

Influência da borra de café no crescimento e nas propriedades químicas e biológicas de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Anabela Dias Ferreira

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por:

Professora Doutora Paula Cristina Baptista

Professora Doutora Elsa Ramalhosa

Bragança

2011

Agradecimentos

Desejo agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Paula Baptista e Professora Doutora Elsa Ramalhosa, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo, sem vós não teria sido possível... Muito Obrigada.

A todos os que de alguma maneira tornaram possível a realização deste projecto, a todos um OBRIGADA!!...

Este trabalho foi efectuado no âmbito do Projecto PTDC/AGR-AAM/102447/2008 “Borra de café: programa de reconversão hortícola e implicações na qualidade e segurança dos vegetais produzidos”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e pelo Programa Operacional COMPETE, com apoio FEDER.



Resumo

O presente trabalho pretendeu avaliar as potencialidades do uso da borra de café como fertilizante agrícola. Para tal cultivaram-se plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), em substrato composto por uma mistura de terra vegetal e borra de café, no estado fresco e compostado, em cinco concentrações diferentes [2,5; 5; 10; 15 e 20% (v/v)]. Como controlo utilizou-se substrato composto só com terra vegetal. Os efeitos da aplicação da borra de café foram avaliados por análise do crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos, composição mineral, anatomia radicular, citogenética das células meristemáticas radiculares e actividade antioxidante das folhas.

Verificou-se que ambos os tipos de borra de café, bem como a sua concentração, influenciaram significativamente o crescimento das plantas. Constatou-se que quanto à borra de café fresca, esta deve ser aplicada em doses baixas (2,5% ou 5%, v/v), enquanto que na forma compostada, as doses a aplicar devem ser iguais ou superiores a 15% (v/v). Nestas condições observou-se, para ambos os casos, um incremento em biomassa, de pigmentos fotossintéticos e de macronutrientes foliares, superior face às plantas controlo. Adicionalmente verificou-se que a borra de café fresca, a concentrações iguais ou superiores a 20%, induz a binucleação das células meristemáticas radiculares e reduz o número de feixes vasculares do xilema, condicionando a absorção dos componentes minerais do substrato.

Em relação à avaliação da actividade antioxidante de alfaces, verificou-se em estudos preliminares, que o uso de amostras desidratadas nas extracções permitia obter soluções com maior capacidade redutora total do que com amostras frescas. Adicionalmente, também se verificou que baixas concentrações de metanol ou de acetona a temperaturas elevadas, originaram extractos com maior Capacidade Redutora Total e Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH.

Em relação à aplicação de borra de café no cultivo de alface, verificou-se que ao usar borra de café compostada, o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e o Poder Redutor para essas plantas, foram semelhantes aos determinados para o controlo, independentemente da concentração em borra de café utilizada. Pelo contrário, menores valores de EC₅₀ para o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e Poder Redutor, foram obtidos em alfaces cultivadas em borra de café fresca, e principalmente para as concentrações de 15 e 20% (v/v), indicando uma maior actividade antioxidante nessas alfaces. Estes resultados indicam que o uso de elevadas concentrações de borra de café

fresca pode funcionar como um *stress*, originando uma maior produção de compostos com actividade antioxidante.

Palavras chave: Borrás de café, Alface (*Lactuca sativa* L.), Crescimento das plantas, Actividade antioxidante.

Abstract

The present study intends to evaluate the potential of using spent coffee as a fertilizer in agriculture. Thus, lettuces (*Lactuca sativa* L.) were cultivated in a mixture of topsoil and spent coffee, composted and no-composted, in five concentrations [2,5; 5; 10; 15 e 20% (v/v)]. Topsoil was used as control. The effect of the application of the spent coffee was evaluated by assessing the plant growth, the photosynthetic pigments contents, the foliar mineral composition and the antioxidant activity, as well as by microscopic observation of the root anatomy and the root tips cells.

It was found that both types of spent coffee, as well as their concentration, significantly influenced the growth of plants. It was found that the fresh spent coffee must be applied at low doses (2,5% or 5%, v/v), while in the composted form, the concentrations to be used must be equal to or greater than 15% (v/v). Under these conditions it was observed in both cases, an increase in foliar biomass and in the contents of foliar photosynthetic pigments and macronutrients, as compared to control plants. Additionally it was found that fresh spent coffee, at concentrations equal to or greater than 20% (v/v), induces the formation of binucleated root cells and reduces the number of xylems in roots, conditioning the absorption of mineral components of the substrate.

In relation to the antioxidant activity of the lettuce, we verified in preliminary studies that the use of dehydrated samples in the extractions allowed obtaining solutions with higher Total Reducing Capacity than when using fresh samples. Moreover, it was verified that low concentrations of methanol or acetone at high temperatures, originated extracts with higher Total Reducing Capacity and DPPH Radical Scavenging Activity.

Regarding the application of coffee-grounds in lettuce culture, the use of composted coffee-ground originated plants with DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power similar to the control plants, not depending on the coffee-ground concentration used. On contrary, low EC_{50} values were obtained for the DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power when lettuces cultivated in fresh coffee-ground were analyzed. Furthermore, the lowest values were obtained with the 15 and 20% (v/v) of coffee-grounds, indicating the higher antioxidant activity of these lettuces. These results suggest that the use of high concentrations of fresh coffee-grounds may act as a stress, originating a higher production of compounds with antioxidant activity.

Keywords: Spent coffee, Lettuce (*Lactuca sativa* L.), Plant growth, Antioxidant activity.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice de tabelas	xii
Índice de figuras	xv
Abreviaturas.....	xix
1 - Introdução geral.....	1
1.1. O café / Borra de café	2
2 - Efeito da aplicação de borra de café como fertilizante no crescimento e composição mineral de plantas de alface.....	7
2.1. Introdução	8
2.2. Material e métodos.....	11
2.2.1. Primeiro ensaio.....	11
2.2.1.1. Produção de plantas	11
2.2.1.2. Tratamentos	11
2.2.1.3. Parâmetros avaliados	13
2.2.1.3.1. Avaliação de parâmetros de crescimento	13
2.2.1.3.2. Avaliação da composição mineral	14
2.2.1.4. Tratamento estatístico.....	15
2.2.2. Segundo ensaio.....	15
2.2.2.1. Produção de plantas	15
2.2.2.2. Tratamentos	16
2.2.2.3. Parâmetros avaliados	18
2.2.2.3.1. Avaliação de parâmetros de crescimento	18
2.2.2.3.2. Avaliação da composição mineral	18
2.2.2.3.3. Análise citogenética.....	19
2.2.2.3.4. Análise microscópica das raízes	19
2.2.2.4. Tratamento estatístico.....	20
2.3. Resultados e discussão.....	20
2.3.1. Primeiro ensaio – borra fresca.....	20
2.3.1.1. Taxas de crescimento.....	22

2.3.1.2. Produção de biomassa	25
2.3.1.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos	27
2.3.1.4. Composição mineral de plantas e substrato de crescimento	27
2.3.2. Segundo ensaio - borra fresca/compostada	31
2.3.2.1. Taxas de crescimento.....	33
2.3.2.2. Produção de biomassa	38
2.3.2.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos	42
2.3.2.4. Composição mineral do substrato de crescimento e de plantas	45
2.3.2.5. Análise microscópica das raízes	52
2.3.2.6. Análise citogenética.....	53
3 - Avaliação da actividade antioxidante da alface, cultivada com adição de borra de café fresca e compostada	54
3.1. Avaliação da actividade antioxidante	55
3.1.1. Parte Experimental	57
3.1.1.1. Primeiro Estudo – Utilização de um desenho factorial para avaliar o efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extractos de alface.....	57
3.1.2 Segundo Estudo – Optimização das condições de extracção de compostos com actividade antioxidante de alface através da metodologia de superfície de resposta (<i>Response Surface Methodology</i>).....	59
3.1.2.2 Desenho Experimental e Análise Estatística	59
3.1.3 Terceiro Estudo – Determinação da actividade antioxidante de alfices.....	63
3.1.4 Avaliação da Capacidade Redutora Total e da Actividade Antioxidante	63
3.1.4.1 Capacidade Redutora Total	63
3.1.4.2 Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH.....	64
3.1.4.3 Poder Redutor	64
3.2 Resultados e discussão.....	66
3.2.1 Primeiro Estudo – Utilização de um desenho factorial para avaliar o efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extractos de alface	66
3.2.2 Segundo Estudo – Optimização das condições de extracção de compostos com actividade antioxidante de alface através da metodologia de superfície de resposta (<i>Response Surface Methodology</i>).....	71
3.2.2.1 Avaliação da actividade antioxidante nos ensaios realizados	71
3.2.2.2 Qualidade dos ajustes dos modelos obtidos	73
3.2.2.2.1 Capacidade Redutora Total	75

3.2.2.2.2 Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH.....	77
3.2.2.3 Condições óptimas.....	80
3.3. Avaliação da actividade antioxidante em plantas sujeitas à adição de borra de café fresca e compostada	82
3.3.1. Capacidade Redutora Total	82
3.3.2. Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH	83
3.3.3. Poder Redutor.....	84
4 - Conclusões	86
4.1. Conclusões	87
5 - Bibliografia	89

Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional e de compostos com toxicidade, em percentagem, de vários resíduos de café (casca, polpa e borra)	3
Tabela 2 – Composição orgânica e mineral da borra de café	8
Tabela 3 - Número de folhas aquando da plantação (P) e colheita (C) de plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café fresca, ao fim de 36 dias.	22
Tabela 4 – Crescimento máximo da raiz aquando da plantação (P) e colheita (C), acréscimos de crescimento em altura (Δx), acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e taxas de crescimento relativo (TCR) em plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café fresca, ao fim de 36 dias.	23
Tabela 5 – Crescimento máximo da parte aérea aquando da plantação (P) e colheita (C), acréscimos de crescimento em altura (Δx), acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e taxas de crescimento relativo (TCR) em plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.	24
Tabela 6 – Comprimento máximo da parte aérea (l_{pa}) e da raiz (l_{pr}) e sua razão, aquando da colheita de plantas de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.	25
Tabela 7 - Peso fresco e seco da parte aérea e radicular de alfaces e razão entre o peso seco da parte aérea e do sistema radicular a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.	26
Tabela 8 - Teores de pigmentos fotossintéticos (mg/g pf), clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (Cl <i>b</i>) e Carotenóides nas folhas internas (FI) e externas (FE) de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.	27
Tabela 9 – Teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio em folhas de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias, quantificados em folhas desidratadas.	28
Tabela 10 – Teores de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio (%) presentes no substrato para cada tratamento aquando da plantação.	29
Tabela 11– Teores de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio (%) presentes no substrato para cada tratamento aquando da colheita.	30

Tabela 12– Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, em diversos parâmetros de crescimento em termos de comprimento.....	37
Tabela 13 – Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, em diversos parâmetros de crescimento em termos de biomassa.	41
Tabela 14 - Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, nos teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas de alfaces (internas e externas).	44
Tabela 15 – Teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio presentes no substrato para cada tratamento (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da plantação.....	46
Tabela 16 – Teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio presentes no substrato para cada tratamento (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da colheita.	46
Tabela 17 – Teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio em folhas de alface provenientes de cada um dos tratamentos (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da colheita, quantificado em folhas desidratadas.....	48
Tabela 18 - Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato aquando a plantação, nos teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nos substratos.	50
Tabela 19 - Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato aquando a colheita, nos teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nos substratos.....	50
Tabela 20 – Valores de <i>F</i> e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e a interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato, nos teores	

(%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nas folhas de plantas de alface desidratadas.	51
Tabela 21 – Percentagem de células binucleadas no tecido meristemático radicular de <i>Lactuca sativa</i> L. exposta a borra de café a diferentes concentrações.	53
Tabela 22 - Condições experimentais estudadas, expressas em termos de variáveis codificadas.	57
Tabela 23 - Condições experimentais estudadas, expressas em termos de variáveis não codificadas.	58
Tabela 24 – Valores codificados e sua correspondência com os valores reais dos parâmetros avaliados na RSM.	60
Tabela 25 – Desenho Experimental da RSM para a alface extraída com metanol e acetona em termos de valores codificados e não codificados.	61
Tabela 26 - Desenho Experimental da RSM para a alface extraída com água em termos de valores codificados e não codificados.	62
Tabela 27 – Avaliação da capacidade redutora total de extractos de alface em função da temperatura, tempo, solvente, tipo de amostra e relação de amostra <i>versus</i> solvente.	68
Tabela 28 – <i>Central Composite Design</i> com os valores experimentais e previstos para a Capacidade Redutora Total (CRT) (mg equivalentes de ácido gálico /g de peso fresco) e Efeito Bloqueador do DPPH (%) para os ensaios que envolveram metanol e acetona.	72
Tabela 29 - <i>Central Composite Design</i> com os valores experimentais e previstos para a Capacidade Redutora Total (mg equivalentes de ácido gálico /g de amostra fresca) e Efeito Bloqueador do DPPH (%) para os ensaios realizados com água.	73
Tabela 30 – <i>p-values</i> e R^2 calculados para os modelos desenvolvidos para a Capacidade Redutora Total (CRT) e Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH para o metanol, acetona e água.	74

Índice de figuras

Figura 1 – Resíduos de café. A – Casca, B – Polpa, C – Borra, D – Água residual	3
Figura 2 - Sementeira das alfaces em placa de alvéolos. Colocação de uma semente por alvéolo (1), germinação (2); crescimento das plantas (3) até ao momento de transplante (4), com 26 dias.	11
Figura 3 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando da transplantação..	12
Figura 4 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando a transplantação (Borra de café fresca – ensaio A)	17
Figura 5 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando a transplantação (Borra de café compostada – ensaio B).....	17
Figura 6 - Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.....	21
Figura 7 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando da colheita (ao fim de 36 dias), em substrato de terra vegetal e borra e borra fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.	21
Figura 8 - Aspecto particular das plantas aquando da colheita (ao fim de 36 dias), em substrato de terra vegetal e borra e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.	21
Figura 9 - Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.....	31
Figura 10 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando da colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.....	31
Figura 11 - Aspecto particular das plantas aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.	31
Figura 12- Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.....	32

Figura 13 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo	32
Figura 14 - Aspecto particular das plantas aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.	32
Figura 15 - Numero de folhas aquando da colheita de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).....	33
Figura 16 - Crescimento relativo em altura (RG) para a parte aérea (Pa) e radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=9).....	35
Figura 17 - Relação do comprimento da parte aérea (Pa) com o radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=9).....	36
Figura 18 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) da parte aérea (Pa) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do segundo ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).....	38
Figura 19 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) do sistema radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do segundo ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).....	39
Figura 20 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) da parte aérea (Pa) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca provenientes do 1º (BF 1) e do 2º (BF 2) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).....	39

Figura 21 - Razão do peso foliar (LWR) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média ± desvio padrão (n=32).....	40
Figura 22 - Teores de clorofila a (Cl _a), clorofila b (Cl _b) e Carotenóides, nas folhas internas (FI) e externas (FE) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média ± desvio padrão (n=7).....	43
Figura 23 - Secções transversais de raízes de <i>Lactuca sativa</i> var. quatro estações, aos 39 dias de cultura em substrato de terra vegetal sem borra de café (A), ou com 20% de borra de café fresca (B) ou compostada (C).....	52
Figura 24 – Células meristemáticas de raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. quatro estações não eliciadas (A) ou eliciadas com borra de café à concentração de 20% (B) ou 30% (C).....	53
Figura 25- Gráficos de <i>Pareto</i> (A) e da Probabilidade Normal dos Efeitos <i>Standardizados</i> (B) para o efeito da capacidade redutora total.....	66
Figura 26 - Relação linear encontrada entre a Capacidade Redutora Total prevista pelo modelo desenvolvido e os valores obtidos experimentalmente.	67
Figura 27 - Efeito do tipo de amostra sobre a capacidade redutora total.	68
Figura 28 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta da Capacidade Redutora Total em função da temperatura e da concentração de solvente, para o metanol (A) e acetona (B).....	76
Figura 29 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta da Capacidade Redutora Total de extractos de alface em função da temperatura e do tempo, para o metanol (A), acetona (B) e água (C) (Concentração de metanol ou de acetona = 30% (v/v)).	77
Figura 30 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta do Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH em função da temperatura e da concentração de solvente, para o metanol (A) e acetona (B) (Tempo = 35 minutos).	78

Figura 31 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta do Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH em função da temperatura e do tempo, para o metanol (A), acetona (B) e água (C) (Concentração de metanol e acetona = 30% (v/v)).	79
Figura 32 – Indicação da área que permite obter uma Capacidade Redutora Total entre 0,35 e 0,56 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo, nas extracções com metanol.	80
Figura 33 – Indicação da área que permite obter um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 0,40 e 0,65 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo, nas extracções com acetona.	81
Figura 34 – Capacidade Redutora Total (mg equivalentes de ác gálico/g alface fresca), determinada em alface cultivada em terra vegetal e borra compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra fresca (B) com diferentes concentrações de borra de café.	83
Figura 35 – EC ₅₀ do Efeito Bloqueador do Radical Livre do DPPH (mg alface fresca/mL), determinada para alface cultivada em terra vegetal e borra de café compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra de café fresca (B) para diferentes concentrações de borra de café.	83
Figura 36 – EC ₅₀ do Poder redutor (mg alface fresca /mL) determinado em alface cultivada em terra vegetal e borra de café compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra de café fresca (B) para diferentes concentrações de borra de café.	84

Abreviaturas

Δx - Acréscimos de crescimento em altura

$\Delta x/\Delta t$ - Acréscimos diários

BC - Borra Compostada

BF - Borra Fresca

Cl_a - Clorofila a

Cl_b - Clorofila b

Cl_t - Clorofila total

CRT - Capacidade Redutora Total

DPPH - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

ESAB – Escola Superior Agrária de Bragança

l_{pa} - Comprimento máximo da parte aérea

l_{pr} - Comprimento máximo da raiz

Kcal – Kilocaloria

kJ - Kilojoules

LWR – Razão do peso foliar (Peso Seco Parte Aérea/Peso Seco Total)

m/v – Massa / Volume

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

PA – Parte Aérea

P_{af} – Peso fresco da parte aérea

P_{as} – Peso seco da parte aérea

Pl - Plantação

ppm – Partes por milhão

p/v – Peso / Volume

P_f – Peso fresco

P_{rf} – Peso fresco da parte radicular

P_{rs} – Peso seco da parte radicular

P_s - Peso seco

P_s/P_f - Razões peso seco / peso fresco

RG - Crescimento médio relativo em altura da planta completa (Comprimento final –
Comprimento inicial)

SR – Sistema radicular

TCR - Taxas de crescimento relativo

v/v – Volume / Volume

$v/v/v$ - Volume / Volume / Volume

Capítulo 1

Introdução geral

1.1. O café / Borra de café

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância no comércio mundial, sendo maioritariamente produzido nas regiões tropicais e consumido, principalmente, na Europa e Estados Unidos da América (António, 2008). A planta produtora de café (cafeeiro) pertence à família das Rubiaceas, género *Coffea*, e engloba cerca de 60 espécies. Contudo, apenas duas espécies, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, conhecidas respectivamente como arábica e robusta, são internacionalmente comercializadas (Gaspar e Monteiro, 2001). A bebida de café é normalmente produzida a partir de uma mistura de grãos de café destas duas espécies, que produzem sabores e aromas bem distintos. A espécie arábica é aromática, perfumada, doce e ligeiramente ácida, enquanto que a espécie robusta tem um sabor áspero, adstringente, pouco perfumado e mais amargo.

Os dados relativos ao consumo mundial de café revelam um consumo crescente *per capita* de 0,4% por ano, tendo sido registado para o ano de 2010 um consumo total de 6,9 milhões de toneladas (Ximenes, 2010). Em Portugal, cerca de 80% da população consome café tendo, em 2008, sido registado um consumo *per capita* de 4,05 Kg de café verde (Anónimo 1, 2009 - 2010). As principais razões para o consumo da bebida de café residem no seu efeito estimulante e nos saborosos aroma e sabor. Adicionalmente, o café exibe actividade antioxidante e, o seu consumo moderado, parece reduzir o desenvolvimento de alguns tipos de tumor como o do intestino grosso (Azuma *et al.*, 2000). É também referido o seu potencial na prevenção da doença de Parkinson, doença de Alzheimer, Diabetes mellitus tipo 2, doença coronária, cirrose, entre outras (Alves *et al.*, 2009). A actividade antioxidante é atribuída à presença de compostos fenólicos, como ácidos clorogénicos (que representam cerca de 6-12% da massa do grão de café), à cafeína e a alguns produtos da reacção de Maillard (Budryn *et al.*, 2009).

Ao consumo elevado de café encontra-se associado a produção de resíduos de baixo valor. Estudos realizados evidenciaram que somente 6% da colheita de café é utilizada na preparação da bebida. Os restantes 94% correspondem a resíduos (Matos, 2003) sendo, a maioria, originada durante o processo de produção do café decorrentes da lavagem e despolpa do fruto do cafeeiro. Estes resíduos incluem a polpa, a casca, a mucilagem e a água residual. No processo de obtenção da bebida de café é gerado, um segundo resíduo, a borra de café (Figura 1). Estes resíduos contêm elevadas concentrações de açúcares, matéria orgânica, compostos orgânicos e inorgânicos

(Tabela 1) com grande potencial poluidor que, se libertados no meio ambiente sem tratamento, podem causar graves problemas ambientais.



Figura 1 – Resíduos de café. A – Casca, B – Polpa, C – Borra, D – Água residual

(Adaptado de Fan e Soccol, 2005).

Tabela 1 – Composição nutricional e de compostos com toxicidade, em percentagem, de vários resíduos de café (casca, polpa e borra)

Compostos	Casca	Polpa	Borra
Proteínas	9,2-11,3	8,5-12,1	10,3-12,2
Lípidos	2,0-2,3	1,5-2,0	15,2-17,9
Celulose	13,2-27,6	15,1-20,3	13,2-18,4
Cinzas	3,3-4,1	5,5-6,8	4,5-6,3
Extractos não-azotados	57,8-66,1	45,5-54,3	41,0-49,8
Taninos	4,5-5,4	1,8-2,4	1,2-1,5
Cafeína	0,8-1,1	0,5-0,7	0,02-0,08

Fonte: Fan e Soccol (2005)

A reutilização de resíduos do café tem sido uma das prioridades dos países produtores, tanto por razões ecológicas como económicas e sociais. Diversas tentativas de reciclagem destes resíduos têm sido testadas através da elaboração de compostagens, produção de fertilizantes orgânicos e de biogás, utilização na alimentação animal e na produção de cogumelos (Pandey *et al.*, 2000; Rathinavelu e Graziosi, 2005). Contudo, a

maior parte dos processos não é tecnologicamente eficiente, causa poluição secundária ou é economicamente inviável.

A polpa e a casca de café são, de entre os resíduos, os mais estudados a nível mundial por serem produzidos em elevadas quantidades e por apresentarem grande capacidade poluente. A remoção da casca (epicarpo) e da polpa (mesocarpo) que se encontra a envolver os grãos de café faz parte do seu processo de produção e, por norma, ocorre depois da colheita dos grãos de café e antecede o processo de fermentação e torrefação. A utilização destes resíduos na alimentação de ruminantes (ovinos e bovinos), peixes, aves e coelhos foi já testada (Donkoh *et al.*, 1988; Mazzafera, 2002; Rathinavelu e Graziosi 2005). Contudo, o seu uso neste âmbito apresenta algumas limitações devido à presença de elevadas quantidades de fibras e de compostos com efeitos anti-nutricionais, como sejam taninos, cafeína e fenóis (Ulloa e Verreth, 2002). Em alguns países, estes resíduos são utilizados como fertilizante, por serem ricos em matéria orgânica, azoto e potássio (Donkoh *et al.*, 1988), e ainda como substrato de crescimento de cogumelos (Leifa *et al.*, 2001; Murthy and Manonmani, 2008). Neste último caso, foram descritos alguns problemas decorrentes da sua utilização nomeadamente ao nível da germinação dos esporos fungicos e da incorporação de cafeína nos cogumelos, com consequências para o consumo humano (Fan e Soccol, 2005). A produção de biogás a partir da polpa (Boopathy, 1988) bem como das águas residuárias do café (Prado *et al.*, 2010), originada no processamento dos frutos do cafeeiro, são uma outra aplicação destes resíduos do café.

As potencialidades do aproveitamento da borra de café não tem sido tão estudado como a da polpa e casca do café. Embora em menor quantidade, a borra contém à semelhança da polpa e da casca, cafeína, taninos e polifenóis tornando-o por isso um resíduo tóxico (Tabela 1). Contudo, vários esforços têm sido feitos com o intuito de avaliar a utilização da borra do café nomeadamente na produção de cogumelos, biogás, composto/vermicomposto e de biodiesel (Pandey *et al.*, 2000; Kondamudi *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2009; Santos, 2010). O uso da borra de café no substrato de crescimento de várias espécies de cogumelos comestíveis, nomeadamente de *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* e *Lentinus edodes*, foi já testado e revelou ser bastante vantajosa (Pandey *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2005). Para além de permitir produzir cogumelos de elevado valor comercial, o resíduo restante, apresenta potencialidades de ser subsequentemente utilizado na alimentação animal. A degradação parcial da cafeína e de taninos, promovida pelo fungo, torna este resíduo menos tóxico e

mais apto para a alimentação animal (Fan e Soccol, 2005). A presença de borra de café na mistura de lixo orgânico doméstico revelou igualmente ser bastante eficiente na vermicompostagem por *Lumbricus rubellus* (Adi e Noor, 2009). O vermicomposto obtido tornou-se mais rico em K e Mg comparativamente ao vermicomposto obtido só a partir de lixo orgânico doméstico, não havendo alteração das restantes características nutricionais. A elevada quantidade de lípidos presente na borra, a maioria dos quais triglicerídeos e ésteres de álcoolditerpeno, sugerem a possibilidade do uso de óleo extraído da borra na produção de biodiesel (Couto *et al.*, 2009). Os resultados alcançados até ao momento neste âmbito são bastante promissores tendo sido já demonstrado o seu potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel (Santos, 2010). Uma outra potencialidade da borra, assim como dos outros resíduos de café, reside no seu uso como matérias-primas na obtenção de alimentos funcionais ou nutracêuticos, devido à presença de compostos fenólicos e/ou com propriedades funcionais na sua composição (Naidu e Murthy, 2010). A borra de café foi ainda considerada um adsorvente de baixo custo e facilmente disponível para a remoção de corantes catiónicos no tratamento de águas residuais (Franca *et al.*, 2009).

Os países importadores de café, incluindo Portugal, são co-responsáveis por estes resíduos, mas apenas contactam praticamente só com a borra de café. Ainda assim, esta constitui um volume de resíduos representativos, estimando-se uma produção de 40 mil toneladas/ano em Portugal. A nível mundial, estima-se que sejam produzidos anualmente cerca de 6 milhões de toneladas de borra de café (Tokimoto *et al.*, 2005). Na indústria de café solúvel, uma tonelada de café verde origina em média 650 Kg de borra; por sua vez, 1 Kg de café solúvel produzido, origina 2 Kg de borra húmida, com 70-80% de humidade (Vegro e Carvalho, 2006). Apesar de ser obrigatória a separação da borra de café do lixo comum nos estabelecimentos comerciais, o seu destino é ainda o mesmo deste, acabando por ser enviado para aterros sanitários ou incineradoras, constituindo uma ameaça ambiental.

A utilização de borra de café na agricultura doméstica é uma prática muito mencionada, mas existe pouca evidência científica da sua efectividade ou mesmo segurança. Actualmente, não há referência a nenhum estudo detalhado do efeito da aplicação da borra de café na agricultura (culturas, solo e ambiente), como fertilizante. Sendo esta uma excelente fonte de nutrientes minerais, é importante dar um destino sustentável a este resíduo orgânico de forma a reduzir o seu impacto ambiental e de certa forma melhorar o ecossistema agrícola. Com o intuito de colmatar esta falta de

informação científica, procurou-se, neste trabalho, avaliar os efeitos da aplicação da borra de café, compostada e não compostada, e da sua concentração no crescimento, composição química e propriedades biológicas de plantas de alfaces (*Lactuca sativa* L.). Escolheu-se a alface como planta modelo para este estudo por apresentar um crescimento rápido, atingindo em poucos meses a fase adulta, e por ser uma das espécies hortícolas com maior produção a nível mundial (cerca de 23 milhões de toneladas por ano).

Do ponto de vista nutricional, 350g de alface apresentam aproximadamente 56kCal, 95,80% de água, 2,3% de hidratos de carbono, 1,20% de proteínas, 0,20% de gorduras, 0,50% de sais minerais (13,3 mg de potássio, 147,0 mg de fósforo, 133,0 mg de cálcio e 3,85 mg de sódio, magnésio e ferro). Contém ainda vitamina A (245-UI), vitaminas de complexo B (B1 – 0,31 mg e B2 – 0,66 mg) e C (35,0 mg) (Vilas Bôas *et al*, 2004).

Dada a inexistência de estudos sobre o resultado da adição de borra de café a culturas vegetais, efectuou-se numa primeira fase um ensaio de forma a se ter uma noção preliminar do efeito da aplicação da borra de café fresca e da sua concentração no crescimento de plantas de alface (Capítulo 2). Os resultados decorrentes deste ensaio preliminar foram extremamente importantes para o delineamento dos estudos subsequentes. Numa segunda fase, procedeu-se à avaliação da influência do estado da borra (compostada e não compostada) e da sua concentração no crescimento e composição mineral (Capítulo 2), bem como nas propriedades antioxidantes (Capítulo 3) das plantas de alface. Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir para a valorização agrícola deste resíduo de café.

Capítulo 2

Efeito da aplicação de borra de café como fertilizante no crescimento e composição mineral de plantas de alface

2.1. Introdução

O café (*Coffea* sp.) é uma das matérias-primas da agro-indústria mais importantes e de maior valor comercial em todo o mundo. O café é, de entre as bebidas, uma das mais consumidas no mundo; e a produção mundial de café chega a ser superior a 105 milhões de toneladas por ano (Ximenes, 2010). Contudo, a grande produção e consumo de café originam uma enorme quantidade de resíduos, nas quais se inclui a borra de café. Apesar da grande quantidade de resíduos produzidos no meio agrícola e agro-industrial, apenas uma pequena percentagem é reutilizada, fruto do desconhecimento do seu potencial nas diversas áreas, como por exemplo a energética, agrícola, pecuária e mesmo alimentar. Nos dias de hoje, é enorme a pressão política e social para a redução da poluição resultante das actividades industriais. Neste sentido, a reutilização da borra de café apresenta um enorme interesse quer ambiental, como económico e social. Uma das potencialidades da borra de café reside no seu uso na agricultura como fertilizante. Trata-se de uma prática comum cujo efeito na produção agrícola, solos e propriedades nutricionais da cultura ainda estão por explorar. A utilização da borra de café como fertilizante, parece ser muito promissora por ser rica em matéria orgânica, e em macro- e micronutrientes (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição orgânica e mineral da borra de café

Parâmetros	Concentração (%)
Matéria Orgânica	90,46
Carbono/Azoto (C/N)	22/1
Azoto	2,30
Fósforo	0,15
Potássio	0,35
Cálcio	0,08
Magnésio	0,13
Alumínio	0,03
Ferro	0,01

Fonte: Mussatto *et al.*, 2011

Contudo, à semelhança de outros resíduos orgânicos, a borra de café poderá ter que ser submetido a um processo de compostagem previamente à sua utilização como fertilizante orgânico. Os materiais orgânicos dos resíduos, na sua grande maioria, necessitam sofrer transformações para que adquiram condições compatíveis com aquilo

que se convencionou chamar “matéria orgânica” e que, na sua essência, são os compostos orgânicos capazes de induzir mudanças benéficas no solo sob o ponto de vista agrícola. A compostagem é um dos métodos considerados mais atractivos para o tratamento dos resíduos orgânicos (Raviv, 1998). Consiste na decomposição aeróbia de sólidos orgânicos pela acção microbiana, sob condições de temperatura e humidade controlada, dando origem a um produto estabilizado, denominado composto, em que os compostos orgânicos sofreram mineralização. Ao ser aplicado no solo, o composto pode melhorar a infiltração e retenção de água, diminuir as variações de temperatura, reduzir a erosão, melhorar a sanidade das culturas, ao favorecer um controlo natural das pragas, e fornecer nutrientes para o crescimento das plantas (Torrentó *et al.*, 2008 cit. por Casco e Herrero, 2008).

A compostagem da borra de café poderá ser uma prática importante e essencial para que se possa utilizar em segurança este resíduo como fertilizante orgânico. Existem evidências de que, no processo de compostagem da borra de café, intervenha o azoto na mineralização da matéria orgânica. Deste modo, a borra de café quando aplicada directamente no solo poderá reduzir a disponibilidade deste elemento químico para as plantas. Ao invés de adubar, a borra de café retira este elemento que já estava presente no solo.

A compostagem tem como objectivo fazer o tratamento dos resíduos orgânicos através de um processo biológico, sendo o material orgânico transformado, pela acção de microrganismos, em material estabilizado e utilizável na preparação de correctivos orgânicos do solo e de substratos para as culturas. No processo de compostagem, os microrganismos que promovem a transformação da matéria orgânica através da oxidação da matéria necessitam de O₂, sendo então necessário uma porosidade de 25 a 35% do volume em ar. Em termos de humidade, esta deve variar entre 55 a 65%, havendo necessidade de a pilha permanecer sempre húmida. A temperatura não deve ser superior a 65-70°C. Relativamente à relação C/N deve variar entre 25-30 (Anónimo 2, 2011).

Durante a compostagem liberta-se, principalmente, dióxido de carbono, vapor de água, mas também amoníaco e outros gases que podem ser prejudiciais para o ambiente. O termo composto orgânico pode ser aplicado ao produto compostado, estabilizado e higiénico, que é benéfico para a produção vegetal.

A matéria orgânica utilizada para a compostagem pode ser classificada de duas formas, a dos materiais ricos em carbono e a dos materiais ricos em azoto. Entre os

materiais ricos em carbono podemos considerar os materiais lenhosos como a casca de árvores, as aparas de madeira e o serrim, as podas dos jardins, folhas e agulhas das árvores, palhas e feno e papel. Entre os materiais azotados incluem-se as folhas verdes, estrumes animais, urinas, restos de plantas hortícolas, erva, etc. (Brito, 2006).

Quase todas as unidades que produzam resíduos orgânicos podem fazer compostagem dos respectivos resíduos. A compostagem pode ser conduzida de diversas formas: em grandes instalações centralizadas com matéria orgânica recolhida selectivamente, em explorações agrícolas ou agro-pecuárias e em pequenas unidades de carácter familiar (compostagem doméstica).

No sistema de pilhas longas estas são geralmente reviradas na fase da compostagem que requer mais oxigénio e em que se produz mais calor, enquanto que as pilhas estáticas não são reviradas (Brito, 2006).

Face ao exposto, neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito da aplicação da borra de café como fertilizante no crescimento de plantas de alface. Numa primeira fase foi avaliada o efeito da aplicação da borra de café, em estado fresco e da sua concentração no crescimento e composição mineral de plantas de alface (primeiro ensaio). Os resultados decorrentes deste estudo preliminar permitiram o delineamento de um segundo ensaio cujo principal objectivo consistiu na avaliação do efeito da compostagem da borra de café no crescimento e composição mineral de plantas de alface.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Primeiro ensaio

2.2.1.1. Produção de plantas

As sementes de *Lactuca sativa* L. da variedade Bola de Manteiga foram postas a germinar (Figura 2) em placa de alvéolos contendo terra vegetal [Siro (R) Germe], no início de Agosto de 2010. A germinação decorreu a temperatura controlada ($20\pm 7^{\circ}\text{C}$) no complexo de estufas da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB). A rega foi efectuada automaticamente por nebulização com duração de 10 segundos e frequência de 40 minutos.



Figura 2 - Sementeira das alfaces em placa de alvéolos. Colocação de uma semente por alvéolo (1), germinação (2); crescimento das plantas (3) até ao momento de transplante (4), com 26 dias.

2.2.1.2. Tratamentos

Após 26 dias da sementeira, as plântulas foram transferidas para vasos (uma planta por vaso), de capacidade de 1 L, contendo terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações, nomeadamente 0% (controlo), 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). No momento da transplantação mediu-se em cada plântula, o comprimento da parte aérea e da raiz maior e contaram-se o número de folhas totais. A mistura da terra vegetal com a borra de café fresca foi realizada numa betoneira.

Para cada tratamento foram efectuadas sete repetições, contendo cada uma delas seis plantas, o que perfaz um total de 42 plantas por tratamento. Os vasos foram colocados na estufa da ESAB, em condições controladas de modo a que a temperatura ambiente fosse de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A rega foi efectuada por nebulização, com uma duração de 10 segundos em cada 40 minutos. Na Figura 3, é indicado de forma esquemática, a distribuição das plantas (tratamentos) na estufa. Teve-se o cuidado de colocar as plantas de cada concentração paralelamente umas às outras, na bancada de trabalho da estufa, para que todas estivessem sujeitas às mesmas condições. As plantas estiveram a crescer nestas condições durante 36 dias (desde 14 de Setembro até 19 de Outubro de 2010). Durante este período realizaram-se 2 fertilizações, tendo a primeira sido realizada 7 dias após a plantação e a segunda após 21 dias. O fertilizante aplicado foi um adubo fluido composto, NPK com micronutrientes para hortícolas. É uma solução aquosa com 120 g/l de azoto, 40 g/l fósforo e 60 g/l de potássio (*Complezal 12-4-6 da BAYER*®).

A borra de café usada no ensaio foi recolhida em cafés da cidade do Porto, desta forma as suas características diferem das da borra resultante da actividade industrial das cafeiras, nomeadamente quanto ao teor em cafeína que é superior no subproduto da indústria do café.

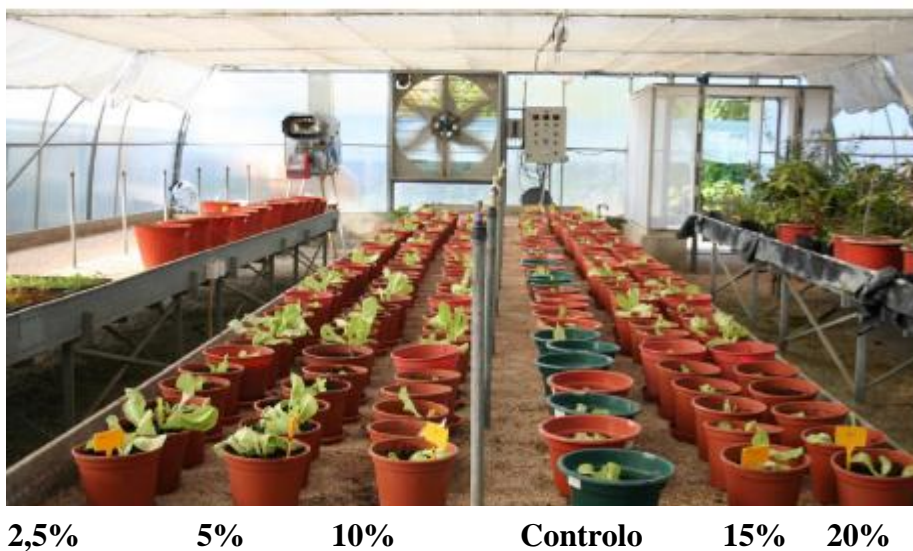


Figura 3 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando da transplantação.

2.2.1.3. Parâmetros avaliados

Ao fim de 36 dias de crescimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca, a diferentes concentrações, procedeu-se à colheita de todas as alfaces. Nas plantas colhidas foram avaliados diversos parâmetros de crescimento bem como a sua composição mineral.

2.2.1.3.1. Avaliação de parâmetros de crescimento

A avaliação do crescimento foi efectuada pela determinação do número total de folhas, comprimento da raiz maior e comprimento da parte aérea. Com os valores obtidos calculou-se o comprimento das plantas e as razões altura total / comprimento da raiz. Calcularam-se ainda os acréscimos diários dos mesmos parâmetros ($\Delta x / \Delta t$) e as taxas de crescimento relativo (TCR). As TCR são definidas como uma medida do acréscimo da parte aérea ou da parte radicular por unidade de acréscimo desse parâmetro (cm) e por unidade de tempo (dia) e é expressa em milímetros por centímetro, por dia ($\text{mm cm}^{-1} \text{d}^{-1}$). Foram avaliadas 24 plantas por tratamento. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

A avaliação do crescimento em função do peso foi efectuada pela determinação do peso fresco (Pf) e peso seco (Ps) das plantas completas e separadamente da parte aérea e radicular. O material fresco foi pesado numa balança analítica (Kern) e posto a secar em placas de Petri de vidro em estufa ventilada (Memmert) a 60°C. Após 3 dias de secagem, o material foi novamente pesado. Com os valores obtidos calcularam-se as razões peso seco / peso fresco (Ps/Pf). As determinações dos pesos foram efectuadas em 11 plantas por tratamento. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

A quantificação de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) foi efectuada nas folhas internas e externas de alfaces frescas submetidas aos diferentes tratamentos, ao fim de 36 dias. A determinação foi realizada espectrofotometricamente após extracção com metanol (Ozerol e Titus, 1965). As determinações foram efectuadas em 5 repetições (folha externa e folha interna) por tratamento e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

As quantidades de clorofila *a* (Cla), clorofila *b* (Clb) e carotenóides foram calculadas pelas fórmulas:

$$Cla = 16,5 \text{ Abs } 664 - 8,3 \text{ Abs } 651 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

$$Clb = 33,8 \text{ Abs } 651 - 12,5 \text{ Abs } 664 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

$$\text{Carotenóides} = (1000 \text{ Abs } 470 - 1,62 \text{ Cla} - 104,69 \text{ Clb})/221 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

2.2.1.3.2. Avaliação da composição mineral

As folhas das alfaces foram lavadas e secas numa estufa ventilada (Memmert) a 60°C durante 3 dias. Após secagem, as folhas foram moídas num triturador da marca *Moulinex*, Modelo *Depose, Type D56*, tendo sido armazenadas em Falcon 50 mL à temperatura ambiente e no escuro até à análise da sua composição mineral. Para cada um dos tratamentos foi ainda recolhida uma alíquota do substrato de crescimento das alfaces aquando o transplante e aquando a colheita das plantas, bem como da borra fresca utilizada na preparação do substrato (100% Borra fresca) e analisado quanto à sua composição mineral. O substrato foi mantido a -20°C tendo sido feita uma descongelação prévia antes da análise.

A determinação de Azoto (N) foi efectuada somente em folhas de alface, enquanto que o Fósforo (P), Magnésio (Mg), Potássio (K) e Cálcio (Ca) foi avaliado nas folhas assim como no substrato de crescimento das alfaces e na borra fresca utilizada na preparação do substrato (100% borra).

Para a determinação da percentagem de Azoto (N), usou-se o Método de Kjeldahl, segundo Peixoto (2007). Para tal, 1 g de amostra seca foi digerida em 14 mL de ácido sulfúrico 95-97% e 7 g K₂SO₄ a 400°C durante 45 minutos num digestor *Velecta*. Após digestão a amostra foi analisada num destilador automático (*Velp scientifica UDK 125* - destillation and titulation unit). Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

Para a determinação do teor em Fósforo, Magnésio, Potássio e Cálcio, 0,25g de amostra foram digeridas em 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) 60% durante 20 minutos a 200°C num microondas (Marspress CEM). Após a digestão aferiu-se com água desionizada até perfazer 50mL. Para a determinação do fósforo usou-se o método do ácido ascórbico. Este método baseia-se na reacção do molibdénio de amónio e do antimónio tartárico de potássio com o ortofosfato, em meio ácido, para formar o ácido fosfomolíbico que reduz a intensidade do azul de molibdénio na presença do ácido ascórbico. Para tal, as amostras de folhas digeridas foram inicialmente diluídas 5 vezes

em água desionizada. Nas amostras de substrato digeridas não houve necessidade de diluir. A 1 mL de amostra digerida adicionou-se 4 mL solução de mudança de cor e após 30 min de incubação à temperatura ambiente procedeu-se à leitura da absorvância a 882 nm (*Qlabo – T80 + UV/VIS Spectrometer PG Instruments Lda*). A solução de mudança de cor foi preparada adicionando 5 mL de solução de molibdénio de amónio a 2 mL de ácido ascórbico a 13,2% (m/v). Após homogeneização fez-se com água desionizada até aos 200 mL. A solução de molibdénio de amónio foi obtida dissolvendo 15g de molibdénio de amónio em 50 mL de água desionizada. Após aquecimento a 60°C até a solução ficar límpida, adicionou-se 0,37g de antimónio de tartarato de potássio e 175mL de ácido sulfúrico concentrado (96%). Após homogeneização fez-se com água desionizada até aos 250mL. Para a obtenção da recta de calibração, foram preparadas soluções-padrão cujas concentrações variaram entre 1 e 5 mg/L, a partir de uma solução mãe de KH_2PO_4 a 1000 ppm. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

A quantificação do potássio foi efectuada na solução digerida por absorção atómica e o magnésio e o cálcio foram determinados por fotometria de chama. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

2.2.1.4. Tratamento estatístico

Os resultados são apresentados sob a forma de médias, acompanhadas pelo respectivo desvio padrão.

As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa SPSS v.17, e calculadas pelo teste de Tukey, para probabilidades inferiores a 0,05, 0,01 e 0,001 considerando-se, respectivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

2.2.2. Segundo ensaio

2.2.2.1. Produção de plantas

As sementes de *Lactuca sativa* L. da variedade Quatro Estações foram postas a germinar em placa de alvéolos contendo terra vegetal [Siro (R) Germe], no início de

Fevereiro de 2011. A germinação decorreu nas mesmas condições referidas anteriormente no primeiro ensaio, no complexo de estufas da ESAB.

2.2.2.2. Tratamentos

Após 32 dias da sementeira, as plântulas foram transferidas para vasos (uma planta por vaso), de capacidade de 1 L, contendo terra vegetal e borra de café fresca (ensaio A) ou terra vegetal e borra de café compostada (ensaio B), às concentrações de 0% (controlo), 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). No momento da transplantação mediu-se em cada plântula, o comprimento da parte aérea e da raiz maior e contaram-se o número de folhas totais. A mistura da terra vegetal com a borra de café fresca/borra compostada foi realizada numa betoneira tal como aconteceu no primeiro ensaio. Para cada tratamento foram efectuadas sete repetições, cada uma com seis plantas, o que perfaz um total de 42 plantas por tratamento. Os vasos foram colocados na estufa da ESAB, em condições controladas de modo a que a temperatura ambiente fosse de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A rega foi realizada manualmente de 2 em 2 dias por adição de 50mL a cada planta. Nas Figuras 4 e 5, é indicado, de forma esquemática, a distribuição das plantas (tratamentos) na estufa. As plantas estiveram a crescer nestas condições durante 39 dias (desde 07 de Março até 14 de Abril de 2011). Durante este período realizaram-se 2 fertilizações, tendo a primeira sido realizada 7 dias após a plantação e a segunda após 21 dias. O fertilizante aplicado foi o mesmo do primeiro ensaio.

O processo de compostagem da borra foi realizado nas instalações da LIPOR - Serviço Intermunicipalizado de Gestão de Resíduos do Grande Porto. Tendo sido da responsabilidade da entidade todo o processo de compostagem.



20% 15% Controlo% 10% 5% 2,5%

Figura 4 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando a transplantação (Borra de café fresca – ensaio A)



20% 15% Controlo 10% 5% 2,5%

Figura 5 - Esquema da distribuição das plantas na estufa, aquando a transplantação (Borra de café compostada – ensaio B)

2.2.2.3. Parâmetros avaliados

Após 39 dias de crescimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca/borra de café compostada, a diferentes concentrações, procedeu-se à colheita de todas as alfaces. Nas plantas colhidas foram avaliados diversos parâmetros de crescimento bem como a sua composição mineral.

2.2.2.3.1. Avaliação de parâmetros de crescimento

A avaliação do crescimento foi efectuada pela determinação do número total de folhas, comprimento da raiz maior, comprimento da parte aérea e área foliar. Com os valores obtidos calculou-se o comprimento das plantas e as razões altura total/comprimento da raiz. Foram avaliadas 24 plantas por tratamento. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

A avaliação do crescimento em função do peso foi igualmente efectuada, utilizando o mesmo procedimento descrito no primeiro ensaio.

A quantificação de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) foi efectuada nas folhas internas e externas de alfaces frescas submetidas aos diferentes tratamentos, ao fim de 39 dias. A quantificação de pigmentos fotossintéticos foi realizada de acordo com o método descrito no primeiro ensaio. Para cada tratamento foram efectuadas cinco repetições, para cada determinação foram efectuadas três determinações em folhas internas e externas.

2.2.2.3.2. Avaliação da composição mineral

A avaliação da composição mineral, em N, P, K, Ca e Mg, foi realizada de acordo com os métodos descritos no primeiro ensaio. Estes elementos foram determinados nas folhas internas e externas das plantas de alface submetidas aos diferentes tratamentos, bem como no substrato de crescimento e na borra de café fresca e compostada utilizada na preparação do substrato. Para cada tratamento foram efectuadas três repetições e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

2.2.2.3.3. Análise citogenética

A germinação das sementes de alface “Quatro Estações” foi efectuada em caixas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel de filtro estéril humedecido com água destilada. Em cada caixa de Petri foram colocadas 6 sementes de alface, previamente esterilizadas. A esterilização foi efectuada em lixívia comercial a 0,3% cloro activo, durante 3 minutos seguida por 3 lavagens em água destilada estéril (3 minutos cada lavagem). Todo este processo decorreu em condições de assépsia, em câmara de fluxo laminar. As sementes foram colocadas a germinar, no escuro, em condições ambientais controladas ($25^{\circ}\text{C}\pm 2$), tendo aí permanecido durante 3 semanas, até ocorrer germinação. Findo este tempo, distribuíram-se as plântulas germinadas em 5 lotes. O sistema radicular de cada um dos lotes foi, em seguida, imerso numa das seguintes soluções aquosas de borra de café: 0%, 2,5%, 20% e 30% (p/v). Após 24h de exposição às diferentes concentrações de borra cortaram-se os ápices radiculares ($\pm 0,5\text{cm}$) com um bisturi, transferiram-se para um tubo eppendorfe de 1,5 mL e adicionou-se 1mL colchicina 0,5% (m/v) (Merck). Após 24h de incubação, a 4°C , os ápices radiculares foram lavados 3 vezes em água destilada (15 minutos cada), fixados em etanol: ácido acético (3:1, v/v), lavados 3 vezes em água destilada (5 minutos cada lavagem), hidrolisados em HCl 1 N durante 5 minutos, seguida de uma nova lavagem (3 vezes) em água destilada. Os ápices foram em seguida colocados sobre uma lâmina de vidro, cortados à mão e corados com orceína acética 2%. Depois de colocar a lamela, o material foi ligeiramente macerado, observado e fotografado em diferentes ampliações num microscópio óptico Leitz laborlux 12. Foram avaliadas 100 células meristemáticas para cada tratamento, sendo observadas e anotadas as diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossómicas e nucleares.

2.2.2.3.4. Análise microscópica das raízes

Com o intuito de avaliar o efeito aplicação da borra de café na morfologia interna da raiz da planta de alface procedeu-se à elaboração de cortes histológicos para posterior análise por microscopia estereoscópica. Nesta avaliação utilizaram-se as raízes das plantas cultivadas em substrato de terra vegetal contendo borra de café fresca ou compostada, em todas as concentrações testadas (controlo, 2,5, 5, 10, 15 e 20%).

Após colheita, as raízes foram conservadas a 4°C numa solução de água destilada:glicerol:álcool (96%) numa proporção 4:3:3 (v/v/v). A observação

microscópica das raízes foi realizada em secções transversais, feitas à mão, de material fresco. Os cortes foram observados e fotografados em diferentes ampliações num microscópio óptico Leitz laborlux 12.

2.2.2.4. Tratamento estatístico

Os resultados são apresentados sob a forma de médias, acompanhadas pelo respectivo erro (ep) ou desvio padrão.

As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa SPSS v.17 e calculadas pelo teste de Tukey, para probabilidades inferiores a 0,05, 0,01 e 0,001 considerando-se, respectivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

Os efeitos da concentração no substrato constituído por terra vegetal e diferentes concentrações em Borra de café, fresca ou compostada, bem como a sua interação na influência do desenvolvimento de plantas de alface, foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Efeitos significativos uma vez com um valor de potência de um foram estabelecidas para cada um dos factores estudados, diferenças significativas entre os grupos foram avaliados pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Primeiro ensaio – borra fresca

Nas Figuras que se seguem, é apresentado o aspecto geral das plantas de alface, do primeiro ensaio, na estufa durante o seu desenvolvimento (Figura 6) e aquando da colheita ao fim de 36 dias de crescimento (Figuras 7 e 8). No final do ensaio as plantas de todos os tratamentos apresentavam, de uma maneira geral, um crescimento reduzido face às alfaces vulgarmente presentes nas superfícies comerciais. As folhas eram mais alongadas e em menor número comparativamente às alfaces comercializadas. Caracterizavam-se ainda por não apresentarem o aspecto de “repolho”, típico da variedade de alface utilizada neste ensaio, a “Bola de Manteiga”. Esta alteração na morfologia pode estar relacionada com o facto de as alfaces terem sido produzidas em vasos. As alfaces são normalmente cultivadas em solo ou mais recentemente em hidroponia, onde dispõem de uma área suficiente para o desenvolvimento do seu grande sistema radicular. Contudo, pela análise macroscópica das plantas obtidas nos diferentes

tratamentos (controlo e substrato com borra de café fresca a diferentes concentrações) podemos verificar que existem diferenças ao nível do crescimento da parte aérea e radicular (Fig. 8).

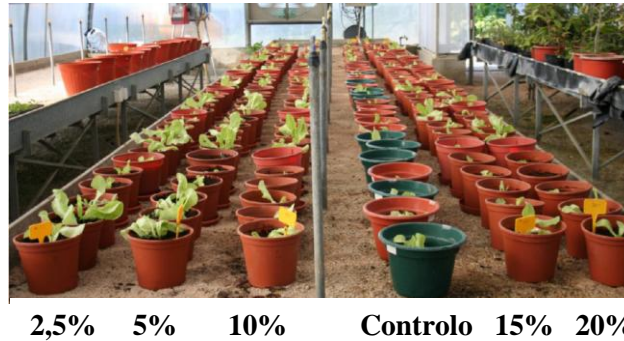


Figura 6 - Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.

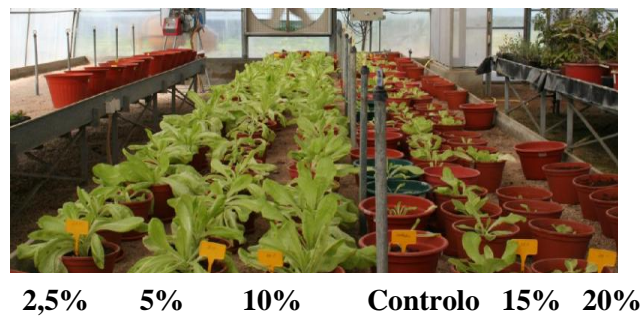


Figura 7 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando da colheita (ao fim de 36 dias), em substrato de terra vegetal e borra e borra fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.

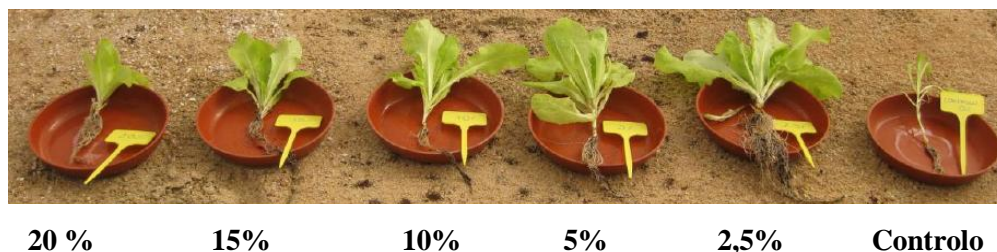


Figura 8 - Aspecto particular das plantas aquando da colheita (ao fim de 36 dias), em substrato de terra vegetal e borra e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.

2.3.1.1. Taxas de crescimento

Os resultados das determinações dos parâmetros de crescimento em termos de número de folhas são apresentados na Tabela 3. Verifica-se que em média o número de folhas duplicou em todos os tratamentos entre a plantação e a colheita, tendo quase triplicado no tratamento de 5%. No tratamento controlo, em termos médios, não ocorreu variação do número de folhas. A razão entre o número de folhas à colheita e à plantação foi superior em plantas cultivadas em borra à concentração de 5%, seguida por 10% e 2,5%, entre os quais não se registaram diferenças estatísticas. Na alface, o número de folhas constitui um parâmetro crucial para a sua comercialização, dado tratar-se de uma característica avaliada pelos consumidores aquando da compra do produto. De acordo com trabalho de Oliveira *et al.* (2005), o número de folhas varia de acordo com o grupo a que a variedade pertence. As variedades do grupo lisa, na qual se insere a “Bola de Manteiga”, apresenta em média 27 folhas por planta. No presente estudo este número foi inferior, tendo sido o maior valor (correspondente em média a 20 folhas por planta) obtido em plantas cultivadas em borra de café a 5% (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de folhas aquando da plantação (P) e colheita (C) de plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café fresca, ao fim de 36 dias.

Tratamento	Plantação (P)	Colheita (C)	C/P
Controlo	7,39±1,44	8,57±3,47	1,16±2,42
2,5%	8,22±2,00	19,39±5,69	2,36±2,85
5%	7,96±1,66	19,96±4,35	2,51±2,62
10%	7,61±1,73	18,00±4,71	2,37±2,73
15%	6,57±3,54	12,30±3,17	1,87±0,90
20%	7,30±2,38	11,17±3,61	1,53±1,52

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=23).

Na Tabela 4, encontram-se indicados o comprimento máximo da raiz na altura da plantação e da colheita, o acréscimo de crescimento em altura e acréscimos diários e as taxas de crescimento de plantas de alface cultivadas em terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações, ao fim de 36 dias de cultura. Da análise dos resultados verifica-se que as plantas de alface cultivadas em borra à concentração de 10 e 15% apresentaram um maior crescimento radicular comparativamente às plantas controlo, cujo crescimento desde a plantação à colheita foi nulo. Este resultado sugere que a borra aplicada à concentração de 10 e 15% favorece o desenvolvimento das raízes

comparativamente às outras concentrações testadas e ao controlo. Convém no entanto referir que os resultados relativos ao comprimento da raiz têm de ser analisados com alguma cautela, dado que durante a colheita grande parte do sistema radicular era perdido. Por se tratar de raízes muito finas e frágeis, uma fracção do sistema radicular ficava retido no substrato de crescimento.

Tabela 4 – Crescimento máximo da raiz aquando da plantação (P) e colheita (C), acréscimos de crescimento em altura (Δx), acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e taxas de crescimento relativo (TCR) em plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café fresca, ao fim de 36 dias.

Tratamento	P (cm)	C (cm)	C/P	Δx (cm)	$\Delta x/\Delta t$ (cm/dia)	TCR (mm/cm.dia)
Controlo	14,89±4,17	14,20±4,12	0,95±0,99	0,00	0,00	0,000
2,5%	15,08±2,91	17,23±4,07	1,14±1,40	2,15	0,06	0,003
5%	14,68±3,27	18,77±4,37	1,28±1,34	4,09	0,11	0,006
10%	13,47±3,63	18,66±5,70	1,39±1,57	5,19	0,14	0,008
15%	13,79±3,54	19,77±6,87	1,43±1,94	5,98	0,17	0,008
20%	15,35±2,78	19,00±6,53	1,24±2,35	3,65	0,10	0,005

Os valores são apresentados na forma média \pm desvio padrão (n=23).

Na Tabela 5 encontram-se indicados os resultados relativos ao comprimento da parte aérea das plantas de alface cultivadas em terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações, ao fim de 36 dias de cultura. Os resultados indicam que as plantas cultivadas em borra à concentração de 2,5%, 5% e 10% apresentam taxas de crescimento da parte aérea significativamente superior às plantas controlo e cultivadas em borra à concentração de 15% e 20%. Não foram contudo, encontradas diferenças estatisticamente significativas ao nível do crescimento das plantas cultivadas em borra fresca às concentrações 2,5%, 5% e 10%. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a borra de café afecta negativamente o crescimento da parte aérea das plantas quando presente a concentrações iguais ou superiores a 15%. Pelo contrário, concentrações baixas de borra de café (entre 2,5 e 10%) proporcionam um aumento do crescimento das plantas.

Tabela 5 – Crescimento máximo da parte aérea aquando da plantação (P) e colheita (C), acréscimos de crescimento em altura (Δx), acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e taxas de crescimento relativo (TCR) em plantas de alface a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.

Tratamento	P (cm)	C (cm)	C/P	Δx (cm)	$\Delta x/\Delta t$ (cm/dia)	TCR (mm/cm.dia)
Controlo	9,93±2,43	13,26±4,26	1,34±1,75	3,33	0,09	0,007
2,5%	10,36±3,57	23,61±2,86	2,28±0,80	13,25	0,37	0,016
5%	11,20±3,19	25,20±2,82	2,25±0,88	14,00	0,39	0,015
10%	9,98±3,08	23,59±2,43	2,36±0,79	13,61	0,38	0,016
15%	11,50±3,78	15,01±2,94	1,31±0,78	3,51	0,10	0,006
20%	10,71±3,75	10,49±2,32	0,98±0,62	0	0,00	0,000

Os valores são apresentados na forma média \pm desvio padrão (n=23).

Os resultados obtidos nas plantas de alface, ao fim de 36 dias de crescimento em substrato de terra vegetal com borra de café a diferentes concentrações, para as relações entre o comprimento máximo da parte aérea e o comprimento máximo da raiz, na altura da colheita, encontram-se na Tabela 6. Os resultados indicam que, de uma maneira geral, as plantas cultivadas a baixas concentrações de borra (2,5, 5 e 10%) apresentam razões de crescimentos próximos de 1 e muito similares ao controlo. Este resultado sugere que o crescimento da parte aérea nestas plantas foi muito similar ao radicular. Pelo contrário, nas plantas provenientes dos tratamentos com borra às concentrações de 15 e 20%, verificou-se um menor crescimento da parte aérea face à radicular, cujos valores apresentavam diferenças estatisticamente significativas face aos restantes tratamentos. A menor razão de comprimento parte aérea / parte radicular nestes dois tratamentos leva-nos a concluir que o investimento destas plantas foi mais direccionado para a parte radicular. Dado que na alface a porção consumida é a parte aérea, a sua redução no crescimento poderá constituir um problema para a comercialização deste produto.

Tabela 6 – Comprimento máximo da parte aérea (Ipa) e da raiz (Ipr) e sua razão, aquando da colheita de plantas de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.

Tratamento	Ipa (cm)	Ipr (cm)	Ipa/Ipr
Controlo	21,5	20,5	1,05
2,5%	27	29,5	0,92
5%	29,8	29	1,03
10%	27,2	28	0,97
15%	19,1	36,5	0,52
20%	16,9	35	0,48

Os valores são apresentados na forma média (n=23).

2.3.1.2. Produção de biomassa

Os resultados obtidos nas plantas de alface, ao fim de 36 dias de crescimento em substrato de terra vegetal com borra de café a diferentes concentrações, para os pesos frescos e secos e relações entre o peso seco e o peso fresco (Ps/Pf) encontram-se na Tabela 7. Mediante a análise dos resultados, verifica-se que o peso fresco e seco da parte aérea de plantas de alface cultivadas a baixas concentrações de borra de café (2,5, 5 e 10%) é significativamente superior face às plantas controlo e cultivadas a concentrações elevadas de borra (15 e 20%). Relativamente à parte radicular, as plantas cultivadas em substrato com 10% e 15% de borra foram as que apresentaram maior peso fresco, e o peso seco foi superior em plantas cultivadas em borra a 20%, seguida pelas plantas cultivadas a 10 e 15%. Os resultados sugerem que a aplicação de baixas concentrações de borra de café (entre 2,5 e 10%) exerce um efeito positivo na produção de biomassa, quer em termos de peso fresco como seco.

A razão entre o peso seco da parte aérea e do sistema radicular permite avaliar a relação de desenvolvimento entre estas duas estruturas, tendo-se verificado que a concentração de borra de café afecta significativamente este parâmetro (Tabela 7). Verificou-se para os tratamentos com menores concentrações de borra de café (2,5, 5 e 10%), uma razão mais elevada face ao controlo e a concentrações de borra superiores a 10%. Este resultado sugere que concentrações de borra de café baixas favorecem a acumulação de biomassa na parte aérea comparativamente à biomassa da parte radicular. Este resultado foi mais notório à concentração de 5%.

Tabela 7 - Peso fresco e seco da parte aérea e radicular de alfaces e razão entre o peso seco da parte aérea e do sistema radicular a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.

Tratamento	Parte aérea (Pa) (g)			Parte radicular (Pr) (g)			Razão
	Paf	Pas	Pas/Paf	Prf	Prs	Prs/Prf	Pas/Prs
Controlo	1,86±2,94	0,15±0,19	0,08±0,07	1,72±1,79	0,13±0,17	0,08±0,09	1,22±0,63
2,5%	13,26±9,5	0,75±0,55	0,06±0,06	3,16±2,39	0,24±0,2 ¹	0,08±0,09	3,46±1,55
5%	18,30±10,05	0,91±0,52	0,05±0,05	3,33±1,36	0,26±0,13	0,08±0,10	3,85±2,08
10%	13,57±6,55	0,90±0,40	0,07±0,06	3,66±2,14	0,33±0,22	0,09±0,10	3,64±2,06
15%	5,87±9,98	0,43±0,29	0,07±0,03	3,62±3,10	0,33±0,48	0,09±0,15	2,03±0,82
20%	2,57±3,19	0,34±0,42	0,13±0,13	2,80±3,02	0,37±0,45	0,13±0,15	1,40±1,06

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=11).

Legenda: Paf – peso fresco da parte aérea; Pas – peso seco da parte aérea; Prf – peso fresco da parte radicular; Prs – peso seco da parte radicular.

Os resultados apresentados indicam que a borra de café bem como a sua concentração influenciam significativamente o crescimento das plantas de alface quer em altura como em produção de biomassa. Nas condições de baixas concentrações de borra de café fresca (entre 2,5 e 10%), registou-se um significativo acréscimo no número de folhas (2,2 vezes), no crescimento (1,8 vezes) e na produção de biomassa da parte aérea (24,1 vezes para o peso fresco e 5,7 vezes para o peso seco), bem como na razão peso seco parte aérea/ raiz (8,8 vezes), face ao controlo. Contudo, os valores obtidos no presente estudo foram muito inferiores aos descritos por Dantas (2011). A produção de biomassa fresca e seca, observada por este autor, de plantas de alface cultivadas em solo onde foi aplicado 23,6 mg/ha de borra de café, foi de 262,05 g/planta e de 8,15 g/planta, respectivamente. Estas diferenças podem ser decorrentes das cultivares utilizadas, do processo de cultura (vaso *vs* solo), das quantidades de borra aplicadas e da sua composição química. Contudo, a produção de biomassa fresca de plantas de alface observada quer no presente estudo quer por Dantas (2011), é muito reduzida quando comparada com plantas de alface produzidas na presença de compostos feitos à base de outros resíduos orgânicos, como sejam estrume de bovino, ovino e de aves e resíduos de culturas agrícolas (Villas Boas *et al.*, 2004; Peixoto, 2006; Dantas 2011).

2.3.1.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Os resultados obtidos nas folhas internas (FI) e externas (FE) de plantas de alface, ao fim de 36 dias de crescimento em substrato de terra vegetal com borra de café fresca a diferentes concentrações, para os teores de pigmentos fotossintéticos (Cl_a, Cl_b e carotenóides) encontram-se na Tabela 8. Os resultados obtidos mostram que não existem diferenças entre as folhas internas e externas. Adicionalmente verificou-se que os teores em clorofilas *a* e *b* foi superior em plantas produzidas em substrato com concentrações baixas de borra de café (2,5, 5 e 10%) comparativamente às plantas controlo e produzidas em borra à concentração de 15 e 20%. Relativamente aos carotenóides, não foram registadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Refere-se ainda que, nas plantas controlo, não foi possível determinar os teores em pigmentos fotossintéticos separadamente das folhas internas das externas, devido à falta de matriz biológica. Os valores apresentados foram obtidos a partir da planta inteira.

Tabela 8 - Teores de pigmentos fotossintéticos (mg/g pf), clorofila *a* (Cl_a), clorofila *b* (Cl_b) e Carotenóides nas folhas internas (FI) e externas (FE) de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias.

Tratamento	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Carotenóides	
	FI	FE	FI	FE	FI	FE
Controlo	0,21±0,16		0,09±0,05		0,05±0,05	
2,5%	0,35±0,06	0,33±0,09	0,13±0,02	0,13±0,02	0,05±0,02	0,04±0,02
5%	0,38±0,12	0,32±0,11	0,13±0,03	0,12±0,02	0,06±0,03	0,04±0,02
10%	0,40±0,32	0,34±0,06	0,13±0,03	0,11±0,03	0,07±0,02	0,05±0,01
15%	0,32±0,09	0,26±0,06	0,09±0,02	0,08±0,01	0,06±0,02	0,05±0,01
20%	0,17±0,04	0,17±0,06	0,07±0,02	0,07±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=5).

2.3.1.4. Composição mineral de plantas e substrato de crescimento

Na Tabela 9 indicam-se os teores de azoto, fósforo, potássio, magnésio e cálcio (%), nas folhas de plantas de alface cultivadas em terra vegetal com borra de café fresca a diferentes concentrações, ao fim de 36 dias de cultura. Os resultados obtidos indicam que os valores de N são significativamente superiores nas plantas cultivadas em borra de café à concentração de 2,5% e 5%, face ao controlo e às plantas cultivadas a

concentrações de borra superior a 10%. Relativamente ao K, registaram-se valores significativamente superiores em plantas cultivadas em substrato contendo borra a uma concentração entre 2,5% e 15%, face às plantas controlo e cultivadas em borra a 20%. Pelo contrário, os teores em P, Ca e Mg foram superiores nas plantas controlo (caso P e Ca) ou muito similares (caso do Mg) às plantas cultivadas em borra de café.

Tabela 9 – Teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio em folhas de alfaces a crescer em diferentes concentrações de borra de café, ao fim de 36 dias, quantificados em folhas desidratadas.

Tratamento	Azoto	Fósforo	Potássio	Magnésio	Cálcio
Controlo	2,98±0,00	0,58±0,00	3,99±0,00	0,26±0,00	1,03±0,00
2,5%	3,38±0,17	0,21±0,18	5,11±1,46	0,21±0,02	0,74±0,03
5%	3,48±0,07	0,23±0,19	5,08±0,72	0,27±0,05	0,94±0,10
10%	1,99±0,09	0,20±0,22	4,48±0,63	0,16±0,00	0,54±0,04
15%	1,37±0,20	0,15±0,14	5,12±0,59	0,22±0,02	0,88±0,17
20%	1,19±0,14	0,13±0,14	2,42±0,27	0,15±0,01	0,55±0,05

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

O azoto é um elemento essencial para as plantas. Intervém em vários processos fisiológicos tais como na fotossíntese, respiração, absorção iónica de outros nutrientes, crescimento, diferenciação celular e genética. Para alface, o N é o segundo elemento químico mais extraído (Beninni *et al.*, 2005). No presente estudo, constata-se que em todos os tratamentos, inclusive no controlo, os níveis foliares de N estão abaixo do referenciado na bibliografia (5%) (Hochmuth e Maynard, 1996, citado por Domingos, 2006). Este resultado pode dever-se a vários motivos. O primeiro prende-se com a elevada mobilidade deste elemento no sistema solo-planta-atmosfera, podendo ocorrer a sua perda por lixiviação e/ou volatilização, não sendo por isso absorvido pelo sistema radicular das alfaces. O segundo motivo pode estar relacionado com a utilização do azoto no processo de decomposição da borra de café, resultando numa diminuição da sua disponibilidade para a planta. Por fim, é sabido que a mineralização de resíduos orgânicos, como é o caso da borra de café, é um processo lento comparativamente aos fertilizantes inorgânicos (Rodrigues e Casali, 1998). Nos resíduos orgânicos, o N é libertado gradualmente à medida que ocorre a sua mineralização a partir da matéria orgânica e a uma taxa inferior face aos fertilizantes inorgânicos (Rodrigues e Casali,

1998). Deste modo, provavelmente não houve libertação de N em tempo útil para planta pelo facto de ainda não ter sido mineralizado.

Nas Tabelas 10 e 11 indicam-se os teores de fósforo, potássio, magnésio e cálcio (%), nos substratos de crescimento compostos por terra vegetal e borra de café a diferentes concentrações aquando da plantação e ao fim de 36 dias de cultura, respectivamente. Aquando da plantação verificou-se que, os teores de fósforo e de magnésio no substrato de crescimento dos diferentes tratamentos (controlo e borra de café) e na borra de café usada na preparação do substrato, eram muito similares variando entre os 0 e os 0,04% para o P e entre 0,06 e 0,07% para o Mg (Tabela 10). Relativamente ao potássio verificou-se que, apesar dos valores serem superiores na borra de café e no substrato com 15% de borra comparativamente aos restantes tratamentos, a diferença não era estatisticamente significativa. No que concerne aos teores em cálcio, registaram-se valores superiores em substrato com borra à concentração de 2,5, 5 e 10%, face aos restantes tratamentos. De notar ainda que a borra utilizada na preparação do substrato de crescimento apresentava teores muito reduzidos deste elemento.

Tabela 10 – Teores de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio (%) presentes no substrato para cada tratamento aquando da plantação.

Tratamento	Fósforo	Potássio	Magnésio	Cálcio
Controlo	0,02±0,02	0,30±0,09	0,06±0,00	0,58±0,14
2,5%	0,02±0,03	0,25±0,01	0,07±0,01	0,78±0,05
5%	0,00±0,00	0,26±0,02	0,07±0,00	0,70±0,11
10%	0,04±0,04	0,31±0,04	0,07±0,01	1,04±0,45
15%	0,04±0,01	0,36±0,08	0,07±0,00	0,62±0,11
20%	0,04±0,02	0,28±0,01	0,07±0,01	0,51±0,11
100%	0,02±0,01	0,37±0,01	0,07±0,01	0,08±0,02

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

Ao fim de 36 dias de cultura, a análise do substrato de crescimento revela que os teores em fósforo e magnésio são ligeiramente inferiores face ao substrato aquando da plantação, sendo esta diferença mais notória para o potássio e o cálcio (Tabela 11). Entre os diferentes tratamentos, não se registaram diferenças significativas nos teores em minerais, à excepção do cálcio. Este elemento, ao fim dos 36 dias de cultura encontrava-se em maior quantidade no substrato com 2,5 e 5% de borra de café, face aos restantes tratamentos.

Tabela 11– Teores de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio (%) presentes no substrato para cada tratamento aquando da colheita.

Tratamento	Fósforo	Potássio	Magnésio	Cálcio
Controlo	0,04±0,02	0,20±0,00	0,05±0,00	0,39±0,10
2,5%	0,03±0,00	0,19±0,00	0,05±0,00	0,47±0,07
5%	0,03±0,02	0,17±0,00	0,05±0,00	0,44±0,07
10%	0,03±0,01	0,18±0,02	0,04±0,00	0,39±0,08
15%	0,03±0,00	0,18±0,01	0,05±0,00	0,33±0,06
20%	0,02±0,00	0,18±0,00	0,04±0,01	0,29±0,07

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

2.3.2. Segundo ensaio - borra fresca/compostada

Nas Figuras subsequentes, é apresentado o aspecto geral das plantas de alface, do segundo ensaio, na estufa durante o seu desenvolvimento e aquando da colheita ao fim de 39 dias de crescimento.



20 % 15% Controlo 10% 5% 2,5%

Figura 9 - Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.



2,5 % 5% 10% Controlo 15% 20%

Figura 10 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando da colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.



2,5 % 5% 10% Controlo 15% 20%

Figura 11 - Aspecto particular das plantas aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café fresca a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.



2,5 % 5% 10% Controlo 15% 20%

Figura 12- Aspecto geral das plantas na estufa durante o desenvolvimento em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo



2,5 % 5% 10% Controlo 15% 20%

Figura 13 - Aspecto geral das plantas na estufa aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo



2,5 % 5% 10% Controlo 15% 20%

Figura 14 - Aspecto particular das plantas aquando a colheita (ao fim de 39 dias), em substrato de terra vegetal e borra de café compostada a diferentes concentrações (2,5-20%) e controlo.

2.3.2.1. Taxas de crescimento

Os resultados das determinações dos parâmetros de crescimento em termos de número de folhas são apresentados na Figura 15. São ainda apresentados os resultados referentes ao primeiro ensaio com o intuito de verificar se a resposta da planta à aplicação de borra de café é independente da variedade de alface. De lembrar que no primeiro ensaio se utilizou a variedade “Bola de Manteiga”, enquanto no segundo ensaio foi utilizada a variedade “Quatro Estações”. Os resultados obtidos indicam que, de entre todos os tratamentos, o maior número de folhas foi observado em plantas cultivadas em borra de café fresca à concentração de 5%. De uma maneira geral, a aplicação de borra de café fresca a baixas concentrações (2,5 e 5%) permitiu obter um maior número de folhas face às plantas controlo e às plantas cultivadas em borra compostada. Pelo contrário, nas alfaces cultivadas em borra compostada, foram apenas observados acréscimos no número de folhas face às plantas controlo e cultivadas em borra de café fresca para concentrações superiores a 5% e a 10%, respectivamente. A análise da resposta das duas variedades de alface à aplicação de borra de café fresca evidencia diferenças apenas quando a concentração de borra é baixa (entre 2,5 e 10%); tendo-se verificado um maior número de folhas na variedade “Bola de Manteiga” face à variedade “Quatro Estações”.

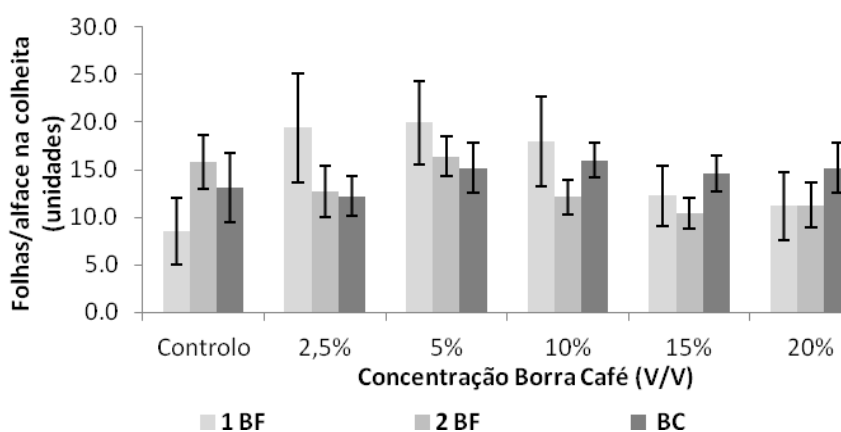


Figura 15 - Número de folhas aquando da colheita de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).

Na Figura 16 encontra-se indicado o crescimento relativo em altura (RG), cujos valores foram calculados pela diferença entre a altura da planta no final e no início do ensaio. Este parâmetro foi determinado para a parte aérea (Pa) e radicular (Pr) de plantas cultivadas em substrato contendo borra de café não compostada e compostada, em diferentes concentrações. São ainda apresentados os dados do primeiro ensaio. Relativamente à parte aérea verificou-se que as plantas cultivadas em borra de café compostada à concentração de 5% e 10%, foram as que apresentaram o maior crescimento relativo, o que parece demonstrar um maior vigor por parte destas plantas. Para todas as concentrações testadas (à excepção de 2,5%) verificou-se que a borra compostada favoreceu um maior crescimento relativo da parte aérea das alfaces face à borra de café fresca e ao controlo, sendo esta diferença mais notória a elevadas concentrações (superior a 15%). Ao nível deste parâmetro foram ainda registadas diferenças de respostas entre as variedades de alface estudadas. A variedade “Bola de Manteiga” apresentou um maior crescimento relativo face à “Quatro Estações”, quando cultivadas em borra de café a concentrações inferiores ou iguais a 15%. De notar ainda que, quando cultivada em borra de café, a variedade “Quatro Estações” teve um crescimento relativo inferior ou igual ao das plantas controlo, o que demonstra não haver qualquer efeito benéfico deste resíduo orgânico no crescimento desta variedade.

No que concerne à parte radicular, foi observado que a borra de café compostada favoreceu um maior crescimento relativo face à borra de café fresca, para qualquer uma das concentrações testadas (Figura 16). Contudo, este favorecimento da borra compostada no crescimento radicular face às plantas controlo foi só observado quando aplicado à concentração de 15%. Para qualquer uma das concentrações testadas de borra de café fresca verificou-se que a variedade “Bola de Manteiga” apresentou um maior crescimento relativo radicular face à “Quatro Estações”. Tal como referido no primeiro ensaio, a análise do crescimento radicular deve ser feito com alguma cautela uma vez que, aquando da colheita das plantas, inevitavelmente uma parte das raízes partiu-se, em todos os ensaios e concentrações.

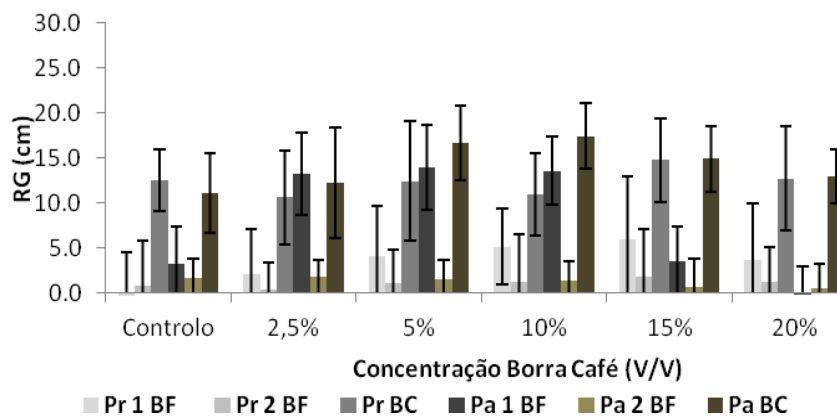


Figura 16 - Crescimento relativo em altura (RG) para a parte aérea (Pa) e radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=9).

Os resultados obtidos para as relações entre o comprimento máximo da parte aérea e o comprimento máximo da raiz, de plantas de alface submetidas aos diferentes tratamentos, na altura da colheita, encontram-se na Figura 17. Verificou-se que, em geral, este valor foi máximo em plantas cultivadas em borra de café fresca à concentração de 2,5%. Contudo, à medida que a sua concentração aumentava no substrato de crescimento, a razão entre o comprimento da parte aérea e o comprimento radicular decrescia para valores inferiores quer ao controlo quer às plantas cultivadas em borra de café compostada, atingindo valores inferiores a 1 à concentração de 15 e 20%. Pelo contrário, as plantas cultivadas em borra de café compostada apresentaram sempre razões superiores a 1 e às plantas controlo, em qualquer uma das concentrações testadas, atingindo um valor máximo à concentração de 10%. Este resultado sugere que a borra compostada parece estimular o crescimento da parte aérea face à radicular; enquanto que para a borra de café fresca, este efeito foi apenas notório quando aplicada a baixas concentrações (2,5%). A resposta das duas variedades de alface à aplicação de borra de café fresca foi muito similar, pela avaliação deste parâmetro. A única exceção foi à concentração de 2,5% onde se observou um maior efeito da borra de café fresca no crescimento da parte aérea da variedade “Quatro Estações” face à variedade “Bola de Manteiga”.

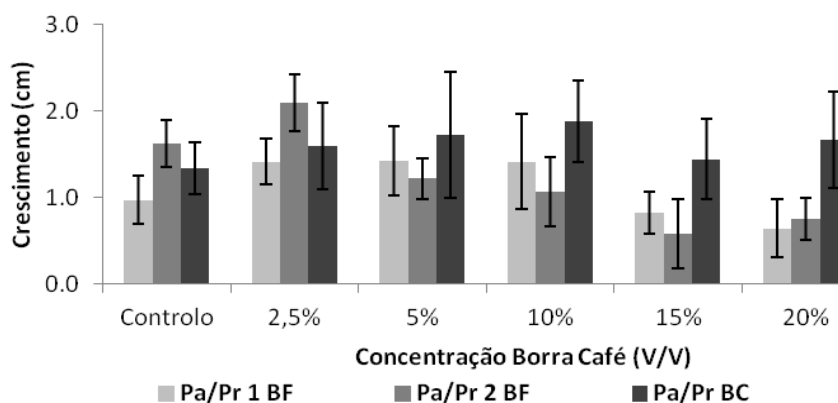


Figura 17 - Relação do comprimento da parte aérea (Pa) com o radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=9).

Através da análise da variância (Tabela 12) verificou-se que o tipo de borra de café utilizada (fresca e compostada), a sua concentração e a interacção entre estes dois parâmetros influenciou significativamente ($p < 0,001$) todos os parâmetros de crescimento avaliados, nomeadamente o comprimento da parte aérea e radicular, bem como a sua razão, o crescimento médio relativo em altura da planta completa e a área foliar. Para este último parâmetro foi apenas registado efeito significativo da concentração de borra de café usada na preparação do substrato de crescimento das plantas e da sua interacção com o estado da borra.

Tabela 12– Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, em diversos parâmetros de crescimento em termos de comprimento.

Parâmetros	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Comprimento Final Raiz maior	$F_{2,575}12,414^{***}$	$F_{5,575}14,502^{***}$	$F_{10,575}3,928^{***}$
Varição do comprimento raiz maior	$F_{2,575}210,011^{***}$	$F_{5,575}7,242^{***}$	n.s.
Comprimento Final PA	$F_{2,575}343,828^{***}$	$F_{5,575}121,655^{***}$	$F_{10,575}51,179^{***}$
Varição do comprimento PA	$F_{2,575}29,426^{***}$	$F_{5,575}44,342^{***}$	$F_{10,575}15,053^{***}$
Comprimento PA/SR	$F_{2,575}52,565^{***}$	$F_{5,575}32,155^{***}$	$F_{10,575}16,116^{***}$
Comprimento Final Total	$F_{2,575}322,291^{***}$	$F_{5,575}34,049^{***}$	$F_{10,575}14,073^{***}$
RG	$F_{2,575}146,506^{***}$	$F_{5,575}95,435^{***}$	$F_{10,575}35,056^{***}$
Área Foliar (cm ²)	n.s.	$F_{5,383}4,638^{***}$	$F_{5,383}11,527^{***}$

Níveis de probabilidade: ns: não significativo, *** $p < 0.001$.

Legenda: SR – Sistema radicular; PA – Parte aérea da planta; RG – Crescimento médio relativo em altura da planta completa (Comprimento final - Comprimento inicial)

2.3.2.2. Produção de biomassa

Os resultados obtidos para o peso fresco e seco da parte aérea e radicular de plantas de alface submetidas aos diferentes tratamentos, na altura da colheita, encontram-se nas Figuras 18 e 19, respectivamente. Relativamente à parte aérea foi nas plantas cultivadas em borra de café fresca à concentração de 5% que se observou a maior produção de biomassa, fresca e seca (Figura 18). Contudo, à medida que a sua concentração aumenta no substrato de crescimento, o peso da parte aérea decresce para valores inferiores quer ao controlo quer às plantas cultivadas em borra de café compostada. Pelo contrário, as plantas cultivadas em borra de café compostada apresentaram, para qualquer das concentrações testadas, produções de biomassa superiores às plantas controlo. Para concentrações iguais ou superiores a 10% a borra compostada permitiu uma maior produção de biomassa da parte aérea face à borra fresca.

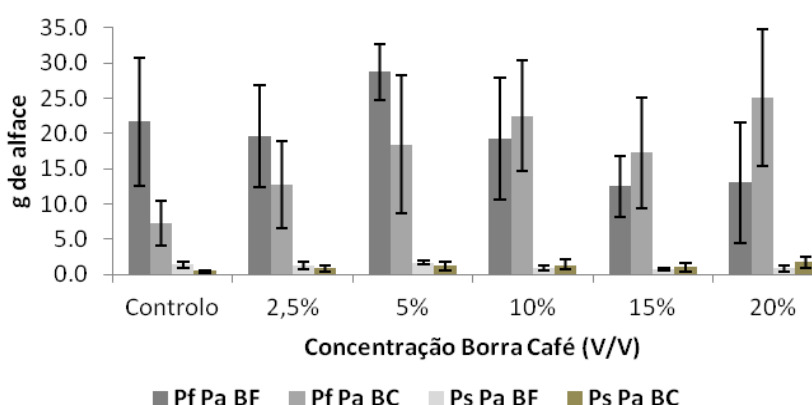


Figura 18 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) da parte aérea (Pa) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do segundo ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).

No que concerne ao sistema radicular verificou-se que, à excepção da concentração de 2,5%, foi a aplicação da borra de café fresca que permitiu uma maior produção de biomassa (Figura 19). Contudo, na análise deste parâmetro deve-se ter em conta que a perda de sistema radicular aquando da colheita das plantas pode influenciar significativamente os resultados obtidos.

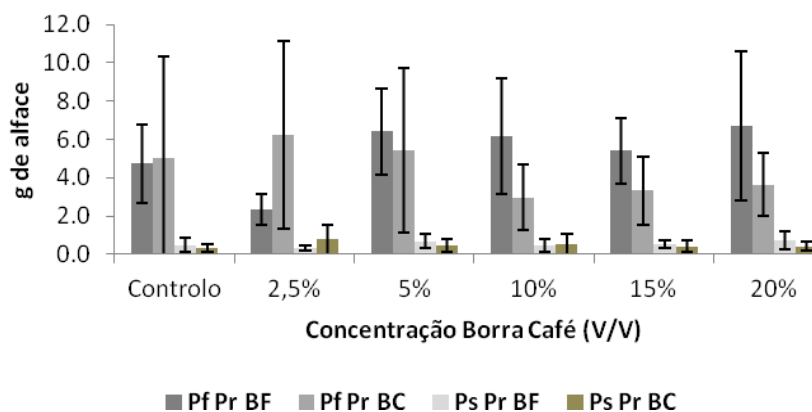


Figura 19 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) do sistema radicular (Pr) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do segundo ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).

Ao nível da produção de biomassa da parte aérea, verificou-se que as duas variedades de alface responderam de maneira diferente à aplicação da borra de café fresca (Figura 20). A variedade “Quatro Estações” apresentou uma maior produção de biomassa comparativamente à variedade “Bola de Manteiga”, tendo atingido o valor máximo quando aplicado à concentração de 5%. Este resultado poderá advir da maior eficiência da primeira variedade na utilização de nutrientes veiculados pela borra fresca. Esta suposição carece, no entanto, de confirmação.

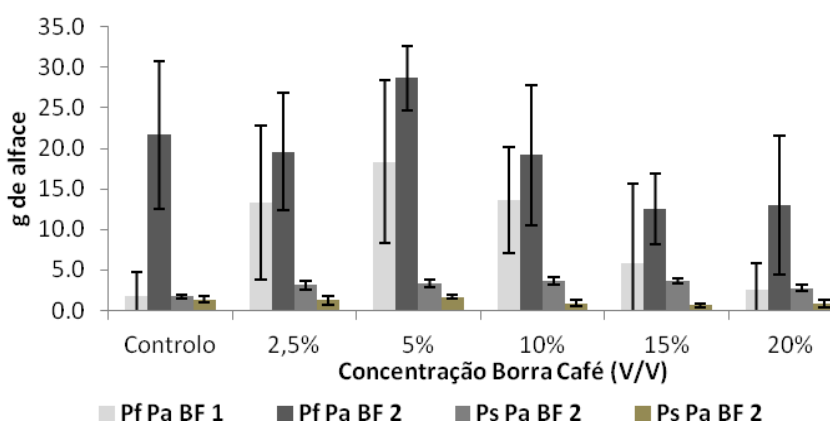


Figura 20 - Peso fresco (Pf) e seco (Ps) da parte aérea (Pa) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca provenientes do 1º (BF 1) e do 2º (BF 2) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).

A razão de peso foliar (LWR), calculada através da razão entre o peso seco foliar e o peso seco total, permite avaliar o investimento que a planta faz em biomassa foliar, proporcionalmente à biomassa das estruturas caulinares e radiculares. A avaliação deste

parâmetro é extremamente importante para a alface dado que a parte consumida corresponde às folhas. A análise dos resultados obtidos revela que a baixas concentrações (2,5%) a produção de biomassa foliar é mais favorecida pela aplicação de borra fresca do que pela compostada (Figura 21). Contudo, esta tendência inverte-se quando são aplicadas concentrações mais elevadas (15 e 20%), observando-se um maior incremento de biomassa foliar em plantas cultivadas em borra de café compostada.

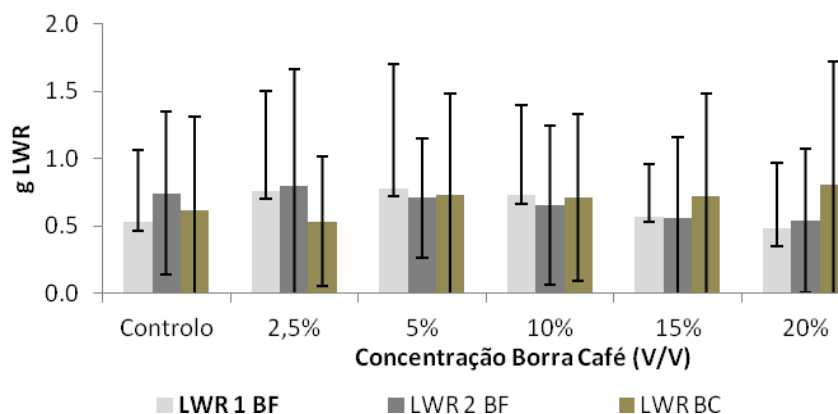


Figura 21 - Razão do peso foliar (LWR) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=32).

A análise da variância (Tabela 13) demonstra claramente que a maioria dos parâmetros de crescimento, estimados com base na produção de biomassa, são influenciados significativamente pelo estado em que a borra de café é aplicada (fresca ou compostada), a sua concentração e a interação entre estes dois parâmetros. De salientar que o estado da borra influencia significativamente o peso seco e fresco, quer do sistema radicular como da parte aérea, bem como a sua razão. Por seu lado, a concentração da borra demonstrou influenciar significativamente os pesos frescos e secos da parte aérea e da razão entre a parte aérea e radicular.

Tabela 13 – Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, em diversos parâmetros de crescimento em termos de biomassa.

Parâmetros	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Peso Fresco SR	$F_{2,161}6,900^{**}$	n.s.	$F_{10,161}2,281^*$
Peso Seco SR	$F_{2,161}5,771^{**}$	n.s.	n.s.
Razão Peso Seco SR/ Peso Fresco SR	$F_{2,161}3,788^*$	n.s.	n.s.
Peso Fresco PA	$F_{2,161}26,103^{***}$	$F_{5,161}9,118^{***}$	$F_{10,161}5,554^{***}$
Peso Seco PA	$F_{2,161}21,543^{***}$	$F_{5,161}4,376^*$	$F_{10,161}5,106^{***}$
Razão Peso Seco PA/ Peso Fresco PA	n.s.	$F_{5,161}4,275^*$	n.s.
Conteúdo em água PA	n.s.	$F_{5,161}4,385^*$	n.s.
Peso Seco Total	$F_{2,161}18,293^{***}$	$F_{5,161}2,880^*$	$F_{10,161}2,336^*$
Varição Peso Seco PA/SR	$F_{2,161}3,386^*$	$F_{5,161}3,390^*$	n.s.
Peso Seco PA/SR	$F_{2,161}3,949^*$	$F_{5,161}2,443^*$	$F_{10,112}5,647^{***}$
Peso Fresco PA/SR	$F_{2,161}16,539^{***}$	$F_{5,161}5,66^{***}$	$F_{10,112}11,859^{***}$
LWR	n.s.	$F_{5,161}4,659^*$	$F_{10,161}7,429^{***}$

Níveis de probabilidade: ns: não significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Legenda: SR – Sistema radicular; PA – Parte aérea da planta; LWR – Razão do peso foliar (Peso Seco Parte Aérea/Peso Seco Total)

2.3.2.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Os resultados obtidos nas folhas internas (FI) e externas (FE) de plantas de alface, cultivadas em substrato contendo borra de café não compostada e compostada, em diferentes concentrações, para os teores de pigmentos fotossintéticos (Cl_a, Cl_b e carotenóides) encontram-se na Figura 22. São ainda apresentados os dados relativos ao primeiro ensaio. De uma maneira geral verificou-se que os teores em clorofila *a* e *b* foram superiores em plantas cultivadas em borra de café compostada face às cultivadas em borra de café fresca. Esta diferença foi sobretudo notória para concentrações iguais ou superiores a 10%. Relativamente aos carotenóides, não foram registadas diferenças entre os diferentes tratamentos (borra compostada e não compostada). De entre todos os tratamentos, foi a borra compostada aplicada à concentração 10% e 15% que permitiu obter plantas com maiores teores de Cl_a, Cl_b e carotenóides. Exceptuando o primeiro ensaio, foram registadas diferenças nos teores de pigmentos fotossintéticos entre as folhas internas e externas. As folhas internas apresentaram teores de pigmentos fotossintéticos superiores às folhas externas, para qualquer uma das concentrações testadas de borra de café fresca e compostada.

Através da análise da variância (Tabela 14) verificou-se que o tipo de borra de café utilizada (fresca e compostada), a sua concentração e a interacção entre estes dois parâmetros influenciou significativamente ($p < 0,001$) a produção de pigmentos fotossintéticos nas folhas das alfaces.

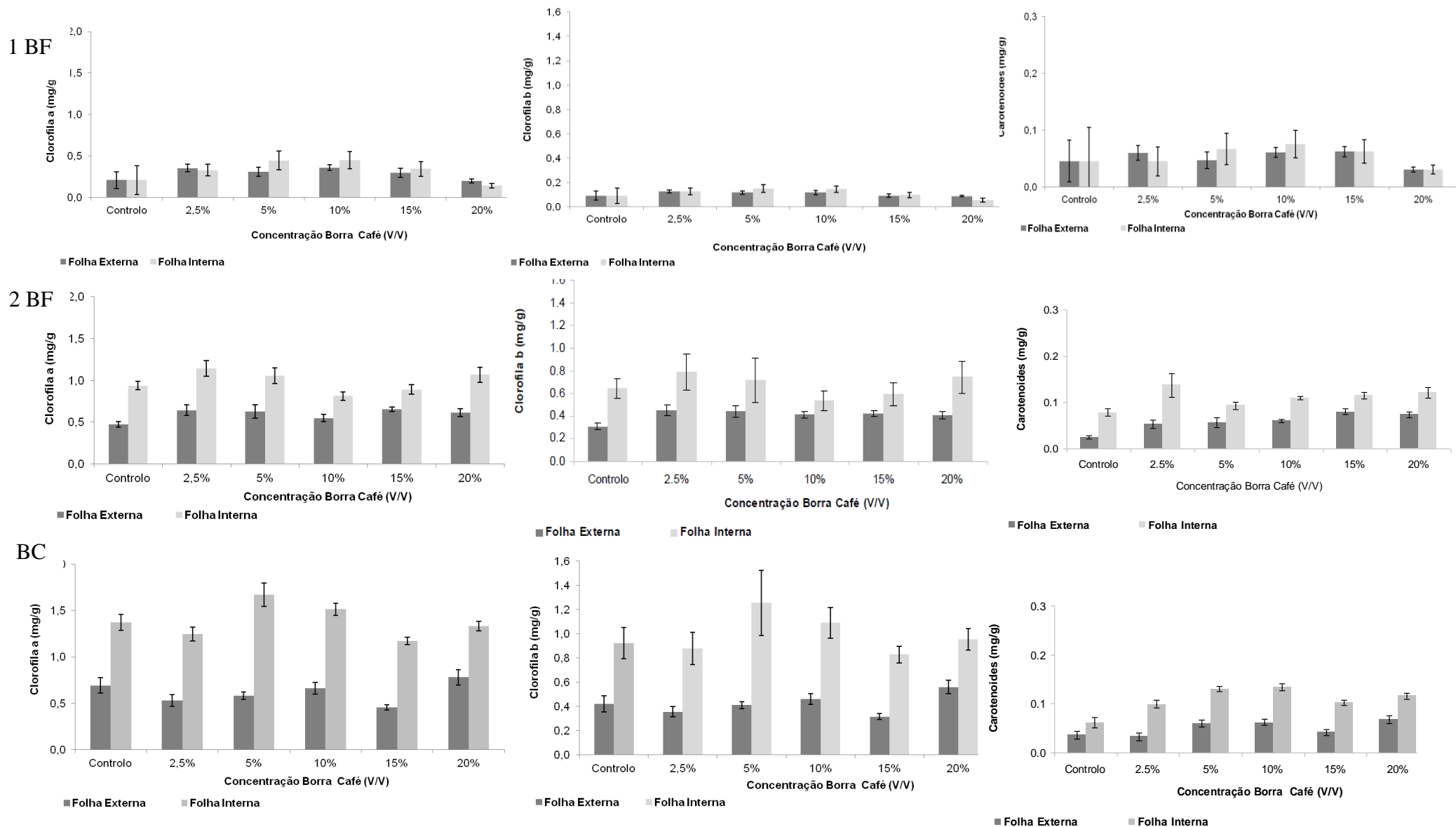


Figura 22 - Teores de clorofila a (Cla), clorofila b (Cib) e Carotenóides, nas folhas internas (FI) e externas (FE) de plantas de alface cultivadas em substrato com borra de café fresca (BF) e compostada (BC), em diferentes concentrações. Relativamente aos tratamentos com borra de café fresca são apresentados os resultados do 1º (1 BF) e 2º (2 BF) ensaio. A barra indica média \pm desvio padrão (n=7).

Tabela 14 - Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação estado de borra vs concentração da borra no substrato, nos teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas de alfaces (internas e externas).

Pigmentos fotossintéticos	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Cl _a (mg/g)	$F_{2,251}136,395^{***}$	$F_{11,251}12,024^{***}$	$F_{22,251}5,008^{***}$
Cl _b (mg/g)	$F_{2,251}184,086^{***}$	$F_{11,251}11,486^{***}$	$F_{22,251}4,771^{***}$
Cl _t (mg/g)	$F_{2,251}135,596^{***}$	$F_{11,251}12,351^{***}$	$F_{22,251}4,993^{***}$
Carotenóides (mg/g)	$F_{2,251}16,440^{***}$	$F_{11,251}6,933^{***}$	$F_{22,251}3,336^{***}$

Níveis de probabilidade: ns: não significativo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

2.3.2.4. Composição mineral do substrato de crescimento e de plantas

Nas Tabelas 15 e 16 indicam-se os teores de fósforo, potássio, magnésio e cálcio (%), nos substratos de crescimento compostos por terra vegetal e borra de café fresca ou compostada a diferentes concentrações aquando da plantação e da colheita, respectivamente. À plantação verifica-se que, de uma maneira geral, os teores de P, K, Ca e Mg são superiores no substrato contendo borra compostada face à não compostada (Tabela 15 e 18). Esta diferença é sobretudo notória para os macronutrientes. Ao nível da borra de café fresca observou-se diferenças em termos de composição mineral entre o primeiro e o segundo ensaio. Estas diferenças podem estar relacionadas com as variedades de café, bem como as suas proporções usadas na preparação dos lotes de café.

A análise do substrato de crescimento no final do ensaio demonstrou igualmente que nos tratamentos com borra de café compostada, o teor de nutrientes minerais era superior comparativamente aos tratamentos com borra de café fresca, com excepção do P (Tabela 16 e 19). Desde a plantação até à colheita verificou-se que no caso do substrato contendo borra fresca o teor de nutrientes minerais diminuiu. Pelo contrário, no substrato contendo borra compostada verificou-se um aumento significativo nos teores de P e uma redução acentuada nos teores de Ca e Mg. Este aumento dos teores de P na borra compostada, pode ter resultado do efeito residual deste tipo de fertilizante. Como referido anteriormente a decomposição dos resíduos no solo, pode ser um processo lento, assegurando um fluxo contínuo de nutrientes à planta (Santos *et al.*, 2001; Damatto Júnior *et al.*, 2006).

Tabela 15 – Teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio presentes no substrato para cada tratamento (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da plantação.

Concentração (v/v)		P	K	Ca	Mg
BF	Controlo	0,02±0,00	0,51±0,00	1,27±0,01	0,13±0,01
	2,5%	0,02±0,00	0,83±0,00	1,49±0,38	0,12±0,01
	5%	0,02±0,00	1,14±0,00	1,44±0,18	0,10±0,00
	10%	0,02±0,00	1,19±0,00	1,30±0,01	0,11±0,02
	15%	0,02±0,00	1,49±0,00	1,13±0,04	0,13±0,02
	20%	0,02±0,00	0,83±0,00	0,78±0,00	0,11±0,00
	100%	0,02±0,00	0,03±0,00	0,99±0,01	2,90±0,02
BC	Controlo	0,02±0,00	0,98±0,00	0,94±0,06	0,12±0,01
	2,5%	0,04±0,00	1,36±0,18	0,84±0,08	0,13±0,00
	5%	0,02±0,00	1,66±0,53	0,90±0,20	0,15±0,01
	10%	0,03±0,00	1,17±0,03	1,56±0,31	0,13±0,01
	15%	0,03±0,00	1,99±0,18	1,20±0,28	0,14±0,03
	20%	0,02±0,00	1,92±0,73	1,55±0,00	0,16±0,02
	100%	0,03±0,00	0,91±0,08	1,24±0,01	0,11±0,01

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 16 – Teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio presentes no substrato para cada tratamento (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da colheita.

Concentração (v/v)		P	K	Ca	Mg
BF	Controlo	0,83±0,00	0,78±0,09	0,11±0,00	0,02±0,00
	2,5%	0,20±0,00	0,44±0,02	0,05±0,00	0,02±0,00
	5%	0,20±0,01	0,44±0,02	0,05±0,00	0,02±0,00
	10%	0,19±0,017	0,51±0,09	0,05±0,00	0,02±0,00
	15%	0,19±0,00	0,51±0,09	0,05±0,00	0,02±0,00
	20%	0,17±0,00	0,41±0,02	0,05±0,01	0,03±0,00
	BC	Controlo	1,92±0,73	1,55±0,00	0,16±0,02
2,5%		0,16±0,01	1,54±0,28	0,14±0,02	0,03±0,00
5%		0,16±0,00	1,63±0,03	0,17±0,00	0,03±0,00
10%		0,15±0,01	1,78±0,254	0,19±0,03	0,03±0,00
15%		0,21±0,06	1,65±0,06	0,21±0,03	0,03±0,00
20%		0,47±0,02	1,46±0,05	0,21±0,02	0,03±0,00

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados relativos à composição mineral das folhas (Tabela 17), ao fim de 39 dias de cultura, indica que não existem diferenças no nível dos teores de N entre plantas cultivadas em borra de café fresca e compostada, a baixas concentrações (entre 2,5 e 10%). Para concentrações iguais ou superiores a 15%, os teores foliares em N decresceram em plantas cultivadas em borra de café fresca. Apesar do maior teor em N ter sido obtido em plantas cultivadas em borra de café compostada à concentração de 5% (3,87% de N) e 10% (3,88% de N), estes valores foram muito similares aos determinados nas plantas controlo (3,84% de N).

Relativamente ao P, registaram-se valores muito similares entre plantas cultivadas em borra compostada e não compostada, para qualquer uma das concentrações testadas (Tabela 17). O maior valor de P foliar foi registado nas plantas controlo, quer no ensaio com borra fresca (0,094% de P) como no de borra compostada (0,098% de P). Pelo contrário, os teores em K e Mg foram superiores nas plantas cultivadas em borra de café fresca face às cultivadas em borra compostada. Nas plantas cultivadas em borra fresca o maior valor de K (1,34%) e de Mg (1,03%) foi obtido à concentração de 5%, não tendo sido observado para o primeiro elemento mineral diferenças face ao controlo. Por sua vez, nas plantas provenientes de substrato com borra compostada, os valores máximos de K (0,81%) e de Mg (0,81%) foram observados no tratamento cuja concentração era de 10%. Os teores de Mg eram, contudo, muito similares aos encontrados nas plantas controlo (0,88%).

O teor em Ca em plantas cultivadas em borra não compostada e compostada foram muito similares, atingindo um valor máximo de 2,44% em substrato com borra não compostada a 10% e de 2,70% em substrato com borra compostada à concentração de 15% (Tabela 17). Neste último caso não se registaram diferenças nos teores em Ca face às plantas controlo.

Tabela 17 – Teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio em folhas de alface provenientes de cada um dos tratamentos (borra fresca – BF, e compostada – BC) aquando da colheita, quantificado em folhas desidratadas.

Concentração (v/v)	N	P	K	Ca	Mg	
BF	Controlo	3,84±0,00	0,09±0,00	1,37±0,00	1,04±0,00	0,26±0,00
	2,5%	3,60±0,00	0,09±0,00	1,34±0,12	2,22±0,08	1,03±0,00
	5%	3,34±0,01	0,08±0,00	1,21±0,14	2,23±0,07	0,98±0,03
	10%	3,67±0,04	0,08±0,00	1,24±0,04	2,44±0,11	0,78±0,09
	15%	2,87±0,00	0,08±0,00	1,07±0,11	2,16±0,39	0,84±0,03
	20%	2,87±0,01	0,08±0,00	1,131±0,03	2,26±0,00	0,83±0,00
BC	Controlo	3,84±0,04	0,10±0,00	0,71±0,10	2,77±0,77	0,88±0,16
	2,5%	3,43±0,00	0,09±0,00	0,66±0,14	1,57±0,32	0,66±0,14
	5%	3,87±0,04	0,08±0,00	0,56±0,19	2,32±0,77	0,54±0,19
	10%	3,88±0,04	0,07±0,00	0,81±0,04	2,02±0,03	0,81±0,04
	15%	3,76±0,03	0,08±0,00	0,59±0,09	2,69±0,32	0,59±0,09
	20%	3,66±0,01	0,08±0,00	0,79±0,14	0,07±0,40	0,79±0,14

Os valores são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3).

Através da análise da variância (Tabela 20) verificou-se que o tipo de borra de café utilizada (fresca e compostada), a sua concentração e a interacção entre estes dois parâmetros influenciou significativamente ($p < 0,001$) o teor de macronutrientes, em especial do N, e de micronutrientes (em especial do Mg) nas folhas das alfaces.

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito anteriormente no primeiro ensaio. De facto, também neste segundo ensaio se registaram valores de N e de P foliares inferiores aos descritos na literatura. A reduzida absorção do N por parte das plantas pode ter resultado da lenta mineralização deste elemento mineral a partir da matéria orgânica, tornando-o deste modo indisponível para a planta no primeiro ciclo de cultura (Rodrigues e Casali, 1998; Santos *et al.* 2001a; Santos *et al.* 2001b; Damatto Júnior *et al.*, 2006). As transformações podem ser lentas ou rápidas dependendo de diversos factores tais como a natureza da matéria orgânica e dos microrganismos, níveis de humidade, temperatura e pH (Rodrigues e Casali, 1998). A reduzida absorção do P pode estar relacionada com a sua baixa disponibilidade, quer pelo facto de se encontrar em baixas concentrações no substrato de crescimento, quer pela sua lenta mineralização a partir da matéria orgânica.

Contrariamente ao observado no primeiro ensaio, os níveis foliares de K no segundo ensaio foram inferiores aos descritos na literatura, cujos valores correspondem em média a 5-6% (Rodrigues e Casali, 1998; Bernardi *et al.*, 2005). A causa destas diferenças de absorção entre ensaios pode ser devido ao facto de se terem utilizado variedades de alface diferentes. A variedade “Bola de Manteiga”, utilizada no primeiro ensaio, parece ter uma maior capacidade de absorção de K face à variedade “Quatro Estações”, utilizada no segundo ensaio. Esta hipótese é corroborada pelos resultados obtidos da análise dos substratos de crescimento na altura da colheita. No primeiro ensaio, os teores de K no substrato eram muito baixos (em média 0,4%) contrariamente ao observado no segundo ensaio que foram superiores nos tratamentos com borra compostada (em média 1,61%), o que indicia a não absorção deste elemento pelas plantas. Relativamente ao magnésio e ao cálcio, verificou-se que os valores obtidos nas folhas das alfaces no segundo ensaio são muito superiores ao das plantas do primeiro ensaio e aos descritos na literatura (0,3% para o Mg e 1,2% para o Ca, Rodrigues e Casali, 1998; Bernardi *et al.*, 2005). Estas diferenças podem igualmente ser explicadas com base na variabilidade de absorção destes nutrientes minerais das duas cultivares de alface utilizadas no presente trabalho. Diferenças de absorção de nutrientes minerais entre variedades de alface foram igualmente observadas por Rodrigues e Casali (1998).

Tabela 18 - Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato aquando a plantação, nos teores (%) de Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nos substratos.

Nutrientes	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Fósforo	$F_{2,27}75,000^{***}$	$F_{6,27}7,333^{**}$	$F_{6,27}7,333^{**}$
Potássio	$F_{2,27}1,801^*$	$F_{6,27}3,440^{**}$	$F_{6,27}4,887^{**}$
Cálcio	$F_{2,27}0,167^*$	$F_{6,27}1,640^*$	$F_{6,27}8,810^*$
Magnésio	$F_{2,27}0,309^*$	$F_{6,27}1,490^*$	$F_{6,27}7,424^{***}$

Níveis de Probabilidade: ns: não significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tabela 19 - Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e da interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato aquando a colheita, nos teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nos substratos.

Nutrientes	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Fósforo	$F_{2,23}128,000^{***}$	$F_{5,23}30,000^{***}$	$F_{5,23}14,00^{***}$
Potássio	$F_{2,23}1,801^*$	$F_{5,23}3,440^{**}$	$F_{5,23}4,887^{**}$
Cálcio	$F_{2,23}49,000^{***}$	$F_{5,23}1,000^*$	$F_{5,23}1,000^*$
Magnésio	$F_{2,23}117,042^{***}$	$F_{5,23}0,142^*$	$F_{5,23}117,042^{***}$

Níveis de Probabilidade: ns: não significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tabela 20 – Valores de F e níveis de probabilidades do efeito do estado da borra (fresca ou compostada), da concentração da borra no substrato (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%) e a interação tipo de borra vs concentração em borra no substrato, nos teores (%) de Azoto, Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, nas folhas de plantas de alface desidratadas.

Nutrientes	Estado de Borra	Concentração da Borra no Substrato	Estado da Borra vs Concentração da Borra no Substrato
Azoto	$F_{2,35}875,032^{***}$	$F_{5,35}208,531^{***}$	$F_{10,35}129,747^{***}$
Fósforo	$F_{2,35}12,759^{***}$	$F_{5,35}1,248^*$	$F_{10,35}0,995^*$
Potássio	$F_{2,35}282,843^{***}$	$F_{5,35}5,790^{**}$	$F_{10,35}6,468^{***}$
Cálcio	$F_{2,35}85,177^{***}$	$F_{5,35}0,645^*$	$F_{10,35}4,836^{**}$
Magnésio	$F_{2,35}174,126^{***}$	$F_{5,35}2,789^{**}$	$F_{10,35}12,596^{***}$

Níveis de Probabilidade: ns: não significativo, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

2.3.2.5. Análise microscópica das raízes

A observação microscópica das raízes mostra que a aplicação da borra de café fresca, à concentração de 20%, induziu alterações na sua estrutura interna (Figura 23 B). Secções transversais de raízes provenientes de substrato constituído por borra de café fresca a 20%, mostram um cilindro central mais reduzido e com um menor número de feixes vasculares, nomeadamente de xilema, por comparação com as plantas controlo (Figura 23 A) e provenientes de substrato com borra de café compostada (Figura 23 C). Este reduzido número de feixes de xilema pode justificar os baixos teores de nutrientes minerais observados nas plantas de alface submetidas a este tratamento e consequentemente o seu reduzido crescimento em termos de biomassa e altura. De facto, é o xilema o responsável pelo transporte de água e de sais minerais na planta (Dinis, 2007). Não foram, contudo, detectadas diferenças ao nível da estrutura interna radicular entre plantas controlo e plantas cultivadas em borra de café compostada (Figura 23 A, C).

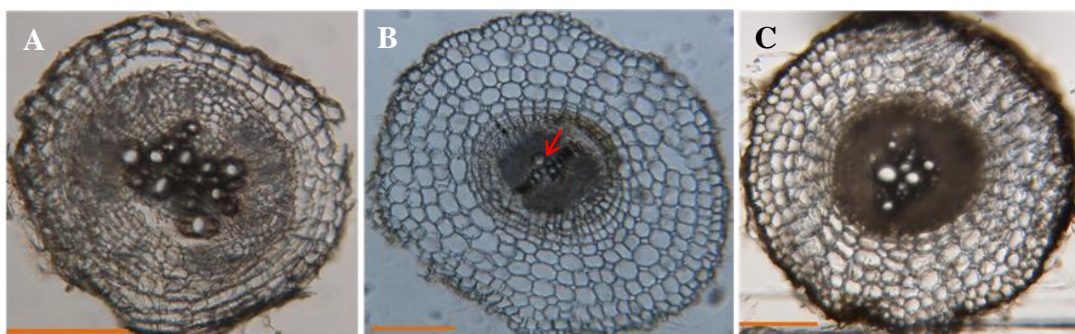


Figura 23 - Secções transversais de raízes de *Lactuca sativa* var. quatro estações, aos 39 dias de cultura em substrato de terra vegetal sem borra de café (A), ou com 20% de borra de café fresca (B) ou compostada (C).

A seta indica o xilema. Barra: 135.00 μm (A), 161.25m μm (B), 181.26 μm (C).

2.3.2.6. Análise citogenética

A análise citogenética efectuada tinha como objectivo avaliar o potencial tóxico da borra de café fresca, pela observação de mutações cromossómicas e/ou distúrbios no ciclo mitótico. Os resultados obtidos indicam que a técnica utilizada não foi a mais apropriada para identificar alterações cromossómicas, uma vez que não permitiu obter células na fase mitótica. Foi, no entanto, possível através desta técnica observar diferenças ao nível do núcleo das células entre os diferentes tratamentos. Verificou-se, que a borra de café fresca induzia a binucleação das células meristemáticas quando presente a concentrações iguais ou superiores a 20% (Figura 24). A borra de café fresca parece, assim, ter um efeito citotóxico devido às alterações nucleares observadas. Adicionalmente verificou-se que este efeito citotóxico aumentava proporcionalmente com o aumento da concentração da borra de café. De facto, verificou-se que o número de células binucleadas aumentou à medida que aumentava a concentração de borra de café (Tabela 21).

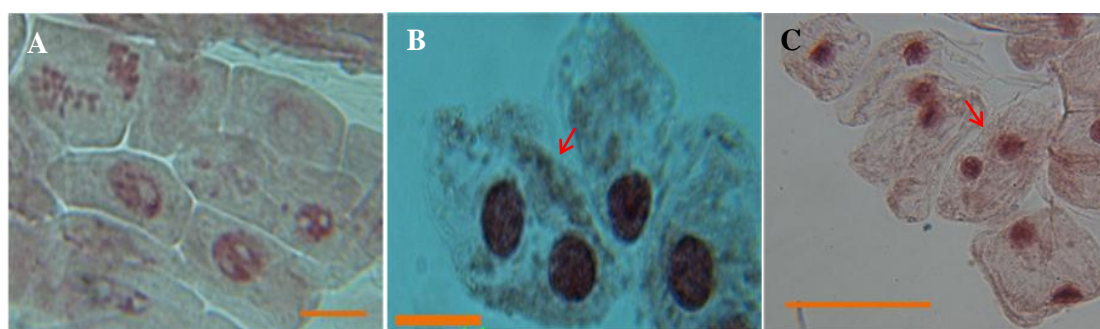


Figura 24 – Células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* L. quatro estações não eliciadas (A) ou eliciadas com borra de café à concentração de 20% (B) ou 30% (C). As células binucleadas encontram-se assinaladas com uma seta. Barra: 11.32 μm (A), 10.12 μm (B), 48.00 μm (C).

Tabela 21 – Percentagem de células binucleadas no tecido meristemático radicular de *Lactuca sativa* L. exposta a borra de café a diferentes concentrações.

Concentração em borra de café	Percentagem (%)
Controlo	0
2,5%	3
20%	11
30%	37

Capítulo 3

Avaliação da actividade antioxidante da alface, cultivada com adição de borra de café fresca e compostada

3.1. Avaliação da actividade antioxidante

Segundo estudos relacionados com a nutrição, saúde e bem estar, sabe-se que o consumo elevado de frutas e vegetais diminui o risco de contrair doenças, nomeadamente doenças cardíacas e cancerígenas, possuindo também acção antiviral e antibacteriana, entre outras (Paisley, 2005). Estas vantagens atribuídas às frutas e vegetais estão relacionadas com o facto de possuírem compostos com actividade biológica, tais como os antioxidantes, que quando presentes mesmo em pequena quantidade, por comparação com o substrato, diminuem ou inibem a oxidação do mesmo, permitindo que se mantenham as características físicas e/ou químicas do produto (Niki, 2010). Mesmo em pequenas quantidades, estes compostos podem impedir em parte a formação de radicais livres, possibilitando, assim a diminuição das reacções de oxidação (Valentão, 2002). Durante a actividade metabólica que ocorre no organismo humano, podem ser produzidos radicais livres. Estes interagem com o DNA, RNA, proteínas e demais substâncias oxidáveis, podendo advir, como consequência o envelhecimento celular, bem como, doenças degenerativas (Ramarathnam *et al.*, 1995). Os antioxidantes previnem a oxidação lipídica, podendo a acção destes compostos ocorrer de diferentes modos, nomeadamente através da diminuição da concentração de oxigénio, radicais livres e de iões metálicos de ligação para evitar o início da formação de radicais (Niki, 2010). Actualmente, as pessoas também possuem uma grande preocupação com a aparência física, estando cada vez mais os vegetais a ser introduzidos na dieta.

As saladas de alface são ricas em antioxidantes naturais, tais como a quercetina, kaempferol, luteolina, apigenina, crisoeriol e ácido ascórbico, devendo este vegetal fazer parte da dieta humana (Llorach *et al.*, 2008). De forma a avaliar a actividade antioxidante é necessário preparar extractos. Contudo, a forma como estes são obtidos, designadamente o tipo de amostra, temperatura, solvente, etc., influencia o resultado das determinações.

A avaliação da capacidade antioxidante de um composto ou de uma amostra, independentemente da sua constituição, baseia-se em estratégias de inibição por competição. Em inúmeros ensaios vão-se gerar/bloquear radicais através de diversos mecanismos, medindo-se a sua concentração em intervalo de tempo definidos (Chevion *et al.*, (1997) e Jasprica *et al.*, (2007)). A maioria destes métodos avalia a capacidade de bloquear radicais livres, tal como o ensaio que envolve o radical 2,2-difenil-1-picril-

hidrazilo (DPPH) (Jasprica *et al.* (2007) e Hatano *et al.*, (1988). A detecção e quantificação deste radical pode ser realizada por Espectrofotometria de UV-Vis. (Chevion *et al.* (1997) e Jasprica *et al.*, (2007)).

A actividade antioxidante pode também ser determinada, através do poder redutor de uma amostra. Esta metodologia baseia-se na capacidade que os antioxidantes apresentam para reduzir o ião férrico (Fe^{3+}) a ião ferroso (Fe^{2+}) (Elmastas *et al.*, (2007), Firuzi *et al.* (2005)).

Para avaliar a capacidade redutora total é muito comum utilizar-se o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Este método é baseado na reacção dos compostos fenólicos com um reagente colorimétrico, seguido de medição na região visível do espectro (Blasco *et al.*, 2005).

Nesta parte do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito sobre a actividade antioxidante de alface cultivada com adição de borra de café fresca e compostada. Contudo, antes de se proceder à avaliação da actividade antioxidante nas amostras de alface produzidas no presente estudo, numa primeira fase realizaram-se dois ensaios para avaliar de que forma as condições de extracção afectavam a determinação da actividade antioxidante de extractos de alface.

O primeiro ensaio consistiu na utilização de um desenho factorial para determinar o efeito de certas condições operacionais a usar na extracção de compostos com actividade antioxidante da alface, sua importância e as suas possíveis interacções. De entre os factores a analisar, estudaram-se a temperatura de extracção, o tipo de solvente, o tempo de extracção, o tipo de amostra (desidratada ou fresca) e a relação de amostra *versus* solvente, e avaliou-se a capacidade redutora total.

Num segundo estudo pretendeu-se otimizar as condições de extracção de compostos com actividade antioxidante a partir da alface e maximizar essa actividade antioxidante, através da metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology*). Nestes ensaios, além de se ter avaliado a capacidade redutora total, também se determinou o efeito bloqueador dos radicais livres DPPH.

Só após a realização destes dois ensaios e após determinação das melhores condições de extracção, é que se procedeu à avaliação da actividade antioxidante nas amostras de alface cultivadas no presente trabalho.

3.1.1. Parte Experimental

3.1.1.1. Primeiro Estudo – Utilização de um desenho factorial para avaliar o efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extractos de alface

A alface utilizada no presente estudo foi uma variedade comercial de folha lisa, adquirida numa superfície comercial. Utilizou-se um desenho factorial a 2 níveis (-1 e 1) para cada um dos factores analisados, tendo sido realizadas 16 experiências no total, tal como indicado nas Tabelas 22 e 23. Os factores e os níveis estudados foram: (A) Temperatura de extracção (30 e 60°C); (B) Tempo de extracção (10 e 60 minutos); (C) Solvente de extracção (metanol e água); (D) Tipo de amostra (fresca eseca) e (E) Relação de amostra em termos de matéria fresca *versus* solvente (1:1 e 1:4; m/v). Adicionalmente, ainda foram avaliadas as seguintes interacções entre os factores: AB, AC, BC, BE, CE e DE. O software utilizado foi o MiniTab®.

Tabela 22 - Condições experimentais estudadas, expressas em termos de variáveis codificadas.

Ensaio	Temperatura	Tempo	Solvente	Tipo de amostra	Relação de amostra em termos de matéria fresca <i>versus</i> solvente
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	-1	1	1	1

Tabela 23 - Condições experimentais estudadas, expressas em termos de variáveis não codificadas.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Solvente	Tipo de amostra	Relação de amostra em termos de matéria fresca <i>versus</i> solvente
1	30	10	Água	Seca	1:1
2	60	10	Água	Seca	1:4
3	30	60	Água	Seca	1:4
4	60	60	Água	Seca	1:1
5	30	10	Metanol	Seca	1:4
6	60	10	Metanol	Seca	1:1
7	30	60	Metanol	Seca	1:1
8	60	60	Metanol	Seca	1:4
9	30	10	Água	Fresca	1:4
10	60	10	Água	Fresca	1:1
11	30	60	Água	Fresca	1:1
12	60	60	Água	Fresca	1:4
13	30	10	Metanol	Fresca	1:1
14	60	10	Metanol	Fresca	1:4
15	30	60	Metanol	Fresca	1:4
16	60	10	Metanol	Fresca	1:1

As amostras desidratadas foram obtidas após secagem de alfaces frescas, em estufa com convecção forçada, a uma temperatura de 60°C, até se observar peso constante. Esta temperatura foi a escolhida por ter sido a utilizada nos ensaios de determinação dos factores de crescimento e da composição mineral.

De forma a avaliar a actividade antioxidante, foram preparados extractos de alface segundo a metodologia de Ballard *et al.*, (2009), com algumas modificações. Em pormenor, pesaram-se 25 gramas de amostra fresca ou 1 grama de amostra desidratada e adicionaram-se 25ml de solvente (água ou metanol) de forma a obter-se a proporção de 1:1, ou 6 gramas de amostra fresca ou 0,25 gramas de amostra desidratada e adicionaram-se 25ml de solvente (água ou metanol) de forma a obter-se a proporção de 1:4, respectivamente. De seguida, a extracção decorreu a 30 ou a 60°C num banho termostaticado, sob agitação, durante 10 ou 60 minutos, tal como indicado pelo desenho experimental (Tabelas 22 e 23). Após arrefecimento, as soluções de extracto foram filtradas para tubos de Falcon e congeladas a -18°C até análise. Todas as extracções foram realizadas em triplicado. A actividade antioxidante dos extractos foi avaliada pelo método da capacidade redutora total, descrito na Secção 3.1.4.1.

3.1.2 Segundo Estudo – Optimização das condições de extracção de compostos com actividade antioxidante de alface através da metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology*)

Neste segundo desenho experimental usou-se a metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology, RSM*) para determinar as condições óptimas a aplicar na extracção de compostos com actividade antioxidante a partir de alface. Os factores estudados foram o tipo de solvente, a sua percentagem, a temperatura e o tempo de extracção. As variáveis de resposta avaliadas foram a capacidade redutora total e o efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH.

A *RSM* é uma metodologia útil para avaliar os efeitos de múltiplos factores e as suas interacções sobre uma ou mais variáveis de resposta. A *RSM* pode ser usada para determinar a combinação dos níveis de factores que origina a resposta óptima. A forma mais popular de *RSM* é o *Central Composite Design* e tem sido utilizado em inúmeros trabalhos de optimização de condições de extracção de inúmeros compostos (Ballard *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010).

3.1.2.1 Material utilizado

A alface utilizada neste estudo foi novamente uma variedade comercial de folha lisa, adquirida numa superfície comercial. Tendo em conta os resultados do estudo anterior, optou-se por secar a alface a 60°C numa estufa com ventilação forçada. As extracções foram realizadas com metanol e acetona a 30, 60 e 90% (v/v) e água ultra-pura. Adicionaram-se 25 ml de solvente a 1 g de amostra seca de alface, e colocou-se num banho termostatizado a 30, 45 e 60°C durante 10, 35 e 60 minutos. Após arrefecimento, os extractos foram filtrados e posteriormente guardados a -18°C. Nesses extractos determinou-se a Capacidade Redutora Total (Secção 3.1.4.1) o Efeito Bloqueador do Radical livre DPPH (3.1.4.2).

3.1.2.2 Desenho Experimental e Análise Estatística

Para avaliar de que forma a actividade antioxidante de alface era afectada pelo uso de diferentes solventes (metanol, acetona e água) a várias concentrações e pelo uso de diferentes temperaturas e tempos, aplicou-se um desenho factorial 3^3 para o caso do

metanol e acetona, e de 3² para a água. Os dados experimentais foram analisados pelo método da superfície de resposta (*Response Surface Methodology* ou *RSM*), através do software Minitab®.

A relação existente entre as variáveis dependentes (capacidade redutora total e efeito bloqueador do radical livre DPPH) e as variáveis operacionais foi estabelecida pelo modelo seguinte, que inclui os termos lineares, quadráticos e de interação:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

, onde Y é a resposta prevista; β_0 é uma constante; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático; β_{ij} é o coeficiente da interação das variáveis i e j . X_i e X_j são variáveis independentes.

As variáveis independentes sobre as quais o presente estudo incidiu, encontram-se descritas na Tabela 24. As variáveis standardizadas (codificadas) apresentaram os valores -1,0,1, estando a correspondência entre as variáveis codificadas e as não codificadas também indicada na Tabela 24.

Tabela 24 – Valores codificados e sua correspondência com os valores reais dos parâmetros avaliados na RSM.

Valor codificado	Concentração de solvente (% v/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Metanol e Acetona			
-1	30	30	10
0	60	45	35
1	90	60	60
Água			
-1	--	30	10
0	--	45	35
1	--	60	60

As Tabelas 25 e 26 apresentam as experiências realizadas em termos das condições aplicadas, expressas na forma de variáveis codificadas e não codificadas.

Tabela 25 – Desenho Experimental da *RSM* para a alface extraída com metanol e acetona em termos de valores codificados e não codificados.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Não Codificadas		
	Concentração de solvente (% <i>, v/v</i>) (<i>X</i> ₁)	Temperatura (°C) (<i>X</i> ₂)	Tempo (min) (<i>X</i> ₃)	Concentração de solvente (% <i>, v/v</i>)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	0	0	0	60	45	35
2	-1	1	-1	30	60	10
3	1	-1	-1	90	30	10
4	-1	-1	-1	30	30	10
5	0	0	0	60	45	35
6	0	0	-1	60	45	10
7	1	1	1	90	60	60
8	1	-1	1	90	30	60
9	-1	0	0	30	45	35
10	-1	-1	1	30	30	60
11	0	-1	0	60	30	35
12	0	0	1	60	45	60
13	0	1	0	60	60	35
14	0	0	0	60	45	35
15	0	0	0	60	45	35
16	1	1	-1	90	60	10
17	1	0	0	90	45	35
18	-1	1	1	30	60	60
19	0	0	0	60	45	35
20	0	0	0	60	45	35

Tabela 26 - Desenho Experimental da *RSM* para a alface extraída com água em termos de valores codificados e não codificados.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Não Codificadas	
	Temperatura (°C) (X_1)	Tempo (min) (X_2)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	0	0	45	35
2	-1	1	30	60
3	1	-1	60	10
4	-1	-1	30	10
5	0	0	45	35
6	0	0	45	35
7	1	0	60	35
8	-1	0	30	35
9	0	-1	45	10
10	1	1	60	60
11	0	1	45	60
12	0	0	45	35
13	0	0	45	35

Estes ensaios permitiram o desenvolvimento de modelos empíricos que descrevem a relação existente entre as variáveis operacionais e experimentais através de equações que incluem termos lineares, de interação e quadráticos. A sequência das experiências foi estabelecida de modo aleatório para limitar a influência de erros sistemáticos na interpretação dos resultados.

Nos ensaios que envolveram metanol e acetona, realizaram-se 20 experiências, em que 6 corresponderam a réplicas no ponto central. No caso da água, como só estavam a ser testados dois factores – temperatura e tempo – só se realizaram 13 experiências, com 5 no ponto central. Estas experiências realizadas no ponto central permitem estimar a influência do erro experimental, enquanto as restantes permitem o cálculo dos coeficientes da regressão.

Tal como anteriormente referido, as variáveis dependentes estudadas foram a capacidade redutora total e o efeito bloqueador do radical livre DPPH, parâmetros relacionados com a actividade antioxidante.

3.1.3 Terceiro Estudo – Determinação da actividade antioxidante de alfaces cultivadas com adição de borra de café fresca e compostada

A alface utilizada no presente estudo foi a variedade comercial Quatro Estações, cultivada no complexo de estufas da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, no âmbito do trabalho já descrito na Secção 2.2.2. Sucintamente, foram usados dois substratos para o cultivo das plantas: um composto por terra vegetal e borra de café fresca e outro substrato composto por terra vegetal e borra de café compostada. Para cada um dos substratos foram estudadas diferentes concentrações em borra de café, tanto em fresco como compostada (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20%).

Após 39 dias de desenvolvimento das plantas, as mesmas foram colhidas. À semelhança dos estudos anteriores, o material fresco (parte aérea da planta) foi posto a secar em placas de Petri de vidro em estufa ventilada (Memmert) a 60°C, até peso constante. Após 3 dias de secagem, as plantas foram trituradas (*Moulinex*, Modelo *Depose, Type D56*), tendo sido armazenadas em Tubos Falcon de 50 mL até à análise da actividade antioxidante, devidamente identificadas e protegidas da luz.

As condições de extracção utilizadas para se obterem os extractos de alface foram as seguintes: o solvente usado foi o metanol a 30% (v/v) na proporção de 1/25 (g/mL). A temperatura de extracção foi de 60°C durante 60 minutos. De seguida, filtraram-se os extractos através de papel de filtro Whatman nº42. Todas as experiências efectuadas foram realizadas em triplicado.

Nos extractos obtidos determinou-se a Capacidade Redutora Total, o Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH e o Poder Redutor, descritos na secção seguinte.

3.1.4 Avaliação da Capacidade Redutora Total e da Actividade Antioxidante

3.1.4.1 Capacidade Redutora Total

A Capacidade Redutora Total (CRT) dos extractos de alface foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton and Rossi (1965). Em mais pormenor, a um 1 mL de solução de extracto foi adicionado 1 mL de reagente de Folin Ciocalteu. Após três minutos, foi adicionado 1 mL de solução saturada de Na₂CO₃ e 7 mL de água destilada. A reacção foi mantida no escuro por 90 minutos, sendo depois a absorvância lida a 725 nm (UV-Vis espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Genesys 10). Simultaneamente, foram preparadas várias soluções padrão

de ácido gálico (0,01 a 0,4 mmol/dm³) de forma a obter a curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico / g alface fresca.

3.1.4.2 Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH

A capacidade sequestradora do radical livre DPPH (%DPPH) foi determinada segundo o método de Hatano *et al.* (1988), citado por Sousa (2008). A 0,3 mL de extracto adicionaram-se 2,7 mL de uma solução contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). Após agitação, a mistura foi colocada no escuro durante uma hora. Após esse período, determinaram-se as absorvâncias a 517nm (Espectrofotómetro UV-Vis da Thermo Electron Corporation Genesys 10).

O efeito bloqueador do radical DPPH foi avaliado através da seguinte expressão (Equação 1):

$$\text{Efeito Bloqueador do Radical DPPH (\%)} = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

(Equação 1)

, onde A_S é a absorvância da solução quando um volume de extracto de alface foi adicionado, e A_{DPPH} a absorvância da solução de DPPH (controlo).

No ensaio da alface à qual se adicionou borra fresca ou compostada, diferentes concentrações de extracto de alface foram utilizadas, o que permitiu determinar o EC₅₀, que corresponde à concentração que origina um efeito bloqueador do radical DPPH igual a 50%.

3.1.4.3 Poder Redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método de Oyaizu (1986). À solução de extracto, 1mL, adicionou-se 2,5mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2,5mL de ferricianeto de potássio a 1% (m/v). Após agitação, a mistura foi colocada num banho termostaticado a 50°C durante 20 minutos. De seguida, adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) e agitou-se. Transferiu-se 2,5mL da solução para um tubo de ensaio e adicionaram-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl₃ a 0,1% (m/v). Leu-se a absorvância a 700 nm (Sousa, 2007).

No ensaio da alface à qual se adicionou borra fresca ou compostada, diferentes concentrações das soluções de extracção foram preparadas de forma a calcular-se o EC_{50} , o qual é igual ao valor da concentração que origina uma absorvância de 0,5.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Primeiro Estudo – Utilização de um desenho factorial para avaliar o efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extractos de alface

Tendo em conta os gráficos de *Pareto* e da Probabilidade Normal dos Efeitos *Standardizados* obtidos (Figura 25) para a capacidade redutora total, verificou-se que de entre os factores - A, B, C, D e E - e as interacções - AB, AC, BC, BE, CE e DE - estudados, o único significativo ($p < 0,05$) foi o tipo de amostra (D).

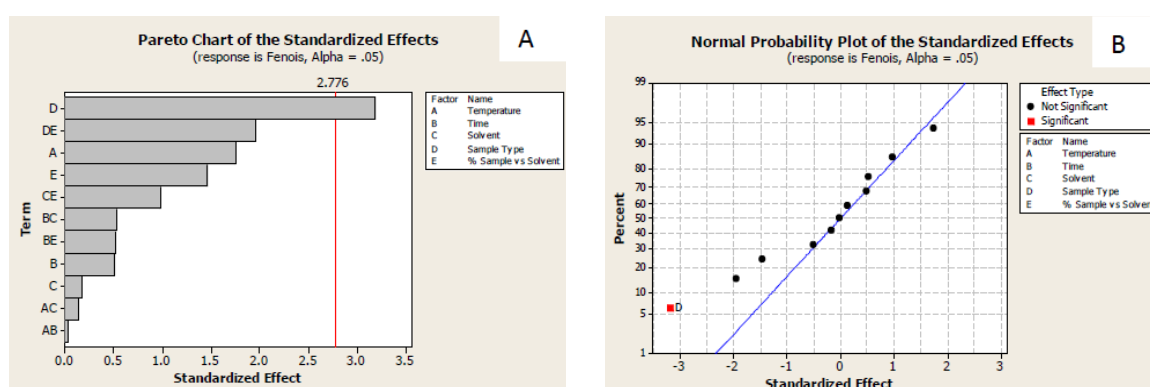


Figura 25- Gráficos de *Pareto* (A) e da Probabilidade Normal dos Efeitos *Standardizados* (B) para o efeito da capacidade redutora total.

Observando a Figura 25, verificou-se que os restantes factores se situaram sobre a linha traçada e grande parte deles se centrou em torno do valor zero, tal como seria esperado para efeitos não importantes. Refira-se que não foi observada qualquer interacção significativa, indicando que as diferenças nos factores não dependem do nível dos restantes.

O modelo desenvolvido para a capacidade redutora total (CRT) apresentou a seguinte equação:

$$CTR = 0,28062 + 0,04536 \times A + 0,01299 \times B - 0,00418 \times C - 0,08278 \times D - 0,03782 \times E - 0,00041 \times A \times B + 0,00338 \times A \times C + 0,01374 \times B \times C - 0,01326 \times B \times E + 0,02526 \times C \times E - 0,05063 \times D \times E \quad (\text{Equação 2})$$

, a qual foi utilizada para determinar os valores previstos. Observou-se existir uma relação linear entre os valores previstos e os experimentais (Figura 26), obtendo-se um coeficiente de correlação (r) igual a 0,916. Os intervalos de confiança ($P=95\%$) do declive (0,839) e da ordenada na origem (0,0452) variaram entre 0,628 a 1,05 e -0,0199

a 0,110, respectivamente, os quais incluíram os valores um e zero, tal como desejado. Dessa forma os resultados indicam que o modelo desenvolvido prevê de forma adequada os resultados experimentais.

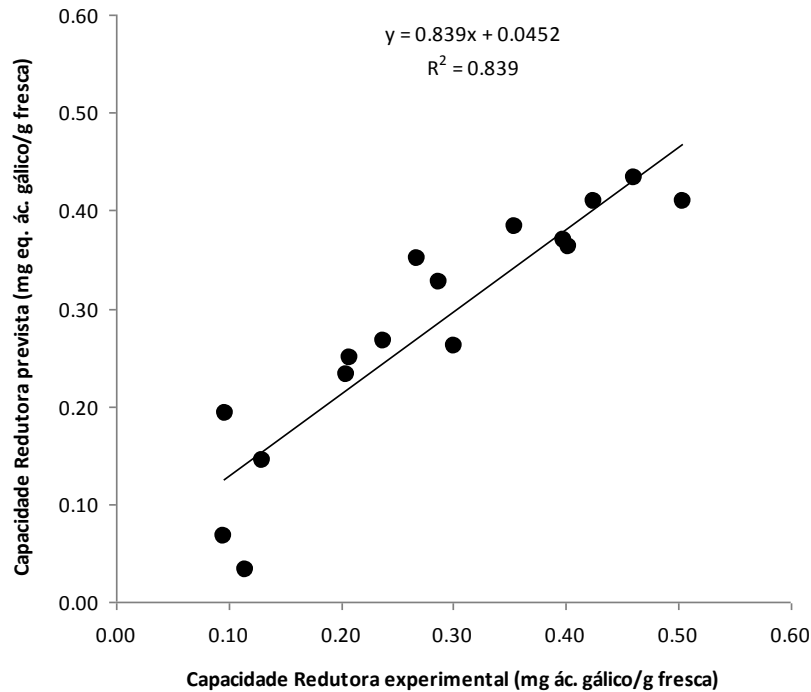


Figura 26 - Relação linear encontrada entre a Capacidade Redutora Total prevista pelo modelo desenvolvido e os valores obtidos experimentalmente.

Para melhor avaliar o efeito do tipo de amostra sobre a capacidade redutora total, analisou-se o gráfico dos efeitos principais (Figura 27), o qual permitiu verificar que as amostras desidratadas apresentaram uma capacidade redutora total superior à das amostras frescas.

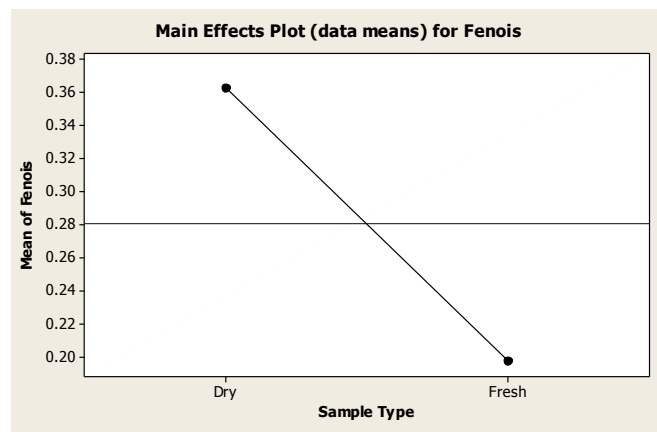


Figura 27 - Efeito do tipo de amostra sobre a capacidade redutora total.

Ao juntar os dados obtidos nas várias experiências realizadas por parâmetro, designadamente, temperatura, tempo, solvente, tipo de amostra e relação de amostra *versus* solvente, obtiveram-se resultados semelhantes aos referidos anteriormente, tal como mostrado na Tabela 27. De facto, só se observaram diferenças significativas nos ensaios em que se utilizaram amostras secas e frescas.

Tabela 27 – Avaliação da capacidade redutora total de extractos de alface em função da temperatura, tempo, solvente, tipo de amostra e relação de amostra *versus* solvente.

Parâmetro		Capacidade Redutora Total (mg eq. de ácido gálico/ g amostra fresca)
Temperatura (°C)	30	0,24±0,10 ^a
	60	0,33±0,15 ^a
Tempo (min)	10	0,27±0,13 ^a
	60	0,29±0,15 ^a
Solvente	Água	0,28±0,11 ^a
	Metanol	0,28±0,16 ^a
Tipo de Amostra	Seca	0,36±0,10 ^a
	Fresca	0,20±0,11 ^b
Relação de Amostra <i>vs</i> solvente	1:4	0,32±0,11 ^a
	1:1	0,24±0,15 ^a

Os valores são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de significância de 0,05.

Estes resultados são semelhantes aos referidos por Capecka *et al.*, (2005) para orégãos e hortelã-pimenta, os quais observaram um aumento significativo do teor de fenóis totais em amostras secas em relação às frescas. Adicionalmente, estes autores verificaram que o efeito bloqueador do radical livre DPPH foi elevado (> 84%) tanto para amostras secas como frescas. Hossain *et al.*, (2010) também referem que ao analisar alecrim, manjerona e manjeriço, o teor de fenóis totais e a actividade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP (poder antioxidante redutor do ião férrico) aumentava quando as amostras frescas eram secas por liofilização, secagem sob vácuo ou ao ar. Estes mesmos autores indicam que a secagem pode tornar os tecidos vegetais mais quebradiços, o que faz com que haja uma rápida ruptura das paredes celulares durante as etapas de trituração e homogeneização do procedimento de extracção. A ruptura destas células pode causar a libertação de mais compostos fenólicos para a

solução de extracção. Por outro lado, as amostras frescas podem perder compostos antioxidantes devido à degradação enzimática, uma vez que as enzimas ainda se encontram activas nas amostras frescas, causando uma diminuição da actividade antioxidante nestas amostras. Aguilera *et al.*, (2010) também referem resultados semelhantes com lentilhas, tendo observado um aumento do teor em ácido dihidroxibenzóico (principal composto fenólico) de 3.68 µg/g para 31.69 µg/g após a lentilha ter sido demolhada, cozida em água a ferver durante 30 minutos e seca num túnel de ar forçado a $75\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas, sugerindo, também, que esse aumento pode ter resultado da ruptura das paredes celulares durante o processamento ou à alteração de compostos fenólicos insolúveis.

Uma vez que não se observou um decréscimo da capacidade redutora total de extractos preparados a partir de amostras secas de alface, os resultados do presente estudo fornecem um dado importante a ter em conta em trabalhos futuros, indicando que nas determinações da actividade antioxidante poder-se-á utilizar amostras secas. O uso deste tipo de amostras permite o seu armazenamento durante períodos mais longos e de forma mais cómoda em relação ao uso de amostras frescas, devido a ocuparem um menor espaço e de não haver necessidade de se recorrer à refrigeração para sua conservação. Deste modo, sugere-se que em trabalhos posteriores onde se pretenda determinar a actividade antioxidante em alface, se utilizem amostras desidratadas. Além disso, o método de secagem utilizado também pode ter um papel importante. Hossain *et al.*, (2010) observaram que a secagem ao ar foi o método de desidratação que originou o maior teor de fenóis totais e a maior actividade antioxidante quando comparada com a liofilização ou a secagem sob vácuo. Este facto pode ser devido a num processo de secagem lento as plantas que ainda apresentam actividade metabólica vão perdendo a água lentamente, o que pode funcionar como um stress para a planta. As plantas, em geral, produzem compostos fenólicos como resposta a stresses (mecanismo de defesa) (Hossain *et al.*, 2010), compostos estes que podem ter actividade antioxidante. A síntese de vários compostos fenilpropanóides (por exemplo, flavonóides, isoflavonóides, cumarinas, ácidos fenólicos) é induzida em plantas por stresses bióticos e abióticos (Dixon and Paiva, 1995). Por outro lado, Yousif *et al.*, (1999) referiram que a liofilização demonstrou causar menos danos na estrutura dos tecidos do que outros métodos de secagem, quando estudaram o manjericão. Contudo, em plantas lenhosas, tais como o alecrim e o tomilho, esses danos são pequenos. Tecidos intactos podem ser desejáveis para uma boa aparência mas, em relação à capacidade antioxidante, esses

tecidos funcionam como uma barreira, impedindo a libertação de compostos fenólicos e resultando numa menor actividade antioxidante.

Outro ponto importante do presente trabalho é o facto de se ter verificado que a forma em que a amostra se encontra pode alterar os resultados obtidos em termos de actividade antioxidante. Este ponto deve ser tido em conta na comparação futura de resultados, pois consoante o estado em que a amostra é utilizada, os resultados poderão ser distintos. De referir que em alguns trabalhos realizados na avaliação da actividade antioxidante em alfaces, têm sido utilizadas amostras frescas (Capecka (2005); Ríos, *et al.*, (2008); Altunkaya and Gökmen (2008); Altunkaya *et al.*, (2009), Ordidge (2010)), liofilizadas (Llorach (2008), Nicolle, *et al.*, (2004), Liu, *et al.*, (2007)) ou secas (Capecka (2005)), o que demonstra a variabilidade existente nos métodos de preservação da amostra, o que se traduzirá numa maior dificuldade de comparação de resultados.

3.2.2 Segundo Estudo – Optimização das condições de extracção de compostos com actividade antioxidante de alface através da metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology*)

3.2.2.1 Avaliação da actividade antioxidante nos ensaios realizados

Os valores da Capacidade Redutora Total e o Efeito Bloqueador do DPPH determinados nos ensaios realizados com metanol, acetona e água encontram-se descritos nas Tabelas 28 e 29.

Observou-se que a Capacidade Redutora Total variou entre 0,269 e 0,566 mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco para o metanol, 0,246 e 0,669 mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco para a acetona e 0,377 e 0,741 mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco para a água. Em relação ao efeito bloqueador do radical DPPH, observou-se uma maior variação entre solventes, tendo este parâmetro variado entre os 51,4 e 90,8% para o metanol, 10,4 e 89,8% para a acetona e 63,2 e 89,4% para a água.

Em relação às condições testadas, os maiores valores de Capacidade Redutora Total foram obtidos quando se utilizou 30% (v/v) de metanol ou de acetona a 60°C durante 10 minutos, ou quando se usou água a 45°C durante 35 minutos. Em termos do Efeito Bloqueador do DPPH, as maiores percentagens foram obtidas com 30% (v/v) de metanol a 60°C durante 60 minutos, 60% (v/v) de acetona a 45°C durante 35 minutos, e água a 45°C durante 35 minutos.

Tabela 28 – *Central Composite Design* com os valores experimentais e previstos para a Capacidade Redutora Total (CRT) (mg equivalentes de ácido gálico /g de peso fresco) e Efeito Bloqueador do DPPH (%) para os ensaios que envolveram metanol e acetona.

Experiência	Níveis das variáveis codificadas ^b			Valores experimentais (Y_I) ^a				Valores previstos (Y_0)			
				Metanol		Acetona		Metanol		Acetona	
	X_1	X_2	X_3	CRT ^c	% DPPH	CRT ^c	% DPPH	CRT ^c	% DPPH	CRT ^c	% DPPH
1	0	0	0	0,483	82,3	0,616	89,5	0,320	87,3	0,349	88,8
2	-1	1	-1	0,566	81,4	0,669	77,8	0,509	81,2	0,567	77,0
3	1	-1	-1	0,439	57,3	0,545	27,6	0,381	61,8	0,432	31,8
4	-1	-1	-1	0,298	87,8	0,287	85,8	0,335	85,0	0,391	80,8
5	0	0	0	0,322	90,0	0,353	89,8	0,320	87,3	0,349	88,8
6	0	0	-1	0,330	90,5	0,385	88,5	0,372	90,8	0,411	91,0
7	1	1	1	0,313	86,7	0,450	49,6	0,263	89,8	0,324	55,0
8	1	-1	1	0,344	51,4	0,264	10,4	0,389	51,9	0,344	11,6
9	-1	0	0	0,349	77,6	0,401	81,0	0,362	83,3	0,415	89,6
10	-1	-1	1	0,336	72,4	0,404	69,4	0,291	74,2	0,297	70,5
11	0	-1	0	0,287	78,7	0,271	69,7	0,303	75,0	0,309	68,4
12	0	0	1	0,332	89,4	0,298	88,5	0,332	88,5	0,360	84,7
13	0	1	0	0,300	88,9	0,337	88,3	0,327	92,0	0,388	88,3
14	0	0	0	0,290	82,6	0,311	87,1	0,320	87,3	0,349	88,8
15	0	0	0	0,298	88,8	0,315	87,4	0,320	87,3	0,349	88,8
16	1	1	-1	0,269	85,0	0,246	58,0	0,299	83,5	0,332	57,2
17	1	0	0	0,277	79,5	0,247	60,2	0,306	73,3	0,321	50,3
18	-1	1	1	0,375	90,8	0,462	88,5	0,421	86,6	0,554	84,6
19	0	0	0	0,315	89,5	0,331	88,5	0,320	87,3	0,349	88,8
20	0	0	0	0,302	89,4	0,342	87,8	0,320	87,3	0,349	88,8

^aMédia de seis valores, resultado de três extracções avaliadas em duplicado.

^b X_1 – Concentração de solvente (% , v/v); X_2 – Temperatura (°C); X_3 – Tempo (minutos).

^cCRT – Capacidade Redutora Total, expressa em mg GAE/g peso fresco.

Tabela 29 - *Central Composite Design* com os valores experimentais e previstos para a Capacidade Redutora Total (mg equivalentes de ácido gálico /g de amostra fresca) e Efeito Bloqueador do DPPH (%) para os ensaios realizados com água.

Experiência	Níveis das variáveis codificadas ^a		Valores experimentais (Y_I) ^b		Valores previstos (Y_0)	
	X_1	X_2	CRT ^c	% DPPH	CRT ^c	% DPPH
1	0	0	0,586	71,7	0,540	75,7
2	-1	1	0,356	81,9	0,316	81,3
3	1	-1	0,365	81,1	0,354	83,0
4	-1	-1	0,337	67,0	0,316	70,7
5	0	0	0,727	64,0	0,540	75,7
6	0	0	0,741	63,2	0,540	75,7
7	1	0	0,420	79,0	0,463	79,5
8	-1	0	0,345	79,5	0,407	76,4
9	0	-1	0,405	80,2	0,440	74,6
10	1	1	0,420	77,8	0,390	75,4
11	0	1	0,387	73,2	0,458	76,2
12	0	0	0,382	89,4	0,540	75,7
13	0	0	0,366	87,8	0,540	75,7

^a X_1 – Temperatura (°C); X_2 - Tempo (min).

^bMédia de seis valores, resultado de três extracções avaliadas em duplicado.

^cCRT – Capacidade Redutora Total, expressa em mg GAE/g peso fresco.

3.2.2.2 Qualidade dos ajustes dos modelos obtidos

Os valores previstos pelos modelos obtidos para o metanol, acetona e água encontram-se descritos nas Tabelas 28 e 29, onde se pode verificar que, salvo raras excepções, os resultados previstos foram bastante próximos dos experimentais. Os modelos quadráticos ajustados, expressos nas variáveis codificadas, e obtidos para a Capacidade Redutora Total (CRT) e Efeito Bloqueador do DPPH, encontram-se descritos nas Equações (3) – (8) para o metanol (Met), acetona (Ace) e água (Ág).

$$CRT_{Met} = 0,320 - 0,028x_1 + 0,012x_2 - 0,020x_3 + 0,014x_1^2 - 0,005x_2^2 + 0,032x_3^2 - 0,064x_1x_2 + 0,013x_1x_3 - 0,011x_2x_3 \quad (3)$$

$$CRT_{Ace} = 0,3486 - 0,0471x_1 + 0,0393x_2 - 0,0254x_3 + 0,0196x_1^2 - 0,0004x_2^2 + 0,0371x_3^2 - 0,0691x_1x_2 + 0,0016x_1x_3 + 0,0201x_2x_3 \quad (4)$$

$$CRT_{Ág} = 0,540 + 0,028x_1 + 0,009x_2 - 0,105x_1^2 - 0,091x_2^2 + 0,009x_1x_2 \quad (5)$$

$$DPPH_{Met} = 87,32 - 5,01x_1 + 8,52x_2 - 1,13x_3 - 9,10x_1^2 - 3,84x_2^2 + 2,30x_3^2 + 6,38x_1x_2 + 0,22x_1x_3 + 4,05x_2x_3 \quad (6)$$

$$DPPH_{Ace} = 88,78 - 19,66x_1 + 9,91x_2 - 3,13x_3 - 18,84x_1^2 - 10,43x_2^2 - 0,96x_3^2 + 7,32x_1x_2 - 2,47x_1x_3 + 4,49x_2x_3 \quad (7)$$

$$DPPH_{Ág} = 75,74 + 1,58x_1 + 0,77x_2 + 2,20x_1^2 - 0,34x_2^2 - 4,55x_1x_2 \quad (8)$$

O nível de significância de cada coeficiente foi determinado pelo *p-value*, indicado na Tabela 30, sendo as variáveis mais significativas aquelas que apresentam menores valores para esse parâmetro estatístico ($p < 0,05$). Para avaliar a qualidade dos modelos desenvolvidos, também foram determinados os coeficientes de determinação (R^2) e os “*lack of fit*”, parâmetro que avalia a falta de ajuste dos modelos obtidos, estando estes parâmetros indicados na Tabela 30. Um bom ajuste é obtido quando se tem um R^2 elevado e um *p-value* do “*lack of fit*” superior a 0,05.

Tabela 30 – *p-values* e R^2 calculados para os modelos desenvolvidos para a Capacidade Redutora Total (CRT) e Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH para o metanol, acetona e água.

T	Metanol		Acetona	
	CRT	%DPPH	CRT	DPPH
Termo	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Constante	0,000	0,000	0,000	0,000
x_1	0,234	0,007	0,283	0,000
x_2	0,605	0,000	0,366	0,000
x_3	0,386	0,466	0,554	0,097
x_1^2	0,742	0,010	0,809	0,000
x_2^2	0,906	0,206	0,996	0,010
x_3^2	0,464	0,437	0,649	0,774
$x_1 x_2$	0,029	0,003	0,167	0,003
$x_1 x_3$	0,620	0,895	0,973	0,225
$x_2 x_3$	0,661	0,036	0,674	0,041
Lack of fit	0,574	0,181	0,337	0,000
$R^2 =$	0,529	0,900	0,364	0,969

Água		
Termo	CRT	%DPPH
	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Constante	0,000	0,000
x_1	0,653	0,713
x_2	0,879	0,858
x_1^2	0,270	0,728
x_2^2	0,331	0,956
$x_1 x_2$	0,905	0,398
Lack of fit	0,908	0,921
R^2	0,382	0,139

Os R^2 dos modelos desenvolvidos para a Capacidade Redutora Total foram iguais a 0,529, 0,364 e 0,382 para o metanol, acetona e água. Melhores coeficientes de determinação foram obtidos para o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH, quando se utilizou metanol e acetona (0,900 e 0,969, respectivamente). Pelo contrário, com a água obteve-se um R^2 mais baixo e igual a 0,139, indicando que o modelo desenvolvido pode não prever como desejado os valores experimentais.

Em relação aos *lack of fit*, e tal como desejado, verificou-se que em todos os modelos, este parâmetro não foi significativo ($p > 0,05$), com exceção da acetona para o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH. Esta situação poderia sugerir um pior ajuste ao modelo matemático. Contudo, o R^2 determinado foi elevado (0,969), indicando que o modelo desenvolvido pode razoavelmente representar os valores observados.

Em termos gerais, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a maioria dos modelos desenvolvidos pode ser usada para prever as respostas.

3.2.2.2.1 Capacidade Redutora Total

Em relação à capacidade redutora total, verificou-se que para o caso do metanol, só o termo da interacção da concentração de solvente (X_1) com a temperatura (X_2) foi significativo (p -value $< 0,05$) (Tabela 29). Na Figura 28A estão representados os gráficos de contorno e de superfície de resposta do efeito da concentração de solvente e da temperatura sobre a capacidade redutora total para o metanol. Uma vez que o tempo mostrou não ter um efeito significativo na capacidade redutora total dos extractos, optou-se por mostrar os gráficos do tempo do nível zero, correspondente aos 35 minutos.

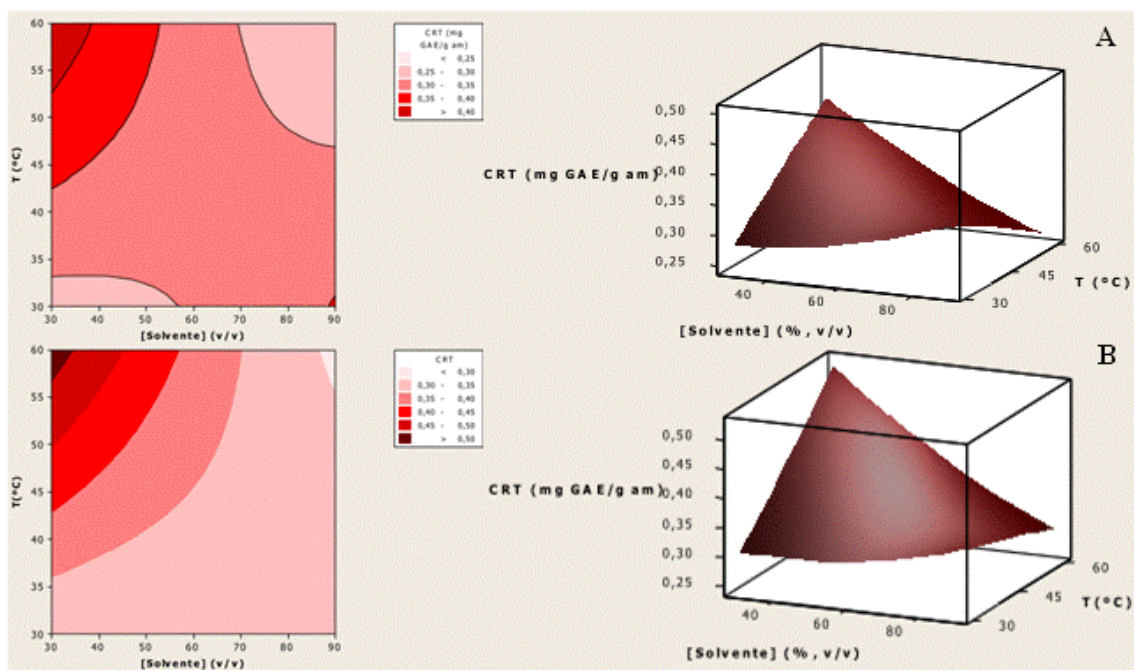


Figura 28 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta da Capacidade Redutora Total em função da temperatura e da concentração de solvente, para o metanol (A) e acetona (B).

Verificou-se que a maior capacidade redutora total foi obtida para baixas concentrações de metanol (30%) e temperaturas elevadas em torno dos 60°C. Em relação à acetona, a concentração de solvente, a temperatura e o tempo, mostraram não ter uma contribuição significativa para esta propriedade (Tabela 30). Contudo, ao observar-se a Figura 28B, constatou-se um resultado semelhante ao obtido com o metanol, sendo os maiores valores de capacidade redutora total observados na zona das temperaturas mais altas e menores concentrações de solvente. Além disso, os valores da capacidade redutora total obtidos com os dois solventes foram bastante semelhantes.

Em relação ao tempo, verificou-se que para os três solventes estudados, este parâmetro não apresentou ter uma contribuição significativa sobre a capacidade redutora total (Tabela 30). Este facto foi também corroborado pelos gráficos de contorno e de superfície de resposta obtidos (Figura 29), uma vez que a capacidade redutora total pouco variou com o tempo.

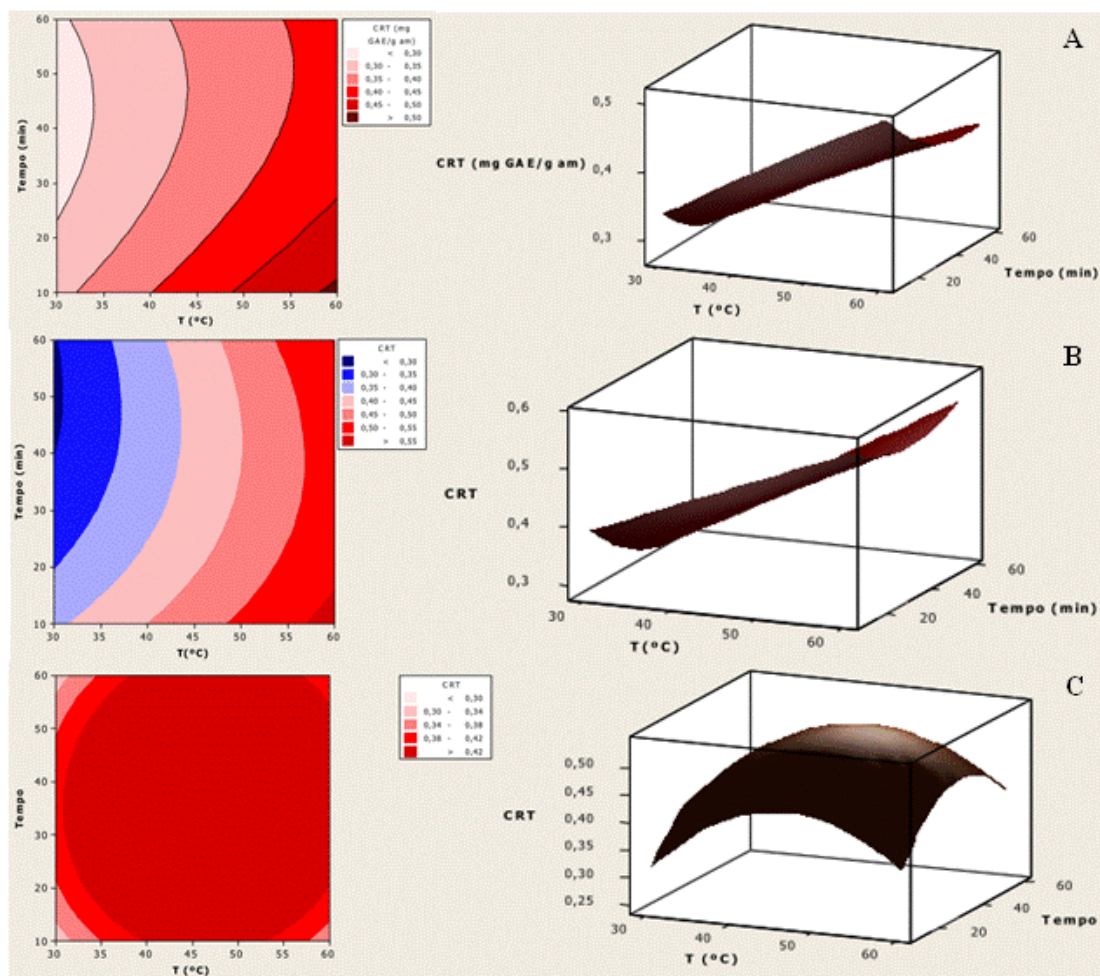


Figura 29 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta da Capacidade Redutora Total de extractos de alface em função da temperatura e do tempo, para o metanol (A), acetona (B) e água (C) (Concentração de metanol ou de acetona = 30% (v/v)).

Maiores tempos de extracção deveriam favorecer a extracção de compostos polifenólicos, uma vez que é necessário tempo para que haja exposição do soluto ao meio. O líquido deve penetrar no produto seco, dissolver o soluto e subsequentemente difundir-se para o meio de extracção (Gan and Latiff, 2011). No entanto, no presente trabalho esta variável não teve um efeito significativo.

Em termos gerais, ao comparar os três solventes entre si, não se detectaram grandes diferenças na capacidade redutora total determinada. Estes resultados vêm, em parte, confirmar os obtidos no 1º Estudo, onde também não se tinha observado um efeito significativo para o tipo de solvente sobre a capacidade redutora total.

3.2.2.2.2 Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH

Em relação ao efeito bloqueador do radical livre de DPPH, a concentração de solvente (X_1), a temperatura (X_2), o termo quadrático relativo à concentração (X_1^2) e as

interacções concentração de solvente \times temperatura (X_1X_2) e temperatura \times tempo (X_2X_3) (Tabela 30), mostraram ser significativos. Na Figura 30A encontram-se representados os gráficos de contorno e de superfície de resposta do efeito bloqueador do radical livre de DPPH obtidos para o metanol.

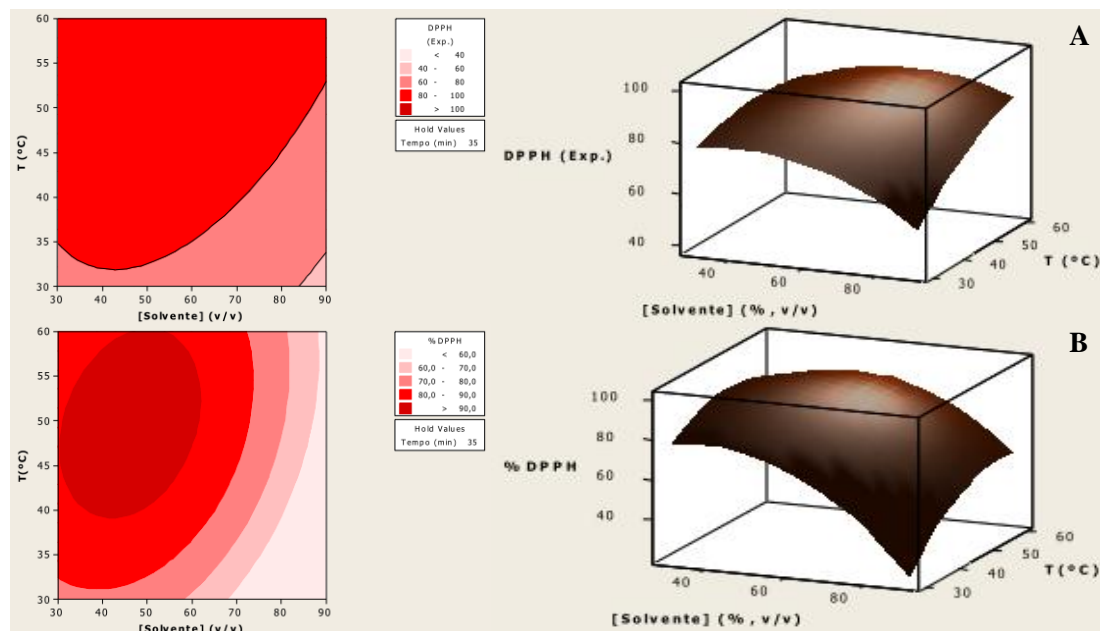


Figura 30 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta do Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH em função da temperatura e da concentração de solvente, para o metanol (A) e acetona (B) (Tempo = 35 minutos).

As maiores percentagens de inibição (>80%) foram obtidas para baixas concentrações de metanol e temperaturas ligeiramente acima dos 30°C. Contudo, esta percentagem de inibição baixa para valores em torno dos 50% quando a percentagem de solvente aumenta para 90%.

Em relação à acetona, a concentração (X_1), a temperatura (X_2), os termos quadráticos X_1^2 e X_2^2 , e as interacções concentração de solvente \times temperatura (X_1X_2) e temperatura \times tempo (X_2X_3) (Tabela 29), mostraram ser significativos. Na Figura 30B, encontram-se representados os gráficos de contorno e de superfície de resposta do efeito bloqueador do radical livre de DPPH obtidos para a acetona, onde se verifica que a diminuição do efeito bloqueador do radical livre de DPPH é ainda mais acentuada para maiores percentagens de solvente do que no caso do metanol. Contudo, os resultados são bastante semelhantes para os dois solventes.

Em relação ao tempo, este factor mostrou ser significativo só para o caso do metanol e da acetona (em ambos os casos, através da interacção temperatura \times tempo).

Na Figura 31 encontram-se representados os gráficos de contorno e de superfície de resposta obtidos para os três solventes. Para o caso do metanol e da acetona, fixou-se a concentração de 30% (v/v) porque foi para esta que se tinham obtido os maiores valores para a capacidade redutora total e efeito bloqueador do radical livre de DPPH. Verificou-se que o factor tempo afectou numa maior extensão o efeito bloqueador do radical livre DPPH quando as extracções foram realizadas com metanol em vez de acetona ou água. Em relação à água, os valores obtidos apresentaram uma menor variação (72 a 80% na maioria das situações) face aos outros dois solventes, não se tendo detectado diferenças significativas com a temperatura e/ou o tempo.

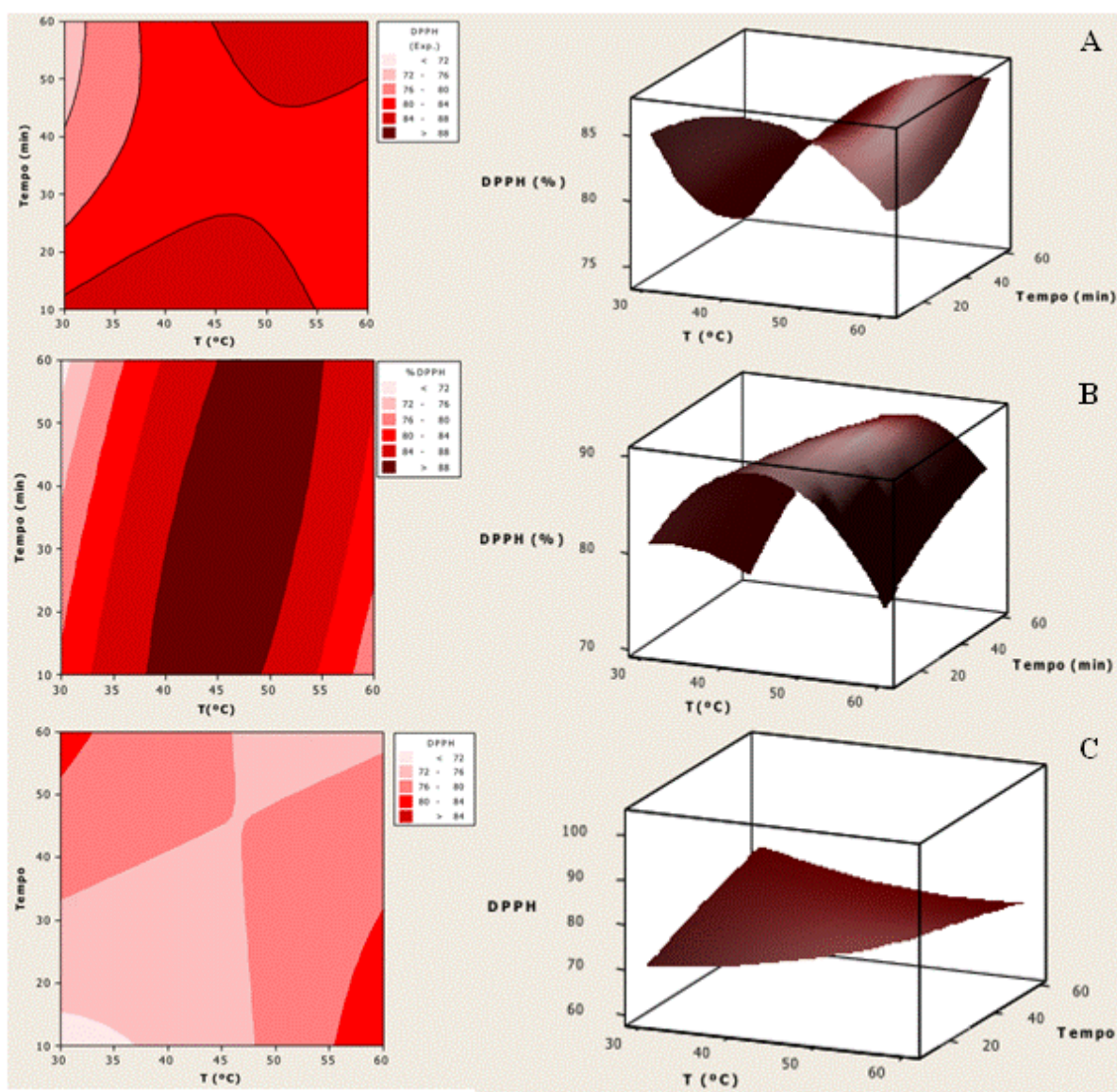


Figura 31 – Gráficos de contorno e de superfície de resposta do Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH em função da temperatura e do tempo, para o metanol (A), acetona (B) e água (C) (Concentração de metanol e acetona = 30% (v/v)).

3.2.2.3 Condições ótimas

Para se avaliar as condições de extracção que optimizavam as respostas da Capacidade Redutora Total e do Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH, utilizou-se a opção do programa MINITAB® intitulada de *Response Optimizer*. Esta opção ajuda a identificar a combinação de variáveis de entrada que permitem optimizar uma só resposta ou um conjunto de respostas. A optimização conjunta deve satisfazer todas as respostas incluídas, sendo avaliada pelo “*composite desirability*”. Este parâmetro é uma medida da forma como a solução obtida satisfaz os objectivos combinados para todas as respostas. O valor 1 corresponde ao caso ideal, enquanto 0 indica que uma ou mais respostas estão fora dos limites aceitáveis.

Como para o metanol, a concentração e temperatura foram os factores que mais influenciaram a Capacidade Redutora Total e o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH, pretendeu-se determinar quais eram as condições experimentais que optimizavam em simultâneo ambas as respostas. Para tal estabeleceu-se como objectivo (*target*) os valores máximos determinados para ambas as propriedades. Na Figura 32 encontra-se representado o gráfico de contorno que permite obter uma Capacidade Redutora Total entre 0,35 e 0,56 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo.

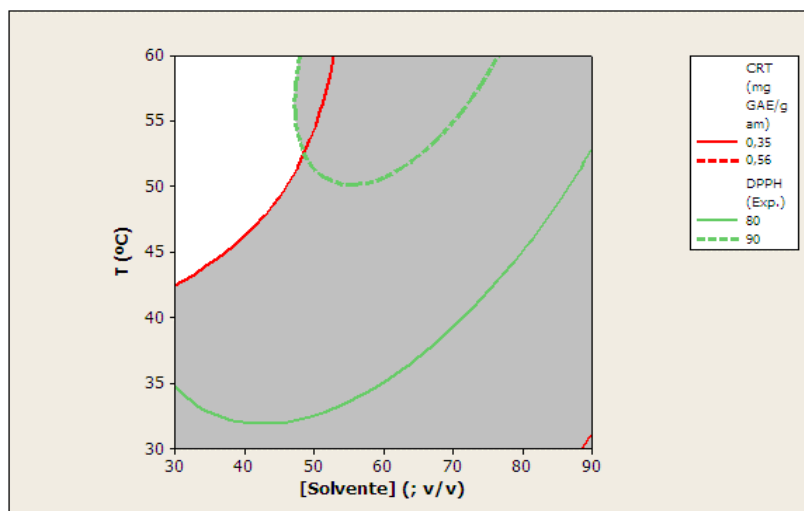


Figura 32 – Indicação da área que permite obter uma Capacidade Redutora Total entre 0,35 e 0,56 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo, nas extracções com metanol.

As condições de extracção ótimas obtidas para o metanol foram iguais a 30% (v/v), 60°C e 60 minutos. Os valores de *desirability* para a Capacidade Redutora Total e

Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH foram iguais a 0,34 e 0,65, respectivamente, enquanto que a “*composite desirability*” foi igual a 0,47, indicando que a solução obtida satisfaz em parte os objectivos combinados das duas respostas.

Para o caso da acetona, a concentração e a temperatura também foram os factores mais significativos. Na Figura 33 encontra-se representado o gráfico de contorno que permite obter uma Capacidade Redutora Total entre 0,40 e 0,65 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo.

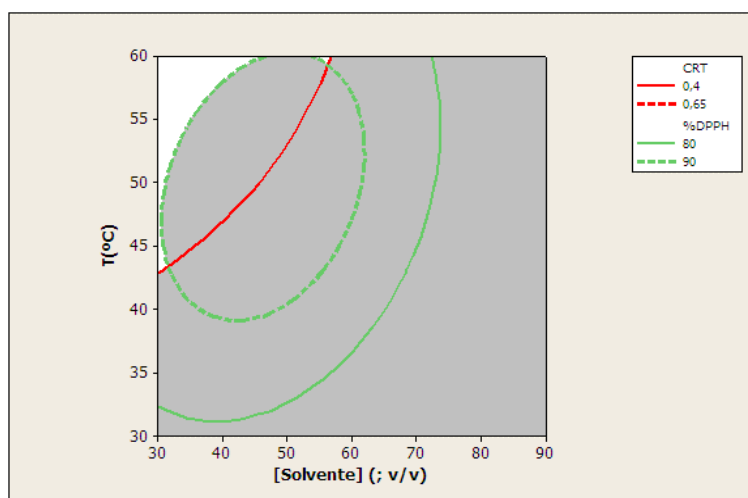


Figura 33 – Indicação da área que permite obter um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 0,40 e 0,65 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra fresca e um Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH entre 80 e 90%, em simultâneo, nas extracções com acetona.

As condições de extracção óptimas obtidas para a acetona foram iguais a 30% (v/v), 43°C e 10 minutos. Os valores de *desirability* para a Capacidade Redutora Total e Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH foram iguais a 0,27 e 0,94, respectivamente, enquanto que o “*composite desirability*” foi igual a 0,50, indicando que a solução obtida satisfaz razoavelmente os objectivos combinados das duas respostas.

Para o caso da água, como os factores estudados, temperatura e tempo, não foram significativos para a Capacidade Redutora Total e Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH, não se determinaram as condições óptimas de extracção.

3.3. Avaliação da actividade antioxidante em plantas sujeitas à adição de borra de café fresca e compostada

No presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da adição de borra de café fresca e compostada na capacidade redutora total e na actividade antioxidante de alfaces. A actividade antioxidante foi avaliada pelo Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e Poder Redutor.

3.3.1. Capacidade Redutora Total

Os resultados obtidos para a capacidade redutora total encontram-se descritos na Figura 34. Verificou-se que ao usar borra de café compostada (Figura 34A), a capacidade redutora total dos extractos de alface foram semelhantes à do controlo, não se tendo verificado diferenças entre as concentrações de borra de café usadas, com a excepção da concentração de 5% (v/v). Pelo contrário, no substrato constituído por borra fresca, observaram-se maiores diferenças nas alfaces produzidas com diferentes concentrações de borra de café fresca, registando-se uma superior capacidade redutora total nas concentrações de borra de café mais baixas (2,5 e 5%). O valor registado na concentração de 2,5% (v/v) foi estatisticamente diferente do determinado no controlo e nas concentrações de 10, 15 e 20% (v/v). Ao comparar os resultados obtidos entre a borra compostada e a fresca, maiores valores médios de capacidade redutora total foram obtidos em plantas cultivadas em borra fresca, constatando-se a existência de diferenças significativas entre a capacidade redutora total das plantas. Só as alfaces cultivadas em borra fresca a 10 % (v/v) é que não foram estatisticamente diferentes das alfaces cultivadas em borra compostada a 15 e 20 % (v/v). Pelo contrário, as restantes alfaces cultivadas em borra de café fresca foram significativamente diferentes das cultivadas em borra de café compostada.

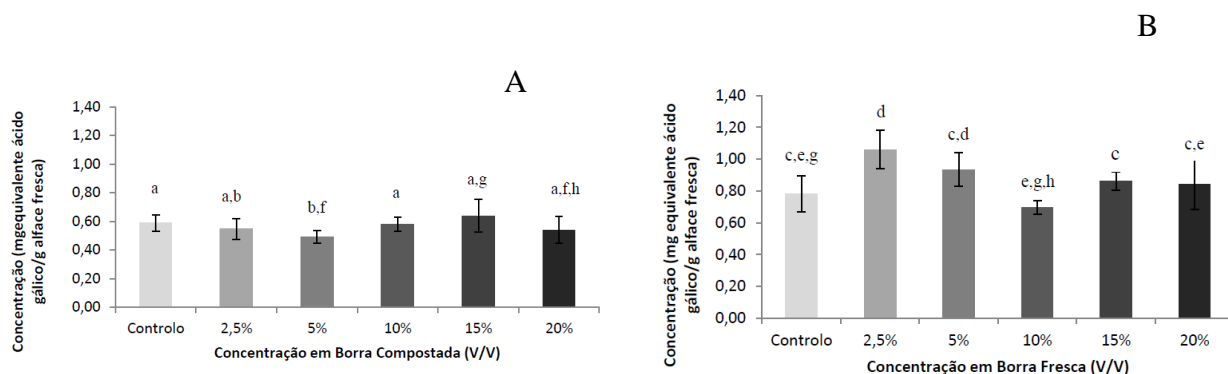


Figura 34 – Capacidade Redutora Total (mg equivalentes de ác gálico/g alface fresca), determinada em alface cultivada em terra vegetal e borra compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra fresca (B) com diferentes concentrações de borra de café.

A barra indica média \pm desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p < 0,05$.

3.3.2. Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH

Relativamente aos resultados do Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH, verificou-se que os dos extractos das plantas cultivadas em substratos de borra de café compostada (Figura 35A) foram semelhantes aos do controlo, independentemente da concentração em borra de café utilizada. No que diz respeito às plantas cultivadas em substratos de borra de café fresca (Figura 35B), verificou-se uma diminuição no valor médio do EC_{50} do Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH à medida que a concentração em borra de café fresca aumentou.

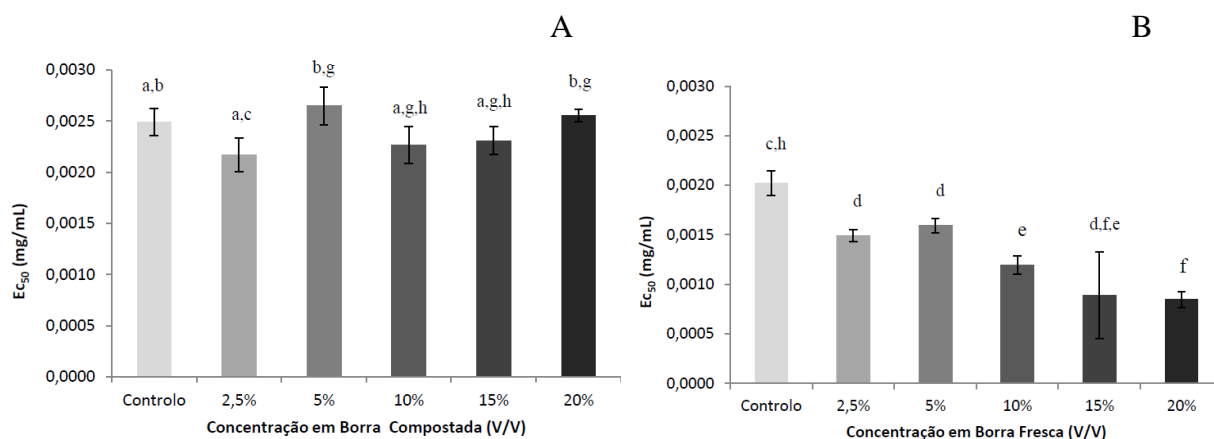


Figura 35 – EC_{50} do Efeito Bloqueador do Radical Livre do DPPH (mg alface fresca/mL), determinada para alface cultivada em terra vegetal e borra de café compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra de café fresca (B) para diferentes concentrações de borra de café.

A barra indica média \pm desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p < 0,05$.

As menores médias de EC₅₀ foram determinadas para as concentrações de 15 e 20% (v/v) de borra de café fresca (Figura 35B). Contudo, para a concentração de 15% de borra de café fresca observou-se uma maior dispersão nos resultados., fazendo com que esta concentração não fosse significativamente diferente das de 2,5, 5 e 10% (v/v).

De um modo geral, as soluções obtidas a partir de alface cultivada em borra de café fresca foram as que apresentaram maior actividade antioxidante, traduzida nos menores valores de EC₅₀. Além disso, foram as alfaces produzidas com 15 e 20% (v/v) de borra fresca, aquelas que apresentaram a maior actividade antioxidante, indicando que o uso de borra de café fresca poderá acarretar a formação de compostos com actividade antioxidante. Tal como referido anteriormente, as plantas, em geral, produzem compostos fenólicos como resposta a um *stress* (mecanismo de defesa) (Hossain *et al.*, 2010). Desse modo, o uso de elevadas concentrações de borra de café fresca pode ter funcionado como um *stress*, tendo originado uma maior produção de compostos com actividade antioxidante.

3.3.3. Poder Redutor

Os resultados referentes ao Poder Redutor, evidenciaram que os EC₅₀ determinados para as plantas cultivadas na presença de borra de café compostada foram semelhantes ao controlo (Figura 36A), com a excepção da concentração de 20% (v/v).

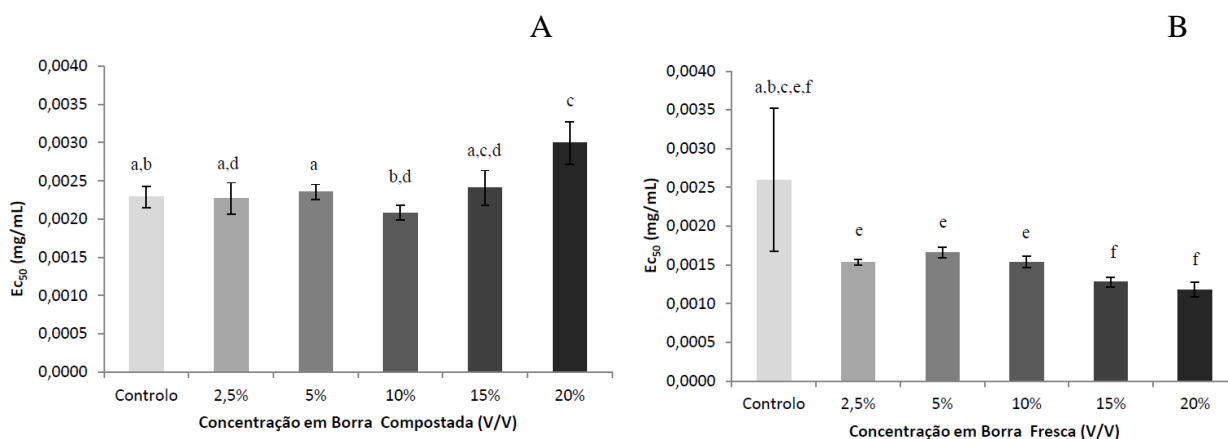


Figura 36 – EC₅₀ do Poder redutor (mg alface fresca /mL) determinado em alface cultivada em terra vegetal e borra de café compostada (A) e substrato de terra vegetal e borra de café fresca (B) para diferentes concentrações de borra de café.

A barra indica média ± desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de p<0,05.

Também foi nas alfaces cultivadas em borra de café compostada (Figura 36A) onde foram determinados valores de EC_{50} ligeiramente superiores aos determinados com borra de café fresca (Figura 36B), indicando uma menor actividade antioxidante nas primeiras plantas. Pelo contrário, as alfaces cultivadas em borra de café fresca, e principalmente as concentrações de 15 e 20% (v/v), foram as que registaram os menores valores de EC_{50} , indicativos novamente de uma maior actividade antioxidante.

Capítulo 4

Conclusões

4.1. Conclusões

Os resultados apresentados indicam que a borra de café, compostada ou não compostada, bem como a sua concentração influenciam significativamente o crescimento das plantas de alface quer em altura como em produção de biomassa. De uma maneira geral verificou-se que a aplicação de borra de café, independentemente do seu estado de decomposição, favoreceu significativamente a produção de biomassa foliar e de crescimento em altura das plantas, sendo em média duas vezes superior face às plantas controlo. Contudo, este efeito foi variável consoante a concentração de borra de café aplicado à cultura. Verificou-se que a baixas concentrações (2,5% e 5%) a produção de biomassa foliar era mais favorecida pela aplicação de borra de café fresca do que pela compostada. Pelo contrário, quando aplicadas concentrações mais elevadas (15% e 20%), verificou-se um maior incremento de biomassa foliar em plantas cultivadas em borra de café compostada face às cultivadas em borra de café fresca. Este resultado sugere que a aplicação de borra de café em ambos os estados (fresca ou compostada) permitiu um incremento de produção de biomassa em plantas de alfaces dependendo da sua dose de aplicação. No caso da borra de café fresca deve-se aplicar em doses baixas (2,5% ou 5%), enquanto que na forma compostada as doses a aplicar devem ser iguais ou superiores a 15%.

Para ambos os tipos de borra de café testados (fresca e compostada) verificou-se que o perfil da produção de biomassa foliar, nas diferentes concentrações de aplicação, era muito similar ao perfil obtido para os teores foliares de pigmentos fotossintéticos e de macronutrientes foliares; o que sugere a correlação destes dois parâmetros com a produção de biomassa foliar nas plantas de alface. Plantas cultivadas em borra de café fresca a baixas concentrações (2,5%) apresentavam teores de pigmentos fotossintéticos e de nutrientes minerais superiores face ao controlo. Pelo contrário, em concentrações superiores ou iguais a 15% foram as plantas cultivadas em borra compostada que apresentaram os maiores valores nestes parâmetros.

A redução da capacidade de absorção de nutrientes minerais das plantas cultivadas em borra de café fresca a elevadas concentrações (20%) pareceu ainda estar relacionada com alterações ao nível do número dos feixes vasculares. A análise microscópica das raízes destas plantas mostrou uma redução do número de feixes vasculares do xilema face às cultivadas no controlo e na borra compostada. Pelo contrário, entre estes dois últimos tratamentos não se registaram diferenças a este nível. Adicionalmente verificou-

se que a borra de café fresca, a concentrações iguais ou superiores a 20%, tem um efeito citotóxico ao induzir a binucleação das células meristemáticas

Em relação ao efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extractos de alface, verificou-se que a temperatura, tempo, solvente utilizado e relação amostra *versus* solvente usados na preparação dos extractos, não mostraram ser factores tão significativos ou importantes como foi o tipo de amostra. Adicionalmente, verificou-se que ao usar alface desidratada em vez de fresca, se obtiveram maiores valores para a capacidade redutora total.

Verificou-se que baixas concentrações de metanol ou de acetona e temperaturas elevadas originaram extractos com maior capacidade redutora total e efeito bloqueador do radical livre de DPPH. Contudo, verificou-se que para otimizar em simultâneo estas duas propriedades, as condições de extracção óptimas para o metanol foram iguais a 30% (v/v), 60°C e 60 minutos, e para a acetona iguais a 30% (v/v), 43°C e 10 minutos.

Em relação ao uso de borra de café no cultivo de alface, verificou-se que ao usar borra de café compostada, a capacidade redutora total dos extractos de alface foram semelhantes à do controlo, não se tendo verificado grandes diferenças entre as várias concentrações de borra de café usadas. Pelo contrário, nas alfaces produzidas com diferentes concentrações de borra fresca, registou-se uma capacidade redutora total ligeiramente superior nas concentrações de borra de café mais baixas. Relativamente aos resultados do Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e do Poder Redutor, verificou-se que os extractos das plantas cultivadas em substratos de borra de café compostada foram semelhantes, independentemente da concentração em borra de café utilizada. Pelo contrário, menores valores de EC₅₀ para o Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e Poder Redutor, foram obtidos em alfaces cultivadas em borra de café fresca, e principalmente para as concentrações de 15 e 20% (v/v), indicando uma maior actividade antioxidante nessas alfaces. Estes resultados indicam que o uso de elevadas concentrações de borra de café fresca pode funcionar como um *stress*, originando uma maior produção de compostos com actividade antioxidante.

Capítulo 5

Bibliografía

- ADI**, A. J.; Noor, Z. M. (2009). Waste recycling: Utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting; *Bioresource Technology*, **100**, 1027–1030.
- AGUILERA**, Y.; Dueñas, M.; Estrella, I.; Hernández; T. Benitez, V.; Esteban, R.M., Martín-Cabrejas, M.A. (2010). Evaluation of Phenolic Profile and Antioxidant Properties of Pardina Lentil as affected by industrial dehydration, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58** (18), 10101–10108.
- ALVES**, R. C.; Casal, S.; Oliveira, B. (2009). Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?; *Quimica Nova*, **32**, 2169-2180.
- ALTUNKAYA**, A., Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*), *Food chemistry*, **107**, 1173-1179.
- ALTUNKAYA**, A.; Becker, E.M.; Gökmen, V.; Skibsted, L. H. (2009). Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **115**, 163–168.
- ANÓNIMO 1** (2009 - 2010). *European Coffee Report*. http://www.ecf-coffee.org/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=94,
acedido em Agosto 2011.
- ANÓNIMO 2** (2011). drapn.min-agricultura.pt/drapn/estudoscasocompostagem.pdf.
acedido em Agosto 2011.
- ANTÓNIO**, J. (2008). O Micro-crédito como ferramenta para o relançamento da cultura do café na região agrícola do Libolo e Amboim (Angola); <http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/609/1/Tese%20JA1.2.pdf>,
acedido em Outubro de 2011. 111.
- AZUMA**, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. (2000). Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5496-5500.
- BENINNI**, E. R. Y.; Takahashi, H. W. Neves, C. S. V. J. (2005) Concentração e acúmulo de macronutrientes em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. *Semina (Verificar se não é seminário): Ciências Agrárias, Londrina*, **26**, n. 3, 273-282.
- BLASCO**, A. J.; Rogelio, M. C.; González, M. C.; Escarpa, A. (2005). Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods *Anal. Chim. Acta*, **539**, 237 -244.
- BOOPATHY**, R. (1988). Dry anaerobic methane fermentation of coffee pulp. *J. Coffee Research*. **18** (2) 59.

- BRITO, L. M.** (2006). Compostagem para a Agricultura Biológica. Manual de Agricultura Biológica - Terras de Bouro. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. /IPVC, 1-21.
- BURDRYN, G.;** Nebesny E.; Podswdek A.; Materska M.; Jankowski S.; Janda B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee bean. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 913-922.
- CAPECKA, E.;** Mareczek, A.; Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry.* **93**, 163–168.
- CHEVION, S.;** Berry, E. M.; Kitrossky, N.; Kohen, R. (1997) Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry *Free Radical Bio. Med.* **22**, 411.
- COUTO, R. M.;** Fernandes, J.; Silva, M. D. R. G.; Simões, P. C. (2009). Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, **59**, 159-166.
- DANTAS, A. M.** (2011). Materiais orgânicos e produção de alface americana. Monografia de graduação em Agronomia. Universidade de Brasília, Faculdade de agronomia e medicina veterinária.
- DINIS, M. L. P. A.** (2007). *Modelos Fenomenológicos de Distribuição Intercompartmental de Substâncias Radioactivas.* Departamento de Engenharia de Minas. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia do Ambiente Volume **II**. 458
- DIXON, R.A.;** Paiva, N.L. (1995) Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- DONKOH, A.,** Atuahene, C. C.; Kese, A.G.; Mensah-Asante, B. (1988). The nutritional value of dried coffee pulp (DCP) in broiler chickens diets. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, **22**, 139-146.
- ELMASTAS, M.;** Isildak, O.; Turkekul, I.; Temur, N. (2007). *J. Food Compos. Anal* **20**, 337.
- FAN, L.,** Soccol, C. (2005). Shiitake Bag Cultivayion. Parte I Shiitake. Coffee Residues. Mushroom Grower´s Handbook. Mushworld All **2**, 92-94.
- FIRUZI, O.;** Lacanna, A.; Petrucci, R.; Marrosu, G.; Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta.* **18**, 1721(1-3):174-84.

- FRANCA, A.S.;** Oliveira, L.S.; Ferreira, M.E. (2009). Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *Desalination*, **249**, 267–272.
- GASPAR, A. M.;** Monteiro, I. M. (2001). *Relatório - Programa: Apoio às Médias Empresas Agrícolas Santomenses (PAMEA)*; <http://www.gppaa.min-agricultura.pt/ri/Cooperacao/Docs/RelatorioCafeSTP2001.pdf>, acedido em Outubro de 2011.
- HOCHMUTH, G. J.;** Maynard, D. N.; Vavrina, C. S.; Stall, W. M. Kucharek, T. A.; Johnson, F. A.; Taylor, T. G. (1996). Cucurbit production in Florida: cantaloupe, cucumber, muskmelon, pumpkin, squash, watermelon. In: Hochmuth, G. J. & D.N. Maynard (editors). Vegetable production guide for Florida. University of Florida, *Institute of Food and Agricultural Sciences*, 179-207.
- HOSSAIN, M.B.;** Barry-Ryan, C; Martin-Diana, A.B.; Brunton N.P. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs, *Food Chemistry*, **123**, 85-91.
- JASPRICA, I.;** Bojic, M.; Mornar, A.; Basic, E.; Bucan, K.; Medic-Saric, M. (2007). Evaluation of Antioxidative Activity of Croatian Propolis Samples Using DPPH[•] and ABTS^{•+} Stable Free Radical Assays. *Molecules* **12**, 1006.
- KONDAMUDI, N.;** Mohapatra, S. K.; Misra, M. (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 11757 – 11760.
- HATANO, T.;** Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T. (1998). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical Flavoscavenging effect. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2090.
- LEIFA, F.;** Pandey, A., Soccol, C.R. (2001). Production of *Flammulina velutipes* on Coffee Husk and Coffee Spent-ground, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **44**, 205-212.
- LIU, X.;** Ardob, S.; Bunning, M.; Parry, J.; Zhou, K.; Stushnoff, C.; Stoniker, F.; Yu, L.; Kendall, P. (2007). Total phenolic content and DPPH^d radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa L.*) grown in Colorado. *LWT - Food Science and Technology*, **40**, 552–557.
- LLORACH, R.;** Martínez-Sánchez A.; Tomas-Barberá F.A.; Gil M.; Ferreres, F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, **108**, 1028–1038.

- MATOS, A. T.** (2003). Tratamento e Destinação Final dos Resíduos Gerados no Beneficiamento do Fruto do Cafeeiro: In: ZAMBOLIN, L., Produção Integrada de Café. Viçosa: UFV: DFP, **710**, 648 a 695.
- MAZZAFERA, P.** (2002). Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agrícola*, V. **54**, 815-821.
- MURTHY, P.S.; Manonmani, H.K.** (2008). Bioconversion of coffee industry wastes with white rot fungus *Pleurotus florida*; *Research Journal of Environmental Sciences*, **2**, 145-150.
- NAIDU, M. M.; Murthy, P. S.** (2010). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. doi: **10.1007/s11947-010-0363-2**.
- NICOLLE, C., Cardinault N.; Gueux, E.; Jaffrelo, L.; Rock, E.; Mazur, A.; Amouroux, P.; Révész, C.** (2004). Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical Nutrition*. **23**, 605–614.
- NIKI, E.** (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine* **49**, 503–515.
- OLIVEIRA, E. Q.; Neto, F. B.; Negreiros, M. Z.; Oliveira, A. M.; Silveira, L. M.** (2005). Cultivares de alface em segundo cultivo em sistemas solteiro e consorciado com duas cultivares de cenoura. Caatinga, Mossoró, *Horticultura Brasileira*, **21**.
- OZEROL, N. H.; Titus J. S.** (1965). The determination of total chlorophyll in methanol extracts. *Trans Illinois State Acad Sci* **58**, 15-19.
- ORDIDGE, M.; García-Macías, P.; Battey, N. H.; Gordon, M. H.; Hadley, P.; John, P.; Lovegrove, J. L.; Vysini, E.; Wagstaffe, A.** (2010). Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chemistry*. **19**, 1224–1227.
- OYAIZU, M.** (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307–315.
- PAISLEY, J., Skrzypczyk S.** (2005). Qualitative Investigation of Differences in Benefits and Challenges of Eating Fruits versus Vegetables as Perceived by Canadian Women. *Journal of Nutrition Education and Behavior*. **37**, 77-82.

- PANDEY, C. R.;** Soccol, P.; Nigam, D.; Brand, R.; Mohan, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, **6**, 153-162.
- PEIXOTO, J.** (2007). Documento adaptado das aulas de Elementos de Engenharia do Ambiente; Laboratórios de tecnologias ambientais, análises físico-químicas, azoto kjeldahl e amoniacal.
- PEIXOTO, F.J. U.** (2006). Produtividade de alface com o uso de diferentes fontes de matéria orgânica e efeito na fertilidade do solo. Dissertação de mestrado em ciência do solo. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1-142.
- PRADO, M. A. C.;** Campos, C. M. M.; Silva, J. F. (2010). Estudo da variação da concentração de metano no biogás produzido a partir das águas residuárias do café *Ciência e Agrotecnologia*, **34** (2), 475-484.
- RAMARATHNAM, N.;** Osawa T.; Ochi, H.; Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technolog.* **6**, 75-82.
- RATHINAVELU, R.;** Graziosi, G. (2005) Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. Organización Internacional del Café ED 1967/05
- RAVIV, M.** (1998). Horticultural uses of composted material. *Acta Horticulturae*, **469**, 225-234.
- RÍOS, J. J.;** Rosales, M.A.; Blasco, B.; Cervilla, L.M.; Romero, L.; Ruiz, J.M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*. **116**, 248–255.
- RODRIGUES, E. T.;** Casali, V.W. (1998). Resposta da alface à adubação orgânica. II. Teores, conteúdos e utilização de macronutrientes em cultivares. *Revista Ceres*, UFV, Viçosa, **45**, n.261, 437-449.
- SANTOS, D. M.** (2010) Desenvolvimento de método para obtenção de energia a partir da produção de biodiesel via extração de óleo de borra de pó de café em escala laboratorial. São Paulo, USP Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de interunidades de Pós-Graduação em Energia, Universidade de São Paulo.
- SOUSA, A.;** Ferreira, I.; Barros L.; Bento, A.; Pereira, J.; (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ‘‘alcaparras’’. *LWT - Food Science and Technology*. **41**. 739–745.

- TORRENTÓ**, Martínez, M., Pujol, O.; (2008). Antecedentes y fundamentos del proceso de compostaje, em Moreno Casco, J., Moral Herrero, R., *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 76-90.
- ULLOA**, J. B., Verreth, J. A. J. (2002). Growth, feed utilization and nutrient digestibility in tilapia fingerlings (*Oreochromis aureus* Steindachner) fed diets containing bacteria-treated coffee pulp, *Aquaculture Research*, **33**, 3, 189-195.
- VALENTÃO**, P. (2002). Limonete, hipericão-do-gerês, cardo-do-coalho, fel-da -terra - Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica. Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora; Tese de Doutoramento apresentado na Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto. 323.
- VEGRO**, C. L. R.; Carvalho, F. C. (2006). Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. *Inf. Econ.*, **24**, p. 9-16.
- VILLAS BÔAS**, R. L. Passos, J.C.; Fernandes, M.; Bull, L.T.; Cezar, V.R.S.; Goto, R. (2004). Efeito de doses e tipos de compostos orgânicos na produção de alface em dois solos sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira, Brasília*, **22**, n.1, 28-34.
- XIMENES**, M. A. (2010). A tecnologia Pós-Colheita e Qualidade Física Organoléptica do Café Arábica de Timor. Dissertação para Obtenção do grau de Mestra em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 121.
- YOUSIF**, A.L.; Scaman, C.H.; Durance, T.D.; Girard, B. (1999). Flavor volatiles and physical properties of vacuum-microwave and airdried sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4777-4781.