

Influência de diferentes bioestimulantes no crescimento e na composição de folhas de oliveira cv. Cobrançosa

Aline Azeredo Castanha

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da
dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do
Paraná*

Orientado por

Prof. Dr. Nuno Miguel de Sousa Rodrigues

Prof. Dr. Gilmar Antônio Nava

Bragança

2023

¹Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento
debaixo do céu: ²tempo de nascer e tempo de morrer;
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou.
³Tempo de matar e tempo de curar; tempo de demolir e
tempo de construir. ⁴Tempo de chorar e tempo de rir;
tempo de gemer e tempo de dançar. ⁵Tempo de atirar
pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo
de apertar-se. ⁶Tempo de procurar e tempo de perder;
tempo de guardar e tempo de jogar fora. ⁷Tempo de rasgar
e tempo de costurar; tempo de calar e tempo de falar.
⁸Tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e
tempo de paz. (A BÍBLIA, 2015)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, e por me proporcionar estar aqui e viver todas as experiências que vivi com saúde.

Ao meu orientador Nuno Rodrigues que me auxiliou em todos os momentos, acompanhando cada passo dado no desenvolver deste trabalho, pela paciência em tantos momentos de nervosismo, pelo apoio nas mais diversas atividades desenvolvidas durante este ano, e pelos inúmeros ensinamentos que me transmitiu sobre as oliveiras.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por me proporcionar os meios adequados para que me pudesse enriquecer profissionalmente. Ao Instituto Politécnico de Bragança por me receber com toda disposição e por permitir a tantos alunos estrangeiros uma vivência mais aprazível dando-nos a oportunidade de conhecer a rica cultura portuguesa, especialmente a cultura de Bragança.

Gostaria também de agradecer a empresa Hubel pela disponibilidade de seus produtos para o desenvolvimento desse trabalho, e também ao Francisco Pavão pelo acolhimento em sua propriedade e disposição da parcela de oliveiras para a realização do estudo.

Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram em tudo, por me terem educado com tanto amor e carinho, devo-lhes tudo que sou e tenho hoje, obrigada pela família que somos, por me terem dado o Daniel e a Helena, o nosso lar é o meu refúgio pois é onde nunca faltou e nem faltará cumplicidade, apoio e amor para com todos.

Os meus sinceros agradecimentos também ao meu coorientador, Gilmar Antônio Nava, que mesmo tendo um oceano de distância entre nós, deu-me todo o apoio necessário, principalmente nos meus momentos de nervosismo onde sabiamente me foi dizendo palavras de conforto, para que tudo terminasse bem.

Às minhas amigas Lárissa, Maria Isabel e Camila que permaneceram ao meu lado durante este longo ano.

Um agradecimento especial à Daniele que esteve comigo em cada momento no desenvolvimento desta dissertação, apoiando-me emocionalmente e também em tudo, em cada etapa do estudo. A nossa amizade é muito importante, destes 6 anos que Deus nos proporcione ainda lindos e longos anos de amizade, compartilhando momentos que serão sempre lembrados com amor e carinho por mim.

Também agradeço a uma grande amiga que me fez ter coragem de chegar até aqui, mesmo quando eu achava que não ia conseguir ela me impulsionava e motivava a continuar, Renata o meu eterno agradecimento por todos os conselhos.

Minha profunda gratidão pelos laços de amizades criados ao longo deste mestrado com a Ana Beatriz, a Cecília e a Ester, conhecemo-nos no decorrer deste ano e construímos uma relação muito importante para que esta etapa fosse concluída, e espero que ao voltar para nossa terra ainda consiga manter contacto com todas vocês.

Ao Nuno Ferreiro e à Sandra Lamas por me terem ensinado tanto com tanto carinho e paciência, prestando sempre o auxílio necessário nas análises que eram propostas e eu nem sabia por onde deveria começar. Ao Kevin que nos ajudou em inúmeros momentos, e assim deixo aqui o meu carinho e grande agradecimento a todo o pessoal do laboratório de azeites, pelas risadas de descontração, trocas de experiências e ensinamentos da cultura portuguesa.

Índice

Resumo	ix
Abstract.....	x
1 Introdução.....	2
2. Referencial teórico.....	5
2.1. Características da oliveira	5
2.2. Alterações climáticas	6
2.3. Efeitos das alterações climáticas nas plantas	7
2.4. Alternativas/ soluções aplicadas	8
2.5. Tipos de bioestimulantes	8
2.5.1. Fungos micorrízicos arbusculares	9
2.5.2. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal	9
2.5.3. Bioestimulantes de quitosana	10
2.5.4. Bioestimulantes de ácidos húmicos e fúlvicos	10
2.5.5. Bioestimulantes de hidrolisados de proteínas animais e vegetais	10
2.5.6. Bioestimulantes Fosfitos	10
2.5.7 Silício	11
2.5.8. Bioestimulantes de extratos de algas marinhas	11
2.6. Bioestimulantes que podem ser usados na oliveira.....	11
2.7. Atividade antioxidante	12
3. Material e métodos	14
3.1. Delineamento experimental	14
3.2. Ensaio de campo.....	15
3.2.1. Bioestimulantes utilizados no ensaio	15
3.3. Acompanhamento de campo.....	16
3.3.1. Avaliação do crescimento de ramos selecionados	16
3.3.2. Avaliação dos estados fenológicos.....	17
3.4. Ensaio de laboratório.....	18
3.4.1. Colheita das amostras.....	18
3.4.2. Biometria das folhas.....	18
3.4.3. Análise de clorofilas e carotenoides.....	19
3.4.4. Atividade antioxidante das folhas de oliveira	19
3.5. Análise estatística	21
4. Resultados e discussões	23

4.1. Resultados do ensaio de campo	23
4.1.1. Estados fenológicos.....	23
4.1.2. Avaliação da aplicação dos bioestimulantes no crescimento da planta	25
4.1.3. Taxa de crescimento do diâmetro do ramo	27
4.1.4. Taxa de crescimento do ramo.....	27
4.2. Resultados do ensaio em laboratório	28
4.2.1. Biometria das folhas.....	28
4.2.2. Clorofila e carotenóides	31
4.2.3. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH.....	33
4.2.4. Fenóis totais	34
4.2.5. Poder redutor	35
5. Conclusões.....	38
6. Referências	41

Índice de figuras

Figura 1. Local e distribuição do ensaio com identificação dos tratamentos (Controlo – sem aplicação de produtos; T1 – e-Dalgin; T2- Fitoalgas green; T3 – Algaman B; T4 – Dalgin MG), (Fonte: Google Earth, 2022).	14
Figura 2. Aplicação dos bioestimulantes com recurso a pulverizador manual.	16
Figura 3. Avaliação do crescimento de ramos selecionados.	17
Figura 4. Avaliação dos parâmetros biométricos nas folhas de oliveira.	18
Figura 5. Avaliação do teor de clorofilas e carotenoides das folhas de oliveira.	19
Figura 6. Preparação de extratos metanólicos para avaliação da atividade antioxidante.	20
Figura 7. Evolução dos estados fenológicos nas plantas com aplicação de diferentes bioestimulantes.	24
Figura 8. Percentagem de crescimento do diâmetro do ramo durante a realização do ensaio.	27
Figura 9. Percentagem do crescimento do ramo.	28
Figura 10. (a) Valores médios de clorofila total ($\mu\text{g/ml}$) e (b) carotenoides ($\mu\text{g/ml}$) nos dois momentos de coleta das folhas.	32
Figura 11. Valores medidos do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (%) obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.	33
Figura 12. Teor de Fenóis Totais expressos em mg ác. Gal./g de amostra obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.	34
Figura 13. Valores médios de absorvância a 700 nm determinados no ensaio do poder redutor expressos em mg Trolox/g amostra. obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.	35
Figura 14. Análise de componentes principais (PC1: 58,5%, PC2: 28,5% e PC3: 12,9%) com base na atividade antioxidante após segunda aplicação (DPPH, Fenóis totais e Poder redutor): gráfico 3D mostrando o reconhecimento padrão não supervisionado de acordo com o tratamento com diferentes bioestimulantes (Controlo, T1, T2, T3 e T4) com base na atividade antioxidante de folhas de oliveira da cv. Cobrançosa.	36

Índice de tabelas

Tabela 1. Parâmetros vegetativos e reprodutivos dos ramos de oliveira antes e após aplicação de bioestimulantes.	26
Tabela 2. Parâmetros biométricos avaliados nas folhas de oliveira com diferentes tratamentos (média±desvio padrão).....	30

Resumo

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma cultura com grande importância para a bacia do mediterrâneo e cultivada há séculos por fazer parte da dieta dos povos mediterrânicos. Em Portugal essa cultura desempenha grande papel socioeconómico e cultural com maior enfoque nas regiões interior do país, como é o caso da região de Trás-os-Montes, onde os olivais tradicionais são cultivados em regime de sequeiro. Nos últimos anos, estas plantas têm sofrido com as constantes alterações climáticas. As chuvas não acontecem mais de forma regular, a temperatura média da região tem apresentado aumentos significativos, ocasionando problemas na produtividade. Nesse contexto o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia de alguns produtos disponíveis no mercado que visam minimizar os efeitos causados pelas alterações climáticas. Para tal, foram avaliados 4 produtos bioestimulantes à base de algas em oliveiras da cv. Cobrançosa. Foi feito o acompanhamento de campo desde maio a outubro para avaliar qual o efeito na evolução dos estados fenológicos, no crescimento na floração e vingamento. Em laboratório foi avaliada a biometria e composição das folhas no que respeita às clorofilas, carotenóides e atividade antioxidante medida pelos métodos de DPPH, teor de fenóis totais e poder redutor. Os resultados obtidos mostram que a aplicação de bioestimulantes promove o atraso na fenologia e um efeito positivo no crescimento da planta. Relativamente à biometria das folhas, verificou-se diferenças significativas com a aplicação dos bioestimulantes. Em relação ao teor de clorofilas e carotenóides verificou-se que os bioestimulantes não influenciam na sua composição variando o teor de clorofilas entre 14,96 µg/mL e 18,83 µg/mL e os carotenóides de 0,81 µg/mL e 1,16 µg/mL. Para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH após a 2ª aplicação dos produtos a variação obtida dentre os tratamentos foram entre 45,10-53,17% sendo o controlo o tratamento com mais atividade. Nos fenóis totais o T4 é aquele que se distingue com um teor de 60,27 mg ácido Gal/g de amostra. Na avaliação do poder redutor verificou-se uma diminuição nos valores. Estes resultados são ainda preliminares sendo necessário mais anos de estudo para perceber melhor a influencia dos bioestimulantes na planta.

Palavras chave: Bioestimulantes, cultura, aplicação, antioxidante, fenóis totais.

Abstract

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a crop of great importance for the Mediterranean basin and has been cultivated for centuries, once it is part of the diet of the Mediterranean people. In Portugal, this crop plays a great socioeconomic and cultural role, with a greater focus on the interior regions of the country, as is the case of the Trás-os-Montes, where traditional olive groves are dry-farmed. In recent years, these plants have suffered from constant climate change. The rains no longer happen on a regular basis, and the average temperature in the region has shown a significant raise, causing problems in productivity. In this context, the present work aimed to evaluate the effectiveness of some products available on the market that aim to minimize the effects caused by climate change. For this, 4 olive trees of cv. Cobrançosa seaweed-based biostimulants were evaluated. Field monitoring was carried out from May to October to assess the effect on the evolution of phenological stages, growth, flowering and flourishing. In the laboratory, the biometry and composition of the leaves were evaluated in regard to chlorophylls, carotenoids, and antioxidant activity measured by DPPH methods, total phenol content, and reducing power. The results obtained show that the application of biostimulants promotes delay in phenology and a positive effect on plant growth. In regard to the biometry of the leaves, there were significant differences with the application of biostimulants. Regarding the content of chlorophylls and carotenoids, it was found that biostimulants do not influence their composition, varying the chlorophyll content between 14.96 µg/mL and 18.83 µg/mL and carotenoids from 0.81 µg/mL and 1.16 µg/mL. For the blocking effect of DPPH free radicals after the 2nd application of the products, the variation obtained between treatments was between 45.10-53.17%, controlling the treatment with more activity. In the total phenols, T4 is the one that stands out with a content of 60.27 mg acid Gal/g of the sample. In the evaluation of the reducing power, a decrease in the values was verified. These results are still preliminary and more years of study are needed better to understand the influence of biostimulants on the plant.

Keywords: Biostimulants, culture, application, antioxidant, total phenols.

Capítulo I

1 Introdução

A oliveira, é uma cultura historicamente importante, especialmente na bacia do mediterrâneo. Há séculos que é utilizada como uma fonte de alimento sendo atualmente considerado um dos pilares da dieta mediterrânica (Rodrigues et al., 2019). O seu cultivo estende-se por mais de 47 países, somando mais de 11 milhões de hectares plantados em todo o mundo, sendo que 97,9% das áreas correspondem à bacia mediterrânica (Rallo et al., 2018). Contudo, nos últimos anos este cenário tem vindo a mudar. Cada vez mais, novos olivais são plantados com grande intensidade em outras regiões além da bacia do Mediterrâneo. Atualmente a oliveira encontra-se espalhada praticamente em todo o mundo, até em regiões onde o seu cultivo não era tradição como é o caso da China, da África do Sul e ou até do Brasil (Rallo et al., 2018; Basile et al., 2020). Em Portugal, a oliveira tem um grande valor, pois, ligado a ela está associada uma grande tradição. Para além do mais tem um papel socioeconómico e cultural importante, principalmente em regiões do interior. Na campanha de 2021/2022, foram produzidas 1.375.753 toneladas de azeitona do qual 98,15% destina-se à produção de azeite e 1,85% para a produção de azeitona de mesa (INE, 2022a). Essa produção distribui-se ao longo de todo o território onde podemos encontrar diferentes regiões produtoras, destacando-se o Alentejo com 80,5% da produção nacional. Esta região é principalmente constituída por olivais “modernos” ou também designados olivais de alta densidade o que permite elevadas produções por hectare (Fraga et al., 2020). Como segunda maior região produtora, está Trás-os-Montes com 8,5% seguido da Beira Interior com 5,66% da produção nacional (INE, 2022a). A região transmontana é caracterizada pelos seus olivais tradicionais que se encontram maioritariamente em regimes de sequeiro (Lopes et al., 2022). Comparativamente ao sistema anteriormente referido, este tipo de olivais apresentam uma menor produção, uma vez que existe uma baixa quantidade de recursos hídricos na região e a maior parte dos olivais encontra-se em solos pobre e/ou apresentam uma idade avançada levando assim a baixas produções por hectare. Associado a isto, estão também as situações de clima extremo nas diferentes estações (Makilutila, 2017).

No ano de 2021 a produção de azeitonas foi muito expressiva superando as expectativas dos produtores. Contudo, 2022 foi um ano com resultados contraditórios, ou seja, baixos valores de produção. Isto deve-se aos períodos de clima extremo com elevadíssimas temperaturas durante o período de maior sensibilidade da planta, sendo no momento da floração na última primavera que levou a esta elevada perda de produção.

Estes constrangimentos provocados pela natureza, levam a grandes incertezas no sector produtivo. De forma a atenuar estes riscos naturais como escassez de chuvas e temperaturas demasiadamente elevadas, várias empresas têm lançado no mercado produtos que ajudam a diminuir os efeitos causados por essas alterações climáticas (Antón-Herrero et al., 2023). Os bioestimulantes, são produtos cujas propriedades permitem mitigar alguns dos efeitos provocados pelas condições severas (Wang et al., 2003). Dada a situação atual, tem-se assistido a um crescente aumento do uso dos diferentes produtos com funções protetora, no sentido de continuar a promover uma grande produção de alimentos de forma sustentável e com utilização eficiente dos recursos disponíveis (Santacruz-García et al., 2022). Alguns autores relatam que o uso dos bioestimulantes em diversas culturas, mostram resultados positivos no que respeita ao crescimento das plantas, aos conteúdos fitoquímicos, características fisiológicas, e diminuição dos efeitos negativos causados pelas salinidades do solo e as alterações climáticas (Zulfiqar et al., 2020).

No sentido de avaliar a eficácia de alguns destes produtos disponíveis no mercado, a presente dissertação teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes bioestimulantes em oliveiras da cv Cobrançosa para avaliar que implicações tem nos estados fenológicos, na floração, no vingamento, no crescimento e na composição das folhas. Para executar este trabalho, foram aplicados quatro bioestimulantes comerciais à base de algas marinhas num olival tradicional na região de Trás-os-Montes. Como objetivos específicos pretende-se avaliar quais as implicações da aplicação dos diferentes bioestimulantes nomeadamente:

- Na evolução dos estados fenológicos das diferentes árvores;
- No crescimento de ramos selecionados da planta, floração e vingamento;
- Composição das folhas em relação à atividade antioxidante, clorofilas e carotenoides.

Esta dissertação está dividida em 5 capítulos dos quais este primeiro ficou dedicado à introdução, o segundo será direcionado ao desenvolvimento do tema. No terceiro capítulo está exposto o desenho experimental, juntamente com os métodos aplicados durante o ensaio. No quarto capítulo encontram-se os expostos os resultados obtidos assim como as discussões dos mesmos e o quinto capítulo ficou reservado para as considerações finais

Capítulo **II**

2. Referencial teórico

2.1. Características da oliveira

A oliveira, pertence à família das oleáceas e tem cerca de 29 diferentes géneros além de mais de 600 espécies espalhadas por inúmeras regiões do mundo. Contudo, esta é a única espécie da família que produz frutos que podem ser consumidos pelo ser humano. Quanto à sua estrutura, as oliveiras são árvores ou arbustos que podem ter de 4 a 8 metros de altura, variável de acordo com a cultivar (Martínez, 2017). A oliveira é uma planta em que o seu ciclo biológico é muito influenciado pela temperatura (Ghanbari et al., 2012). Apresenta uma grande rusticidade e longevidade, facilmente pode ser reproduzida por via vegetativa (Monteiro, 1999). É uma das plantas mais antigas cultivada pelo homem e possui a capacidade de se manter produtiva durante centenas de anos (Martínez, 2017). Apresenta folhas simples, inteiras, sem estípulas e o pecíolo é curto. As folhas são perenes podendo durar até três anos. Apresentam também uma disposição oposta e uma coloração verde escura. Outra das características é a nervura central bem aparente. Relativamente ao formato e à dimensão das folhas, estas variam entre as diferentes espécies (Monteiro, 1999).

Vários estudos têm decorrido no sentido de caracterizar as folhas do ponto de vista da sua atividade antioxidante como diz Edziri et al., (2019) que a folha de oliveira possui metabólicos secundários amplamente utilizados para as atividades hipoglicémicas e hipotensoras. Além do mais, Ammar et al., 2017 afirma que as folhas de oliveira são consideradas um subproduto, pois demasiadas quantidades de folhas acabam por ser colhidas durante os processos realizados no decorrer do desenvolvimento da planta, como a colheita dos frutos, o processamento dos mesmos e ainda durante as podas. E como os antioxidantes retêm certas substâncias vitais para proteger organismos e produtos que acabam por ser causados através do stresse oxidativo que é induzido pelos radicais livres, cada vez mais surgem estudos referentes a atividade antioxidante (Ganga Rao et al., 2011). As composições fenólicas quantitativa e qualitativa das folhas da oliveira têm determinadas variações de acordo com as condições que estão expostas, a forma como são armazenadas, as condições climáticas do ambiente onde se desenvolveram, o tamanho dos ramos, e um fator muito relevante para essas características a variedade da planta (Edziri et al., 2019; El & Karakaya, 2009). Para além de conhecer a composição da folha, é necessário conhecer todo o seu ciclo. Nos diferentes estados fenológicos da planta, a floração e o vingamento são dois dos estágios de maior importância. É preciso conhecer

bem o ciclo de cada cultivar no sentido de poder optar pela mais adaptável às condições adversas durante o período de floração e do vingamento. Em zonas onde há a ocorrência de geadas tardias, é importante ter cultivares com uma floração mais tardia para que não haja prejuízos provocados por baixas temperaturas. O mesmo ocorre em zonas de maior calor. Para que haja floração reprodutiva a planta necessita que as temperaturas sejam próximas dos 20°C (Barranco et al., 2017; Hamze et al., 2022). Atualmente os novos olivais plantados usam cultivares específicos de acordo com as técnicas culturais, e sistemas usados. Temos à disposição centenas de cultivares com diferentes tipos de comportamentos e características, resultado de séculos de seleções realizadas empiricamente pelo ser humano (Ammar et al., 2017; Martins et al., 2022). O aparecimento das inflorescências na oliveira tem origem nas gemas axiliares das folhas com crescimento vegetativo do ano anterior da floração. A sua forma é paniculada, contém um eixo central de onde saem as ramificações, que também pode acontecer de serem ramificadas. Relativamente à quantidade de flores por inflorescência esta varia entre 10 e 40 flores, dependendo da cultivar, juntamente com as condições ambientais e fisiológicas da planta (Barranco et al., 2017). A maioria das oliveiras inicia o seu ciclo produtivo por volta dos 4 a 6 anos. Além disso a oliveira é caracterizada também por ser uma planta bienal por isso a sua produção é variável entre um ano e outro (Rallo et al., 1994). As fases de desenvolvimento da oliveira têm as mais variadas importâncias, como a avaliação da adaptação das plantas em novos ambientes a que estão sujeitadas, onde não há conhecimentos prévios em olivicultura.

2.2. Alterações climáticas

As alterações climáticas são mudanças que ocorrem no clima, possíveis de serem identificadas através de testes estatísticos que são realizados ao longo dos anos, essas variações podem ser naturais ou uma resposta das atividades humanas (Pereira, 2011).

O aumento da temperatura média do planeta é principal alteração climática ocorrente nos últimos anos, em que a emissão de gases do efeito estufa está a ocorrer de forma descontrolada, provocando um desequilíbrio no processo que acontece de forma natural e responsável para manter a vida no planeta (APA, 2021). Mudanças na temperatura e nas precipitações impulsionam também mudanças diretas nos rendimentos advindos da olivicultura, principalmente no cultivo de sequeiro que está maior exposição sem o auxílio de tecnologias no campo para auxiliar as plantas em momentos críticos das

intempéries climáticas, sendo que temperaturas altas podem proporcionar benefícios em algumas espécies, mas podem também ocasionar menor rendimento em outras e quando se trata de sistemas irrigados certos constrangimentos são evitados (Altieri et al., 2015).

A bacia do Mediterrâneo está a ter um aumento significativo nas taxas de evapotranspiração desencadeando uma menor precipitação, com uma tendência de diminuição na disponibilidade de humidade para as vegetações, com casos mais extremos nas regiões da Península Ibérica, França e Norte da África (García-Ruiz et al., 2011). Entre os países da Europa, Portugal encontra-se numa situação bem acentuada de vulnerabilidade no que diz respeito às alterações climáticas que têm vindo a acontecer, principalmente pelas características geográficas do país, que se enfatizam devido ao aumento do nível médio do mar, que pode desencadear o efeito de seca (IPCC, 2022). Têm-se observado ainda um aumento de temperatura por década de em média 0,5°C e além disso tem se verificado um certo aumento na humidade do ar, e no que respeita às precipitações das estações primavera, verão e outono nota-se uma considerável diminuição, ao que indica que com estas informações Portugal além do aumento significativo da temperatura sofrerá com aumento na intensidade das ondas de calor, situações estas previstas para início do próximo século (Melo-Abreu et al., 2011).

2.3. Efeitos das alterações climáticas nas plantas

Nos últimos anos tem-se sentido alterações no clima em todo mundo, e essas mudanças acabam por causar eventos climáticos extremos. O setor agrícola é aquele que mais sofre diretamente com estes desastres e pode acarretar problemas no sistema de segurança alimentar de acordo com a importância das determinadas culturas atingidas por esses eventos (Lesk et al., 2016). As mudanças que causam grandes impactos na produtividade das plantas são provocadas sobretudo pelas irregularidades nas precipitações e as elevadas temperaturas (Forni et al., 2017; Ferdous et al., 2015). Além dos problemas causados pelos stresses abióticos, as culturas exploradas na agricultura estão a sofrer com a intensificação dos ataques causados por pragas e doenças, sendo uma possível explicação o desequilíbrio instigado pelas alterações climáticas, em que na maior parte das situações os patógenos adaptam-se a essas alterações e os seus inimigos naturais não conseguem acompanhar esse mesmo ritmo (Yang et al., 2022).

Além de todos os problemas em questão da produção e produtividade dos alimentos as alterações climáticas afetam as plantas na sua fenologia, podendo os danos serem gerados desde a germinação até a fase reprodutivas das culturas (Li et al., 2021).

2.4. Alternativas/ soluções aplicadas

Com o aumento previsto da população mundial e conseqüentemente o aumento na demanda de alimentos, o sector agrícola necessita de alternativas para aumentar a produtividade de alimentos de forma mais sustentável. Nesse sentido a irrigação tem entrado como uma grande possibilidade para contornar os problemas ocorridos com as secas e as altas temperaturas, dois problemas gerados pelas alterações climáticas (Kamali et al., 2022). Uma outra solução, é o uso de bioestimulantes. Nos últimos anos, a aplicação de diferentes bioestimulantes tem sido umas das alternativas para mitigar os efeitos provocados pelos climas extremos. Estes são vistos como uma saída viável e com potencial para proporcionar um aumento na produção de alimentos (García-García et al., 2020). Além do aumento na produção de alimentos de forma sustentável, procuram-se cada vez mais soluções que não sejam uma ameaça para o meio ambiente, como os fertilizantes químicos demonstram ser (Li et al., 2022). Para contornar a situação agravante do clima, Portugal tem procurado algumas alternativas. Assim foram criadas metas a serem cumpridas pelo país, neste sentido foram criadas duas linhas de atuação, sendo elas a redução dos gases do efeito estufa na atmosfera e aumentar o sequestro de carbono nomeadamente como mitigação, e fazer com que a população do país se adapte às mudanças previstas (APA, 2021).

2.5. Tipos de bioestimulantes

Na agricultura são cada vez mais procuradas formas alternativas para aumento da produtividade nas mais diversas culturas (Silva, 2019). Principalmente com a previsão de aumento da população mundial, é necessário o aumento da produção de alimentos, neste sentido os bioestimulantes tornam-se uma estratégia interessante para a agricultura, sendo também necessário que a produção de alimentos seja segura e sustentável, diminuindo o máximo possível a utilização e dependência dos produtos químicos (Zulfiqar et al., 2020).

Assim os novos bioestimulantes disponíveis no mercado são utilizados para que ocorram aumentos significativos na absorção dos nutrientes pelas plantas possibilitando

que as estas não sofram com os efeitos abióticos, não ocorrendo perdas significativas na produção (Zouari et al., 2020).

Os bioestimulantes agem através de processos naturais e estimulam as plantas para que aumentem a eficiência dos fertilizantes utilizados, garantindo assim melhores rendimentos. O uso de bioestimulantes tornam as plantas menos suscetíveis aos stresses causados durante o ciclo da planta explica European Biostimulants Industry Council (EBIC, 2022). De modo geral os bioestimulantes mesmo que aplicados em pequenas concentrações ainda são capazes de impulsionar alterações bioquímicas significativas nas plantas, como auxiliar na melhoria da floração, desenvolvimento da planta e possibilitar um melhor rendimento (Basile et al., 2020). A diversificação dos bioestimulantes envolve a derivação de alguns compostos biológicos e inorgânicos (Brown & Saa, 2015). Por isso os bioestimulantes são divididos em duas categorias: os de origem microbiana e não microbiana. Os de origem microbiana provêm de fungos micorrízicos arbusculares (AMF) e as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), enquanto que os de origem não microbiana são os bioestimulantes à base de: quitosana (Chi), ácidos húmicos e fúlvicos (HFA), hidrolisados de proteínas animais e vegetais (PHs), fosfitos (Phi), silício (Si) e os extratos de algas marinhas (SWE) (J. Li et al., 2022), sendo este o utilizado para o desenvolvimento do ensaio.

2.5.1. Fungos micorrízicos arbusculares

A presença de micorrizas arbusculares no ambiente leva a uma maior absorção de diversos micronutrientes pelas plantas por ocorrer melhor exploração do solo, realizando-se um aproveitamento notável na absorção de alguns nutrientes poucos móveis como é o caso do fósforo, zinco e cobre (Sorensen et al., 2008). Desta forma, é muito utilizado na área da horticultura pois tem uma grande importância pelo facto de gerar uma maior amplitude de desenvolvimento de hifas que auxiliam na capacidade de absorção de nutrientes (Rouphael et al., 2015).

2.5.2. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

As PGPR são agentes biológicos presentes no solo, e são cada vez mais utilizadas para minimizar os efeitos colaterais causados pelos stresses pelos quais as plantas passam. Neste sentido as PGPR levam a uma certa melhoria no rendimento das plantas que passam

por determinados episódios stressantes (Zarei, 2022). Parte destas bactérias têm capacidades para originar uniões mutualísticas e benéficas com boa parte das plantas, o que possibilita as plantas de terem uma capacidade de tolerar o stresse (Chukwuneme et al., 2020).

2.5.3. Bioestimulantes de quitosana

Esta classe de bioestimulantes são obtidas através da desacetilação da quitina que está presente nos restos de exoesqueleto de camarões e caranguejos e ainda nos resíduos de mariscos. Os bioestimulantes à base de quitosana suscitam melhorias no crescimento das plantas e aumentam a tolerância aos stresses bióticos e abióticos que as plantas sofrem durante seu desenvolvimento (el Amerany et al., 2020).

2.5.4. Bioestimulantes de ácidos húmicos e fúlvicos

Estes bioestimulantes podem ser descritos como um estimulante no crescimento das plantas podendo também melhorar os rendimentos das culturas agrícolas. Porém, em determinadas ocorrências atuam como promotores de crescimento das raízes por meio das auxinas (Schiavon et al., 2010). Assim, substâncias húmicas são parte integrante do solo de forma natural, sendo resultado da decomposição dos sedimentos animais, microbianos e vegetais, em que são separados de acordo com seus pesos moleculares e solubilidade em huminas (du Jardin, 2015).

2.5.5. Bioestimulantes de hidrolisados de proteínas animais e vegetais

Através de hidrólises químicas e enzimáticas de certas proteínas são produzidas as misturas de aminoácidos e peptídeos, estes podem ser de origem vegetal, normalmente são resíduos de colheitas ou podem ser por resíduos animais, obtidos mediante os subprodutos agroindustriais (du Jardin, 2015).

2.5.6. Bioestimulantes Fosfitos

Os compostos de Phi não são utilizados somente como bioestimulantes, pois também são caracterizados pelo seu elevado potencial no controlo de doenças importantes como as causadas pelos *Oomycetes* com particularidade a *Phytophthora* sp., e além disso

também é utilizado nas formulações de alguns fertilizantes fosfatados (Thao & Yamakawa, 2009). Por outro lado, quando utilizado como bioestimulante, o Phi apresenta resultados interessantes evidenciando que melhora a eficácia na absorção e assimilação de nutrientes, proporcionando tolerância aos stresses bióticos e abióticos e melhoria da qualidade das culturas (Han et al., 2021).

2.5.7 Silício

O silício, pertence ao grupo dos bioestimulantes de compostos inorgânicos, tendo utilidades benéficas no desenvolvimento e crescimento de diversas espécies de plantas proporcionando melhores condições às plantas diante do stress biótico e abiótico (Hidalgo-Santiago et al., 2021).

2.5.8. Bioestimulantes de extratos de algas marinhas

Os extratos à base de algas marinhas possuem características diferenciadas nomeadamente por serem algas multicelulares de diferentes cores como castanho, vermelhas e verdes. Este grupo são macroscópicos e têm consideráveis fontes de nutrientes fertilizantes e matéria orgânica. Por possuírem estas características, nos últimos tempos, os extratos de algas, têm ganho espaço na agricultura sendo pulverizados nas folhas das plantas para que contribuam para o aumento do crescimento das plantas, aumentando a tolerância a stresses o que leva a uma melhoria dos resultados produtivos de enumerar culturas (Bulgari et al., 2019).

2.6. Bioestimulantes que podem ser usados na oliveira

O uso de bioestimulantes é uma prática cada vez mais popular, cujo principal objetivo é contornar os mais diversos efeitos causados pelas mudanças climáticas (Goñi et al., 2018). Tem-se tornado numa opção viável na agricultura, pois além das alterações climáticas, as plantas estão suscetíveis a outros stresses bióticos, como ataque de pragas e doenças (Zulfiqar et al., 2020). Vários autores referem os benefícios do uso dos bioestimulantes. Num trabalho publicado por Almadi et al. (2020), verificou-se que o uso de bioestimulantes à base de hidrolisados proteicos (Sinergon 3000) teve resultados interessantes em relação ao crescimento do caule, quantidade de biomassa, produção de frutos por árvores e também eficiência na produção de azeites nas suas avaliações com

oliveiras jovens em vaso e oliveiras jovens no campo. As aplicações em oliveiras adultas resultaram em melhores rendimentos e também em resultados mais satisfatórios nas características dos frutos, ocasionando diretamente efeitos favoráveis na qualidade do azeite proveniente desses frutos (Almadi et al., 2020).

2.7. Atividade antioxidante

A oliveira de acordo com Edziri et al., (2019) tem sido muito investigada devido ao facto do seu fruto, a azeitona, conter muitos compostos bioativos. Contudo, nos últimos anos, as suas folhas têm conquistado espaço nas pesquisas por conterem importantes metabólicos secundários amplamente utilizados para as atividades hipoglicêmicas e hipotensoras. As folhas de oliveira são consideradas um subproduto com elevado potencial, mas que têm sido pouco aproveitadas. Durante todo o ciclo da planta são geradas demasiadas quantidades de folhas, como a colheita dos frutos, processamento dos mesmos e ainda durante as podas (Ammar et al., 2017).

As composições fenólicas quantitativa e qualitativa das folhas da oliveira têm determinadas variações de acordo com as condições que estão expostas, a forma como são armazenadas, as condições climáticas do ambiente onde se desenvolveram, o tamanho dos ramos e um fator muito relevante para essas características é a cultivar da planta (Edziri et al., 2019 El & Karakaya, 2009).

Por outro lado, as folhas da oliveira têm por característica a presença de alguns compostos importantes como os ácidos fenólicos, flavonoides, secoiridóides e glicosídeos secoiridóides quase em todas as partes da planta (Hashmi et al., 2015). Todos estes compostos fenólicos apresentam atributos nutricionais significativos principalmente pela sua função antioxidante capaz de proporcionar uma ação de forma preventiva para algumas doenças (Ammar et al., 2017).

Capítulo III

3. Material e métodos

3.1. Delineamento experimental

O presente trabalho foi realizado num olival tradicional da Terra Quente Transmontana, localizado em Suções no Concelho de Mirandela nas coordenadas 41°30'7.81 N e 7°15'0.77W pertencente ao distrito de Bragança, na região Norte de Portugal e sub-região de Trás-os-Montes. As plantas do olival pertenciam todas à cultivar Cobrançosa e tinham aproximadamente 20 anos com um espaçamento de plantação de 7×7. A parcela seleccionada tinha aproximadamente 1,5ha de área e encontrava-se em regime de sequeiro. Foi feito o delineamento de blocos, onde os fatores analisados foram quatro diferentes bioestimulantes comerciais nas dosagens recomendadas pelos fabricantes.

Foram seleccionadas 100 plantas que foram divididas em 5 diferentes blocos contendo 20 plantas. Cada bloco corresponde a um diferente tratamento (Figura 1).

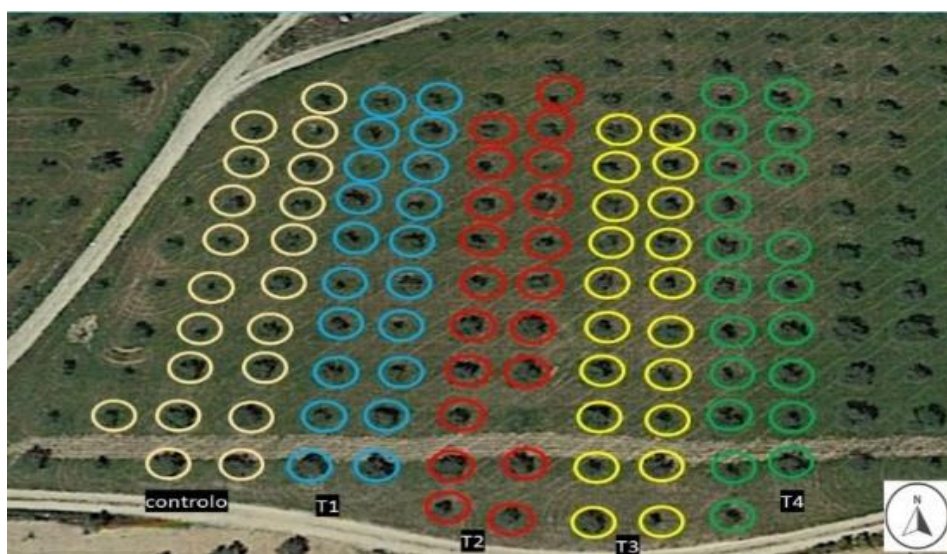


Figura 1. Local e distribuição do ensaio com identificação dos tratamentos (Controlo – sem aplicação de produtos; T1 – e-Dalgin; T2- Fitoalgas green; T3 – Algaman B; T4 – Dalgin MG), (Fonte: Google Earth, 2022).

As denominações dos tratamentos foram as seguintes: Controlo, não foi feita nenhuma aplicação de produtos durante o período de ensaio. T1: foi realizada a aplicação do e-Dalgin à concentração de 0,2%. T2: teve a aplicação de Fitoalgas green à concentração de 0,1%. T3: foi aplicado Algaman B sendo a concentração de 0,2% de produto. T4: Dalgin MG com a concentração de 0,25% do produto. Todos os tratamentos foram diluídos em água. Os produtos utilizados no tratamento 1, 3 e 4 foram fornecidos

pela empresa Grupo Hubel, empresa especializada na prestação de serviços e venda de produtos de engenharia e tecnologia agrônômica. Já o produto usado no tratamento 2 foi fornecido pelo agricultor.

3.2. Ensaio de campo

3.2.1. Bioestimulantes utilizados no ensaio

As principais substâncias dos bioestimulantes são os aminoácidos e hidrolisados de proteínas, substâncias húmicas, inóculos e microrganismos e também os extratos de algas e derivados de plantas (Silva, 2019).

3.2.1.1. Tratamento 1 - e-Dalgin

É um extrato de algas marinhas, com formulação a partir de *Ascophyllum nodosum*, com constituição de micro e macronutrientes, aminoácidos e hidratos de carbono, possui componentes com a função de aumentar rendimentos, dar vigor às culturas melhorando a qualidade da planta, além disso contam com alguns promotores de crescimento naturais (Hubel, 2015).

3.2.1.2. Tratamento 2 - Fitoalgas green

De acordo com a ficha técnica do produto (Tradecorp, 2022), fitoalgas green é um bioestimulante à base de *Ascophyllum nodosum* com elevada ação, o produto conta com o extrato puro da alga, dos benefícios citados: é um produto solúvel, totalmente orgânico, sustentável e natural, induz maior e melhor floração nas plantas, promove maior qualidade na produção, e proporciona à planta uma maior resistência aos ataques de pragas e doenças. É um bioestimulante compatível com muitos fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos. O pH do produto é de 4,5 e sua densidade é de 1,10.

3.2.1.3. Tratamento 3 - Algaman B

Este bioestimulante é a base do extrato da alga marinha *Ecklonia maxima* e boro, age na assimilação e translocação do cálcio, estimula o crescimento de novos tecidos e tem uma função também repelente, para que planta fique protegida dos ataques de insetos. Pode ser utilizado no modo de produção biológica (Agriterria, 2021).

3.2.1.4. Tratamento 4 - Dalgin MG

Na ficha técnica do produto consta que é um bioestimulante à base de *Ascophyllum nodosum*, é um produto que permite aplicação via foliar e tendo uma rápida eficácia. Conta com mais de 60 micro e macronutrientes e também com promotores de crescimento de origem natural. O seu uso é permitido para inúmeras culturas incluindo a cultura da oliveira (Agriterra, 2022).

Os bioestimulantes foram aplicados com as suas respetivas dosagens, com o auxílio de um pulverizador manual (Figura 2).



Figura 2. Aplicação dos bioestimulantes com recurso a pulverizador manual.

A primeira aplicação foi feita a 02 de maio de 2022 e a segunda no dia 15 de junho de 2022, totalizando um intervalo de 44 dias.

3.3. Acompanhamento de campo

3.3.1. Avaliação do crescimento de ramos selecionados

Durante o ensaio foram realizadas três medições no olival. Para cada árvore foram selecionados e identificados quatro ramos (um ramo em cada orientação norte, sul, este e oeste), para avaliar o efeito da aplicação dos diferentes bioestimulantes nos ramos selecionados. Em cada medição, nos ramos selecionados, foram avaliados o comprimento e diâmetro do ramo e o número de folhas (Figura 3). Avaliou-se também o número de cachos e o número de botões florais dos cachos. Todos estes parâmetros foram avaliados no dia 02 de maio de 2022 antes da aplicação dos bioestimulantes. Na segunda medição

que ocorreu no dia 15 de junho de 2022, foi avaliado o comprimento, diâmetro do ramo e número de folhas e avaliou-se também a taxa de vingamento. E na terceira medição ocorrida no dia 01 de outubro de 2022 todos os parâmetros foram analisados com diferença que nessa medição contou-se o número de frutos por ramo.



Figura 3. Avaliação do crescimento de ramos selecionados.

3.3.2. Avaliação dos estados fenológicos

Semanalmente, foi feito o acompanhamento de campo para avaliar a evolução dos diferentes estados fenológicos da planta de acordo com Cantero, (1997), com o objetivo de verificar qual o efeito dos bioestimulantes na fenologia da oliveira. O acompanhamento de campo iniciou-se a partir de 02 de maio de 2022 tendo finalizado no dia 01 de outubro de 2022. Para ajudar no acompanhamento dos diferentes estados fenológicos foi seguida a metodologia proposta segundo Cantero, (1997), a qual segue uma escala alfabética (A-J). Esta escala alfabética classifica os diferentes estados fenológicos sendo que o estado A- Representa o estado invernal, a planta encontra-se em repouso vegetativo; B- Início vegetativo, os gomos terminais das plantas iniciam o seu crescimento; C- Aparecimento de botões florais, os cachos mostram diferentes verticilos florais; D1- Formação da corola, os botões florais demonstram-se inchados, o cálice abre-se. D2- Mudança de cor da corola, os botões florais aumentam de tamanho e há uma mudança na sua coloração, alterando de verde para branca-amarela; E- Estames visíveis, inicia-se a abertura da corola possibilitando a visualização dos estames; F1- Desabrochamento, as primeiras flores desabrocham; F2- Plena Floração, grande parte das flores já estão abertas havendo uma grande emissão de pólen; G- Frutos formados, o ovário fecundado aumenta o seu tamanho e é possível ver o fruto formado, e as pétalas

começam a murchar e a cair; H- Lenhificação do caroço, o fruto já tem metade do tamanho final e oferece resistência ao corte; I- Início da maturação, o fruto tem o seu tamanho normal e a sua cor começa a mudar e finalmente a letra J- Significa a maturação completa do frutos.

3.4. Ensaio de laboratório

3.4.1. Colheita das amostras

Para efeitos de análises laboratoriais foram colhidas em média cinquenta folhas das dez primeiras árvores (das vinte que cada tratamento continha). As folhas colhidas foram colocadas em sacos plásticos com as devidas informações e postas numa arca refrigeradora. A primeira colheita de folhas ocorreu no dia 22 de junho de 2022 sendo 51 dias após a primeira aplicação dos produtos e a segunda colheita ocorreu no dia 01 de outubro de 2022. Já em laboratório, foram depositadas no frigorífico à temperatura de 5°C, para que não ocorresse alterações nas folhas o que poderia induzir resultados discrepantes nas análises.

3.4.2. Biometria das folhas

A biometria das folhas foi realizada mediante aos parâmetros biométricos estabelecidos por (UPOV, 2011), com a utilização de vinte folhas selecionadas aleatoriamente de dez árvores de cada tratamento. A biometria das folhas foi feita, com o auxílio de uma régua e uma balança analítica onde foi avaliado o comprimento e largura de cada folha e as gramas de biomassa de cada uma.



Figura 4. Avaliação dos parâmetros biométricos nas folhas de oliveira.

3.4.3. Análise de clorofilas e carotenoides

A análise de clorofila foi realizada de acordo com a metodologia descrita por (Gholami et al., 2022). Uma massa de 0,1g de folhas cortadas em pequenos pedaços foi dissolvido em 5 ml de acetona (100%) num tubo de Falcon de 15 ml e posteriormente homogeneizado por 1 min. O homogeneizado foi posteriormente colocado durante 10 minutos numa centrífuga com 2500 rpm (figura 5). A absorbância foi medida no sobrenadante a 470nm, 651nm e 664nm por um espectrofotômetro UV-VIS/UV-1280 Shimadzu. Com base nos resultados obtidos das 20 amostras analisadas, foi possível calcularos teores de clorofila e carotenóides.

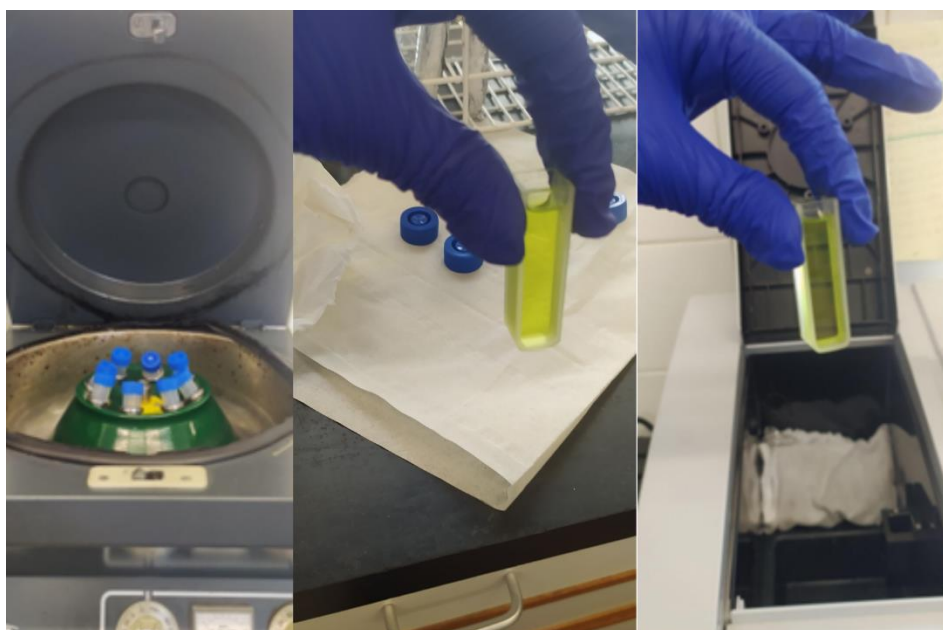


Figura 5. Avaliação do teor de clorofilas e carotenoides das folhas de oliveira.

3.4.4. Atividade antioxidante das folhas de oliveira

Para avaliar a atividade de antioxidantes das folhas de oliveira, foi feito um extrato metanólico para posteriormente determinar a atividade biológica pelos diferentes métodos. Após liofilização das folhas, 1,5g da amostra triturada foi colocada em agitação com 50 mL de metanol durante 1h, tendo sido em seguida filtrada através de papel filtro e diretamente transferida para um balão. Este processo foi repetido mais duas vezes até obter um conteúdo de 150 ml de metanol acrescido na amostra. Para fim de quantificação do extrato foi feita uma concentração de 100 mg de extrato/ml. A amostra foi armazenada num tubo de falcon de 15 ml (figura 6), com a respetiva identificação no frigorífico.



Figura 6. Preparação de extratos metanólicos para avaliação da atividade antioxidante.

3.4.4.1 Determinação do efeito bloqueador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Para a realização do DPPH foram realizadas análises de 20 amostras por tratamento utilizando a metodologia de Hatano et al., (1988) que consiste nos seguintes passos descritos, utilizou-se 300µL da amostra com 2,7mL de solução de DPPH (2,4mg de DPPH em 100mL de metanol), em tubos de ensaio e posteriormente foi realizada a agitação em vortex e deixados em escuro durante o período de uma hora. Ao fim desse período realizou-se a leitura das absorvâncias num espectrofotômetro Genesys™ 10 UV a 517nm. A percentagem de inibição foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} \times 100$$

Onde:

A_{DPPH} representa a absorvância da solução DPPH, ou seja, o branco e A_A considera a absorvância da solução contendo o extrato.

3.4.4.2. Fenóis totais

Para a possibilidade de determinação de fenóis totais do extrato das folhas de oliveira com um total de 20 amostras por tratamento, utilizou-se a metodologia adaptada que é descrita por Singleton et al., (1999). Para tal, misturou-se 1 ml da amostra com 1 ml de Folin-Ciocalteu e procedeu-se a agitação em vórtex, e deixou-se em repouso

durante três minutos. Posteriormente foi acrescentado 1 ml de Na₂CO₃ saturado com 7,5 ml de água destilada e realizada novamente a homogeneização da amostra. Posto isto, a mistura foi colocada no escuro durante 1 hora e 30 minutos. Após esse período, as leituras foram feitas num espectrofotômetro ultravioleta Genesys™ 10 UV a 725 nm. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico/mg de extrato.

3.4.4.3. Poder redutor

A determinação do poder redutor igualmente fazendo uso de 20 amostras por tratamento, foi realizada com base na metodologia descrita por Berker et al., (2007). Para tal, 1 ml da amostra foi incorporada com 2,5 ml de solução tampão com pH em 6,6 e 2,5 ml de ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) a 1%, sendo incubada durante 20 minutos a uma temperatura de 50°C. Após arrefecimento, procedeu-se à adição de 2,5 ml de ácido tricloroacético a 10% e agitação por meio de vórtex. Posteriormente, foi recolhido 2,5 ml de sobrenadante e adicionado com 2,5 ml de água destilada juntamente com 0,5 ml de cloreto de ferro (III). Realizou-se a agitação em vórtex e passados dois minutos, as leituras das absorbâncias foram executadas através do espectrofotômetro ultravioleta a 700 nm. Os resultados são apresentados em mg Trolox/g de amostra.

3.5. Análise estatística

Aplicou-se a análise de variância one-way (one-way ANOVA) para avaliar a existência de efeitos estatisticamente significativos do comportamento dos bioestimulantes no crescimento dos ramos, biometria das folhas, clorofilas e carotenoides e atividade antioxidante. A influência do efeito dos bioestimulantes (ou seja, controlo, T1, T2, T3 e T4) na atividade antioxidante de folhas de oliveira da cv. foi também avaliado usando análise de componentes principais (PCA:3D), uma técnica de reconhecimento de padrão multivariada não supervisionada. As análises estatísticas procederam-se no software livre RStudio (versão 3.6.2).

Capítulo **IV**

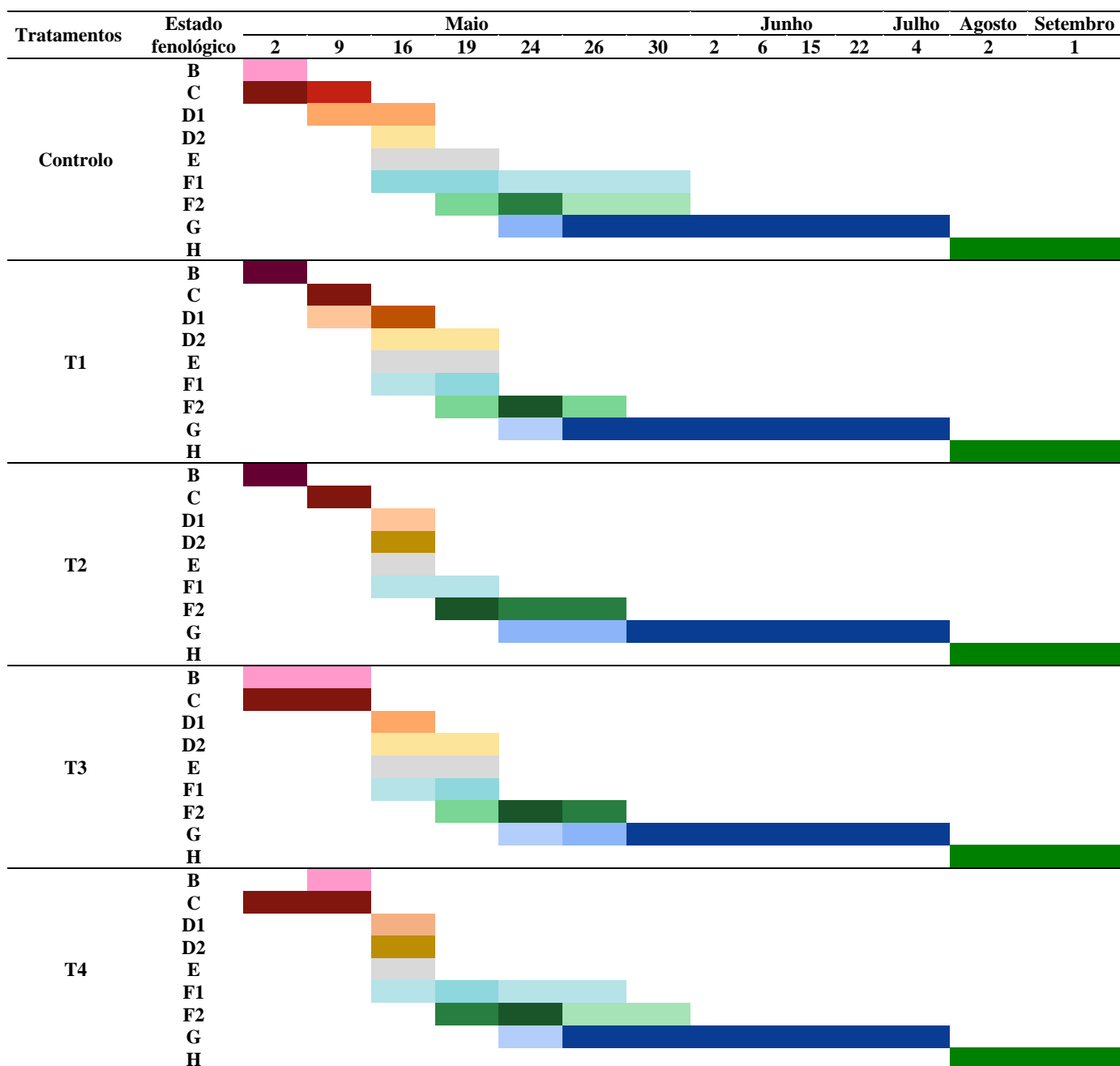
4. Resultados e discussões

4.1. Resultados do ensaio de campo

Durante o período de maio a outubro de 2022, foram feitas semanalmente observações no campo no para avaliar o efeito da aplicação de diferentes bioestimulantes à base de algas no crescimento, floração, vingamento, número de frutos e composição química das folhas de oliveira da cv. Cobrançosa. Os resultados obtidos estão descritos nas secções seguintes.

4.1.1. Estados fenológicos

A coleta de dados sobre a evolução dos estados fenológicos das plantas teve início a partir do dia 02 de maio de 2022 onde foram avaliados semanalmente e registradas as suas evoluções. As avaliações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Cantero (1997), usando como referência a escala alfabética de A-J. Contudo, as avaliações ocorreram apenas até as plantas atingirem o estado fenológico H. De acordo com os resultados obtidos através da Figura 7, pode observar-se que quando se iniciou o acompanhamento de campo, a maior parte das plantas avaliadas estavam em início vegetativo, onde os gomos terminais das plantas iniciavam o crescimento (B). As percentagens variaram de acordo com o tratamento. Observou-se que as plantas submetidas aos tratamentos 1 e 2 que tiveram aplicação dos produtos e-dalgin (1) e Fitoalgas Green (2) apresentaram uma fenologia mais tardia comparativamente aos demais tratamentos e ao controlo. Na observação feita em 09 de maio de 2022, as plantas alteraram a sua fenologia em relação à observação anterior. Nesta observação podemos verificar que o controlo apresentou estados fenológicos mais avançados comparativamente com os tratamentos com os diferentes bioestimulantes. Pode ainda observar-se que o controlo apresentou 43% em estado em D1, uma vez que aqui já era possível observar a formação da corola onde os botões florais se mostram inchados, com o cálice aberto e corola maior que o cálice. Esta mudança nos estados vegetativos do olival só foi possível após o aumento nas temperaturas, o qual possibilitou que a planta iniciasse as suas atividades de desenvolvimento. Relativamente ao estado fenológico F1 - início da floração (F1), esta foi apenas observada a partir do dia 16 de maio de 2022 com as mais divergentes percentagens entre os tratamentos analisados, sendo o tratamento 3 o primeiro tratamento que atingiu o maior valor (29,50%) referente a esse estado.



Escala fenológica	Percentagem de ocorrência			
B	0-25	26-50	51-75	76-100
C	0-25	26-50	51-75	76-100
D1	0-25	26-50	51-75	76-100
D2	0-25	26-50	51-75	76-100
E	0-25	26-50	51-75	76-100
F1	0-25	26-50	51-75	76-100
F2	0-25	26-50	51-75	76-100
G	0-25	26-50	51-75	76-100
H	0-25	26-50	51-75	76-100

Figura 7. Evolução dos estados fenológicos nas plantas com aplicação de diferentes bioestimulantes.

A floração das oliveiras tem grande importância para a produção final das plantas, com capacidade direta de interferir significativamente no rendimento dos frutos, desta forma é considerada uma fase extremamente crítica (Medina-Alonso et al., 2020). A plena floração (F2) do olival teve início a partir do dia 19 de maio de 2022 com percentagens mais expressivas no tratamento 2, tendo sido este o primeiro a atingir a maior percentagem de plantas nesse estado fenológico. A floração plena no olival teve uma duração de 7 dias, exceto o controlo e o tratamento 4, que no 14º dia ainda apresentavam uma pequena percentagem de floração, sendo que o tempo da plena floração é o evento mais avaliado/expressivo em relação à fenologia da cultura da oliveira (Hamze et al., 2022). A floração na oliveira é variável de acordo com o modo de cultivo, sendo que em pomares tradicionais de sequeiro, pomares intensivos e superintensivos variam no sentido da época em que as plantas florescem, tendo ligação especial pois cada modo de cultivo existem em diferentes lugares e também plantas cultivadas em pomares sua floração pode durar até 20 dias, sendo assim, o tempo obtido de floração do pomar onde se encontrava o ensaio está de acordo com o que diz Fernández, (2014).

Contudo, mudanças na evolução dos estados vegetativos das plantas foram ocorrendo no decorrer do mês de maio, com duração entre um estado e outro com pequenos espaços de tempo, porém durante todo o mês de junho até à avaliação do dia 04 de julho de 2022 as plantas permaneceram constantes com frutos já formados, com aumento do seu tamanho podendo ser visualizado. Por outro lado, a evolução do estado fenológico só ocorreu nas duas últimas avaliações, sendo o estado fenológico verificado no olival foi 100% em H onde o fruto já apresentava lenhificação do caroço e o fruto já apresentava metade do seu tamanho final.

4.1.2. Avaliação da aplicação dos bioestimulantes no crescimento da planta

De forma a avaliar o crescimento da planta, foram feitas medições de diferentes parâmetros em ramos selecionados em duas épocas distintas. A primeira medição foi feita no dia 02 de maio de 2022, onde não tinha sido aplicado qualquer bioestimulantes. Nesta medição foi feita a medição do comprimento e diâmetro do ramo bem como do número de folhas, número de cachos e número de botões florais dos cachos. Ainda na segunda medição ocorrida no dia 15 de junho de 2022, foi avaliado o comprimento e diâmetro do ramo, bem como o número de folhas e o número de vingamento por ramo. Na terceira medição que ocorreu após a aplicação de dois tratamentos com bioestimulantes, a 01 de

outubro de 2022, foi avaliado o comprimento e diâmetro do ramo, bem como o número de folhas e o número de frutos por ramo. Foi calculada também a taxa de vingamento. Os resultados obtidos mostram (Tabela 1) que o diâmetro médio de ramo antes da aplicação dos bioestimulantes variou entre 2,22 e 2,72 mm, sendo o menor valor observado em T3 e o maior valor no controlo. Após a aplicação dos bioestimulantes, os valores do diâmetro médios dos ramos variaram de 2,48 e 3,05 mm para os mesmos tratamentos.

Em relação ao comprimento dos ramos selecionados, verificou-se que antes da aplicação de bioestimulantes este variou de 72,78 mm em T4 e 115,30 mm no controlo. Após a aplicação, este variou de 84,43 mm e 128,20 mm nos mesmos tratamentos. Verificou-se também que após a aplicação dos bioestimulantes, as diferenças significativas observadas antes do tratamento foram diluídas após tratamento. Isto mostra claramente que a aplicação dos bioestimulantes promovem maior crescimento do ramo, com exceção do T4, onde foi observado menor crescimento.

Em relação ao número de folhas por ramo, esse variou de 13,53 em T4 e 16,95 em T1 antes a aplicação. Após a realização dos diferentes tratamentos com bioestimulantes, T4 foi aquele onde se observou menor valor médio de folhas por ramo, com 13,57 por outro lado onde se observou maior número de folhas foi no controlo com 18,13. Embora o número de folhas tenha aumentado no controlo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Para o número de frutos vingados pode verificar-se que o tratamento 3 não se encontra com média pelo facto de não apresentar frutos, sendo que para esse parâmetro somente foi encontrado diferenças significativas no tratamento 4, o qual apresentou menor média, de 0,18 por ramo, ficando à frente somente do tratamento 3 em que a média foi de 0. e a maior média encontrada entre os tratamentos foi no 1 que foi de 0,53 frutos vingados.

Tabela 1. Parâmetros vegetativos e reprodutivos dos ramos de oliveira antes e após aplicação de bioestimulantes.

Parâmetros avaliados		Tratamentos					Valor de P
		Controlo	T1	T2	T3	T4	
Diâmetro do ramo (mm)	Antes da aplicação	2,72±0,30a (2,17-3,36)	2,51±0,23b (2,17-2,99)	2,59±0,28ab (2,04-3,19)	2,22±0,19c (1,87-2,75)	2,38±0,29bc (1,85-3,01)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	3,05±0,19a (2,71-3,40)	2,60±0,24bc (2,21-2,99)	2,66±0,26bc (2,10-3,20)	2,48±0,36c (2,03-3,46)	2,73±0,25b (2,25-3,15)	
Comprimento do ramo (mm)	Antes da aplicação	115,30±19,41a (65,25-143,75)	96,20±26,50b (57,50-154,00)	95,54±15,92b (69,00-118,50)	104,56±22,75ab (71,75-145,25)	72,28±14,75c (43,00-106,00)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	128,20±16,94a (98,25-160,25)	115,76±24,18a (76,50-166,25)	111,49±22,42a (74,00-150,00)	119,70±22,45a (84,75-168,25)	84,43±16,61b (56,25-126,75)	
Nº de folhas	Antes da aplicação	16,80±1,80a (14,50-18,38)	16,95±3,01a (12,38-20,88)	15,70±1,61a (13,75-17,17)	16,83±2,94a (13,25-21,13)	13,53±2,12b (10,38-16,88)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	18,13±2,63a (15,63-19,50)	15,76±3,08ab (11,13-18,38)	16,04±1,87a (13,63-18,63)	16,83±3,54a (13,63-22,46)	13,57±2,13b (11,50-17,88)	
Nº de cachos	Antes da aplicação	7,89±1,57a (6,25-9,00)	7,28±2,10ab (5,75-11,00)	7,75±1,13a (6,08-9,38)	8,39±2,36a (5,88-11,25)	5,94±1,45b (4,04-8,13)	0,0005
	Após 2ª aplicação	-	-	-	-	-	
Nº de frutos	Antes da aplicação	-	-	-	-	-	0,426
	Após 2ª aplicação	1,13±0,75a (0,38-2,13)	1,09±0,60a (0,50-2,25)	1,22±0,49a (0,80-1,75)	0±0,85a (0,38-2,00)	0,82±0,65a (0,25-1,88)	
Nº de botões florais	Antes da aplicação	13,78±1,28a (11,56-16,)	14,12±1,28a (12,69-15,56)	14,53±1,98a (11,69=16,75)	14,32±1,28a (13,00-15,13)	14,05±1,56a (12,06-15,88)	0,579
	Após 2ª aplicação	-	-	-	-	-	
Nº de frutos vingados	Antes da aplicação	-	-	-	-	-	<0,0001
	Após 2ª aplicação	0,48±0,22a (0,19-0,75)	0,53±0,19a (0,38-0,75)	0,50±0,23a (0,38-0,63)	0±0,36a (0,19-0,88)	0,18±0,15b (0,06-0,38)	

Análise de variância (valor de p indicado). Letras iguais nas linhas não indicam diferença significativa das médias de acordo com o teste de Tukey (p <0,05).

4.1.3. Taxa de crescimento do diâmetro do ramo

Comparando os valores obtidos antes e após aplicação dos bioestimulantes, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8). Os valores obtidos diferem dos resultados que foram encontrados por Almadi et al., (2020), que avaliaram oliveiras jovens em vaso, onde as plantas tratadas com bioestimulantes tiveram maior crescimento do diâmetro do caule desde o início até o fim do ensaio realizado, e essas diferenças de crescimento entre as plantas tratadas e as plantas controle aumentaram constantemente até o encerramento do ensaio.

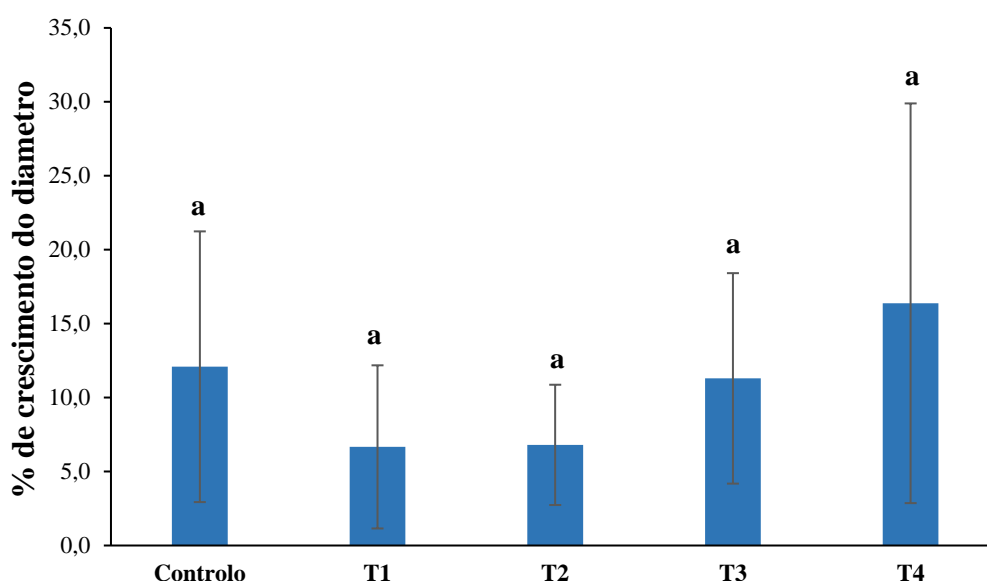


Figura 8. Percentagem de crescimento do diâmetro do ramo durante a realização do ensaio.

4.1.4. Taxa de crescimento do ramo

Para o crescimento do ramo (Figura 9) foram encontradas diferenças significativas entre alguns tratamentos. O controlo e T1 diferenciaram-se entre si significativamente com valores que variam entre os 9,09 e 22,77% respetivamente. Nos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas entre si e em comparação com o controlo e o T1. Os resultados obtidos são diferentes dos encontrados por Oliari et al. (2013) onde quando nenhum dos tratamentos com a aplicação de bioestimulante a base de algas *Ascophyllum nodosum* se diferenciaram entre si, na cultura da ameixeira.

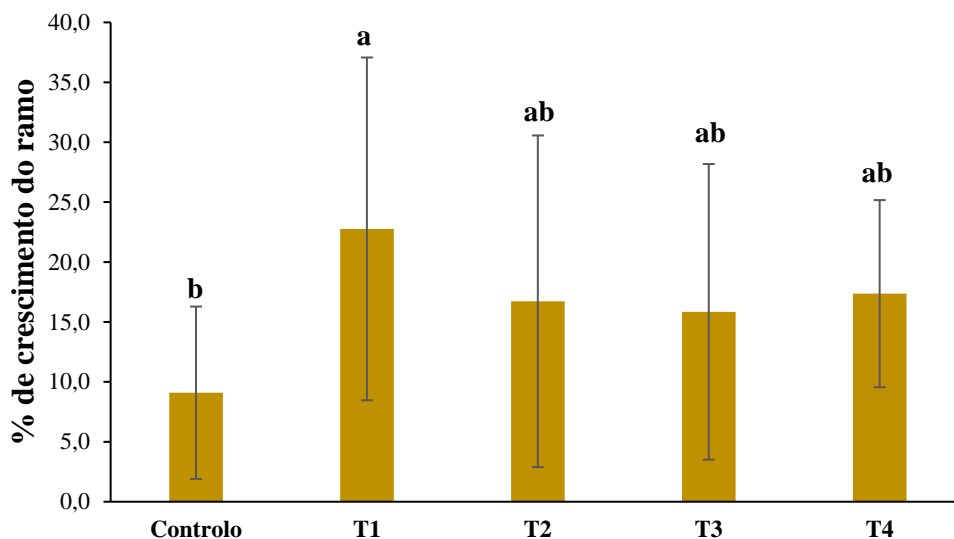


Figura 9. Percentagem do crescimento do ramo.

4.2. Resultados do ensaio em laboratório

4.2.1. Biometria das folhas

No que diz respeito aos parâmetros biométricos analisados nas folhas (Tabela 2), os resultados mostram que a aplicação de bioestimulantes exerceu alguma alteração na folha. Relativamente ao peso, observou-se que este variou entre 0,15g em T2 e 0,19g em T1 antes do tratamento. Após o tratamento, verificou-se que os valores variaram entre 0,21g e 0,23g, contudo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Estes resultados mostram que os bioestimulantes contribuíram para a folha atingir o seu peso máximo, ação não observada antes da aplicação dos bioestimulantes. Em relação ao comprimento das folhas, os resultados obtidos mostram que este variou de 59,89mm em T3 e 66,30mm em T1 antes da aplicação dos diferentes tratamentos. Após a aplicação, verificou-se que este variou entre 66,70mm e 69,27mm, contudo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Mais uma vez, observa-se que os bioestimulantes têm uma ação positiva no crescimento das folhas.

Nas avaliações da largura da folha observou-se que a mesma variou de 8,92mm em T2 e 9,58mm em T1 antes da aplicação. Após a aplicação dos diferentes bioestimulantes, os valores variaram de 9,95mm e 10,76mm não sendo observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

Tabela 2. Parâmetros biométricos avaliados nas folhas de oliveira com diferentes tratamentos (média±desvio padrão).

Parâmetros biométricos das folhas		Tratamentos					Valor de P
		Controlo	T1	T2	T3	T4	
Peso das folhas (g)	Antes da aplicação	0,16 ±0,02b (0,13-0,19)	0,19±0,03a (0,15-0,24)	0,15±0,01b (0,13-0,17)	0,16±0,02b (0,14-0,20)	0,16±0,01b (0,14-0,19)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	0,22±0,01a (0,20-0,26)	0,23±0,02a (0,21-0,28)	0,22±0,02a (0,18-0,27)	0,21±0,02a (0,18-0,24)	0,21±0,03a (0,15-0,24)	0,0786
Comprimento das folhas (mm)	Antes da aplicação	61,09±2,91b (55,00-65,40)	66,30±4,09a (57,10-72,90)	60,53±2,07b (56,90-64,60)	59,89±4,51b (49,20-65,30)	62,27±2,69b (56,80-65,70)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	67,54±2,26a (63,80-72,90)	68,91±3,68a (61,50-75,10)	69,27±2,44a (63,90-76,00)	66,70±2,75a (62,40-71,10)	67,40±3,58a (58,00-71,80)	0,0454
Largura das folhas (mm)	Antes da aplicação	9,10±0,58ab (7,90-10,10)	9,58±0,58a (8,50-10,50)	8,92±0,62b (8,10-10,30)	9,25±0,68ab (8,10-10,40)	9,14±0,58ab (8,00-10,10)	<0,0001
	Após 2ª aplicação	10,19±0,52a (9,20-11,00)	10,76±2,13a (9,30-19,60)	10,12±0,66a (9,40-11,80)	9,95±0,79a (8,70-11,30)	10,22±0,58a (8,70-11,20)	0,203

Foi aplicada a análise de variância (valor de p indicado) onde as letras iguais nas linhas não indicam diferença significativa das médias de acordo com o teste de Tukey (p <0,05).

4.2.2. Clorofila e carotenóides

As clorofila e carotenóides são os principais pigmentos que existem na folha em quantidades variadas. Esta varia de acordo com vários fatores tais como o sistema de condução, a fertilidade, a rega, a idade da planta ou ainda podem variar caso a planta passe por estresses abióticos (Ferret et al., 2008). A clorofila é o pigmento com grande importancia para as folhas pois é responsável pela absorção da radiação fotossintética que é refletida na atividade fotoquímica do fotossistema II, nesse sentido a clorofila absorve a energia luminosa e a transforma em energia química, mas essas absorções tem variações de acordo com a espécie da planta, sua fisiologia e morfologia (Zhuang et al., 2021).

Na determinação das clorofilas (Figura 10a), observou-se que a aplicação de bioestimulantes influencia a sua composição, sendo que os teores de clorofila variaram de 8,68 µg/mL a 11,48 µg/mL. Foram observadas diferenças significativas na aplicação dos diferentes bioestimulantes, como no T3, o qual apresentou maior teor de clorofila e nos tratamentos T2 e T4, que apresentaram os menores teores. Na determinação da clorofila após a segunda aplicação de bioestimulantes, o mesmo não foi observado. O teor de clorofila variou entre 14,96 µg/mL e 18,83 µg/mL, contudo não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com diferentes tipos de bioestimulantes.

As concentrações dos pigmentos de clorofila observados podem ter ocorrido por influência da idade que as folhas apresentavam na segunda avaliação, não sendo somente aumentos devido à aplicação dos bioestimulantes (Brahmi et al., 2012). Em estudo realizado por Taskos et al., (2019), que aplicaram um bioestimulante a base de extrato de *Ascophyllum nodosum*, juntamente com a fertilização utilizada a base de N, verificou que os teores de clorofila da copa das videiras utilizadas no ensaio foram claramente mais expressivos.

Na determinação dos carotenoides (Figura 10b), verificou-se que a aplicação de bioestimulantes não exerce qualquer efeito sobre estes. Na primeira aplicação foi possível observar que o seu teor variou entre 0,75 µg/mL a 0,91 µg/mL, enquanto que na segunda aplicação o teor variou de 0,81 µg/mL a 1,16 µg/mL. Em ambas aplicações não foram observadas diferenças significativas com a aplicação dos diferentes bioestimulantes à base de algas.

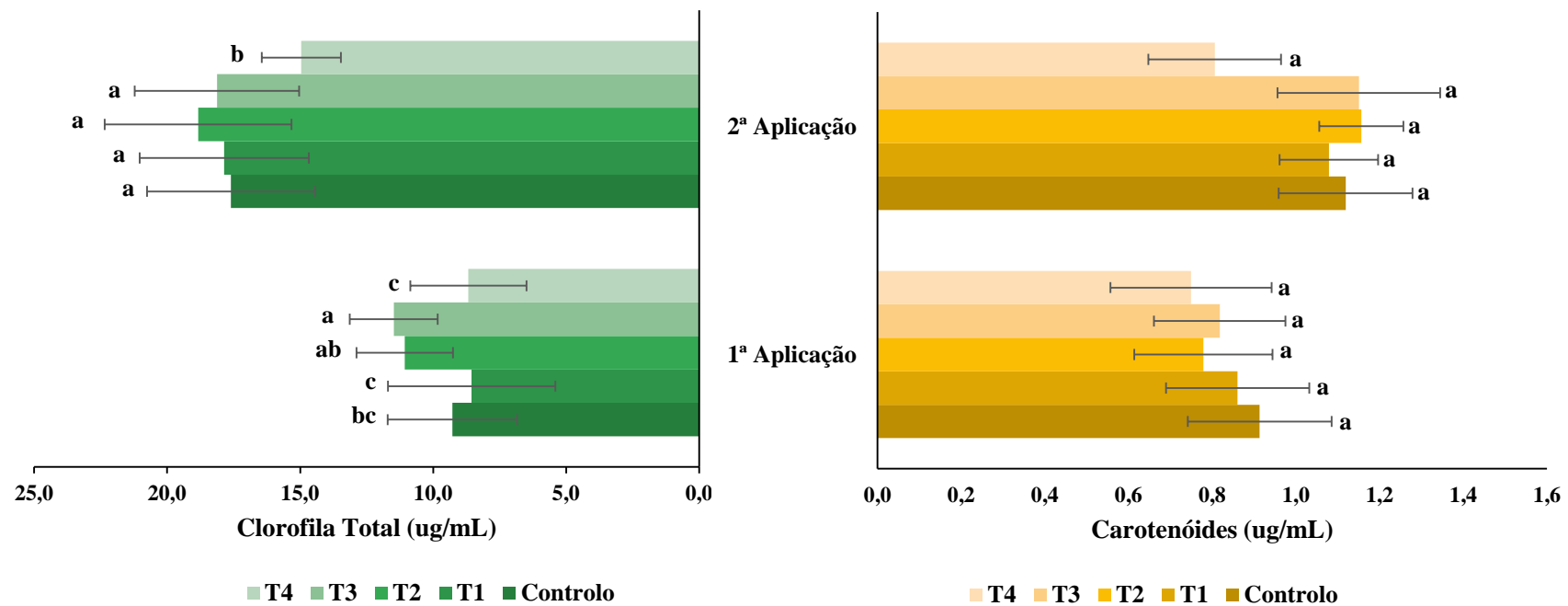


Figura 10. (a) Valores médios de clorofila total (µg/ml) e (b) carotenoides (µg/ml) nos dois momentos de coleta das folhas.

4.1.3. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

O efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, permite medir a percentagem de sequestro de radicais livres presentes nas folhas. Quanto maior for o seu valor, maior será a capacidade antioxidante da matriz. No caso da figura 11, pode-se observar a percentagem de inibição nos diferentes tratamentos. Foi avaliado a atividade antioxidante em dois momentos distintos aos quinze dias após primeira aplicação de bioestimulantes e quinze dias após o reforço, com a segunda aplicação de bioestimulantes. Os resultados obtidos, mostram que a percentagem de inibição variou entre 48,41% a 55,78 %. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com principal destaque para o controlo, T2 e T4 que apresentaram os valores mais elevados. Já o contrário foi observado em T1, onde foram observados os valores mais baixos de atividade antioxidante.

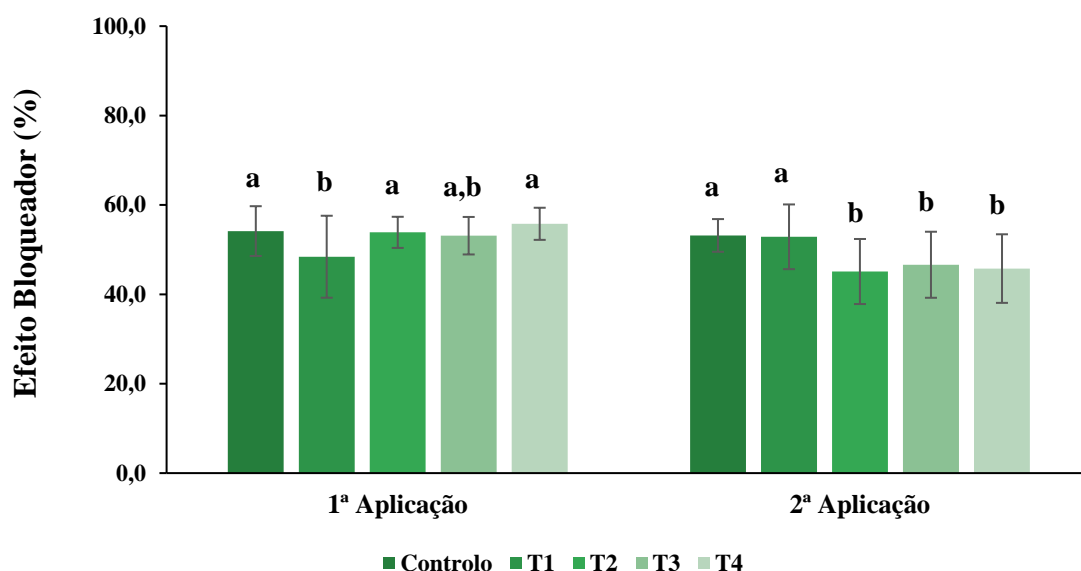


Figura 11. Valores medidos do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (%) obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.

Nos resultados obtidos após a segunda aplicação, observa-se que ocorreram mudanças quando comparadas com a primeira aplicação. Pode-se observar que o controlo e o T1 foram os tratamentos que apresentaram maior atividade antioxidante, com valores médios de 53,17% e 52,87%, respetivamente. Já os tratamentos 2,3 e 4 foram aqueles que apresentaram menor atividade antioxidante com valores de 45,10%, 46,62% e 45,76%, respetivamente, sem diferenças significativas entre si. Assim pode-se observar que existem diferenças significativas com a aplicação dos diferentes bioestimulantes. Contudo, os valores alteram com o tempo de aplicação, isto pode ser resultado da biossíntese de metabólitos secundários produzidos pelas oliveiras, provocados por

estresses abióticos (Brito et al., 2019), pois resultados diferentes foram encontrados por Graziani et al., (2022) em que as plantas que foram tratadas com bioestimulantes com misturas de algas marinhas tiveram valores superiores de antioxidantes quando comparadas com as plantas que não receberam o tratamento. Então a possível explicação para tal fato foi que as plantas passaram por um stress hídrico severo ocorrente devido provocado pela falta de precipitação e temperaturas acima do normal que foram registradas na região (IPMA, 2022).

4.2.4. Fenóis totais

Os valores de fenóis totais estão representados na Figura 12. Relativamente aos resultados obtidos nas folhas após a primeira aplicação de bioestimulantes, verificou-se que estes variaram de 32,52 mg ácido Gal/g de amostra e 42,27 mg ácido Gal/g de amostra.

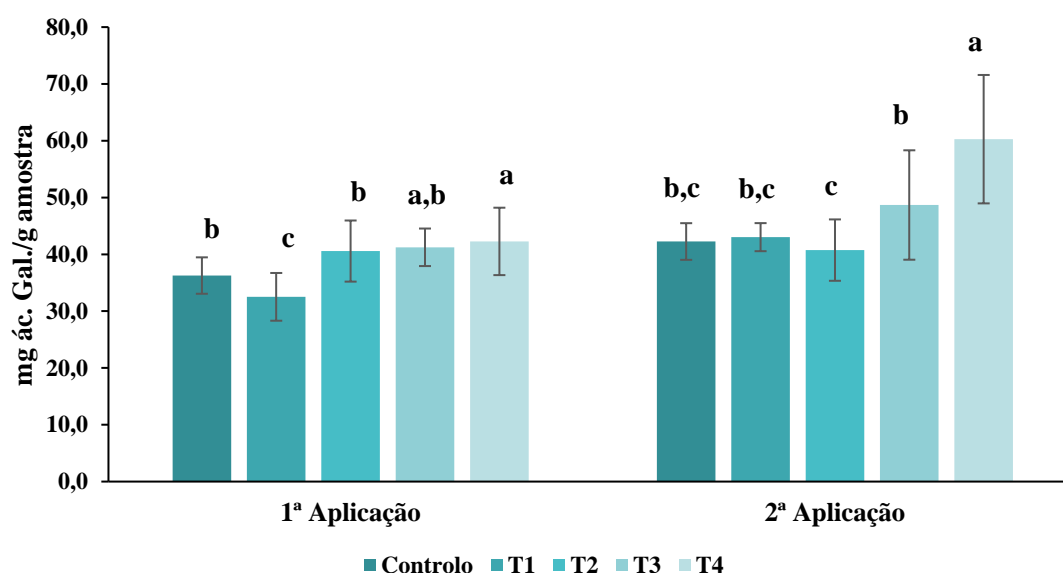


Figura 12. Teor de Fenóis Totais expressos em mg ác. Gal/g de amostra obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.

Na primeira avaliação foram observadas diferenças significativas, com principal destaque para o T4 como o tratamento que apresentou o maior teor de fenóis totais seguido do T3 e T2, enquanto o T1 apresentou o menor teor de fenóis totais. Nos resultados obtidos nas folhas de oliveira após a segunda aplicação, verificou-se que os valores de fenóis totais variaram de 40,75 mg ácido Gal/g de amostra a 60,27 mg ácido Gal/g de amostra. Pode-se observar que existem diferenças significativas, com principal destaque para o T4, que foi mais uma vez o tratamento que apresentou maior teor de

fenóis totais, onde ocorreu um aumento expressivo, principalmente se comparado ao T2 que foi o tratamento com menor valor em fenóis totais obtido. A aplicação de Dalgin MG (T4) na concentração de 0,25%, mostrou melhor desempenho nesse parâmetro de avaliação. Tais valores podem ser explicados pelo fato de que certos bioestimulantes articulam e modificam os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas de oliveira (Graziani et al., 2022). Outros estudos relacionados com a aplicação de bioestimulantes em ervas utilizadas como especiarias, mostram um aumento de fenóis totais (Pichyangkura & Chadchawan, 2015).

4.2.5. Poder redutor

Relativamente ao poder redutor (Figura 13), os resultados obtidos são contraditórios aos valores obtidos nos fenóis totais. Pode se observar que os valores de poder redutor na primeira aplicação variaram de 125,46 mg Trolox/g amostra a 139,34 mg Trolox/g amostra.

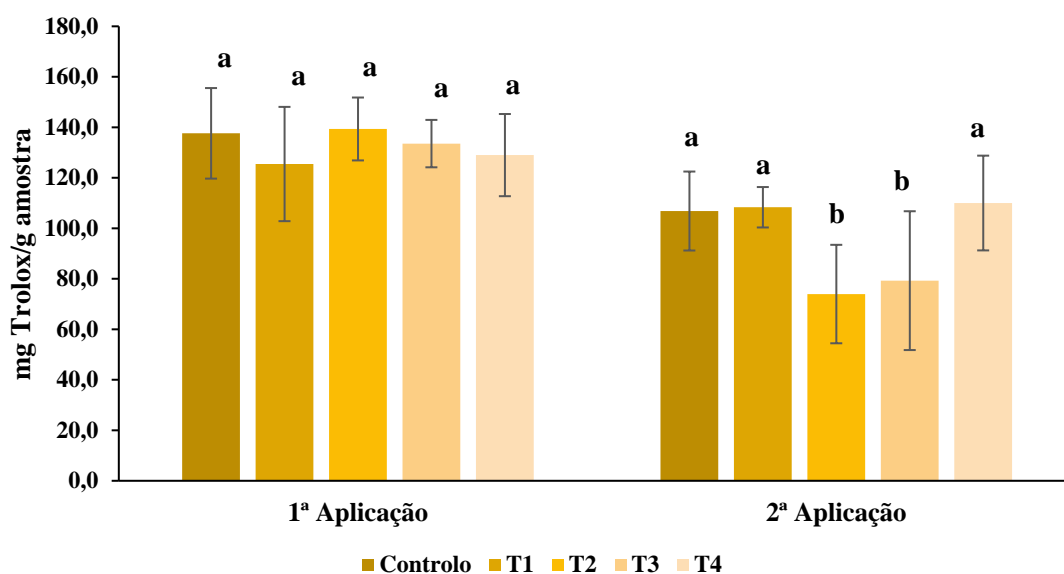


Figura 13. Valores médios de absorvância a 700 nm determinados no ensaio do poder redutor expressos em mg Trolox/g amostra. obtidos nas folhas de oliveira após aplicação em duas datas distintas dos diferentes bioestimulantes.

Contudo não foram observadas diferenças significativas nos diferentes tratamentos após a primeira aplicação de bioestimulantes. O mesmo não foi observado após a segunda aplicação. Na figura 14, pode se observar que nesta aplicação, os valores de poder redutor variaram de 73,96 mg Trolox/g amostra a 110,01 mg Trolox/g amostra, mostrando um abaixamento na atividade antioxidante de todos os tratamentos. Foram observadas diferenças significativas com principal destaque para o controlo, T1 e T4, os

quais apresentaram maior teor de antioxidantes. Já o tratamento T2 e T3 foram aqueles que apresentaram menor teor de antioxidantes. Como pode ser observado na Figura 14, a atividade antioxidante medida pelos métodos de DPPH, Fenóis totais e Poder redutor, permitiram a diferenciação não supervisionada de acordo com a aplicação de diferentes bioestimulantes.

A visualização do gráfico PCA-3D, cujos 3 primeiros componentes principais (PCs) explicaram 99,9% da variabilidade dos dados), mostra claramente que o T4 se distingue facilmente dos tratamentos restantes. Entre os diferentes métodos, os fenóis totais foram os que mais contribuíram para a classificação não supervisionada dos bioestimulantes. O método de DPPH foi o mais relevante para a diferenciação dos tratamentos controlo e T2.

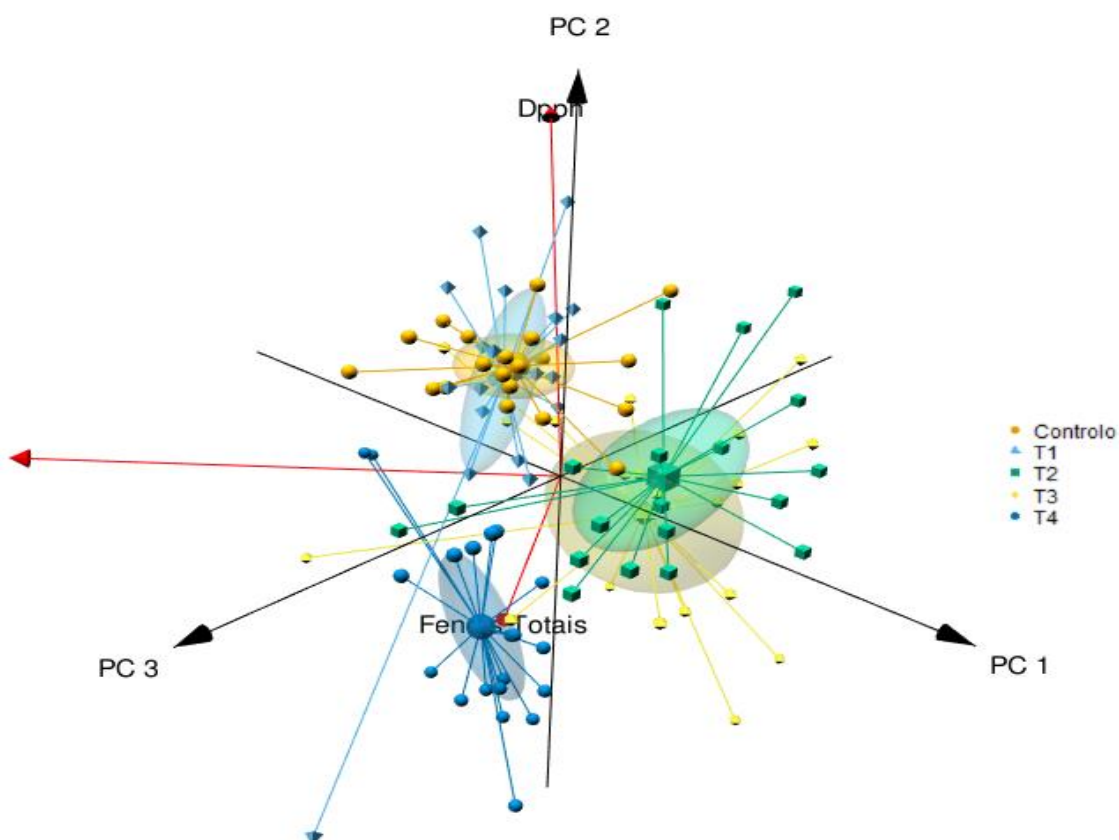


Figura 14. Análise de componentes principais (PC1: 58,5%, PC2: 28,5% e PC3: 12,9%) com base na atividade antioxidante após segunda aplicação (DPPH, Fenóis totais e Poder redutor): gráfico 3D mostrando o reconhecimento padrão não supervisionado de acordo com o tratamento com diferentes bioestimulantes (Controlo, T1, T2, T3 e T4) com base na atividade antioxidante de folhas de oliveira da cv. Cobrançosa.

Capítulo **V**

5. Conclusões

Referente à análise dos estados fenológicos verificou-se que a aplicação de bioestimulantes atrasa ligeiramente a fenologia da planta, resultados semelhantes aos descritos em literaturas anteriores. Nos parâmetros biométricos dos ramos escolhidos para a realização das medições antes e pós aplicação dos produtos, verificou-se que a aplicação dos bioestimulantes promoveu um ligeiro crescimento do ramo e da folha.

Ainda nas avaliações laboratoriais, referente as clorofilas e carotenóides diante dos valores apresentados não foi possível a visualização de grandes diferenças entre os tratamentos, apenas diferenças de valores entre os momentos das avaliações. A mesma situação ocorreu nos valores medidos do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, quantificados em percentagens, pequenas diferenças foram notadas somente entre o período de avaliação entre os tratamentos não foram notadas expressivas diferenças.

Nos teores de fenóis totais foi possível a verificação de um salto significativo nos valores do tratamento 4, onde após a segunda aplicação se destacou significativamente em comparação aos demais tratamentos, e dessa forma é possível concluir ocorreu a intervenção da aplicação do produto dalgin Mg utilizado no tratamento 4, assim podemos concluir que a aplicação de bioestimulantes favorece a formação destes compostos.

Na avaliação do poder redutor os resultados encontrados sofreram visíveis diminuições da primeira avaliação para a segunda, podendo ser resultados dos metabólitos secundários por algum efeito que foi provocado por stresses abióticos. Os resultados gerados são preliminares, serão necessários mais anos de ensaio e estudos com outras cultivares no sentido de perceber melhor o efeito dos bioestimulantes no crescimento e composição da planta.

Capítulo VI

6. Referências

- Agriterra. (2021, May). *Algaman B (ficha de produto)*. [https://www.agriterra.pt/Artigos/346755-Algaman-\(ficha-de-produto\).html](https://www.agriterra.pt/Artigos/346755-Algaman-(ficha-de-produto).html)
- Agriterra. (2022, July). *Dalgin Mg (ficha de produto)*. [https://www.agriterra.pt/Artigos/346760-Dalgin-Mg-\(ficha-de-produto\).html](https://www.agriterra.pt/Artigos/346760-Dalgin-Mg-(ficha-de-produto).html)
- Almadi, L., Paoletti, A., Cinosi, N., Daher, E., Rosati, A., di Vaio, C., & Famiani, F. (2020). A Biostimulant Based on Protein Hydrolysates Promotes the Growth of Young Olive Trees. *Agriculture*, *10*(12), 618. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120618>
- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Henao, A., & Lana, M. A. (2015). Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(3), 869–890. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0285-2>
- Ammar, S., Kelebek, H., Zribi, A., Abichou, M., Selli, S., & Bouaziz, M. (2017). LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Tunisian extra-virgin olive oils: Effect of olive leaves addition on chemical composition. *Food Research International*, *100*, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.001>
- Antón-Herrero, R., García-Delgado, C., Antón-Herrero, G., Mayans, B., Delgado-Moreno, L., & Eymar, E. (2023). Design of a hydroponic test to evaluate the biostimulant potential of new organic and organomineral products. *Scientia Horticulturae*, *310*, 111753. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111753>
- APA. Agência Portuguesa do ambiente. (2021). *Clima*. <https://apambiente.pt/clima>
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., & Rallo, L. (2017). *El cultivo del olivo* (D. Barranco, R. Fernández-Escobar, & L. Rallo, Eds.; 7ª). Úbeda, I. H.
- Basile, B., Roupheal, Y., Colla, G., Soppelsa, S., & Andreotti, C. (2020). Appraisal of emerging crop management opportunities in fruit trees, grapevines and berry crops facilitated by the application of biostimulants. *Scientia Horticulturae*, *267*, 109330. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109330>

- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., & Hammami, M. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.023>
- Brito, C., Dinis, L.-T., Ferreira, H., Coutinho, J., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. M. (2019). Salicylic acid increases drought adaptability of young olive trees by changes on redox status and ionome. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.011>
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671>
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 9(6), 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Cantero, F. de A. (1997). *Enfermedades y Plagas del olivo* (Riquelme y Vargas, Ed.; 3^a).
- Chukwuneme, C. F., Babalola, O. O., Kutu, F. R., & Ojuederie, O. B. (2020). Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*, 15(1), 93–105. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1752833>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- EBIC. (2022). *Bioestimulantes de Plantas Contribuem Para Uma Agricultura Inteligente Para o Clima*.

- Edziri, H., Jaziri, R., Chehab, H., Verschaeve, L., Flamini, G., Boujnah, D., Hammami, M., Aouni, M., & Mastouri, M. (2019). A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon*, 5(5), e01604. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01604>
- el Amerany, F., Rhazi, M., Wahbi, S., Taourirte, M., & Meddich, A. (2020). The effect of chitosan, arbuscular mycorrhizal fungi, and compost applied individually or in combination on growth, nutrient uptake, and stem anatomy of tomato. *Scientia Horticulturae*, 261, 109015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109015>
- El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>
- Ferdous, J., Hussain, S. S., & Shi, B. (2015). Role of micro <scp>RNA</scp> s in plant drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 293–305. <https://doi.org/10.1111/pbi.12318>
- Feret, J.-B., François, C., Asner, G. P., Gitelson, A. A., Martin, R. E., Bidel, L. P. R., Ustin, S. L., le Maire, G., & Jacquemoud, S. (2008). PROSPECT-4 and 5: Advances in the leaf optical properties model separating photosynthetic pigments. *Remote Sensing of Environment*, 112(6), 3030–3043. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.02.012>
- Fernández, J.-E. (2014). Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 158–179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.003>
- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1–2), 335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>
- Fraga, H., Pinto, J. G., & Santos, J. A. (2020). Olive tree irrigation as a climate change adaptation measure in Alentejo, Portugal. *Agricultural Water Management*, 237, 106193. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106193>

- Ganga Rao, B., Umamaheswara Rao, P., Sambasiva Rao, E., Mallikarjuna Rao, T., & Praneeth. D, V. S. (2011). Studies on Phytochemical Constituents, Quantification of Total Phenolic, Alkaloid Content and In-vitro Anti-oxidant Activity of *Thespesia populnea* Seeds. *Free Radicals and Antioxidants*, *1*(4), 56–61. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.9>
- García-García, A. L., García-Machado, F. J., Borges, A. A., Morales-Sierra, S., Boto, A., & Jiménez-Arias, D. (2020). Pure Organic Active Compounds Against Abiotic Stress: A Biostimulant Overview. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575829>
- García-Ruiz, J. M., López-Moreno, J. I., Vicente-Serrano, S. M., Lasanta-Martínez, T., & Beguería, S. (2011). Mediterranean water resources in a global change scenario. *Earth-Science Reviews*, *105*(3–4), 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2011.01.006>
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(3), 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
- Gholami, R., Fahadi Hoveizeh, N., Zahedi, S. M., Gholami, H., & Carillo, P. (2022). Melatonin alleviates the adverse effects of water stress in adult olive cultivars (*Olea europea* cv. Sevillana & Roughani) in field condition. *Agricultural Water Management*, *269*, 107681. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107681>
- Goñi, O., Quille, P., & O’Connell, S. (2018). *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants and their role in enhancing tolerance to drought stress in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *126*, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.024>
- Graziani, G., Cirillo, A., Giannini, P., Conti, S., El-Nakhel, C., Roupheal, Y., Ritieni, A., & di Vaio, C. (2022). Biostimulants Improve Plant Growth and Bioactive Compounds of Young Olive Trees under Abiotic Stress Conditions. *Agriculture*, *12*(2), 227. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020227>

- Hamze, L. M., Trentacoste, E. R., Searles, P. S., & Rousseaux, M. C. (2022). Spring reproductive and vegetative phenology of olive (*Olea europaea* L.) cultivars at different air temperatures along a latitudinal-altitudinal gradient in Argentina. *Scientia Horticulturae*, 304, 111327. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111327>
- Han, X., Xi, Y., Zhang, Z., Mohammadi, M. A., Joshi, J., Borza, T., & Wang-Pruski, G. (2021). Effects of phosphite as a plant biostimulant on metabolism and stress response for better plant performance in *Solanum tuberosum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, 111873. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111873>
- Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2015/541591>
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090–2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>
- Hidalgo-Santiago, L., Navarro-León, E., López-Moreno, F. J., Arjó, G., González, L. M., Ruiz, J. M., & Blasco, B. (2021). The application of the silicon-based biostimulant Codasil® offset water deficit of lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, 285, 110177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110177>
- Hubel. (2015, March). *Ficha Técnica de Produto: e-Dalgin*. https://hubel.pt/uploads/product_documents/e-dalgin_-_Ficha_Tecnica_iaBmAES.pdf
- INE, I. N. de E. (2022a). *Anuário Estatístico de Portugal 2021*. [url:https://www.ine.pt/xurl/pub/6174083](https://www.ine.pt/xurl/pub/6174083)
- INE, I. N. de E. (2022b). *Contas Económicas da Agricultura 1ª Estimativa*. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=541080993&DESTAQUESmodo=2

- IPMA, & Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2022, September). *Seca Meteorológica Ano hidrológico 2011/2022*.
<https://www.ipma.pt/pt/pesquisa/searchresult.jsp>
- Kamali, B., Lorite, I. J., Webber, H. A., Rezaei, E. E., Gabaldon-Leal, C., Nendel, C., Siebert, S., Ramirez-Cuesta, J. M., Ewert, F., & Ojeda, J. J. (2022). Uncertainty in climate change impact studies for irrigated maize cropping systems in southern Spain. *Scientific Reports*, *12*(1), 4049.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-08056-9>
- Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, *529*(7584), 84–87.
<https://doi.org/10.1038/nature16467>
- Li, J., van Gerrewey, T., & Geelen, D. (2022). A Meta-Analysis of Biostimulant Yield Effectiveness in Field Trials. *Frontiers in Plant Science*, *13*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836702>
- Li, N., Li, Y., Biswas, A., Wang, J., Dong, H., Chen, J., Liu, C., & Fan, X. (2021). Impact of climate change and crop management on cotton phenology based on statistical analysis in the main-cotton-planting areas of China. *Journal of Cleaner Production*, *298*, 126750.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126750>
- Lopes, J. I., Arrobas, M., Raimundo, S., Gonçalves, A., Brito, C., Martins, S., Pinto, L., Moutinho-Pereira, J., Correia, C. M., & Rodrigues, M. Â. (2022). Photosynthesis, Yield, Nutrient Availability and Soil Properties after Biochar, Zeolites or Mycorrhizal Inoculum Application to a Mature Rainfed Olive Orchard. *Agriculture*, *12*(2), 171. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020171>
- Makilutilla, M. (2017). *Efeito da gestão do solo no estado nutricional e produtividade das árvores em olival*. Instituto Politécnico de Bragança.
- Martínez, J. B. (2017). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE VARIEDADES ITALIANAS DE OLIVO (Olea europaea L.) INSTALADAS EN EL JARDÍN DE INTRODUCCIÓN DE INIA LAS BRUJAS*. Universidade de La República .

- Martins, M., Gomes, A. F. G., da Silva, É. M., da Silva, D. F., Peche, P. M., Magalhães, T. A., & Pio, R. (2022). Effects of anatomical structures and phenolic compound deposition on the rooting of olive cuttings. *Rhizosphere*, 23, 100557. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100557>
- Medina-Alonso, M. G., Navas, J. F., Cabezas, J. M., Weiland, C. M., Ríos-Mesa, D., Lorite, I. J., León, L., & la Rosa, R. de. (2020). Differences on flowering phenology under Mediterranean and Subtropical environments for two representative olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104239>
- Melo-Abreu, J. P. de, Afonso Do Paço, T., Castro Ribeiro, A., Geraldés Barba, N., Cordeiro, A. M., Neves, A., Abreu, I., Oliveira, H., Oliveira, C., & Mexia, A. (2011). *IMPACTOS DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS NA AGRICULTURA PORTUGUESA*.
- Monteiro, A. M. (1999). *Património Natural Transmontano: A Oliveira* (José Azevedo, Ed.; única).
- Oliari, I. C. R., Hennerich, J. E., Sato, A. J., Faria, C. M. D. R., & Botelho, R. V. (2013). Extrato de algas na produção e qualidade de ameixeiras cv. Pluma 7. *Resumos Do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia*, 1–4. <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/14332/9018>
- Pereira, L. S. (2011). Challenges on water resources management when searching for sustainable adaptation to climate change focusing agriculture. In *European Water* (Vol. 34). <https://www.researchgate.net/publication/292875830>
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034>
- Rallo, L., Torreño, P., Vargas, A., & Alvarado, J. (1994). DORMANCY AND ALTERNATE BEARING IN OLIVE. *Acta Horticulturae*, 356, 127–136. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.28>

- Rodrigues, N., Casal, S., Pinho, T., Peres, A. M., Bento, A., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2019). Ancient olive trees as a source of olive oils rich in phenolic compounds. *Food Chemistry*, 276, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.106>
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., Pascale, S. de, Bonini, P., & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>
- Santacruz-García, A. C., Senilliani, M. G., Gómez, A. T., Ewens, M., Yonny, M. E., Villalba, G. F., & Nazareno, M. A. (2022). Biostimulants as forest protection agents: Do these products have an effect against abiotic stress on a forest native species? Aspects to elucidate their action mechanisms. *Forest Ecology and Management*, 522, 120446. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120446>
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010). High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 662–669. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9790-6>
- Silva, T. da. (2019). *USO DE BIORREGULADORES E BIOESTIMULANTES NA AGRICULTURA*.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent (pp. 152–178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sorensen, J. N., Larsen, J., & Jakobsen, I. (2008). Pre-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases early nutrient concentration and growth of field-grown leeks under high productivity conditions. *Plant and Soil*, 307(1–2), 135–147. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9591-7>
- Taskos, D., Stamatiadis, S., Yvin, J.-C., & Jamois, F. (2019). Effects of an *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. extract on grapevine yield and berry

- composition of a Merlot vineyard. *Scientia Horticulturae*, 250, 27–32.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.030>
- Tekaya, M., El-Gharbi, S., Mechri, B., Chehab, H., Bchir, A., Chraief, I., Ayachi, M., Boujnah, D., Attia, F., & Hammami, M. (2016). Improving performance of olive trees by the enhancement of key physiological parameters of olive leaves in response to foliar fertilization. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 101.
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2122-x>
- Thao, H. T. B., & Yamakawa, T. (2009). Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Science and Plant Nutrition*, 55(2), 228–234.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00365.x>
- The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2022). (2022). *The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) is the United Nations body for assessing the science related to climate change*.
<https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg2/>
- Tradecorp. (2022). *Fitalgas Green*.
- UPOV. (2011). *Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability*. . International Union for the Protection of New Varieties of Plants. .
https://www.upov.int/upov_collection/en/
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Yang, L.-N., Ren, M., & Zhan, J. (2022). Modeling plant diseases under climate change: evolutionary perspectives. *Trends in Plant Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.12.011>
- Zarei, T. (2022). Balancing water deficit stress with plant growth-promoting rhizobacteria: A case study in maize. *Rhizosphere*, 24, 100621.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100621>
- ZERO. (2022, February 28). *ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS: RELATÓRIO CONFIRMA PORTUGAL COMO PAÍS A NECESSITAR DE FORTES MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO CLIMÁTICA*. <https://zero.org/alteracoes->

climaticas-relatorio-confirma-portugal-como-pais-a-necessitar-de-fortes-medidas-de-adaptacao-climatica/

- Zhuang, J., Zhou, L., Wang, Y., & Chi, Y. (2021). Nitrogen allocation regulates the relationship between maximum carboxylation rate and chlorophyll content along the vertical gradient of subtropical forest canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 307, 108512. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108512>
- Zouari, I., Mechri, B., Attia, F., Cheraief, I., Mguidiche, A., Laabidi, F., Hammami, M., Martins, M., Ribeiro, H., & Aïachi-Mezghani, M. (2020). Mineral and carbohydrates changes in leaves and roots of olive trees receiving biostimulants and foliar fertilizers. *South African Journal of Botany*, 135, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.032>
- Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H., & Munné-Bosch, S. (2020). An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Science*, 295, 110194. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110194>