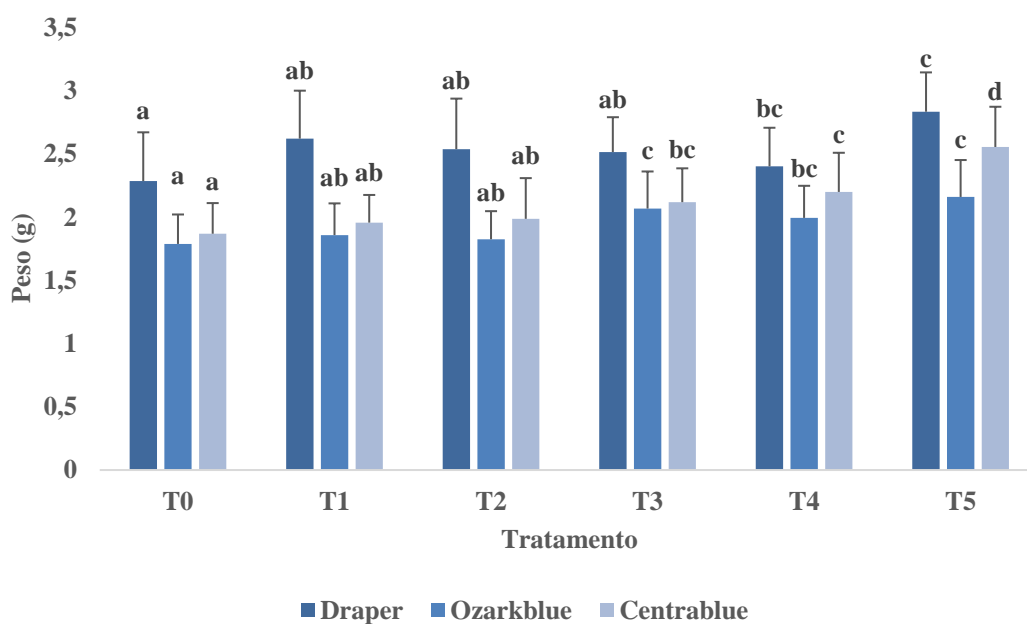


Figura 1 - Peso médio dos frutos (g) das variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue sujeitos aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

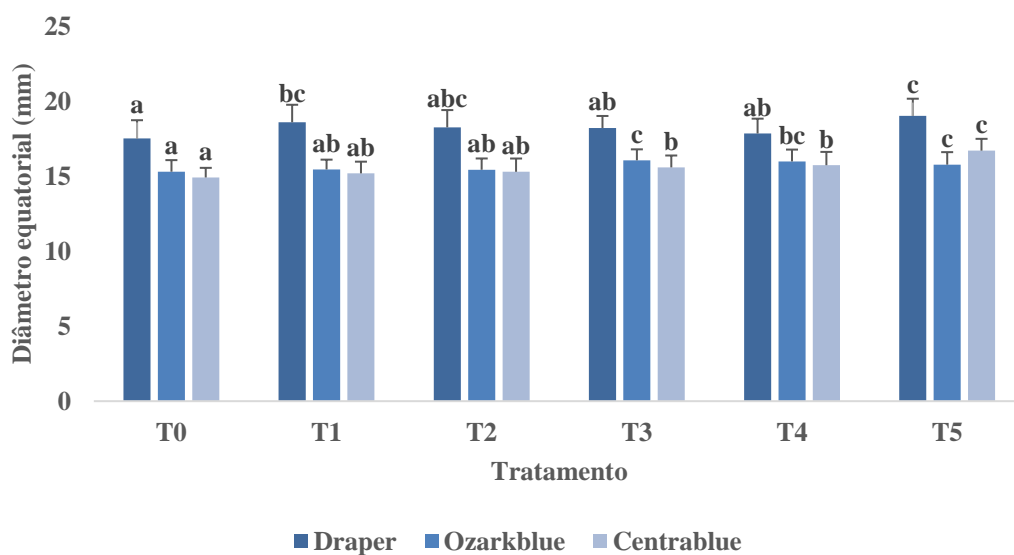


Figura 2 - Diâmetro equatorial (mm) dos frutos das variedades Draper, Ozarkblue e Centra Blue sujeitos aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

Projeto ACROPICS – estratégias de co-inovação em sustentabilidade

Daniel McGuire, Márcia Santos, Frederico Preza, Eugénio Diogo, Pedro Naves, Lurdes Inácio, Célia Mateus, Leonor Cruz, Pedro B. Oliveira

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês - 2780-157 Oeiras

Resumo

A ação Marie Curie ACROPICS é um projeto Europeu que visa responder à necessidade crescente de práticas agrícolas sustentáveis fomentando estratégias sistémicas de redução do uso de pesticidas e agroquímicos. Consiste num consórcio mundial que liga 12 polos constituídos por sistemas de agricultura sustentável (SAS), onde se implementam iniciativas de co-inovação que envolvem atores locais praticantes de estratégias de proteção agroecológica. Estes SAS, apoiados por equipas de investigação e inovação de 15 instituições dispersas a nível mundial, promovem a disseminação de evidências científicas passíveis de ser transferidas entre os diferentes SAS, comunicadas aos agricultores, *stakeholders* e público em geral.

A ação ACROPICS pretende assim criar uma rede sustentável de peritos para a promoção de estratégias inovadoras de produção e proteção dos sistemas agroecológicos que assentam em 4 pilares complementares: a) Produção, avaliação e divulgação de dados cientificamente válidos que evidenciem a elevada sustentabilidade dos sistemas de proteção agroecológica; b) Criação de uma rede de sistemas modelo locais que envolvam vários atores na cadeia de produção alimentar e que combinem inovações ecológicas, tecnológicas, organizacionais, sociais e institucionais de promoção de práticas de uso reduzido de pesticidas; c) Implementação de ações de formação, intercâmbio e demonstração de estratégias inovadoras que apresentem elevados índices de sustentabilidade e com vista a implementação a larga escala; d) Combinação de estratégias de inovação e divulgação institucional.

O Polo de Inovação da Fataca (INIAV), na região de Odemira, onde desde 2017 se têm desenvolvido estratégias e técnicas assentes na redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia na produção de pequenos frutos foi escolhido para fazer parte desta rede internacional Sistemas de Agricultura Sustentável (SAS-ODE). Neste âmbito têm-se vindo a implementar estratégias que visam não só o estudo da variabilidade de características fenotípicas e morfológicas de framboesas, amoras, mirtilos e camarinhas em condições agroecológicas específicas tendo em conta o impacto de futuras alterações climáticas nestes sistemas produtivos, como estudos de resistência a elevada salinidade do solo, adaptação a diferentes regimes de stress hídrico, redução de fertilizantes e uso alternativo a pesticidas, programas de melhoramento genético com vista a aumento da variabilidade genética, seleção de características de interesse comercial e estudos de adaptação aos condicionalismos edafo-climáticos da região. Estas iniciativas de co-inovação/co-criação desenvolvidas em estreita colaboração com produtores e *stakeholders*, visam também a implementação de sistemas sustentáveis com viabilidade económica da produção, envolvendo todos os agentes da cadeia de produção dos pequenos frutos.

Palavras-chave: Agroecologia, agricultura sustentável, pesticidas, comunicação, consórcio

Abstract

The Marie Curie Action ACROPICS is a European project addressing the urgent need for sustainable agriculture by fostering systemic strategies to reduce pesticide and agrochemical dependency. The project operates through a global consortium of 12 Sustainable Agricultural Systems (SAS) hubs. These hubs implement co-innovation initiatives involving local actors to implement and refine agroecological protection strategies. Supported by 15 international research institutions, the SAS promote the transfer of scientific evidence between hubs and its communication to farmers, stakeholders, and the public.

ACROPICS aims to establish a sustainable expert network for innovative agroecological production based on four pillars: a) Production, evaluation, and dissemination of scientific data demonstrating high sustainability of agroecological protection systems; b) Creating a network of local model systems involving actors in the food production chain, combining various innovations to promote pesticide reduction; c) Implementation of training, exchange, and demonstration activities for innovative high sustainability strategies, aimed at large-scale implementation; d) Integration of institutional innovation and dissemination strategies.

The Fataca Innovation Hub (INIAV) in Odemira was selected as the SAS-ODE hub for this network. Since 2017, Fataca has focused on the reduction, reuse, and recycling of materials and energy in small fruit production. Within this scope, strategies have been implemented to study the variability of phenotypic and morphological characteristics of raspberries, blackberries, blueberries, and Portuguese white crowberries (camarinhas) under specific agroecological conditions, accounting for the impact of future climate change on these productive systems. These include studies on high soil salinity resistance, adaptation to different water stress regimes, reduction of fertilizers, and alternatives to pesticides, as well as genetic improvement programs to increase genetic variability, select commercially relevant traits, and study adaptation to regional edaphoclimatic conditions. These co-innovation/co-creation initiatives, developed with producers and stakeholders, aim to implement economically viable, sustainable systems, involving all agents in the production chain.

Keywords: Agroecology, Sustainable agriculture, pesticide, communication, consortium

Introdução

O efeito negativo dos pesticidas - aqui definidos como substâncias sintéticas de proteção de culturas com impacto negativo na saúde humana, animal e nos ecossistemas (solo, água, ar e biodiversidade) – encontra-se amplamente documentado. A crescente pressão social em prol de práticas agrícolas sustentáveis resultou na imposição de restrições ao seu uso. Paralelamente, diversas partes interessadas (*stakeholders*), públicas e privadas, têm promovido inovações e novos sistemas de produção que demonstram ser possível reduzir o uso de pesticidas sem comprometer a produtividade (Lechenet et al., 2017).

Apesar destes avanços, o setor agrícola europeu continua dependente de grandes volumes de pesticidas para manter os seus níveis de produtividade. Estes produtos são também utilizados na silvicultura, na berma das estradas e linhas ferroviárias e em espaços verdes como jardins infantis ou jardins públicos, o que aumenta o risco de exposição dos membros mais vulneráveis da população. Na Europa, os valores de venda de pesticidas mantiveram-se estáveis até 2021 (cerca de 350.000 toneladas), registando-

se uma redução para 292.000 toneladas em 2023 (Eurostat, 2025). Este decréscimo pode ser parcialmente atribuído ao aumento dos custos de produção decorrente da instabilidade dos mercados e da guerra na Ucrânia e, simultaneamente, à aplicação da Diretiva relativa à Utilização Sustentável de Pesticidas, embora a sua implementação tenha sido heterogénea entre os Estados-Membros (European Commission, 2025).

O Green Deal Europeu (European Commission, 2020) e, especificamente, a estratégia "Farm to Fork", visam criar um sistema alimentar justo, saudável e respeitador do ambiente, definindo metas claras para a redução de pesticidas. Contudo, o contraste entre a persistência no uso destes químicos e as ambições europeias sublinha a necessidade de uma análise sistémica que identifique claramente as causas desta lenta transição (*lock-in*). Este bloqueio decorre de um sistema estruturado na premissa de que a estabilidade e a abundância da produção agrícola dependem, obrigatoriamente, do recurso a pesticidas. Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos dos últimos anos, os agricultores continuam a enfrentar barreiras estruturais à alteração das suas práticas (Geels, 2002). Atingiu-se um equilíbrio insustentável onde a vantagem económica de curto prazo na produção primária inviabiliza, na maioria dos casos, a implementação de alternativas ecológicas com claros benefícios a longo prazo.

Para viabilizar novas estratégias, é imperativo repensar globalmente os sistemas de produção alimentar. Esta transição exige sistemas de cultivo mais diversificados, uma gestão otimizada da paisagem e das infraestruturas ecológicas, bem como a adaptação das estruturas das cadeias de valor, a capacitação dos agentes e o desenvolvimento de novos quadros políticos.

Embora a investigação e o desenvolvimento tecnológico sejam essenciais, não são suficientes por si só. Uma mudança de larga escala requer uma combinação de inovações ecológicas, organizacionais e institucionais em toda a cadeia alimentar, começando por uma maior adoção destas práticas ao nível da exploração (Jacquet et al., 2022). Especificamente, são necessárias intervenções estruturais que permitam uma melhor distribuição de riscos e rendimentos entre os agentes ao longo de toda a cadeia de valor. A sensibilização e o compromisso de todos os intervenientes sobre os benefícios e desafios específicos de uma agricultura livre de pesticidas são fundamentais. Numa perspetiva agroecológica, é crucial adaptar os sistemas de transição às condições locais e apoiar as inovações através de políticas territoriais. Finalmente, a escassez e a reduzida divulgação de dados científicos sobre os impactos positivos destes novos sistemas continuam a ser um obstáculo ao investimento e à implementação de iniciativas públicas e privadas.

Uma redução efetiva no uso de pesticidas exige também uma ambição partilhada por todos os intervenientes da cadeia alimentar, desde a produção ao consumo. Este alinhamento é o ponto fulcral para a redistribuição de valor e de risco, bem como para a adesão a novas inovações. Sob uma perspetiva agroecológica, cada inovação deve ser adaptada às especificidades das condições locais onde será implementada. A transição em larga-escala para sistemas agroecológicos só é viável através da combinação entre a adesão a novas tecnologias e técnicas a nível da exploração agrícola (estratégia "*push*") e a criação de uma procura real para este tipo de soluções ao longo de toda a cadeia de valor (estratégia "*pull*"). Esta dinâmica é impulsionada pela conjugação de estratégias de inovação complementares - ecológicas, tecnológicas, organizacionais/institucionais e sociais. Para tal, é imperativa a avaliação de novos modelos de cadeia alimentar que assegurem a viabilidade económica da produção primária, a salvaguarda ambiental dos ecossistemas e a equidade social para todos os agentes (os três pilares da sustentabilidade). Estas avaliações devem ser comunicadas e debatidas com todos

intervenientes do setor, garantindo assim uma implementação generalizada (Möhring et al., 2020). Desta forma, a superação dos sistemas em *lock-in* é facilitada pela formação de recursos humanos ao longo da cadeia de valor e por uma gestão mais eficaz dos riscos. Finalmente, a redução do uso de pesticidas requer um contexto de políticas coordenadas que alinhe as diretrizes de diferentes setores (agricultura, ambiente, saúde e economia), eliminando contradições entre incentivos e regulamentações.

O projeto ACROPICS surge para dar resposta a esta necessidade, visando a redução do uso de pesticidas, através da adoção de inovações sistémicas na área da proteção agroecológica. A sua estratégia assenta em quatro eixos de intervenção complementares:

- **Produção e Avaliação de Dados:** Gerar e validar cientificamente evidências sobre a elevada sustentabilidade dos sistemas de proteção agroecológica. Estes dados são partilhados com os diversos *stakeholders*, visando consolidar uma rede de comunicação que perdure após o término do projeto e que continue a fomentar novos focos de transição agroecológica.
- **Rede de Sistemas Modelo Locais:** Criar uma estrutura de sistemas modelo, os sistemas de agricultura sustentável (SAS), que envolva os diversos agentes da cadeia de produção. Estes sistemas combinam inovações ecológicas, tecnológicas, organizacionais, sociais e institucionais, funcionando como catalisadores para a adesão e implementação de práticas de uso reduzido de pesticidas.
- **Capacitação e Demonstração:** Promover ações de formação de recursos humanos, intercâmbio de especialistas e demonstração de estratégias inovadoras com elevados índices de sustentabilidade, com o objetivo de facilitar a sua implementação em larga escala.
- **Estratégia "Push-Pull" de Inovações:** Conjuguar a disseminação de novas tecnologias e práticas desenvolvidas no projeto com inovações organizacionais que facilitem a difusão de inovações. Esta abordagem recorre a sistemas-piloto que promovam a adesão tecnológica e a ações que visem induzir mudanças estruturais nos regimes técnico-sociais e nos contextos institucionais.

CrITÉRIOS de seleção dos SAS

Os vetores de inovação, demonstração e impacto da estratégia do projeto são os sistemas de agricultura sustentável (SAS). Estas áreas piloto, consistem em zonas protegidas onde se testam inovações com vista à implementação, em larga escala, de forma a atingir um objetivo comum – a redução do uso de pesticidas na agricultura. Cada um dos SAS está integrado localmente, com áreas geográficas definidas, inclui uma cadeia de agentes locais e têm em conta as condições ambientais e sócio-económicas da região (

Tabela 1).

A seleção dos SAS foi feita de acordo com a estrutura de mapeamento de iniciativas semelhantes levadas a cabo na rede “EU alliance Towards a Chemical Pesticide Free Agriculture” (24 organizações, 15 países) iniciada em 2020 e na iniciativa Agroecological Crop Protection International Initiative – ACPI (30 organizações, 25 países) fundada em 2022. De 50 potenciais SAS, 12 foram selecionados de forma a englobar os principais tipos de culturas agrícolas, de forma a maximizar o efeito do protocolo de intercambio “MSCA Staff Exchange Scheme” (ações Marie Curie), fomentando ligações entre redes Europeias e ações internacionais noutros continentes. Os critérios de seleção foram:

- Ter dimensão suficiente para servir como prova de conceito e permitir expansão das inovações para fora do contexto dos SAS.
- Evidências prévias (historial) de implementação de mecanismos de criação de valor no percurso de transição agroecológica.
- Ter ligação a instituições de investigação e desenvolvimento, facilitando intercâmbio de pessoal de investigação e inovação, nomeadamente jovens investigadores, entre as instituições do consórcio.
- Representação de sistemas diversos: cereais, hortícolas, leguminosas, vinho, fruteiras; cultura em estufa ou de ar livre; de subsistência ou produção comercial, num contexto de integração nas condições ambientais e socioeconómicas locais.

Inovação e transição: exemplos do Polo de Inovação da Fataca (SAS-ODE)

Um dos passos primários do projeto assenta na análise das cadeias de valor e dos intervenientes dos SAS para identificar e impulsionar inovações técnicas e organizacionais. O processo inicia-se com a identificação das inovações já existentes em cada sistema, seguindo-se a determinação das inovações-chave sobre as quais incidirá a análise. Através do mapeamento do percurso destas inovações, pretende-se diagnosticar as barreiras económicas, técnicas ou institucionais que impedem a mudança, bem como as soluções e inovações mobilizadas para superar esses bloqueios. Adicionalmente, o estudo explora as motivações subjacentes às escolhas dos agricultores, distinguindo entre fatores internos, como os seus valores e ambições, e fatores externos, como as dinâmicas de mercado e o acesso à informação. Por fim, o processo analisa os modelos de negócio desenvolvidos, de forma a compreender como estes sistemas garantem a sua sustentabilidade financeira a longo prazo.

O Polo de Inovação da Fataca, na região de Odemira em Portugal, é uma infraestrutura de investigação e experimentação pertencente ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.). Este polo foca-se no desenvolvimento científico e técnico, nomeadamente na fileira hortofrutícola dos pequenos frutos. Funciona em parceria com diversas entidades (Tabela 2) num esforço conjunto para inovar no setor, com base em estratégias e técnicas assentes na redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e de energia na produção de pequenos frutos.

As inovações sistémicas testadas no Polo da Fataca visam a transição agroecológica das culturas em estufa, demonstrando que é possível responder às necessidades de sistemas de produção intensiva em ambiente protegido, de forma ecológica e com base num princípio de redução da dependência de pesticidas. Destes esforços pretende-se a criação de condições para que o Polo de Inovação da Fataca (SAS-ODE) se torne uma exploração agrícola onde seja possível produzir pequenos frutos num sistema rentável para os agricultores, tirando partido da agricultura de precisão e da implementação de práticas agroecológicas.

Regiões como o Alentejo (Odemira) e o Algarve, onde a produção de pequenos frutos é intensiva, apresentam desafios específicos à sustentabilidade na cadeia de produção de pequenos frutos. O aumento médio da temperatura de 0,3 °C por década em Portugal Continental (APA, 2025) juntamente com a intensificação de fenómenos meteorológicos extremos, cria uma pressão enorme sobre os diferentes recursos naturais, sendo a água o recurso mais crítico no contexto das alterações climáticas. Nos últimos 10 anos verificaram-se períodos longos de seca meteorológica na região Sul, em especial no Baixo Alentejo e Algarve. Contudo, a complexidade do setor não se cinge à gestão da água, uma vez que a fileira dos pequenos frutos enfrenta um conjunto de pressões transversais e interdependentes.

À dificuldade crónica na contratação e retenção de mão-de-obra qualificada soma-se a necessidade de uma renovação varietal, através da introdução de cultivares que apresentem uma melhor adaptação às condições edafoclimáticas específicas destas regiões. Simultaneamente, a cadeia de valor impõe exigências crescentes quanto à qualidade dos frutos, exigindo que estes sejam obtidos através de modos de produção ecológicos e com uma reduzida pegada de carbono. Estes fatores desenham um quadro de elevada exigência para um sistema assente numa transição agroecológica, requerendo soluções integradas que garantam a viabilidade económica da produção primária e a salvaguarda ambiental dos ecossistemas. As respostas a muitos destes desafios estão na Ciência e na Cooperação e no estabelecimento de parcerias público-privadas de natureza técnico-científica.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto ACROPICS (Agroecological Crop Protection Innovations for Climate-resilient Systems), tendo recebido financiamento do programa de investigação e inovação Horizonte Europa da União Europeia, ao abrigo do acordo de subvenção das Ações Marie Skłodowska-Curie (MSCA) – Staff Exchanges (Projeto nº 101131263).

~

Referências Bibliográficas

- APA (2025, September 24). *Relatório do Estado do Ambiente 2025*.
<https://Rea.Apambiente.Pt/Content/Precipita%C3%A7%C3%A3o-e-Temperatura>.
- European Commission (2020). *The European Green Deal Striving to be the first climate-neutral continent*. https://Commission.Europa.Eu/Strategy-and-Policy/Priorities-2019-2024/European-Green-Deal_en.
- European Commission (2025). *Member States: Trends. Trend in use and risk of chemical pesticides and the use of more hazardous pesticides*.
https://Food.Ec.Europa.Eu/Plants/Pesticides/Sustainable-Use-Pesticides/Pesticide-Reduction-Targets-Progress/Member-States-Trends_en
- Eurostat. (2025, April). *Agri-environmental indicator - consumption of pesticides*.
https://Ec.Europa.Eu/Eurostat/Statistics-Explained/Index.Php?Title=Agri-Environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides#Footnotes.
- Geels, F. W. (2002). Technological transitions as evolutionary reconfiguration processes: a multi-level perspective and a case-study. *Research Policy*, 31(8–9), 1257–1274. [https://doi.org/10.1016/S0048-7333\(02\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0048-7333(02)00062-8)
- Jacquet, F., Jeuffroy, M. H., Jouan, J., Le Cadre, E., Litrico, I., Malausa, T., Reboud, X., & Huyghe, C. (2022). Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 42, Number 1). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>
- Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D., & Munier-Jolain, N. (2017). Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nature Plants*, 3. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.8>
- Möhring, N., Ingold, K., Kudsk, P., Martin-Laurent, F., Niggli, U., Siegrist, M., Studer, B., Walter, A., & Finger, R. (2020). Pathways for advancing pesticide policies. *Nature Food* 2020 1:9, 1(9), 535–540. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-00141-4>

Tabelas e Figuras

Tabela 1 - Lista e descrição dos 12 Sistemas de Agricultura Sustentável (SAS) integrantes do projeto ACROPICS

Sigla	Área Geográfica	Setor agrícola	Ponto de contacto	Agentes envolvidos	Razão de escolha
CNF	Himachal Pradesh, Índia	Cereais, pomares, hortícolas	Dr. YS Parmar University of Horticulture and Forestry (UHF), Nauni	Chaupal Naturals Farmer Producer Company, 41 agricultores e stakeholders associados	CNF segue práticas de agricultura natural para o cultivo de diversas culturas. Trata-se de um estudo de caso sobre o desafio da transição dos sistemas dominantes para práticas agrícolas sustentáveis (ACP), apoiado pelo incentivo à inovação proveniente da indústria a jusante
GDT	Himachal Pradesh, Índia	Maçã, cereais e hortícolas	Dr. YS Parmar University of Horticulture and Forestry (UHF), Nauni	Gram Disha Trust e cerca de 100 produtores e stakeholders associados	GDT trabalha com pequenos agricultores e agricultores marginais de sequeiro em prol de uma transformação agrícola sustentável. A organização assegura que os custos de produção dos agricultores não aumentam e que são aproveitadas tecnologias adequadas ao seu contexto para o incremento dos rendimentos.
ALM	Almeria, Espanha	Hortícolas de estufa	Agrobio SL.	2 grandes cooperativas de mais de 800 agricultores, viveiros, administradores locais, meios de comunicação	Sistema-modelo reconhecido para culturas em estufa, que na década de 2000 passou rapidamente da proteção de culturas convencional para a baseada em biocontrolo. Atualmente, é um caso de estudo para a melhoria da sustentabilidade dos sistemas com base em inovações ecológicas
BIOP	Colibași, Giurgiu, Roménia	Hortícolas de campo aberto	University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest (USAMV)	Bioprod, 290 agricultores, fornecedores, distribuidores e vendedores, administradores locais e centrais, meios de comunicação social	Uma das maiores cooperativas hortícolas da Roménia, com cerca de 400 membros, mais de 200 ha de estufas e 650 ha de áreas cultivadas em campo aberto totalmente irrigadas. Estratégia orientada para a redução do uso de pesticidas com recurso a equipamentos e tecnologias modernos. Possui uma base de equipamentos extensa que engloba o processo desde a sementeira e plantação de alta precisão, ao armazenamento frigorífico e distribuição própria com capacidade de entrega a nível nacional. Os equipamentos e instalações modernos (armazenamento, sensores de monitorização das culturas e deteção de patógenos) estão conectados através de um fornecedor de sistemas de TIC e utilizam o mesmo retalhista para distribuição dos produtos
AER	Battambang, Camboja	Arroz	Royal University of Agriculture (RUA)	Agricultores envolvidos na "Sustainable Rice Platform"	O Camboja criou uma delegação nacional da Sustainable Rice Platform, envolvendo atores de toda a cadeia de valor e com objetivos ambiciosos de aumento da produção e do rendimento dos agricultores. O SAS acolhe uma rede de agricultores na área mais importante de produção de arroz do Camboja.
DyT	Fatick, Senegal	Hortícolas	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles: (ISRA)	20 organizações de agricultores, ONGs, associações de consumidores e autoridades locais.	SAS que trabalha com culturas mistas de sequeiro e produção hortícola sujeitas a risco de salinização. Representa a primeira iniciativa local a promover dinâmicas agroecológicas a nível do sistema alimentar local. O Fatick DyTAEL integra uma rede agroecológica mais ampla chamada DyTAES. Os DyTAEL são alianças locais para transições agroecológicas, com o objetivo de fomentar sinergias entre atores e projetos em torno de um plano de ação comum de transição agroecológica.

Sigla	Área Geográfica	Setor agrícola	Ponto de contacto	Agentes envolvidos	Razão de escolha
CAP42	Comarca Andina del Paralelo 42, Argentina	Frutos, hortaliças, lúpulo	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)	>250 agricultores, associação de Produtores El Bolson, Paluan SRL, agentes de ecoturismo, Rapa Nui SA	Um grande vale com agricultura altamente sustentável, atores muito motivados e orientados para a inovação, mas ainda a utilizar um conjunto de práticas que vão do convencional ao biológico. O valor acrescentado é fornecido à cadeia com base numa imagem coletiva muito positiva e reconhecida, e através do agroturismo.
OGC	Curicó, Maule, Chile	Maçã, videira, outros frutos	Universidad Católica Del Maule (UCM)	Organicoop envolvendo 4 empresas de exportação e >50 Produtores, Universidade de Talca	SAS na principal região chilena produtora de frutos e uva. Iniciativa agroecológica recentemente criada, reunindo atores da agricultura biológica em torno de Curicó, quatro empresas de exportação e transformação, bem como serviços de extensão e fornecedores de biosoluções.
VDB	Buzet, França	Videira	Winemakers of Buzet case study (VDB)	>150 agricultores, INRAE, universidade local, companhias de seguros	Cooperativa de dimensão média comprometida com a transição para uma produção com baixo recurso a pesticidas, com uma forte estratégia de comunicação junto dos consumidores. Altamente orientada para a inovação (cultivares, biocontrolo, sistemas de segurança)
CNET	Província Shandong, China	Pomares (maçã, pêssego)	Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (BAAFS)	700 agricultores, 7 estações experimentais	SAS na maior região produtora de frutos da China. Visa responder às exigências da sociedade na redução do uso de pesticidas. Foco no treino de transição para sistemas de produção agroecológicos via implementação de infraestruturas ecológicas para a gestão de múltiplas pragas e patógenos. A formação é reforçada pela existência de estações de experimentais dedicadas, ferramentas de networking (website, aplicações, etc.) e incentivos provenientes de mercados e consumidores alvo.
ODE	Odemira, Portugal	Pequenos frutos (framboesas, amoras, mirtilos e camarinhas)	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)	Beirabaga, Madrefruta, Deifil, INIAV, Driscols, Lusomorango	Sistemas de estufa nos quais o incentivo à inovação por parte dos agentes a jusante é forte, devido às elevadas expectativas dos consumidores em relação a bagas saudáveis.
CREA	Província Mendoza, Argentina	Videira	Universidad Nacional De Cuyo (CUYO)	CREA “Las Acequias” e stakeholders desde produtores a universidades	Grupo de vinicultores orgânicos inseridos numa iniciativa local já estruturada com mais de 50 anos de experiência, que reúne grupos de atores locais e está orientada para a inovação e o desenvolvimento. Modelo de organização coletiva num sistema que enfrenta grandes desafios de produção, incluindo o uso de pesticidas.

Tabela 2 - Protocolos Co-Inovação e Co-criação (I&D) em vigor no SAS-ODE (Fataca)

Produtor / Stakeholder	Início	Programa	Atividades
	2017	Melhoramento genético de framboesa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Criação de variabilidade genética, seleção, avaliação e estudos de adaptação aos condicionalismos edafo-climáticos ➤ Inscrição de novas variedades no Catálogo Nacional de Variedades (CNV). ➤ Aperfeiçoamento de tecnologias de produção, rega, nutrição vegetal e outros em framboesa.
	2020	Melhoramento das tecnologias de produção do mirtilo	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Estudos de adaptação aos condicionalismos edafo-climáticos das diversas cultivares existentes, bem como a fisiologia da planta e a sua adaptação às condições de cultura protegida ➤ Aperfeiçoamento das tecnologias de produção, rega, nutrição vegetal, etc. em mirtilo
	2021	Melhoramento genético de amora	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Criação de variabilidade genética, seleção, avaliação e estudos de adaptação aos condicionalismos edafo-climáticos ➤ Inscrição de novas variedades no Catálogo Nacional de Variedades (CNV). ➤ Aperfeiçoamento de tecnologias de produção, rega, nutrição vegetal e outros em amora
	2023	Melhoramento das tecnologias de produção da framboesa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Instalação de um campo experimental de produção de framboesa em substrato para estudar resistência das plantas a elevada salinidade tendo como base um sistema fechado de recirculação da água da rega, e baixos níveis de drenagem. ➤ Demonstração de novas tecnologias que minimizam a salinidade da rega e/ou a sua fitotoxicidade. ➤ Estudo da produtividade de plantas submetidas a diferentes regimes de stress hídrico e de uso reduzido de certos fertilizantes considerados potenciais poluentes dos recursos aquíferos. ➤ Viabilidade técnica e económica dos melhores sistemas desinfeção, de re-circularização e reutilização da água da rega e recolha parcial, 20% da área, e utilização da água da chuva.
	2023	Avaliação genética de <i>Corema album</i> (camarinha) e <i>Arbutus unedo</i> (medronheiro)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Atividades de criação de variabilidade genética, seleção, avaliação e estudos de adaptação aos condicionalismos edafo-climáticos ➤ Obtenção de clones superiores ➤ Implementação de 2 campos de experimentação para a realização de ensaios de I&DE com o objetivo de aumentar os conhecimentos sobre as espécies.

Primeiro registo de ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ associado à doença “*Rubus stunt*” a infetar *Rubus occidentalis* L. em Portugal

Mónica Rodrigues¹, Melissa Oliveira², Margarida Teixeira Santos¹, Pedro B. Oliveira¹, Diogo Mendonça¹, Esmeraldina Sousa¹

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Av. da República, Quinta do Marquês. 2780-157 Oeiras;

²Beirabaga - Polo de Inovação da Fataca, 7630-580, S. Teotónio, Odemira.

Resumo

Os fitoplasmas são procariontes parasitas, desprovidos de parede celular, que vivem exclusivamente no floema de plantas e em insetos vetores, sendo transmitidos principalmente por hemípteros sugadores de seiva, como *Macropsis fuscula* (Hemiptera: Cicadellidae), ou através da propagação vegetativa.

Em espécies do género *Rubus*, como a framboeseira-vermelha (*Rubus idaeus*) e a amoreira-preta (*Rubus* subgenus *Rubus*), estes agentes patogénicos causam a doença conhecida como “*Rubus stunt*”, caracterizada por crescimento atrofiado das plantas, ramificações desordenadas (vassoura-de-bruxa), redução do tamanho das folhas, entrenós curtos, anomalias florais e deformações nos frutos. A doença está amplamente distribuída, com relatos na Europa, América do Norte e Ásia.

No sudoeste de Portugal, observaram-se sintomas compatíveis com “*Rubus stunt*” em amoreiras-pretas quer silvestres quer cultivadas. A presença de fitoplasma foi confirmada por testes moleculares. Entre 2016 e 2018, foi identificado *Macropsis scotti* como potencial vetor, tendo sido detetado o fitoplasma ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’ em alguns dos insetos capturados.

Devido à existência de insetos vetores e à utilização de materiais de propagação vegetativa, há um elevado risco de disseminação rápida da doença. O curto período de incubação do fitoplasma (cerca de um ano em espécies sensíveis como *Rubus hochstetterorum* e cultivares como a ‘Brazos’ e a Olallie) e a natureza subtil dos sintomas no início da plantação dificultam a sua deteção precoce, potenciando a dispersão do fitoplasma dentro das plantações.

Em framboeseiras-pretas (*Rubus occidentalis* L.) cultivadas em túneis na região de Odemira (Fataca, 37,58N, -8,73W) foram observados sintomas típicos da doença. Todas as amostras com sintomas originaram resultados positivos para ‘*Ca. P. rubi*’ quando analisadas por PCR com os *primers* específicos 16SR(V) F1/R1. A sequência obtida (966 pb) mostrou >99% de identidade com o grupo 16SrV e 99,59% com o *Candidatus Phytoplasma rubi*. Esta sequência foi depositada no NCBI GenBank com o nº de acesso PV500996, constituindo o primeiro registo deste fitoplasma em *Rubus occidentalis* L. em Portugal.

Palavras-chave: Fitoplasma; vetor; deteção; ‘nested-PCR’; framboesas.

Abstract

Phytoplasmas are parasitic prokaryotes, lacking a cell wall, that live exclusively in the phloem tissue of plants and in insect vectors. They are mainly transmitted by sap-sucking hemipterans, such as *Macropsis fuscula* (Hemiptera: Cicadellidae), or spread through vegetative propagation.

In *Rubus* species, such as red raspberry (*Rubus idaeus*) and blackberry (*R.* subgenus *Rubus*), these pathogens cause the disease known as "Rubus stunt" characterized by stunted growth, abnormal branching (witches' broom), reduced leaf size, shortened internodes, floral anomalies and deformed fruits. The disease has been reported in Europe, North America and parts of Asia.

In the southwest of Portugal, typical "Rubus stunt" symptoms were observed in both wild and cultivated blackberry plants. The presence of phytoplasma was confirmed through molecular testing. Surveys conducted between 2016 and 2018 identified *Macropsis scotti* as a potential vector, with '*Candidatus Phytoplasma rubi*' detected in some collected insects.

Due to the short incubation period (around one year in sensitive species like *Rubus hochstetterorum* and commercial varieties like 'Brazos' and Olallie) and the frequent use of vegetative propagation, the disease poses a significant phytosanitary risk. The often-subtle symptoms hinder early visual detection, increasing the likelihood of unintentional spread through infected planting material.

In black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) plants grown in tunnels at Odemira region (37.58N, -8.73W), similar symptoms were also observed. Total DNA extracted from petioles was analysed by PCR using specific primers 16SR(V) F1/R1. All symptomatic plants tested positive for '*Candidatus phytoplasma rubi*'. The consensus sequence (966 bp) showed over 99% identity with phytoplasmas from group 16SrV and 99.59% identity with '*Candidatus phytoplasma rubi*' (OQ520101; AY197649). This sequence was deposited in NCBI GenBank under accession number PV500996, representing the first report of '*Candidatus phytoplasma rubi*' associated with black raspberry in Portugal

Keywords: Phytoplasma; vector; detection; nested-PCR; raspberries.

Introdução

Os fitoplasmas são procariontes parasitas obrigatórios, desprovidos de parede celular, com tamanho variando entre 200 e 800 nm. São parasitas obrigatórios, sobrevivendo apenas nos tecidos vivos dos hospedeiros (plantas e insetos vetores). A principal forma de transmissão em campo destes organismos patogénicos ocorre por meio de insetos hemípteros sugadores de seiva, especialmente *Macropsis fuscula* (Hemiptera: Cicadellidae), e, a longa distância, por propagação vegetativa. Em espécies do género *Rubus*, como a framboeseira-vermelha (*Rubus idaeus*) e a amoreira-preta (*Rubus* subgénero *Rubus*), a infeção por fitoplasmas causa uma doença conhecida como "*Rubus stunt*" (fig. 1).

A doença é caracterizada por crescimento atrofiado das plantas, ramificação excessiva em forma de "vassoura-de-bruxa", folhas ananizadas, entrenós curtos, sépalas alargadas, ocorrência de filodia, proliferação floral e deformações nos frutos. Com ampla distribuição geográfica, já foi relatada em diversas regiões, incluindo Europa, antiga União Soviética, Estados Unidos da América, Paquistão e Turquia (Fahmeed, et al., 2009).

O curto período de incubação do fitoplasma, que pode chegar a um ano em espécies sensíveis como *Rubus hochstetterorum* e cultivares como a 'Brazos' e a Olallie (Oliveira, comunicação pessoal), conjuntamente com a prática comum de propagação vegetativa na cultura de *Rubus*, representa um elevado risco de disseminação involuntária

da infeção por meio de materiais infetados com o fitoplasma. A natureza frequentemente discreta dos sintomas do “*Rubus stunt*” no início da plantação dificulta a sua deteção precoce, favorecendo o subdiagnóstico e aumentando o risco de propagação generalizada. Como resultado, esta doença representa uma ameaça económica significativa para as culturas de *Rubus* (Linck, et al., 2019).

De acordo com a base de dados ‘EPPO Global Database’, ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’ já esteve listado no Anexo IV da Diretiva 2000/29/CE, que estabelece a lista de organismos de quarentena da União Europeia. No entanto, e, desde 2019, que é considerado um ‘Regulated Non-Quarantine Pest’ (RNQP) na UE.

Um surto desta doença foi, anteriormente, reportado numa região produtora de amoras silvestres no sudoeste de Portugal, onde tanto amoreiras-pretas cultivadas quanto silvestres apresentaram sintomas típicos da infeção por “*Rubus stunt*”. A presença de fitoplasmas foi confirmada em plantas sintomáticas (Sousa, et al., 2016). Prospecções realizadas entre 2016 e 2018 confirmaram a presença do vetor *Macropsis* spp., reconhecido pela sua capacidade de transmitir o fitoplasma ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’. O agente patogénico foi detetado nalguns espécimes de *Macropsis scotti*, apontando fortemente o papel desta espécie na disseminação da infeção (Mateus, et al., 2023).

Em 2024, na mesma área de produção, sintomas compatíveis com a doença “*Rubus stunt*” foram também observados em framboeseira-preta (*Rubus occidentalis* L.). Até onde se sabe, este estudo representa o primeiro registo da ocorrência dos sintomas e da deteção do fitoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ em *Rubus occidentalis* L. Esta descoberta amplia a gama de hospedeiros conhecidos do agente patogénico e reforça a necessidade de monitorizar a sua disseminação entre diferentes espécies do género *Rubus*.

Material e Métodos

O material vegetal de *Rubus occidentalis* L. com sintomas consistentes com “vassoura-de-bruxa” e redução foliar foi colhido numa estufa com ensaios experimentais localizada no concelho de Odemira (37,58 N, -8,73 O).

Extraiu-se DNA total a partir de raspas do pecíolo e de tecido foliar pelo método de CTAB (Boudon-Padieu, et al. (2003) modificado a partir de Doyle & Doyle (1990). A deteção do fitoplasma foi realizada através de nested-PCR com utilização de um kit “Universal Phytoplasma” (Qualiplante) para a deteção geral de fitoplasmas, seguido de outro PCR com *primers* específicos 16SR (V) F1/R1 (1100bp), ambos direcionados para a região ribossomal 16S do rRNA (Bertaccini, et al., 2019).

O resultado do ensaio de PCR foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose (1%). Os amplicões foram purificados com ‘Illustra™ ExoProStar™ 1-step Kit (Cytiva, USA)’ e submetidos a sequenciação de Sanger (Applied3500) para, posteriormente, confirmar a sua identidade na base de dados ‘NCBI BLASTn’.

Resultados e Discussão

Todas as plantas sintomáticas produziram amplicões (966 pb) próximos do tamanho esperado para o grupo 16S rRNA (V) (1100 pbpb). As plantas assintomáticas, tal como esperado, não apresentaram qualquer amplificação (fig. 2).

As sequências obtidas, foram alinhadas no ‘software’ BioEdit, tendo-se obtido as respetivas sequências ‘consensus’, as quais foram posteriormente submetidas na base de dados NCBI BLASTn para análise. Estas revelaram elevada similaridade (>99%) com as sequências de ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’ (KR233473; OQ520101; AY197649; MH279544; OQ520102), apresentando um limite de identidade de 99,59%, o que está de

acordo com Bertaccini (2022), confirmando-se assim a presença deste agente patogénico nas amostras testadas. A sequência do isolado foi depositada no NCBI GenBank com o número de acesso PV500996.

Embora tipicamente associado a amoreira-preta, ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’ foi também detetado, neste estudo, em plantas de framboeseira-preta com sintomas de vassoura-de-bruxa. Na República Checa, Franová (2023) também verificou a presença deste fitoplasma nas cultivares de framboeseira "Enrosadira" e "Rutrigo" em campos comerciais, assim como em amoreira-preta em jardins particulares.

A deteção de ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ em Portugal, inicialmente em amoreiras-pretas por Franová e colaboradores (2016) e, agora, em framboeseira-preta no presente trabalho, reforça a necessidade de uma monitorização mais rigorosa e da implementação de estratégias de gestão eficazes para mitigar o impacto deste organismo patogénico na produção de framboesa e amora-preta. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro registo da ocorrência deste fitoplasma em framboesa-preta.

Conclusões

Este estudo confirma, pela primeira vez em Portugal, a presença do fitoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ em framboeseira-preta (*Rubus occidentalis* L.), alargando assim o leque de hospedeiros conhecidos deste agente patogénico no território nacional. A deteção molecular em plantas com sintomas típicos de "Rubus stunt", incluindo vassoura-de-bruxa, redução do tamanho foliar e anomalias reprodutivas, reforça a associação entre o fitoplasma e a manifestação da doença.

A propagação vegetativa, aliada ao curto período de incubação e à discrição dos sintomas em fases iniciais, constitui um risco considerável para a disseminação silenciosa da infeção, dificultando a implementação de medidas fitossanitárias atempadas. A confirmação do vetor *Macropsis scotti* como portador do fitoplasma em estudos anteriores, na mesma região, sublinha o papel fundamental destes insetos na epidemiologia da doença.

Estes resultados reforçam a necessidade de uma vigilância ativa e sistemática nas áreas de produção de *Rubus*, bem como a aplicação de práticas agrícolas que minimizem o risco de introdução e propagação do fitoplasma, nomeadamente, a certificação do material vegetal, o controlo de vetores e a eliminação de plantas infetadas. Considerando o potencial impacto económico da doença na produção de framboesa e amora-preta, é imperativo desenvolver estratégias integradas de monitorização, prevenção e mitigação da presença deste agente patogénico nas espécies de *Rubus*, sustentadas por diagnósticos moleculares fiáveis e precoces.

Referências Bibliográficas

- Bertaccini, A., Arocha-Rosete, Y., Contaldo, N., Duduk, B., Fiore, N., Montano, H. G., Kube, M., Kuo, C.-H., Martini, M., Oshima, K., Quaglino, F., Schneider, B., Wei, W. e Zamorano, A. 2022. Revision of the ‘*Candidatus Phytoplasma*’ species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72.4: 005353.
- Bertaccini, A., Weintraub, P.G., Rao, G.P. e Mori, N. (eds). 2019. *Phytoplasmas: plant pathogenic bacteria—II: transmission and management of phytoplasma—associated diseases*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01699-1>.

- Boudon-Padieu, E., Béjat, A., Clair, D., Larrue, J., Borgo, M., Bertotto, et al. 2003. Grapevine yellows: comparison of different procedures for DNA extraction and amplification for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis* 42(3), 141–149.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.I. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13–15.
- Fahmeed, F., Rosete, Y.A., Pérez, K.A., Boa, E. e Lucas, J. 2009. First report of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (group 16SrI) infecting fruits and vegetables in Islamabad, Pakistan. *Journal of Phytopathology* 157: 639–641. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01549.x>.
- Fránová, J., de Sousa, E., Koloniuk, I., Mimoso, C., Matos, J., Cardoso, F., Contaldo, N., Paltrinieri, S. e Bertaccini, A. 2016. Multigene characterization of a new ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’-related strain associated with blackberry witches’ broom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 1438–1446. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000871>.
- Fránová, J., Přibyllová, J., Zemek, R., Tan, J.L., Hamborg, Z., Blystad, D.-R., Lenz, O. e Koloniuk, I. 2023. First report of ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ associated with *Rubus* stunt disease of raspberry and blackberry in the Czech Republic. *Plant Disease* 107 No.8: 2510.
- Linck, H. e Reineke, A. 2019. *Rubus* stunt: a review of an important phytoplasma disease in *Rubus* spp.. *Journal of Plant Diseases and Protection* 126, 393–399. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00247-3>.
- Mateus, C., Preza, F., Videira, N., Pita, N., Sousa, E., Oliveira, P., Wilson M. R. e Tishechkin, D. 2023. *Macropsis scotti* (Hemiptera: Cicadellidae) detected in Portugal in blackberry (*Rubus*) plants, associated with a *Rubus* stunt disease outbreak. (EPPO-Bulletin). Vol 53. <https://doi.org/10.1111/epp.12931>.
- Sousa, E., Mateus, C., Calha, I e Oliveira, P.B. 2016. ‘*Candidatus Phytoplasma Rubi*’: uma ameaça à produção de *Rubus* em Portugal. *Atas Portuguesas de Horticultura* 25: 149-155. <https://gd.eppo.int/taxon/PHYPRU/distribution>.

Quadros e Figuras



Figura 1 – Aspeto geral de um lançamento de framboesa preta (*Rubus occidentalis* L.).

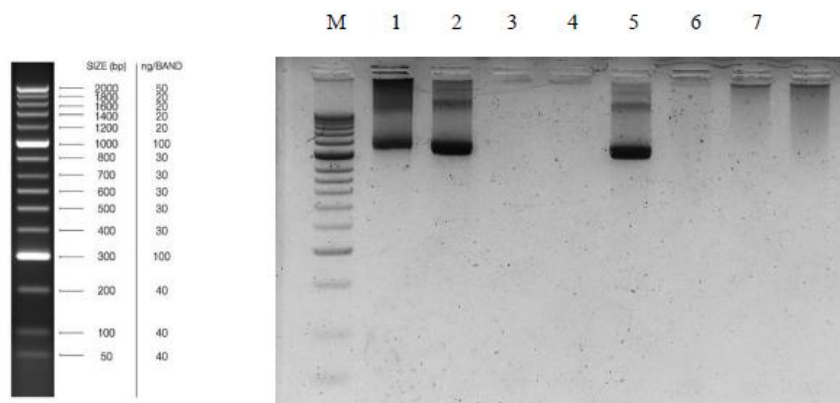


Figura 2 – Perfil eletroforético em agarose (1%) das amostras testadas por PCR com os *primers* 16SR(V). Linhas 1 e 2 – material vegetal com sintomas (pecíolo e folhas); Linhas 3 e 4 – material vegetal sem sintomas; Linha 5 – controlo positivo; Linhas 6 e 7 – controlos negativos.

Pequenos frutos e polinizadores: uma dependência crescente em território nacional

Miriam Cavaco^{1,2}, Pedro B. Oliveira¹, Teresa Valdiviesso¹, João Jacinto^{1,3}

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Av. da República, Quinta do Marquês. 2780-157 Oeiras;

²Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisboa;

³CE3C, Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (CE3C) & CHANGE-Global Change and Sustainability Institute, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Campo Grande, 1749-016 Lisbon.

Resumo

Os pequenos frutos, nomeadamente amoras, framboesas, morangos, medronhos e mirtilos, constituem culturas de elevada importância no mercado nacional, tendo registado um crescimento acentuado da área de produção nas últimas décadas, conforme evidenciado pelos dados do Recenseamento Agrícola do Instituto Nacional de Estatística. Estas culturas são, em geral, fortemente dependentes da polinização entomófila. À exceção do morango, que apresenta um baixo nível no Índice de Dependência de Polinizadores, espécies como o mirtilo, a framboesa e a amora requerem níveis elevados de polinização, sendo as abelhas – em particular a abelha-europeia (*Apis mellifera*) e o *Bombus terrestris* – agentes polinizadores fundamentais.

Neste trabalho, analisamos a evolução da área cultivada com pequenos frutos entre 1989 e 2019, com base nos dados dos Recenseamentos Agrícolas, à escala das NUTS II e dos municípios (NUT III). Paralelamente, abordamos a variação do Índice de Dependência Média (ADI – Average Dependence Index), que reflete o desfasamento crescente entre a área agrícola dependente de polinização e a capacidade de resposta dos polinizadores disponíveis, especialmente nos períodos críticos de floração.

Os resultados apontam para uma tendência preocupante: o aumento contínuo da área de culturas dependentes de polinização que não tem sido acompanhado por uma expansão proporcional nas populações de polinizadores em Portugal. Este desequilíbrio acentua o risco de défice de polinização, com impactos diretos na produtividade e qualidade dos pequenos frutos. Face a este cenário, torna-se premente a implementação de estratégias integradas de gestão e conservação de polinizadores, incluindo o reforço da apicultura e a preservação de habitats naturais, como condição essencial para a sustentabilidade da fruticultura em Portugal.

Palavras-chave: Polinização; índice de dependência média; *Apis mellifera*.

Abstract

Small fruits, namely blackberries, raspberries, strawberries, strawberry tree fruit and blueberries, represent crops of high importance in the national market, having experienced significant growth in cultivated area over the past decades, as evidenced by the Agricultural Census data from the National Institute of Statistics. These crops are generally highly dependent on entomophilous pollination. With the exception of strawberries, which show a low level on the Pollinator Dependency Index, species such as blueberries, raspberries, and blackberries require high levels of pollination, with bees, particularly the European honeybee (*Apis mellifera*) and *Bombus terrestris*, acting as essential pollinators.

In this study, we analyse the evolution of the cultivated area of small fruits between 1989 and 2019, based on Agricultural Census data at the NUTS II and municipal (NUTS III) levels. In parallel, we address variations in the Average Dependence Index (ADI), which reflects the growing mismatch between the pollination-dependent agricultural area and the capacity of available pollinators, especially during critical flowering periods.

The results point to a worrying trend: the continuous expansion of pollination-dependent crops has not been matched by a proportional increase in pollinator populations in Portugal. This imbalance heightens the risk of pollination deficits, directly impacting the productivity and quality of small fruits. Given this scenario, the implementation of integrated pollinator management and conservation strategies, including the reinforcement of beekeeping and the preservation of natural habitats, becomes urgent and is an essential condition for the sustainability of fruit production in Portugal.

Keywords: Pollination; average dependence index; *Apis mellifera*.

Introdução

A polinização é um processo central na reprodução sexual das plantas, envolvendo a transferência de pólen das anteras para os estigmas (Kevan et al., 1990). A morfologia floral frequentemente reflete o modo de polinização, e em espécies com flores vistosas, coloridas ou perfumadas, este processo resulta de uma longa coevolução com os polinizadores (Crepet, 1983). Os polinizadores constituem um grupo diversificado de animais, predominantemente insetos (Bugin et al., 2022). Estes são capazes de transferir pólen dentro de uma flor, entre flores da mesma planta ou entre flores de plantas diferentes, dependendo da estratégia reprodutiva da espécie (Bugin et al., 2022).

As culturas agrícolas são consideradas dependentes de polinizadores quando a polinização animal é necessária para atingir a produção ótima de frutos ou sementes, como ocorre com amêndoas e peras. Já as culturas não dependentes podem autopolinizar-se, ser polinizadas por meios abióticos, como o vento, ou ser cultivadas principalmente pelas partes vegetativas, como folhas, caules ou tubérculos (Klein et al., 2007). Contudo, para a maioria das culturas temperadas e tropicais, a transferência de pólen realizada por polinizadores é essencial para o desenvolvimento de sementes e frutos (Kevan et al., 1990). Dessa forma, a polinização constitui um serviço ecossistémico crucial, estimado em cerca de 15 mil milhões de dólares por ano nos Estados Unidos (Calderone, 2012) e pelo menos 5 mil milhões de euros por ano na União Europeia, onde 84% das espécies cultivadas dependem, pelo menos parcialmente, de polinizadores (Klein et al., 2007; COM, 2023).

Em Portugal, os pequenos frutos, incluindo amoras, framboesas, morangos, medronhos e mirtilos, têm elevada importância económica, com crescimento significativo das áreas cultivadas nas últimas décadas (INE, 2019). Exceto o medronho que apresenta baixa dependência de polinizadores, espécies como mirtilo, framboesa e amora requerem níveis elevados de polinização, sendo *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* os principais agentes polinizadores.

A expansão contínua das culturas de pequenos frutos dependentes de polinizadores levanta preocupações quanto ao equilíbrio entre a necessidade e a disponibilidade de polinizadores.

A produção de pequenos frutos é relativamente assimétrica com a maior área de mirtilo dispersa pela região Norte e a área de framboesa e amora concentrada no sudoeste

alentejano e Algarve. As tecnologias de produção utilizadas são também distintas em função da região do país sendo o mirtilo praticado essencialmente ao ar livre na região norte e a framboesa e a amora em cultura protegida no Sul (Oliveira a,b, 2021).

Na cultura da framboesa em estufa ficou provado que as abelhas têm um papel essencial na polinização, evitando deformações e que contribuem para a higienização da cultura, porque, ao extraírem o néctar, reduzem a proliferação de agentes patogénicos, evitando danos nos frutos (Brito, 2019). As observações realizadas permitiram concluir também que o comportamento das abelhas dentro das estufas é perturbado. As estruturas e a filtração dos raios ultravioleta pelo revestimento plástico são as causas mais prováveis para esta desorientação. Preparar colmeias com o objetivo específico de polinizarem e extraírem o néctar em excesso na cultura de framboesa é essencial para o sucesso da operação (Brito, 2019).

Evidências indicam que o aumento da área cultivada não tem sido acompanhado por crescimento proporcional das populações naturais de polinizadores, aumentando o risco de défices de polinização e afetando diretamente a produtividade e a qualidade dos frutos. Dessa forma, a implementação de estratégias integradas de gestão e conservação de polinizadores, incluindo o reforço da apicultura e a preservação de habitats naturais, torna-se essencial para garantir a sustentabilidade da fruticultura em Portugal.

Material e Métodos

Para avaliar a evolução da dependência de polinizadores em sistemas de produção de pequenos frutos, foram analisados dados específicos destas culturas no território continental de Portugal, ao nível das NUTS e dos municípios. Os dados de área (ha) por cultura referem-se aos anos de 1989, 1999, 2009 e 2019 (INE, 2019).

A dependência das culturas em polinização foi estimada com base no Índice de Defice de Polinização quantifica a redução na produção total de uma cultura na ausência de polinizadores. Segundo Klein *et al.* (2007), e pode ser classificada em cinco níveis: Classe 0: nenhuma redução; Classe 1: baixa (<10% redução na produção); Classe 2: moderada (10–40%); Classe 3: elevada (40–90%); e Classe 4: essencial (>90%).

Os valores de PDI atribuídos às culturas deste estudo foram obtidos da literatura existente (Quadro 1).

O Índice de Dependência Média (ADI) foi determinado de acordo com a equação:

$$ADI = \sum \frac{(\text{área da cultura} \times PDI)}{\text{Superfície Agrícola Útil}} \times 100$$

A variação geográfica do ADI (Índice de Dependência Média) por NUTS III em todo o país foi mapeada ao longo do período de estudo (1989 a 2019), usando o QGIS, com um gradiente de cores para representar as mudanças ao longo do tempo (QGIS versão 3.28 Firenze).

Em 2019, comparou-se a disponibilidade de colmeias por hectare com a necessidade estimada, calculada a partir das densidades recomendadas de colmeias para cada cultura segundo a literatura (Breeze *et al.*, 2014; Rollin & Garibaldi, 2019; Delaplane & Mayer, 2000).

Resultados e Discussão

A área cultivada com pequenos frutos em Portugal continental registou um crescimento muito expressivo ao longo das últimas quatro décadas, aumentando de 53 ha em 1989 para 6125 ha em 2019 (fig. 1). Este alargamento foi especialmente marcado após 2009, refletindo a forte intensificação da produção e o crescente interesse comercial por estas culturas. O aumento da área plantada, para além da especificidade da utilização de

polinizadores em cultura protegida, traduziu-se numa maior dependência global dos serviços de polinização, como demonstrado pela evolução da Dependência Média (ADI), que atingiu os valores mais elevados em 2019, ano em que se verificou também a maior expansão da área agrícola (fig. 2). Esta tendência confirma que a intensificação produtiva tem ampliado a pressão sobre os polinizadores, reforçando a necessidade de garantir a sua disponibilidade em regiões com forte concentração de pequenos frutos, o que confirma as conclusões de Blettler et al. (2022).

Apesar do aumento da área agrícola dependente de polinizadores, a disponibilidade das colmeias de *A. mellifera* não acompanhou a mesma trajetória. Entre 2015 e 2018 observou-se um crescimento do número de colónias de abelhas, mas este foi seguido de um declínio contínuo até 2023, totalizando a perda estimada de cerca de 118 000 colónias entre 2018 e 2023 (fig. 3).

A análise da necessidade de polinizadores por cultura e por região mostra que a dependência não é homogénea no território (fig. 4). O medronho apresenta as maiores necessidades relativas no Algarve, enquanto o mirtilo se destaca nas regiões Centro e Norte. Estes padrões refletem tanto a distribuição geográfica das culturas como as diferenças intrínsecas no seu Índice de Dependência de Polinização (PDI), com espécies como mirtilo, framboesa, medronho e morango a exigirem maior aporte de polinizadores para manter níveis produtivos elevados.

Em conjunto, os resultados evidenciam um desfasamento entre a expansão agrícola e a capacidade atual do sistema de suportar as necessidades crescentes de polinização.

Conclusões

Em síntese, os resultados reforçam que a expansão agrícola deve ser orientada por estratégias que assegurem a proteção e a conservação dos polinizadores, sobretudo nas regiões do Norte, Centro e Algarve, onde a dependência destes serviços é mais acentuada. A manutenção da produtividade agrícola a longo prazo depende da adoção de práticas de gestão sustentável que considerem a diversidade de polinizadores, incluindo outras espécies para além de *Apis mellifera*, como *Bombus terrestris*. Integrar esta perspetiva ecológica no planeamento agrícola é essencial para garantir sistemas de produção mais resilientes e sustentáveis.

Referências Bibliográficas

- Blettler, Diego César; Biurrun Manresa, José Alberto; Fagundez, Guillermina Andrea (2022). A review of the effects of agricultural intensification and the use of pesticides on honey bees and their products and possible palliatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*; 20(4):1-15.
- Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Koz' ak, L. & Potts, S.G., (2014). Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS One*, 9 (1): e82996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082996>.
- Brito, T.A. (2019). O néctar na cultura da framboesa em estufa: Extração pelas abelhas. Tese de Mestrado em gestão sustentável dos espaços rurais, Universidade do Algarve: 65p.
- Bugin, G., Lenzi, L., Ranzani, G., Barisan, L., Porrini, C., Zanella, A. & Bolzonella, C. (2022). Agriculture and Pollinating Insects, No Longer a Choice but a Need: EU Agriculture's Dependence on Pollinators in the 2007–2019 Period. *Sustainability*, 14(6), 3644. <https://doi.org/10.3390/su14063644>.

- Calderone, N.W. (2012). Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PLoS One*, 7: e37235. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>.
- COM (2023). Revision of the EU Pollinators Initiative A new deal for pollinators, (COM/2023/35 final): 19 pp. (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2023%3A35%3AFIN>).
- Crepet, W.L. (1983). The role of insect pollination in the evolution of the angiosperms. In L. Real (ed.). *Pollination Biology*. Academic Press, Orlando, Florida. Chapter 3: 29-50.
- Delaplane, K. & Mayer, D. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI, UK: 344pp.
- Gallai, N. & Vaissière, B. (2009). Guidelines for the economic valuation of pollination services at a national scale. *FAO*:17 pp. <https://hal.inrae.fr/1hal-02822628>.
- INE (2019). Recenseamento Agrícola. Análise dos principais resultados: 2019. Lisboa: INE, 2021. Disponível na [www: <url:https://www.ine.pt/xurl/pub/437178558>](http://www.ine.pt/xurl/pub/437178558). ISBN 978-989-25-0562-6.
- Kevan, P.G.; Clark, E.A. and Thomas, V.G. (1990). Insect pollinators and sustainable agriculture. *American J. of Alternative Agric.*, 5 (1):13-22.
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*, 274. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.
- Oliveira, P.B., (2021a). Manual de boas práticas de fruticultura. 7º fascículo - Framboesa. *Frutas Legumes e Flores* 215: 5p.
- Oliveira, P.B., (2021b). Manual de boas práticas de fruticultura. 8º fascículo - Mirtilos. *Frutas Legumes e Flores* 216: 7p.
- Rollin, O. & Garibaldi, L.A. (2019). Impacts of honeybee density on crop yield: A meta-analysis. *J. Appl. Ecol.* 2019: 56: 1152–1163. (DOI: 10.1111/1365-2664.13355).

Quadros e Figuras

Quadro 1 - Valores de Índice de dependência de polinização (PDI) de cada cultura (Delaplane and Mayer, 2000, Klein *et al.*, 2007).

Cultura	Nome científico	PDI	Dependência de polinização (Categoria)
Mirtilo	<i>Vaccinium spp.</i>	0,53	Elevado
Amora	<i>Rubus fruticosus</i>	0,45	Elevado
Framboesa	<i>Rubus idaeus</i>	0,42	Elevado
Groselha vermelha	<i>Ribes rubrum</i>	0,65	Elevado
Morango	<i>Fragaria x ananassa</i>	0,54	Elevado
Medronho	<i>Arbutus unedo</i>	0,25	Moderado

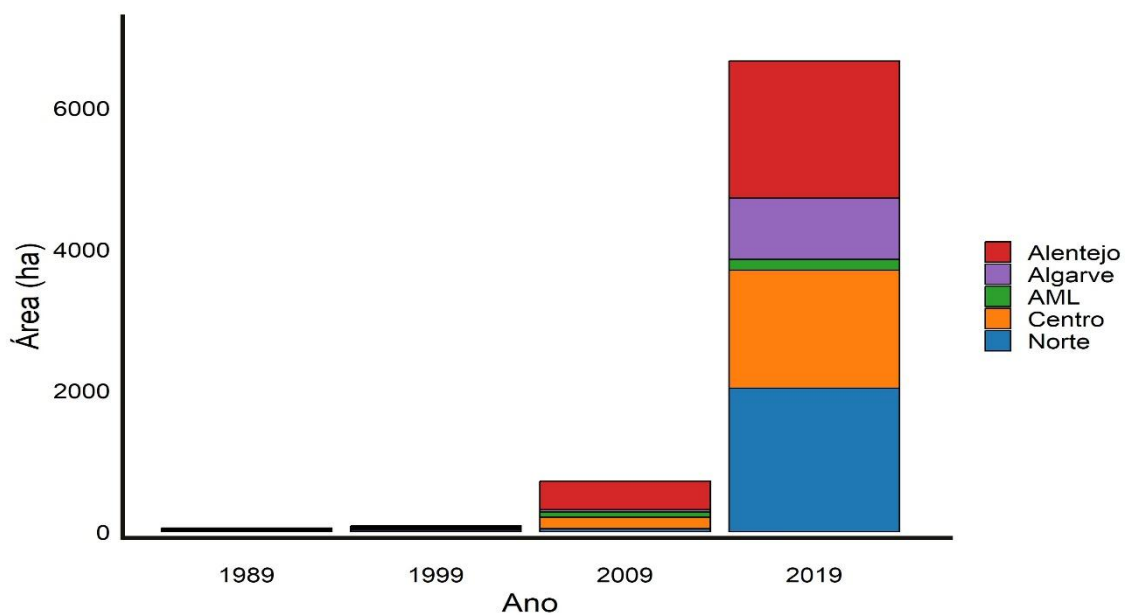


Figura 1 - Evolução da área de pequenos frutos, entre 1989, 1999, 2009 e 2019, para as 5 NUT II do território de Portugal continental (INE, 2019).

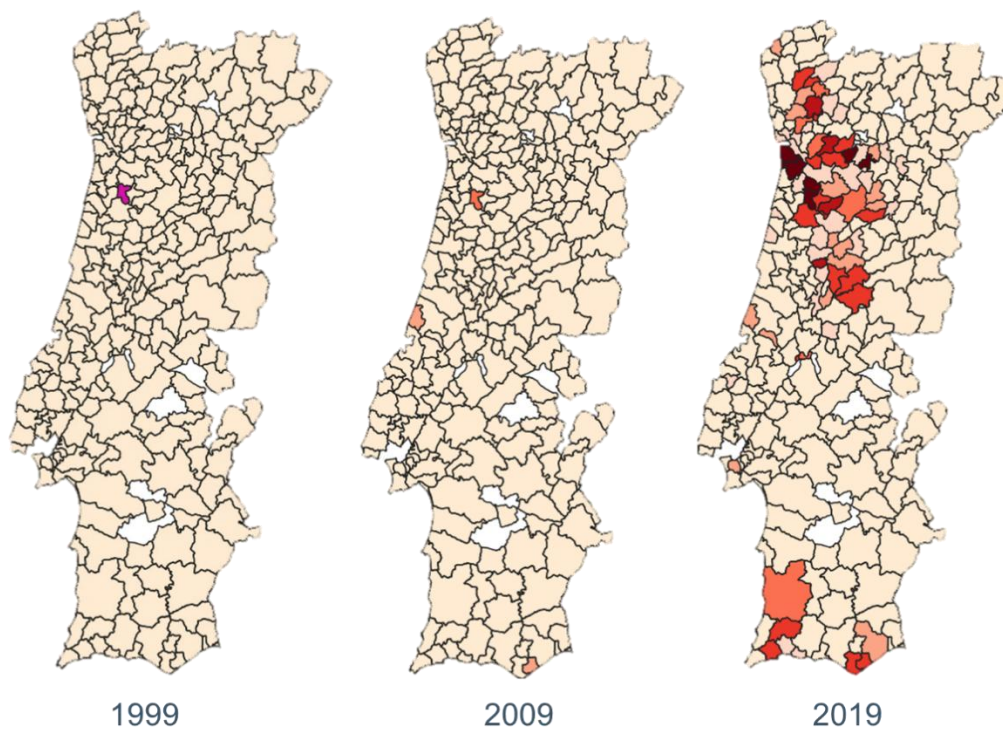


Figura 2 - Evolução da Dependência Média em Portugal Continental, entre 1999-2019 (INE, 2019) para as culturas de pequenos frutos.

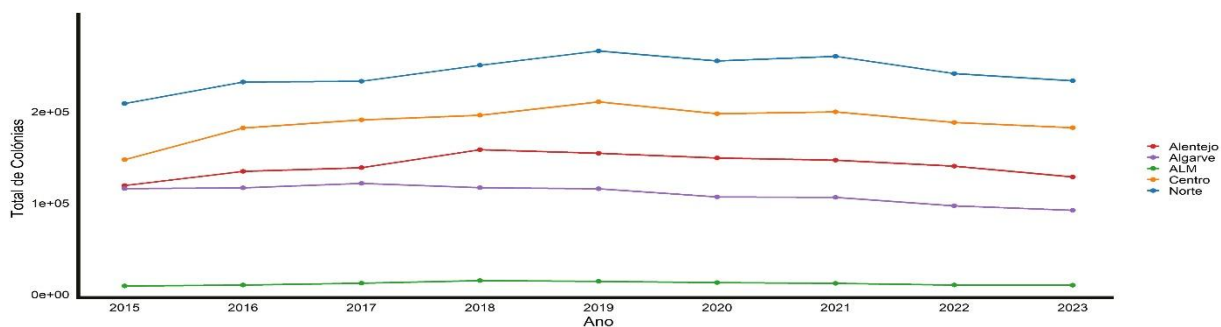


Figura 3 - Evolução do número de colónias de abelhas entre os anos 2015 e 2023, em cada NUT II de Portugal continental.

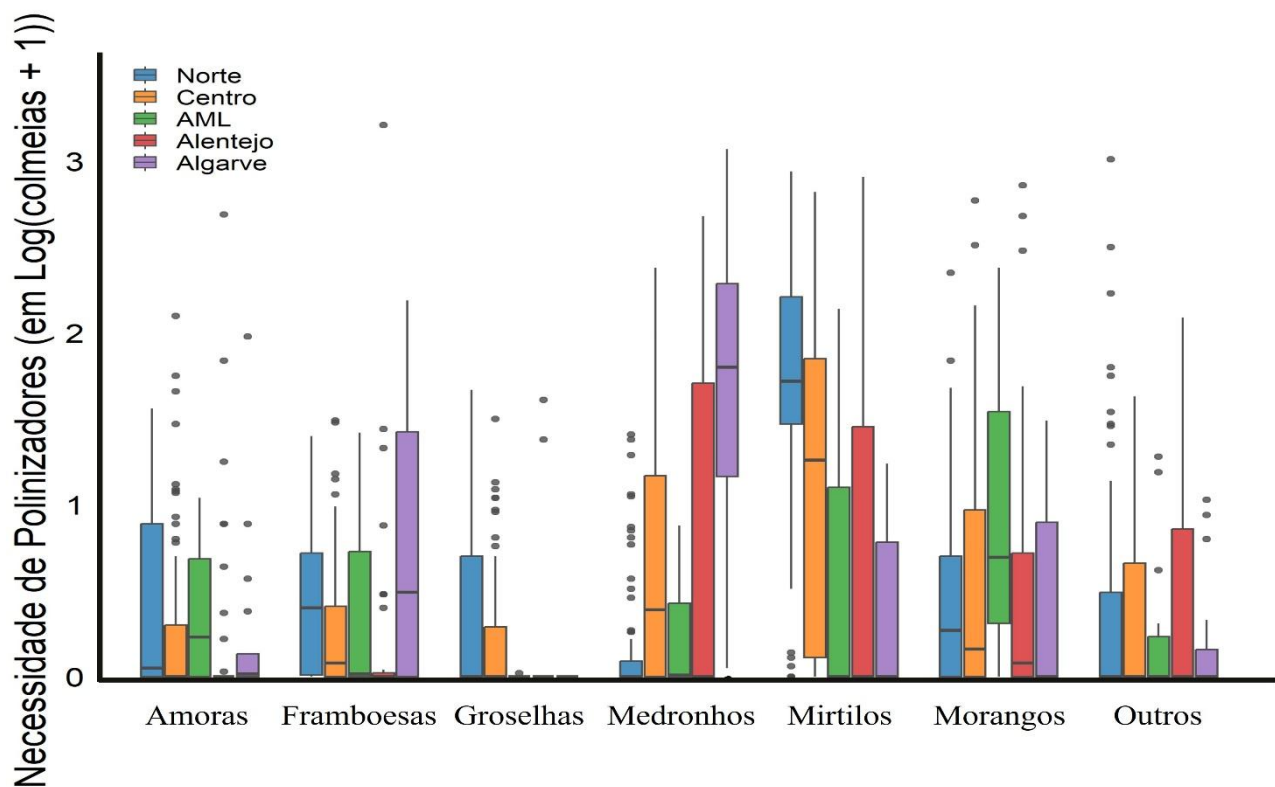


Figura 4 - Necessidade de polinizadores, expresso em Log (colmeias + 1), para cada cultura em cada NUT II, para o ano de 2019.

Avaliação de um bioestimulante microbioano a nível comercial no controlo de doenças fúngicas: metodologia e constrangimentos

Miguel G. Santos, Rosa M.N. Ricardo, Andreia Garrido, Tânia R. Fernandes, Susana M.P. Carvalho

GreenUPorto - Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável/Inov4Agro, DGAOT, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua da Agrária 747, 4485-646 Vairão.

Resumo

O projeto BFREE, financiado pelo IFAP, visa a redução da aplicação de fungicidas de síntese em frutos e legumes, através do desenvolvimento e otimização da aplicação de um novo bioestimulante de origem microbiana. Avaliações prévias de diferentes formulações, juntamente com ensaios-piloto realizados nas culturas do morango (*Fragaria × ananassa* Duch.) e da framboesa (*Rubus idaeus* L.), revelaram uma ação promissora de um bioestimulante (derivado de exsudados de duas espécies de leveduras) no controlo preventivo de várias doenças fúngicas. Além disso, foi desenvolvido um protocolo experimental para avaliação do potencial do bioestimulante em condições de campo. Seguindo esse protocolo, foram implementados nove ensaios em explorações comerciais de vários produtores e organizações de produtores de referência, distribuídas por diversas regiões de Portugal: Norte, Centro, Oeste e Vale do Tejo e Alentejo. Os ensaios abrangeram culturas de amora (*Rubus* spp.), framboesa, mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.), morango, pepino (*Cucumis sativus* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Assim, pretendeu-se validar a eficácia deste bioestimulante no controlo de doenças fúngicas em diferentes culturas hortofrutícolas sob condições edafoclimáticas distintas, por comparação com as práticas convencionais (controlo), nas quais são aplicados fungicidas de síntese. Para tal, foi estabelecida uma metodologia transversal aplicada a todos os ensaios, a qual é apresentada neste artigo e poderá ser implementada para teste na aplicação de outros produtos à escala comercial. Foram ainda discutidos os constrangimentos associados a este tipo de abordagem.

Palavras-chave: Biocontrolo; fitopatologia; gestão fitossanitária sustentável; horticultura; pequenos frutos.

Abstract

The BFREE project, funded by IFAP, aims to reduce the use of synthetic fungicides on fruits and vegetables by developing and optimizing a new microbial biostimulant. Previous evaluations of different formulations, together with pilot trials carried out on strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) crops, revealed the promising action of a biostimulant (derived from exudates of two yeast species) in the preventive control of various fungal diseases. In addition, an experimental protocol was developed to evaluate the biostimulant's potential under field conditions. Following this protocol, nine trials were implemented in commercial context of various leading growers and growers' organizations, distributed across several regions of Portugal: North, Center, Oeste, Vale e Tejo, and Alentejo. The trials covered blackberry (*Rubus* spp.), raspberry, blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), strawberry, cucumber (*Cucumis sativus* L.), and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops. The aim was to validate the effectiveness of this biostimulant in controlling fungal diseases in different

fruit and vegetable crops under different soil and climate conditions, compared to conventional practices (control), in which synthetic fungicides are applied. To this end, a cross-sectional methodology was established and applied to all trials, which is presented in this article and can be implemented for testing in the application of other products on a commercial scale. The constraints associated with this type of approach were also discussed.

Keywords: Biocontrol; horticulture; plant pathology; small fruits; sustainable phytosanitary management.

Introdução

As culturas hortícolas, incluindo frutas e vegetais como amora (*Rubus* spp.), framboesa (*Rubus idaeus* L.), mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.), morango (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), contribuem para a diversidade alimentar e oferecem benefícios para a saúde (Zou et al., 2022). A horticultura representa uma das cadeias de valor mais importantes do setor agroalimentar português devido à sua importância para a economia nacional (Agroportal, 2025).

Em 2020, a produção nacional de hortofrutícolas totalizou cerca de 2,5 milhões de toneladas (t), distribuídas por 57.656 hectares (ha), com destaque para o aumento da produtividade dos pequenos frutos, impulsionado tanto pelas condições climáticas propícias do país como pela produção anual em regime de horticultura protegida (Cardoso, 2020; Nunes et al., 2022). De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2020), os pequenos frutos representam aproximadamente 4% da produção nacional de frutos, com um aumento da área cultivada e do volume de exportação na última década (Oliveira, 2023). Entre os produtos hortícolas, o tomate é particularmente importante e a sua produção tem vindo a aumentar ao longo dos últimos 20 anos, atingindo uma área de 1.776 ha em 2021, com uma produtividade média de 84,5 t/ha (Coelho et al., 2024).

No entanto, o cultivo de hortofrutícolas é frequentemente afetado por diversos fungos patogénicos responsáveis por doenças que comprometem gravemente a produtividade e a qualidade, prejudicando fortemente o rendimento económico dos produtores (Xu et al., 2022; Zou et al., 2022). De facto, as doenças fúngicas como a podridão cinzenta, o oídio, a antracnose e a ferrugem contribuem significativamente para perturbações tanto durante o ciclo produtivo como ao longo da restante cadeia de valor das culturas (Simões et al., 2023), frequentemente resultando na rejeição dos produtos (Bernardo et al., 2016; Huang et al., 2021; Rodrigues et al., 2025).

Desde 2011 as vendas de produtos fitofarmacêuticos sintéticos na União Europeia (UE) têm vindo a diminuir, sendo que atingiram um mínimo relativo em 2023 de aproximadamente 292.000 (t). Portugal e Itália estão entre os países onde se observou uma quebra mais acentuada na venda destes produtos, com uma redução de 44% (Eurostat, 2023). De acordo com o INE, em 2023, Portugal vendeu 1,97 kg de substância ativa por hectare dos principais grupos de pesticidas, em comparação com a média europeia de 2,40 kg/ha. Em particular, o grupo dos fungicidas tem a maior representação nacional, com uma venda de aproximadamente 1,21 kg/ha (INE, 2023). Embora o uso de fungicidas continue a ser comum na agricultura portuguesa, observa-se uma tendência de redução que está alinhada com políticas internacionais orientadas para a sustentabilidade na produção de alimentos (European Commission, 2024).

Dado o uso restrito de produtos sintéticos regulamentado pela UE, os bioestimulantes microbianos surgem como uma estratégia especialmente promissora na horticultura, pois podem aumentar a eficiência, a resiliência e a qualidade dos produtos, mesmo que os seus mecanismos de ação ainda não sejam totalmente compreendidos (Ansari et al., 2023; Lucini, 2022). No entanto, o desempenho dos bioestimulantes em condições de campo revela-se frequentemente inconsistente quando se transita de ensaios controlados em laboratório ou estufas para condições comerciais, evidenciando a necessidade crucial de validação em diferentes culturas e regiões (Rouphael et al., 2018; Stridh et al., 2022). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver um protocolo para avaliar a eficácia de um bioestimulante à base de exsudados de duas espécies de leveduras (BFREE), no controlo de doenças fúngicas em diferentes culturas hortofrutícolas sob condições edafoclimáticas distintas, por comparação com as práticas convencionais (controlo). Os ensaios ainda se encontram em curso, sendo que os mesmos fornecerão informações relevantes para ajustes necessários à otimização da aplicação do bioestimulante BFREE, bem como para avaliar o seu potencial na mitigação sustentável de doenças fúngicas em frutos e legumes.

Metodologias para a aplicação do biostimulante BFREE

Culturas hortofrutícolas

Os nove ensaios de validação do bioestimulante BFREE estão em curso desde abril de 2025, estando prevista a sua conclusão em fevereiro de 2026. Os ensaios estão instalados em diversas regiões de Portugal, abrangendo explorações agrícolas e organizações de produtores (OP) parceiras do projeto BFREE (fig.1). A Norte participaram as empresas Sociedade Agrícola dos Sirfídeos Lda, com o cultivo de mirtilo e Frescura Sublime Unipessoal Lda, com o cultivo de tomate e pepino – ambas associadas da PAM OP, Produção e Distribuição Hortícola do Litoral, Lda – assim como a empresa Miguel Mesquita & Hugo Seca, Lda (Póvoa de Varzim), com o cultivo de morangueiro. Na região Centro, Oeste, e Vale do Tejo colaborou-se com a Berrysmart Unipessoal Lda, com a produção de mirtilo, e também com a Hortorres & Hortafina (HT&HF) com a produção de tomate cereja. Na região do Alentejo, participaram a OP Madrefuta - Centro de Vendas Hortofrutícolas Lda com a produção de amora e as empresas Beirabaga – Soc. Produção e Comercialização de Pequenos Frutos, Lda., com a produção de mirtilo, e ainda o Centro de Investigação para a Sustentabilidade, com a produção de framboesa.

Condições de crescimento das plantas e aplicação dos tratamentos

As experiências em curso decorrem maioritariamente em estufas comerciais, com exceção da produção de mirtilo da parceira Berrysmart, que ocorre ao ar livre e varia consoante as práticas de cada produtor. O delineamento experimental previa um esquema aleatório em blocos com três réplicas biológicas por tratamento (convencional ou BFREE), sendo que cada réplica tem no mínimo seis plantas. Porém, a distribuição das réplicas foi adaptada para cada ensaio, encontrando-se ajustada à realidade de cada produtor. Além disso, foram incluídas ‘plantas de bordadura’ entre os tratamentos, de forma a tornar fidedignos os dados recolhidos em cada tratamento. Por exemplo, no parceiro Miguel Mesquita & Hugo Seca, o ensaio em morangueiro (cv. ‘Royal Royce’) decorreu numa estufa multinave com paredes de policarbonato e plástico térmico na cobertura, sendo que as réplicas biológicas dos tratamentos convencional e BFREE foram distribuídas em naves adjacentes (fig. 2a). No caso do ensaio em tomate cereja (cv. ‘Santa Rita’) no parceiro HT&HF, cada réplica biológica foi representada em túneis distintos (fig. 2b)

Em todos os ensaios foram considerados dois tratamentos: (i) convencional/controlo, no qual as plantas foram tratadas de acordo com a gestão fitossanitária habitual de cada produtor, incluindo o uso de fungicidas sintéticos; (ii) BFREE, no qual as plantas foram pulverizadas com o bioestimulante BFREE, que consiste numa mistura de dois exsudados líquidos derivados de duas espécies de leveduras endófitas de morangueiro. A escolha das formulações teve por base os resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de investigação, os quais demonstraram eficácia no controlo de doenças fúngicas em morangueiro. O bioestimulante BFREE foi fornecido pela Proenol – Indústria Biotecnológica, S. A. (Gaia, Portugal), empresa parceira do projeto. A formulação consistiu em dois exsudados na proporção de 1:1, suplementados com 1 mL·L⁻¹ de aderente, com o objetivo de promover a aderência foliar. O bioestimulante BFREE foi mantido sob refrigeração até à aplicação, de forma a preservar a viabilidade e a atividade biológica. A aplicação foliar do bioestimulante BFREE foi realizada até ao ponto de escorrimento, com recurso a pulverizadores de turbina montados em trator ou aplicação manual, conforme as condições específicas de cada exploração e o delineamento experimental definido juntamente com o produtor. As aplicações, um total de seis, foram efetuadas quinzenalmente ao longo do ciclo cultural, com início após um mês da plantação da cultura ou conforme o calendário produtivo de cada espécie (fig. 3). A avaliação da incidência de doenças fúngicas, da produtividade e dos parâmetros de qualidade dos produtos é realizada no pico da colheita, de forma a refletir o impacto global dos tratamentos ao longo do ciclo cultural. O registo dos parâmetros avaliados decorre durante todo o período de aplicação dos tratamentos e preferencialmente até ao final do ciclo cultural.

Resultados e Discussão

A literatura descreve inúmeros estudos que relatam efeitos positivos dos bioestimulantes microbianos, contudo, os resultados variam amplamente em função do método de aplicação, da composição das formulações, da espécie cultivada e das condições ambientais (Li et al., 2022). Observa-se ainda que a aplicação de filtrados de cultura sem células ou de exsudados microbianos tem sido, na sua maioria, avaliada em condições controladas de estufa ou em ensaios laboratoriais (El-Gendi et al., 2022), sendo ainda escassos os estudos conduzidos em contextos comerciais e que incluam comparação direta com práticas agrícolas convencionais (Ansari et al., 2023; Morcillo et al., 2022).

A padronização de metodologias para a avaliação de bioestimulantes é essencial para garantir analogia e a reprodução dos resultados entre diversos contextos produtivos. A ausência de protocolos uniformes tem sido uma limitação à integração nas práticas agrícolas já estabelecidas (Khoulati et al., 2025). A metodologia proposta no âmbito do projeto BFREE procura colmatar esta lacuna, estabelecendo um modelo de ensaio replicável e adaptável a distintas culturas e condições de cultivo, promovendo assim práticas agrícolas mais sustentáveis. Contudo, embora os ensaios em contexto comercial representem uma abordagem mais realista, estes acarretam uma variabilidade de fatores que pode afetar a consistência dos resultados e limitar a identificação de efeitos do bioestimulante. Por exemplo, a logística da empresa ao nível da aplicação dos tratamentos fitossanitários (ex. uso de turbinas, e conseqüente deriva, que dificulta a distribuição aleatória dos tratamentos), a pressão fitossanitária de outras pragas e doenças de origem não-fúngica (ex: bacteriana ou viral, que obrigam a tratamentos frequentes que podem interagir com o produto em estudo), as condições edafoclimáticas variáveis de ensaio para ensaio e a própria logística da colheita (ex. colheitas diárias no pico de colheita que exigem um registo frequente dos valores obtidos para os tratamentos em estudo).

Trabalho futuro, para complementar os resultados obtidos, poderá incluir a repetição dos ensaios abrangendo diferentes anos - já que as condições climáticas impactam a incidência das doenças e a necessidade de suplementação com fungicidas. A realização destes ensaios à escala nacional e para vários produtos hortícolas é uma enorme mais-valia deste projeto por permitir a avaliação de bioestimulantes em condições comerciais variadas em termos de culturas/sistemas de produção/práticas agrícolas e condições edafoclimáticas, contribuindo para a redução do uso de fungicidas e para a transição ecológica do setor hortofrutícola em Portugal.

Conclusões

A definição de uma metodologia uniforme para práticas biológicas é fundamental, pois assegura coerência, eficiência e segurança na aplicação de produtos biológicos em diferentes sistemas produtivos. O presente artigo metodológico descreve o protocolo seguido pelos parceiros do projeto BFREE na aplicação do bioestimulante BFREE, destinado à prevenção de doenças fúngicas em pequenos frutos e legumes em contextos de produção comercial. A adoção e validação deste protocolo, por parte dos produtores, em diferentes condições de cultivo irão seguramente contribuir para a promoção da integração de bioestimulantes microbianos na gestão das doenças, contribuindo para a sustentabilidade do setor e para a redução dos resíduos químicos nos produtos hortofrutícolas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento do Projeto I&D ‘BFREE: Biocontrolo de Frutos e de IEgumEs’ (Ref. PRR-C05-i03-I-000082-LA6.2) cofinanciado pelo PRR-IFAP – Agenda de Investigação e Inovação para a sustentabilidade da agricultura, alimentação e agroindústria, PROJETOS I&D+I, Territórios Sustentáveis. Agradecem ainda ao ‘GreenUPorto - Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável’, cofinanciado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através dos programas estratégicos UID/05748/2025 e UID/PRR/05748/2025. DOI <https://doi.org/10.54499/UID/05748/2025> e <https://doi.org/10.54499/UID/PRR/05748/2025>. Tânia Fernandes agradece ao CEEC Institucional do Laboratório Associado Inov4Agro cofinanciado pela FCT (<https://doi.org/10.54499/CEECINSTLA/00037/2022/CP2992/CT0001>).

Referências Bibliográficas

- Agroportal. (2025). Exportações de frutas, legumes e flores já valem 2,5 mil milhões de euros, o valor mais alto de sempre.
- Ansari, M., Devi, B. M., Sarkar, A., Chattopadhyay, A., Satnami, L., Balu, P., Choudhary, M., Shahid, M. A., & Jailani, A. A. K. (2023). Microbial Exudates as Biostimulants: Role in Plant Growth Promotion and Stress Mitigation. *Journal of Xenobiotics* 2023, Vol. 13, Pages 572-603, 13(4), 572–603. <https://doi.org/10.3390/JOX13040037>
- Bernardo, M., Fontes, J., & Almeida, D. P. F. (2019). Último quilómetro da pós-colheita: causas de perdas de frutos e batata em condições de loja simuladas.
- Cardoso, S. (2020). A horticultura protegida representa inúmeras vantagens para os produtores. *Agrotec*, 37:22–25.
- Coelho, P. S., Naves, P., & Carranca, C. (2024). Use of Traps to Monitor the Tomato Leaf Miner Moth Attack in a West Portugal Greenhouse. *Agri Res & Tech: Open Access J*, 28(4). <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2024.28.556420>

- El-Gendi, H., Al-Askar, A. A., Király, L., Samy, M. A., Moawad, H., & Abdelkhalek, A. (2022). Foliar Applications of *Bacillus subtilis* HA1 Culture Filtrate Enhance Tomato Growth and Induce Systemic Resistance against Tobacco mosaic virus Infection. *Horticulturae* 2022, Vol. 8, Page 301, 8(4), 301. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8040301>
- European Commission. (2024). *Farm to Fork: New rules to reduce the risk and use of pesticides in the EU*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda_22_3694
- Eurostat. (2023). *Agri-environmental indicator – consumption of pesticides*. Eurostat.
- Huang, X., Ren, J., Li, P., Feng, S., Dong, P., & Ren, M. (2021). Potential of microbial endophytes to enhance the resistance to postharvest diseases of fruit and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1744–1757. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10829>
- INE. (2020). Instituto Nacional de Estatística.
- INE. (2023). Instituto Nacional de Estatística.
- Khoulati, A., Ouahhoud, S., Taibi, M., Said Ezrari, ., Mamri, S., Merah, . Othmane, Hakkou, . Abdelkader, Addi, M., Maleb, . Adil, & Saalaoui, E. (2025). Harnessing biostimulants for sustainable agriculture: innovations, challenges, and future prospects. *Discover Agriculture 2025 3:1*, 3(1), 1–28. <https://doi.org/10.1007/S44279-025-00177-9>
- Li, J., Van Gerrewey, T., & Geelen, D. (2022). A Meta-Analysis of Biostimulant Yield Effectiveness in Field Trials. *Frontiers in Plant Science*, 13, 836702. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.836702/BIBTEX>
- Lucini, L. (2022). *EIP-AGRI*. <https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/news/inspirational-ideas-biostimulants-sustainable.html>
- Morcillo, R. J. L., Baroja-Fernández, E., López-Serrano, L., Leal-López, J., Muñoz, F. J., Bahaji, A., Férez-Gómez, A., & Pozueta-Romero, J. (2022). Cell-free microbial culture filtrates as candidate biostimulants to enhance plant growth and yield and activate soil- and plant-associated beneficial microbiota. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1040515. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1040515>
- Nunes, A., Trindade, cãndida, Palha, M., Brás De Oliveira, P., & Valdiviesso, T. (2022). Tecnologias de Produção de Pequenos Frutos para Produção Fora de Época. 978-972-579-061–8 (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.)).
- Oliveira, A. G. (2023). Produção de Pequenos Frutos quase duplica em quatro anos. Grande Plano- Frutas, Legumes e Flores.
- Rodrigues, F., Tenore, G. C., Gonçalves, J., Anjos, O., & Guiné, R. P. F. (2025). A Revisit of Plant Food Waste Along Food Supply Chains: Impacts and Perspectives. *Foods* 2025, Vol. 14, Page 1364, 14(8), 1364. <https://doi.org/10.3390/FOODS14081364>
- Rouphael, Y., Spíchal, L., Panzarová, K., Casa, R., & Colla, G. (2018). High-throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or from field to lab? *Frontiers in Plant Science*, 9, 408288. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01197/BIBTEX>
- Simões, A., Veloso, A., Mateus, C., Diogo, E., Calha, I., Carlos Franco, J., Santos, M., Da, M., Palha, G., De Lurdes Inácio, M., Cavaco, M., Brás De Oliveira, P., Jordão, P., Naves, P., & Oliveira, P. (2023). *Guia técnico de proteção de proteção integrada dos pequenos frutos- Parte I*.

- Stridh, L. J., Mostafanezhad, H., Andersen, C. B., Odilbekov, F., Grenville-Briggs, L., Lankinen, Å., & Liljeroth, E. (2022). Reduced efficacy of biocontrol agents and plant resistance inducers against potato early blight from greenhouse to field. *Journal of Plant Diseases and Protection* 2022 129:4, 129(4), 923–938. <https://doi.org/10.1007/S41348-022-00633-4>
- Xu, X., Chen, Y., Li, B., Zhang, Z., Qin, G., Chen, T., & Tian, S. (2022). Molecular mechanisms underlying multi-level defense responses of horticultural crops to fungal pathogens. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/HR/UHAC066>
- Zou, Z., Zhu, X., & Gyawali, S. (2022). Editorial: Horticultural crops: Interaction with fungal community. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1096201. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1096201/BIBTEX>

Quadros e Figuras

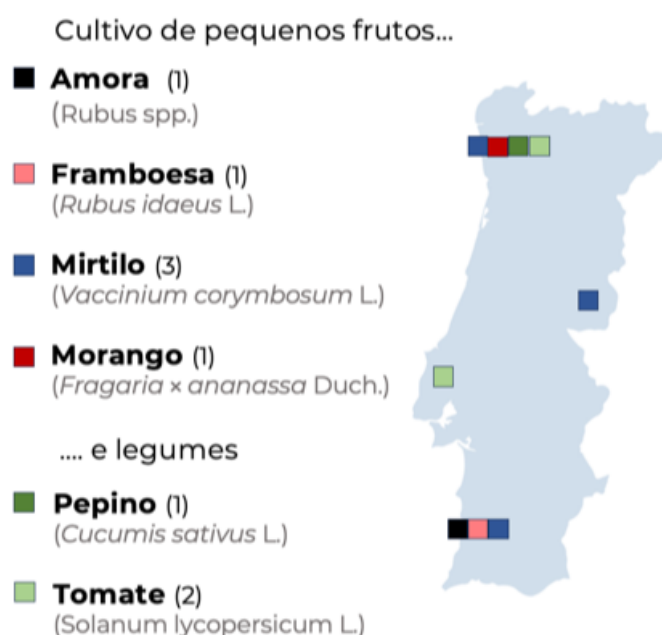


Figura 1 - Representação da cobertura geográfica nacional (Norte, Centro, Oeste e Vale do Tejo e Alentejo) das explorações onde os ensaios em pequenos frutos e legumes estão a decorrer, no âmbito do projeto BFREE.

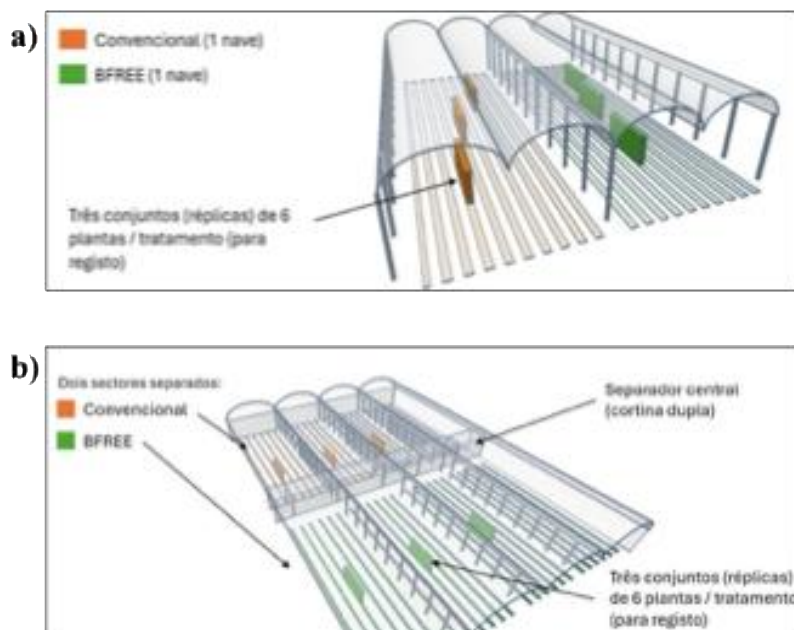


Figura 2 - Esquema da distribuição dos tratamentos (convencional e BFREE) e das réplicas no ensaio em (a) morangueiro (cv. ‘Royal Royce’), no parceiro Miguel Mesquita & Hugo Seca (Póvoa de Varzim), e em (b) tomate cereja (cv. ‘Santa Rita’), na empresa HT&HF (Torres Vedras).

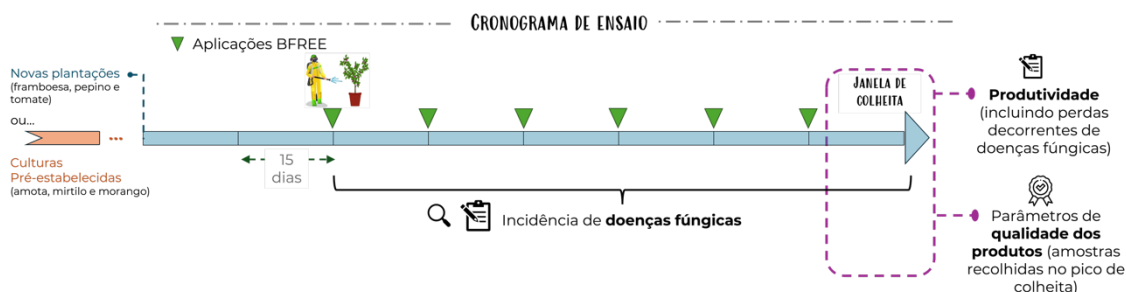


Figura 3 - Cronograma das aplicações foliares do bioestimulante BFREE ao longo do ciclo cultural. As setas verdes indicam aplicações quinzenais do tratamento BFREE, iniciadas 30 dias após a plantação ou conforme o calendário da cultura, no caso de culturas pré-estabelecidas. A colheita ocorre na “Janela de Colheita”, com registo da produção comercializável e perdas de produção, e recolha de amostras de frutos e legumes para posteriores análises da qualidade dos produtos.

Aplicação de exsudados de leveduras endofíticas como uma estratégia sustentável para o controlo de doenças fúngicas em morangueiro

Andreia Garrido, Tânia R. Fernandes, Inês Moura, Miguel G. Santos, Pedro R.P. Lourenço, Susana M.P. Carvalho

GreenUPorto - Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável/Inov4Agro, DGAOT, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua da Agrária 747, 4485-646 Vairão.

Resumo

A aplicação de bioestimulantes como estratégia sustentável para o controlo de doenças tem vindo a aumentar. No entanto, é fundamental aprofundar o conhecimento sobre a sua eficácia, compreender o modo de ação e avaliar o impacto na produtividade e qualidade dos produtos. O projeto BFREE visa explorar a aplicação de leveduras endofíticas no setor hortícola, como medida preventiva no controlo de doenças fúngicas. Num primeiro ensaio, foi analisado o efeito da aplicação de 13 formulações (provenientes de três leveduras aplicadas sob a forma de células vivas, exsudados ou extratos - às folhas ou folhas e raízes no caso dos exsudados), no controlo da podridão cinzenta em morangueiro (cv. 'San Andreas'). As formulações foram aplicadas quinzenalmente a plantas cultivadas em sistema semi-hidropónico em estufa. Após três aplicações foliares do exsudado B, observou-se uma redução significativa de 56% da área de lesão causada por *B. cinerea* (infecção *in vivo*) em folhas destacadas, comparativamente ao controlo. Num segundo ensaio, os exsudados B e C (formulações mais promissoras no Ensaio 1) foram aplicados, de forma individual e combinada, a três cultivares de morangueiro ('Felicity', 'Fortuna' e 'Leticia'). A aplicação combinada dos exsudados reduziu significativamente a incidência de oídio em folhas de 'Felicity' (89%) e 'Fortuna' (97%), comparativamente a plantas não tratadas. Paralelamente, a aplicação dos exsudados B e C, de forma individual ou combinada, promoveu um aumento significativo (entre 120 a 155%) na produtividade da cultivar 'Felicity', em comparação com plantas não tratadas, sendo que estes não afetaram a qualidade dos frutos. De forma geral, este estudo revelou um elevado potencial deste bioestimulante no controlo de doenças fúngicas. De modo a validar o mesmo, estão a decorrer 10 ensaios em condições comerciais, onde os exsudados B e C estão a ser aplicados de forma combinada a diferentes culturas hortofrutícolas.

Palavras-chave: Biocontrolo; bioestimulante; *Fragaria* × *ananassa*; podridão cinzenta; oídio.

Abstract

The application of biostimulants as a sustainable strategy for disease control has been increasing. However, it is essential to deepen the knowledge about their effectiveness, understand their mode of action, and evaluate their impact on productivity and product quality. The BFREE project aims to explore the application of endophytic yeasts in the horticultural sector as a preventive measure in the control of fungal diseases. In a first trial, the effect of applying 13 formulations (derived from three yeasts applied in the form of live cells, exudates, or extracts - to leaves or leaves and roots in the case of exudates) on the control of grey mould in strawberries (cv. 'San Andreas') was analyzed. The formulations were applied fortnightly to plants grown in a semi-hydroponic system in a greenhouse. After three foliar applications of exudate B, a significant 56%

reduction in the lesion area caused by *B. cinerea* (*in vivo* infection) was observed in detached leaves, compared to the control. In a second trial, exudates B and C (the most promising formulations in Trial 1) were applied individually and in combination to three strawberry cultivars ('Felicity', 'Fortuna', and 'Leticia'). The combined application of the exudates significantly reduced the incidence of powdery mildew on the leaves of 'Felicity' (89%) and 'Fortuna' (97%), compared to untreated plants. Simultaneously, the application of exudates B and C, individually or in combination, promoted a significant increase (between 120 and 155%) in the productivity of the 'Felicity' cultivar, compared to untreated plants, without affecting fruit quality. Overall, this study revealed a high potential for this biostimulant in controlling fungal diseases. In order to validate this, 10 trials are underway under commercial conditions, where exudates B and C are being applied in combination to different fruit and vegetable crops.

Keywords: Biocontrol; biostimulant; *Fragaria* × *ananassa*; grey mould; powdery mildew.

Introdução

Os pequenos frutos representam cerca de 4% da produção total de fruta fresca em Portugal, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística de 2020 (INE, 2020). A área dedicada ao cultivo dos pequenos frutos já ultrapassou os 5.000 hectares, aspeto que se reflete no volume de produção e na valorização económica da fileira (Ramos et al., 2023). Por exemplo, no período de 2017 a 2021, a produção de morango aumentou de 9.347 para 23.012 toneladas (Palha, 2020; Oliveira, 2023), contribuindo para a subida de 5% nas exportações de frutos vermelhos, verificada de 2021 para 2022 (Oliveira, 2023).

Ao longo do ciclo produtivo dos pequenos frutos, bem como durante o período de pós-colheita, as doenças fúngicas (ex.: podridão cinzenta, oídio, antracnose e ferrugem) representam uma das principais preocupações e desafios do sector. Estas são responsáveis por acentuadas perdas na produtividade e rejeição dos frutos (Almeida, 2018), traduzindo-se em impactos económicos e desperdícios alimentares consideráveis. Paralelamente, prevê-se que nos próximos anos os efeitos negativos das alterações climáticas contribuam para um agravamento das consequências dessas doenças (Williams et al., 2024). Para o controlo e a prevenção de doenças fúngicas recorre-se frequentemente à aplicação de fungicidas químicos de síntese, que apresentam efeitos nefastos para os ecossistemas e para a saúde humana (Simões et al., 2023). Por outro lado, têm emergido políticas internacionais que visam reduzir significativamente o uso de produtos fitofarmacêuticos na agricultura e ampliar a área dedicada a práticas agrícolas mais sustentáveis (p. ex.: modo de produção biológico) (União Europeia, 2020).

Perante este contexto, é de extrema importância e premência a adoção de estratégias eficazes e sustentáveis para mitigação de doenças fúngicas, sobretudo em cultivo protegido (p. ex: em estufa), onde a ocorrência tem tendência a acentuar-se, devido à dificuldade de arejamento. A aplicação de bioestimulantes tem surgido como uma alternativa promissora e sustentável às abordagens convencionais, nomeadamente devido ao efeito elicitor (indutor) dos mecanismos de defesa das culturas (Villavicencio-Vásquez et al., 2025). Porém, a falta de conhecimento acerca dos modos de ação dos bioestimulantes, e da interação com a planta e o ambiente, representam desafios à aplicação desta prática sustentável (Al Raish et al., 2025).

Desta forma, o projeto 'BFREE – Biocontrolo de FRutos e de lEGumEs' tem como objetivo central avaliar a eficácia da aplicação *in planta* de formulações de leveduras

endofíticas no controlo de doenças fúngicas em culturas de pequenos frutos e legumes. Em particular, o presente trabalho visa: (i) Ensaio 1 - avaliar a eficácia da aplicação de formulações de leveduras na tolerância à podridão cinzenta em morangueiros da cultivar ‘San Andreas’; (ii) Ensaio 2 - determinar a eficácia das formulações mais promissoras (selecionadas no Ensaio 1) em três cultivares de morangueiro de dias curtos (‘Felicity’, ‘Fortuna’ e ‘Leticia’) na tolerância a doenças fúngicas, assim como o impacto na produtividade e na qualidade dos frutos.

Material e Métodos

Formulações de leveduras endofíticas

Com base em ensaios preliminares foram selecionadas três espécies (doravante designadas por A, B e C) com ação antagonista contra *B. cinerea* (Esteves et al., 2023). Para cada levedura foram testadas três formulações: células vivas (suspensas em meio líquido), exsudados libertados pelas leveduras (substância líquida) e extratos (i.e., um pó obtido por liofilização da suspensão celular). Estas formulações foram fornecidas pela Proenol – Indústria Biotecnológica, S. A. (Gaia, Portugal), empresa parceira do projeto.

Condições de crescimento das plantas de morangueiro e aplicação dos tratamentos

As plantas de morangueiro com raiz nua (*Fragaria × ananassa* Duch.; cultivar ‘San Andreas’ – para Ensaio 1; cultivares ‘Felicity’, ‘Fortuna’ e ‘Leticia’ – para Ensaio 2) foram adquiridas num viveiro certificado (Viveros Campiñas, Espanha) e crescidas em sistema semi-hidropónico numa estufa de polietileno (*Campus* de Vairão da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 41°19'39.9"N; 8°40'34.5"W; 9,0 x 40,0 m). Foram plantados sete morangueiros por saco de cultivo (100 x 18 x 14 cm; 25,2 L), contendo uma mistura de turfa, fibra de coco e casca de pinheiro (SIRO®, pH 5,0-5,8, condutividade elétrica 100-150 $\mu\text{S cm}^{-1}$, granulometria 0-15 mm, matéria orgânica > 70%). As plantas foram irrigadas através de um sistema automatizado com uma solução nutritiva ajustada ao estado de desenvolvimento. Em ambos os ensaios e para cada tratamento, foram consideradas três réplicas biológicas (i.e., três sacos de substrato; n = 3), cada um contendo sete plantas, as quais foram distribuídas aleatoriamente na estufa.

Ensaio 1: realizou-se na primavera/verão de 2023, e foram considerados 14 tratamentos. Particularmente, foram aplicadas 3 leveduras (A, B, C) sob 3 formulações: células vivas, exsudados e extratos. Para os exsudados, foram ainda considerados dois modos de aplicação: foliar e radicular. Aquando da preparação destas soluções foi adicionado um agente aderente (1 mL L⁻¹) de modo a aumentar a aderência e capacidade molhante das substâncias na superfície das plantas. Deste modo, um grupo de plantas foi exclusivamente tratado com solução aquosa aderente (1 mL L⁻¹), correspondendo ao controlo (CT) do ensaio. Além disso, foi também considerado um grupo de plantas não tratadas (NT) com qualquer substância. As soluções de tratamento para a primeira aplicação foram preparadas de acordo com as diretrizes da Proenol. A primeira aplicação ocorreu dois meses após a plantação, pulverizando-se, com aspersor manual, toda a parte aérea das plantas (incluindo a superfície abaxial das folhas) até ao escorrimento. No caso das aplicações radiculares (i.e., com os exsudados), foram aplicados 10 mL por planta nas duas primeiras aplicações, e 20 mL nas restantes, recorrendo a uma seringa e distribuindo uniformemente o exsudado à volta de cada planta. As 10 aplicações foram realizadas quinzenalmente ao final da tarde.

Ensaio 2: decorreu no outono/inverno de 2024-2025, com três cultivares de dias curtos, tendo sido considerados os exsudados das leveduras B e C, os quais foram aplicados de forma individual e combinada por via foliar. Este ensaio consistiu em cinco

tratamentos: plantas não tratadas (NT), controlo (CT), exsudado B, exsudado C e a combinação de exsudados B e C (Exs B+C; em proporção 1:1). A primeira aplicação foliar dos exsudados foi realizada um mês após a plantação, seguindo-se uma periodicidade e metodologia de aplicação idênticas às descritas para o Ensaio 1.

Ensaio de infeção *in vivo* com *Botrytis cinerea*

Para a obtenção de esporos frescos de *B. cinerea*, a estirpe B05.10 foi crescida em meio *potato dextrose agar* (PDA) durante 10 dias (7 e 3 dias, no escuro e à luz, respetivamente) a 25 °C. Após esse período, foram recolhidos esporos e uma suspensão de esporos preparada em 50% (v/v) PDB foi ajustada a 1×10^7 esporos mL⁻¹.

Para a infeção *in vivo*, o material vegetal da cultivar ‘San Andreas’ — folíolos (em estados fenológicos idênticos) e frutos maduros (com tamanhos e estados de maturação semelhantes) — foi recolhido sete dias após a terceira e sexta aplicação dos tratamentos, respetivamente. Para cada tratamento, foram recolhidos 18 folíolos e 9 frutos de cada réplica biológica (n = 3). Os folíolos foram inoculados na superfície adaxial, enquanto que os frutos foram inoculados na zona equatorial, em ambas as situações com 10 µL de uma suspensão a 1×10^7 esporos mL⁻¹ de *B. cinerea* preparada em PDB a 50% (v/v). Folíolos e frutos não-infetados (condição *mock*) foram também incluídos neste ensaio, tendo-se procedido de forma idêntica, com aplicação de 10 µL de PDB a 50% (v/v) mas sem esporos. Após infeção, folíolos e frutos foram incubados em condições de escuridão, elevada humidade e à temperatura ambiente. Aos três e sete dias pós-inoculação (dpi), para folíolos e frutos, respetivamente, determinou-se, com recurso ao software ImageJ®, a área de lesão (cm²) causada por *B. cinerea*.

Avaliação da incidência de doenças fúngicas em estufa

No Ensaio 1, após término do ciclo vegetativo da cultivar ‘San Andreas’, e das dez aplicações dos tratamentos, observou-se incidência de podridão cinzenta nas plantas em estufa. Por essa razão, procedeu-se, apenas nesse momento (novembro 2023), à aplicação de um fungicida sintético (Luna Sensation®; 0,6 L ha⁻¹) no grupo de plantas inicialmente designadas de “não tratadas” (NT), passando este a ser designado como grupo de controlo químico (CQ). Na mesma data, as diferentes formulações das três leveduras (bem como a solução aderente) foram aplicadas de acordo com as indicações da Proenol. Após os tratamentos curativos, e ao longo de dez dias, foi registado de forma cumulativa, o número total de órgãos infetados (i.e., hastes florais, inflorescências e frutos verdes e maduros) com *B. cinerea*, por réplica biológica.

No início do Ensaio 2 — ou seja, em novembro de 2024 — foi observada incidência de oídio em folíolos das plantas das cultivares ‘Felicity’, ‘Fortuna’ e ‘Leticia’, numa altura em que estas já tinham sido pulverizadas duas vezes com os exsudados das leveduras B e C. Assim, nesse momento, foi determinada a percentagem de folíolos infetados por planta [(n.º folíolos infetados/n.º de folíolos totais na planta) × 100], para cada tratamento e cultivar (n = 3).

Determinação da produtividade total

O impacto dos exsudados das leveduras B e C na produtividade das três cultivares do Ensaio 2 foi avaliado através do registo do peso dos frutos maduros, realizado duas vezes por semana. Este registo foi efetuado entre a 6ª e a 21ª semana após a plantação, abrangendo desde o início da produção até à semana em que ocorreu a décima aplicação dos tratamentos. Os resultados da produtividade cumulativa foram expressos em peso total dos frutos (g) por planta.

Determinação de parâmetros de qualidade dos frutos

O efeito dos exsudados das leveduras B e C na concentração de sólidos solúveis totais e na acidez titulável foi avaliado em morangos maduros das três cultivares (Ensaio 2). Para tal, foram considerados pelo menos cinco frutos maduros por réplica (i.e., por saco de substrato; $n = 3$ cada com > 5 frutos). Devido às diferenças de desenvolvimento entre as cultivares, os frutos maduros foram colhidos durante o pico de produção em momentos distintos. Assim, para as cultivares ‘Felicity’ e ‘Fortuna’, a colheita decorreu durante os 14 dias seguintes à quarta aplicação dos tratamentos, enquanto que para a cultivar ‘Leticia’, a colheita foi realizada após a nona aplicação.

Os sólidos solúveis totais foram determinados pela medição do índice de refração utilizando um refractómetro (Hanna Hi96801) e os resultados foram expressos em graus Brix ($^{\circ}\text{Bx}$). A acidez titulável foi determinada com base no método de Muley et al. (2022), com pequenas modificações. Resumidamente, 20 mL de polpa de morango foram diluídas em 100 mL de água destilada. De seguida, a solução foi misturada num agitador com 150 μL de fenolftaleína (1% v/v). A titulação ocorreu adicionando hidróxido de sódio (NaOH; 0,1 N) até à mudança de cor da solução, sendo registado o volume adicionado. Os resultados foram representados em mg de ácido cítrico mL^{-1} .

Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM) de três réplicas biológicas ($n = 3$). Os resultados foram analisados estatisticamente através do software *GraphPad Prism* versão 5. A análise de variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*) foi utilizada para verificar o efeito dos tratamentos nas diferentes variáveis quantitativas. Após rejeição da hipótese nula por ANOVA ($p < 0,05$), as diferenças entre os grupos foram analisadas por comparações múltiplas através do teste *post hoc* de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussão

A aplicação foliar de exsudados das leveduras endofíticas aumentou a tolerância à podridão cinzenta

De forma geral, os folíolos destacados das plantas da cultivar ‘San Andreas’ (Ensaio 1), previamente tratadas três vezes com diferentes formulações de leveduras, apresentaram uma redução estatisticamente significativa na área de lesão causada por *B. cinerea* (infecção *in vivo*), em comparação com os folíolos da condição controlo (CT) (fig. 1a). Destaca-se, em particular, uma redução de 55,5% na área de lesão dos folíolos pulverizados com o exsudado da levedura B, relativamente à condição CT, demonstrando uma maior tolerância à podridão cinzenta induzida por este tratamento. Para além disso, a aplicação radicular dos exsudados, conduziu a uma redução significativa da área de lesão (30–40%) em folíolos destacados, em comparação com a condição CT (fig. 1a). No caso dos frutos maduros colhidos após a sexta aplicação, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, destaca-se que os exsudados das leveduras B e C, aplicados de forma foliar, conduziram a áreas de lesão inferiores em comparação com a condição CT (fig. 1b).

Ao contrário deste estudo, em que foi analisado o impacto da aplicação de leveduras com ação antagonista, sob diferentes formulações, durante o ciclo cultural, a maioria dos estudos tem avaliado a eficácia de leveduras na pós-colheita. Particularmente, estudos mais recentes têm avaliado o efeito da co-inoculação de leveduras (potencialmente agentes de biocontrolo) com agentes patogénicos na pós-colheita. Por exemplo, um estudo avaliou em morangos maduros da cultivar ‘Earliglow’ (ensaio *in*

vivo) o efeito da co-inoculação de três estirpes de *B. cinerea* (B05.10, IWBT-FF1 e PPRI 30807) com três inóculos de leveduras (*Suhomyces pyralidae*, *Aureobasidium melanogenum* e *Pichia kluyveri*), ou com um fungicida sintético (Captan). Os autores verificaram uma inibição praticamente total do crescimento de *B. cinerea* — por exemplo, para *S. pyralidae* co-inoculada com qualquer estirpe de *B. cinerea*, e para *P. kluyveri* com a estirpe IWBT-FF1 — valores equiparáveis aos obtidos com o fungicida químico Captan (Gomomo et al., 2025). Os autores atribuíram ainda a atividade antifúngica à libertação de compostos voláteis, como o 2-feniletanol e o acetato de isoamila (Gomomo et al., 2025). De forma semelhante, Qin et al. (2017), num ensaio *in vivo* de pós-colheita com morangos maduros da cultivar ‘Hong Yan’, inoculados com esporos de *B. cinerea* e colocados no interior de um dessecador com placas abertas contendo a levedura *Hanseniaspora uvarum*, observaram, ao fim de três dias de incubação, uma redução no crescimento do agente patogénico, bem como no índice de deterioração e na perda de peso dos frutos.

Relativamente à incidência de podridão cinzenta em estufa (*in planta*) observou-se que o exsudado da levedura C, aplicado de forma foliar, reduziu o número de órgãos infetados por *B. cinerea* para valores próximos aos registados no grupo CQ (fig. 2), embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

De um modo geral, os resultados do Ensaio 1 revelaram que a aplicação foliar dos exsudados B e C promoveu uma maior tolerância à podridão cinzenta em morangueiro. Importa ressaltar que, dada a aplicação ter sido efetuada durante o ciclo cultural, as respostas observadas poderão, pelo menos em parte, dever-se a uma ação indireta destes exsudados sob os mecanismos de defesa das plantas, potenciando os mesmos para uma resposta mais rápida e/ou eficaz aquando da presença do agente patogénico. No entanto, são necessários ainda estudos de validação e compreensão destes mecanismos.

A aplicação dos exsudados das leveduras B e C reduziu a incidência de oídio e promoveu a produtividade sem comprometer a qualidade dos frutos

Após duas aplicações dos exsudados das leveduras B e C (de forma individual ou combinada) nas cultivares ‘Felicity’, ‘Fortuna’ e ‘Leticia’, observou-se incidência de oídio em estufa. Após contagem dos folíolos infetados, verificou-se que a aplicação combinada dos exsudados B e C (Exs B+C) reduziu significativamente a incidência de oídio nas folhas das cultivares ‘Felicity’ (88,6%) e ‘Fortuna’ (96,8%), em comparação com as plantas não tratadas (NT; fig. 3a,b). Um resultado semelhante foi registado para a cultivar ‘Leticia’ (94,7%), apesar dos tratamentos não serem estatisticamente diferentes entre si (fig. 3c). Além disso, o exsudado C reduziu significativamente a incidência da doença nas folhas de ‘Felicity’ (79,5%) e de ‘Fortuna’ (54,3%), comparativamente a plantas não tratadas (NT; fig. 3a,b). O exsudado B revelou-se eficaz na redução significativa (89,9%) da incidência de oídio em folhas de ‘Fortuna’, em comparação com as folhas do grupo NT.

A análise da produtividade durante o período de aplicação dos tratamentos (21 semanas) revelou diferenças entre as três cultivares (fig. 4), tendo-se verificado que a cultivar ‘Leticia’ apresentou uma produtividade mais elevada ($105,8 \pm 20,6$ g/planta) em comparação ‘Felicity’ (85 ± 16 g/planta) e ‘Fortuna’ ($55,1 \pm 14,2$ g/planta). Verificou-se, ainda, que a aplicação dos exsudados B e C, de forma individual ou combinada, aumentou significativamente (120 a 155%) a produtividade na cultivar ‘Felicity’, após seis aplicações, em comparação com as plantas não tratadas (fig. 4a). Um aumento significativo na produtividade (67,7%) foi também registado após dez aplicações de cada

um dos exsudados B e C (fig. 4a). Nas plantas da cultivar ‘Fortuna’, a aplicação dos exsudados não afetou significativamente a produtividade (fig. 4b). De forma semelhante, a cultivar ‘Leticia’ não apresentou diferenças significativas na produtividade entre os tratamentos após seis aplicações dos exsudados (fig. 4c). No entanto, após 10 aplicações, as plantas de ‘Leticia’ tratadas com Exs B+C apresentaram uma produtividade significativamente menor (82,6 g/planta; redução de 37,8%) em comparação com as plantas tratadas apenas com o exsudado C (132,8 g/planta) (fig. 4c). Apesar disso, a produtividade registada nessas duas condições não foi estatisticamente diferente da registada nas plantas não tratadas e no controlo. Importa ressaltar que este efeito poderá estar relacionado com o número de aplicações dos tratamentos, uma vez que a utilização de bioestimulantes, ao potenciar os mecanismos de defesa da planta, poderá comprometer, pelo menos em parte, o crescimento e, conseqüentemente, a produtividade das mesmas. Com o intuito de mitigar este impacto em estudos posteriores, foi definido que, nos ensaios atualmente em curso com produtores de hortícolas, sejam realizadas apenas seis aplicações do tratamento, uma vez que até essa fase não se registaram impactos negativos na produtividade.

Os parâmetros de qualidade dos frutos maduros tais como pH, calibre, cor, textura e condutividade elétrica, avaliados após a quarta aplicação para as cultivares ‘Felicity’ e ‘Fortuna’, e após a nona aplicação para a cultivar ‘Leticia’, não foram, de modo geral, significativamente afetados pela aplicação dos exsudados B e C (dados não apresentados). De forma semelhante, o grau Brix dos frutos não foi negativamente impactado (fig. 5a,b,c). No entanto, a acidez titulável dos morangos provenientes da condição controlo e dos tratamentos com os exsudados foi significativamente menor (25,5%) em comparação com a acidez dos morangos das plantas não tratadas. Este resultado sugere que a aplicação combinada dos exsudados B e C pode acelerar a degradação dos ácidos orgânicos e a sua conversão em açúcares, modulando assim a fisiologia metabólica dos frutos. Estudos prévios com bioestimulantes (Aljawasim et al., 2024; Zydlik et al., 2024), evidenciam os seus efeitos positivos na qualidade dos frutos na fase de pós-colheita.

Conclusões

Os resultados obtidos até à data no âmbito do Projeto BFREE demonstram que a aplicação foliar, ao longo do ciclo cultural, dos exsudados das leveduras endofíticas B e C apresenta potencial como bioestimulante no controlo de doenças fúngicas (como a podridão cinzenta e o oídio). Estes resultados podem ser atribuídos a mecanismos de ação indireta dos exsudados sobre os agentes patogénicos, nomeadamente o reforço da capacidade de resposta do sistema antioxidante das plantas de morangueiro. Além disso, a combinação destes exsudados revelou um efeito mais promissor do que os exsudados individuais, que as leveduras vivas que os originaram e até mesmo do que os extratos obtidos a partir desses microrganismos. Isto sugere a presença de moléculas bioactivas (ex: metabolitos especializados) nos exsudados das leveduras B e C com capacidade para estimular o sistema imunitário das plantas contra os agentes patogénicos em estudo. No entanto, os nossos resultados revelaram que a eficácia destes tratamentos poderá estar dependente do genótipo de morangueiro. Importa destacar que a aplicação dos exsudados não teve impacto negativo na qualidade dos morangos. Relativamente à produtividade, observaram-se efeitos significativamente positivos em duas das três cultivares de dias curtos avaliadas. Assim, torna-se necessário realizar novos ensaios com vista à otimização das condições de aplicação, em especial quanto à frequência, tendo em conta as especificidades de cada cultura e cultivar. Será também necessário identificar as

moléculas envolvidas no efeito bioestimulante, assim como os modos de ação na planta e/ou nos patógenos.

Em suma, os resultados obtidos nestes dois ensaios — conduzidos em épocas sazonais distintas e com diferentes cultivares de morangueiro — fornecem informações relevantes sobre a eficácia do bioestimulante em desenvolvimento, à base de derivados de leveduras. Para estender a validação destes resultados a outras condições experimentais, estão a decorrer, no âmbito deste projeto, 10 ensaios em explorações agrícolas distribuídas de norte a sul do país. Neles, pretende-se avaliar o desempenho da aplicação combinada dos exsudados B e C em comparação com tratamentos convencionais baseados em fungicidas químicos de síntese, abrangendo diferentes culturas de pequenos frutos e legumes.

Agradecimentos

Projeto I&D ‘BFREE: Biocontrolo de Frutos e de IEgumEs’ (Ref. PRR-C05-i03-I-000082-LA6.2) cofinanciado pelo PRR-IFAP – Agenda de Investigação e Inovação para a sustentabilidade da agricultura, alimentação e agroindústria, PROJETOS I&D+I, Territórios Sustentáveis. Unidade de I&D ‘GreenUPorto - Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável’ cofinanciada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do Programa Plurianual de Financiamento UID 05748. CEEC Institucional do Laboratório Associado Inov4Agro cofinanciado pela FCT atribuído a Tânia Fernandes (<https://doi.org/10.54499/CEECINSTLA/00037/2022/CP2992/CT0001>).

Referências Bibliográficas

- Al Raish, S. M., Sourani, O. M., & Abu-Elsaoud, A. M. (2025). Plant Growth-Promoting Microorganisms as Biocontrol Agents: Mechanisms, Challenges, and Future Prospects. *Applied Microbiology*, 5(2), 44. <https://doi.org/10.3390/APPLMICROBIOL5020044>
- Aljawasim, B. D., Richardson, P., Pilot, G., & Samtani, J. B. (2024). Minimal impact from biostimulant product use on strawberry crop yield and postharvest strawberry quality. *Southern Region Small Fruit Consortium*. <https://smallfruits.org/2024/10/minimal-impact-from-biostimulant-product-use-on-strawberry-crop-yield-and-postharvest-strawberry-quality/>
- Almeida, D. P. F. (2018). Pequenos frutos com grandes problemas: recomendações para a qualidade na cadeia de abastecimento. *Actas Portuguesas de Horticultura Nº 26. Sessão III - Qualidade e Pós-Colheita*.
- Esteves, M., Lage, P., Sousa, J., Centeno, F., de Fátima Teixeira, M., Tenreiro, R., & Mendes-Ferreira, A. (2023). Biocontrol potential of wine yeasts against four grape phytopathogenic fungi disclosed by time-course monitoring of inhibitory activities. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1146065. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1146065/BIBTEX>
- Gomomo, Z., Fanadzo, M., Mewa-Ngongang, M., Chidi, B. S., Hoff, J. W., Rijst, M. van der, Mokwena, L., Setati, M. E., & du Plessis, H. W. (2025). The Use of Specific Non-*Saccharomyces* Yeasts as Sustainable Biocontrol Solutions Against *Botrytis cinerea* on Apples and Strawberries. *Journal of Fungi*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.3390/JOF11010026>
- INE. (2020). *Instituto Nacional de Estatística*.

- Muley, A. B., Kedia, P., Pegu, K., Kausley, S. B., & Rai, B. (2022). Analyzing the physical and biochemical changes in strawberries during storage at different temperatures and the development of kinetic models. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *16*(1), 222–247. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01146-8>
- Oliveira, A. (2023). Produção de pequenos frutos quase duplica em quatro anos. *Frutas, Legumes e Flores*.
- Palha, M. G. (2020). Apostar na competitividade e na sustentabilidade do morango em Portugal. *AGROTEC*.
- Qin, X., Xiao, H., Cheng, X., Zhou, H., & Si, L. (2017). *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. *Food Microbiology*, *63*, 205–212. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2016.11.005>
- Ramos, A. C., Moldão, M., Alves, V., & Abreu, M. (2023). Pequenos frutos: pilares nutricionais e motores de desenvolvimento sustentável em Portugal. *Vida Rural*.
- Simões, A. M., Veloso, A., Mateus, C., Diogo, E., Calha, I., Franco, J. C., Santos, M., Palha, M. da G., Inácio, M. de L., Cavaco, M., Oliveira, P. B. de, Jordão, P., & Naves, P. (2023). *Guia Técnico de Proteção Integrada dos Pequenos Frutos – Parte I (Amora, Framboesa, Morango e Mirtilo)*. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
- União Europeia. (2020). Moving towards a more healthy and sustainable EU food system, a corner stone of the European Green Deal. *From Farm to Fork: Our Food, Our Health, Our Planet, Our Future*. <https://doi.org/10.2875/653604>
- Villavicencio-Vásquez, M., Espinoza-Lozano, F., Espinoza-Lozano, L., & Coronel-León, J. (2025). Biological control agents: mechanisms of action, selection, formulation and challenges in agriculture. *Frontiers in Agronomy*, *7*, 1578915. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2025.1578915/XML>
- Williams, S. L., Toda, M., Chiller, T., Brunkard, J. M., & Litvintseva, A. P. (2024). Effects of climate change on fungal infections. *PLOS Pathogens*, *20*(5), e1012219. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1012219>
- Zydlik, P., Zydlik, Z., & Kafkas, N. E. (2024). The Effect of the Foliar Application of Biostimulants in a Strawberry Field Plantation on the Yield and Quality of Fruit, and on the Content of Health-Beneficial Substances. *Agronomy*, *14*(8), 1786. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY14081786>

Quadros e Figuras

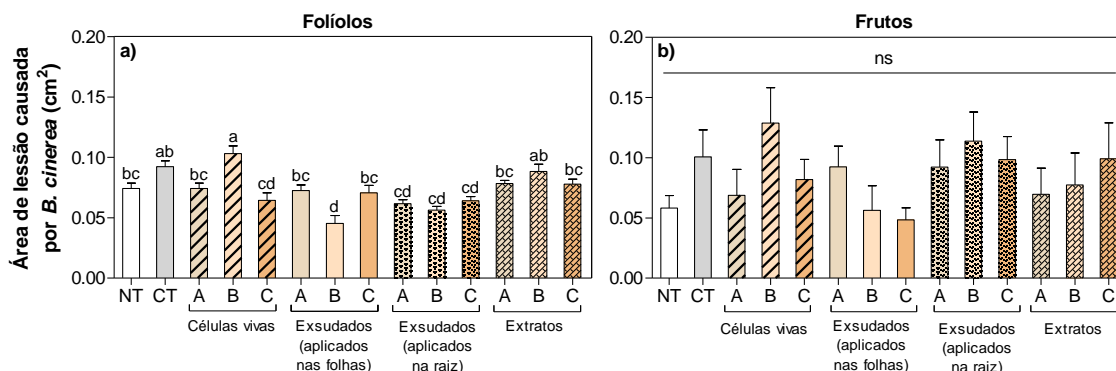


Figura 1 - Área de lesão (cm²) causada por *B. cinerea* através de um ensaio de infecção *in vivo* utilizando folíolos (a) e frutos maduros (b) destacados da cultivar ‘San Andreas’ (Ensaio 1). Os folíolos e frutos foram recolhidos sete dias após a terceira e a sexta aplicação dos tratamentos, respetivamente. Para cada tratamento (NT – plantas não tratadas; CT – controlo; células vivas, exsudados e extractos das leveduras A, B e C; os exsudados foram aplicados tanto ao nível da folha como da raiz) os dados representam a média \pm EPM de três réplicas biológicas (n = 3). Análise estatística efetuada pelo teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Nos casos em que o teste foi significativo, as comparações múltiplas entre tratamentos foram realizadas com base no teste *post hoc* de Tukey. Letras distintas no topo das barras representam diferenças significativas entre os tratamentos; ns - diferenças não significativas.

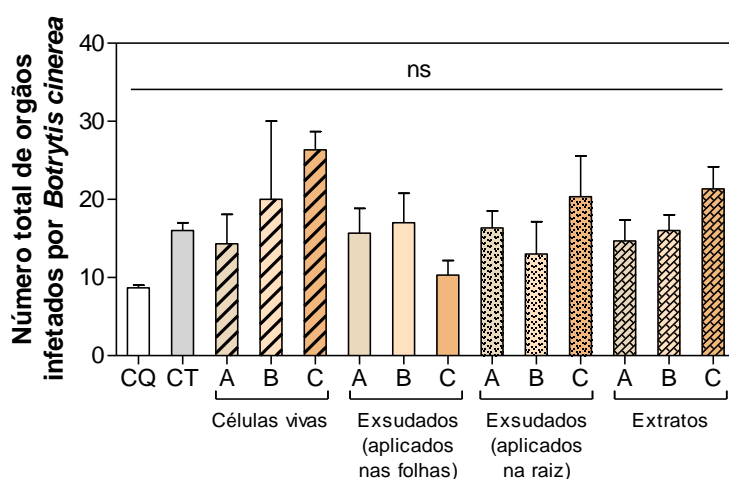


Figura 2 - Incidência de podridão cinzenta avaliada através do número total (valor cumulativo) de órgãos (hastes, inflorescências e frutos verdes e maduros) infetados por *B. cinerea* em plantas da cultivar ‘San Andreas’ (Ensaio 1) mantidas em estufa. A contagem foi realizada ao longo de 10 dias após a aplicação do fungicida sintético Luna Sensation[®] (início de novembro de 2023) nas plantas previamente não tratadas, passando este grupo a ser designado como controlo químico (CQ). Os dados representam a média \pm EPM de três réplicas biológicas (n = 3). Análise estatística efetuada pelo teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Notação estatística: ns - diferenças não significativas.

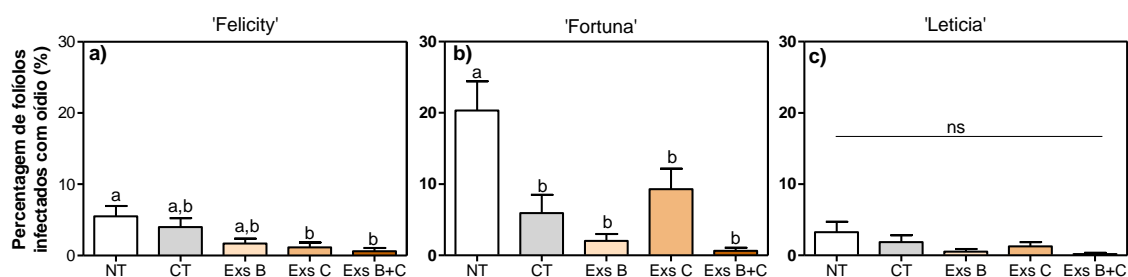


Figura 3 - Incidência de oídio (*P. aphanis*) avaliada através da percentagem de folíolos infectados nas cultivares 'Felicity' (a), 'Fortuna' (b) e 'Leticia' (c) - Ensaio 2. Esta avaliação foi realizada dois dias após a segunda aplicação dos exsudados e considerando os cinco tratamentos (i.e., NT – plantas não tratadas; CT – controlo; ExsB – exsudado da levedura B; ExsC – exsudado da levedura C; ExsB+C – exsudados das leveduras B e C). Os dados representam a média \pm EPM de três réplicas biológicas ($n = 3$). Análise estatística efetuada pelo teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Nos casos em que o teste foi significativo, as comparações múltiplas entre tratamentos foram realizadas com base no teste *post hoc* de Tukey. Letras distintas no topo das barras representam diferenças significativas entre os tratamentos; ns - diferenças não significativas.

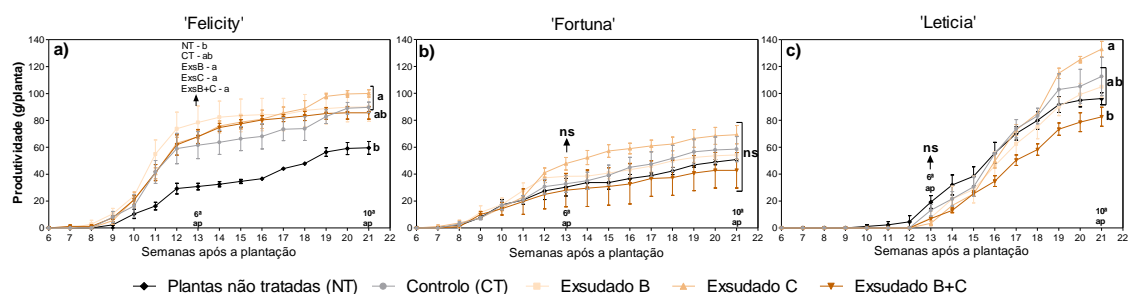


Figura 4 - Produtividade cumulativa (g/planta) das cultivares 'Felicity' (a), 'Fortuna' (b) e 'Leticia' (c) nos diferentes tratamentos (i.e., NT – plantas não tratadas; CT – controlo; exsudado B; exsudado C; e exsudado B+C) - Ensaio 2. O peso total dos frutos maduros foi registado desde a sexta até à vigésima primeira semana após a plantação. A sexta e a décima aplicação dos exsudados foram efetuadas na semana treze e vinte e uma, respetivamente. Os dados representam a média \pm EPM de três réplicas biológicas ($n = 3$). Análise estatística (para a semana seis e vinte e uma) efetuada pelo teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Nos casos em que o teste foi significativo, as comparações múltiplas entre tratamentos foram realizadas com base no teste *post hoc* de Tukey. Letras distintas no topo das barras representam diferenças significativas entre os tratamentos; ns - diferenças não significativas.

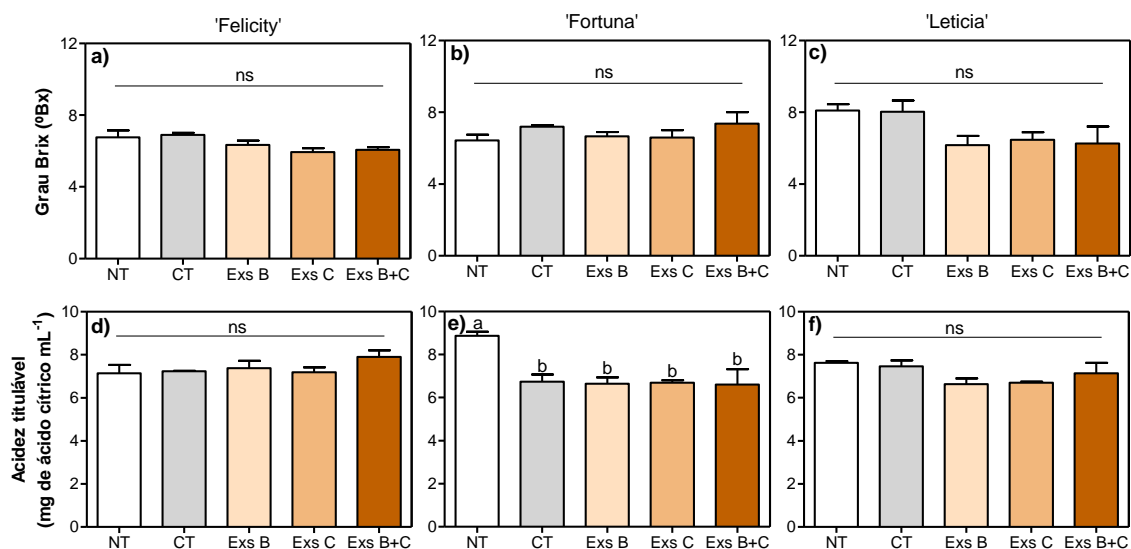


Figura 5 - Grau Brix (°Bx) e acidez titulável (mg de ácido cítrico mL⁻¹) avaliados em morangos maduros colhidos após a quarta aplicação dos tratamentos, das cultivares 'Felicity' (a, d) e 'Fortuna' (b, e), e após a nona aplicação da cultivar 'Leticia' (c, f) - Ensaio 2. Os frutos foram colhidos dos diferentes tratamentos (NT – plantas não tratadas; CT – controlo; ExsB – exsudado da levedura B; ExsC – exsudado da levedura C; ExsB+C – exsudados das leveduras B e C). Os dados representam a média ± EPM de três réplicas biológicas (n = 3). Análise estatística efetuada pelo teste *one-way* ANOVA ($p \leq 0,05$). Nos casos em que o teste foi significativo (e), as comparações múltiplas entre tratamentos foram realizadas com base no teste *post hoc* de Tukey. Letras distintas no topo das barras representam diferenças significativas entre os tratamentos; ns - diferenças não significativas.



Sessão IV

Qualidade e benefícios para a saúde

Avaliação exploratória dos voláteis de partes aéreas em floração de *Corema album*

João Jacinto^{1,2}; Cristina Máguas¹; Carla Alegria¹; Ana Rita Varela^{2,3}; Mari Cruz Díaz-Barradas⁴; Ana Cristina Figueiredo¹

¹CE3C – Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, DBV, 1749-016 Lisboa, Portugal;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal;

³MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal;

⁴Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Espanha.

Resumo

A *Corema album* (L.) D. Don, vulgarmente conhecida como camarinha, é uma espécie arbustiva dióica da família Ericaceae, endémica da Península Ibérica, que tem despertado interesse devido às suas propriedades bioativas. Embora vários estudos tenham abordado o seu perfil fenólico e atividade antioxidante, o conhecimento sobre os seus compostos voláteis permanece escasso. O presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação exploratória do perfil de compostos voláteis das partes aéreas em floração (folhas e flores) de 5 indivíduos masculinos e 5 femininos de *C. album*, colhidas da zona da Comporta, durante o inverno (início de março). Os voláteis foram isolados por hidrodestilação, e analisados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), para sua identificação e quantificação, respetivamente. A composição percentual dos voláteis foi utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras, por análise aglomerativa em grupos (*cluster*). A fração volátil, de coloração esbranquiçada e consistência viscosa, foi obtida com um rendimento $\leq 0,05\%$ (v/p.f.). A análise química permitiu identificar 75 compostos, totalizando entre 69% e 84% de identificação. O 1-fenil-1,3-butadieno dominou em todas as amostras, variando entre 20 e 49%, do total dos voláteis. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre sexos para nove compostos, e os perfis voláteis permitiram alguma segregação por género através de análise de clusters. Estes resultados representam um contributo pioneiro para o conhecimento da ecologia química e do potencial bioativo de *C. album*. A utilização de GC-FID e GC-MS revelou-se eficaz na caracterização detalhada da composição volátil da espécie. Estudos adicionais com amostragens sazonais e geográficas poderão reforçar o valor económico e ecológico desta planta para aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética e agroalimentar.

Palavras-chave: Camarinha; hidrodestilação; cromatografia gasosa; voláteis

Abstract

Corema album (L.) D. Don, commonly referred to as white crowsberry is a dioecious shrub species of the Ericaceae family, endemic to the Iberian Peninsula, which has gained attention due to its bioactive properties. While several studies have investigated its phenolic profile and antioxidant capacity, knowledge regarding its volatile constituents remains limited. The present study aimed to explore the volatile

profile of flowering aerial parts (leaves and flowers) from five male and five female individuals of *C. album*, collected in the Comporta region during winter (early March). Volatiles were isolated by hydrodistillation and subsequently analysed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), for compound quantification and identification, respectively. The relative composition of volatiles was employed to determine relationships among the different samples through agglomerative hierarchical cluster analysis. A whitish, viscous volatile fraction was obtained with a yield $\leq 0.05\%$ (v/w f.w.). Chemical analysis enabled the identification of 75 compounds, accounting for 69–84% of the total composition. 1-Phenyl-1,3-butadiene was predominant across all samples, representing 20–49% of the total volatiles. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between sexes were observed for nine compounds, and the volatile profiles allowed partial segregation by sex based on cluster analysis. These findings provide a pioneering contribution to the chemical ecology and bioactive potential of *C. album*. The combined application of GC-FID and GC-MS proved effective for a detailed characterization of the species' volatile composition. Further studies involving seasonal and geographical sampling are needed to enhance the economic and ecological value of this plant for potential applications in the pharmaceutical, cosmetic, and agri-food industries.

Keywords: White crowberry; hydrodistillation; gas chromatography; volatiles.

Introdução

As plantas são reconhecidas como importantes fontes de compostos bioativos (Bernhoft, 2010), que podem ter diferentes origens e requerer técnicas de extração distintas (Azmir et al., 2013), incluindo os voláteis. Estes representam cerca de 1% dos metabolitos secundários das plantas, sendo principalmente terpenoides, fenilpropanoides, benzenoides, derivados de ácidos gordos e aminoácidos, e são libertados por folhas, flores, frutos e raízes, desempenhando funções ecológicas como defesa contra herbívoros e patogénicos ou atração de polinizadores e dispersores de sementes (Dudareva et al., 2006). A síntese de voláteis ocorre em várias estruturas vegetais (Fahn, 1988), sendo os tricomas secretores dos órgãos vegetativos e reprodutivos particularmente ativos na produção destes compostos (McCaskill & Croteau, 1995; Kolb & Müller, 2004). Uma mistura de voláteis pode constituir um óleo essencial, pouco solúvel em água mas solúvel em solventes orgânicos e lípidos, com propriedades olfativas e farmacológicas, utilizado em diversas indústrias. De acordo com a norma ISO 9235, da *International Organization for Standardization* (ISO) um óleo essencial (OE) é o produto obtido a partir de matérias-primas vegetais por destilação, ou processos mecânicos, no caso do epicarpo de citrinos. O método mais comum de extração é a destilação, sendo a hidrodestilação em Clevenger a mais utilizada em laboratório (Łuczkiwicz et al., 2019). A composição dos óleos essenciais é influenciada por fatores fisiológicos, ambientais, geográficos, genéticos, evolutivos, de armazenamento, sociopolíticos e pela quantidade de material vegetal disponível (Figueiredo et al., 2008).

Os habitats costeiros são potenciais fontes de espécies bioativas devido às condições adversas (Rodrigues et al., 2014; Stanković et al., 2023). Um exemplo é a camarinha (*Corema album*) (Marques et al., 2021), um arbusto perene da família Ericaceae, de folhas persistentes e dimorfismo sexual (Léon-González et al., 2013), tolerante à seca e adaptado a solos arenosos com baixos nutrientes e pH entre 5,6 e 7,8

(Hellmann et al., 2017), com raiz profunda que permite resistência a longos períodos de seca. A floração ocorre de fevereiro a abril, sendo as flores masculinas e femininas semelhantes, distinguindo-se apenas pelo tamanho e ausência de estames nas femininas (Jacinto et al., 2022).

Devido às suas adaptações morfológicas (Antunes et al., 2018; Jacinto, 2019) e características do fruto (Jacinto et al., 2021), *C. album* é considerada candidata à domesticação e cultivo futuro (Oliveira & Dale, 2012). Estudos anteriores focaram-se no perfil fenólico (Andrade et al., 2017b; León-González et al., 2012, 2013; Pimpão et al., 2013) e na atividade antioxidante (Andrade et al., 2017a, 2017b; León-González et al., 2012) em frutos e folhas. Silva et al. (2023) demonstraram que a estação do ano e o sexo da planta influenciam a atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos foliares, sendo maior em indivíduos masculinos e aumentando ao longo do ciclo fenológico, em concordância com a concentração de compostos fenólicos.

Apesar destes estudos, a informação sobre os compostos voláteis de *C. album* é escassa. Neste contexto, o presente estudo visa caracterizar o perfil volátil de folhas e flores de *C. album*, comparando plantas masculinas e femininas.

Material e Métodos

Material Vegetal: As amostras de camarinha (*Corema album*), constituídas por partes aéreas em floração de 10 plantas (5 masculinas e 5 femininas), foram recolhidas em início de março de 2024 na praia da Comporta (Setúbal), acondicionadas em sacos de papel e armazenadas a -20 °C até à análise.

Isolamento da componente volátil: Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger (Council of Europe, 2010), a partir de 120 g de material fresco, durante 3 h. Devido ao baixo rendimento, o OE foi recuperado com *n*-pentano destilado (Monteiro et al. 2024), concentrado até ~200 µL sob fluxo de azoto e armazenado a -20 °C no escuro até à análise.

Análise da componente volátil: A caracterização química dos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), e por cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS), para quantificação por normalização de acordo com a ISO 7609:1985 e identificação, respetivamente, dos seus constituintes, como detalhado em Póvoa et al. (2024).

Análises estatísticas: As análises estatísticas não paramétricas foram realizadas em R (RStudio Team, 2017), com o pacote *agricolae* (De Mendiburu, 2019). Para cada composto volátil aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis entre os sexos ($n = 5$; $\alpha = 0,05$), seguido do teste pós-hoc SNK ($\alpha = 0,05$). A composição percentual dos voláteis foi utilizada para análise de clusters no NTSYS-PC 2.2 (Rohlf, 2000), usando o coeficiente de correlação como medida de similaridade e o método UPGMA para definição dos grupos. O grau de correlação foi classificado conforme Pestana e Gageiro (2000): muito elevado (0,90–1,0), elevado (0,70–0,89), moderado (0,40–0,69), baixo (0,20–0,39) e muito baixo (<0,20).

Resultados e Discussão

Os óleos essenciais (OEs) isolados das partes aéreas em floração de *C. album* revelaram um rendimento < 0,05% (v/p), independentemente de se tratar de amostras masculinas ou femininas.

O perfil volátil mostrou-se semelhante entre plantas femininas e masculinas (fig. 1). Foram identificados setenta e quatro compostos nos OEs analisados (Quadro 1), com uma percentagem de identificação entre 69% e 84%. Os compostos identificados podem

ser agrupados em 11 grupos diferentes: hidrocarbonetos monoterpénicos [entre vestigial (v) e 0,3%], monoterpénos oxigenados (v a 1%), hidrocarbonetos sesquiterpénicos (1 a 6%), sesquiterpénos oxigenados (1 a 2%), hidrocarbonetos diterpénicos (v); apocarotenóides (0,2 a 1%), fenilpropanóides (1%), ácidos gordos (v a 0,4%), alcanos (4% a 11%), alcenos (20 a 50%) e outros (24 a 40%). O grupo “outros” inclui todos os compostos que não sendo incluídos em nenhum dos grupos biossintéticos mencionados, são, entre outros, derivados de aminoácidos ou ácidos gordos.

O hidrocarboneto aromático, 1-fenil-1,3-butadieno, dominou tanto os OEs isolados de plantas femininas (20–36%) como masculinas (21–49%) (Quadro 1). Em percentagens inferiores, mas ainda assim considerados relevantes ($\geq 4\%$) (Quadro 1), salientam-se, nas amostras femininas, o *cis*-3-hexenol ($6\% \pm 2$) e o *n*-octadecanol ($11\% \pm 4$), e, nas plantas masculinas, o *cis*-3-hexenol ($4\% \pm 1$), *n*-nonanal ($5\% \pm 1$), e o *n*-octadecanol ($7\% \pm 1$).

De todos os compostos detetados apenas cinco compostos identificados (*n*-nonanal, β -cariofileno, *n*-heptadecano, *n*-eicosanal e *n*-triacotano), e três compostos ainda não identificados, e não incluídos no Quadro 1, apresentaram diferenças significativas entre plantas masculinas e femininas. Dos 11 grupos formados, apenas os fenilpropanóides apresentaram diferenças significativas entre sexos ($p < 0,05$).

A análise de clusters, baseada na composição volátil de *C. album*, revelou elevada correlação entre amostras ($\text{Scorr} \geq 0,86$, Figura 2). Formaram-se dois clusters principais, obtendo-se uma segregação parcial baseada no sexo das plantas.

Estes dados preliminares fornecem novos conhecimentos sobre os voláteis das folhas e flores de *C. album*. À data, esta foi a primeira avaliação dos voláteis da espécie. Comparativamente a outras Ericaceae, foram encontradas algumas semelhanças, mas insuficientes para identificar os compostos desconhecidos (Muravnik e Shavarda, 2012; Dias et al., 2016). Silva et al. (2021) caracterizaram frutos de *C. album* através de extração em fase sólida por *headspace* acoplada a GC-MS (HS-SPME/GC-MS), mas detetaram apenas seis compostos (*n*-hexanal, 2-hexenal, 2-decen-1-ol, hexil-oxirano, (*trans,trans*)-2,4-hexadienal e *n*-nonanal), dos quais apenas dois (*n*-hexanal e *n*-nonanal) foram também identificados no presente estudo.

Conclusões

A caracterização preliminar do perfil volátil de folhas e flores de plantas masculinas e femininas de *Corema album* forneceu informação crucial para otimizar a colheita e explorar aplicações industriais, como perfumaria, farmacêutica e aromatizantes. Estes dados também abrem caminho para futuras análises de variabilidade sazonal e entre populações, contribuindo para a valorização científica e económica da espécie.

Agradecimentos

Os autores JJ, CM, CA e ACF agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro UID/00329/2025 CE3C, e JJ à FCT pela bolsa de doutoramento 2022.13267.BD.

Referências Bibliográficas

Andrade, S.C., Gonçalves, F. & Guiné, R. 2017a. Contribution for the physical-chemical characterization of Portuguese Crowberry (*Corema album*). International Journal of Food Science and Nutrition 2: 9-14.

- Andrade, S.C., Guiné, R.P.F. & Gonçalves, F.J.A. 2017b. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (*Corema album*). *Journal of Food Measurement and Characterization* 11: 1936–1946.
- Antunes, C., Pereira, A. J., Fernandes, P., Ramos, M., Ascensão, L., Correia, O. & Máguas, C. 2018. Understanding plant drought resistance in a Mediterranean coastal sand dune ecosystem: differences between native and exotic invasive species. *Journal of plant ecology* 11, 26-38.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering* 117: 426-436.
- Bernhoft, A. J. A. B. 2010. A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals* 50: 11-17.
- Council of Europe. 2010. European Directorate for the Quality of Medicines, in *European Pharmacopoeia*, 7th ed. Council of Europe: Strasbourg, France, p. 241.
- De Mendiburu F. 2019. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Dias, P., Martins, A., Figueiredo, A. C. & Rauter, A. P. 2016. Flower Colour and Essential oil composition in *Erica australis* L. Grown in Portugal. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 19: 1013-1018.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A. & Orlova, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences* 25: 417-440.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New phytologist* 108: 229-257.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. & Scheffer, J. J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal* 23: 213-226.
- Hellmann, C., Große-Stoltenberg, A., Thiele, J., Oldeland, J. & Werner, C. 2017. Heterogeneous environments shape invader impacts: integrating environmental, structural and functional effects by isoscapes and remote sensing. *Scientific reports* 7: 4118.
- ISO 7609:1985. Essential oils-analysis by gas chromatography on capillary columns – General method. ISO: Geneva, Switzerland. (This standard was last reviewed and confirmed in 2020.)
- ISO 9235. Aromatic Natural Raw Materials – Vocabulary, 2021.
- Jacinto, J. M. A. 2019. Morphological and genetic characterization of four populations of *Corema album* (L.) D. Don (Dissertação de Mestrado, ISA/UL).
- Jacinto, J., Giovanetti, M., Oliveira, P. B., Valdiviesso, T., Máguas, C. & Alegria, C. 2021. Quality attributes of cultivated white crowberries (*Corema album* (L.) D. Don) from a multi-origin clonal field. *Euphytica* 217: 40.
- Jacinto, J., Magalhães, T., Oliveira, P. B., Oliveira, C., Luz, F., Trindade, C. S. & Valdiviesso, T. 2022. *Corema album* (L.) D. Don phenological growth stages according to extended BBCH scale. *International Journal of Fruit Science* 22: 317-328.
- León-González, A. J., Mateos, R., Ramos, S., Martín, M. Á., Sarriá, B., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Bravo, L. & Goya, L. 2012. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. *Food research international* 49: 728-738.
- León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Barradas, M. C. D. & Martín-Cordero, C. 2013. Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 58-63.

- Łuczkiwicz, M., Jesionek, A., Zabiegala, B. & Bucinski, A. 2019. From harvesting to distillation— Effect of analytical procedures on the yield and chemical composition of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) essential oil. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 76: 83-92.
- Kolb, D. & Müller, M. 2004. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany* 94: 515-526.
- Marques, J., Martin, D., Amado, A. M., Lysenko, V., Osório, N., Batista de Carvalho, L. A., Marques, M.P.M., Barroca, M.J. & Moreira da Silva, A. 2021. Novel insights into *Corema album* berries: Vibrational profile and biological activity. *Plants* 10: 1761.
- McCaskill, D. & Croteau, R. 1995. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* 197: 49-56.
- Monteiro, J., Scotti-Campos, P., Pais, I., Figueiredo, A. C., Viegas, D. & Reboredo, F. 2022. Elemental composition, total fatty acids, soluble sugar content and essential oils of flowers and leaves of *Moringa oleifera* cultivated in Southern Portugal. *Heliyon* 8.
- Muravnik, L. E. & Shavarda, A. L. 2012. Leaf glandular trichomes in *Empetrum nigrum*: morphology, histochemistry, ultrastructure and secondary metabolites. *Nordic Journal of Botany* 30: 470-481.
- Oliveira, P. B. & Dale, A. 2012. *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry—a new crop. *Journal of Berry Research* 2: 123-133.
- Pestana, M. H. & Gageiro, J. N. 2014. Análise de dados para ciências sociais: a complementaridade do SPSS. Edições Sílabo: Lisboa, Portugal.
- Pimpão, R. C., Dew, T., Oliveira, P. B., Williamson, G., Ferreira, R. B. & Santos, C. N. 2013. Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 61: 4053-4062.
- Póvoa O., Farinha, N., Lopes, V., Machado, A. M., & Figueiredo, A. C. 2024. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) from Alentejo (South Portugal) — Ethnobotany and potential industrial use. *Foods* 13: 929
- Rodrigues, M. J., Gangadhar, K. N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S. G., Nyberg, N. T., Barreira, L., Varela, J. & Custódio, L. 2014. Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Marine Drugs* 12: 2228-2244.
- Rohlf J.F. 2000. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1, user guide, Applied Biostatistics, New York.
- RStudio Team. 2016. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL: <http://www.rstudio.com/>.
- Silva, K., Rodrigues, N., Ramos, A. C., Gonçalves, E. M., Abreu, M. & Ramalhosa, E. 2021. Characterization of volatile compounds of *Corema album* L.". Poster em XV Encontro de Química dos Alimentos, Funchal, Portugal.
- Silva, D. J., Santos, J. A., Pinto, J. C., Llorent-Martínez, E. J., Castilho, P. C., de Carvalho, L. A. B., Marques, M. P. M., Barroca, M. J. Silva, A.M. & da Costa, R. M. 2023. Spectrochemical analysis of seasonal and sexual variation of antioxidants in *Corema album* (L.) D. Don leaf extracts. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 299: 122816.
- Stanković, M., Stojanović-Radić, Z., Jakovljević, D., Zlatić, N., Luković, M. & Dajić-Stevanović, Z. 2023. Coastal Halophytes: Potent Source of Bioactive Molecules from Saline Environment. *Plants* 12: 1857.

Quadros e Figuras

Quadro 1 - Variação mínima (Min), máxima (Max), e média (Med) com desvio padrão (DP), da composição percentual dos voláteis isolados por hidrodestilação das partes aéreas floridas, femininas e masculinas, de *Corema album*. Compostos com uma cruz (X) no final da linha apresentaram diferenças significativas entre as amostras masculinas e femininas.

Compostos	IR	Feminina				Masculina			
		Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP
<i>n</i> -Hexanal	739	0,2	0,5	0,3	± 0,1	0,2	0,5	0,3	± 0,1
<i>trans</i> -2-Hexenal	866	0,3	3,4	2,0	± 1,2	0,5	3,0	1,7	± 0,8
<i>cis</i> -3-Hexenol	868	3,3	8,6	5,8	± 1,9	2,8	5,7	4,1	± 1,0
<i>n</i> -Hexanol	883	v	0,8	0,3	± 0,3	v	0,2	0,1	± 0,1
<i>n</i> -Heptanal	897	v	0,2	v	± 0,1	v	0,6	0,2	± 0,2
Benzaldeído	927	2,3	3,9	2,9	± 0,6	1,5	3,3	2,2	± 0,6
<i>n</i> -Octanal	973	v	0,3	0,2	± 0,1	0,2	0,3	0,3	± 0,0
Acetofenona	1017	2,2	3,6	2,9	± 0,5	1,4	3,2	2,6	± 0,6
γ -Terpineno	1035	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,3	0,1	± 0,1
<i>n</i> -Octanol	1045	0,2	0,4	0,3	± 0,1	0,3	0,6	0,4	± 0,1
2,5-Dimetilestireno	1059	v	v	v	± 0,0	v	v	v	± 0,0
<i>n</i> -Nonanal	1073	0,7	3,1	2,4	± 0,9	3,5	6,6	5,3	± 1,2
Linalol	1074	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,2	v	± 0,1
1-Fenil-1,3-butadieno	1119	19,5	36,1	24,8	± 6,2	20,8	49,3	36,7	± 10,6
2- <i>trans</i> -Nonen-1-ol	1124	v	0,2	v	± 0,1	v	0,3	0,2	± 0,1
Borneol	1134	v	v	v	± 0,0	v	0,1	v	± 0,0
Terpinen-4-ol	1148	v	0,1	v	± 0,0	v	0,6	0,2	± 0,2
α -Terpineol	1159	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,2	0,1	± 0,1
<i>n</i> -Decanal	1180	v	0,2	0,2	± 0,1	0,2	0,3	0,2	± 0,0
4-Fenil-2-butanona (= Benzilacetona)	1206	1,1	2,1	1,5	± 0,4	1,0	1,7	1,3	± 0,3
<i>trans</i> -Cinamalaldeído	1224	v	0,3	0,1	± 0,1	v	0,3	0,2	± 0,1
2- <i>trans</i> -Decenal	1236	0,8	1,1	0,9	± 0,1	0,7	2,1	1,1	± 0,5
2-Undecanona	1275	v	v	v	± 0,0	v	1,0	0,2	± 0,4
α -Ionenol	1330	v	0,1	v	± 0,0	v	0,1	v	± 0,0
<i>trans</i> -2-Undecenal	1334	v	0,2	0,1	± 0,1	0,1	0,2	0,1	± 0,0
Isobutirato de octilo	1338	v	v	v	± 0,0	v	0,3	0,1	± 0,1
<i>trans</i> - β -Damascenona	1372	0,2	0,4	0,3	± 0,1	0,2	0,5	0,4	± 0,1
Metileugenol	1377	0,4	0,8	0,6	± 0,1	0,4	1,3	0,8	± 0,3
β -Bourboneno	1379	v	v	v	± 0,0	v	v	v	± 0,0
β -Damascona	1385	v	0,4	0,1	± 0,2	v	v	v	± 0,0
1,5-Dimetilnaftaleno	1408	v	0,2	v	± 0,1	v	0,5	0,2	± 0,2
β -Cariofileno	1414	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,1	0,2	0,1	± 0,0
β -Copaeno	1426	0,2	0,3	0,2	± 0,0	v	0,3	0,1	± 0,1
α -Humuleno	1447	v	0,1	v	± 0,0	v	0,3	0,1	± 0,1
γ -Muroleno	1469	v	0,1	v	± 0,0	v	0,3	0,1	± 0,1
Germacreno D	1474	1,6	3,1	2,3	± 0,5	0,8	3,7	1,7	± 1,1
2-Tridecanona	1479	v	0,3	0,2	± 0,1	v	0,4	0,2	± 0,1
α -Muroleno	1494	0,3	0,6	0,4	± 0,1	0,2	0,6	0,4	± 0,2
γ -Cadineno	1500	v	0,1	v	± 0,0	v	0,1	v	± 0,0
<i>n</i> -Pentadecano (C15)	1500	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,4	0,1	± 0,1
δ -Cadineno	1505	0,2	0,5	0,3	± 0,1	0,2	0,4	0,3	± 0,1
Benzoato de <i>cis</i> -3-hexenilo	1540	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,3	0,1	± 0,1
Ácido dodecanóico (= Ácido láurico)	1550	v	0,4	0,1	± 0,2	v	0,3	0,1	± 0,1
β -Oplopenona *	1576	v	0,3	0,1	± 0,1	v	0,2	0,1	± 0,1
T-Cadinol	1616	0,3	0,5	0,4	± 0,1	0,2	0,3	0,3	± 0,0
α -Cadinol	1616	0,1	0,3	0,2	± 0,1	v	0,3	0,2	± 0,1
<i>n</i> -Heptadecano (C17)	1700	0,4	0,7	0,5	± 0,1	v	0,4	0,3	± 0,1
Benzoato de benzilo	1701	v	0,2	0,1	± 0,1	v	0,2	0,1	± 0,1
Ácido tetradecanóico (= Ácido mirístico)	1723	v	v	v	± 0,0	v	0,3	0,1	± 0,1
Salicilato de octilo *	1743	v	v	v	± 0,0	v	v	v	± 0,0

Compostos	IR	Feminina				Masculina				
		Min	Max	Med	DP	Min	Max	Med	DP	
<i>n</i> -Octadecano	1751	v	0,3	0,1 ± 0,1		v	0,3	0,1 ± 0,1		
<i>n</i> -Octadecano (C18)	1800	v	0,3	0,1 ± 0,1		v	0,3	0,1 ± 0,1		
Hexahidrofarnesil acetona *	1803	0,5	0,9	0,7 ± 0,2		0,4	0,9	0,7 ± 0,2		
1-Hexadecanol	1821	v	0,5	0,2 ± 0,2		v	0,2	0,1 ± 0,1		
<i>n</i> -Nonadecano (C19)	1900	0,2	0,3	0,2 ± 0,0		v	0,2	0,1 ± 0,1		
1-Heptadecanol	1975	0,1	0,5	0,3 ± 0,1		0,2	0,4	0,3 ± 0,1		
<i>n</i> -Eicoseno	1969	0,1	0,5	0,2 ± 0,1		0,1	0,4	0,3 ± 0,1		
Abietatrieno	2045	v	v	v ± 0,0		v	v	v ± 0,0		
Cinamato de benzilo *	2051	0,7	1,8	1,2 ± 0,4		0,5	0,9	0,8 ± 0,1		
<i>n</i> -Octadecanol	2095	5,6	18,5	11,3 ± 4,4		4,8	8,3	6,6 ± 1,2		
<i>n</i> -Heneicosano (C21)	2100	0,2	1,0	0,5 ± 0,3		0,2	0,7	0,4 ± 0,2		
<i>n</i> -Docosano (C22)	2200	0,1	0,2	0,1 ± 0,0		0,1	0,5	0,2 ± 0,1		
<i>n</i> -Tricosano (C23)	2300	0,4	1,6	0,9 ± 0,5		0,2	1,7	1,0 ± 0,5		
<i>n</i> -Tetracosano (C24)	2400	0,2	0,5	0,3 ± 0,1		0,1	0,7	0,3 ± 0,2		
<i>n</i> -Eicosanal	2200	0,1	0,3	0,2 ± 0,1		v	0,1	v ± 0,0	×	
<i>n</i> -Pentacosano (C25)	2500	0,4	0,7	0,6 ± 0,1		v	0,7	0,4 ± 0,2		
Metilbehenato	2506	v	0,8	0,4 ± 0,4		v	1,2	0,2 ± 0,5		
<i>n</i> -Hexacosano (C26)	2600	0,2	0,3	0,2 ± 0,0		v	0,4	0,1 ± 0,1		
<i>n</i> -Docosanal	2426	0,1	1,5	0,4 ± 0,5		v	0,2	v ± 0,1		
<i>n</i> -Heptacosano (C27)	2700	0,4	2,2	1,2 ± 0,6		0,5	2,0	1,0 ± 0,5		
Metillignocerato	2707	v	0,2	0,1 ± 0,1		v	0,4	0,2 ± 0,1		
<i>n</i> -Octacosano (C28)	2800	v	0,1	0,1 ± 0,0		v	0,2	0,1 ± 0,1		
<i>n</i> -Nonacosano (C29)	2900	1,1	2,7	1,8 ± 0,6		0,3	2,6	1,0 ± 0,8		
<i>n</i> -Triacotano (C30)	3000	v	0,2	0,1 ± 0,1		v	v	v ± 0,0	×	
<i>n</i> -Hentriacotano (C31)	3100	0,4	0,7	0,5 ± 0,1		0,2	0,8	0,4 ± 0,2		
Componentes Agrupados:										
Hidrocarbonetos Monoterpénicos		v	0,2	0,1 ± 0,1		v	0,3	0,1 ± 0,1		
Monoterpenos Oxigenados		v	0,3	0,2 ± 0,1		v	0,8	0,3 ± 0,3		
Hidrocarbonetos Sesquiterpénicos		2,9	4,4	3,7 ± 0,6		1,4	5,7	2,7 ± 1,6		
Sesquiterpenos Oxigenados		1,1	1,8	1,4 ± 0,2		0,9	1,4	1,2 ± 0,2		
Hidrocarbonetos Diterpenicos		v	v	- ± -		v	v	- ± -		
Apocarotenóides		0,2	0,9	0,4 ± 0,1		0,3	0,5	0,4 ± 0,1		
Fenilpropanóides		0,5	0,8	0,7 ± 0,2		0,6	1,3	1,0 ± 0,2		
Ácidos Gordos		v	0,4	0,1 ± 0,2		v	0,3	0,2 ± 0,1		
Alcanos		5,8	9,8	7,4 ± 2,1		4,0	10,7	5,6 ± 2,6		
Alcenos		19,7	36,3	25,1 ± 8,1		21,5	49,6	37,1 ± 10,6		
Outros		26,9	40,0	34,4 ± 3,7		23,8	31,6	29,3 ± 2,8		

IR: Índice de retenção em laboratório calculado relativamente aos *n*-alcanos C₇-C₃₁ numa coluna DB-1. *: composto identificado com base no espectro de massa. v: vestigial (< 0,05%).

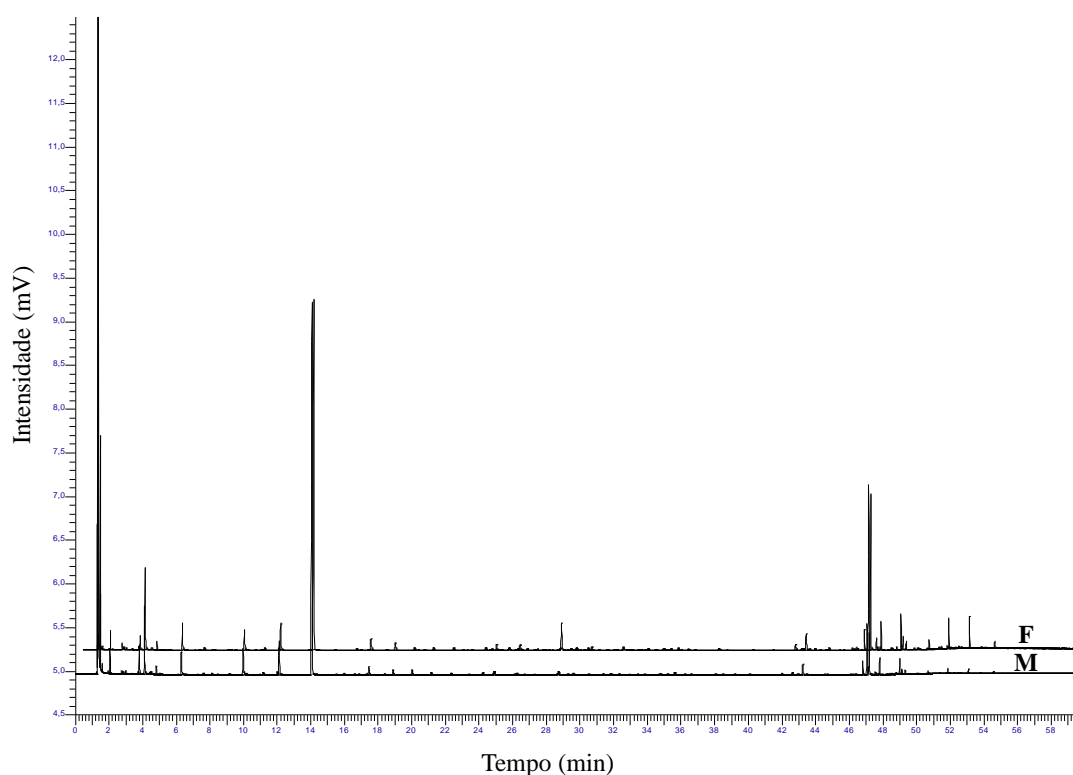


Figura 1 - Cromatogramas de GC-FID, representativos do perfil volátil de uma amostra de planta feminina (F) e masculina (M) de *Corema album*.

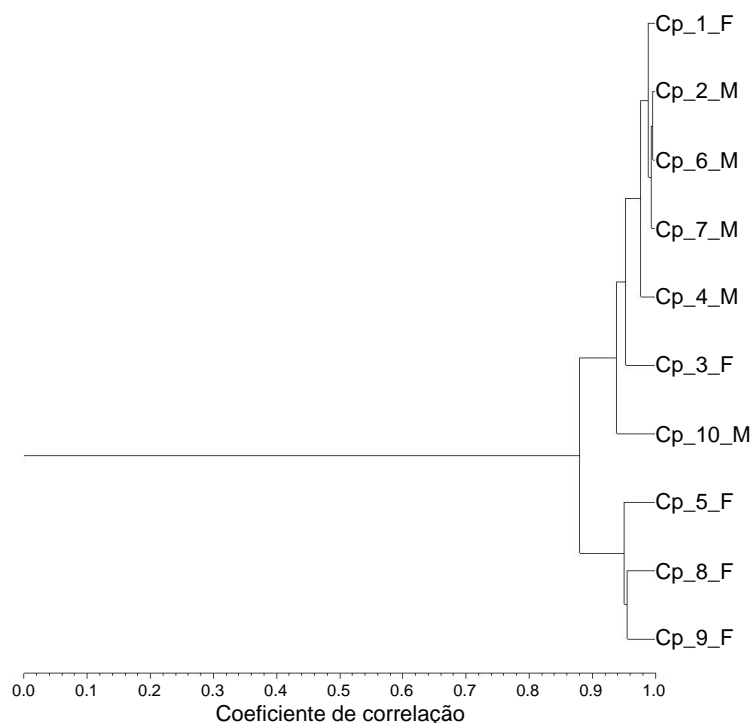


Figura 2 - Dendrograma obtido por análise aglomerativa em grupos da composição percentual dos voláteis das amostras de *Corema album* utilizando o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição dos *clusters*. Cp: Comporta. 1-10: Número da planta. F ou M: planta feminina ou masculina, respetivamente.

Bagas vermelhas mascaradas de branco. O exemplo da camarinha

Díaz-Barradas, M.C.¹; Martín-Cordero, C.²; León-González, A.²; Zunzunegui, M.¹; Pineda-Balbuena, P.¹; Álvarez-Cansino, L.¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Espanha;

²Departamento de Farmacología. Universidad de Sevilla, Espanha.

Resumo

As cores dos frutos servem de atração para os animais dispersores, e devem-se à presença de três tipos de pigmentos nomeadamente, carotenoides, antocianinas e betalaínas. Podem variar entre tons amarelos, avermelhados e azulados. No entanto, na natureza, é raro encontrar frutos brancos, como é o caso de *Viscum album* e *Corema album*.

As bagas da camarinha são inicialmente avermelhadas, depois acumulam água, aumentam de volume e tornam-se brancas no verão e, finalmente, no outono, perdem água e voltam a adquirir tons vermelhos. Para explicar estas mudanças de cor, recolhemos frutos nas dunas do SW de Espanha nestas três épocas do ano, os quais foram analisados quimicamente por cromatografia. Além disso, medimos o pH dos três tipos de frutos, tendo verificado que todos são ácidos. Contudo, os frutos vermelhos têm um pH em torno de 1, enquanto nos frutos brancos é à volta de 4.

As bagas são ricas em compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonóis e antocianinas. Além disso, os frutos maduros são ricos em triterpenos pentacíclicos, como ácido ursólico e oleanólico, que refletem a luz UV. Durante a maturação, os frutos vermelhos perdem a sua cor porque as antocianinas passam a leucoantocianinas (que são incolores), à medida que os frutos acumulam água e o pH aumenta.

A razão pela qual os frutos aparentam ser brancos para a visão humana deve-se à refletância uniforme ao longo de todo o espectro visível, à grande acumulação de água no fruto maduro e à presença do ácido ursólico e oleanólico, que são insolúveis em água e permanecem suspensos na interface com a cutícula. Isto confere ao fruto uma elevada impermeabilidade. Estas propriedades óticas são importantes para aumentar o contraste entre os frutos e a copa, tornando-os visíveis para os dispersores, geralmente mamíferos crepusculares, e têm também importância na produção comercial das bagas da camarinha. Para manter a sua cor branca, é necessário preservar essa película insolúvel junto da cutícula. Caso contrário, os frutos tornam-se translúcidos e deixam de ser visualmente apelativos e apetecíveis.

Palavras-chave: Ácido ursólico, antocianinas, dispersores, pigmentos, triterpenos.

Abstract

The colours of the fruits attract dispersing animals and are due to the presence of three types of pigments, namely carotenoids, anthocyanins and betalains. They can vary between yellow, reddish and bluish tones. However, in nature, it is rare to find white fruits, as is the case with *Viscum album* and *Corema album*.

The berries of *C. album* are initially reddish, then accumulate water, increase in volume and turn white in summer, and finally, in autumn, lose water and regain their red tones. To explain these colour changes, we collected fruits from the dunes of south-western Spain during these three seasons of the year, which were chemically analysed by

chromatography. In addition, we measured the pH of the three types of fruit and found that they are all acidic. However, the red fruits have a pH of around 1, while the white fruits have a pH of around 4.

The berries are rich in phenolic compounds, including phenolic acids, flavonols and anthocyanins. In addition, ripe fruits are rich in pentacyclic triterpenes, such as ursolic and oleanolic acid, which reflect UV light. During ripening, red fruits lose their colour because anthocyanins turn into leucoanthocyanins (which are colourless) as the fruits accumulate water and the pH increases.

The reason why the fruits appear white to human vision is due to their uniform reflectance across the entire visible spectrum, the large accumulation of water in ripe fruit, and the presence of ursolic and oleanolic acids, which are insoluble in water and remain suspended at the interface with the cuticle. This gives the fruit a high degree of impermeability. These optical properties are important for increasing the contrast between the fruit and the canopy, making them visible to dispersers, usually crepuscular mammals, and are also important in the commercial production of *C. album* berries.

To maintain their white colour, it is necessary to preserve this insoluble film near the cuticle. Otherwise, the fruits become translucent and are no longer visually appealing and desirable.

Keywords: Ursolic acid, anthocyanins, dispersers, pigments, triterpens.

Introdução

As cores dos frutos e flores são tradicionalmente consideradas como uma adaptação para incrementar a visibilidade dos órgãos vegetais aos vetores animais.

Embora as cores dos frutos têm sido geralmente contempladas como uma adaptação aos dispersores animais, a pressão seletiva na coloração dos frutos não está completamente entendida (Wilson and Whelan 1990, Schmidt et al. 2004). Alguns autores propõem que existe uma seleção pelas características bioquímicas (por exemplo antioxidantes, Schaefer et al. 2008) ou de algumas propriedades visuais dos pigmentos (Schmidt et al. 2004). Em geral, a percepção dos sinais visuais aumenta com um aumento do contraste entre a objetiva e o fundo (Renault et al. 2014) e a percepção visual do animal que recebe o sinal (Endler 1990). O contraste vem marcado por dois fatores, um aspeto cromático (cor) e um aspeto acromático (intensidade da luz), que podem ser captados de maneira diferente pelos animais (Cazetta et al 2009).

A maioria dos frutos consumidos pelas aves nas zonas temperadas são vermelhos, roxos ou negros (Wilson e Whelan 1989, Schaefer 2011), embora nas áreas boreais do norte a proporção de frutos azuis também seja elevada. Assim, a evolução da sinalização dos frutos foi provavelmente promovida para a convergência dos sinais mais bem-sucedidos. Neste contexto, 50-70% dos frutos de zonas temperadas e uma proporção semelhante das frutas tropicais dispersadas por aves são vermelhas ou pretas (Wheelwright e Janson 1985; Schaefer et al. 2004). Além disso, muitas bagas azuis têm uma camada cerosa que reflete a luz ultravioleta (Burkhardt 1982, Wilson e Whelan 1989).

Estas cores dos pequenos frutos devem-se à presença de três tipos de pigmentos que diferem nas estruturas químicas e nas vias biossintéticas, estes pigmentos são nomeadamente, carotenóides, flavonóides (incluindo flavonóis e antocianinas) e betalaínas. Os carotenóides (tetraterpenos) podem produzir tonalidades que variam do amarelo pálido ao vermelho. Flavonóis e antocianinas (dois tipos de compostos fenólicos)

produzem tonalidades na gama do amarelo, vermelho, roxo e azul, podendo até incluir o preto devido às altas concentrações de pigmentos. As betalainas são compostos nitrogenados que produzem cores que variam do vermelho ao violeta e, por vezes, produzem cores azuis e amarelas. Estes três tipos de pigmentos também atuam como sinais visíveis para atrair insetos, pássaros e animais para a polinização e dispersão de sementes.

Na Península Ibérica, a maioria das bagas naturais dispersadas pelos animais são vermelhas, roxas ou pretas, mas existem algumas plantas que apresentam naturalmente bagas brancas, como o *Viscum album* L. e a camarinha *Corema album* (L.) D. Don. (Valdés et al. 1987).

C. album (Ericaceae) é um arbusto dioico que habita as zonas costeiras do litoral atlântico da Península Ibérica, desde a Galiza até ao estreito de Gibraltar. Também podemos encontrar uma população isolada nas arribas da costa Gelada em Alicante e uma subespécie nos Açores.

As bagas da camarinha são inicialmente avermelhadas (em maio), depois acumulam água, aumentam de volume e tornam-se brancas com brilho nacarado (em agosto) e, finalmente, no outono, se não apodrecem, perdem água e voltam a adquirir a cor vermelha.

Os principais objetivos deste estudo consistiam em explicar quais são as causas das mudanças de cor e os mecanismos que explicam a cor branca e o brilho nacarado nos frutos maduros de *C. album*.

Material e Métodos

Nas dunas estabilizadas do Asperillo (Parque Natural de Doñana) no SW de Espanha existem extensas populações naturais de *C. album* (Zunzunegui et al. 2006). Os frutos foram recolhidos em Huelva (Espanha), 37° 04' 10.15" N – 6° 41' 15.45" O, nos meses de maio, agosto e setembro. No campo, foi retirada uma pequena amostra dos frutos, que foram cortados com um bisturi, e o pH da polpa foi medido com tiras indicadoras de pH. O restante dos frutos foi transportado em frio para o laboratório de Farmacologia da Universidade de Sevilha, onde foram congelados e liofilizados.

Para a extração dos compostos fenólicos, o material liofilizado foi tratado com três tipos de solventes: a) acetona, b) acetato de etilo e c) água. A identificação e quantificação das antocianinas foram realizadas por HPLC, de acordo com o método descrito por León-González et al. (2012, 2021). Para a extração dos triterpenos, os frutos foram imersos em acetato de etilo; o extrato foi evaporado em rotavapor e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, conforme descrito em Díaz-Barradas et al. (2016). A refletância dos frutos foi medida no campo e no laboratório com um espectro radiómetro portátil (UniSpec-DC, PP-System), conforme descrito em Díaz-Barradas et al. (2016).

Resultados e Discussão

Os resultados das estimativas do pH na polpa dos frutos, com papel indicador, mostraram que os frutos vermelhos têm um pH entre 1 e 2, no entanto nos frutos maduros, brancos e turgentes o pH oscila entre 3 e 4.

A quantificação das antocianinas revelou resultados significativos com a utilização dos extratos de acetona e água, e não se detetam com acetato de etilo devido ao caráter polar das antocianinas (tabela 1). Os compostos identificados foram delphinidina-3-O-glucósido e cianidina-3-O-glucósido e cianidina-3-O-arabinósido.

Estes compostos são comuns em numerosas plantas, tanto em flores como em frutos, por exemplo o heterósido de delphinidina é responsável de tons azuis e violetas em numerosas espécies e o heterósido de cianidina dá tons vermelhos e rosados tanto em frutos como em flores, por exemplo em uvas, amoras, cerejas e mirtilos. Ambos compostos têm elevadas propriedades antioxidantes.

Mas então, porque é que os frutos da camarinha são brancos?

A evidência fitoquímica indicou-nos que existe uma transformação reversível das antocianinas (com cor) a leucoantocianinas (incolores) que depende da acumulação da água e de um ligeiro aumento do pH (fig. 1).

Podemos deduzir que, durante a maturação, os frutos vermelhos perdem a sua cor porque as antocianinas passam a leucoantocianinas (que são incolores), à medida que os frutos acumulam água e o pH aumenta ligeiramente. Mas este processo é reversível, e no fim do verão à medida que o fruto se vai desidratando pode voltar a recuperar os tons avermelhados.

O cromatograma obtido do extrato de acetato de etilo apresentou dois picos maioritários; o primeiro (1) com tempo de retenção (tR) de 10 min 10 s, e o segundo (2) com Tr de 10 min 54 s. O composto (2) foi o maioritário, numa proporção de 2:1 (fig. 3). Os seus espectros de massas foram identificados com a base de dados NIST e por comparação com amostras autênticas, como ac ursólico (2 e como ácido oleanólico 1).

A razão pela qual os frutos maduros de *C. album* aparentam ser brancos para a visão humana deve-se à refletância uniforme ao longo de todo o espectro visível, à grande acumulação de água no fruto maduro (75 a 80% no verão) e à presença do ácido ursólico e oleanólico. Além disso estes frutos mostram uma elevada refletância entre 300 e 400 nm, os que corresponde aos comprimentos de onda da luz UV (Figura 2).

Ao comparar o espectro de refletância do fruto branco, com um fruto translúcido e rosado, podemos observar que no fruto translúcido existe uma diminuição significativa na refletância no UV, no espectro visível é quase nula e só apresenta um ligeiro aumento entre 650 e 700 nm, o que parece explicar os tons rosados.

Os compostos responsáveis pela refletância no ultravioleta são o ácido ursólico e oleanólico, como foi demonstrado em Díaz-Barradas et al. (2016).

Conclusões

O ácido ursólico e oleanólico parecem ser os responsáveis da cor branca dos frutos. Estes compostos são insolúveis em água (a pH ácido) e mantém uma estrutura junto da cutícula que dá a cor branca aos frutos e a elevada refletância no UV. Também confere aos frutos um grande isolamento e proteção.

As propriedades óticas tão singulares que apresenta a camarinha (bagas brancas, com brilho nacarado) são importantes para aumentar o contraste entre os frutos e a copa, tornando-os visíveis para os dispersores, geralmente mamíferos crepusculares das dunas, e têm também grande importância na produção comercial das bagas da camarinha.

Para manter a sua cor branca, é necessário preservar essa película insolúvel junto da cutícula e as suas propriedades físicas. Caso contrário, os frutos tornam-se translúcidos e deixam de ser visualmente apelativos e apetecíveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do projeto PLEC2022-009299 01/10/2022 Cultivo sostenible de bayas de *Corema album* (L.) D. Don en el entorno de Doñana y su impacto en la salud humana (COREBERRY).

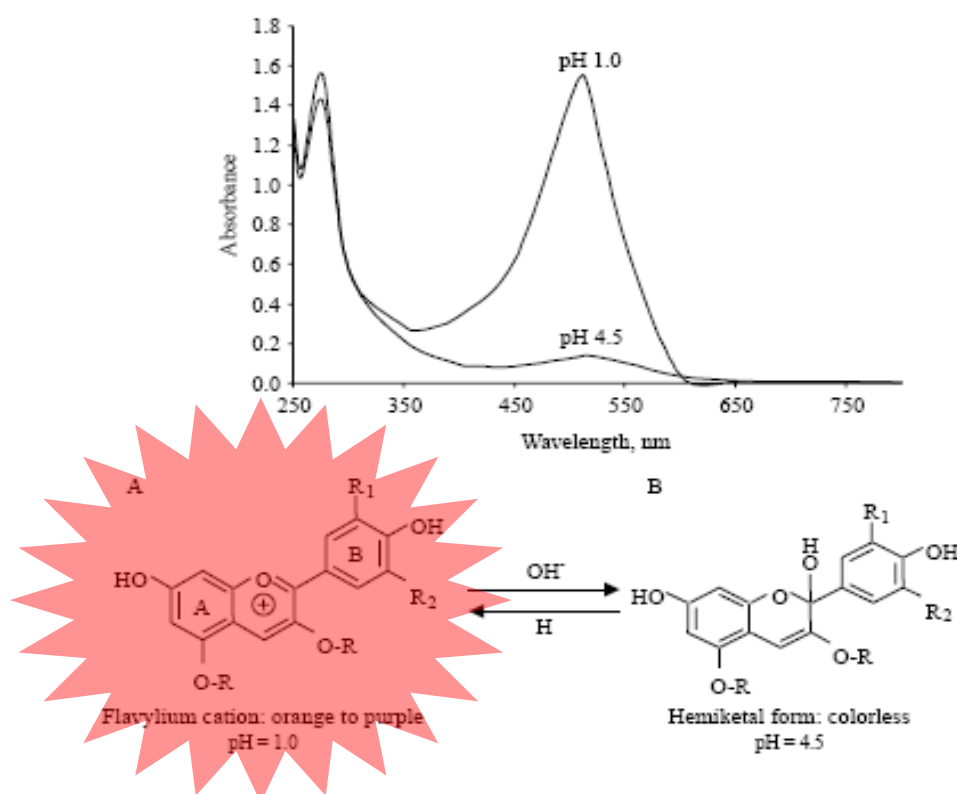
Referências Bibliográficas

- Burkhardt D (1982) Birds, berries and UV: a note on some consequences of UV vision in birds, *Naturwissenschaften* 69: 153-157
- Diaz-Barradas MC, Costa C, Correia O et al (2016) Pentacyclic triterpenes responsible for photoprotection of *Corema album* (L.) D. Don white berries. *Biochem Syst Ecol* 67:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.05.009>
- Cazetta E, Schaefer HM, Galetti M (2009) Why are fruits colourful? The relative importance of achromatic and chromatic contrasts for detection by birds. *Evol Ecol* 23: 233–244
- Endler JA (1990) On the measurement and classification of colour in studies of animal colour patterns. *Biol J Linn Soc* 41: 315–352
- León-González AJ, Mateos R, Ramos S et al (2012) Chemoprotective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. *Food Res Int* 49:728–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.016>
- León-González AJ, Navarro I, Acero N, Muñoz-Mingarro D, Martín-Cordero C (2021) The fruit of *Corema album* (L.) D. Don, a singular White berry with potential benefits in nutrition and health. *Phytochem Rev.* <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09787-9>
- Renoult JP, Valido A, Jordano P, Schaefer HM (2014) Adaptation of flower and fruit colours to multiple, distinct mutualists. *New Phytol* 201: 678-686
- Schaefer HM, Schaefer V, Levey DJ (2004) How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology and Evolution.* 19: 577-584
- Schaefer HM, McGraw K, Catoni C (2008) Birds use fruit colour as honest signal of dietary antioxidant rewards. *Funct Ecol* 22: 303-310
- Schaefer HM (2011) Why fruits go to the dark side. *Acta Oecologica* 37: 604-610
- Schmidt V, Schaefer HM, Winkler, H (2004) Conspicuousness, not colour as foraging cue in plant–animal signalling. *Oikos* 106: 551-557
- Valdés B, Talavera S, Galiano EF (1987) *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Ketres Editora, 3 Volumes.
- Wheelwright NT, Janson CH (1985) Colors of fruit displays of bird-dispersed plants in two tropical forests. *Am Nat* 126: 777–799
- Wilson MF, Whelan CJ (1989) Ultraviolet reflectance of fruits of vertebrate-dispersed plants. *Oikos* 55: 341-348
- Wilson MF, Whelan CJ (1990) The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *Am. Nat.* 136: 790-809
- Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Clavijo A, Alvarez-Cansino L, Ain Lhout F, García Novo F (2006) Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album*. *Plant Ecol* 183:35–46

Quadros e Figuras

Tabela 1 - Antocianinas identificados nas bagas de *C. album* (León-González et al. 2012 e 2021).

		Acetona (mg/100g)	acetato de etilo (mg/100g)	Água (mg/100g)
Delfinidina glucoside	3-O-	0,52 ±0,04	0,00±0,00	0,88±0,05
Cyanidina glucoside	3-O-	1,13±0,04	0,00±0,00	1,01±0,04
Cyanidina arabidoside	3-O-	0,26±0,04	0,00±0,00	0,52±0,04
Antocianinas totais		1,91±0,05	0,00±0,00	2,40±0,05

**Figura 1** - Transformação reversível entre antocianinas e leucoantocianinas em relação com as mudanças do pH. As antocianinas (à esquerda da imagem) têm cor, no entanto as leucoantocianinas são incolores.

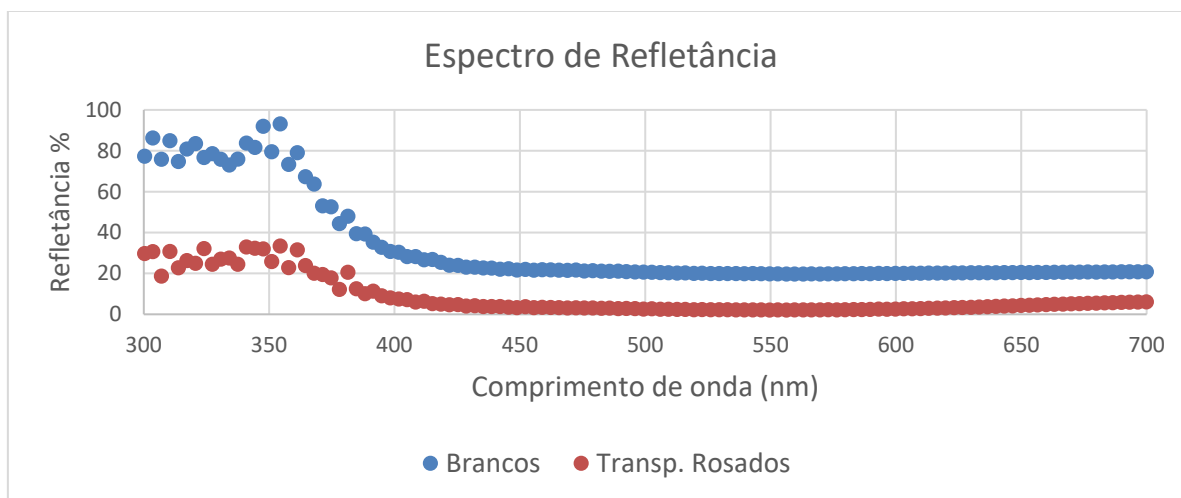


Figura 2 - Espectro de reflectância (desde 300 a 700 nm) das bagas brancas turgentes e translúcidas rosadas da camarinha.

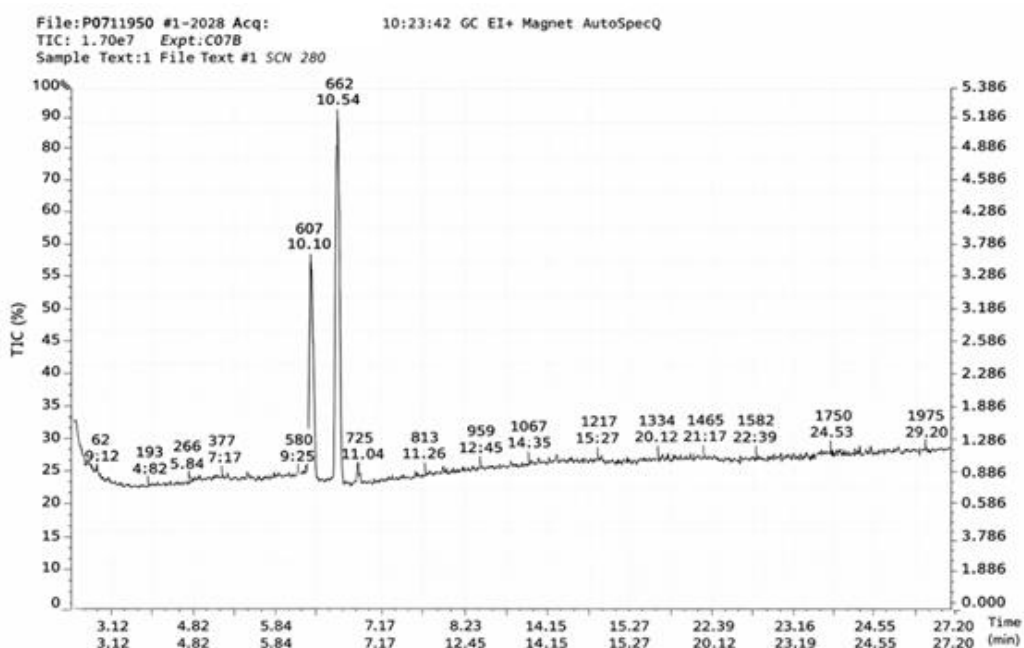


Figura 3 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa do extrato de acetato de etilo obtido por imersão dos frutos neste solvente.

Biocontroladores verdes como estratégia para melhorar a qualidade nutricional de pequenos frutos

Carlo Bravo¹, Andreia Garrido², Tânia Fernandes², Miguel Santos², Susana Carvalho², Susana Soares^{1,3}, Victor de Freitas^{1,3}

¹Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, S/n, 4169-007, Porto;

²GreenUPorto – Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4485-646, Vairão;

³REQUIMTE, LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, S/n, 4169-007, Porto.

Resumo

A crescente procura por alimentos funcionais e por práticas agrícolas sustentáveis tem estimulado o desenvolvimento de estratégias inovadoras que conciliem produtividade, qualidade nutricional e baixo impacto ambiental. Neste contexto, os biocontroladores verdes — substâncias de origem vegetal ou microbiana com propriedades bioativas — surgem como alternativas ecológicas promissoras para a proteção fitossanitária e a valorização nutricional dos produtos agrícolas. O presente estudo avaliou os efeitos de exsudados de leveduras endofíticas, aplicadas como agentes de biocontrolo, no perfil nutricional de morangos (*Fragaria × ananassa*) e framboesas (*Rubus idaeus*). Ensaios de campo foram conduzidos com dois biocontroladores/exsudados inovadores (Exs B e Exs C) e sua mistura (Exs B+C), obtidos a partir de subprodutos da indústria vinícola, aplicados foliarmente a cada 15 dias. Foram testadas três cultivares de framboesa ('12F37', 'Clarita' e '13F82') e três de morango ('Felicity', 'Fortuna' e 'Leticia'). As amostras colhidas no estágio ótimo de maturação foram analisadas quanto ao pH, teor de proteínas, açúcares, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, utilizando métodos espectrofotométricos, cromatográficos e eletroquímicos. Embora não tenham sido verificadas diferenças significativas nos parâmetros de pH e proteína, observou-se um aumento moderado (até 15%) no teor total de fenólicos (principalmente antocianinas) e um incremento na capacidade antioxidante (até 25%) nos frutos tratados, em comparação com os controlos. Estes resultados evidenciam o potencial dos biocontroladores verdes não apenas no controlo de doenças fúngicas, mas também como agentes bioestimulantes capazes de melhorar a qualidade nutricional dos frutos. A sua integração em sistemas agrícolas convencionais alinha-se com os princípios da agricultura sustentável, contribuindo para uma produção hortícola mais resiliente, funcional e de maior valor agregado.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, conteúdo proteico, morangos, framboesas, capacidade antioxidante.

Abstract

The growing demand for functional foods and sustainable agricultural practices has driven the development of innovative strategies that combine productivity, nutritional quality, and low environmental impact. In this context, green biocontrol agents — substances of plant or microbial origin with bioactive properties — have emerged as promising ecological alternatives for crop protection and nutritional enhancement. This

study evaluated the effects of exudates from two endophytic yeasts, applied as biocontrol agents, on the nutritional profile of two economically relevant red fruits: strawberry (*Fragaria × ananassa*) and raspberry (*Rubus idaeus*). Field trials were conducted using two innovative biocontrol formulations/exudates (Exs B and Exs C) and their combination (Exs B+C), derived from wine industry by-products. These formulations were applied to the leaves at 15-day intervals. Three raspberry cultivars ('12F37', 'Clarita', and '13F82') and three strawberry cultivars ('Felicity', 'Fortuna', and 'Leticia') were tested. Fruits collected at optimal ripeness were analyzed for pH, protein, sugar, total phenolic content, and antioxidant capacity using spectrophotometric, chromatographic, and electrochemical methods. No significant differences were observed in pH or protein levels; however, a moderate increase (up to 15%) in total phenolics and a notable enhancement (up to 25%) in antioxidant capacity were recorded in fruits treated with the green biocontrol agents compared to untreated controls. These findings highlight the dual role of green biocontrol agents not only in fungal disease suppression but also as bio-stimulants that can improve fruit nutritional quality. The integration of such eco-friendly strategies into conventional agricultural systems aligns with the principles of sustainable agriculture and represents a promising step toward more resilient, functional, and nutritionally enriched horticultural production.

Keywords: Phenolic compounds; protein content; strawberries; raspberries; antioxidant capacity.

Introdução

Os pequenos frutos, como o morango (*Fragaria × ananassa*) e a framboesa (*Rubus idaeus*), ocupam um lugar de destaque no setor hortícola nacional e mundial devido ao seu elevado valor económico, ao interesse crescente dos consumidores por alimentos saudáveis e à sua reconhecida riqueza em compostos bioativos (Bortolini et al, 2022). Estes frutos são amplamente valorizados não apenas pelo sabor e pelo valor comercial, mas também pelas suas propriedades funcionais, associadas à presença de metabólitos secundários como polifenóis, com comprovada atividade antioxidante e benefícios para a saúde humana (Basu et al., 2014). A procura por frutos vermelhos frescos e processados tem vindo a aumentar de forma constante, impulsionando a necessidade de práticas agrícolas que conciliem elevada produtividade, qualidade nutricional e sustentabilidade ambiental.

Contudo, a produção intensiva destes frutos enfrenta diversos desafios, entre os quais se destacam as doenças fúngicas e as infestações por insetos, que afetam significativamente a produtividade e a qualidade final das culturas. Tradicionalmente, o controlo fitossanitário tem-se baseado no uso de pesticidas sintéticos. Apesar da sua eficácia imediata, o uso excessivo desses produtos químicos levanta preocupações ambientais e de saúde pública, além de poder comprometer a biodiversidade e favorecer o aumento das resistências a pragas e patógenos. Neste contexto, torna-se imperativo o desenvolvimento de estratégias alternativas de controlo biológico, que reduzam a dependência de agroquímicos e promovam uma agricultura mais sustentável e resiliente (Naranjo et al., 2015).

Os biocontroladores verdes representam uma dessas alternativas inovadoras. Trata-se de substâncias ou microrganismos de origem natural — como extratos vegetais, bactérias, fungos ou leveduras — capazes de inibir o crescimento de patógenos, induzir resistência nas plantas e, em alguns casos, estimular o crescimento vegetal. Além de

apresentarem baixo impacto ambiental, estes agentes podem ser obtidos a partir de subprodutos agrícolas e industriais, favorecendo a economia circular e a valorização de resíduos agroindustriais (Kovaleski et al., 2025).

Entre os microrganismos utilizados com sucesso no biocontrolo, as leveduras endofíticas têm despertado particular interesse. Estas leveduras vivem de forma simbiótica no interior dos tecidos vegetais, sem causar danos às plantas hospedeiras, e podem exercer múltiplas funções benéficas, incluindo a promoção do crescimento vegetal, a competição por nutrientes com microrganismos patogénicos e a produção de compostos antimicrobianos e indutores de defesa. Estudos recentes têm demonstrado que as leveduras endofíticas são capazes de reduzir a incidência de doenças fúngicas em várias culturas hortícolas e frutícolas, oferecendo uma solução promissora e ecológica para o controlo de pragas e doenças (Lalremruati et al., 2024).

Para além do seu papel protetor, a aplicação de biocontroladores pode também influenciar o metabolismo secundário das plantas e, conseqüentemente, alterar a composição química e o perfil nutricional dos frutos produzidos. As interações planta-microrganismo podem desencadear respostas fisiológicas e bioquímicas que resultam em modificações no conteúdo de compostos fenólicos, açúcares e proteínas, com impacto direto sobre as propriedades sensoriais e funcionais dos frutos. Apesar da crescente literatura sobre a eficácia de biocontroladores no controlo de pragas, ainda existem poucos estudos que abordem de forma sistemática os efeitos destas aplicações no valor nutricional e funcional dos frutos.

Neste sentido, torna-se essencial investigar se estes biocontroladores, além de mitigarem o impacto das pragas e doenças, também podem contribuir para a melhoria da qualidade nutricional dos pequenos frutos. Avaliar parâmetros como o teor total de compostos fenólicos, conteúdo proteico e a capacidade antioxidante permitirá compreender melhor o potencial bioestimulante destes agentes e o seu papel na produção de alimentos mais saudáveis e sustentáveis.

Assim, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto de exsudados de duas leveduras endofíticas, aplicadas como agentes de biocontrolo, sobre o perfil nutricional de morangos e framboesas de diferentes cultivares. Foram utilizados biocontroladores inovadores obtidos a partir de subprodutos da indústria vinícola, aplicados por via foliar em condições de campo. As análises centraram-se em parâmetros químicos e funcionais, incluindo pH, teor de proteínas, açúcares, compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Através desta abordagem, pretende-se contribuir para o avanço do conhecimento sobre o papel dos biocontroladores verdes não apenas na proteção fitossanitária, mas também como ferramentas promissoras para o aumento do valor nutricional e funcional dos frutos dentro dos princípios da agricultura sustentável.

Material e Métodos

Condições de crescimento das plantas e aplicação dos tratamentos

As plantas de morangueiro, de três cultivares de dias curtos ('Felicity', 'Fortuna' e 'Leticia'), foram cultivadas em sistema semi-hidropónico numa estufa de polietileno localizada no Campus de Vairão da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) (fig. 1). O cultivo foi realizado em sacos de 25,2 L, preenchidos com substrato comercial (SIRO[®]) composto por turfa, fibra de coco e casca de pinheiro (pH 5,0–5,8; condutividade elétrica 100–150 $\mu\text{S cm}^{-1}$; matéria orgânica > 70%; granulometria 0–15 mm). Cada saco continha sete plantas e foi irrigado por um sistema automatizado com solução nutritiva ajustada ao estágio de desenvolvimento. Cada tratamento incluiu três

réplicas biológicas ($n = 3$), correspondentes a três sacos de substrato, distribuídos aleatoriamente na estufa.

As plantas de framboesa (cultivares ‘12F37’, ‘Clarita’ e ‘13F82’) foram cultivadas numa estufa do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) — Polo de Inovação da Fataca, localizada em Odemira (fig. 1). Cada tratamento incluiu quatro réplicas biológicas ($n = 4$), contendo 10 plantas cada, que foram distribuídas aleatoriamente na estufa.

Com base em ensaios anteriores realizados com uma coleção de leveduras endofíticas disponibilizadas pela Proenol – Indústria Biotecnológica, S.A. (Gaia, Portugal), foram selecionadas duas estirpes (designadas como B e C) com comprovada ação antagonista contra *Botrytis cinerea* (Esteves et al., 2023). Em ambos os ensaios, 5 tratamentos foram considerados: *i*) um grupo de plantas não tratadas com qualquer substância. (NT - plantas sem aplicação de biocontroladores e não tratadas para as doenças em estudo ao longo de todo o ensaio); *ii*) plantas tratadas só com solução aquosa aderente (1 mL L^{-1}), usadas como controlo (C); *iii-iv*) aplicação de exsudados líquidos produzidos pelas leveduras endofíticas (designados Exs B e Exs C), aplicados por pulverização foliar na concentração de 250 mL L^{-1} ; *v*) formulação combinada (Exs B+C), obtida pela mistura em partes iguais dos dois exsudados (Fig. 1). Aquando da preparação dos exsudados foi adicionado um agente aderente (1 mL L^{-1}) de modo a aumentar a aderência e capacidade molhante das substâncias na superfície das plantas. Deste modo, o grupo de plantas que foi exclusivamente tratado com solução aquosa aderente corresponde ao controlo (C) do ensaio. Nos casos *iii-v*, a primeira aplicação foi realizada um mês após o plantio, sendo as aplicações subsequentes efetuadas quinzenalmente, sempre ao final da tarde, de forma a otimizar a absorção foliar e a preservar a estabilidade dos compostos bioativos.

Avaliação dos parâmetros nutricionais

Os frutos maduros (ca. 100-150 g peso húmido) foram colhidos no estágio ótimo de maturação e transportados imediatamente para os laboratórios do Departamento de Química e Bioquímica da FCUP, onde foram lavados com água destilada, pesados e congelados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, novamente pesadas e moídas finamente até à obtenção de um pó homogéneo (fig. 1). Posteriormente, as amostras foram divididas em diferentes alíquotas para realizar as seguintes análises:

i) *pH* – determinado em amostras liofilizadas e reidratadas, com eletrodo calibrado (Crison; padrões pH 1, 4 e 7);

ii) *Açúcares totais* – quantificados pelo método de Dubois ligeiramente modificado (Bravo et al., 2023), usando microplacas de 96 poços (PowerWave XS, Biotek Instruments), com glicose como padrão e resultados expressos em mg g^{-1} equivalentes de glicose;

iii) *Proteínas* – quantificadas pelo método de Kjeldahl, utilizando um fator de conversão de 6,25 e titulação com HCl 0,1 M.

iv) *Compostos fenólicos* – extraídos, a partir de 1 g de pó seco em 20 mL de solvente etanol/água (50:50, v/v) acidificado a pH 2 com HCl (1:20 p/v). A mistura foi submetida a agitação magnética durante 15 min à temperatura ambiente, realizando-se três extrações sequenciais. Após centrifugação ($13\ 000 \text{ g}$, 8 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), o sobrenadante foi filtrado (filtros RC 0,45 μm), reunido e concentrado num evaporador rotativo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. O extrato aquoso resultante foi purificado em cartucho de fase reversa C18, lavado com água e eluído com metanol acidificado. O solvente foi evaporado e o extrato final liofilizado. O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado pelo método de

Folin-Ciocalteu, adaptado para microplaca de 96 poços (Bravo et al., 2023), utilizando cianidina-3-glicosídeo (C3G) como padrão. A caracterização fenólica foi realizada num sistema Vanquish HPLC (Thermo Fisher Scientific) equipado com uma coluna Agilent Poroshell 120 C18 (250 × 4,6 mm; 2,7 μm). As condições cromatográficas foram otimizadas com base em trabalhos prévios do grupo (Ribeiro et al., 2024). As análises por espectrometria de massas foram realizadas num UPLC (Thermo Scientific Vanquish) acoplado a um espectrómetro de massa linear ion trap (LTQ XL™, Thermo Scientific), com fonte ESI em modo positivo. A identificação dos compostos foi efetuada com base nos dados de massa, padrão de fragmentação e tempo de retenção, por comparação com padrões comerciais e literatura. A capacidade antioxidante dos extratos das framboesas foi avaliada pelo método DPPH e por técnicas eletroquímicas (cyclic voltammetry – CV; e square wave voltammetry – SWV) conforme descrito por Bravo et al. (2023) e Ribeiro et al. (2024).

Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM) de três réplicas biológicas (n = 3). Os resultados foram analisados estatisticamente através do software *GraphPad Prism* versão 5. A análise de variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*) foi utilizada para verificar o efeito dos tratamentos nas diferentes variáveis quantitativas. Após rejeição da hipótese nula por ANOVA ($p < 0,05$), as diferenças entre os grupos foram analisadas por comparações múltiplas através do teste *post hoc* de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados apresentados no quadro 1 mostram que o peso seco dos frutos de framboesa variou entre 11,5 e 14,4 %, enquanto nas cultivares de morango os valores oscilaram entre 8,3 e 9,6 %, sem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos. De modo semelhante, os valores de pH mantiveram-se estáveis, variando entre 2,9 e 3,2 para as framboesas e entre 2,9 e 3,1 para os morangos, o que indica ausência de alterações relevantes na acidez dos frutos após a aplicação dos biocontroladores. De facto, o pH é um parâmetro relevante para o impacto sensorial e também para a estabilidade dos compostos fenólicos no pós-processamento. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas no teor de proteínas e nos açúcares totais (fig. 2), com valores dentro da faixa previamente descrita na literatura (Kallio et al., 2000). Em geral, as cultivares de morango apresentaram maior teor de açúcares (4,9–6,3 %) e menor teor de proteínas (0,63–0,91 %) em comparação com as framboesas (3,7–4,8 % e 0,89–1,27 %, respetivamente). Além disso, as principais diferenças ocorreram entre as próprias cultivares, refletindo a influência da variabilidade genética nas características físico-químicas dos frutos.

Os resultados reportados na fig. 3 mostram que, em todas as cultivares analisadas, os tratamentos Exs B e Exs C promoveram um ligeiro aumento no teor total de polifenóis, em comparação com os controlos (NT e C), embora sem diferenças marcantes entre as condições. No entanto, um efeito significativo ($p < 0,05$) foi observado no tratamento Exs B+C, face à condição controlo. Nas framboesas, o teor fenólico aumentou cerca de 15–20% em relação aos controlos, com valores máximos de 280 e 218 mg C3G/100 g para as cultivares ‘Clarita’ e ‘12F37’, respetivamente (fig. 3a). Da mesma forma, nos morangos, o tratamento combinado levou a um incremento evidente do teor total de polifenóis em relação à média dos outros tratamentos, atingindo 145, 140 e 183 mg C3G/100 g para ‘Felicity’, ‘Fortuna’ e ‘Leticia’, respetivamente (fig. 3b). Estes resultados

sugerem que a combinação dos dois exsudados (Exs B+C) exerce um efeito sinérgico positivo na síntese/estabilização dos compostos fenólicos, potencializando a resposta de compostos secundários dos frutos em comparação com os tratamentos isolados. Ao mesmo tempo, não foram observadas diferenças qualitativas e os principais compostos identificados em todas as amostras de framboesa foram cianidina-3-soforosídeo, cianidina-3-(2-glucosilrutinosídeo), cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-soforosídeo e ácido elágico.

No que diz respeito à capacidade antioxidante das framboesas, verificou-se um aumento (até +32% na cultivar Clarita) estatisticamente significativo nos frutos colhidos de plantas tratadas com a combinação dos exsudados (Exs B+C), por comparação com o controlo (fig. 3b). Este resultado determinado pelo método DPPH, foi consistente com os resultados obtidos pelos métodos eletroquímicos (fig. 4c, d).

Conclusões

Este estudo demonstrou que os biocontroladores sustentáveis podem constituir uma alternativa viável para mitigar doenças fúngicas em culturas de pequenos frutos. Observou-se que não houve alterações significativas na qualidade nutricional básica dos frutos, ou seja, parâmetros como proteínas, açúcares, peso seco e pH mantiveram-se estáveis. Este resultado é particularmente relevante, pois indica que o uso destes biocontroladores não compromete atributos fundamentais quer para o consumidor quer para a indústria. No entanto, foi identificado um impacto positivo na capacidade antioxidante, o que sugere que os compostos bioativos — particularmente os fenólicos — podem ser favorecidos pelos tratamentos. Deste modo, este resultado abre perspectivas interessantes, uma vez que os antioxidantes não só melhoram o valor nutricional, como também conferem benefícios funcionais e de saúde, cada vez mais valorizados no mercado alimentar.

Agradecimentos

Projeto I&D 'BFREE: Biocontrolo de Frutos e de IEgumEs' (Ref. PRR-C05-i03-I-000082-LA6.2) cofinanciado pelo PRR-IFAP – Agenda de Investigação e Inovação para a sustentabilidade da agricultura, alimentação e agroindústria, PROJETOS I&D+I, Territórios Sustentáveis.

Referências Bibliográficas

- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N.M. 2014. Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:790-806.
- Bortolini, D.G., Maciel, G.M., Fernandes, I.A.A, Rossetto, R., Brugnari, T., Ribeiro, V. & Haminiuk, C.W.I. 2022. Biological potential and technological applications of red fruits: An overview. *Food Chemistry Advances*, 1:100014.
- Bravo, C., Perez-Gregorio, R., ..., de Freitas, V. & Soares, S. 2023. Unlocking the Potential of Spent Coffee Grounds as a Source of Humic-like Substances with High Antioxidant Capacity. *Waste and Biomass Valorization* 15:2769-2779.
- Esteves, M., Lage, P., Sousa, J., Centeno, F., Teixeira, M.F., Tenreiro, R. & Mendes-Ferreira, A. 2023. Biocontrol potential of wine yeasts against four grape phytopathogenic fungi disclosed by time-course monitoring of inhibitory activities. *Frontiers in Microbiology* 14: 1146065.
- Kallio, H., Hakala, M., Pelkkikangas, A.M. & Lapveteläinen, A. 2000. Sugars and acids of strawberry varieties. *European Food Research and Technology* 212:81-85.

- Kovaleski, M., Maurer, T.R., Banfi, M., Remor, M., Restelatto M., Rieder, R., Deuner, C.C. & Colla, L.M. 2025. Biocontrol of plant pathogens by actinomycetes: a bibliometric analysis and systematic review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 41:243.
- Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., ..., Singhm P.K. & Zothanpuia 2024. Fungal Endophytes as Biocontrol Agents of Plant Pathogens: Recent Developments and Prospects p279-294. In: Singh, B.P. et al. (Eds): *Endophytic Fungi*, Springer, Cham.
- Naranjo, S.E., Ellsworth, P.C. & Frisvold G.B. 2015. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual Review of Entomology* 60:621-645
- Ribeiro, A.C., Bravo, C., ..., Perez-Gregorio, R. & Soares, S. 2025. Polyphenols as enhancers of emulsifying and antioxidant properties of egg and yeast protein emulsions: Understanding the molecular interactions behind their technological and functional potential. *Food Hydrocolloids* 167:111399.

Quadros e Figuras

Quadro 1 - Valores médios (\pm desvio padrão) do peso seco ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e do pH dos frutos de diferentes cultivares de framboesa ($n = 4$) (*Rubus idaeus*) e morango ($n = 3$) (*Fragaria \times ananassa*) submetidas aos tratamentos: plantas não tratadas(NT), controlo (C), exsudado B (Exs B), exsudado C (Exs C) e mistura dos dois exsudados (Exs B+C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos dentro de cada cultivar.

Cultivar	Peso seco (%)					pH				
	NT	C	Exs B	Exs C	Exs B+C	NT	C	Exs B	Exs C	Exs B+C
Framboesas										
'12F37'	14,2 \pm 0,5	14,4 \pm 0,5	14,3 \pm 0,4	14,2 \pm 0,4	13,8 \pm 0,6	2,90 \pm 0,05	2,91 \pm 0,05	2,96 \pm 0,05	2,96 \pm 0,06	2,90 \pm 0,08
'Clarita'	13,6 \pm 0,6	14,3 \pm 0,5	13,9 \pm 0,4	13,6 \pm 0,2	13,6 \pm 0,5	2,98 \pm 0,05	2,91 \pm 0,05	3,00 \pm 0,05	2,93 \pm 0,11	2,95 \pm 0,08
'13F82'	12,4 \pm 0,5	12,0 \pm 0,7	11,7 \pm 0,9	11,5 \pm 0,6	12,0 \pm 0,9	3,10 \pm 0,05	3,15 \pm 0,06	3,18 \pm 0,05	3,20 \pm 0,15	3,15 \pm 0,08
Morangos										
'Felicity'	8,6 \pm 0,1	8,5 \pm 0,5	8,3 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2	2,92 \pm 0,05	2,97 \pm 0,03	2,92 \pm 0,05	2,92 \pm 0,06	2,97 \pm 0,08
'Fortuna'	9,5 \pm 0,1	9,5 \pm 0,1	9,5 \pm 0,2	9,5 \pm 0,1	9,6 \pm 0,1	2,93 \pm 0,05	2,83 \pm 0,03	2,90 \pm 0,05	2,92 \pm 0,06	2,97 \pm 0,08
'Leticia'	9,0 \pm 0,1	9,0 \pm 0,1	9,1 \pm 0,1	9,0 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	3,08 \pm 0,05	3,07 \pm 0,03	3,02 \pm 0,05	2,95 \pm 0,05	2,89 \pm 0,08

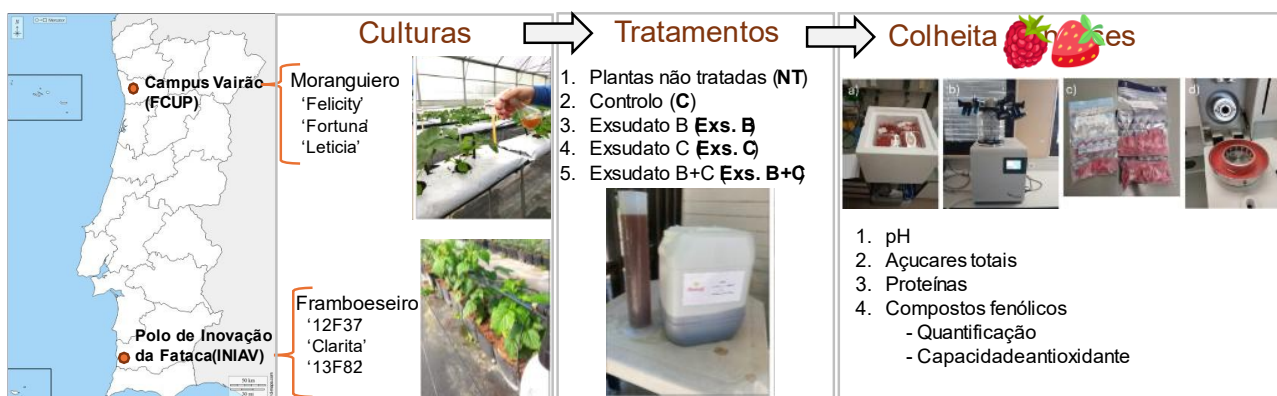


Figura 1 - Localização das estufas nas quais decorreram os ensaios com as plantas de moranguieiro e framboeseiro de três cultivares, bem como a indicação dos tratamentos aplicados e das análises realizadas.

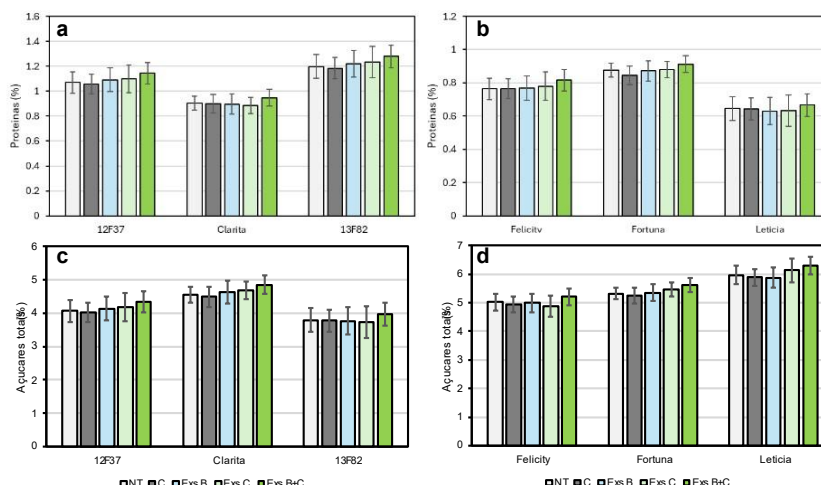


Figura 2 - Teor de proteínas (a, b) e de açúcares totais (c, d) nos frutos de diferentes cultivares de framboesa e de morango, submetidas aos vários tratamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

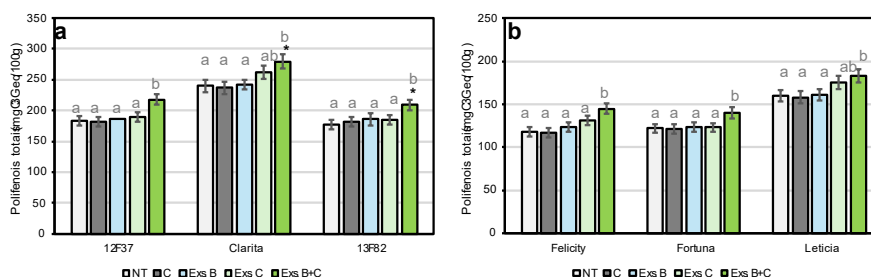


Figura 3 - Conteúdo de polifenóis (mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g) nos frutos de diferentes cultivares de framboesa (a) e morango (b) submetidos aos vários tratamentos. Para cada cultivar, as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

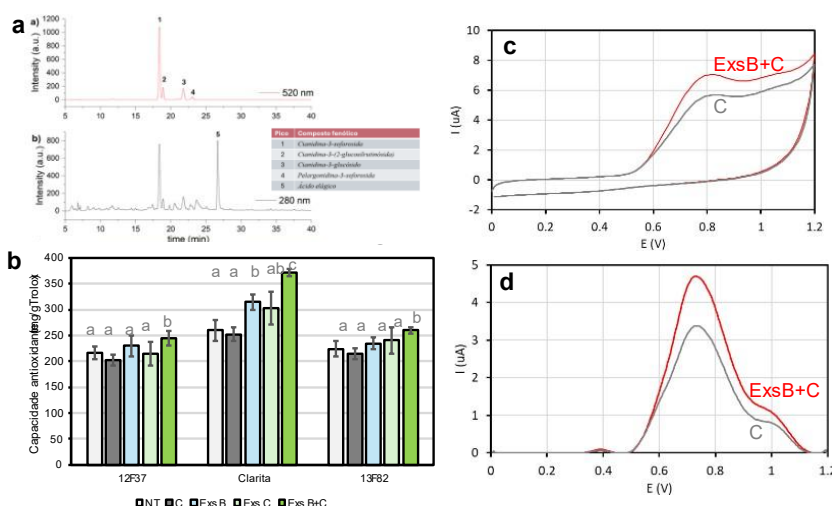


Figura 4 - (a) Cromatogramas de HPLC de um extrato representativo de framboesa com a identificação dos compostos. (b) Capacidade antioxidante (mg de trolox por 100 g) das framboesas determinada pelo método DPPH. Exemplo de voltamograma cíclico (c) e voltamograma em onda quadrada (d) das amostras de framboesa da cultivar ‘Clarita’ da condição controlo (C) e do tratamento Exs B+C.

Pequenos frutos e a doença de Parkinson: uma abordagem alimentar para proteger o cérebro e o intestino

Carlos Pita^{1,2}, Rafael Carecho^{2,3}, Catarina Pinto^{1,2}, Natasa Loncarevic-Vasiljkovic¹, María Ángeles Ávila-Gálvez^{4,5}, Pedro B. Oliveira⁶, Cláudia Nunes dos Santos^{1,2,3,5}

¹INOVA4Health, NOVA Institute Medical Systems Biology, NIMSB, Universidade Nova de Lisboa, 1099-085 Lisboa, Portugal;

²NMS, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal;

³ITQB, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA de Lisboa, Avenida da República, 2780-157 Oeiras, Portugal;

⁴Laboratory of Food and Health, Research Group on Quality, Safety, and Bioactivity of Plant Foods, Campus de Espinardo, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain.

⁵iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Avenida da República, apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal;

⁶INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal;

Resumo

O envelhecimento da população coloca novos desafios para a saúde pública e para a produção agrícola. Neste contexto, os pequenos frutos ganham destaque, não apenas pelo seu valor económico, mas também pelas suas propriedades bioativas ricas em (poli)fenóis. Neste trabalho investigaram-se os efeitos de uma dieta enriquecida com pequenos frutos (mirtilos, framboesas e amoras) na saúde cerebral e intestinal num modelo animal da doença de Parkinson. Esta é uma condição neurodegenerativa sem cura, comum em idades avançadas e marcada por sintomas motores debilitantes, como tremores e rigidez, mas também por perturbações não motoras precoces, nomeadamente ao nível gastrointestinal. A ligação entre o cérebro e o intestino tem vindo a assumir um papel central no desenvolvimento da doença de Parkinson, sendo considerada um elemento-chave na sua compreensão e abordagem terapêutica. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se os metabolitos de baixo peso molecular resultantes do metabolismo dos (poli)fenóis destes frutos poderiam exercer um efeito protetor no eixo intestino-cérebro. Ratos foram alimentados com uma dieta suplementada durante seis semanas antes da administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), uma toxina que mimetiza a degeneração dopaminérgica característica da doença de Parkinson. Avaliou-se o impacto da dieta na função motora, na neuroinflamação, na integridade neuronal, na inflamação intestinal e na composição da microbiota. Observou-se que a suplementação atenuou os défices motores, reduziu a inflamação cerebral e intestinal e promoveu uma microbiota mais equilibrada, com aumento de bactérias produtoras de metabolitos benéficos. Conclui-se que o consumo regular de pequenos frutos poderá constituir uma estratégia alimentar adjuvante para atenuar fenótipos associados à doença de Parkinson e ao envelhecimento. Estes resultados reforçam a importância da valorização nutricional dos pequenos frutos produzidos em Portugal, tanto pela sua relevância em saúde pública como pelo seu impacto económico e agrícola.

Palavras-chave: (Poli)fenóis, doenças neurodegenerativas, neuroproteção, microbiota, saúde intestinal

Abstract

Population ageing poses new challenges for public health and agricultural production. In this context, berries have gained relevance not only for their economic value but also for their bioactive properties rich in (poly)phenols. In this study, we investigated the effects of a diet enriched with berries (blueberries, raspberries, and blackberries) on brain and gut health in an animal model of Parkinson's disease. This neurodegenerative condition has no cure, is common in older age, and is characterised by debilitating motor symptoms, such as tremors and rigidity, as well as by early non-motor disturbances, namely gastrointestinal dysfunction. The connection between the brain and the gut has increasingly been recognised as central to the development of Parkinson's disease and is considered a key element for its understanding and therapeutic management. Thus, this study aimed to evaluate whether low-molecular-weight metabolites derived from the metabolism of (poly)phenols in these fruits could exert a protective effect on the gut-brain axis. Mice were fed a berry-enriched diet for six weeks prior to the administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a toxin that mimics the dopaminergic degeneration characteristic of Parkinson's disease. The impact of the diet was subsequently assessed on motor performance, neuroinflammation, neuronal integrity, intestinal inflammation, and microbiota composition. Supplementation attenuated motor deficits, reduced brain and intestinal inflammation, and promoted a more balanced microbiota profile, with an increase in bacteria producing beneficial metabolites. In conclusion, regular consumption of berries may constitute an adjuvant dietary strategy to mitigate phenotypes associated with Parkinson's disease and ageing. These results also highlight the nutritional value of berries produced in Portugal, underlining both their public health relevance and their agricultural and economic impact.

Keywords: Gut microbiota, intestinal health, neurodegenerative diseases, neuroprotection, (poly)phenols

IntroduçãoEnvelhecimento populacional e impacto das doenças neurodegenerativas

O aumento contínuo da esperança média de vida tem conduzido a uma população cada vez mais envelhecida, o que, por sua vez, está a impulsionar o crescimento das doenças neurodegenerativas a nível mundial (1). Estes distúrbios crónicos acarretam não só consequências devastadoras a nível pessoal e familiar, mas também constituem um desafio significativo para a saúde pública, devido às necessidades de cuidados prolongados e ao seu impacto socioeconómico (1). A demência, considerada a condição neurodegenerativa mais prevalente, encontra-se atualmente entre as principais causas de incapacidade e dependência em todo o mundo (2). Apesar do agravamento contínuo do impacto destas doenças, os tratamentos disponíveis são, na sua maioria, de carácter sintomático e oferecem apenas benefícios limitados no abrandamento da sua progressão (3). Não existe cura nem tratamento modificador da doença para patologias prevalentes como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, o que evidencia a necessidade urgente de novas estratégias centradas na prevenção ou no adiamento da sua manifestação (3). Neste contexto, intervenções relacionadas com o estilo de vida e a nutrição têm ganho destaque como potenciais abordagens adjuvantes. Em particular, dietas ricas em compostos bioativos, como os polifenóis, têm sido estudadas pela sua capacidade de reforçar a resiliência contra a neurodegeneração associada ao envelhecimento (4). Cada

vez mais, os investigadores encaram estas estratégias preventivas como um complemento às terapias tradicionais, procurando dar resposta às necessidades ainda não satisfeitas de uma sociedade em envelhecimento (3).

Doença de Parkinson: impacto e fisiopatologia

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, logo após a doença de Alzheimer (5). Do ponto de vista patológico, caracteriza-se pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* do mesencéfalo e pela acumulação intraneuronal de agregados de α -sinucleína, designados corpos de Lewy. Esta neurodegeneração conduz aos sintomas motores da DP: bradicinésia (lentidão dos movimentos), rigidez muscular, instabilidade postural e tremor em repouso (5). Estes défices motores, que definem o diagnóstico clínico, tornam-se geralmente evidentes apenas após uma perda significativa de neurónios dopaminérgicos. Para além das manifestações motoras, a DP é atualmente entendida como uma doença multissistémica, com um amplo espectro de sintomas não motores. Os doentes apresentam frequentemente disfunções autonómicas, alterações cognitivas e perturbações do humor e, de forma relevante, muitas destas manifestações podem preceder o aparecimento dos sinais motores por vários anos ou mesmo décadas (6). A obstipação crónica, por exemplo, é um dos sintomas precoces mais comuns e pode surgir muito antes do início dos sintomas motores, em alguns casos até 20 anos antes do diagnóstico (6). Estas observações são consistentes com a hipótese do eixo intestino-cérebro na patogénese da doença de Parkinson (DP). Evidências crescentes indicam que a doença poderá ter origem, pelo menos em parte, no trato gastrointestinal, progredindo subsequentemente para o sistema nervoso central através de conexões neurais. Em fases iniciais, é frequente a presença de comprometimento da barreira intestinal (intestino permeável), associado a alterações da composição da microbiota (7). Este ambiente intestinal disfuncional pode desencadear inflamação local e favorecer a estruturação anómala e agregação da α -sinucleína no sistema nervoso entérico. Modelos neuropatológicos sugerem que estes agregados patogénicos podem propagar-se do intestino para o cérebro através do nervo vago, atingindo os neurónios nigroestriatais e contribuindo para a progressão da neurodegeneração (7). Esta hipótese tem suporte experimental, uma vez que estudos em animais demonstraram que a interrupção da inervação vagal pode impedir a disseminação da patologia para o sistema nervoso central. De forma concordante, dados epidemiológicos mostram que indivíduos submetidos a vagotomia precoce apresentam um risco inferior de desenvolver DP (8). Em síntese, a DP é atualmente reconhecida como uma condição resultante da interação entre fatores centrais e periféricos, na qual a neuroinflamação, a disbiose intestinal e a propagação transneuronal de proteínas tóxicas desempenham papéis determinantes. Este enquadramento abre novas perspetivas de intervenção, sugerindo que o controlo de fatores periféricos, como a saúde intestinal, poderá contribuir para modular a progressão da doença.

Dieta, polifenóis e neuroproteção

Entre os vários fatores de estilo de vida, a alimentação desempenha um papel determinante na modulação da inflamação sistémica e da microbiota intestinal, dois elementos intimamente associados ao risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Em particular, padrões alimentares ricos em frutas e hortícolas fornecem quantidades elevadas de (poli)fenóis, fitoquímicos bioativos reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (9). Pequenos frutos, como mirtilos,

framboesas e amoras, são especialmente ricos em compostos polifenólicos (nomeadamente flavonoides, como as antocianinas) e, por esse motivo, têm despertado interesse pelo seu potencial efeito neuroprotetor. Evidências experimentais sugerem que estes compostos e os seus metabolitos podem exercer múltiplos benefícios, incluindo a neutralização de espécies reativas de oxigénio, a inibição de vias pró-inflamatórias e a preservação da integridade do eixo intestino-cérebro. Os polifenóis têm ainda sido associados à promoção da saúde intestinal, em parte por modularem a microbiota no sentido de um perfil mais equilibrado (10). Alterações na composição da microbiota, como o aumento de géneros benéficos, nomeadamente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e a redução de bactérias pró-inflamatórias, têm sido consistentemente associadas ao consumo de polifenóis (11). Estas modificações microbianas podem originar padrões distintos de metabolização, conduzindo à produção de metabolitos como ácidos gordos de cadeia curta e precursores de neurotransmissores, com impacto em processos inflamatórios e de sinalização neuronal do hospedeiro (12). Assim, através de mecanismos mediados pela microbiota, os polifenóis dietéticos podem contribuir indiretamente para a atenuação da inflamação intestinal e sistémica implicada na neurodegeneração. Adicionalmente, muitos polifenóis são metabolizados por bactérias intestinais em metabolitos fenólicos de baixo peso molecular, os quais atingem a circulação em concentrações mais elevadas e permanecem por períodos mais prolongados do que os compostos originais (1). Evidências crescentes indicam que estes metabolitos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e atuar diretamente no sistema nervoso central (13). Foram, por exemplo, detetados metabolitos fenólicos no cérebro após suplementação dietética, alguns dos quais demonstraram capacidade de modular vias neuronais associadas à memória e à neuroinflamação (14). Ensaio clínicos e estudos em humanos, embora ainda limitados, sustentam os potenciais benefícios neurológicos das dietas ricas em polifenóis. Estudos demonstraram que o consumo elevado de pequenos frutos está associado um declínio cognitivo mais gradual (1). Adicionalmente, outros ensaios clínicos evidenciaram que a ingestão de mirtilos ou de outros alimentos ricos em flavonoides promove melhorias na função cognitiva em diferentes faixas etárias. Estes efeitos indicam estar relacionados com a redução da neuroinflamação e do stress oxidativo, bem como com a melhoria da função cerebrovascular (15,16). Em modelos animais de neurodegeneração, a suplementação com polifenóis revelou-se eficaz na preservação da viabilidade neuronal e na atenuação de défices comportamentais, reforçando a sua ação neuroprotetora (1). Contudo, importa reconhecer que a evidência atual permanece fragmentada, frequentemente centrada em domínios isolados, como o desempenho cognitivo ou a análise de vias moleculares específicas. Torna-se, assim, necessária investigação mais abrangente que integre estes diferentes resultados e avalie de que forma intervenções dietéticas ricas em polifenóis influenciam globalmente o eixo intestino-cérebro no contexto das doenças neurodegenerativas.

Lacuna de conhecimento e objetivos do presente estudo

Apesar das evidências de que os polifenóis provenientes da dieta podem exercer efeitos neuroprotetores, poucos estudos avaliaram simultaneamente parâmetros do sistema nervoso central e parâmetros periféricos (intestinais) no mesmo modelo experimental de doença de Parkinson (15). Em termos práticos, continua pouco explorado de que forma uma intervenção dietética rica em polifenóis pode, de forma concomitante, influenciar a função motora, a neuroinflamação e a sobrevivência neuronal no cérebro, bem como a patologia intestinal e a composição da microbiota, em contexto de DP. O esclarecimento desta lacuna é fundamental para compreender o potencial protetor

integrado dos polifenóis ao longo do eixo intestino-cérebro. O presente estudo foi concebido para responder a esta necessidade, recorrendo a um modelo de DP induzido por toxina e a uma dieta enriquecida com uma combinação de pequenos frutos. Especificamente, avaliou-se se a suplementação com mirtilos, framboesas e amoras, frutos particularmente ricos em polifenóis, poderia exercer um efeito protetor no eixo intestino-cérebro num modelo roedor de DP. Para tal, utilizou-se o modelo de rato tratado com a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que tem a capacidade de destruir seletivamente os neurónios dopaminérgicos nigroestriatais, reproduzindo múltiplos marcadores patológicos da doença, incluindo a perda de neurónios dopaminérgicos, a depleção estriatal de dopamina, a neuroinflamação glial e os défices motores (17). Com este modelo, foram analisados de forma integrada: o comportamento motor, para avaliação dos défices funcionais; os marcadores neuroinflamatórios e neuronais no mesencéfalo, para caracterização da patologia central; e a saúde intestinal e os perfis da microbiota, para caracterização da patologia intestinal e da disbiose microbiana. Formulou-se a hipótese de que a dieta suplementada com frutos atenuaria os défices motores induzidos por MPTP, reduziria as respostas inflamatórias centrais e a perda de neurónios dopaminérgicos e, em simultâneo, promoveria um ambiente intestinal mais saudável, refletido numa melhor integridade da barreira e numa microbiota mais equilibrada. Através desta análise multidimensional, o objetivo foi determinar se os polifenóis dietéticos podem, de facto, conferir uma proteção integrada ao longo do eixo intestino-cérebro na doença de Parkinson, contribuindo potencialmente para o desenvolvimento de novas estratégias nutricionais preventivas ou de terapias adjuvantes em doenças neurodegenerativas.

Material e Métodos

Ensaio animal

O fenótipo semelhante à doença de Parkinson foi induzido em ratos machos *C57BL/6J* através da administração aguda de MPTP. Para este estudo, ratos com 4 semanas de idade foram obtidos da Charles River Laboratories (França). À chegada, os animais permaneceram em quarentena durante uma semana, seguida de uma semana de aclimatização. Foram alojados em pares num ambiente controlado (20–22 °C, 55% de humidade relativa, ciclo de luz/escuro de 12 h), com acesso *ad libitum* a água e alimento. Às 6 semanas de idade, os ratos foram aleatoriamente distribuídos por quatro grupos experimentais: dieta normal + salina (C), dieta com pequenos frutos + salina (B), dieta normal + MPTP (MPTP) e dieta com pequenos frutos + MPTP (B+MPTP). Dois grupos receberam dieta standard (Teklad 2018, Envigo, EUA), enquanto os restantes receberam uma dieta enriquecida com 8% (p/p) de pó liofilizado de pequenos frutos (mistura de mirtilos *Vaccinium spp.* cv. Star, framboesas *Rubus idaeus L.* cv. Kweli e amoras *Rubus spp. L.* cv. Loch Ness), provenientes da região de Odemira, Portugal. O modelo agudo de MPTP consistiu em quatro injeções intraperitoneais (i.p.) de 15 mg/kg, administradas a intervalos de 2 h. Os animais foram sacrificados 24 h ou 7 dias após a administração. Todos os procedimentos respeitaram a legislação portuguesa e europeia (Diretiva 2010/63/UE), com aprovação da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, licença n.º 0421/000/000/2021), e foram realizados por investigadores acreditados pela FELASA/DGAV.

Comportamento animal

No teste da corda, cada rato foi colocado numa corda de aço de 1 m de comprimento e 3 mm de diâmetro, coberta por material plástico lavável, suspensa a 60

cm de altura, com plataformas de saída em ambas as extremidades. Após treino prévio, o rato era colocado no centro da corda e registava-se o tempo até alcançar a plataforma (máx. 60 s). A avaliação foi repetida três vezes por animal, sendo calculada a média do tempo e da pontuação (3 = alcançou a plataforma, 2 = permaneceu na corda até 60 s sem alcançar a plataforma, 1 = queda). A análise da marcha foi composta por uma passadeira em acrílico de 80 cm com iluminação por FTIR (frustrated total internal reflection) e câmara de alta resolução (60 fps). Cada animal realizou pelo menos três passagens espontâneas.

Avaliação cerebral

A neuroinflamação foi avaliada por imunohistoquímica para Iba1. Foram obtidos cortes coronais (20 μm) do córtex motor, estriado e *substantia nigra pars compacta* (SNpc), com intervalos de 400 μm para córtex e estriado e 200 μm para a SNpc. Em cada região, foram analisadas seis secções de quatro cérebros por grupo. Retângulos padronizados (500 \times 1000 μm) foram sobrepostos em diferentes áreas de interesse. As áreas das células Iba1-positivas foram medidas com o software ImageJ, contabilizando-se ≥ 100 células por animal e ≥ 400 por grupo/região. A análise foi realizada por observador cego ao grupo experimental.

Análise da microbiota intestinal

O DNA bacteriano foi extraído de fezes e conteúdos intestinais com o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), com etapa adicional de disrupção mecânica. O DNA foi eluído em 30 μl de água livre de nucleases, quantificado e avaliado quanto à pureza com o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Os amplicões do gene 16S rRNA foram preparados por PCR em duas etapas com dupla indexação e sequenciados no sistema Illumina MiSeq.

Resultados e Discussão

O ensaio animal foi conduzido em ratos C57BL/6J alimentados durante seis semanas com uma dieta enriquecida com 8% de pequenos frutos (mirtilos, framboesas e amoras), seguida da indução do modelo de doença de Parkinson por administração de MPTP (Figura 1A). Este desenho experimental permitiu avaliar o impacto da intervenção da dieta no comportamento motor, na inflamação cerebral e intestinal e na composição da microbiota.

A suplementação com pequenos frutos atenuou os défices motores induzidos por MPTP, traduzidos em melhorias na coordenação, no equilíbrio e no movimento (Figura 1B). Este efeito protetor é consistente com trabalhos prévios que demonstraram que dietas ricas em (poli)fenóis, reduzem os défices motores em modelos animais de Parkinson, possivelmente através da preservação da neurotransmissão dopaminérgica e da redução do stress oxidativo (4). Estes resultados reforçam a relevância da dieta como estratégia adjuvante na modulação de fenótipos motores associados à neurodegeneração.

A dieta enriquecida com pequenos frutos aumentou a riqueza da microbiota e promoveu uma comunidade funcionalmente mais eficiente, associada a uma atenuação da resposta inflamatória intestinal induzida por MPTP (Figura 1C). Estudos anteriores mostraram que o consumo de polifenóis favorece o crescimento de famílias microbianas benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, reduzindo simultaneamente a abundância de bactérias pró-inflamatórias (9,10). Estas alterações microbianas conduzem a uma maior produção de metabolitos derivados da fermentação, como os ácidos gordos de cadeia curta, com reconhecida ação anti-inflamatória e relevância para a homeostase

intestinal e a comunicação no eixo intestino-cérebro (9). Assim, os nossos resultados sugerem que a modulação microbiana poderá contribuir de forma significativa para os efeitos neuroprotetores observados.

Na *substantia nigra pars compacta*, a administração de MPTP resultou em neuroinflamação marcada, refletida no aumento do número de micróglia e no aumento do tamanho dos seus corpos celulares, indicadores de reatividade microglial. Estes efeitos foram prevenidos nos animais suplementados com pequenos frutos (Figura 1D). Estes resultados estão de acordo com estudos que demonstraram que polifenóis dietéticos reduzem a reatividade microglial e a libertação de citocinas pró-inflamatórias em modelos de neurodegeneração (17). Adicionalmente, metabolitos fenólicos de baixo peso molecular derivados da microbiota intestinal têm sido identificados no cérebro após suplementação e demonstraram atuar em vias associadas à neuroinflamação e à preservação neuronal, reforçando a hipótese de um efeito protetor direto (13).

Conclusões

Em síntese, a dieta enriquecida com pequenos frutos demonstrou exercer um efeito protetor multidimensional no modelo murino de doença de Parkinson induzido por MPTP, atenuando os défices motores, reduzindo a neuroinflamação na *substantia nigra pars compacta* e mitigando a inflamação intestinal, enquanto promoveu uma microbiota mais rica e funcionalmente eficiente. Estes resultados reforçam a relevância de intervenções nutricionais ricas em (poli)fenóis como potenciais estratégias adjuvantes na prevenção e na progressão de doenças neurodegenerativas, sugerindo que a modulação do eixo intestino-cérebro poderá constituir uma via promissora para novas abordagens terapêuticas.

Referências Bibliográficas

- Carregosa D, Mota S, Ferreira S, Alves-Dias B, Loncarevic-Vasiljkovic N, Crespo CL, et al. Overview of Beneficial Effects of (Poly)phenol Metabolites in the Context of Neurodegenerative Diseases on Model Organisms. *Nutrients*. 2021 Aug 25;13(9):2940.
- WHO. World Health Organization (WHO) - Dementia. 2025.
- Jiang Q, Liu J, Huang S, Wang XY, Chen X, Liu GH, et al. Antiageing strategy for neurodegenerative diseases: from mechanisms to clinical advances. *Signal Transduct Target Ther*. 2025 Mar 10;10(1):76.
- Arias-Sánchez RA, Torner L, Fenton Navarro B. Polyphenols and Neurodegenerative Diseases: Potential Effects and Mechanisms of Neuroprotection. *Molecules*. 2023 Jul 14;28(14).
- Yang K, Wu Z, Long J, Li W, Wang X, Hu N, et al. White matter changes in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2023 Oct 31;9(1):150.
- Palanivel M, Ghosh KK, Mallam M, Bhuvanakantham R, Padmanabhan P, Lim KL, et al. Imaging advances to detect non-motor prodromal markers of Parkinson's disease and explore therapeutic translation opportunities. *NPJ Parkinsons Dis*. 2025 Jun 18;11(1):174.
- Harsanyiova J, Buday T, Kralova Trancikova A. Parkinson's Disease and the Gut: Future Perspectives for Early Diagnosis. *Front Neurosci*. 2020 Jun 17;14.
- Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2015 Oct 17;78(4):522–9.

- Liu S, Cheng L, Liu Y, Zhan S, Wu Z, Zhang X. Relationship between Dietary Polyphenols and Gut Microbiota: New Clues to Improve Cognitive Disorders, Mood Disorders and Circadian Rhythms. *Foods*. 2023 Mar 19;12(6):1309.
- Zhang Y, Yu W, Zhang L, Wang M, Chang W. The Interaction of Polyphenols and the Gut Microbiota in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 2022 Dec 17;14(24):5373.
- Ma G, Chen Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. *J Funct Foods*. 2020 Mar; 66:103829.
- Wang X, Qi Y, Zheng H. Dietary Polyphenol, Gut Microbiota, and Health Benefits. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jun 20;11(6).
- Figueira I, Garcia G, Pimpão RC, Terrasso AP, Costa I, Almeida AF, et al. Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Sci Rep*. 2017 Sep 13;7(1):11456.
- Kujawska M, Jodynis-Liebert J. Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies. *Nutrients*. 2018 May 19;10(5):642.
- Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, et al. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem*. 2010 Apr 14;58(7):3996–4000.
- Miller MG, Hamilton DA, Joseph JA, Shukitt-Hale B. Dietary blueberry improves cognition among older adults in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr*. 2018 Apr 10;57(3):1169–80.
- Lee E, Hwang I, Park S, Hong S, Hwang B, Cho Y, et al. MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration. *Cell Death Differ*. 2019 Feb 21;26(2):213–28.

Agradecimentos/Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo European Research Council (ERC) no âmbito do programa de investigação e inovação Horizon 2020 da União Europeia, através do contrato de financiamento n.º 804229; e pelo projeto Horizon Europe da União Europeia (101060346). Unidade de Investigação UID/04462: iNOVA4Health – Programa em Medicina Translacional; e LS4FUTURE Laboratório Associado (LA/P/0087/2020), cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia / Ministério da Educação, Ciência e Inovação, através de fundos nacionais. Os autores gostariam ainda de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concedido a Carlos Pita (2023.00453.BD). Agradecimentos adicionais ao Doutor Pedro Oliveira do INIAV pelo fornecimento dos pequenos frutos para o ensaio.

Quadros e Figuras

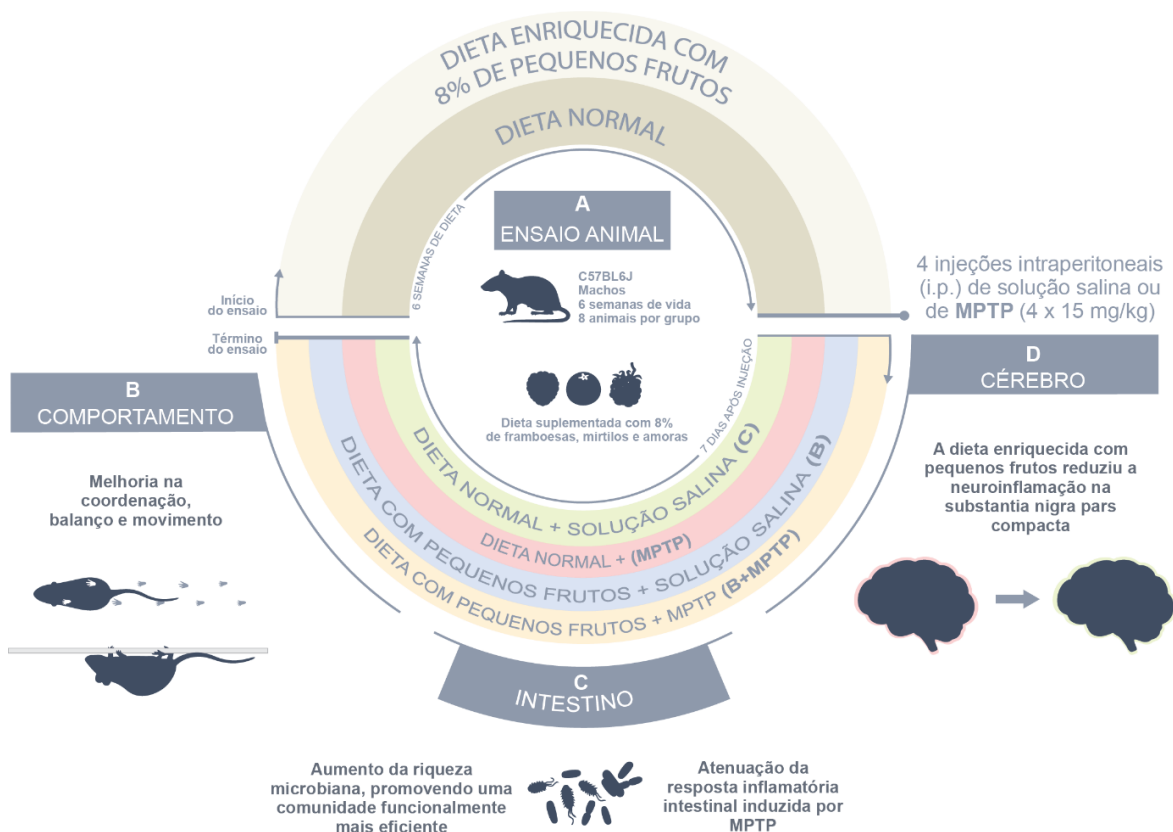


Figura 1 - Desenho experimental e principais efeitos da dieta enriquecida com pequenos frutos em modelo murino de doença de Parkinson induzido por MPTP.

(A) Esquema do ensaio animal: ratos machos C57BL/6J (6 semanas de idade; n=8/grupo) foram alimentados durante seis semanas com dieta normal ou dieta suplementada com 8% de pequenos frutos (mirtilos, framboesas e amoras). Posteriormente, metade dos animais de cada grupo recebeu quatro injeções intraperitoneais (i.p.) de MPTP (15 mg/kg) para indução de um fenótipo semelhante à doença de Parkinson, enquanto a outra metade recebeu solução salina. Foram assim constituídos quatro grupos: controlo (C), dieta com frutos (B), (MPTP) e dieta com frutos+MPTP (B+MPTP). (B) Comportamento: a suplementação com pequenos frutos atenuou os défices motores induzidos por MPTP, refletidos em melhorias na coordenação, equilíbrio e movimento. (C) Intestino: a dieta com pequenos frutos aumentou a riqueza microbiana, promovendo uma comunidade funcionalmente mais eficiente, e atenuou a resposta inflamatória intestinal induzida por MPTP. (D) Cérebro: na *substantia nigra pars compacta*, a dieta suplementada preveniu a neuroinflamação induzida por MPTP, reduzindo a reatividade microglial.

Suplementação da dieta com pequenos frutos altera a microbiota intestinal

Catarina J. G. Pinto^{1,2,3,4}, David Berry⁵, Pedro Moura-Alves^{3,4,6}, Pedro B. Oliveira⁷, Cláudia Nunes dos Santos^{1,2}

¹iNOVA4Health, NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa; Lisboa, Portugal;

²iNOVA4Health, NOVA Institute Medical Systems Biology, NIMSB, Universidade Nova de Lisboa, 1099-085 Lisboa, Portugal;

³IBMC, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Rua Alfredo Allen, 208, 4200-135, Porto, Portugal;

⁴I3S, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Rua Alfredo Allen, 208, 4200-135, Porto, Portugal;

⁵Centre for Microbiology and Environmental Systems Science, Department of Microbiology and Ecosystem Science, Division of Microbial Ecology, University of Vienna, Djerassiplatz 1, 1030 Vienna, Austria;

⁶Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, OX3 7DQ, Oxford, United Kingdom;

⁷INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal;

Resumo

O microbioma intestinal é um ecossistema complexo e dinâmico, composto por diversas comunidades microbianas e seus elementos genéticos e metabolitos. Desempenha funções essenciais no desenvolvimento intestinal, homeostasia, modulação imunitária e produção de nutrientes. A dieta é um fator crítico na modulação da sua composição. Este estudo investigou o impacto de uma dieta suplementada com 8% (p/p) de uma mistura de pequenos frutos (amoras, framboesas, mirtilos) na microbiota intestinal de rato C57BL/6, durante uma semana. Foram realizadas análises temporais (3^o e 6^o dias) e espaciais ao longo do trato gastrointestinal. Os resultados revelaram alterações rápidas e significativas na estrutura e diversidade microbiana. Diferenças significativas entre grupos foram detetadas três dias após o início da suplementação. Após sete dias, observou-se uma reestruturação da comunidade microbiana, com alterações mais pronunciadas no íleo e ceco. A suplementação com (poli)fenóis aumentou significativamente a diversidade microbiana. Concluiu-se que uma dieta enriquecida com pequenos frutos induz mudanças rápidas e regionalmente distintas na microbiota intestinal.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana, diversidade, intestino, (poli)fenóis, rato.

Abstract

The gut microbiome is a complex and dynamic ecosystem composed of diverse microbial communities and their genetic elements and metabolites. It plays essential roles in intestinal development, homeostasis, immune modulation, and nutrient production. Diet is a critical factor in modulating its composition. This study investigated the impact of a diet supplemented with 8% (w/w) of a berry mixture (blackberries, raspberries, and blueberries) on the gut microbiota of C57BL/6 mice over one week. Temporal (days 3 and 6) and spatial analyses along the gastrointestinal tract were conducted. The results revealed rapid and significant changes in microbial structure and diversity. Significant

differences between groups were detected three days after the start of supplementation. After seven days, a restructuring of the microbial community was observed, with the most pronounced changes in the ileum and cecum. (Poly)phenol supplementation significantly increased microbial diversity. It was concluded that a berry-enriched diet induces rapid and regionally distinct changes in the gut microbiota.

Keywords: Bacterial community, diversity, gut, mouse, (poly)phenols.

Introdução

A microbiota intestinal influencia significativamente o seu hospedeiro, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e homeostasia do intestino, estimulando o sistema imunitário intestinal (Hillman et al., 2017; Kelly et al., 2004) e contribuindo para a proteção contra patógenos, a produção de vitaminas e a fermentação de alimentos (Hillman et al., 2017; Hou et al., 2022). A composição microbiana do trato intestinal, que inclui o estômago, intestino delgado, ceco e cólon, varia espacialmente. Esta variabilidade é influenciada pelas características únicas de cada estrutura intestinal, podendo levar a diferentes funções específicas (Hillman et al., 2017).

A dieta influencia significativamente a microbiota intestinal, levando a alterações na sua composição microbiana e a modificações tanto no transcriptoma microbiano como no do hospedeiro. Estas alterações afetam o conjunto de metabolitos no intestino e, conseqüentemente, os metabolitos em circulação (Bourdeau-Julien et al., 2023; Ross et al., 2024; Valdes et al., 2018). Por exemplo, modificações dietéticas podem impactar a produção de ácidos gordos de cadeia curta e a síntese de ácidos biliares secundários, os quais são cruciais para vários processos funcionais, incluindo a modulação do sistema imunitário e o metabolismo (O’Keefe et al., 2015; Valdes et al., 2018).

Dietas ricas em alimentos de origem vegetal, como a dieta mediterrânea, são conhecidas pela sua elevada ingestão de fitoquímicos, incluindo (poli)fenóis. As bagas, que são abundantes em (poli)fenóis como as antocianinas e as elagitaninas, demonstraram influenciar a microbiota intestinal através de um efeito prebiótico (Lavefve et al., 2020; Ross et al., 2024). Estudos mostram que os (poli)fenóis das bagas podem modular seletivamente as bactérias intestinais, promovendo estirpes benéficas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Akkermansia*, enquanto reduzem bactérias nocivas como *Salmonella* e *Staphylococcus* (Gomes et al., 2019; Lavefve et al., 2020). Esta modulação melhora a saúde intestinal e contribui para benefícios sistêmicos, incluindo melhor saúde cardiovascular e redução da inflamação (Gomes et al., 2019; Ross et al., 2024).

Embora esteja bem documentado que os (poli)fenóis dietéticos podem influenciar a microbiota intestinal (Catalkaya et al., 2020; Lavefve et al., 2020; Narduzzi et al., 2022; Tomás-Barberán et al., 2016), a progressão destas alterações durante a suplementação permanece menos compreendida. Adicionalmente, as dinâmicas espaciais das alterações intestinais durante o consumo de bagas não foram exploradas minuciosamente. Aqui, descrevemos o impacto na microbiota, de um regime alimentar com uma dieta rica em (poli)fenóis. As nossas descobertas revelam alterações microbianas significativas após apenas três dias de uma dieta enriquecida com bagas, que se mantiveram até ao final do ensaio. Adicionalmente, revelamos como esta dieta afeta a microbiota das várias secções do trato intestinal.

Materiais e Métodos

Animais, desenho experimental e colheita de amostras

Para o ensaio de suplementação alimentar de curta duração, foram utilizados ratos machos C57BL/6J com 11 semanas de idade (adquiridos com 7 semanas de idade às Charles River Laboratories, França). Sete pares de irmãos foram separados em 2 grupos, ficando 1 irmão em cada grupo para evitar o efeito de ninhada. Os animais foram alojados aos pares com separadores de acrílico para evitar aloprofagia e contacto direto entre eles.

Os animais foram alimentados com ração normal (Teklad 2018, Envigo, EUA) ou com uma ração rica em (poli)fenóis, contendo 8% de bagas liofilizadas (quantidades iguais de mirtilos (*Vaccinium spp.*, variedade Star), amoras-pretas (*Rubus spp. L.*, variedade Loch Ness) e framboesas (*Rubus idaeus L.*, variedade Kweli) produzidas na região de Odemira, Portugal). O consumo de alimento foi monitorizado diariamente e foi fornecido alimento fresco todos os dias, durante 7 dias.

Foram recolhidas fezes frescas de cada animal em tubos livres de DNase e RNase nos dias 0, 3 e 6 para análise posterior. As amostras foram armazenadas a -80°C até utilização. No 7.º dia, os animais foram anestesiados com isoflurano e perfundidos com solução salina. O intestino, desde o estômago até ao ânus, foi removido intacto e colocado numa placa de Petri estéril. Utilizando instrumentos estéreis e começando no estômago, o intestino delgado foi cortado em três porções de tamanho igual, consistindo no duodeno e jejuno (SI1), jejuno (SI2) e jejuno e íleo (SI3), e separadamente o ceco, como representativo do microbiota do intestino grosso. O conteúdo de cada secção foi recolhido através de massagem manual do intestino, sendo guardado em tubos livres de DNase e RNase. Imediatamente após a recolha, os tubos foram congelados e armazenados a -80°C.

Todos os experiências envolvendo animais foram aprovadas pela Comissão de Ética da NOVA Medical School e pela Entidade Nacional Portuguesa (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária; Ref.^a 0421/000/000/2021), que está em conformidade com a Diretiva Europeia 86/609/CEE do Conselho Europeu.

Extração de ADN microbiano e análise 16S

A extração de ADN bacteriano foi realizada com um *kit* QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen #50951604) a partir de fezes dos animais ou dos conteúdos intestinais, de acordo com as instruções do fabricante, mas com uma etapa adicional de disrupção mecânica, conforme descrito por outros (Thompson et al., 2015). No final da extração, o DNA foi eluído com 30 µl de água livre de DNase e RNase (Fisher Scientific # 10295243). As colunas foram incubadas durante 5 min à temperatura ambiente e centrifugadas à velocidade máxima durante 1 min para eluir o DNA. O DNA foi quantificado e a sua pureza foi avaliada utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Os amplicões do gene do rRNA 16S foram preparados numa abordagem de PCR em duas etapas com código de barras duplo e sequenciados num Illumina MiSeq, conforme descrito em detalhe em Pjevac et al. (Pjevac et al., 2021).

Resultados e Discussão

De forma a estudar o impacto de uma dieta rica em (poli)fenóis na microbiota dois grupos de animais foram alimentados durante sete dias com ração padrão (grupo controlo, C) ou com ração padrão suplementada com 8% de uma mistura de pequenos frutos (grupo bagas, B) composta por quantidades iguais de framboesa, amora e mirtilo. Não houve alterações no padrão e quantidade de comida ingerida pelos animais devido à

suplementação, e também não se observaram alterações a nível do peso dos animais (resultados não disponibilizados).

Embora esteja descrito que a suplementação da dieta com (poli)fenóis pode influenciar a microbiota intestinal, a forma como essa alteração evolui durante a suplementação é menos conhecida (Catalkaya et al., 2020; Lavefve et al., 2020; Narduzzi et al., 2022; Tomás-Barberán et al., 2016). A caracterização da microbiota nas fezes dos animais aos dias zero, três (resultados não disponibilizados), e seis, permitiu calcular o número de famílias e o índice de diversidade microbiana, nessas mesmas amostras (Figura 1). Tendo em conta o número de famílias (Figura 1.a), pode-se observar que não há uma alteração da abundância de famílias ao longo do tempo. No entanto, observa-se uma alteração significativa na diversidade microbiana a nível da família entre os dias zero e seis, no grupo dos animais suplementados, grupo B, bem como diferenças significativas entre a diversidade microbiana dos animais que consumiram a dieta controlo e os animais que consumiram a comida suplementada (Figura 1.b) ao sexto dia. Este resultado indica que a suplementação da dieta não causa alterações a nível da riqueza de famílias microbianas, ou seja, não há alteração do número de famílias presentes, mas há um aumento da diversidade da microbiota. Apesar de outros autores já terem atestado a capacidade de modulação da microbiota pela ação dos (poli)fenóis presentes na dieta (Cano et al., 2024; Catalkaya et al., 2020; Lavefve et al., 2020; Narduzzi et al., 2022; Tomás-Barberán et al., 2016), este trabalho mostra que esta alteração pode ocorrer muito rapidamente, em poucos dias, e que os (poli)fenóis presentes na dieta promovem um aumento da diversidade microbiana, normalmente associados a uma microbiota saudável (Hou et al., 2022).

No ponto final da experiência, o trato gastrointestinal completo foi recolhido. O intestino delgado foi dividido em 3 secções de tamanho igual: a SI1, correspondente ao duodeno e à parte superior do jejuno; a SI2, correspondente à parte média do jejuno; e a SI3, correspondente à parte inferior do jejuno e ao íleo. O ceco foi também separado para utilizarmos como *proxy* para o intestino grosso. Os conteúdos foram utilizados para estudar o impacto da suplementação na microbiota de cada uma destas secções de intestino. Os resultados mostram que a suplementação da dieta não promoveu alterações a nível da riqueza de famílias em nenhuma das secções intestinais analisadas (Figura 2.a). No que toca à diversidade microbiana das famílias presentes nas amostras, observa-se que a suplementação da dieta promoveu um aumento da diversidade microbiana nas secções SI3, correspondente à parte inferior do jejuno e ao íleo, e no ceco. Este aumento pode indicar uma alteração da composição microbiana, bem como indicar alterações a nível da funcionalidade da microbiota nestas secções. Em suma, estes dados permitem compreender de que forma uma dieta rica em (poli)fenóis impacta diferentes famílias bacterianas e a sua distribuição espacial ao longo do intestino.

Conclusões

Em suma, este estudo demonstra que uma suplementação da dieta de curta duração com (poli)fenóis de bagas induz alterações microbianas rápidas e significativas, sem afetar o consumo ou peso corporal. Conclui-se que a suplementação aumenta rapidamente a diversidade microbiana (sem alterar a riqueza de famílias), promovendo um perfil comunitário mais saudável. As alterações são espacialmente distintas, sendo o efeito mais pronunciado no íleo e no ceco, onde é expectável que a concentração e tempo de permanência dos compostos são maiores. A riqueza de famílias manteve-se estável em todas as secções, confirmando que a modulação ocorre via redistribuição da abundância relativa das bactérias existentes. Estes resultados evidenciam que os (poli)fenóis

modulam de forma rápida e seletiva a microbiota intestinal, com impactos potencialmente significativos para a saúde do hospedeiro.

Agradecimentos/Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo European Research Council (ERC) no âmbito do programa de investigação e inovação Horizon 2020 da União Europeia, através do contrato de financiamento n.º 804229; e pelo projeto Horizon Europe da União Europeia (101060346). Unidade de Investigação UID/04462: iNOVA4Health – Programa em Medicina Translacional; e LS4FUTURE Laboratório Associado (LA/P/0087/2020), cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia / Ministério da Educação, Ciência e Inovação, através de fundos nacionais. P. Moura-Alves reconhece o apoio do Ludwig Institute for Cancer Research-Core Award. P. Moura-Alves reconhece também o apoio do H2020-WIDESPREAD-2018-951921-ImmunoHUB. Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concedido a Catarina J.G. Pinto (2022.11465.BD). Os autores gostariam ainda de agradecer ao Doutor Pedro Oliveira, do Instituto Nacional Investigação Agrária e Veterinária I.P., pelo fornecimento dos pequenos frutos para o ensaio animal.

Referências Bibliográficas

- Bourdeau-Julien, I., Castonguay-Paradis, S., Rochefort, G., Perron, J., Lamarche, B., Flamand, N., Di Marzo, V., Veilleux, A., & Raymond, F. (2023). The diet rapidly and differentially affects the gut microbiota and host lipid mediators in a healthy population. *Microbiome*, *11*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01469-2>
- Cano, R., Bermúdez, V., Galban, N., Garrido, B., Santeliz, R., Gotera, M. P., Duran, P., Boscan, A., Carbonell-Zabaleta, A.-K., Durán-Agüero, S., Rojas-Gómez, D., González-Casanova, J., Díaz-Vásquez, W., Chacín, M., & Angarita Dávila, L. (2024). Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Cross-Talk: Molecular and Therapeutic Perspectives for Cardiometabolic Disease: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(16), 9118. <https://doi.org/10.3390/ijms25169118>
- Catalkaya, G., Venema, K., Lucini, L., Rocchetti, G., Delmas, D., Daglia, M., De Filippis, A., Xiao, H., Quiles, J. L., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2020). Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health. *Food Frontiers*, *1*(2), 109–133. <https://doi.org/10.1002/fft2.25>
- Gomes, Oudot, Macià, Foito, Carregosa, Stewart, Van de Wiele, Berry, Motilva, Brenner, & dos Santos. (2019). Berry-Enriched Diet in Salt-Sensitive Hypertensive Rats: Metabolic Fate of (Poly)Phenols and the Role of Gut Microbiota. *Nutrients*, *11*(11), 2634. <https://doi.org/10.3390/nu11112634>
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, *32*(4), 300–313. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., & Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol*, *5*(1), 104–112. <https://doi.org/10.1038/ni1018>

- Lavefve, L., Howard, L. R., & Carbonero, F. (2020). Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. *Food and Function*, *11*(1), 45–65. <https://doi.org/10.1039/c9fo01634a>
- Narduzzi, L., Agulló, V., Favari, C., Tosi, N., Mignogna, C., Crozier, A., Del Rio, D., & Mena, P. (2022). (Poly)phenolic compounds and gut microbiome: new opportunities for personalized nutrition. *Microbiome Research Reports*, *1*(2), 16. <https://doi.org/10.20517/mrr.2022.06>
- O’Keefe, S. J. D., Li, J. V., Lahti, L., Ou, J., Carbonero, F., Mohammed, K., Posma, J. M., Kinross, J., Wahl, E., Ruder, E., Vipperla, K., Naidoo, V., Mtshali, L., Tims, S., Puylaert, P. G. B., DeLany, J., Krasinskas, A., Benefiel, A. C., Kaseb, H. O., ... Zoetendal, E. G. (2015). Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nature Communications*, *6*(1), 6342. <https://doi.org/10.1038/ncomms7342>
- Pjevac, P., Hausmann, B., Schwarz, J., Kohl, G., Herbold, C. W., Loy, A., & Berry, D. (2021). An Economical and Flexible Dual Barcoding, Two-Step PCR Approach for Highly Multiplexed Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669776>
- Ross, F. C., Patangia, D., Grimaud, G., Lavelle, A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2024). The interplay between diet and the gut microbiome: implications for health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, *22*(11), 671–686. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01068-4>
- Thompson, J. A., Oliveira, R. A., Djukovic, A., Ubeda, C., & Xavier, K. B. (2015). Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota. *Cell Reports*, *10*(11), 1861–1871. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.049>
- Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2016). Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *19*(6), 471–476. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000314>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>

Quadros e Figuras

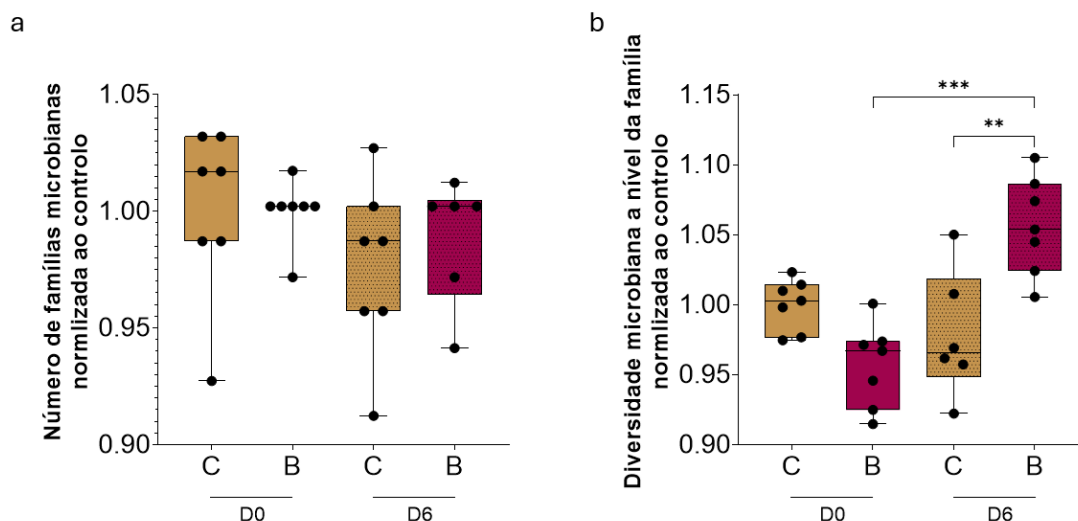


Figura 1 – Suplementação da dieta promove alterações na diversidade microbiana ao longo do tempo. (a) Número de famílias microbianas, normalizado ao respetivo controlo, para os grupos controlo (C) e suplementado com pequenos frutos (B), nos dias zero e seis após o início da suplementação. (b) Diversidade microbiana a nível da família, normalizada ao respetivo controlo, para os grupos controlo (C) e suplementado com pequenos frutos (B), nos dias zero e seis após o início da suplementação. ANOVA com $n=6/7$ e $**p\text{-value}<0,01$, $***p\text{-value}<0,001$.

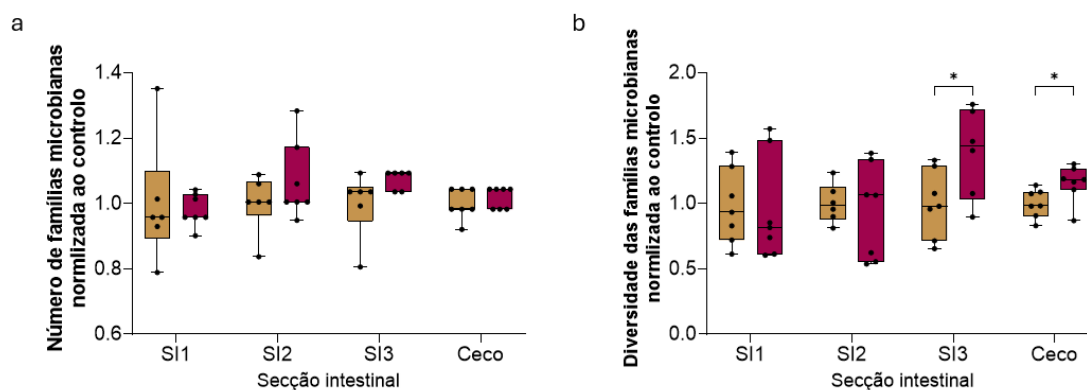


Figura 2 – Suplementação da dieta promove alterações na diversidade microbiana em diferentes secções do intestino. (a) Número de famílias microbianas, normalizado ao respetivo controlo, para os grupos controlo (C) e suplementado com pequenos frutos (B) ao longo das diferentes secções do intestino analisadas, sete dias após o início da suplementação. (b) Diversidade microbiana a nível da família, normalizada ao respetivo controlo, para os grupos controlo (C) e suplementado com pequenos frutos (B), ao longo das diferentes secções do intestino analisadas, sete dias após o início da suplementação. Teste *t-student* com $n=6/7$ e $*p\text{-value}<0,05$.

Avaliação preliminar da eficácia de revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de mirtilos

Clara Silva^{1,2}, Mafalda Silva¹, Ana Cristina Ramos^{2,3}, Pedro B. Oliveira², Elsa M. Gonçalves^{2,3}

¹Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica;

²INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras;

³Centro de Investigação GeoBioTec, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica.

Resumo

A elevada perecibilidade do mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) constitui um desafio para a sua conservação pós-colheita. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes revestimentos comestíveis aplicados por duas metodologias (spray e imersão) na preservação da qualidade de mirtilos armazenados a 18 °C durante 14 dias. Os revestimentos testados foram: quitosano adicionado de glicerol (1,25% e 2,5% (p/v)), gelatina+quitosano e pectina. Como controlo utilizou-se uma amostra sem revestimento. Foram avaliados a perda de peso (%), sinais visuais de murchamento (número de frutos afetados em 10) e aparecimento de bolores (número de frutos afetados em 10). Os resultados mostraram que os revestimentos à base de quitosano, sobretudo em combinação com glicerol e aplicados por imersão, apresentaram maior eficácia, com perda de peso <5% aos 14 dias, murchamento reduzido (até 2 frutos em 10) e ausência de bolores. O controlo e a pectina por spray revelaram maior degradação, com 70–90% dos frutos afetados e presença de fungos. Estes resultados demonstram o potencial dos revestimentos comestíveis de quitosano na conservação pós-colheita de mirtilos, podendo constituir alternativa sustentável às embalagens convencionais.

Palavras-chave: Tratamentos pós-colheita; quitosano; revestimentos edíveis; murchamento; bolores.

Abstract

The high perishability of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) poses a challenge for their post-harvest conservation. This study aimed to evaluate the effectiveness of different edible coatings applied by two methodologies (spray and immersion) in preserving the quality of blueberries stored at 18 °C for 14 days. The coatings tested were: chitosan with added glycerol (1.25% and 2.5% (p/v)), gelatin+chitosan and pectin. An uncoated sample was used as a control. Weight loss (%), visual signs of wilting (number of affected fruits in 10) and mould appearance (number of affected fruits in 10) were evaluated. The results showed that chitosan-based coatings, especially in combination with glycerol and applied by immersion, were more effective, with weight loss <5% at 14 days, reduced wilting (up to 2 fruits in 10) and no mould. The control and sprayed pectin showed greater degradation, with 70–90% of the fruits affected and the presence of fungi. These results demonstrate the potential of edible chitosan coatings in the post-harvest conservation of blueberries, which may be a sustainable alternative to conventional packaging.

Keywords: Post-harvest treatments; chitosan; edible coatings; wilting; moulds.

Introdução

O mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) é um pequeno fruto amplamente valorizado pelo seu perfil nutricional e sensorial. Rico em antocianinas, ácidos fenólicos, vitaminas C e K, fibras e compostos antioxidantes, é frequentemente associado a benefícios para a saúde, como a redução do risco de doenças cardiovasculares e o fortalecimento da resposta imunológica (Pires et al., 2020). Do ponto de vista sensorial, a firmeza da polpa, a integridade da película e o equilíbrio entre acidez e doçura são atributos críticos de qualidade para a aceitação do consumidor (Paniagua et al., 2013). Contudo, devido à sua elevada taxa respiratória, à ausência de cutícula espessa e à suscetibilidade a danos mecânicos e infeções fúngicas (sobretudo por *Botrytis cinerea*), os mirtilos apresentam curta vida útil pós-colheita, deteriorando-se rapidamente sob condições de armazenamento inadequadas (Chu et al., 2018; Romanazzi et al., 2018).

Estima-se que perdas pós-colheita em pequenos frutos possam ultrapassar os 30%, em cadeias de distribuição prolongadas, principalmente por perda de água, murchamento, amolecimento e desenvolvimento de bolores (Gidado et al., 2024). Nesse sentido, estratégias de conservação que prolonguem a vida útil, sem comprometer a qualidade sensorial, são essenciais para reduzir o desperdício alimentar e melhorar a rentabilidade da cadeia de valor.

Entre as abordagens estudadas, os revestimentos comestíveis têm-se destacado como alternativas sustentáveis às embalagens convencionais. Definidos como filmes finos aplicados sobre a superfície dos frutos, atuam como barreiras semipermeáveis que modulam as trocas gasosas, reduzem a transpiração e limitam o crescimento microbiano (Usman et al., 2025). Além disso, podem ser enriquecidos com plastificantes, antioxidantes ou antimicrobianos naturais, ampliando a proteção e contribuindo para manter atributos sensoriais como frescura, cor, brilho e firmeza (Jafarzadeh et al., 2021; Ascencio-Arteaga et al., 2022; Pham et al., 2023; Hossen, et al., 2024).

O quitosano, em particular, tem atraído atenção pela sua versatilidade: além da formação de filmes resistentes e transparentes, possui reconhecida atividade antimicrobiana e antioxidante (Dutta et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que o quitosano, quando combinado com compostos bioativos ou plastificantes como glicerol, pode prolongar a vida útil de frutos como morangos, amoras e mirtilos, preservando firmeza, cor e conteúdo fenólico (Petriccione et al., 2015; Eldib et al., 2020; Ascencio-Arteaga, et al., 2022; Gigante et al., 2025). Outros biopolímeros, como a gelatina e a pectina, também têm sido explorados, embora muitas vezes com eficácia limitada quando comparados ao quitosano isolado (Romanazzi et al., 2018). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes revestimentos comestíveis (quitosano com glicerol em duas concentrações, gelatina+quitosano e pectina), aplicados por pulverização ou imersão, na conservação pós-colheita de mirtilos armazenados a 18 °C durante 14 dias, analisando parâmetros como perda de peso, murchamento e aparecimento de bolores.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram utilizados mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) recém-colhidos, selecionados quanto à uniformidade de cor, tamanho e ausência de defeitos visíveis. Após a colheita, os frutos foram submetidos a higienização em solução de hipoclorito de sódio

(100 mg L⁻¹) durante 2 minutos, com o objetivo de reduzir a carga microbiana superficial, e posteriormente secos manualmente com papel absorvente. O material experimental foi subdividido em amostras idênticas, constituídas por lotes homogêneos de frutos, destinados à aplicação dos diferentes tratamentos.

Tratamentos

Os revestimentos comestíveis testados incluíram: (i) quitosano adicionado de glicerol em duas concentrações — 1,25% (p/v) (QG1) e 2,5% (p/v) (QG2); (ii) gelatina associada ao quitosano (GQ); (iii) pectina (P). Como grupo de comparação, utilizou-se uma amostra controlo, composta por frutos sem revestimento.

Métodos de aplicação

Os revestimentos foram aplicados por duas metodologias: pulverização (S), através de um atomizador manual, até à completa cobertura da superfície dos frutos; e imersão (I), mergulhando os frutos na solução formadora de filme durante 2 minutos, repetindo-se a operação duas vezes para assegurar a uniformidade da cobertura. Após a aplicação, os frutos foram escorridos e deixados a secar, em condições controladas, à temperatura ambiente.

Condições de armazenamento

As amostras tratadas foram armazenadas a 18 °C em ambiente controlado, simulando condições de conservação não refrigerada, durante 14 dias.

Avaliações

A qualidade das amostras foi monitorizada nos tempos 0, 2, 7 e 14 dias. Foram avaliados: (i) a perda de peso, expressa em percentagem relativa ao peso inicial (100%); (ii) sinais visuais de murchamento, registados pelo número de frutos afetados em lotes de 10 unidades; e (iii) o aparecimento de bolores, contabilizado igualmente pelo número de frutos afetados em lotes de 10 unidades. Foram ainda realizados registos fotográficos das amostras ao longo do período experimental, de modo a documentar visualmente a evolução da qualidade.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos em valores médios, considerando as repetições realizadas para cada tratamento (n=3). Para avaliar a significância das diferenças entre tratamentos e ao longo do tempo, foi utilizado um delineamento fatorial, com análise de variância (ANOVA) de dois fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Como se observa na Figura 1, a perda de peso (%) foi influenciada de forma significativa pelo tipo de revestimento e pelo método de aplicação ($p < 0,05$). O tratamento com quitosano associado a glicerol, aplicado por imersão (QG2_I), destacou-se como o mais eficaz, mantendo a perda de peso inferior a 5%, ao final de 14 dias de armazenamento a 18 °C.

Este resultado confirma a eficácia do quitosano na formação de uma barreira semipermeável, que reduz a transpiração e a taxa respiratória dos frutos (Dutta et al., 2009). Resultados semelhantes foram relatados por Hossen et al. (2024), ao demonstrarem que revestimentos de quitosano/gelatina enriquecidos com óleo essencial

encapsulado em β -ciclodextrina reduziram de forma expressiva a perda de massa e o apodrecimento em mirtilos armazenados por 16 dias. Os tratamentos com quitosano por spray (QG1_S e QG2_S) também reduziram a perda de peso, mas foram menos eficazes do que a imersão, confirmando que a uniformidade e a espessura da cobertura exercem um papel fundamental no desempenho dos revestimentos. Este efeito da metodologia de aplicação foi igualmente observado em melão minimamente processado por Mannozi et al. (2021), onde a imersão proporcionou maior preservação de massa e firmeza do que a pulverização. Em contraste, a pectina aplicada por spray (P_S) foi o tratamento menos eficiente, com perda de peso próxima de 40% no final do armazenamento. Apesar de ser um polissacarídeo capaz de formar filmes, a pectina apresenta elevada permeabilidade à água, o que compromete a sua eficácia na redução da desidratação (Pan et al., 2024). A aplicação por imersão (P_I) resultou em valores ligeiramente superiores, mas ainda substancialmente inferiores aos tratamentos com quitosano. As amostras controlo (sem revestimento) apresentaram perda de peso superior a 30% em apenas 14 dias, confirmando a elevada perecibilidade dos mirtilos em condições ambientais. Estes resultados estão de acordo com Paniagua et al. (2013), que identificaram a perda de água como o principal fator de redução de firmeza em mirtilos durante o armazenamento.

No que diz respeito ao murchamento (quadro 1), verificou-se uma progressão gradual ao longo do tempo, mas com diferenças marcantes entre os tratamentos. Nos frutos tratados com quitosano + glicerol por imersão (QG2_I), apenas 1–2 frutos em cada lote de 10 apresentaram sinais de murchamento ao 14.º dia, em contraste com o controlo, no qual 70% dos frutos se encontravam visivelmente murchos nesse mesmo período. Estes resultados confirmam que a redução da perda de água está diretamente associada à prevenção do murchamento, conforme também demonstrado por Arrubla Vélez et al (2021) em amora-preta revestida com filmes enriquecidos com *Aloe vera*, onde se verificou prolongamento da firmeza e redução da desidratação.

Nos tratamentos com gelatina+quitosano (GQ_S e GQ_I) e com quitosano+glicerol spray (QG1_S e QG2_S) verificou-se uma proteção parcial, com 40–60% dos frutos apresentando sinais de murchamento aos 14 dias. Embora menos eficazes que o quitosano+glicerol por imersão, estes tratamentos ainda superaram os resultados da pectina spray, em que 90% dos frutos se encontravam murchos no final do armazenamento.

Em relação ao aparecimento de bolores (quadro 1), os tratamentos com quitosano + glicerol (QG2_I e QG2_S) foram os mais eficazes, não se verificando desenvolvimento fúngico ao longo do período experimental. Este resultado confirma a reconhecida ação antifúngica do quitosano (Romanazzi et al., 2018; Mohamed et al., 2025). Por outro lado, em amostras tratadas com gelatina+quitosano e pectina observaram-se casos esporádicos de contaminação, enquanto no controlo, 30% dos frutos apresentaram colonização fúngica no 14.º dia, maioritariamente atribuída a *Botrytis cinerea*, patógeno de elevada incidência em pequenos frutos. Resultados semelhantes foram relatados em morangos por da Silva Simões et al. (2022), em que revestimentos de quitosano reduziram significativamente o desenvolvimento de bolores.

Na Figura 2, apresentam-se registos fotográficos exemplificativos da evolução da qualidade ao longo do tempo, comparando as amostras controlo e as tratadas com quitosano + glicerol por imersão (QG2_I). Observa-se que, enquanto os frutos controlo exibem sinais de murchamento logo no 2.º dia, acentuando-se até ao 14.º dia, os frutos revestidos com QG2 mantêm melhor aparência e integridade estrutural, corroborando os resultados quantitativos obtidos.

No presente estudo, os resultados demonstram que os revestimentos comestíveis à base de quitosano com glicerol, aplicados por imersão, constituem a estratégia mais eficaz para prolongar a vida útil dos mirtilos em condições de armazenamento ambiente (18 °C). Esta formulação revelou capacidade de reduzir a perda de peso, o murchamento e a ocorrência de bolores, em linha com estudos prévios realizados em mirtilos e outros pequenos frutos (Totad et al., 2020; da Silva Simões et al. 2022; Hosseini et al., 2023). Por outro lado, o fraco desempenho da pectina, particularmente em spray, evidencia limitações estruturais da sua matriz polimérica na formação de barreiras eficazes contra a perda de água. Assim, reforça-se o potencial do quitosano como componente central em revestimentos comestíveis para pequenos frutos, podendo constituir uma alternativa sustentável às embalagens convencionais e contribuindo para a redução do desperdício alimentar.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que os revestimentos comestíveis à base de quitosano associados ao glicerol, sobretudo quando aplicados por imersão, constituem uma estratégia eficaz para prolongar a vida útil de mirtilos armazenados em condições ambiente (18 °C). Esta formulação reduziu de forma significativa a perda de peso (<5% aos 14 dias), limitou o murchamento a apenas 1–2 frutos em cada lote de 10 e preveniu o desenvolvimento de bolores, contrastando com a rápida deterioração observada no controlo e com a eficácia limitada dos revestimentos de pectina e gelatina+quitosano.

Os resultados evidenciam que o quitosano, pela sua ação de barreira semipermeável e pelas propriedades antimicrobianas, pode ser integrado como ferramenta prática de manuseamento pós-colheita, contribuindo para reduzir perdas, manter a qualidade visual e estender a comercialização em mercados onde a refrigeração é limitada. Para os produtores, a aplicação por imersão apresenta-se como a técnica mais eficiente e economicamente viável, garantindo maior cobertura e proteção uniforme dos frutos.

Neste contexto, a adoção de revestimentos comestíveis à base de quitosano pode representar uma solução sustentável para a cadeia produtiva de pequenos frutos, reduzindo desperdícios, aumentando a rentabilidade e respondendo à crescente procura por tecnologias de conservação seguras e amigas do ambiente.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar o agradecimento pelo apoio financeiro do projeto IDFoods — Food System of The Future (Investigação e Desenvolvimento em Sistemas Agroalimentares Sustentáveis e Nutrição Saudável, cofinanciado pelo COMPETE2020 (Grant Agreement Id182848).

Referências Bibliográficas

- Ascencio-Arteaga, A., Luna-Suárez, S., Cárdenas-Valdovinos, J.G., Oregel-Zamudio, E., Oyoque-Salcedo, G., Ceja-Díaz, J.A., Angoa-Pérez, M.V., Mena-Violante, H.G. 2022. Shelf Life of Blackberry Fruits (*Rubus fruticosus*) with Edible Coatings Based on Candelilla Wax and Guar Gum. *Horticulturae* 8: 574. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070574>.
- Arrubla Vélez, J. P., Guerrero Álvarez, G. E., Vargas Soto, M. C., Cardona Hurtado, N., Pinzón, M. I., & Villa, C. C. 2021. Aloe Vera Gel Edible Coating for Shelf Life and Antioxidant Properties Preservation of Andean Blackberry. *Processes*, 9(6), 999. <https://doi.org/10.3390/pr9060999>

- Chu, W.; Gao, H.; Chen, H.; Fang, X.; Zheng, Y. 2018. Effects of cuticular wax on the postharvest quality of blueberry fruit. *Food Chem.* 239: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.024>.
- da Silva Simões, C. V., Stamford, T. C. M., Berger, L. R. R., Araújo, A. S., da Costa Medeiros, J. A., de Britto Lira Nogueira, M. C., Pintado, M. M. E., Salgado, S. M., & de Lima, M. A. B. 2025. Edible Alginate–Fungal Chitosan Coatings as Carriers for *Lactocaseibacillus casei* LC03 and Their Impact on Quality Parameters of Strawberries During Cold Storage. *Foods* 14(2): 203. <https://doi.org/10.3390/foods14020203>.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 114: 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>.
- Eldib, R., Khojah, E., Elhakem, A., Benajiba, N., Helal, M. 2020. Chitosan, Nisin, Silicon Dioxide Nanoparticles Coating Films Effects on Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Quality. *Coatings*, 10: 962. <https://doi.org/10.3390/coatings10100962>.
- Gidado, M.J.; Gunny, A.A.N.; Gopinath, S.C.B.; Ali, A.; Wongs-Aree, C.; Salleh, N.H.M. 2024. Challenges of postharvest water loss in fruits: Mechanisms, influencing factors, and effective control strategies—A comprehensive review. *J. Agric. Food Res.* 17.101249. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101249>.
- Gigante, V., Dal Pont, B., Cavallero, A., Sbrana, C., Fabbri, L.P., Gabriele, M., Aliotta, L. 2025. Designing eco-friendly edible coatings, valorising agro-wastes, to extend the shelf-life of post-harvest strawberries. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 11:100984. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2025.100984>.
- Hosseini, S.F., Mousavi, Z., McClements, D.J. 2023. Beeswax: A Review on the Recent Progress in the Development of Superhydrophobic Films/Coatings and Their Applications in Fruits Preservation. *Food Chem.*, 424, 136404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136404>
- Hassan, J., Anwar, R., Khan, A.S., Ahmad, S., Malik, A.U., Nafees, M., Hussain, Z., Inam-ur-Raheem, M. 2020. Chitosan-Based Edible Coating Delays Fungal Decay and Maintains Quality of Strawberries during Storage. *Int. J. Agric. Biol.* 24(3), 486–492. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1463>
- Hossen, M.A., Shimul, I.M., Sameen, D.E., Rasheed, Z., Tanga, W., Chen, M., Liu, Y. 2024. Chitosan/gelatin coating loaded with ginger essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex on quality and shelf life of blueberries. *Int. J. Biol. Macromol.* 279: 135026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135026>.
- Jafarzadeh, S., Nafchi, A.M., Salehabadi, A., Oladzad-Abbasabadi, N., Jafari, S.M. 2021. Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. *Adv. Colloid Interface Sci.* 291: 102405. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102405>.
- Mannozi, C., Glicerina, V., Tylewicz, U., Castagnini, J. M., Canali, G., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2021). Influence of Two Different Coating Application Methods on the Maintenance of the Nutritional Quality of Fresh-Cut Melon during Storage. *Applied Sciences*, 11(18), 8510. <https://doi.org/10.3390/app11188510>
- Mohamed, A.M.A., Ramaswamy, H.S. 2025. Caseinate–Carboxymethyl Chitosan Composite Edible Coating with Soybean Oil for Extending the Shelf Life of Blueberry Fruit. *Foods* 14: 2598. <https://doi.org/10.3390/foods14152598>.
- Pan, J., Li, C., Liu, J., Jiao, Z., Zhang, Q., Lv, Z., Yang, W., Chen, D., & Liu, H. (2024). Polysaccharide-Based Packaging Coatings and Films with Phenolic Compounds in Preservation of Fruits and Vegetables—A Review. *Foods*, 13(23), 3896. <https://doi.org/10.3390/foods13233896>

- Paniagua, A.C., East, A.R., Hindmarsh, J.P., Heyes, J.A. 2013. Moisture loss is the major cause of firmness change during postharvest storage of blueberry. *Postharvest Biol. Technol.* 79: 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.016>.
- Petriccione, M., Mastrobuoni, F., Pasquariello, M.S., Zampella, L., Nobis, E., Capriolo, G., Scortichini, M. 2015. Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage. *Foods* 4: 501–523. <https://doi.org/10.3390/foods4040501>.
- Pham, T.T., Nguyen, L.L.P., Dam, M.S., Baranyai, L. 2023. Application of Edible Coating in Extension of Fruit Shelf Life: Review. *AgriEngineering* 5: 520–536. <https://doi.org/10.3390/agriengineering5010034>.
- Pires, T.C.S.P., Caleja, C., Santos-Buelga, C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. 2020. *Vaccinium myrtillus* L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications—A Review. *Curr. Pharm. Des.*, 26: 1917–1928. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200317132507>.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S.B., Sivakumar, D. 2018. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58:572–581. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>.
- Totad, M.G., Sharma, R.R., Sethi, S., Verma, M.K. 2020. Effect of edible coatings on quality of blueberry fruits under supermarket storage conditions. *The Indian Journal of Agricultural Science* 90 (4): 780-3. <https://doi.org/10.56093/ijas.v90i4.102223>.
- Usman, I., Sana, S., Jaffar, H.M., Munir, M., Afzal, A., Sukhera, S., Boateng, I.D., Afzaal, M., Urugo, M.M. 2025. Recent Progress in Edible Films and Coatings: Toward Green and Sustainable Food Packaging Technologies. *Applied Food Research* 5(2): 101070. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101070>.

Quadros e Figuras

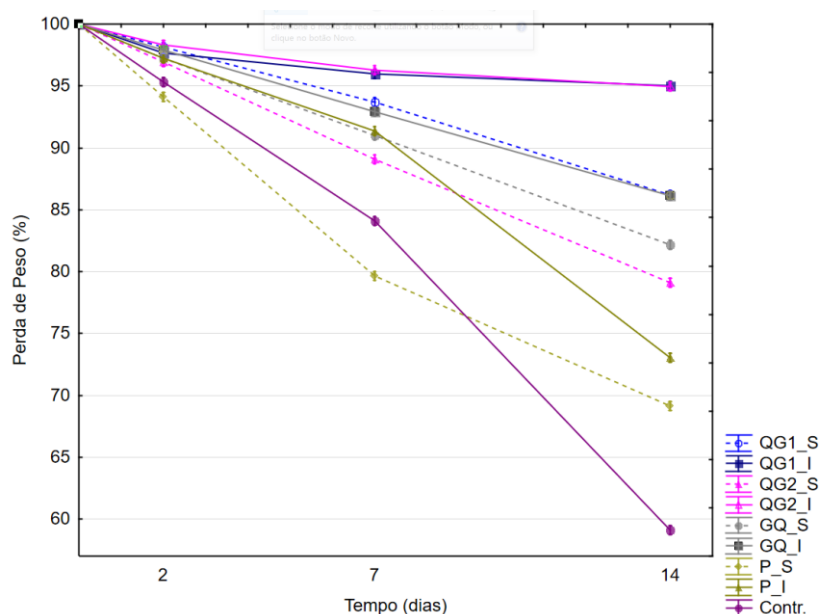


Figura 1 - Efeito dos diferentes tratamentos, na perda de peso (%) em mirtilos, ao longo do tempo de armazenamento.

Quadro 1 - Avaliação do murchamento e aparecimento de bolores em mirtilos submetidos a diferentes revestimentos e métodos de aplicação, durante o armazenamento.

Tratamentos	Sinais visuais de murchamento (nº de frutos em nº inicial de frutos, ni = 10)				Aparecimento de bolores (nº de frutos em nº inicial de frutos, ni = 10)			
	Tempo de armazenamento (dias)				Tempo de armazenamento (dias)			
	0	2	7	14	0	2	7	14
QG1_S	0	0	2	4	-	-	-	-
QG1_I	0	0	1	2	-	-	-	-
QG2_S	0	0	1	3	-	-	-	-
QG2_I	0	0	1	2	-	-	-	-
GQ_S	0	0	2	5	-	-	-	-
GQ_I	0	0	1	2	-	-	-	-
P_S	0	2	6	9	-	-	-	-
P_I	0	1	3	8	-	-	-	-
Contr.	0	3	7	10	-	-	1	3

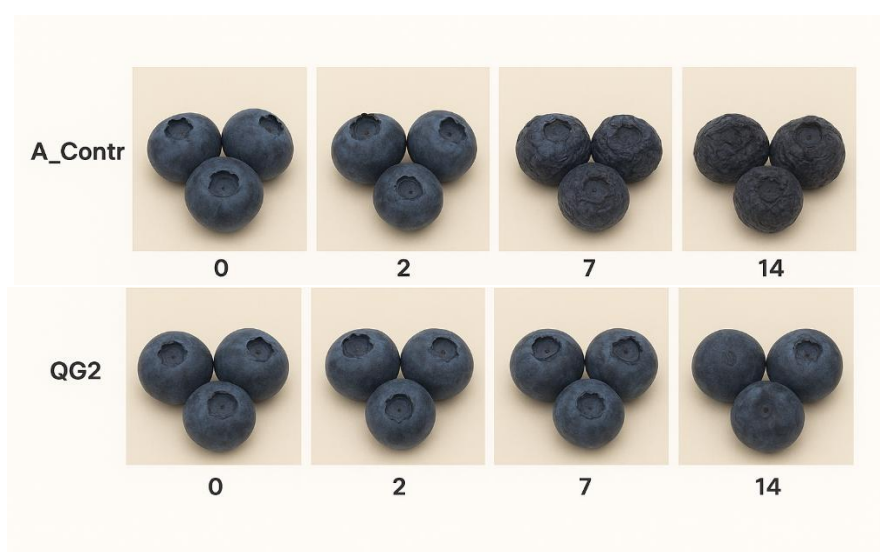


Figura 2 - Imagens das amostras de mirtilos sem revestimento (A_Contr) e com glicerol+quitosano (QG2), ao longo do armazenamento.

Resposta diferencial dos mirtilos à aplicação de inoculantes bacterianos para melhorar o rendimento, as qualidades organolépticas e a concentração de compostos bioativos

José David Flores-Félix^{1,2}, Ana Carolina Gonçalves^{2,3}, Sara Meirinho², Ana Raquel Nunes^{2,4}, Gilberto Alves², Cristina Garcia-Viguera⁵, Diego A. Moreno⁵, Luís R. Silva^{2,6,7*}

¹Microbiology and Genetics Department, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain;

²RISE/HEALTH-UBI, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal;

³CIBIT – Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

⁴CNC – Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Faculty of Medicine, 3004-504 Coimbra, Portugal;

⁵Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS), Department Food Science and Technology, CSIC, CEBAS, Campus Universitario 25, Espinardo, 30100 Murcia, Spain;

⁶SPRINT—Sport Physical Activity and Health Research & Innovation Center, Instituto Politécnico da Guarda, 6300-559 Guarda, Portugal;

⁷CERES, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, 3030-790 Coimbra, Portugal.

Resumo

A aplicação de biofortificantes bacterianos é uma técnica cada vez mais comum. Nos últimos anos, algumas estirpes demonstraram melhorar as qualidades nutracêuticas de várias culturas. Este estudo analisou o impacto da biofortificação com três estirpes bacterianas dos géneros *Rhizobium*, *Paenibacillus* e *Lactiplantibacillus* nas características nutricionais e na composição orgânica dos mirtilos em Portugal. O tratamento com *Paenibacillus* sp. VMFR46 mostrou um aumento de 71,36% e 79,88% na produção total. Os tratamentos biofortificados foram capazes de aumentar o grau Brix, o índice de maturação (até 48,05% para a cultivar Legacy e até 26,04% para a cultivar Duke) e o índice CIEL*a*b* em comparação com o controlo não inoculado. Assim, a concentração de compostos fenólicos aumentou no tratamento biofortificado e o seu perfil fenólico foi modificado. Alguns compostos, como a aglicona miricetina ou derivados da miricetina, são exclusivos dos frutos de plantas biofortificadas, com aumentos nas concentrações de compostos fenólicos relativamente à inoculação de *R. laguerreae* PEPV16 ou *Paenibacillus* sp. VMFR46 na cultivar Legacy. Essas modificações resultaram em melhores características nutracêuticas dos frutos obtidos.

Palavras-chave: Mirtilos; biofortificação; compostos fenólicos; probióticos; agricultura sustentável.

Abstract:

The application of bacterial biofortifiers is an increasingly common technique. In recent years, some strains have been shown to improve the nutraceutical qualities of various crops. This study analysed the impact of biofortification with three bacterial strains from the genera *Rhizobium*, *Paenibacillus*, and *Lactiplantibacillus* on the nutritional characteristics and organic composition of blueberries in Portugal. The treatment with *Paenibacillus* sp. VMFR46 showed a 71.36% and 79.88% increase in total production. The biofortified treatments were able to increase the Brix degree, the ripening index (up to 48.05% for the Legacy cultivar and up to 26.04% for the Duke cultivar), and the CIEL*a*b* index compared to the uninoculated control. Thus, the concentration of

phenolic compounds increased in the biofortified treatment, and its phenolic profile was modified. Some compounds, such as myricetin aglycone or myricetin derivatives, are exclusive to fruits from biofortified plants, with increases in phenolic compound concentrations related to inoculation of *R. laguerreae* PEPV16 or *Paenibacillus* sp. VMFR46 in the Legacy cultivar. These modifications resulted in improved nutraceutical characteristics of the fruits obtained.

Keywords: Blueberries; biofortification; phenolic compounds; probiotics; sustainable agriculture.

Introdução

Os mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) têm-se tornado cada vez mais um ponto focal da investigação nutricional devido à sua rica composição de compostos fenólicos, que conferem propriedades antioxidantes e promotoras da saúde consideráveis. Essas moléculas bioativas, incluindo antocianinas, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos, contribuem não só para a coloração vibrante da fruta, mas também para a sua utilidade na mitigação do stress oxidativo, inflamação e doenças crónicas (Brito et al., 2014; Pap et al., 2021).

A procura do mercado por mirtilos de alta qualidade, com propriedades organolépticas superiores e benefícios funcionais, impulsionou a busca por práticas de cultivo sustentáveis que aumentem tanto o rendimento quanto a qualidade dos frutos. Entre elas, a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) como biofertilizantes representa uma estratégia promissora (Bhardwaj et al., 2014; Flores-Félix et al., 2018). Esses micróbios benéficos influenciam o metabolismo das plantas, a absorção de nutrientes e a resistência sistémica, aumentando potencialmente a biossíntese de compostos bioativos e melhorando a resiliência ao stress.

Pesquisas anteriores destacaram o sucesso variado da inoculação bacteriana em diferentes culturas hortícolas; no entanto, estudos de campo abrangentes que avaliam os efeitos da biofortificação bacteriana na produção de mirtilo e na composição fitoquímica permanecem limitados. O presente trabalho investigou a aplicação de três estirpes bacterianas: *Rhizobium laguerreae* PEPV16, *Lactiplantibacillus plantarum* QSE79 e *Paenibacillus* sp. VMFR46, individualmente e em co-inoculação, em duas cultivares de mirtilo (“Legacy” e “Duke”) em condições de campo (Portugal), e caracterizadas por ótimos fatores edafoclimáticos.

Este estudo teve como objetivo elucidar os impactos desses biofertilizantes no desempenho da produtividade, nas características físico-químicas dos frutos, nas alterações do perfil fenólico e na capacidade antioxidante. As conclusões obtidas contribuirão para a otimização dos protocolos de cultivo assistido por microrganismos, promovendo o valor nutracêutico e económico dos mirtilos.

Material e Métodos

Desenho experimental e descrição local

Foram realizadas experiências de campo durante a época de cultivo de 2021 em dois locais agrícolas distintos na região da Beira Interior, em Portugal: Covilhã (40,1459°N, 7,2602°W) e Guarda (40,3641°N, 7,1024°W). Essas localidades têm uma longa história de cultivo de mirtilo, apresentando regimes climáticos temperados e condições de solo favoráveis ao desenvolvimento das espécies *Vaccinium*.

Plantas com dois anos das cultivares Legacy (Covilhã) e Duke (Guarda) foram cultivadas em linha com espaçamento de 1 m entre plantas e 1,5 m entre linhas, mantendo uma densidade de aproximadamente 6660 plantas por hectare. Práticas agrícolas sustentáveis integradas convencionais foram implementadas de forma uniforme.

Estirpes bacterianas e procedimentos de inoculação

As estirpes bacterianas utilizadas incluíram: (i) *Rhizobium laguerreae* PEPV16, que já havia demonstrado eficácia na promoção do crescimento das plantas e na biofertilização (Flores-Félix et al., 2021, 2018). (ii) *Lactiplantibacillus plantarum* QSE79, caracterizada por alta biossegurança e atributos probióticos (Nunes et al., 2022). (iii) *Paenibacillus* sp. VMFR46, isolada da rizosfera nativa de *Vaccinium*, apresentando efeitos benéficos.

Os tratamentos consistiram na aplicação na raiz de 50 mL de suspensões bacterianas a 1×10^7 unidades formadoras de colónias (UFC) por mL, aplicadas no início do desenvolvimento foliar. Um tratamento combinou PEPV16 com QSE79, enquanto nenhuma outra combinação de múltiplas estirpes foi testada para evitar interações antagónicas.

A gestão de nutrientes seguiu as taxas de fertirrigação de rotina, com azoto, fósforo, potássio, cálcio e magnésio fornecidos nas doses agronómicas recomendadas para um rendimento ideal.

Amostragem e medição dos parâmetros de rendimento

Os frutos foram colhidos manualmente na maturação comercial em datas escalonadas entre junho e julho de 2021. Os frutos frescos de cada bloco de tratamento foram imediatamente transportados em condições de refrigeração para análise laboratorial.

O rendimento foi avaliado pesando a massa total dos frutos por planta e calculando as estimativas de produção por hectare. Além disso, as características individuais dos frutos, incluindo peso, comprimento e largura, foram determinadas em subamostras utilizando balanças de precisão e calibradores digitais.

Análises físico-químicas

A firmeza foi medida utilizando um analisador de textura equipado com uma célula de carga de 50 N e uma sonda cónica para testes de penetração. Os valores de firmeza são expressos em Newtons (N). O sumo foi extraído de amostras de frutos agrupadas para avaliação das propriedades físico-químicas. Os sólidos solúveis totais (TSS) foram quantificados por refratometria e expressos em °Brix, os valores de pH foram medidos através de um medidor de pH de bancada calibrado e a acidez titulável (TA) foi determinada pela titulação do sumo com hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,1, reportada em gramas de ácido málico por 100 g de peso fresco. Esses ensaios foram realizados em triplicata usando homogeneizados independentes (Gonçalves et al., 2021).

Determinações colorimétricas

A cor da superfície dos frutos foi avaliada com base no espaço de cor CIELab (L*, a*, b*) utilizando um colorímetro. As medições foram realizadas em dois pontos equatoriais equidistantes por fruto em amostras selecionadas aleatoriamente.

Extração e perfil fenólico

Amostras de frutos liofilizados em pó foram submetidas à extração com solvente utilizando etanol a 70%. Os extratos foram fracionados em frações fenólicas ricas em antocianinas e sem antocianinas utilizando extração em fase sólida C18 (Gonçalves et al., 2020).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de matriz de díodos e espectrometria de massa em tandem (HPLC-DAD-ESI-MSⁿ) foi utilizada para identificar provisoriamente compostos fenólicos individuais com base em padrões de fragmentação, tempos de retenção e comparação com padrões autênticos.

A quantificação dos principais compostos fenólicos, incluindo ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e antocianinas, foi calculada em relação às curvas de calibração preparadas com padrões analíticos.

Ensaio da atividade antioxidante

O potencial antioxidante do extrato foi avaliado através de vários protocolos de interseção dos radicais livres, como o ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), que mediu a capacidade de doação de elétrons, o ensaio de interseção do óxido nítrico ([•]NO), que avaliou a inibição de espécies reativas de azoto, e a eliminação do radical anião superóxido (O₂^{•-}), que determinou a capacidade contra espécies reativas de oxigénio. O ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo e todos os testes foram realizados em triplicado.

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando ANOVA unidirecional com teste *post hoc* de Tukey para comparação de médias ($\alpha=0,05$). Os procedimentos estatísticos foram efetuados no software GraphPad Prism.

Resultados e Discussão

Rendimento e características morfológicas

A aplicação de inoculantes bacterianos aumentou significativamente a produtividade do mirtilo nos locais da Covilhã e da Guarda, em comparação com os controlos não inoculados. Notavelmente, o tratamento com *Paenibacillus* sp. VMFR46 resultou em aumentos de rendimento de aproximadamente 71,4% e 79,9% em relação aos controlos na Covilhã e na Guarda, respetivamente. Estes ganhos substanciais sublinham a eficácia desta estirpe na promoção da absorção de nutrientes e do vigor das plantas em condições de campo.

A estirpe PEPV16 também demonstrou melhorias significativas no rendimento, com aumentos que variaram entre 57% e 67%, dependendo da cultivar e do local. A co-inoculação com PEPV16 e QSE79 produziu efeitos sinérgicos, resultando em melhorias comparáveis aos tratamentos com uma única estirpe, sugerindo compatibilidade mútua e benefícios aditivos na modulação das comunidades rizosféricas e endofíticas.

Os parâmetros de tamanho dos frutos, incluindo peso, comprimento e largura, mostraram um aumento significativo nos tratamentos inoculados. Os frutos Legacy inoculados com PEPV16 apresentaram o maior peso médio (2,83 g), superando o controlo em 15% (tabela 1). Essas mudanças provavelmente refletem uma melhor alocação de hidratos de carbono e sinalização hormonal mediada por PGPB.

Propriedades físico-químicas dos frutos

A firmeza, um atributo crítico que influencia a vida útil pós-colheita, apresentou um aumento modesto, mas significativo, nos frutos inoculados, particularmente sob o tratamento VMFR46. A melhoria na firmeza pode ser atribuída à indução microbiana de enzimas de fortalecimento da parede celular e modificações na composição da pectina.

O total de sólidos solúveis, que representa o teor de açúcar, foi mais elevado nos mirtilos biofertilizados, o que é consistente com o aumento da eficiência fotossintética e da translocação de açúcar. Por exemplo, os frutos tratados com QSE79 apresentaram aumentos de TSS de até 13,56 °Brix, em comparação com 11,87 °Brix nos controles. A acidez titulável diminuiu ligeiramente nos frutos tratados, melhorando o equilíbrio açúcar-ácido e o perfil geral do sabor (tabela 1).

As métricas de cor revelaram aumento da luminosidade (L^*) e da cromaticidade (C^*) nos frutos tratados, melhorando o aspeto visual, o que pode influenciar a preferência do consumidor. As variações na vermelhidão (a^*) e amarelecimento (b^*) foram associadas à alteração na acumulação de antocianina, consistente com o elevado teor fenólico quantificado.

Perfil fenólico

A análise HPLC-MSⁿ identificou um conjunto complexo de constituintes fenólicos, incluindo ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e antocianinas. Os tratamentos inoculados apresentaram consistentemente concentrações elevadas de isómeros de ácido cafeoilquínico e flavonóis glicosídeos, compostos bem conhecidos pela sua funcionalidade antioxidante.

Os perfis de antocianinas demonstraram níveis aumentados de derivados de malvidina, delphinidina e petunidina nos frutos tratados, corroborando as métricas de cor mais profunda observadas. Uma nova descoberta foi a deteção de derivados de miricetina presentes exclusivamente em frutos biofortificados, indicando a influência microbiana nas vias metabólicas secundárias.

Essas alterações fitoquímicas correspondem a uma maior capacidade antioxidante, conforme confirmado pelos ensaios de interseção dos radicais DPPH, óxido nítrico e superóxidos (tabela 1). O tratamento com o consórcio produziu notavelmente as maiores atividades antioxidantes, reforçando a hipótese da sinergia microbiana no aumento da biossíntese de compostos bioativos.

Atividade antioxidante e implicações biofuncionais

Os testes de interseção de radicais livres demonstraram que a inoculação bacteriana amplificou o potencial biofuncional dos extratos de mirtilo. O ensaio do DPPH mostrou percentagens de inibição de até 62% nos extratos de frutas co-inoculadas, contra 45% nos controles, um aumento significativo, provavelmente relacionado ao enriquecimento de compostos fenólicos (tabela 1).

Os resultados da interseção de $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2\cdot^-$ foram coincidentes com os do $\cdot\text{DPPH}$, sugerindo um aumento da defesa antioxidante de amplo espectro. Tais melhorias poderiam aumentar o valor nutracêutico dos mirtilos, contribuindo para benefícios da saúde relacionados com a mitigação do stress oxidativo.

Conclusões

O presente estudo demonstra que a aplicação de inoculantes bacterianos selecionados melhora significativamente os aspetos quantitativos e qualitativos da produção de mirtilos. Os tratamentos que empregaram *Paenibacillus* sp. VMFR46

apresentaram os aumentos mais pronunciados no rendimento e no tamanho dos frutos, indicando uma forte promoção do crescimento das plantas em condições de campo.

A inoculação elevou o total de sólidos solúveis, o teor de antocianina e a atividade antioxidante, melhorando assim a qualidade organoléptica e nutracêutica dos frutos. O tratamento combinado PEPV16+QSE79 mostrou efeitos sinérgicos na biossíntese fenólica e na capacidade de eliminação de radicais, sugerindo a biofertilização multi-estirpe como uma técnica promissora.

Parâmetros físico-químicos, como firmeza e cor da fruta, foram modulados favoravelmente, influenciando potencialmente a durabilidade pós-colheita e a aceitação do consumidor. A análise PCA validou correlações significativas entre bioinoculação, aumento fenólico e propriedades antioxidantes.

Esta avaliação abrangente apoia a integração de inoculantes microbianos à base de biofertilizantes na agronomia sustentável do mirtilo, oferecendo um duplo benefício de melhoria do rendimento e enriquecimento do conteúdo de compostos bioativos. Trabalhos futuros devem explorar as vias de sinalização molecular envolvidas e os impactos a longo prazo nos microbiomas do solo e na saúde das plantas.

Referências Bibliográficas

- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., Tuteja, N., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Fact.* 13, 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E.J., Simirgiotis, M.J., 2014. Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules* 19, 10936–10955. <https://doi.org/10.3390/molecules190810936>
- Flores-Félix, J.D., Velázquez, E., García-Fraile, P., González-Andrés, F., Silva, L.R., Rivas, R., 2018. Rhizobium and Phyllobacterium bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. *Food Res. Int.* 111. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.059>
- Flores-Félix, J.D., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., González-Andrés, F., Squartini, A., Rivas, R., 2021. Connecting the lab and the field: Genome analysis of phyllobacterium and rhizobium strains and field performance on two vegetable crops. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061124>
- Gonçalves, A.C., Campos, G., Alves, G., Garcia-Viguera, C., Moreno, D.A., Silva, L.R., 2020. Physical and phytochemical composition of 23 Portuguese sweet cherries as conditioned by variety (or genotype). *Food Chem.* 335, 127637. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127637>
- Gonçalves, A.C., Rodrigues, M., Flores-Félix, J.D., Campos, G., Nunes, A.R., Ribeiro, A.B., Silva, L.R., Alves, G., 2021. Sweet cherry phenolics revealed to be promising agents in inhibiting P-glycoprotein activity and increasing cellular viability under oxidative stress conditions: in vitro and in silico study. *J. Food Sci.* 1–16. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16001>
- Nunes, A.R., Sánchez-Juanes, F., Gonçalves, A.C., Alves, G., Silva, L.R., Flores-Félix, J.D., 2022. Evaluation of Raw Cheese as a Novel Source of Biofertilizer with a High Level of Biosecurity for Blueberry. *Agronomy* 12, 1150. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051150>

Pap, N., Fidelis, M., Azevedo, L., do Carmo, M.A.V., Wang, D., Mocan, A., Pereira, E.P.R., Xavier-Santos, D., Sant'Ana, A.S., Yang, B., Granato, D., 2021. Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 42, 167–186. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.06.003>

Quadros e Figuras

Tabela 1 - Resumo dos principais resultados dos tratamentos com inoculação bacteriana.

Parâmetro	Control	PEPV16	QSE79	VMFR46	PEPV16 + QSE79
Rendimento (kg/planta)	1,20 ± 0,10 ^a	1,89 ± 0,20 ^b	1,82 ± 0,15 ^b	2,05 ± 0,21 ^c	1,95 ± 0,18 ^{bc}
Peso médio do fruto (g)	2,10 ± 0,12 ^a	2,58 ± 0,14 ^b	2,45 ± 0,10 ^b	2,75 ± 0,10 ^c	2,62 ± 0,11 ^{bc}
Sólidos solúveis totais (°Brix)	11,4 ± 0,3 ^a	12,4 ± 0,4 ^b	12,6 ± 0,5 ^b	12,9 ± 0,4 ^b	12,7 ± 0,4 ^b
Acidez titulável (g ácido cítrico /100 mL)	0,52 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,02 ^b	0,46 ± 0,02 ^b	0,46 ± 0,01 ^b
Firmeza (N)	1,75 ± 0,12 ^a	2,10 ± 0,15 ^b	2,01 ± 0,20 ^b	2,20 ± 0,19 ^b	2,07 ± 0,18 ^b
Teor fenólico total (mg GAE/100 g)	130 ± 9 ^a	170 ± 12 ^b	162 ± 10 ^b	180 ± 15 ^c	185 ± 13 ^c
Atividade antioxidante (% DPPH interseção)	43 ± 3 ^a	52 ± 4 ^b	50 ± 3 ^b	55 ± 5 ^c	57 ± 4 ^c

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Os diferentes sobrescritos nas linhas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Efeito de extratos ricos em fenólicos de *Rubus fruticosus*, *R. ulmifolius* e *Morus nigra* no stresse oxidativo e na inibição do crescimento das Caco-2

Ana C. Gonçalves¹, Mariana S. Martins¹, Márcio Rodrigues², José David Flores-Félix^{1,3}, Cristina Garcia-Viguera⁴, Diego A. Moreno⁴, Gilberto Alves¹, Luís R. Silva^{1,5,6}

¹RISE-Health, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, 6201-506 Covilhã, Portugal;

²SPRINT—Sport Physical Activity and Health Research & Innovation Center, Polytechnic of Guarda, 6300-559 Guarda, Portugal;

³Microbiology and Genetics Department, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain;

⁴Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS), Department Food Science and Technology, CSIC, CEBAS, Campus Universitario 25, Espinardo, 30100 Murcia, Spain;

⁵SPRINT—Sport Physical Activity and Health Research & Innovation Center, Instituto Politécnico da Guarda, 6300-559 Guarda, Portugal;

⁶CERES, Department of Chemical Engineering, University of Coimbra, 3030-790 Coimbra, Portugal.

Resumo

Atualmente, as frutas vermelhas têm sido objeto de grande interesse por parte da comunidade científica, devido à sua riqueza em metabolitos ativos, incluindo antocianinas e compostos fenólicos não corados. Assim sendo, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar o perfil fenólico, as capacidades antioxidantes e os efeitos antiproliferativos em fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) e células do carcinoma do cólon humano (Caco-2) de extratos ricos em fenólicos de três frutas vermelhas muito apreciadas pelos consumidores: duas espécies de amoras-pretas (*Rubus fruticosus* e *Rubus ulmifolius*) e uma espécie de amoreira (*Morus nigra*). Um total de 19 fenólicos diferentes foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ e HPLC-DAD, respetivamente. Com foco no potencial biológico dos extratos ricos em compostos fenólicos, todos eles revelaram notáveis capacidades de sequestro em relação aos radicais testados. Em relação às propriedades antiproliferativas, *R. fruticosus* apresentou seletividade citotóxica para células Caco-2 em comparação às células NHDF. Para explorar mais profundamente o potencial biológico, combinações com controlos positivos (ácido ascórbico e 5-fluorouracil) também foram efetuadas. Finalmente, os dados obtidos são mais uma evidência de que a combinação de extratos ricos em compostos fenólicos de plantas naturais com controlos positivos pode reduzir os custos da terapia clínica e a possível toxicidade de medicamentos.

Palavras-chave: Amoras; amoreira; compostos fenólicos; potencial antioxidante; atividades antiproliferativas.

Abstract:

Currently, red fruits have attracted great interest from the scientific community due to their richness in active metabolites, including anthocyanins and non-colored phenolic compounds. Therefore, the main objective of the present study was to investigate the phenolic profile, antioxidant capacities, and antiproliferative effects in normal human dermal fibroblasts (NHDF) and human colon carcinoma cells (Caco-2) of phenolic-rich extracts from three red fruits highly appreciated by consumers: two blackberry species (*Rubus fruticosus* and *Rubus ulmifolius*) and one mulberry species (*Morus nigra*). A total of 19 different phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD-

ESI/MSⁿ and HPLC-DAD, respectively. Focusing on the biological potential of the phenolic-rich extracts, all of them exhibited remarkable radical-scavenging capacities against the tested radicals. Regarding antiproliferative properties, *R. fruticosus* showed cytotoxic selectivity toward Caco-2 cells compared to NHDF cells. To further explore the biological potential, combinations with positive controls (ascorbic acid and 5-fluorouracil) were also performed. Finally, the data obtained provide further evidence that combining phenolic-rich extracts from natural plants with positive controls may reduce clinical therapy costs and the potential toxicity of drugs.

Keywords: Blackberries; mulberry; phenolic compounds; antioxidant potential; antiproliferative activities.

Introdução

Os frutos vermelhos, como as amoras, são amplamente reconhecidos pelas suas propriedades organolépticas e benefícios para a saúde. Estudos anteriores demonstraram que estes frutos possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e anticarcinogénica (Benvenuti et al., 2004; Gundogdu et al., 2011; Moyer et al., 2002). Os compostos fenólicos, particularmente as antocianinas e os flavonóis, desempenham um papel fundamental nestes efeitos, contribuindo para a neutralização de espécies reativas de oxigénio e de azoto, modulando as vias celulares associadas ao stress oxidativo e diminuindo o risco de desenvolvimento de variadas doenças (Gonçalves et al., 2022). O presente trabalho teve como objetivo investigar o perfil fenólico e o potencial biológico de extratos ricos em compostos fenólicos de *Rubus fruticosus*, *R. ulmifolius* e *Morus nigra* cultivados em Portugal, avaliando a sua capacidade antioxidante e antiproliferativa em células normais (NHDF) e tumorais (Caco-2).

Material e Métodos

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As antocianinas foram obtidas da Extrasynthese (Genay, França). Os compostos fenólicos e reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e à Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha). As linhas celulares eram da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). O metanol e a acetona eram da Fisher Chemical (Glenfield, Leicestershire, Reino Unido). A água foi desionizada utilizando um sistema Milli-Q (Millipore Ibérica, S.A.U., Madrid, Espanha).

Foram colhidos cerca de 1 kg de frutos maduros de *R. fruticosus*, *R. ulmifolius* e *M. nigra*, na região da Covilhã (Portugal) em 2022. Após a colheita, os frutos foram congelados em azoto líquido, liofilizados e reduzidos a pó. A extração dos compostos fenólicos foi realizada por extração em fase sólida (Gonçalves et al., 2018). Os rendimentos obtidos foram de 22,4% para *R. fruticosus*, 47,4% para *R. ulmifolius* e 28,1% para *M. nigra*.

A caracterização dos compostos fenólicos foi feita por HPLC-DAD-ESI/MS, de acordo com o método descrito por Miguel et al. (2018). A quantificação foi realizada por HPLC-DAD, de acordo com Gonçalves et al. (2017).

Relativamente aos ensaios biológicos, foi avaliada a atividade antioxidante, através dos ensaios de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, óxido nítrico e superóxido, conforme descritos em ensaios anteriores do grupo (Gonçalves et al., 2018; Jesus et al., 2019; Teixeira & Silva, 2013). O ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo. Cada ensaio foi realizado utilizando sete concentrações para cada extrato (ou controlo positivo)

e, em triplicado. Os resultados obtidos foram expressos como valores de concentração inibitória de 25% (IC₂₅) ou metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) (µg/mL). A atividade antiproliferativa em células NHDF e Caco-2, foi avaliada através do ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (Gonçalves et al., 2018). O 5-fluorouracil (5-FU) foi utilizado como controlo positivo. Foram realizados seis ensaios independentes por extrato (ou controlo positivo). As células NHDF utilizadas encontravam-se entre as passagens 14 e 19, e as células Caco-2, encontravam-se entre as passagens 39 a 48. Além disso, foram realizadas misturas entre os extratos e os controlos positivos, de maneira a serem exploradas possíveis interações sinérgicas entre ambos.

A estatística e as correlações adequadas foram realizadas usando o Graph Pad Prism Version 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados e Discussão

Foram identificados 19 compostos fenólicos, nomeadamente 7 antocianinas, 6 flavonóis, 1 ácido hidroxicinâmico, 3 ácidos hidroxibenzóicos e 2 taninos, conforme descrito na tabela 1. As antocianinas foram as mais abundantes, com destaque para a cianidina-3-*O*-glicósido, responsável por cerca de 62,5% do total fenólico detetado no extrato de *R. ulmifolius*. Relativamente aos compostos fenólicos não corados, *R. fruticosus* apresentou o maior teor total (79072 µg/g peso seco), seguido por *M. nigra* (18.518 µg/g) e *R. ulmifolius* (6.976 µg/g). O extrato de *R. fruticosus* destacou-se pela elevada presença de quercetina-3-*O*-glucurónido e elagitaninos, compostos altamente reconhecidos pelos seus efeitos antioxidantes e antiproliferativos. Por outro lado, o extrato de *R. ulmifolius* revelou elevada abundância em flavonóis e taninos, enquanto o extrato de *M. nigra* revelou elevado teor em ácidos fenólicos (gálhico e elágico). As antocianinas estão predominantemente presentes em vegetais e frutos de coloração vermelha, roxa e azulada, como beterraba, bagas, uvas, ameixas, entre outros. Devido ao grande número de grupos hidroxilo livres que rodeiam o anel B, são reconhecidos como as principais moléculas antioxidantes na dieta humana (Vega et al., 2021). Nas amoras, as antocianinas contribuem com cerca de 90% da capacidade antioxidante, sendo também reconhecidas pelas suas notáveis propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Cadi et al., 2021; Jakobek et al., 2009; Kang et al., 2006), bem como pela sua atividade de sinalização celular, cardiovascular, prevenção do cancro e atividades antidiabéticas, para além da sua capacidade de controlar o peso (Mattioli et al., 2020; Mihok et al., 2019; Tatar et al., 2019). Estes efeitos são atribuídos principalmente à capacidade das antocianinas de eliminar facilmente espécies reativas, quelar metais e interagir com proteínas e recetores ativos no proliferador de peroxissomas, modificando a sua atividade e influenciando o metabolismo do substrato e a inflamação (Curtis et al., 2022; Hutchison et al., 2016). Todas estas capacidades ajudam a reduzir perigos patológicos, como o cancro, a diabetes e as doenças cardiovasculares (Cosme et al., 2022).

Relativamente ao potencial biológico, os três extratos demonstraram forte capacidade antioxidante (tabela 2). No ensaio de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, o extrato de *R. fruticosus* foi o mais eficaz (IC₅₀ = 34,3 µg/mL), seguido do extrato de *M. nigra* (56,3 µg/mL). Mesmo assim, extratos de *M. nigra* provenientes da Turquia apresentaram valores de IC₅₀ inferiores aos obtidos neste estudo, variando entre 17,22 e 25,45 µg/mL (Skrovankova et al., 2022). Por outro lado, no ensaio contra os radicais de óxido nítrico, o extrato de *R. ulmifolius* apresentou maior atividade (IC₅₀ = 59,5 µg/mL), tendo demonstrado cerca de duas vezes mais atividade contra estes radicais do que o ácido ascórbico (104 µg/mL).

As misturas de extratos com ácido ascórbico evidenciaram efeitos sinérgicos nos ensaios de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e óxido nítrico, mas antagónicos frente ao radical superóxido. O extrato de *R. fruticosus* combinado 1:1 com ácido ascórbico reduziu o IC₅₀ de 34,3 para 9,4 µg/mL (tabela 3).

Em geral, o maior teor de fenólicos leva ao aumento da atividade antioxidante. De facto, a estrutura química dos fenólicos, ou seja, os compostos por grupos catecol, pirogalol e metoxi, confere-lhes uma fácil capacidade de neutralizar os radicais livres. No entanto, a presença de outros compostos bioativos não determinados neste trabalho (por exemplo, os compostos voláteis), e que poderão interagir de forma sinérgica ou antagónica com os compostos fenólicos não deverá ser ignorada.

Nas células NHDF, nenhum dos extratos apresentou toxicidade nas concentrações testadas (50-800 µg/mL). Observou-se até um ligeiro aumento de viabilidade celular, provavelmente devido ao efeito antioxidante e estímulo do ciclo celular (resultados não apresentados).

Nas células tumorais Caco-2, apenas o extrato de *R. fruticosus* demonstrou atividade antiproliferativa significativa a 800 µg/mL (figura 1AB). Este efeito é atribuído à elevada concentração de antocianinas e elagitaninos presentes neste extrato. Sem surpresas, a atividade antiproliferativa exibida pelos extratos naturais está intimamente ligada com a sua riqueza em fenólicos.

A combinação do extrato de *R. fruticosus* (800 µg/mL) com 5-FU (0,65 µg/mL) em proporções 50:50 e 75:25 mostrou efeito sinérgico (figura 1C), aumentando a inibição da proliferação das células Caco-2 (índice de combinação <1). Essa sinergia sugere que o extrato pode potenciar o efeito do fármaco, permitindo reduzir a dose de 5-FU e, assim, minimizar seus efeitos secundários indesejáveis e também o seu preço.

Conclusões

O estudo confirma que as amoras e amoreiras portuguesas são fontes ricas em compostos fenólicos bioativos, especialmente antocianinas e flavonóis. O extrato de *R. ulmifolius* destacou-se pelo alto teor de antocianinas, enquanto o extrato de *R. fruticosus* apresentou maior concentração de fenólicos não coloridos e maior atividade antioxidante global. Relativamente ao potencial biológico, o extrato de *M. nigra* revelou excelente capacidade de neutralizar o radical superóxido. De entre os extratos estudados, o de *R. fruticosus* foi o mais promissor devido à sua seletividade citotóxica para células tumorais e ausência de toxicidade em células normais. O efeito sinérgico observado entre o extrato desta espécie e o 5-FU reforça o potencial da combinação entre produtos naturais e fármacos convencionais na terapêutica oncológica. Finalmente, os resultados sustentam o uso de extratos fenólicos de frutas vermelhas como coadjuvantes em terapias antioxidantes e anticancerígenas, com possíveis aplicações futuras em formulações nutracêuticas e farmacêuticas. Contudo, são necessários estudos adicionais *in vivo* e ensaios clínicos para validar a eficácia e segurança destas combinações.

Referências Bibliográficas

Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D., 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J Food Sci* 69, 164–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x>

- Cadi, H. El, Bouzidi, H. El, Selama, G., Ramdan, B., Majdoub, Y.O. El, Alibrando, F., Brigui, J., Altemimi, A.B., Dugo, P., Mondello, L., Cacciola, F., 2021. Characterization of *Rubus fruticosus* L. berries growing wild in Morocco: phytochemical screening, antioxidant activity and chromatography analysis. *European Food Research and Technology* 247, 1689–1699. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03739-5>
- Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M.C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A., Gonçalves, B., 2022. Red fruits composition and their health benefits- A review. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>
- Curtis, P.J., Berends, L., van der Velpen, V., Jennings, A., Haag, L., Chandra, P., Kay, C.D., Rimm, E.B., Cassidy, A., 2022. Blueberry anthocyanin intake attenuates the postprandial cardiometabolic effect of an energy-dense food challenge: Results from a double blind, randomized controlled trial in metabolic syndrome participants. *Clinical Nutrition* 41, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.11.030>
- Gonçalves, A.C., Costa, A.R., Flores-Félix, J.D., Falcão, A., Alves, G., Silva, L.R., 2022. Anti-Inflammatory and Antiproliferative Properties of Sweet Cherry Phenolic-Rich Extracts. *Molecules* 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27010268>
- Gonçalves, A.C., Rodrigues, M., Santos, A.O., Alves, G., Silva, L.R., 2018. Antioxidant status, antidiabetic properties and effects on Caco-2 cells of colored and non-colored enriched extracts of sweet cherry fruits. *Nutrients* 10, 1688. <https://doi.org/10.3390/nu10111688>
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Sensoy, R.I.G., Yilmaz, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Sci Hortic* 132, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.035>
- Hutchison, A.T., Flieller, E.B., Dillon, K.J., Leverett, B.D., 2016. Black currant nectar reduces muscle damage and inflammation following a bout of high-intensity eccentric contractions. *J Diet Suppl* 13, 1–15. <https://doi.org/10.3109/19390211.2014.952864>
- Jakobek, L., Šeruga, M., Šeruga, B., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., 2009. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *Int J Food Sci Technol* 44, 860–868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01920.x>
- Jesus, F., Gonçalves, A.C., Alves, G., Silva, L.R., 2019. Exploring the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and anti-hemolytic potential of *Prunus avium* vegetal parts. *Food Research International* 116, 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.079>
- Kang, T.H., Hur, J.Y., Kim, H.B., Ryu, J.H., Kim, S.Y., 2006. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 391, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.053>
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Silva, P., 2020. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules* 25, 3809. <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Migues, I., Baenas, N., Gironés-Vilaplana, A., Cesio, M., Heinzen, H., Moreno, D., 2018. Phenolic profiling and antioxidant capacity of *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) samples collected in different Uruguayan locations. *Foods* 7, 67. <https://doi.org/10.3390/foods7050067>
- Mihok, E., György, É., Máthé, E., 2019. The Carpathian lingonberry, raspberry and blackberry fruit extracts feature variable antimicrobial efficiency. *Acta Agraria Debreceniensis* 27–32. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/2365>

- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J Agric Food Chem* 50, 519–525. <https://doi.org/10.1021/JF011062R/ASSET/IMAGES/LARGE/JF011062RF00001.JPEG>
- Skrovankova, S., Ercisli, S., Ozkan, G., Ilhan, G., Sagbas, H.I., Karatas, N., Jurikova, T., Mlcek, J., 2022. Diversity of phytochemical and antioxidant characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruits from Turkey. *Antioxidants* 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11071339>
- Tatar, M., Bagheri, Z., Varedi, M., Naghibalhossaini, F., 2019. Blackberry extract inhibits telomerase activity in human colorectal cancer cells. *Nutr Cancer* 71, 461–471. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1506491>
- Teixeira, R., Silva, L.R., 2013. Bioactive compounds and in vitro biological activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne extracts. *Ind Crops Prod* 50, 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.035>
- Vega, E.N., Molina, A.K., Pereira, C., Dias, M.I., Heleno, S.A., Rodrigues, P., Fernandes, I.P., Barreiro, M.F., Stojković, D., Soković, M., Carcho, M., Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., 2021. Anthocyanins from *Rubus fruticosus* L. and *Morus nigra* L. applied as food colorants: A natural alternative. *Plants* 10. <https://doi.org/10.3390/plants10061181>

Quadros e Figuras

Tabela 1 - Quantificação de compostos fenólicos não coloridos e antocianinas ($\mu\text{g/g}$ de fruto seco) identificados em extratos de amoras-pretas *R. fruticosus* e *R. ulmifolius* e amoreiras *M. nigra* cultivadas na região da Covilhã, Portugal.

Phenolic compounds	<i>R. fruticosus</i>	<i>R. ulmifolius</i>	<i>M. nigra</i>
Cianidina 3- <i>O</i> -glucósido (1)	946,79 \pm 27,48	2224,40 \pm 81,70 ^a	185,31 \pm 11,87 ^{ab}
Cianidina 3- <i>O</i> - glucósido (2)	24053,14 \pm 34,88 ^a	39847,30 \pm 73,40 ^a	13252,31 \pm 60,59 ^{ab}
Cianidina 3- <i>O</i> -rutinósido	nq	nd	735,13 113,00
Pelargonidina glucósido	nd	nq	119,41 \pm 32,40
Pelargonidina deoxi-hexósido-hexósido	nd	nd	nd
Cianidina arabinose/xilósido	264,65 \pm 10,43	329,95 \pm 16,23	14554,56 \pm 262,51 ^{ab}
Cianidina-malonil-glucósido	nq	13766,39 \pm 161,81	nd
Cianidina-dioxalil-glucósido	11919,49 \pm 117,57	579,96 \pm 24,63	nd
Σ	37184,06	56748,00	28846,72
Elagitanino (Pedunculagina I)	1151,40 \pm 41,95	nd	nd
Ellagitannin (Pedunculagina II)	9964,30 \pm 107,04 ^b	nd	nd
Ácido 3-caffeoil-quínico (Ácido neoclorogénico)	nd	nq	nd
Ácido 5- ρ -coumaroil quínico	nd	nd	nq
Ácido elágico pentósido	9348,74 \pm 109,27	6975,72 \pm 547,83 ^a	nd
Galhoil-hexahidroxidifenoil-glucósido	11382,10 \pm 56,26	nq	nd
Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido	nq	nd	nq
Quercetina 3- <i>O</i> -glucurónido	42995,90 \pm 539,94	nd	nd
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido derivado	nq	nq	18518,37 \pm 370,71
Quercetina acetil-glucósido	nd	nd	nq
Caempferol 3-rutinósido	nd	nd	nq
Quercetina 3-pentósido	4229,38 \pm 123,21	nd	nd
Σ	79071,82	6975,72	18518,37

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios. Σ , soma das antocianinas determinadas; nd; não detectável; nq, não quantificado. As diferenças significativas entre os diferentes extratos foram obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e indicadas por ^aResultado significativo ($p < 0,05$) é indicado como vs. *R. fruticosus* L. ^b $p < 0,05$ é indicado como vs. *R. ulmifolius* Schott.

Tabela 2 - Capacidade antioxidante dos extratos de *R. fruticosus*, *R. ulmifolius* Schott e *M. nigra*. Os valores foram expressos como valores de concentração inibitória de 25% (IC₂₅) ou metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) (µg/mL).

Assay	<i>R. fruticosus</i>	<i>R. ulmifolius</i>	<i>M. nigra</i>
DPPH•	34,29 ± 0,55	62,55 ± 0,82 ^a	56,30 ± 0,96 ^a
•NO	202,98 ± 2,12	59,49 ± 0,81 ^a	65,01 ± 0,63 ^a
O ₂ • ⁻	14,70 ± 0,58	23,59 ± 0,73^a	14,26 ± 0,47^b

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de três ensaios referentes à capacidade antioxidante contra radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, óxido nítrico e superóxido (DPPH•, •NO e O₂•⁻, respetivamente). ^aResultado significativo (p < 0,05) é indicado como vs. *R. fruticosus* L. ^bp < 0,05 é indicado como vs. *R. ulmifolius* Schott.

Tabela 3 - Capacidade antioxidante dos extratos de *R. fruticosus*, *R. ulmifolius* e de *M. nigra*, combinados com o controlo positivo do ácido ascórbico. Os valores foram expressos como valores de concentração inibitória de 25% (IC₂₅) ou metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) (µg/mL).

Assay	Extract: Ascorbic acid	<i>R. fruticosus</i>	<i>R. ulmifolius</i>	<i>M. nigra</i>
DPPH•	25:75	10,89 ± 0,14	4,18 ± 0,20 ^a	3,14 ± 0,18 ^{ab}
	50:50	9,42 ± 0,20	6,65 ± 0,21 ^a	3,32 ± 0,12 ^{ab}
	75:25	6,77 ± 0,15	4,04 ± 0,28 ^a	6,68 ± 0,19 ^b
•NO	25:75	295,77 ± 0,87	80,29 ± 0,19 ^a	184,36 ± 1,41 ^{ab}
	50:50	227,28 ± 1,65	28,27 ± 0,40 ^a	176,25 ± 0,85 ^b
	75:25	19,66 ± 0,28	31,70 ± 0,71 ^a	16,97 ± 0,88 ^b
O ₂ • ⁻	25:75	8,22 ± 0,41	7,73 ± 0,33	24,10 ± 0,63^{ab}
	50:50	12,87 ± 0,23	8,19 ± 0,41	37,28 ± 1,01^{ab}
	75:25	8,44 ± 0,20	13,11 ± 0,50	22,47 ± 0,98^{ab}

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de três ensaios referentes à capacidade antioxidante contra radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, óxido nítrico e superóxido (DPPH•, •NO e O₂•⁻, respetivamente). ^aResultado significativo (p < 0,05) é indicado como vs. *R. fruticosus* L. ^bp < 0,05 é indicado como vs. *R. ulmifolius* Schott.



Lista de Participantes

Lista de participantes

A

Adam Dale
Agostinho Teixeira
Alexandra Abreu Lima
Alexandra Passos
Alexandre Penicheiro
Alfredo Weel
Ana Catarina Ribeiro
Ana Cristina Ramos
Ana Filipa Baltazar
Ana Margarida Durand
Ana Morais
Ana Paula Nunes
Ana Pinho
Ana Rita Varela
Ana Trindade
Anabela Silva
Andreia Afonso
Andreia Garrido
António Coelho
Armindo Tadeu Alves
Adam Dale
Adriana Guerreiro
Afonso Águas
Agostinho Teixeira
Alexandra Abreu Lima
Alexandra Passos
Alexandre Penicheiro
Alfredo Weel
Ana Catarina Ribeiro
Ana Cristina Ramos

B

Bárbara Rodrigues
Bernardo Camões
Bruno Azinheirinha
Bruno Mezzetti

C

Cândida Trindade
Carino Ferrão
Carla Araújo
Carla Monteiro
Carlo Bravo

Carlos Adão
Carlos Afonso
Carlos Marques
Carlos Pita
Catarina Pinto
Catarina Quendera
Cátia Guerreiro
Célia Mateus
Cláudia Andrade Serrano
Cláudia Nunes dos Santos
Cristina Cavaleiro
Cristina Mota

D

Daniel McGuire
Daniel Vieira
Daniela Marques
Daniela Segantini
David Horgan
Diogo Correia
Diogo Machado
Duarte Galaio

E

Eduarda Sousa
Elisabete Brigadeiro
Elisabete Figueiredo
Ellen Thompson
Elsa Gonçalves
Emília Testoni
Esmeraldina Sousa
Eugénio Diogo

F

Fábio Mendão
Fernanda Alves
Filipa Aires
Filipe Centeno
Filomena Nóbrega
Flávia Matias
Francisco Aires
Francisco Barreto
Francisco Costa
Francisco Luz
Francisco Reigada

- Francisco Vicente
Frederico Preza
- G**
Gaspar Gomes
Gonçalo Bernardo
- H**
Helder Coelho
- I**
Inês França
- J**
Jéssica Gomes
Joana Lourenço
João Alves
João Jacinto
João Lage
João Mamede
João Ribeiro
Jorge Duarte
Jorge Ferreira
José Carlos Franco
José Morato Garcia
José Silva
José Silvestre
José Vanzeler de Melo
Juan Carlos Calvo
Júlia Trindade
- K**
Kleber Nilson Lima
- L**
Leonor Cruz
Lígia Vasconcelos
Lourenço de Botton
Luís Carvalheira
Luís Cavaleiro
Luís Silva
Luísa Barão
- M**
Manoela Rodrigues Campagner
Manuel Roque
Manuel Trincão de Oliveira
Margarida Franco
Mari Cruz Barradas
Maria Carvalho
Maria José Silva
Maria Palma
Mariana Anjos
Mariana Teles Branco
- Mário Oliveira
Marisa Carvalho
Marta Abreu
Melissa Oliveira
Miguel Santos
Miriam Cavaco
Mónica Rodrigues
- N**
Nélia Silva
Nelson Lima
Nuno Canada
- P**
Paula Cristina Santos
Pauliina Palonen
Pedro Bonifácio
Pedro Brás de Oliveira
Pedro Correia
Pedro Patacho
Pedro Rosa
Pilar Pineda-Balbuena
- R**
Raquel Parreira
Raquel Pedras
Reinaldo Pereira
Ricardo Veríssimo
Rita Ganso
Rita Pinto
Rui Beleza
Rui Henriques
Rui Loureiro
Rui Vagarinho
- S**
Sérgio Martins
Sofia Horgan
Sofia Patricio
Susana Carvalho
Susana Soares
- T**
Tânia Fernandes
Teresa Valdivieso
Tiago Domingos
- V**
Vânia Correia
Vera Guerreiro
Verónica Dias
Vitor Nunes

Patrocinador Platina



Patrocinador Ouro



Patrocinador Prata



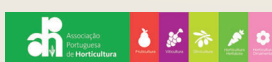
Parceiros



Media Partners



Organização



Apoio



MUNICÍPIO OEIRAS