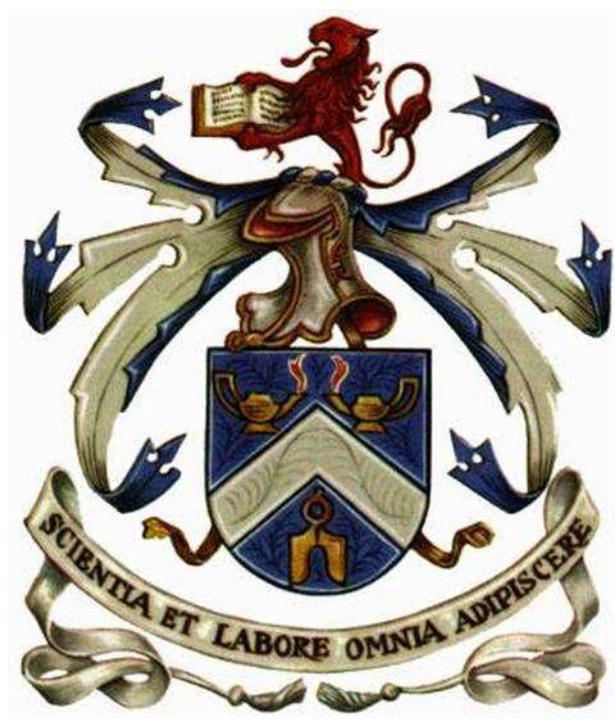


Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da fertilização potássica e magnésiana em
parâmetros de qualidade da cereja (*Prunus avium* L.) de
Resende**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Juliana Andreia Carvalho Nunes



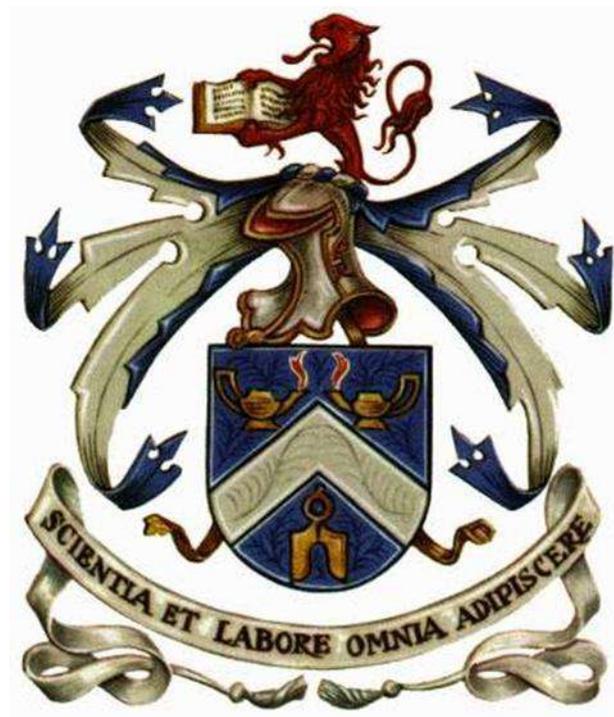
Vila Real, 2020

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da fertilização potássica e magnésiana em
parâmetros de qualidade da cereja (*Prunus avium* L.) de
Resende**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Juliana Andreia Carvalho Nunes



Vila Real, 2020

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da fertilização potássica e magnésiana em
parâmetros de qualidade da cereja (*Prunus avium* L.) de
Resende**

Dissertação de mestrado em Bioquímica

Juliana Andreia Carvalho Nunes

Orientadora: Professora Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves
Macedo

Coorientador: Professor Doutor João Ricardo Pinto Magalhães de Sousa

Júri

Vila Real, 2020

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. As opiniões apresentadas no mesmo, são de total responsabilidade do autor.

Agradecimentos

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e ao seu magnífico Reitor, Professor Doutor Fontainhas Fernandes, por permitir o acesso aos vários laboratórios, que tornaram possível a realização desta dissertação.

À Direção do 2º ciclo de estudos em Bioquímica pela aceitação deste projeto de dissertação e pelo auxílio prestado durante toda a realização do mesmo.

À minha orientadora de dissertação de mestrado, Professora Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves por toda a sua ajuda, orientação, paciência, por acreditar em mim e por todas as palavras de incentivo dadas.

Ao meu coorientador de dissertação de mestrado, Professor Doutor João Ricardo Pinto de Magalhães de Sousa, por todo o apoio, dedicação, paciência e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Às técnicas de laboratório, D. Rosa Carvalho, Dra. Helena Ferreira e D. Ana Fraga por toda a disponibilidade e ajuda durante o trabalho laboratorial.

À Vânia Silva, à Sandra Pereira, à Sílvia Afonso e ao Ivo Oliveira que me ajudaram e orientaram imenso no trabalho de laboratório.

À Sílvia Rocha, das pessoas que nunca me deixou desistir e que sempre esteve lá para me ouvir mesmo nos momentos mais difíceis.

Por último, mas não menos importante, um grande agradecimento à minha família, que fizeram com que tudo isto fosse possível e que me tornaram na pessoa que sou hoje. Ao meu irmão Carlos, que ouvia sempre os meus desabafos, aos meus pais Carlos e Teresa, que sempre acreditaram em mim e me deram palavras de muita força.

A todos o meu muito obrigada!

Resumo

A cerejeira (*Prunus avium* L.) tem um elevado interesse económico, quer pelo uso da sua madeira, quer pelo uso do seu fruto, a cereja. Esta pode ser consumida em fresco ou usada no fabrico de compotas, sumos, iogurtes, entre outros. Esta espécie é nativa da Europa, Anatólia, norte de África e oeste da Ásia. Em Portugal, a cerejeira está distribuída a Norte do rio Tejo, mais predominantemente nas regiões da Beira Interior e de Trás-os-Montes. A cereja tem inúmeros efeitos benéficos para a saúde, devido às suas propriedades nutricionais, relacionado em parte com a presença de compostos fenólicos, com características antioxidantes, cujos teores estão dependentes de fatores climáticos e práticas agronómicas, como a fertilização. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da fertilização potássica (K) e magnésiana (Mg) na qualidade da cereja da cultivar Burlat. Para tal, foi instalado um ensaio experimental num pomar de cerejeiras com sete anos de idade, localizado em Resende, distrito de Viseu. Os tratamentos foram distribuídos por blocos, com dois níveis de aplicação foliar para cada um dos nutrientes estudados, K e Mg, num total de 4 modalidades. Para os nutrientes em estudo foram realizadas duas aplicações, relativas a duas concentrações, na forma do produto comercial ENERMAX[®], nas doses de 50 g hL⁻¹ (T₁) e 100 g hL⁻¹ (T₂), e KITPLANT Mg[®], nas doses de 125 g hL⁻¹ (T₃) e 250 g hL⁻¹ (T₄), para K e Mg, respetivamente. Para cada dose foram consideradas três repetições, com 5 árvores por repetição, num total de 15 árvores por tratamento ou dose. Um tratamento controlo (T₀) foi, também, considerado e no qual foram incluídas, igualmente, três repetições com 5 árvores por repetição. Neste último tratamento, ao contrário do procedimento normal, foram aplicados todos os nutrientes na forma dos produtos usando, para o efeito, a dose máxima de referência indicada pelo fabricante. Nas folhas, os resultados evidenciaram efeitos significativos nos teores de macro e micronutrientes. Para os macronutrientes, os maiores efeitos foram observados no caso do Ca, com a fertilização magnésiana a promover valores mais elevados deste elemento que a adubação potássica. No caso dos micronutrientes, os efeitos mais notados foram observados para o Zn e Mn, com a aplicação de Mg e K a promover uma diminuição e aumento dos respetivos teores. No fruto, foram analisados os seguintes parâmetros: peso, calibre, cor, firmeza, sólidos solúveis totais, pH, acidez titulável, perfil e composição fenólica e a sua atividade antioxidante. Os resultados obtidos demonstram que as cerejas tratadas com K apresentaram frutos mais pesados,

de maior calibre e com área das células da hipoderme e do parênquima de reserva de maiores dimensões, com implicação positiva na firmeza do fruto. O teor em sólidos solúveis totais aumentou em cerejas com aplicação de K e Mg. A aplicação de KITPLANT Mg[®] em dose baixa promoveu um aumento da cor e teor de polifenóis, facto que se refletiu numa atividade antioxidante mais elevada e, conseqüentemente, num aumento da qualidade e benefícios nutricionais.

Palavras-chave: *Prunus avium* L., atividade antioxidante, compostos fenólicos, cv. Burlat, qualidade do fruto.

Abstract

The cherry tree (*Prunus avium* L.) has a huge valuable economic interest, due to its wood and fruit usage, the cherry. This can be consumed on fresh or used in the manufacture of jams, juices, yogurts, among others. This species is native from Europe, Anatolia, North Africa and West Asia. In Portugal, the cherry tree is distributed by the North of the Tejo River, most predominantly in the regions of Beira Interior and Trás-os-Montes. Cherry has amount of beneficial health effects, due to its nutritional properties, related to the presence of phenolic compounds with antioxidant characteristics, witch dependents on climatic factors and agronomic practices such as fertilization. So the current study has as its main goal to go thought the effect of potassium (K) and magnesium (Mg) fertilization on the quality of Burlat cherry. For that, an experimental trial was installed in a seven-year-old cherry orchard located in Resende, Viseu district. The treatments were distributed in blocks, with two levels of foliar application for each of the studied nutrients, K and Mg, in a total of 4 modalities. For the nutrients under study, two applications were made, concerning two concentrations, in the form of the commercial product ENERMAX[®], at the doses of 50 g hL⁻¹ (T₁) and 100 g hL⁻¹ (T₂), and KITPLANT Mg[®], at doses of 125 g hL⁻¹ (T₃) and 250 g hL⁻¹ (T₄), for K and Mg, respectively. For each one, three replicates were considered, with 5 trees per repetition, in a total of 15 trees per treatment or dose. A control treatment (T₀) was considered as well, it was repeated 3 times with 5 trees per repetition. In the last case, unlike the normal procedure, all nutrients were applied in the form of products, using for the effect, the maximum reference dose indicated by the manufacturer. In the leaves, the results showed significant effects on the macro and micronutrient contents. For macronutrients, the greatest effects were observed in the case of Ca, with Mg fertilization promoting higher values of this element than potassium fertilization. In the case of micronutrients, the most noticeable effects were observed for Zn and Mn, with the application of Mg and K promoting a decrease and increase of their contents. In fruit, were analysed some parameters: weight, size, colour, firmness, total soluble solids, pH, titratable acidity, profile and phenolic composition and its antioxidant activity. The results show that the cherries treated with K presented heavier fruits, larger size and higher area of hypodermis and storage parenchyma, with positive implication in fruit firmness. The total soluble solids content increased in cherries with K and Mg application. The application of low dose

of KITPLANT Mg[®] promoted an increase in colour and polyphenol content, which reflected in a higher antioxidant activity and, consequently, an increase in quality and nutritional benefits.

Key words: *Prunus avium* L., antioxidant activity, phenolic compounds, cv. Burlat, fruit quality

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract.....	viii
Índice de figuras	xii
Índice de quadros.....	xiv
Símbolos e abreviaturas.....	xv
Introdução geral e objetivos	1
1. Revisão bibliográfica ou estado de arte	3
1.1. Caracterização da espécie <i>Prunus avium</i> L.	3
1.2. Distribuição geográfica	6
1.3. Aplicações e interesse económico	7
1.4. Atributos de qualidade da cereja	8
1.4.1. Peso, calibre, cor e acidez.....	8
1.4.2. Composição bioquímica	9
1.4.2.1. Compostos fenólicos	10
1.5. Aspetos nutritivos e nutricionais da cereja	13
1.5.1. Efeito do magnésio (Mg) e do potássio (K) nas plantas.....	14
2. Material e métodos	17
2.1. Ensaio experimental	17
2.2. Delineamento experimental.....	18
2.3. Análises de solos	19
2.4. Análise de material vegetal	22
2.5. Determinação de parâmetros biométricos, físicos e químicos	25
2.5.1. Biometria do fruto	25
2.5.2. Análises histológicas	25
2.5.3. Cor, força de rutura da epiderme e firmeza.....	27
2.5.4. Índice refratométrico	27
2.5.5. pH.....	28
2.5.6. Acidez titulável.....	28
2.5.7. Determinação do teor em compostos fenólicos.....	29
2.5.7.1. Teor em (poli)fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	29
2.5.7.2. Determinação do teor em orto-difenóis	30
2.5.7.3. Determinação do teor em flavonoides	31
2.5.7.4. Determinação do teor em antocianinas totais	32
2.5.7.5. Quantificação de fenólicos por HPLC-Diode Array (DAD).....	32
2.5.8. Determinação da atividade antioxidante total	32
2.5.8.1. Atividade antioxidante total pelo método ABTS ^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzoatiazolina-6-sulfónico)).....	32
2.5.8.2. Aprisionamento de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	34
2.5.8.3. Capacidade redutora do Fe ³⁺ em Fe ²⁺ (FRAP).....	34
2.5.9. Processo de extração.....	35
2.6. Análise estatística	36
3. Resultados e discussão	37

3.1. Teores foliares	37
3.1.1. Macronutrientes principais	37
3.1.2. Macronutrientes secundários	39
3.1.3. Micronutrientes.....	40
3.2. Caracterização biométrica dos frutos	42
3.3. Caracterização histológica do fruto	43
3.4. Cor, força de rutura da epiderme e firmeza	45
3.5. Teor em sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável.....	47
3.6. Determinação do teor em compostos fenólicos.....	48
3.7. Determinação da atividade antioxidante total	52
4. Conclusões e perspetivas de trabalho futuro	54
5. Referências bibliográficas	56

Índice de figuras

Figura 1. Árvore da espécie <i>Prunus avium</i> L. A. em floração, B. em plena produção	3
Figura 2. Aspeto do tronco de <i>Prunus avium</i> L.....	4
Figura 3. Flores hermafroditas de <i>Prunus avium</i> L.....	4
Figura 4. Drupas de <i>Prunus avium</i> L.....	5
Figura 5. Distribuição geográfica da espécie <i>Prunus avium</i> L. (A) na Europa e (B) Portugal Continental.....	6
Figura 6. Principais produtores mundiais de cereja doce.....	7
Figura 7. Evolução na produção de cereja entre 2007 e 2017.....	7
Figura 8. Cultivar de cerejeira Burlat.....	9
Figura 9. Estrutura química do orto-difenol.....	11
Figura 10. Estrutura química geral dos flavonoides.....	11
Figura 11. Estrutura química geral das antocianinas.....	12
Figura 12. Antocianinas predominantes na cereja doce.....	12
Figura 13. Fotografia aérea do pomar de cerejeiras do Sr. Armindo Barbosa, Resende.....	17
Figura 14. Aspeto do pomar em estudo.....	18
Figura 15. Determinação biométrica do fruto.....	25
Figura 16. Secção dos frutos em bloco, após inclusão em parafina.....	26
Figura 17. Refratómetro digital (PR-101, Atago, Japão).....	27
Figura 18. Medidor de pH Jenway.....	28
Figura 19. Triturador automático Schott Easy Tritoline.....	28
Figura 20. Aspeto da microplaca na determinação dos (poli)fenóis totais.....	29
Figura 21. Aspeto da microplaca na determinação dos orto-difenóis.....	30
Figura 22. Aspeto da microplaca na determinação dos flavonoides.....	31
Figura 23. Reação de redução pelo método do ABTS na presença de um antioxidante.....	33
Figura 24. Aspeto da microplaca na determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS.....	33
Figura 25. Reação de redução pelo método do DPPH na presença de um antioxidante.....	34
Figura 26. Aspeto da microplaca na determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.....	35
Figura 27. Processo de extração da amostra.....	36
Figura 28. Teores de macronutrientes principais (g kg^{-1}) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados.....	37
Figura 29. Teores de macronutrientes secundários (g kg^{-1}) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados.....	39
Figura 30. Corte histológico da cereja. A – T1, Fruto com dose baixa de K; B – T2, Fruto com dose alta de K; C – T3, Fruto com dose baixa de Mg; D – T4, Fruto com dose alta de Mg; E – Controlo.....	44

Figura 31a. Perfil fenólico da cereja doce obtido por HPLC-DAD. Cromatogramas obtidos a 280 e 370 nm.....	50
Figura 31b. Perfil fenólico da cereja doce obtido por HPLC-DAD. Cromatogramas obtidos a 320 e 520 nm	51

Índice de quadros

Quadro 1. Valor nutricional da cereja (100 g de matéria edível).....	9
Quadro 2. Teores dos nutrientes presentes nas cerejas em mg por 100g de porção comestível e teores dos nutrientes presentes nas folhas de cerejeira.....	13
Quadro 3. Produtos comerciais e respectivas doses ou concentrações (g hL ⁻¹), (mL hL ⁻¹) aplicadas nos tratamentos em estudo.....	19
Quadro 4. Resultados da análise ao solo do pomar de cerejeiras.....	19
Quadro 5. Teores de macro- (g kg ⁻¹) e micronutrientes (mg kg ⁻¹) em folhas de cerejeira colhidas a 28 de junho de 2018	23
Quadro 6. Teores de macro- (g kg ⁻¹) e micronutrientes (mg kg ⁻¹) presentes na polpa e película da cereja colhida em 21 de junho de 2018.....	24
Quadro 7. Teores de micronutrientes (mg kg ⁻¹) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados	40
Quadro 8. Parâmetros biométricos dos frutos, para os tratamentos de fertilização foliar estudados	43
Quadro 9. Parâmetros histológicos dos frutos, para os tratamentos de fertilização foliar estudados.....	45
Quadro 10. Parâmetros cromáticos do fruto para os tratamentos de fertilização foliar estudados	46
Quadro 11. Força de rutura da epiderme (N) e firmeza (N mm ⁻¹), para a cereja doce nos diferentes tratamentos	46
Quadro 12. Teor em sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável na cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados	47
Quadro 13. Análise da composição fenólica no fruto nos diferentes tratamentos utilizados.....	49
Quadro 14A. Teor de compostos fenólicos HPLC-DAD para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados	52
Quadro 14B. Teor de compostos fenólicos HPLC-DAD para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados	52
Quadro 15. Atividade antioxidante pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP, para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados.....	53

Símbolos e Abreviaturas

a*. Coordenada cromática a*

AT. Acidez titulável

b*. Coordenada cromática b*

C. Croma

CE. Condutividade elétrica

cvs. Cultivares

DAD. *Diode Array Detector*

HPLC. Cromatografia líquida de alta eficiência

ICP. Inductively Coupled Plasma

L. Luminosidade

NIRD. Near infrared detector

PS. Peso seco

SST. Sólidos solúveis totais

T₀. Tratamento controlo

T₁. Tratamento com ENERMAX na dose 50 g hL⁻¹

T₂. Tratamento com ENERMAX na dose 100 g hL⁻¹

T₃. Tratamento com KITPLANT Mg na dose 125 g hL⁻¹

T₄. Tratamento com KITPLANT Mg na dose 250 g hL⁻¹

UV. Ultravioleta

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

A cerejeira doce (*Prunus avium* L.) é uma espécie nativa da Europa, Anatólia, norte de África e oeste da Ásia (De Candolle, 1883 cit. Gonçalves, 2006). A cerejeira é cultivada em mais de 40 países, quer do Hemisfério Norte (a Península da Escandinávia, a 61° N, é o extremo em termos de produção), quer do Hemisfério Sul (até 46–47° S na Patagónia, Chile e Argentina e até 45–46° S em Otago, na Nova Zelândia) (Predieri *et al.*, 2003). Os principais produtores são os EUA, Turquia, Irão e Chile. Em Portugal, os pomares de cerejeiras situam-se, essencialmente, a norte do rio Tejo, com exceção da região de Portalegre (Serra de S. Mamede), sendo na maioria provenientes de enxertias em *Prunus avium* (GPPAA, 2006). A zona de maior expressão é a região da Cova da Beira (Covilhã, Fundão e Belmonte) com cerca de 55% da produção nacional. A zona do Douro Sul (Resende, Lamego e Penajóia) e Alfândega da Fé, em Trás-os-Montes, perfazem cerca de 40%. Os restantes 5% distribuem-se por Proença-a-Nova, Ferreira do Zêzere e Portalegre. Cerca de 40% da cereja destina-se às grandes superfícies de venda em fresco, 45% aos mercados abastecedores dos grandes centros urbanos e a restante tem como destino a indústria de transformação. Para além da sua madeira que é utilizada na indústria de mobiliário, o seu fruto é utilizado no fabrico de sumos, tortas, licores, iogurtes, compotas e chocolates, mas também pode ser consumido em fresco. A cereja doce é muito valorizada pelos consumidores devido ao seu sabor, cor, valor nutricional e efeitos benéficos na saúde (Crisosto *et al.*, 2006). De facto, a cereja doce é rica em potássio (K), fibra, ácido ascórbico, carotenoides (USDA, 2017), em antocianinas e outros compostos fenólicos (Gonçalves *et al.*, 2004), daí apresentar inúmeras propriedades benéficas para o consumidor, incluindo propriedades antioxidantes, antialérgicas, anticarcinogénicas, anti-microbianas, anti-mutagénicas e anti-inflamatórias (Kim *et al.*, 2005). Nos últimos anos têm surgido diferentes cultivares de cerejeira, umas mais temporãs e outras mais tardias, com o intuito de aumentar a qualidade e a disponibilidade do fruto para o consumidor. Os atributos de qualidade da cereja mais importantes para o consumidor são o calibre, a cor, a firmeza, a doçura, a acidez, o sabor e o aroma (Crisosto *et al.*, 2006). No entanto, a qualidade da cereja depende de vários fatores, nomeadamente das condições edafoclimáticas do local de produção, operações culturais e estado de maturação. A fertilização mineral em K, magnésio (Mg), fósforo (P), cálcio (Ca), entre outros, é, assim, essencial para a obtenção de um fruto com qualidade.

Este trabalho tem como objetivo principal caracterizar os efeitos da aplicação foliar de dois elementos minerais, o K e o Mg, na qualidade do fruto da cultivar de cerejeira doce (*Prunus avium* L.) Burlat. Para tal, serão determinados parâmetros biométricos, nomeadamente o peso e dimensões do fruto, bem como a respetiva análise histológica. Serão ainda realizadas análises de rotina aos frutos que incluem a medição dos parâmetros cromáticos, firmeza, índice refratométrico, pH e acidez titulável. Serão, também, avaliados os efeitos da adubação potássica e magnésiana na composição bioquímica do fruto, nomeadamente, nos teores de (poli)fenóis, orto-difenóis, flavonoides e antocianinas e na atividade antioxidante total, assim como o teor em macro e micronutrientes nas folhas e frutos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA OU ESTADO DE ARTE

1.1. Caracterização da espécie *Prunus avium* L.

A espécie *Prunus avium* (Figura 1), vulgarmente conhecida como cerejeira-brava, cerejeira ou cerdeira, pertence ao Reino Plantae, divisão Magnoliophyta, ordem Rosales, família Rosaceae, e ao género *Prunus* (Crespi *et al.*, 2005). Esta família apesar de incluir cerca de 3000 espécies desde ervas a árvores, todas elas apresentam características comuns, como é o caso das folhas estipuladas e a presença do hipanto (estrutural floral) (Glimn-Lacy e Kaufman, 2006).



Figura 1. Árvore da espécie *Prunus avium* L.: A – em floração; B – em plena produção.

Quanto às características morfológicas desta árvore pode-se referir que chega a atingir uma altura compreendida entre 15 e 32 m (Welk *et al.*, 2016), possui uma copa ampla, tronco direito com a presença de anéis transversais, casca lisa e de cor cinzenta acastanhada, como se pode observar na Figura 2 (Loureiro *et al.*, 2003). É uma árvore que apresenta elevado porte e tronco lenhoso (Quadrado *et al.*, 2014). Esta espécie tem preferência por solos férteis, ligeiramente ácidos e de texturas ligeiras a médias (Sauget, 1965).



Figura 2. Aspeto do tronco de *Prunus avium* L.

As folhas da cerejeira revelam várias tonalidades, de acordo com a estação, apresentando cor verde-claro na primavera, que muda para verde-escuro no Verão, e para amarelo ou vermelho-alaranjado no Outono. As suas flores (Figura 3) são brancas, hermafroditas e com simetria radial (Welk *et al.*, 2016). Esta espécie é caracterizada por ser entomófila, ou seja, a sua polinização é realizada através de insetos, em particular por abelhas, sendo necessário temperaturas de 13-14° C e uma velocidade do vento inferior a 4-5 m s⁻¹ (Serradilla *et al.*, 2016). A polinização é afetada principalmente pela temperatura e pelo vento (Rodrigues *et al.*, 2012). No caso da cultivar Burlat, objeto de estudo neste trabalho, é polinizada pela variedade Stark Hardy Giant (Ferreira, 2015).



Figura 3. Flores hermafroditas de *Prunus avium* L.

A cerejeira possui drupas unicarpelares desenvolvendo um tecido carnudo por fora, característico do fruto (Strasburger *et al.*, 2002). O fruto é revestido pelo exocarpo, protegido pela cutícula e epiderme que normalmente acumula antocianinas, pigmentos geralmente de cor vermelha (Figura 4) (Santos *et al.*, 2008). A cutícula funciona como uma barreira contra a transpiração mas, por outro lado, possui poros que permitem que haja alguma penetração de água, importante nos mecanismos de rachamento (Sekse, 1995). A segunda camada de tecido de proteção, a hipoderme, surge a seguir à epiderme, que envolve o parênquima subjacente, tecido este que inclui a maior parte da polpa do fruto (Sekse, 1995). Este é constituído por um mesocarpo comestível carnudo (parênquima de reserva) que, quando maduro, é consumido por vários tipos de animais, incluindo aves, mas também vertebrados maiores (Welk *et al.*, 2016). No interior do fruto, surge o exocarpo lenhoso que encerra uma semente (Santos *et al.*, 2008).



Figura 4. Drupas de *Prunus avium* L.

Na fase de colheita do fruto, a cereja é extremamente sensível à precipitação, devido à sensibilidade ao rachamento mas, também, à podridão dos frutos (Rodrigues *et al.*, 2012), embora esta espécie exija 800 mm de precipitação anual (Quadrado *et al.*, 2014). A humidade é, assim, um fator com elevada importância uma vez que o fruto é constituído essencialmente por água, necessitando de valores entre 80-83% no estágio de maturação do fruto (Serradilla *et al.*, 2016).

O rachamento do fruto é uma desordem fisiológica grave que induz perdas de rendimento consideráveis para os cerisicultores e cuja incidência tem aumentado notavelmente nos últimos anos, sendo atribuída às alterações climáticas. De facto, as previsões de alterações climáticas mais recentes apontam para um agravamento de fenómenos de precipitação extrema que poderão aumentar ainda mais este grave problema.

O rachamento que ocorre ao nível da cutícula é caracterizado por micro-rachamento (micro-fissuras), que não são visíveis a olho nu, mas que poderá funcionar como uma entrada de agentes infecciosos. Existe, também, outro tipo de rachamento, o macro-rachamento, de maiores dimensões, sendo por isso visível a olho nu, afetando assim a epiderme e a hipoderme (Correia *et al.*, 2018).

Esta espécie exige temperaturas inferiores a 8 °C no decorrer do mês de janeiro enquanto, entre janeiro e julho, tem preferência por temperaturas superiores a 13 °C e no Verão uma temperatura média mensal de 15 °C (Quadrado *et al.*, 2014). A cerejeira é tolerante a solos arenosos e argilosos preferindo, no entanto, solos de textura franca (Serradilla *et al.*, 2016).

1.2. Distribuição geográfica

Esta espécie é nativa da Europa, Anatólia, norte de África e oeste da Ásia, e como se pode observar no mapa da Figura 5A está amplamente distribuída na Europa (Welk *et al.*, 2016).

Devido à cerejeira necessitar de 800 a 1000 horas de frio para conseguir frutificar com sucesso, a sua produção está limitada a determinadas áreas (Welk *et al.*, 2016). Em Portugal (Figura 5B), as principais zonas produtoras de cereja encontram-se a Norte do rio Tejo, mais predominantemente nas regiões da Beira Interior e de Trás-os-Montes (Costa, 2006).

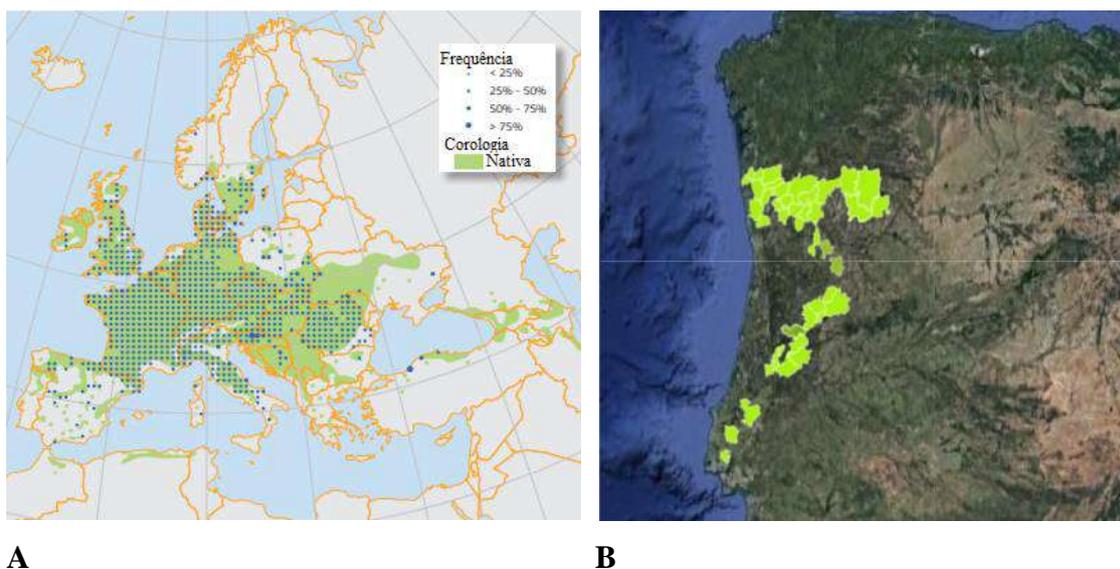


Figura 5. Distribuição geográfica da espécie *Prunus avium* L.: A – Europa; B- Portugal Continental (adaptado de Welk *et al.*, 2016).

1.3. Aplicações e interesse económico

Como anteriormente referido, os principais produtores mundiais são os EUA, Turquia, Irão e Chile, com a produção mundial a atingir 2320460 t (Figura 6) (FAO, 2019).

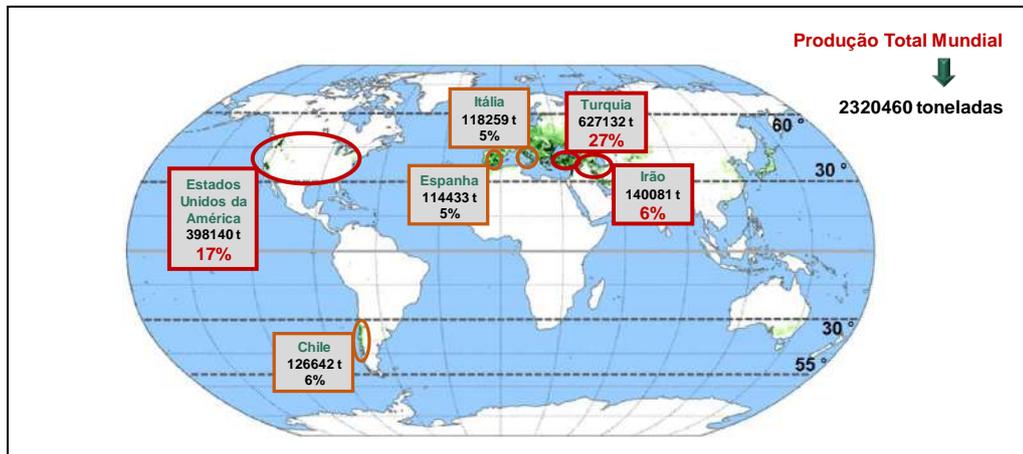


Figura 6. Principais produtores mundiais de cerejeira doce (FAO, 2019).

A Figura 7 apresenta a evolução da produção de cereja em Portugal entre 2007 e 2017 (FAO, 2019). Tal como se pode observar pela Figura 7 a produção tem vindo a aumentar, ultrapassando atualmente as 19000 t. A produtividade, i.e., a produção dos pomares de cerejeira em toneladas/hectare também tem evoluído positivamente, com valores acima das 3 t/ha, em resultado da opção por técnicas culturais mais avançadas (FAO, 2019).

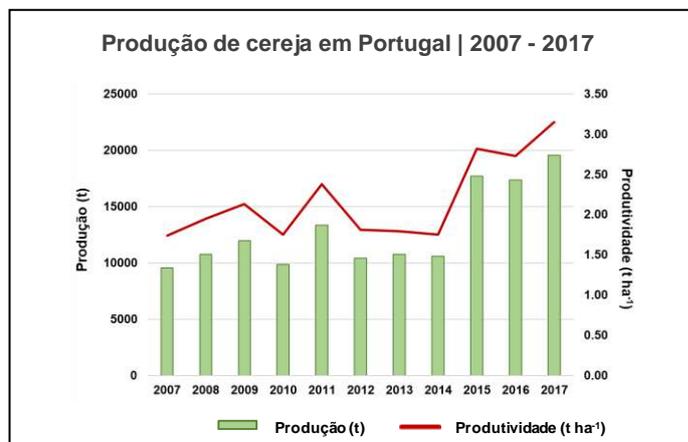


Figura 7. Evolução na produção de cereja entre 2007 e 2017 (FAO, 2019).

A cerejeira tem várias aplicações como, por exemplo, a utilização da sua madeira na indústria do mobiliário (Nussinovitch, 2010). A cereja para além de poder ser consumida em fresco é, também, usada no fabrico de produtos alimentares, nomeadamente em sumos, tortas, licores, iogurtes, compotas, chocolates, ou sob a forma de fruta cristalizada (Caballero *et al.*, 2016). A cerejeira pode ainda ser utilizada para fins ornamentais, paisagísticos e em medicina tradicional (Nussinovitch, 2010).

Problemas relacionados com determinadas doenças ou distúrbios alimentares, nomeadamente obesidade, diabetes, entre outros, têm promovido o interesse da indústria transformadora na utilização deste fruto para a obtenção de produtos alimentares saudáveis, devido à qualidade nutricional da cereja e devido ao seu baixo índice glicémico (Foster-Powell *et al.*, 2002). A presença de antocianinas e de outros compostos fenólicos, bem como de vitaminas, e as respetivas propriedades antioxidantes, têm efeitos benéficos comprovados para quem os consome, como parte de uma dieta equilibrada, e têm servido de estratégia para um maior consumo de fruta, nomeadamente entre a população mais jovem (Albuquerque *et al.*, 2018).

1.4. Atributos de qualidade da cereja

1.4.1. Peso, calibre, cor e acidez

Atualmente em Portugal são selecionadas e plantadas cultivares (cvs.) de cerejeira doce com o objetivo de aumentar a produtividade e a qualidade do fruto, nomeadamente as cvs. Burlat, Earlise, Summit, Van, Skeena, Sunburst, Staccato, Sweetheart, entre outras. Uma das cultivares de cerejeira doce mais importante é a Burlat (Figura 8), devido à sua produção temporã e elevada produtividade, que explica os preços elevados que atinge nos mercados. O peso médio da cereja Burlat é 7,10g e com calibre de 25,49mm (Venturini *et al.*, 2002). Já o seu pH apresenta valores próximos de 4,2 (Serradilla *et al.*, 2016). A cor da cereja é indicativa do estado de maturação e da qualidade do fruto e depende da concentração de antocianinas, pH, luz, temperatura, entre outros fatores (Gonçalves *et al.*, 2006). O pH é um fator importante na apreciação do fruto pelo consumidor, variando entre valores de 3,7 e 4,2. Sendo um fruto ligeiramente ácido, o valor de pH depende das concentrações de ácidos orgânicos, nomeadamente, ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, entre outros (Serradilla *et al.*, 2016).



Figura 8. Cultivar de cerejeira Burlat.

1.4.2. Composição bioquímica

Relativamente à composição química e bioquímica da cereja (Quadro 1), os hidratos de carbono são os principais compostos químicos presentes, podendo variar entre 12,2 e 17 %, de acordo com as condições de cultivo e climáticas. Nos compostos azotados estão incluídos aminoácidos essenciais e proteínas, com a respetiva composição a refletir-se nos teores totais de azoto, os quais variam entre 0,8 e 1,4 %.

Outros compostos de interesse bioquímico são, igualmente, observados embora em menores concentrações, nomeadamente de vitaminas, minerais e lípidos, estes últimos com valores na ordem de 0,2 a 0,7%.

De entre as vitaminas presentes na cereja, a mais abundante é a vitamina C (ácido ascórbico) com valores de 6 a 10 mg por 100 g de peso fresco (Serradilla *et al.*, 2016). No caso dos minerais, o potássio é o que se apresenta em maiores concentrações, entre 170 e 260 mg por 100 g de peso fresco, enquanto para o magnésio os teores observados são bastantes inferiores, na ordem de 10 mg por 100 g de peso fresco (Ferretti *et al.*, 2010).

Quadro 1. Valor nutricional da cereja (100 g de matéria edível) (Souci *et al.*, 2015; USDA, 2018).

Valor calórico (Kcal)	63,00	Aminoácidos (mg)	
Água (g)	82,25	Alanina	26,00
Proteínas (g)	1,06	Arginina	18,00
Lípidos (g)	0,20	Ácido aspártico	569,00
Hidratos de carbono (g)	16,01	Cistina	10,00
Fibra total (g)	2,10	Ácido glutâmico	83,00
Açúcar total (g)	12,82	Glicina	23,00
Minerais (mg)		Histidina	15,00
Cálcio	13,00	Isoleucina	20,00
Cobre	0,06	Leucina	30,00

Ferro	0,36	Lisina	32,00
Magnésio	11,00	Metionina	10,00
Fósforo	21,00	Fenilalanina	24,00
Potássio	222,00	Prolina	39,00
Zinco	0,07	Serina	30,00
Vitaminas		Treonina	22,00
Riboflavina (µg)	33,00	Triptofano	9,00
Niacina (µg)	154,00	Tirosina	14,00
β-Caroteno (µg)	38,00	Valina	24,00
Tocoferol total (µg)	120,00	Ácidos (mg)	
α-tocoferol (µg)	70,00	Ácido málico	940,00
β-tocoferol (µg)	10,00	Ácido cítrico	13,00
γ-tocoferol (µg)	40,00	Ácido p-cumárico	9,00
Folato (µg)	4,00	Ácido oxálico	7,20
Vitamina A (µg)	3,00	Ácido clorogénico	6,10
Vitamina B1 (µg)	27,00	Compostos fenólicos (Flavonoides) (mg)	
Vitamina B6 (µg)	49,00	Antocianinas	
Vitamina C (mg)	7,00	Cianidina	30,20
Vitamina K (µg)	2,10	Peonidina	1,50
Hidratos de carbono (g)		Pelargonidina	0,30
Glucose	6,59	Flavan-3-ols	
Frutose	5,37	Catequina	4,40
Galactose	0,59	Epicatequina	5,00
Sacarose	0,15	Flavonóis	
Maltose	0,12	Quercetina	2,30
Maltose	0,12	Kaempferol	0,20

1.4.2.1. Compostos fenólicos

Adicionalmente, as cerejas apresentam elevadas concentrações em compostos fenólicos responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes, antialérgicas, anticarcinogénicas, antimicrobianas, anti-mutagénicas e anti-inflamatórias (Kim *et al.*, 2005). Estes compostos são metabolitos secundários das plantas, que influenciam a aparência, sabor e aroma do fruto, bem como as suas propriedades benéficas na saúde (Serradilla *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2005) reforçam a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, referindo que alguns destes são responsáveis pela proteção das células neuronais. A concentração de compostos fenólicos nos frutos é fortemente influenciada pelo estado de maturação, pelas cultivares e pelas condições edafoclimáticas do local de produção.

Cerca de 212,3 mg por 100 g de peso fresco da cereja corresponde ao teor em compostos fenólicos, sendo esta cultivar considerada rica nestes compostos, daí o seu elevado poder antioxidante (Gonçalves *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático, do tipo benzeno, e vários grupos hidroxilo nas suas estruturas químicas. A presença de grupos hidroxilo confere atividade antioxidante a estes compostos (Rice-Evans *et al.*, 1996). Para um composto fenólico ser caracterizado como antioxidante tem

de obedecer a duas condições: (i) mesmo que o composto fenólico esteja presente em baixas concentrações relativamente ao substrato, ele retarda a auto oxidação ou impede a oxidação mediada por o radical livre, e (ii) o radical que é formado após a “captura” é estável (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Os orto-difenóis são caracterizados estruturalmente por um anel aromático com dois grupos hidroxilo (OH) em posição orto (Figura 9). Segundo Rice-Evans *et al.* (1996), o facto destes compostos apresentarem os grupos OH em posição orto aumenta a atividade antioxidante quando comparada com grupos OH em posição meta. Estes autores também concluíram que a atividade antioxidante baixa quando a estrutura apresentava apenas um grupo OH, apresentando a ligação dupla um papel menos relevante na respetiva atividade antioxidante, tornando o anel um dador de H⁺ mais fraco.

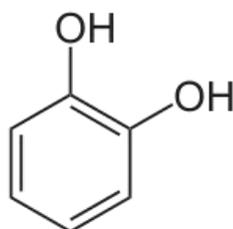


Figura 9. Estrutura química do orto-difenol (adaptado de Muñoz-Muñoz *et al.*, 2013).

Os flavonoides são os fenóis mais comuns das plantas e são caracterizados estruturalmente pela presença de dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono, podendo ou não formar um terceiro anel C₆-C₃-C₆ (Bravo, 1998), como se pode observar na Figura 10.

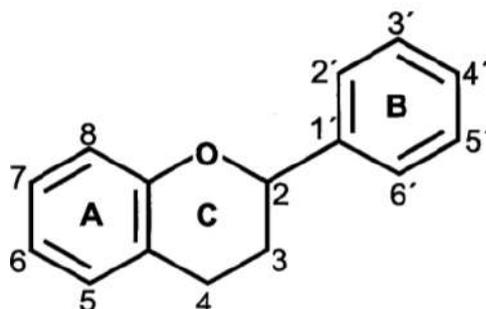


Figura 10. Estrutura química geral dos flavonoides (adaptado de Fan *et al.*, 2019).

Estes compostos são muito úteis a nível medicinal devido às suas propriedades antioxidantes, ou seja, na sua capacidade de captar radicais livres (Havsteen, 2002). Eles captam várias espécies, incluindo radicais anião superóxido, radical hidroxilo ou peróxido (Harborne e Williams, 2000). Existem várias classes de flavonoides que diferem na oxidação do anel pirano e na ligação ao anel B, que incluem flavonas, flavonóis, antocianinas, flavanonas, entre outros (Rice-Evans *et al.*, 1996).

No caso das antocianinas, este tipo de compostos é caracterizado por apresentar na sua estrutura um íão flavílio (Figura 11).

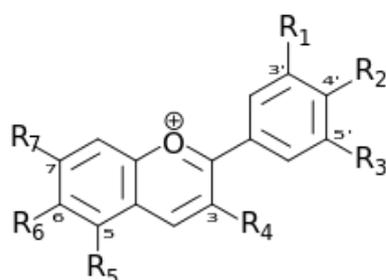


Figura 11. Estrutura química geral das antocianinas (adaptado de Cardoso *et al.*, 2011).

Estes compostos são responsáveis pela cor do fruto e desempenham várias funções nas plantas influenciando o poder antioxidante, proteção contra a radiação ultravioleta (UV), entre outras (Lopes *et al.*, 2007). A sua capacidade antioxidante aumenta com o número de grupos OH e pela presença do íão flavílio, ao contrário da presença de grupos metilo que reduzem este efeito (Cardoso *et al.*, 2011). Na cereja doce estão presentes várias antocianinas mas predominando a cianidina-3-*O*-rutinósido e a cianidina-3-*O*-glucósido, como mostra a Figura 12 (Chaovanalikit e Wrolstad 2004; Ferreti *et al.*, 2010).

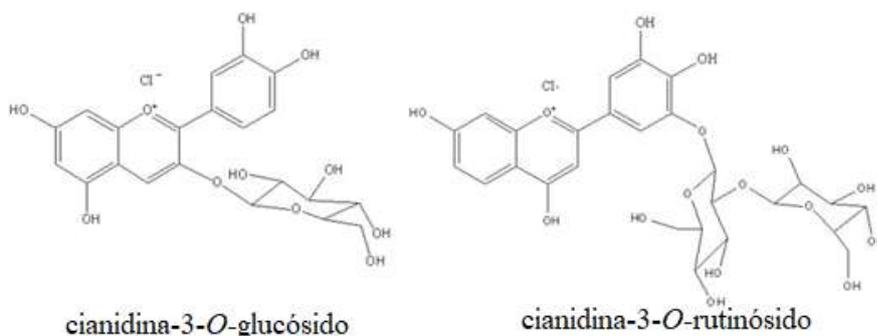


Figura 12. Antocianinas predominantes na cereja doce (adaptado de Gonçalves *et al.*, 2007).

1.5. Aspetos nutritivos e nutricionais da cereja

Tal como referido a cereja é rica em macronutrientes, especialmente em potássio (K), mas também apresenta fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e sódio (Na) e em micronutrientes, ferro (Fe), mangânes (Mn), boro (B), zinco (Zn) e cobre (Cu), tal como se pode constatar pela informação contida no Quadro 2. Neste Quadro são indicados os teores adequados de macro- e micronutrientes no fruto (cereja) e nas folhas de cerejeira propostos por Serradilla *et al.* (2016) e Simmonds e Preedy (2015), respetivamente.

Quadro 2. Teores dos nutrientes presentes nas cerejas em mg por 100 g de porção comestível (adaptado de Serradilla *et al.*, 2016) e teores dos nutrientes presentes nas folhas de cerejeira (adaptado de Simmonds e Preedy, 2015).

Nutriente	Teores em cerejas (mg por 100g de porção comestível)	Teores em folhas de cerejeira
<i>K</i>	170 – 260	0,16 – 0,40 %
<i>P</i>	15 – 18	-
<i>Ca</i>	13 – 20	1,0 – 3,0 %
<i>Mg</i>	8 – 13	0,3 – 0,6 %
<i>Na</i>	1 – 8	-
<i>N</i>	-	1,9 – 3,0 %
<i>Fe</i>	< 1	20 – 200 ppm
<i>Mn</i>	< 1	20 – 200 ppm
<i>B</i>	-	25 – 60 ppm
<i>Zn</i>	< 1	15 – 70 ppm
<i>Cu</i>	<1	5 – 20 ppm

Relativamente aos macronutrientes das plantas, o P é um elemento com função estrutural em macromoléculas. Esta função é mais evidente na constituição dos ácidos nucleicos, incluindo moléculas de DNA e RNA (Marshner, 1985). O Ca exerce um papel de mensageiro secundário intracelular. O Ca^{2+} é uma molécula de sinalização libertada pela célula provocando assim determinadas alterações como resposta. Um exemplo disso é a alteração na conformação de determinada proteína alterando deste modo a sua atividade (Edel *et al.*, 2017). Já no caso do Na, este desempenha funções nos mecanismos de osmorregulação e pode, também, substituir o K em algumas reações enzimáticas (Faquin, 2005). No caso do azoto (N) este é o constituinte essencial das proteínas, dai

estar indiretamente envolvido em todos os processos vitais das plantas. Desempenha um papel muito importante nos processos fisiológicos, uma vez que é responsável pela cor verde escura presente nas plantas, para além disso ele melhora a qualidade do fruto (Leghari *et al.*, 2016).

Dos micronutrientes presentes nas plantas, o Fe possui um papel muito importante, uma vez que está envolvido no transporte de ácidos orgânicos, devido à sua capacidade de formar complexos octaédricos com vários ligandos (Marshner, 1985). O Fe está, maioritariamente, presente nos cloroplastos (Marshner, 1985). O Mn é outro dos micronutrientes presentes nas plantas, e exerce importantes funções. É caracterizado por ser um ativador de um grande número de enzimas. Este micronutriente possui um raio iónico situado entre o raio iónico do Mg e do Ca, podendo substituir ou competir em várias reações que envolvem estes dois iões (Marshner, 1985). O B tem um papel fundamental na fase reprodutiva das plantas, uma vez que é necessário para a germinação do grão de pólen e para o crescimento do tubo polínico (Nyomora *et al.*, 2000). Segundo Marschner (1985), este elemento está envolvido na biossíntese e na estrutura da parede celular e na integridade da membrana plasmática. O Zn tem um papel fundamental no crescimento das plantas, estando envolvido em diversas atividades metabólicas (Abbas *et al.*, 2009). Este micronutriente ativa diversas enzimas envolvidas na manutenção da integridade da membrana celular, na síntese proteica e na formação do grão de pólen (Hafeez *et al.*, 2013). O Cu influencia a rigidez da planta caracterizado pelo seu efeito tónico. Estas funções estão relacionadas com o facto de este ião ser cofator de diversas enzimas. Para além disso, o Cu ainda tem um papel importante na formação do grão de pólen e, conseqüentemente, na fertilização (Brinate *et al.*, 2015).

1.5.1. Efeito do magnésio (Mg) e do potássio (K) nas plantas

O Mg e o K são considerados macronutrientes essenciais para as plantas, sendo que o Mg é absorvido a nível radicular pelas plantas através do mecanismo de fluxo de massa. Já no caso do K, este movimenta-se do solo para o interior da planta por difusão (Benites *et al.*, 2015). Estes dois catiões (Mg^{2+} e K^{+}) têm diferentes raios iónicos que quanto mais hidratados raios estiverem, menor será a força de absorção, adquirindo assim estes catiões uma maior mobilidade no solo, comprometendo deste modo a absorção a nível radicular. Para além deste entrave, a velocidade de absorção destes catiões pelas

raízes pode diminuir na presença de outros cátions, como é o caso do K^+ que é considerado um cátion absorvido muito rapidamente e que compete intensivamente com outros cátions (Benites *et al.*, 2015).

Estes dois elementos podem, igualmente, ser absorvidos via foliar, uma vez que as folhas, para além de serem órgãos de síntese, possuem também capacidade de absorção de nutrientes (Faquin, 2005). Este processo de absorção ocorre por difusão através da cutícula, com predominância no sentido de fora para dentro. É um tipo de aplicação mais eficaz do que a aplicação ao solo, embora existam vários fatores que podem influenciar este tipo de aplicação dos elementos nutritivos, nomeadamente o seu grau de eficiência, como o caso da humidade do ar e do solo, a temperatura, o pH da solução nutritiva, entre outros (Faquin, 2005).

Os elementos essenciais, necessários para a planta completar o seu ciclo vegetativo, estão envolvidos diretamente no metabolismo da planta (Marschner, 1985). O Mg é um constituinte das estruturas orgânicas, maioritariamente de moléculas com um papel importante no desenvolvimento vegetativo. Entre as moléculas mais importantes, destacam-se as clorofilas *a* e *b*, imprescindíveis para a realização da fotossíntese (Marschner, 1985) sendo que um défice de Mg pode inibir a assimilação de CO_2 (Mengel e Kirkby, 1979). O Mg desempenha, também, um importante papel nos processos metabólicos de obtenção de energia, sendo um cofator na produção de ATP (McCauley *et al.*, 2011).

O macronutriente K, apesar de não ser um constituinte estrutural das células, apresenta um papel específico importante na conformação proteica (Mengel e Kirkby, 1979), exercendo funções importantes na manutenção da osmolaridade do meio celular, no equilíbrio eletroquímico das células e na regulação da atividade enzimática (Marschner, 1985).

Quando as concentrações de Mg e K na planta são reduzidas, podem surgir nas folhas sintomas de deficiência característicos. Estes dois elementos apresentam elevada mobilidade na planta pelo que, em condições de deficiência, estes nutrientes são translocados das folhas mais velhas para as mais novas, com a respetiva sintomatologia a tornar-se inicialmente visível nas folhas mais velhas (McCauley *et al.*, 2011). Assim, no caso do Mg, nas folhas mais velhas, é possível observar o aparecimento de cloroses interveinais (Marschner, 1985). Apesar de pouco comum, as deficiências de Mg nas

folhas mais velhas podem também ser traduzidas por uma coloração avermelhada, acompanhada pelo aparecimento de zonas necróticas (McCauley *et al.*, 2011), provocando a queda prematura das folhas (Mengel e Kirkby, 1979).

No caso do K, numa fase inicial, as deficiências promovem uma redução no crescimento. Numa fase mais avançada, surgem cloroses e necroses nas folhas, com as margens secas e enroladas para o interior, com a planta a tornar-se mais suscetível ao ataque por fungos e geadas (Mengel e Kirkby, 1979), e promovendo a queda prematura das folhas (Muhammad *et al.*, 2017). A deficiência de K, a manter-se, poderá por em causa a produção do ano seguinte, tal como observaram Muhammad *et al.* (2017), devido à conseqüente diminuição do número de flores e frutos.

As deficiências de Mg e K na planta podem, igualmente, surgir como consequência da utilização de fertilizantes à base de cálcio, pelas relações de antagonismo que este último elemento apresenta em relação aos primeiros (Mikiciuk *et al.*, 2015).

De acordo com Ferretti *et al.* (2010), a fertilização permite obter frutos com melhor aparência, mais apetecíveis para o consumo humano, mas também influencia fortemente os teores de ácidos fenólicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ensaio experimental

O ensaio experimental foi instalado num pomar de cerejeiras, instaladas em patamares e pertencentes ao produtor Sr. Armindo Barbosa na região de Resende, Distrito de Viseu, norte de Portugal, localizado a uma altitude de 200 m (latitude 41,0973661N, longitude 8,0045009W) (Figura 13). As árvores da cultivar Burlat com 7 anos de idade e conduzidas em vaso, foram enxertadas em *Prunus avium* e plantadas ao compasso de 3x4 m (Figura 14). A seleção desta cultivar é justificada pelo seu elevado valor comercial, calibre e características organolépticas, mas sobretudo devido ao facto de ser uma cultivar muito temporã, com colheita dos frutos a partir de meados de abril até meados de maio, atingindo preços elevados no início da campanha. Ainda assim, é uma cultivar que apresenta elevada sensibilidade ao rachamento (Remón *et al.*, 2003).



Figura 13. Fotografia aérea do pomar de cerejeiras do Sr. Armindo Barbosa, Resende. (T₁ – Tratamento com K dose baixa; T₂ – Tratamento com K dose alta; T₃ – Tratamento com Mg dose baixa; T₄ – Tratamento com Mg dose alta; R₁ – Repetição 1; R₂ – Repetição 2; R₃ – Repetição 3)



Figura 14. Aspeto do pomar em estudo.

Assim, para efeitos de delineamento de ensaio, foram selecionadas 100 árvores pertencentes à variedade em estudo (Burlat) de acordo com aspetos relacionados com o porte, altura, idade, exposição, entre outros, de modo a garantir uma maior homogeneidade.

2.2. Delineamento experimental

Os tratamentos foram distribuídos por blocos, com dois níveis de aplicação foliar para cada um dos nutrientes estudados, K e Mg, num total de 4 modalidades. Para os nutrientes em estudo foram realizadas duas aplicações, relativas a duas concentrações, na forma do produto comercial ENERMAX[®], nas doses de 50 g hL⁻¹ (T₁) e 100 g hL⁻¹ (T₂), e KITPLANT Mg[®], nas doses de 125 g hL⁻¹ (T₃) e 250 g hL⁻¹ (T₄), para K e Mg, respetivamente (Quadro 3). Para cada dose foram consideradas três repetições, com 5 árvores por repetição, num total de 15 árvores por tratamento ou dose. Um tratamento controlo (T₀) foi, também, considerado e no qual foram incluídas, igualmente, três repetições com 5 árvores por repetição. Neste último tratamento, ao contrário do procedimento normal, foram aplicados todos os nutrientes na forma dos produtos indicados no Quadro 3 usando, para o efeito, a dose máxima de referência indicada pelo fabricante.

Quadro 3. Produtos comerciais e respectivas doses ou concentrações (g hL⁻¹), (mL hL⁻¹) aplicadas nos tratamentos em estudo.

Tratamento	ENERMAX K (g hL⁻¹)	KITPLANT Mg (g hL⁻¹)	KITPLANT Ca (g hL⁻¹)	FORALG B, Mo (mL hL⁻¹)
T ₀	100	250	300	150
T ₁	50	0	300	150
T ₂	100	0	300	150
T ₃	0	125	300	150
T ₄	0	250	300	150

Entre repetições e tratamentos foram deixadas 2 a 3 árvores ou 1 a 2 patamares de intervalo, respetivamente, de modo a evitar contaminações aquando da aplicação dos respetivos produtos e concentrações. A definição das concentrações de fertilizantes teve como referência a dose máxima de cada indicada pelo fabricante para aplicação foliar (dose 1) e a respetiva redução para metade (dose 2). A aplicação dos fertilizantes ocorreu na fase de desenvolvimento do fruto, desde a frutificação até perto da maturação, por pulverização foliar, através de jato transportado em toda a copa das árvores selecionadas para o efeito.

2.3. Análise de solos

Numa fase inicial, para a caracterização do pomar em estudo, em termos do respetivo estado de fertilidade, foram realizadas análises ao solo cujos resultados são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Resultados da análise ao solo do pomar de cerejeiras.

Parâmetro	Profundidade (cm)		Média	Classificação
	0 - 15	15 - 30		
pH (H ₂ O)	6,2	6,1	6,2	<i>Pouco ácido</i>
pH (KCl 1 M)	5,3	5,1	5,2	-
Cond. Elétrica (dS cm ⁻¹)	0,03	0,02	0,02	<i>Baixo</i>
Mat. Org. (g kg ⁻¹)	20,0	16,0	18,0	<i>Médio</i>
N _{total} (g kg ⁻¹)	0,4	0,3	0,4	<i>Baixo</i>
P ₂ O ₅ (Egner-Riehm) (mg kg ⁻¹)	54,7	43,0	48,9	<i>Baixo</i>
K ₂ O (Egner-Riehm) (mg kg ⁻¹)	161,2	137,0	149,1	<i>Alto</i>
Ca ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	5,1	4,2	4,7	<i>Baixo</i>
Mg ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,7	0,6	0,7	<i>Baixo</i>

K ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,3	0,2	0,3	<i>Médio</i>
Na ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	<i>Médio</i>
Acidez de troca (cmol _c kg ⁻¹)	0,1	0,1	0,1	<i>Não limitante</i>
B (mg kg ⁻¹)	0,3	0,2	0,3	<i>Baixo</i>
Zn (mg kg ⁻¹)	0,7	0,5	0,6	<i>Muito baixo</i>
Cu (mg kg ⁻¹)	4,9	2,4	3,7	<i>Médio</i>
Mn (mg kg ⁻¹)	8,5	8,4	8,5	<i>Baixo</i>
Fe (mg kg ⁻¹)	34,5	36,8	35,7	<i>Médio</i>
Areia grossa (g kg ⁻¹)	518,1	517,5	517,8	-
Areia fina (g kg ⁻¹)	340,6	353,2	346,9	-
Limo (g kg ⁻¹)	41,2	46,9	44,1	-
Argila (g kg ⁻¹)	100,2	82,3	91,3	-
Classe de textura	<i>Arenoso-franco</i>			

A amostragem e colheita do solo foram realizadas de acordo com os procedimentos recomendados pelo Laboratório de Solos e Fertilidade Joaquim Quelhas dos Santos, da UTAD. Para o efeito, de forma aleatória, foram recolhidas um total de 20 subamostras em toda a área do pomar, entre os 0-15 e 15-30 cm de profundidade, com auxílio de uma sonda de canas. Posteriormente, as subamostras foram homogeneizadas de acordo com a respetiva profundidade e colhida uma toma de aproximadamente 0,5 kg para efeitos de caracterização, num recipiente plástico devidamente identificado.

Em termos de procedimentos, os valores de pH em água (H₂O) e cloreto de potássio (KCl) 1M foram determinados por técnicas potenciométricas (Santos, 1965), em suspensões de solo e das respetivas soluções, com base numa razão 1:2,5 (m/v), com tempos de estabilização de 1 e 2 h, respetivamente.

A condutividade elétrica (CE) foi determinada em extrato obtido a partir de suspensão aquosa, razão massa:volume de 1:5, após um tempo de agitação de 1 h e posterior separação do solo por filtração (Watman nº 42). A leitura dos valores foi realizada em condutivímetro, após calibração com solução padrão de KCl 0,01M, sendo os resultados expresso em dS cm⁻¹ (Kalra e Mayard, 1991).

O carbono total do solo foi determinado por via seca, através de NIRD (*Near Infrared Detector*), após combustão de aproximadamente 1 g ($\pm 0,000$) de terra fina de solo ($\varnothing < 2$ mm) a uma temperatura de 1100 °C, em autoanalisador elementar (SKALAR PRIMACS®). Considerando a inexistência de carbono mineral, através da ausência de reação com ácido clorídrico (HCl) 1M, os teores de carbono total são equivalentes aos teores de carbono orgânico. O teor de matéria orgânica do solo foi determinado por via

indireta, através da multiplicação do carbono orgânico no solo pelo fator 1,724, considerando que o teor de carbono na matéria orgânica do solo representa, em média, cerca de 58 % (Santos, 2002).

Para o N total do solo foi seguida a metodologia proposta por Kjeldahl (1883), baseada na digestão da amostra de solo em ácido sulfúrico (H_2SO_4) e selênio (Se) (catalisador), a temperaturas elevadas (Bremner e Mulvaney, 1982). A concentração de N amoniacal ($N-NH_4^+$) nos digeridos é determinada por espectrofotometria de absorção molecular, em autoanalisador de fluxo segmentado (SKALAR), através da reação de Berthelot (Houba *et al.*, 1995).

Os teores de P e K extraíveis foram determinados de acordo com os procedimentos descritos por Balbino (1968). Para o efeito, na extração simultânea foi utilizada uma solução de Egner-Riehm (solução aquosa de ácido acético e lactato de amônio tamponizada a pH entre 3,7 e 3,8), numa proporção de 50 mL para uma toma de 2,5 g de terra fina de solo, sendo a respetiva mistura colocada a agitar durante um período 2 horas. Após filtração (Watman nº 42), os teores de P e K nos extratos foram obtidos por espectrofotometria de absorção molecular, a 880 nm de acordo com o método do ácido ascórbico-molibdato de amônio (Murphy e Riley, 1962) e fotometria de emissão de chama, respetivamente. Os resultados foram expressos em termos de massa dos respetivos óxidos, pentóxido de fósforo (P_2O_5) e óxido de potássio (K_2O), por massa de solo ($mg\ kg^{-1}$).

Em termos do complexo de troca do solo, nomeadamente as bases de troca, cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+) e sódio (Na^+), os teores foram determinados com base numa extração com acetato de amônio ($C_2H_7NO_2$) 1M (1:10) (m/v) (Houba *et al.*, 1995) seguida da respetiva leitura por espectrofotometria de absorção atómica, para os casos do Ca^{2+} e Mg^{2+} , e emissão de chama, para os casos do K^+ e Na^+ . Por sua vez, a acidez de troca (AT) foi avaliada com base na metodologia proposta por Thomas (1982) na qual, numa fase inicial, é realizada uma extração com KCl 1M (1:10) (m/v) seguida de uma fase analítica, sendo a quantificação realizada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M.

Relativamente aos micronutrientes no solo, no caso concreto dos teores de B, Zn, Cu, Mn e Fe foi seguida a metodologia proposta por Houba *et al.*, (1995). No processo de extração, para o caso do B, foi usado o método do cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,01M

fervente (1:2) (m/v), sendo os respectivos teores determinados por espectrofotometria de UV (420 nm). Para os restantes microelementos (Zn, Cu, Mn e Fe), de acordo com os valores do pH do solo, foi aplicado o método de Lindsay (1:2) (m/v) e os teores determinados por absorção atômica.

Para a determinação da textura do solo foi realizada uma análise mecânica, com a respetiva quantificação dos diferentes lotes granulométricos, de acordo com a metodologia descrita por Silva (1967). Operações de crivagem foram realizadas para separação da areia grossa, sedimentação e decantação para o lote de areia fina e sedimentação e pipetagem nos lotes de limo e argila. De acordo com os valores obtidos para cada lote granulométrico foi determinada a classe de textura do solo, com base na consulta do diagrama triangular de texturas proposto por Gomes e Silva (1962).

2.4. Análise de material vegetal

Para além da caracterização do solo foram também realizadas análises ao material vegetal (folhas e frutos), de modo a avaliar o estado nutritivo das cerejeiras. Os procedimentos seguidos estão de acordo com as normas orientadoras do Laboratório de Solos e Fertilidade Joaquim Quelhas dos Santos da UTAD.

Assim, tendo em consideração a espécie em estudo, em junho foram amostradas 30 árvores localizadas na zona experimental, selecionadas de forma aleatória, de acordo com a respetiva homogeneidade em relação a critérios relacionados com o porte, idade, porta-enxerto e estado sanitário. Para cada árvore foram colhidas 4 folhas, à mesma altura de copa, na zona do terço médio do ramo, de acordo com os principais pontos cardeais.

Após amostragem, o material vegetal (folhas) foi devidamente embalado, identificado e transportado para o laboratório, no qual se procedeu à estabilização através de secagem, em estufa com ventilação, a uma temperatura compreendida entre 40-60 °C, durante um período de 48 h. Posteriormente, o material seco foi moído a 1 mm, usando para o efeito um moinho Retsch GM 200[®], durante 5 s a 4000 rpm, e armazenado em condições de ausência de luz e humidade para posterior análise.

Os resultados dos teores de macro- e micronutrientes no material vegetal são apresentados no Quadro 5. O teor total de N foi determinado em digeridos, obtidos a partir de uma digestão sulfúrica, catalisada por selénio, a temperaturas controladas, por

espectrofotometria de absorção molecular, em autoanalisador de fluxo segmentado (SKALAR®), através da reação de Berthelot (Houba *et al.*, 1995).

Para os restantes elementos, na preparação dos extratos foi seguido o método de decomposição por via seca, que envolve a incineração da amostra a uma temperatura de 550 °C, de modo a promover a destruição da matéria orgânica, seguido da dissolução do resíduo (cinzas) com um ácido forte (HNO₃) e diluição com água ultrapura. As soluções obtidas são filtradas e os respetivos teores determinados através da técnica de ICP (*Inductively Coupled Plasma*). Os teores de macro- e micronutrientes foram expressos em termos de massa por massa de matéria seca de material vegetal, g kg⁻¹ e mg kg⁻¹, respetivamente.

Quadro 5. Teores de macro- (g kg⁻¹) e micronutrientes (mg kg⁻¹) em folhas de cerejeira colhidas a 28 de junho de 2018.

Parâmetro	Teor	Classificação
N	-	-
P	1,8	<i>adequado</i>
K	11,4	<i>adequado</i>
Ca	13,2	<i>baixo</i>
Mg	5,8	<i>adequado</i>
S	0,5	-
B	30,6	<i>adequado</i>
Fe	66,6	<i>baixo</i>
Zn	11,6	<i>baixo</i>
Mn	96,0	<i>adequado</i>
Cu	8,8	<i>adequado</i>

Na avaliação inicial do pomar procedeu-se também à colheita de frutos, num total de 2 kg de cereja amostradas aleatoriamente das árvores a estudar, incluídas no ensaio experimental. As cerejas foram colhidas, a 23 de maio de 2018, durante o período de manhã, devidamente acondicionadas e transportadas no mesmo dia para o laboratório, para avaliação biométrica, histológica e química.

Cerca de 100-200 g do total de cereja colhida foi selecionada para determinação dos teores totais de macro- e micronutrientes. Para facilitar o armazenamento e evitar a respetiva deterioração, as cerejas foram congeladas a uma temperatura de -20 °C. Esta operação apresentou vantagens práticas na medida em que facilitou a separação da película da polpa, após um período relativamente curto de descongelação.

Após a operação de separação os respectivos materiais, película e polpa, foram liofilizados de modo a estabilizar o material e permitir o seu armazenamento e manuseamento para posterior análise.

Os procedimentos seguidos na determinação dos teores de macro- e micronutrientes presentes na película e polpa da cereja foram similares aos descritos anteriormente para o caso das folhas. O material liofilizado foi moído a 1 mm de diâmetro. Uma primeira toma do material foi usada para análise do N total, através de via húmida (digestão sulfúrica) e análise através de espectrofotometria de absorção molecular, em autonalisador de fluxo segmentado (SKALAR®). Uma segunda toma foi usada para a determinação dos restantes elementos, por via seca, através da calcinação da amostra, em mufla a 550 °C, seguido de uma dissolução e diluição com HNO₃ e H₂O ultrapura, respetivamente. Os teores nos extratos obtidos foram determinados por ICP.

Assim, em termos químicos, no que se refere à determinação dos principais macro- e micronutrientes presentes na polpa e película da cereja, os resultados obtidos para o ano inicial (2018), antes da aplicação dos fertilizantes, são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Teores de macro- (g kg⁻¹) e micronutrientes (mg kg⁻¹) presentes na polpa e película da cereja colhida em 21 de junho de 2018.

Parâmetro	Película	Polpa
N	8,7	11,2
P	1,1	1,0
K	9,9	9,7
Ca	0,8	0,5
Mg	0,6	0,6
S	0,3	0,5
B	8,6	5,8
Fe	34,1	29,2
Zn	7,8	6,1
Mn	7,3	4,4
Cu	8,5	5,0

Após aplicação foliar dos fertilizantes indicados no Quadro 3, procedeu-se à colheita de material vegetal (folhas) de modo a avaliar o respetivo efeito. O período de amostragem ocorreu na fase de crescimento (25 de julho de 2019), seguindo os procedimentos anteriormente descritos, de acordo com o delineamento experimental.

Foram analisados os mesmos elementos químicos apresentados no Quadro 5, de modo a avaliar o efeito dos diferentes tratamentos estudados (Quadro 3) como, também, a respetiva evolução seguindo-se e aplicando os procedimentos e técnicas descritos anteriormente.

2.5. Determinação de parâmetros biométricos, físicos e químicos

2.5.1. Biometria do fruto

Para a determinação das dimensões dos 30 frutos da cultivar Burlat amostrados em cada um dos tratamentos estudados foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo, Reino Unido) (Figura 15). O peso foi determinado usando uma balança digital (Kern EW, Alemanha).



Figura 15. Determinação biométrica do fruto.

2.5.2. Análise histológica do fruto

Para a análise histológica dos frutos, as secções foram fixadas em uma solução de FAA (5 % de formaldeído, 5 % de ácido acético glacial e 90 % de etanol), durante um

período de 48 h. De seguida, as amostras foram desidratadas numa série de soluções de etanol (70 %, 80 %, 90 %, 95 % e 100 %), durante 1 h. Posteriormente, as amostras foram colocadas em xilol, durante 1 h, e, por fim, embebidas em parafina líquida a 60 °C durante 24 h, para a obtenção do bloco com o material incluído (Figura 16).

Para o seccionamento dos blocos foi utilizado um micrótomo rotativo manual (RMC Power Tome XL, Boeckeler Instruments, Inc., Arizona, EUA). De seguida, foi feita a colagem, que consiste em fazer aderir o corte à lâmina de vidro em banho-maria (45 °C). Depois procedeu-se à desparafinação e hidratação, que consiste na eliminação de toda a parafina através da colocação em xilol (15 min). O xilol é retirado, introduzindo a lâmina numa série de banhos em concentrações decrescentes de álcool. As secções foram coradas utilizando o método de O'Brien e McCully (1981), com azul de toluidina a 1 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), durante 10 min. Por fim, procedeu-se à desidratação das amostras, na qual foi utilizada a técnica de banho numa série de álcoois de concentração crescente. O material foi colocado de modo a ser observado no microscópio ótico invertido Olympus IX51 e os cortes foram fotografados com uma câmara Olympus TH4-200. Foram realizadas as seguintes medições: espessura da cutícula, espessura e área das células da epiderme e área das células da hipoderme e do parênquima de reserva, recorrendo ao software Digimizer. Foram utilizados 6 frutos por tratamento e as medições foram efetuadas em 12 microfotografias por tratamento, as medições foram realizadas em duplicado.



Figura 16. Secção dos frutos em bloco, após inclusão em parafina.

2.5.3. Cor, força de rutura da epiderme e firmeza

A cor foi avaliada em sítios opostos do fruto (em 30 frutos por tratamento) com um colorímetro (CR-300, Minolta Japan) que expressa a cor em valores L, a* e b*. A cor da cereja é determinada como croma (C) de acordo com a expressão $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e que reflete a pureza ou saturação da cor (Voss, 1992; Gonçalves *et al.*, 2007; Giménez *et al.*, 2016). A tonalidade do fruto é expressa por h (°), $h = \arctg(b^*/a^*)$ (Voss, 1992).

A força de rutura da epiderme (em N) e a firmeza ($N\text{ mm}^{-1}$) foram determinados em 30 frutos por tratamento, usando um analisador de textura TA.XTPlus (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido), incluindo uma célula de carga de 50 N e uma sonda cilíndrica com 2,0 mm de diâmetro. A força máxima quando existe compressão a 5 mm tem uma velocidade de 1 mm s^{-1} .

2.5.4. Índice refratométrico

O teor em sólidos solúveis totais (SST) tem uma elevada importância na qualidade dos frutos, sendo de interesse para o produtor que este apresente valores elevados (Silva *et al.*, 2002).

O sumo foi extraído com um extrator elétrico (ZN350C70, Tefal Elea, China) durante 1 min. O teor em SST (°Brix) foi determinado usando um refratómetro digital (PR-101, Atago, Japão) (Figura 17). Para determinação deste parâmetro foram realizados 3 grupos com 10 frutos cada, num total de 30 frutos por tratamento.



Figura 17. Refratómetro digital (PR-101, Atago, Japão).

2.5.5. pH

O pH é um parâmetro importante na qualidade e aspeto dos frutos. Este parâmetro foi medido pelo método clássico, utilizando o sumo da etapa anterior, o aparelho utilizado foi o pH meter 3310 Jenway (Figura 18).



Figura 18. Medidor de pH Jenway.

2.5.6. Acidez titulável

A acidez titulável (TA) é um parâmetro importante para determinar o estado de maturação do fruto. A TA (em g de ácido málico por 100 g⁻¹ de peso fresco) foi determinada pela diluição de 10 mL de sumo com 10 mL de água destilada e titulado com NaOH a 0,1 mol L⁻¹ até um pH de 8,2 utilizando um titulador automático Schott Easy Titroline (Alemanha) (Figura 19).



Figura 19. Titulador automático Schott Easy Titroline.

2.5.7. Determinação do teor em compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos e para a determinação das atividades antioxidantes foi necessário recorrer a um processo de extração, que irá ser explicado mais à frente.

2.5.7.1. Teor em (poli)fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Na quantificação de compostos fenólicos totais, foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965) e Dewanto *et al.* (2002), com algumas alterações, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, adaptado a microplacas. A técnica tem como base a determinação do teor de fenóis totais nas amostras a estudar, por interpolação linear, através de uma reta de calibração, construída com soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico ($C_7H_6O_5$).

Para a quantificação de fenóis totais foi pipetado 20 μ L do extrato para cada poço numa microplaca de 96 poços, 100 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 80 μ L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (7,5%) em água ultrapura. De seguida, a microplaca foi incubada durante 15 min a 45 °C em banho-maria. Na etapa final procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 765 nm num leitor de microplacas (Figura 21). A equação da reta de regressão $y = 7,5495x + 0,0143$ com um $R^2 = 0,9992$, obtida a partir de diferentes concentrações de $C_7H_6O_5$ ($mg mL^{-1}$), foi estimada a partir do método de regressão linear, com base no método dos quadrados mínimos, usando para o efeito a folha de cálculo Excel, do software Windows®. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por g^{-1} de peso seco da amostra.



Figura 20. Aspeto da microplaca na determinação dos (poli)fenóis totais.

2.5.7.2. Determinação do teor em orto-difenóis

Na quantificação de orto-difenóis foi utilizado o método de complexação com o molibdato de sódio (Na_2MoO_4) descrito por Gutfinger (1981) e Garcia *et al.* (2012) com algumas alterações e adaptado a microplacas. Este método baseia-se na quantificação de orto-difenóis de uma amostra comparando-a com uma reta de calibração construída com soluções de concentração crescente e conhecidas de ácido cafeico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$).

Para a quantificação de orto-difenóis foi pipetado 20 μL de extrato (amostra/padrão) para cada poço numa microplaca de 96 poços, 100 μL de água ultrapura, 80 μL de tampão fosfato 0,1 M com um pH de 6,5 e 160 μL de solução de Na_2MoO_4 (5%) (Figura 22). De seguida, a microplaca foi colocada no escuro, à temperatura ambiente durante 15 min. Na etapa final procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 350 nm. O procedimento seguido na estimativa da equação da reta de regressão foi idêntico ao descrito para a determinação do teor de polifenóis totais, apresentado no ponto 2.5.8.1., sendo que a reta obtida foi $y = 3,4529x + 0,057$ com $R^2 = 0,9968$. Os valores obtidos foram expressos em mg/equivalente de ácido cafeico por grama de peso seco da amostra.

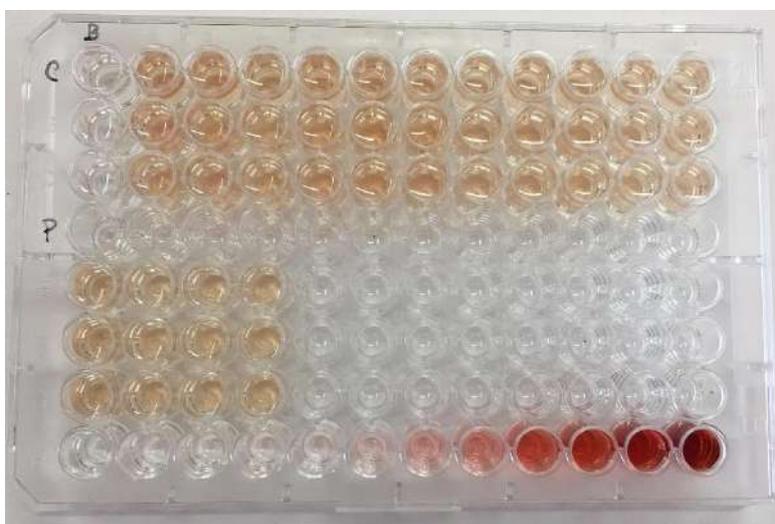


Figura 21. Aspeto da microplaca na determinação dos orto-difenóis.

2.5.7.3. Determinação do teor em flavonoides

Na quantificação de flavonoides foi utilizado o método de complexação com o cloreto de alumínio descrito por Dewanto *et al.* (2002), com algumas alterações e adaptado a microplacas. Este método baseia-se na determinação do teor em flavonoides na amostra por interpolação com os valores de uma reta de regressão construída com soluções de concentração crescente e conhecidas de catequina ($C_{14}H_{14}O_6$).

Para a quantificação de flavonoides foi pipetado 100 μ L de água ultrapura para um poço de uma microplaca com 96 poços, 10 μ L de nitrito de sódio ($NaNO_3$) (5%) e 25 μ L de extrato (amostra/padrão) (Figura 23). Posteriormente, a microplaca foi incubada durante 5 min à temperatura ambiente. Foram depois adicionados 5 μ L de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (10 %) e levada novamente a incubar durante 6 min. De seguida, foi adicionado 100 μ L de hidróxido de sódio 1 M e 50 μ L de água ultrapura. Na etapa final, a placa foi agitada e procedeu-se às leituras de absorvância a 510 nm. A reta de calibração foi obtida a partir da relação entre os valores de concentração de $C_{14}H_{14}O_6$ das soluções padrão e os respetivos valores de absorvância, através do método dos quadrados mínimos. Os valores nas amostras a estudar foram obtidos por interpolação, a partir da reta de calibração, expressos em mg equivalente de $C_{14}H_{14}O_6$ por g^{-1} de peso seco da amostra. Sendo que a reta obtida foi $y = 7,0747x - 0,0307$ com $R^2 = 0,9927$.



Figura 22. Aspeto da microplaca na determinação dos flavonoides.

2.5.7.4. Determinação do teor em antocianinas totais

O método utilizado para a determinação de antocianinas foi baseado em Smith *et al.* (2000), Lee *et al.* (2005) e Nicoué *et al.* (2007). Foi pesado 1 g do extrato da amostra juntamente com 5 mL de metanol acidificado com 1 % de HCl. A mistura foi agitada e colocada a repousar no escuro, durante 1 h a 4 °C. De seguida, a mistura foi centrifugada durante 15 min a 4000 rpm, e o sobrenadante foi recolhido e filtrado através de filtro Fisherbrand 90nm. Por fim, a cada 0,5 mL de extrato foi adicionado 2,5 mL de uma solução de KCl a 0,025 M a pH 1,0. A absorvância foi lida a 541 e 700 nm e obtida pela expressão $Abs = A_{\lambda 541nm} - A_{\lambda 700nm}$. Posteriormente à leitura, foi selecionada a cianidina-3-*O*-rutinosídeo com a respetiva característica molar, antocianina que se revelou como a mais representativa nas amostras estudadas.

2.5.7.5. Quantificação de fenólicos por HPLC-Diode Array (DAD)

Para a quantificação de fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram utilizados os extratos de cereja que estavam conservados a -20 °C de acordo com Aires *et al.* (2013). No HPLC, a coluna utilizada possui 250 x 4,6 mm diâmetro. Os solventes utilizados foram a água ultrapura com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e acetonitrilo com 0,1 % TFA (solvente B) com um fluxo de 1 mL min⁻¹ e com o gradiente a começar com 100 % de água. O volume de injeção foi de 10 µL e o tempo de corrida foi de 60 min. A identificação dos picos foi realizada recorrendo a padrões comerciais (espectros e tempos de retenção). Os comprimentos de onde usados foram 254, 280, 320 e 370 nm para os compostos fenólicos em geral e, mais especificamente, 520 nm para as antocianinas.

2.5.8. Determinação da atividade antioxidante total

2.5.8.1. Atividade antioxidante total pelo método ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzoatiazolina-6-sulfónico))

O método ABTS^{•+} (Figura 24) baseia-se na reação do antioxidante com o radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico), ocorrendo assim a redução do ABTS^{•+} a ABTS, quando este é capturado pelo antioxidante, o que provoca uma perda de cor, sendo considerado uma técnica espectrofotométrica (Borges *et al.*,

2011). O teste de redução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi realizado conforme descrito por Stratil *et al.* (2006).

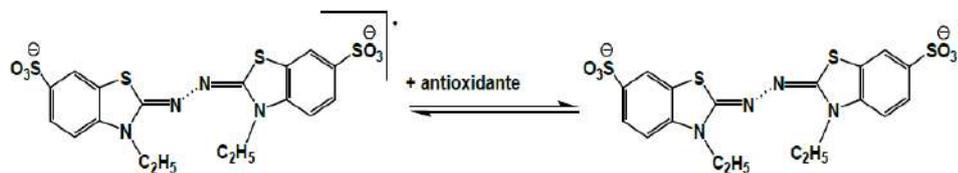


Figura 23. Reação de redução do ABTS na presença de um antioxidante (adaptado de Borges *et al.*, 2011).

Para tal, foi colocado 1 mg mL^{-1} de ABTS (1:1, v/v) juntamente com $0,65 \text{ mg mL}^{-1}$ de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), em água ultrapura. De seguida, após a mistura, a placa foi incubada durante 12-16 h no frio, formando-se assim o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Seguidamente foi colocado $15 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato (amostra) com $285 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de trabalho de ABTS, a cada poço, numa microplaca de 96 poços. Na etapa final, a microplaca foi incubada no escuro à temperatura ambiente, durante 30 min procedendo-se de seguida à leitura das absorvâncias a 734 nm num leitor de microplacas (Figura 25). Para determinar a atividade antioxidante das cerejas foi necessário uma reta de calibração $y = -0,0005x + 0,9118$ com $R^2 = 0,989$, em que se fez variar a concentração de Trolox. Este serve como antioxidante de referência (padrão), e os resultados obtidos foram expressos em μmol equivalente de Trolox por g^{-1} de peso seco da amostra.

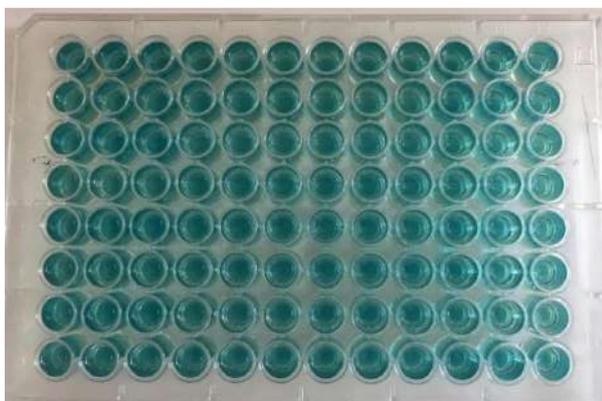


Figura 24. Aspeto da microplaca na determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS.

2.5.8.2. Aprisionamento de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O método de aprisionamento de radicais DPPH baseia-se na reação do DPPH com um antioxidante, em que ocorre a redução do DPPH (Figura 26), verificada pela mudança de cor de púrpura para amarelo, acompanhada por um decréscimo na absorvância (Borges *et al.*, 2011). O método utilizado foi adaptado de Brand-Williams *et al.* (1995), Sánchez-Moreno *et al.* (1998) e Siddhuraju e Becker (2003), com algumas modificações.

Para tal, foi colocado 4 mg de DPPH em 100 mL de metanol puro. De seguida, colocou-se 280 μ L de DPPH e 10 μ L de amostra em cada poço, em 96 poços numa microplaca. Posteriormente, a microplaca foi incubada no escuro durante 12 min e à temperatura ambiente. Por fim procedeu-se à leitura das absorvâncias a 517 nm num leitor de microplacas. A atividade antioxidante das cerejas foi calculada pela fórmula $((\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs branco}) * 100$, onde os valores obtidos vêm expressos em % de inibição.

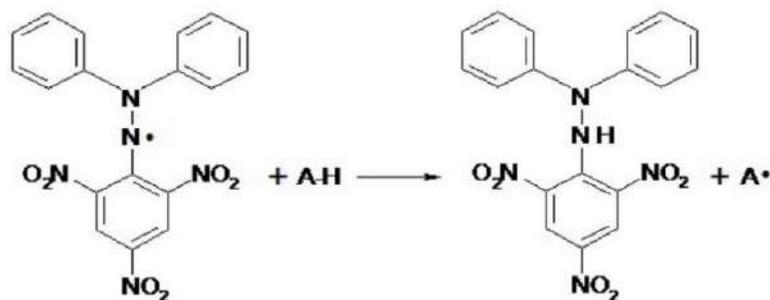


Figura 25. Reação de redução do DPPH na presença de um antioxidante (A-H) (adaptado de Oliveira *et al.*, 2015).

2.5.8.3. Capacidade redutora do Fe^{3+} em Fe^{2+} (FRAP)

O método FRAP baseia-se na medição da capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo Fe^{3+} -TPTZ de cor amarela para o complexo Fe^{2+} -TPTZ de cor azul. Esta reação ocorre em meio ácido e é medida espectofotometricamente a 593 nm (Nilsson *et al.*, 2005). A metodologia aplicada foi adaptada de Stratil *et al.* (2006) e Benzie e Strain (1996) com ligeiras modificações e adaptada a microplacas.

Para tal, foi adicionado 25 μ L de amostra e 275 μ L do reagente FRAP num poço de uma microplaca, a qual foi incubada no escuro durante 5 min à temperatura ambiente

(Figura 27). As absorvâncias foram lidas a 593 nm no leitor de microplacas. A atividade antioxidante das cerejas foi calculada com base numa reta de calibração $y = 0,0018x + 0,1237$ com $R^2 = 0,9959$ onde o sulfato de ferro foi utilizado como antioxidante de referência. Os resultados obtidos foram expressos em μmol equivalente de FeSO_4 por g^{-1} de peso seco de amostra.

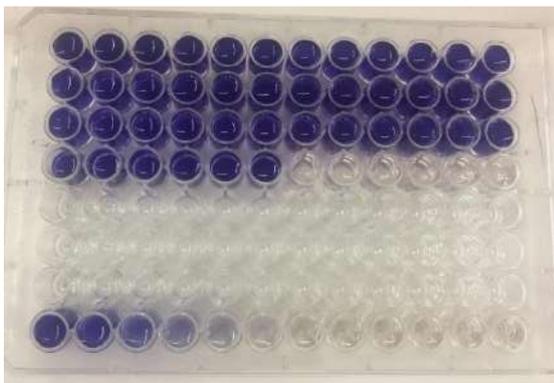


Figura 26. Aspeto da microplaca na determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.

2.5.9. Processo de extração

Para o processo de extração foi necessário 40 mg de extrato de cereja liofilizado, ao qual foi adicionado 950 μL do solvente de extração (metanol/água destilada (70:30, v/v)) e de seguida foi levado ao vórtex. Após este procedimento, as amostras foram sujeitas a um banho-maria (70 °C) por um período de 30 min, seguindo-se de uma centrifugação a 11000 rpm, a 4 °C e durante 15 min. Da solução final foi recolhido o sobrenadante e foi filtrado utilizando um filtro Fisherbrand 90 mm (Figura 20). O extrato obtido foi guardado a uma temperatura -20 °C, até proceder à sua análise. Para a determinação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante foram colhidas cerejas em 5 árvores diferentes por tratamento. As análises foram realizadas em microplacas, e por cada tratamento foram realizadas 9 repetições.

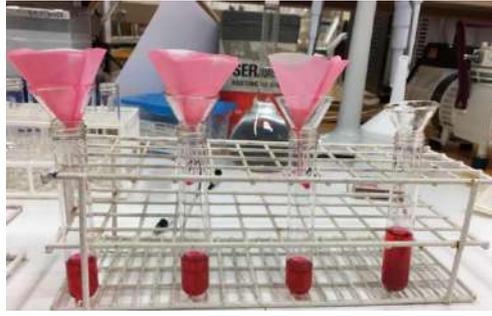


Figura 27. Processo de extração da amostra.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e a separação de médias foi realizada aplicando o teste de Tukey a 5 % de significância, utilizando o software IBM SPSS Statistics 20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores foliares

3.1.1. Macronutrientes principais

Na Figura 28 são apresentados os teores foliares (g kg^{-1}) dos macronutrientes principais nos vários tratamentos de adubação foliar estudados no presente trabalho. Assim, neste primeiro grupo de elementos essenciais ao crescimento das plantas, o azoto (N) foi o que apresentou maiores teores foliares, entre 20 e 25 g kg^{-1} , seguido do potássio (K), com valores entre 5 e 10 g kg^{-1} , e, por último, o fósforo (P) com teores foliares abaixo de 5 g kg^{-1} .

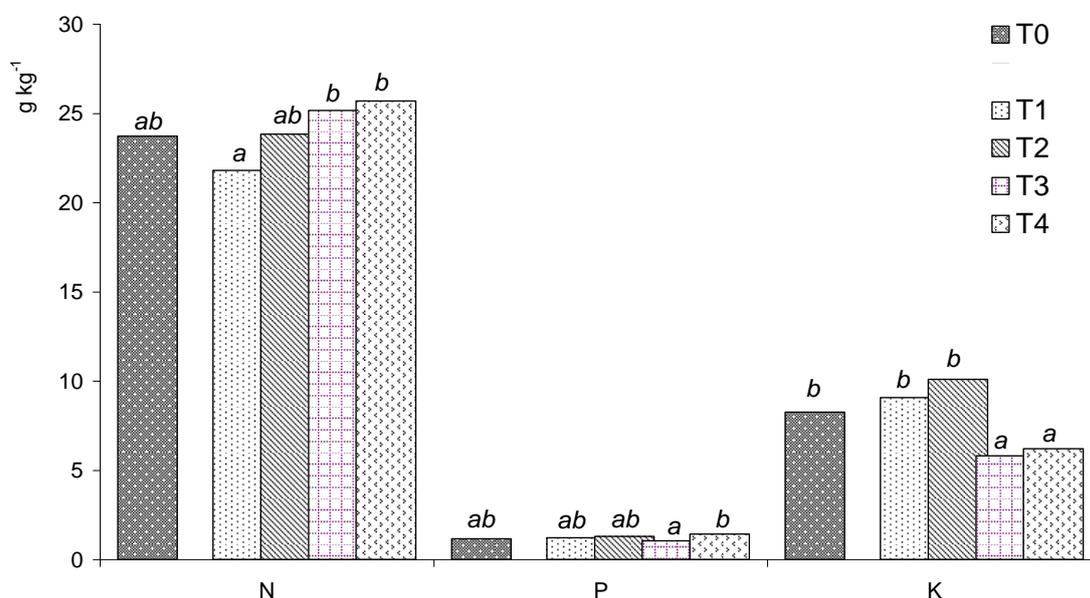


Figura 28. Teores de macronutrientes principais (g kg^{-1}) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados. (para o mesmo elemento nutritivo, barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05).

Estes resultados traduzem a importância bioquímica de cada elemento assim como a respetiva disponibilidade química e biológica no solo para as plantas, ou seja, cada elemento tem uma função importante nos processos bioquímicos na planta, relacionados com o respetivo papel que apresentam ao nível dos processos bioquímicos; o azoto como elemento integrante dos aminoácidos ou proteínas; o magnésio fundamental na construção da clorofila e o potássio na manutenção dos potenciais iónicos na célula, na abertura e fecho dos estomas, importante na absorção de nutrientes e água. Assim, para o

N, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos estudados e o tratamento controlo (T₀), com os efeitos da adubação potássica e magnésiana, como das respetivas doses, a não se fazerem sentir nos teores foliares de N. Este facto poderá ser explicado pela ausência deste elemento nos fertilizantes usados, com as necessidades nutritivas de N das plantas a serem garantidas pelo solo, a partir dos processos de decomposição e mineralização da matéria orgânica, cujos teores no solo apresentaram valores médios (Quadro 4). Ainda assim, é possível observar que os tratamentos sem aplicação de Mg (T₁ e T₂) apresentaram menores teores de N que os restantes tratamentos (Figura 28), o que poderá estar associado à importância que este elemento tem nos processos de fotossíntese, podendo limitar a integração de N na construção celular ou produção biomassa.

Em relação aos teores foliares de K, ao contrário do observado para o N, os resultados revelaram diferenças significativas entre os tratamentos estudados, nomeadamente ao nível do tipo de fertilização foliar (Figura 28). Neste caso, como seria de esperar, os tratamentos sem aplicação de potássio (T₃ e T₄), apresentaram teores foliares significativamente inferiores aos tratamentos com aplicação deste elemento (T₁ e T₂) mas, também, ao tratamento testemunha (T₀). Por sua vez, nos tratamentos T₁ e T₂, com e sem aplicação de K e Mg, respetivamente, os teores foliares de K revelaram-se mais elevados que os registados no T₀, embora sem apresentarem diferenças significativas (Figura 28). No caso das doses aplicadas, o reforço da adubação magnésiana ou potássica não se reflete num acréscimo significativo dos teores foliares de K, aspeto que se revela mais importante no caso da adubação potássica. Estes resultados estarão relacionados com os níveis de suficiência de K no solo (Quadro 4), que terão mitigado possíveis efeitos das maiores doses de K aplicados no T₂ em relação a T₁.

O P foi, de todos os macronutrientes principais o que apresentou os menores teores foliares. Estes resultados traduzem os baixos teores do solo (Quadro 4) mas, também, a reduzida dinâmica que limita de forma significativa a sua disponibilidade durante o ciclo cultural (Santos, 2015). Em termos dos teores foliares de P, os resultados revelaram valores equiparáveis entre os tratamentos estudados. As aplicações de K ou Mg não revelaram qualquer efeito nos teores foliares de P apesar das relações de antagonismo e sinergismo que, respetivamente, estes elementos apresentam com o P (Santos, 2017). Estas relações de causa-efeito foram mais notadas no caso do Mg, nomeadamente para o caso do efeito da dose de fertilização, no qual é observado um aumento significativo dos teores foliares de P com o aumento da fertilização em Mg (Figura 28).

3.1.2. Macronutrientes secundários

Para os macronutrientes secundários são apresentados na Figura 29 os respectivos teores foliares obtidos para os tratamentos estudados. Os resultados revelam teores variados entre os elementos analisados, refletindo a sua importância biológica diferenciada, com os valores a diminuir na ordem indicada: cálcio, magnésio e enxofre. Para os teores foliares de cálcio (Ca) apenas os tratamentos com adubação magnesiana (T₃ e T₄) revelaram aumentos significativos comparativamente ao tratamento T₀. Por sua vez, em relação aos teores foliares de Mg e S, mantem-se a tendência observada apenas no tratamento com a dose mais elevada de magnésio (T₄) (Figura 29).

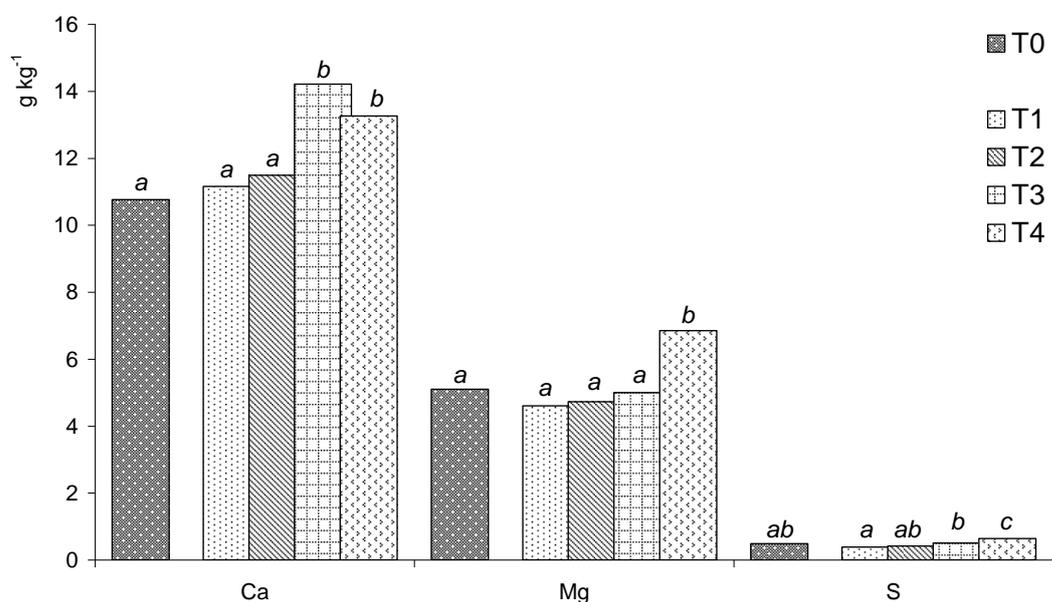


Figura 29. Teores de macronutrientes secundários (g kg⁻¹) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados. (para o mesmo elemento nutritivo, barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05).

Em termos das quantidades aplicadas, apenas nas doses mais elevadas com Mg é que se registaram aumentos significativos destes nutrientes (Ca, Mg e S) para níveis de fertilização adequados para a cultura (Santos, 2008). Uma vez mais, a adubação potássica (T₁), tal como o seu reforço, com o aumento da dose aplicada (T₂), não promoveu acréscimos significativos dos teores foliares dos macronutrientes secundários analisados. As relações de antagonismo entre o K e os elementos Ca e Mg poderão explicar estes

resultados (Santos, 2017). Relativamente ao S, os resultados parecem não depender do tipo e dose de fertilização com exceção, como foi referido anteriormente, para a dose mais elevada de fertilização magnésiana (T₄). Nestes casos, com a devida exceção, os resultados estarão mais relacionados com os processos de disponibilidade deste elemento a partir da mineralização da matéria orgânica do solo.

3.1.3. Micronutrientes

No Quadro 7 são apresentados os teores de micronutrientes (mg kg⁻¹) presentes nas folhas, para os diferentes tratamentos estudados. Também para estes elementos os resultados evidenciam efeitos diferenciados do tipo e dose de fertilização nos respetivos teores foliares.

Quadro 7. Teores de micronutrientes (mg kg⁻¹) presentes nas folhas, para os tratamentos de fertilização foliar estudados.

tratamento/ micronutriente	B	Fe	Zn	Mn	Cu
T ₀	21,6 ^a	72,2 ^{bc}	11,3 ^{ab}	57,0 ^{ab}	6,1 ^a
T ₁	20,8 ^a	74,0 ^c	10,9 ^{ab}	60,3 ^b	6,3 ^{ab}
T ₂	22,0 ^a	76,8 ^c	11,9 ^b	73,2 ^c	6,2 ^a
T ₃	24,9 ^b	63,7 ^a	9,6 ^{ab}	51,4 ^a	6,5 ^b
T ₄	26,6 ^c	65,2 ^{ab}	9,3 ^a	54,3 ^{ab}	6,8 ^c

(para o mesmo elemento nutritivo, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05)

No caso do boro (B), os teores foliares indicam níveis de suficiência para a cultura em todos os tratamentos (LQARS, 2001). Os teores revelaram-se mais elevados nos tratamentos T₃ e T₄, com a fertilização magnésiana a promover aumentos significativos comparativamente ao tratamento testemunha (T₀) e aos tratamentos com fertilização potássica (T₁ e T₂). Tendência similar foi, também, observada para o elemento cobre (Cu) no qual, uma vez mais, a fertilização magnésiana (T₃ e T₄) promoveu aumentos nos respetivos teores foliares. Para estes elementos, o efeito da dose revelou-se significativo apenas na fertilização magnésiana, com o tratamento com a dose alta (250 g hL⁻¹) (T₄) a promover aumentos dos teores foliares de B e Cu em relação ao tratamento com dose baixa (125 g hL⁻¹) (T₃). A aplicação de FORALG, como fonte de B em todos os tratamentos, permitiu que os respetivos teores apresentassem níveis foliares adequados

deste elemento para a cultura em todos os tratamentos (LQARS, 2001). Todavia, nos tratamentos com aplicação de ENERMAX, T₀, T₁ e T₂, nos quais foram aplicadas doses variadas de K, os menores teores registados nestes casos estão relacionados com os efeitos de antagonismo que este elemento exerce sobre o B, limitando a respetiva disponibilidade e absorção nestes tratamentos.

Os teores foliares de ferro (Fe) estão abaixo do intervalo de suficiência indicado para a cultura, em todos os tratamentos estudados. Ainda assim são observadas diferenças entre tratamentos (Quadro 7). Assim, para este elemento, os resultados revelam uma tendência oposta à observada para os casos do B e Cu, com os tratamentos com adubação potássica (T₁ e T₂) a revelar teores mais elevados e significativos que os tratamentos com adubação magnésiana (T₃ e T₄). Em ambos os casos, o efeito da dose não se revelou significativo, com o aumento das quantidades de K ou Mg aplicadas, T₂ e T₄, respetivamente, a não promover aumentos dos teores de Fe, comparativamente aos tratamentos com aplicações de doses mais baixas, T₁ e T₃ (Quadro 7). As características alcalinas e a influência que este elemento apresenta no aumento do pH, poderão contribuir para uma menor disponibilidade de micronutriente, facto que poderá explicar os teores foliares mais baixos deste micronutriente observados nos tratamentos T₃ e T₄.

Em relação aos restantes micronutrientes, Zn e Mn, os teores foliares apresentaram-se adequados para a cultura em todos os tratamentos. Nestes elementos, os resultados apresentam uma tendência similar à observada para o caso do Fe, com os tratamentos com K (T₁ e T₂) a registar teores foliares significativamente mais elevados que os tratamentos com Mg (T₃ e T₄) (Quadro 7). Nestes casos, o efeito da dose ou quantidade de fertilizante foi apenas registado no Mn, com o tratamento T₂ a revelar teores foliares mais elevados e significativos que os observados para o T₁. Estes efeitos poderão estar associados, uma vez mais, com as relações de sinergismo e antagonismo observadas entre os elementos aplicados e os micronutrientes Zn e Mn. Dibb *et al.* (1985) fazem referência à relação de sinergismos entre o K e Mn, efeito que poderá explicar os maiores teores deste micronutriente registados nos tratamentos com K. Por sua vez, os menores teores de Zn nos tratamentos com adubação magnésiana (T₃ e T₄) estarão relacionados com a inibição competitiva entre estes elementos, como referem Oliver *et al.* (1994).

As interações nutricionais podem, ainda, interferir na composição mineral, podendo um elemento estimular ou inibir a absorção de outros elementos (Mengel e Kirby, 1979). Deste modo, os menores teores de Zn nos tratamentos com Mg (T₃ e T₄)

poderão estar relacionados com os maiores teores de B observados nestes tratamentos (Quadro 7). Vários estudos, em outro tipo de culturas, revelam a diminuição dos teores de Zn em função do aumento da concentração de B (Lopez-Lefebvre *et al.*, 2002; Rajaie *et al.*, 2009).

3.2. Caracterização biométrica do fruto

No Quadro 8 apresentam-se os valores dos parâmetros biométricos dos frutos sujeitos aos diferentes tratamentos. Após a análise estatística dos dados obtidos (pela ANOVA a um fator), verifica-se que os tratamentos influenciaram significativamente o peso, a altura e os diâmetros menor e maior das cerejas. O peso médio do fruto variou entre 6,99 e 8,12 g, sendo que os frutos mais pesados foram obtidos em árvores tratadas com K, quer na dose baixa, quer na dose mais elevada (T₁ e T₂). Apesar do peso do fruto proveniente de cerejeiras tratadas com dose baixa de K ser estatisticamente idêntico ao registado para o tratamento com dose alta de K, verifica-se um impacto positivo no peso do fruto quando este nutriente é usado em dose alta, apresentado assim uma média de peso superior (8,12g) a todos os outros tratamentos. Este aumento pode ser explicado pelo aumento de K nas folhas de cerejeira, uma vez que segundo Robbins *et al.* (1982), 17 a 20% da variabilidade do peso do fruto poderá ser explicada pela presença deste nutriente. Destaca-se ainda que não se observaram diferenças significativas no peso dos frutos entre o grupo controlo e os tratamentos com Mg (T₁ e T₂). Estudos realizados por Ruhl *et al.* (1992), obtiveram descidas pouco acentuadas no peso da uva quando esta foi sujeita ao tratamento com Mg, e ligeiras subidas no peso com o tratamento com K. No tratamento controlo, o peso médio do fruto foi de 7,35 g, valor este que vai de encontro aos resultados obtidos por Gonçalves *et al.* (2004) para frutos da mesma cultivar.

Relativamente aos outros parâmetros biométricos (altura, diâmetro maior e diâmetro menor) verificou-se geralmente a mesma tendência, i.e., maiores dimensões nos frutos tratados com K (T₃ e T₄) (Quadro 8).

Quadro 8. Parâmetros biométricos dos frutos, para os tratamentos de fertilização foliar estudados.

Tratamento	Peso (g)	Altura (mm)	Diâmetro Maior (mm)	Diâmetro Menor (mm)
T ₀	7,35 ± 0,73 ^{ab}	22,49±1,06 ^{ab}	24,71±1,10 ^a	20,86±0,91 ^{ab}
T ₁	7,63 ± 0,79 ^{bc}	21,97±1,06 ^a	25,63±1,14 ^{bc}	20,99±0,79 ^{ab}
T ₂	8,12 ± 1,04 ^c	22,68±1,15 ^{bc}	25,76±1,42 ^c	21,48±1,17 ^b
T ₃	7,54 ± 0,53 ^b	23,30±0,80 ^c	25,67±0,91 ^c	20,90±0,62 ^{ab}
T ₄	6,99 ± 0,43 ^a	22,09±0,68 ^{ab}	24,88±0,69 ^{ab}	20,57±0,93 ^a

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05; médias (n=30) ± desvio-padrão)

3.3. Caracterização histológica do fruto

Na Figura 30 apresentam-se microfotografias de cortes histológicos transversais dos frutos após os tratamentos de fertilização foliar estudados e que foram utilizados para as medições dos parâmetros histológicos que estão apresentadas no Quadro 9. O fruto é constituído pela epiderme revestida pela cutícula e uma camada mais interna de hipoderme, que constitui o tecido de proteção do fruto (Figura 30). Mais internamente, surge o parênquima de reserva, que é constituído por células de maiores dimensões.

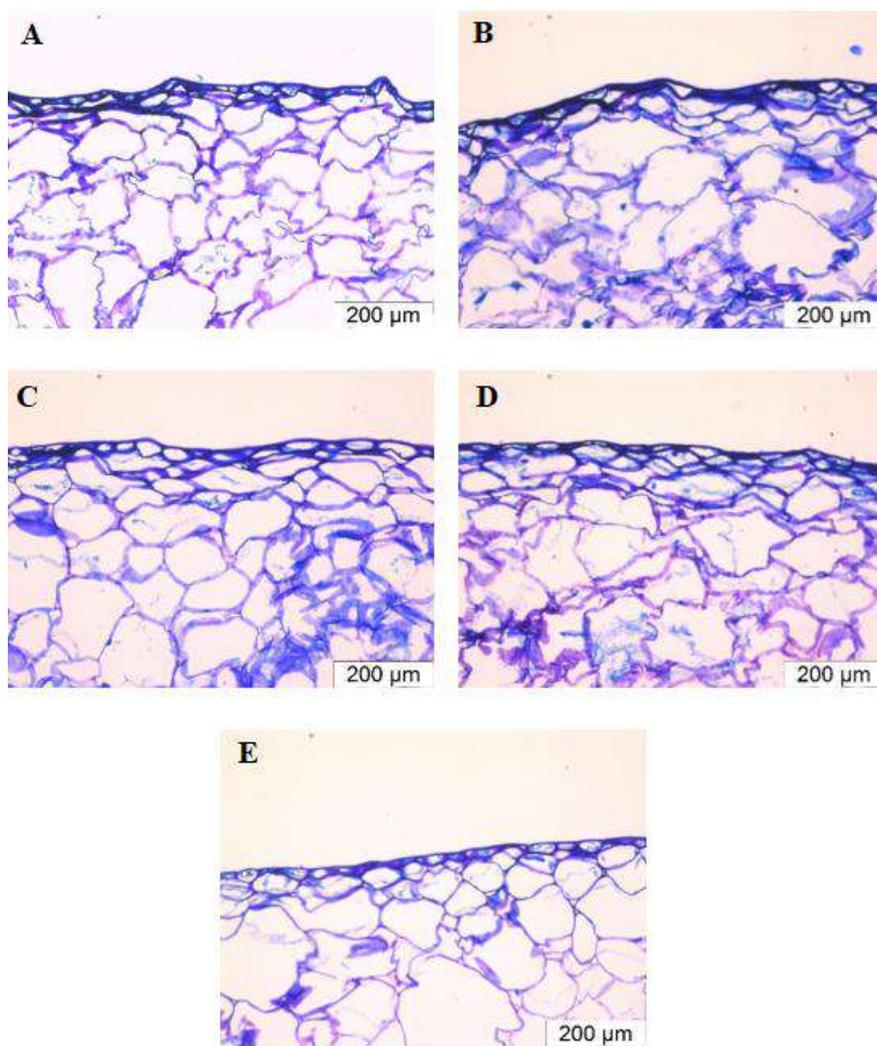


Figura 30. Corte histológico da cereja. A - T1, Fruto com dose baixa de K; B - T2, Fruto com dose alta de K; C - T3, Fruto com dose baixa de Mg; D - T4, Fruto com dose alta de Mg; E – Fruto controle.

Relativamente aos parâmetros histológicos, e como se pode verificar pelo Quadro 9, os tratamentos aplicados não alteraram significativamente a espessura da cutícula e da epiderme, bem como da área das células da epiderme, relativamente às cerejas controle. Já no que se refere à área das células da hipoderme e do parênquima de reserva já se registaram diferenças significativas entre tratamentos. Os valores mais elevados daqueles parâmetros foram observados nas cerejas em T₁, T₂ e T₃, o que vai de encontro ao observado para os parâmetros biométricos, peso e calibre (Quadro 8).

Quadro 9. Parâmetros histológicos do fruto para os tratamentos de fertilização foliar estudados.

Tratamento	Cutícula (µm)	Espessura da epiderme (µm)	Área das células da epiderme (µm ²)	Área das células da hipoderme (µm ²)	Área das células do parênquima de reserva (µm ²)
T ₀	4,77±0,37 ^a	18,00±1,83 ^{ab}	573,20±81,08 ^a	2091,18±514,40 ^a	15449,30±2448,25 ^a
T ₁	4,23±0,81 ^a	13,81±3,40 ^a	472,76±124,82 ^a	6153,20±1476,53 ^b	26563,52±9061,30 ^b
T ₂	4,50±0,84 ^a	19,57±2,92 ^b	606,71±171,72 ^a	5346,06±1712,59 ^b	18505,56±4699,68 ^a
T ₃	4,88±0,94 ^a	17,50±3,77 ^{ab}	531,19±110,47 ^a	5461,38±1666,70 ^b	20478,67±7117,66 ^{ab}
T ₄	4,71±0,91 ^a	16,00±3,02 ^{ab}	453,85±84,65 ^a	2403,54±918,80 ^a	16066,55±3413,28 ^a

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=24) ± desvio-padrão)

3.4. Cor, força de rutura da epiderme e firmeza

No Quadro 10 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros cromáticos dos frutos após os diferentes tratamentos com fertilizantes. É de salientar que se registaram efeitos significativos dos tratamentos em todos os parâmetros cromáticos avaliados (L^* , a^* , b^* , C^* , h). A luminosidade do fruto (L^*) variou entre 31,26 em T₂ e 32,51 em T₃. Em relação aos outros parâmetros cromáticos, os valores mais baixos foram observados em frutos T₂ e os mais altos em cerejas controlo. Os valores médios dos parâmetros cromáticos das cerejas controlo são similares aos obtidos por Gonçalves *et al.* (2007) para a cv. Burlat.

Em suma, os frutos em T₂ (dose elevada de K) exibiram uma diminuição de todos os parâmetros cromáticos estudados, em concordância com o obtido por Kadir (2019). Segundo Rowley (2013), a cor dos frutos melhorava positivamente quando era utilizado um fertilizante com Mg, o vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo.

Quadro 10. Parâmetros cromáticos do fruto para os tratamentos de fertilização foliar estudados.

Tratamento	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	(<i>h</i> *)
T ₀	31,54±2,64 ^{ab}	25,22±5,12 ^c	10,23±3,63 ^c	27,25±6,10 ^c	21,44±3,06 ^c
T ₁	31,49±2,32 ^{ab}	21,84±5,07 ^{ab}	7,86±3,20 ^{ab}	23,25±5,84 ^{ab}	19,17±3,15 ^{ab}
T ₂	31,26±1,58 ^a	19,84±4,26 ^a	6,55±2,39 ^a	20,92±4,76 ^a	17,76±2,92 ^a
T ₃	32,51±2,35 ^b	24,10±4,88 ^{bc}	9,51±3,45 ^c	25,95±5,80 ^{bc}	20,96±2,92 ^c
T ₄	32,23±4,95 ^{ab}	23,34±4,32 ^{bc}	8,71±2,64 ^{bc}	24,94±4,95 ^{bc}	20,04±2,45 ^{bc}

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=60) ± desvio-padrão)

Os resultados obtidos para a força necessária para a rutura da epiderme e firmeza dos frutos após tratamentos encontram-se no Quadro 11. A sua análise revela que as cerejas sujeitas à aplicação de fertilizantes apresentam valores de força de rutura da epiderme e de firmeza significativamente mais elevados do que as cerejas controlo (T₀).

Relativamente à força de rutura da epiderme, esta decresceu da seguinte forma em cerejas sujeitas aos tratamentos: T₂ > T₁ > T₄ > T₃ > T₀ (Quadro 11). A aplicação de K em dose mais alta teve um impacto positivo no aumento da firmeza do fruto, sendo esta um atributo de qualidade muito valorizado pelo consumidor.

Os tratamentos com Mg (T₃ e T₄) aumentaram a força da rutura da epiderme e firmeza, comparando com o grupo controlo, embora as diferentes doses tenham apresentado resultados estatisticamente iguais.

Quadro 11. Força de rutura da epiderme (N) e firmeza (N mm⁻¹), para a cereja doce nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Força de rutura da epiderme (N)	Firmeza (N mm ⁻¹)
T ₀	1,76±0,33 ^a	0,52±0,09 ^a
T ₁	2,45±0,41 ^c	0,54±0,07 ^{ab}
T ₂	2,55±0,36 ^c	0,58±0,10 ^b
T ₃	2,17±0,24 ^b	0,54±0,07 ^{ab}
T ₄	2,19±0,33 ^b	0,53±0,07 ^{ab}

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=30) ± desvio-padrão)

3.5. Teor em sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável

O Quadro 12 apresenta os resultados obtidos na medição do teor em sólidos solúveis totais (SST), pH e acidez titulável (AT) após os tratamentos com adubação magnesiana e potássica. Pela análise do Quadro 12 verifica-se que os teores em SST foram significativamente mais elevados em todos os tratamentos (aplicação de K ou Mg), comparativamente às cerejas controlo (T₀). No entanto, o teor em SST foi superior nas cerejas tratadas com K (T₁ e T₂), embora os valores não tenham sido estatisticamente diferentes entre doses do mesmo fertilizante. Para as cerejas em T₀ o teor em SST foi de 14,7 °Brix, o que está em consonância com o intervalo de 13,5 ° - 15,5 °Brix, obtido por Faniadis *et al.* (2010), para cerejas da cv. Burlat produzidas em áreas e altitudes distintas.

Em relação aos outros dois parâmetros, pH e AT do fruto, não se registaram diferenças significativas entre tratamentos (Quadro 12). O pH é um parâmetro com elevada relevância nas características sensoriais do fruto. Nas cerejas T₀, o pH médio obtido foi de 3,7, o que está de acordo com o intervalo de pH 3,4 - 4,0 obtido por Girard *et al.* (1998). Segundo Ruhl *et al.* (1992), a aplicação de Mg resultou numa ligeira subida de pH, ao contrário do K que fez descer o pH em videira. Estes resultados estão de acordo com o presente estudo.

Quadro 12. Teor em sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável na cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados.

Tratamento	SST (°Brix)	pH	Acidez titulável (% ácido málico)
T ₀	14,70±0,30 ^a	3,70±0,02 ^a	5,07±1,15 ^a
T ₁	17,60±0,46 ^c	3,74±0,04 ^a	6,18±0,39 ^a
T ₂	17,33±0,25 ^c	3,84±0,01 ^a	5,10±0,23 ^a
T ₃	16,07±0,31 ^b	3,64±0,03 ^a	5,31±0,58 ^a
T ₄	15,33±0,51 ^{ab}	3,67±0,03 ^a	4,89±0,33 ^a

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=3) ± desvio-padrão)

3.6. Determinação do teor em compostos fenólicos

O Quadro 13 apresenta os teores médios de compostos fenólicos totais, orto-difenóis, flavonoides e antocianinas totais das cerejas à colheita após os diferentes tratamentos.

Na determinação da concentração de fenóis totais, observa-se que a aplicação de Mg em dose baixa (T₃) apresenta uma média de concentrações superiores no teor de flavonoides e antocianinas totais, com valores de 1,10 e 0,72 mg g⁻¹ de PS, respectivamente. Como consequência a concentração de fenóis totais também aumentou, ou seja, este tratamento teve um impacto positivo no teor de fenóis totais obtidos (4,84±0,18 mg g⁻¹ de PS). Apesar de as concentrações de antocianinas dos tratamentos com Mg serem estatisticamente iguais, a média da concentração de antocianinas foi superior no tratamento T₃. No caso do teor de orto-difenóis nos frutos, os tratamentos com K (T₁ e T₂) evidenciam valores superiores aos outros tratamentos, como se pode observar no Quadro abaixo. O composto fenólico com maiores concentrações obtidas em todos os tratamentos estudados, pertencem à classe dos flavonoides, o que vai ao encontro dos estudos realizados por Gonçalves *et al.* (2019), onde afirma que os flavonoides são a classe de fenóis que predominam na cereja doce. As concentrações de antocianinas totais obtidas são a segunda classe de fenóis com valor superior. Estudos realizados em cereja doce da cv. Burlat afirmam que esta variedade é das mais ricas no teor de antocianinas totais, de acordo com Gonçalves *et al.* (2019).

Um estudo realizado com dezassete diferentes cultivares de cereja doce, incluindo a cv. Burlat, obteve um teor flavonoides de 0,73 mg g⁻¹ de PS, o que vai de encontro ao estudo presente, para o teor de antocianinas o valor obtido teria sido de 0,69 mg g⁻¹ de PS, o que também pode ser confirmado de acordo com o estudo presente (Prvulović *et al.*, 2011).

Quadro 13. Análise da composição fenólica na cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados.

Tratamento	Fenóis totais (mg g ⁻¹ PS)	Orto-difenóis (mg g ⁻¹ PS)	Flavonoides (mg g ⁻¹ PS)	Antocianinas totais (mg g ⁻¹ PS)
T ₀	4,68±0,18 ^b	0,11±0,01 ^a	0,87±0,10 ^{ab}	0,61±0,07 ^{ab}
T ₁	3,78±0,18 ^a	0,13±0,01 ^b	0,66±0,08 ^a	0,66±0,09 ^{abc}
T ₂	4,27±0,14 ^a	0,13±0,01 ^b	0,74±0,12 ^a	0,59±0,02 ^a
T ₃	4,84±0,18 ^b	0,10±0,01 ^a	1,10±0,32 ^b	0,72±0,06 ^c
T ₄	4,82±0,37 ^b	0,10±0,01 ^a	0,99±0,07 ^b	0,69±0,04 ^{bc}

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05 (n=9), médias ± desvio-padrão)

As cerejas sujeitas aos diferentes tratamentos apresentam o mesmo perfil fenólico que consta da Figura 31. Foi possível identificar vários compostos, nomeadamente: catequina, epicatequina, ácido neoclorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogénico, ácido cafeico, quercitina-3-*O*-rutinósido, luteolina-7-*O*-glucósido, luteolina-7-*O*-rutinósido, cianidina-3-*O*-rutinósido e cianidina-3-*O*-glucósido. Estas duas últimas pertencem à classe das antocianinas, sendo que a cianidina-3-*O*-rutinósido está presente em maiores concentrações tendo um valor de 336 µg g⁻¹ de PS em T₀ (Quadro 14B). No caso dos tratamentos com K (T₁ e T₂), ao observar o Quadro 14A e 14B, pode-se afirmar que comparativamente aos tratamentos T₃ e T₄, existiu descida da concentração de todos os compostos fenólicos apresentados. Observando-se um impacto positivo nos tratamentos nos quais foi usado o Mg em ambas as doses (T₃ e T₄). Podemos ainda dizer que existiu um aumento da concentração da cianidina-3-*O*-glucósido em todos os tratamentos, apesar de este impacto positivo ter sido superior nos tratamentos com Mg (T₃ e T₄).

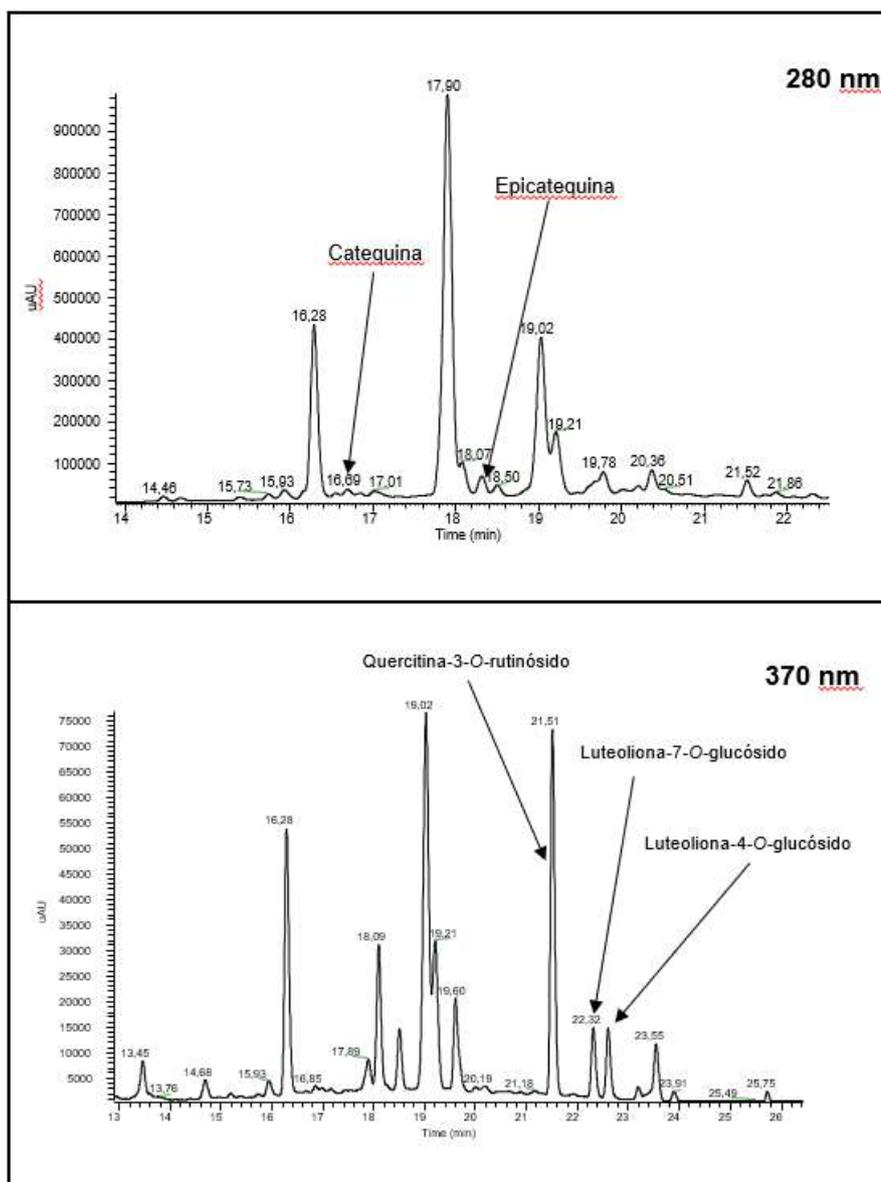


Figura 31a. Perfil fenólico da cereja doce obtido por HPLC-DAD. Cromatogramas obtidos a 280 e 370 nm.

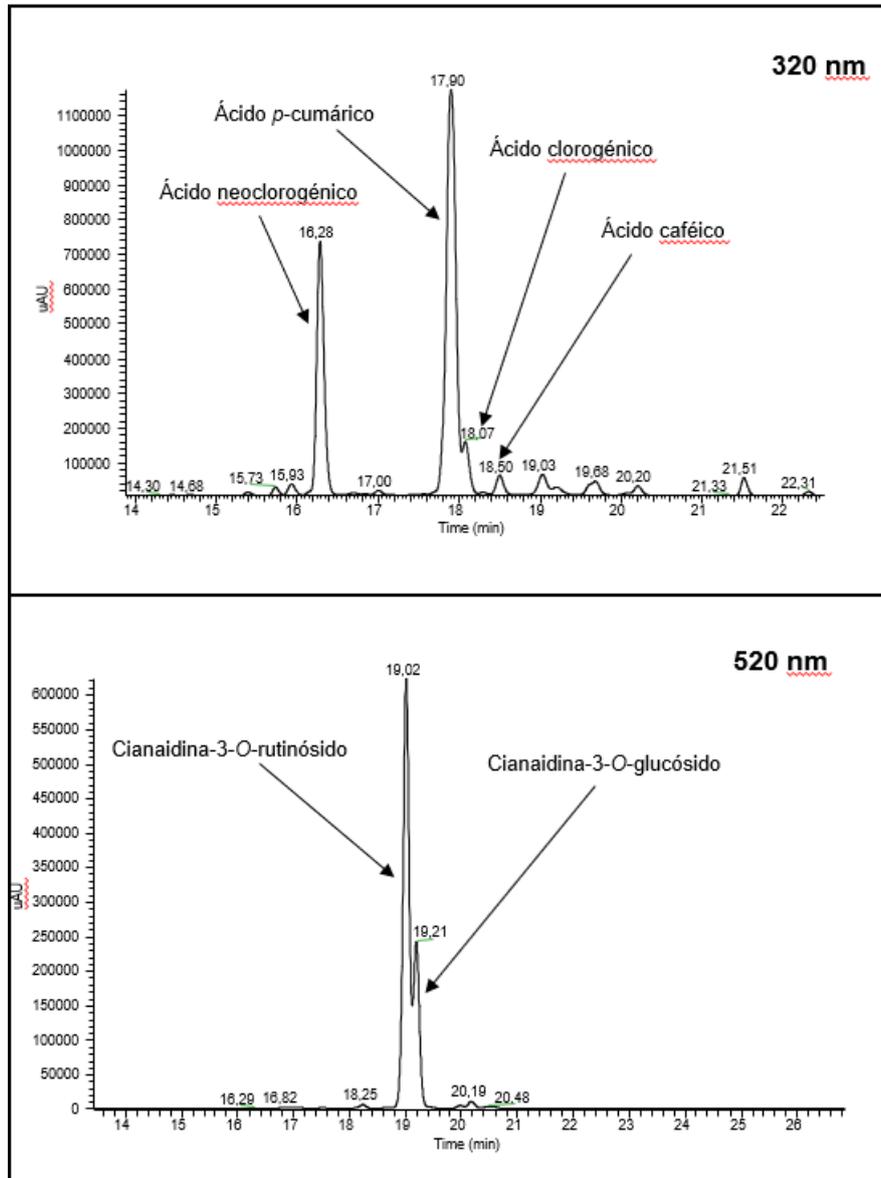


Figura 31b. Perfil fenólico da cereja doce obtido por HPLC-DAD. Cromatogramas obtidos a 320 e 520 nm.

Quadro 14A. Teor de compostos fenólicos obtidos por HPLC-DAD para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados.

Tratamento	Catequina ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Epicatequina ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Ácido neoclorogénico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Ácido <i>p</i> - cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Ácido clorogénico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)
T ₀	77,83±13,80 ^b	67,39±11,38 ^a	637,79±27,48 ^b	563,23±56,88 ^b	165,94±2,17 ^d
T ₁	16,89±1,67 ^a	77,04±6,37 ^a	434,66±10,48 ^a	383,92±18,59 ^a	88,29±2,97 ^{ab}
T ₂	23,07±6,29 ^a	67,27±13,06 ^a	428,69±10,08 ^a	400,32±18,09 ^a	75,41±25,82 ^a
T ₃	73,70±14,77 ^b	87,93±17,85 ^a	662,96±58,49 ^b	585,67±61,91 ^b	123,34±6,32 ^{bc}
T ₄	87,02±21,11 ^b	78,67±13,45 ^a	696,04±93,06 ^b	568,98±79,61 ^b	145,30±20,76 ^{cd}

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=9) ± desvio-padrão)

Quadro 14B. Teor de compostos fenólicos obtidos por HPLC-DAD para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados (cont. do Quadro 14A).

Tratamento	Ácido cafeico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Luteolina-4- <i>O</i> -glucósido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Cianidina-3- <i>O</i> -rutinosido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)
T ₀	42,79±3,24 ^a	73,36±0,55 ^{bc}	16,56±1,42 ^a	15,68±1,42 ^{bc}	335,71±20,24 ^a b	56,42±1,90 ^a
T ₁	36,43±6,90 ^a	60,33±0,68 ^{ab}	17,90±0,86 ^a	11,43±0,53 ^{ab}	258,32±7,24 ^a	87,58±10,17 ^{ab}
T ₂	26,72±6,43 ^a	58,21±2,00 ^a	16,99±1,19 ^a	8,87±0,69 ^a	251,24±26,61 ^a	87,54±10,90 ^{ab}
T ₃	42,99±4,82 ^a	64,66±6,14 ^{abc}	19,54±2,06 ^a	15,48±2,05 ^{bc}	390,07±55,87 ^b	114,84±17,46 ^b
T ₄	41,60±12,01 ^a	77,53±10,58 ^c	20,32±3,44 ^a	19,07±3,01 ^c	430,43±86,94 ^b	103,32±21,51 ^b

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias (n=9) ± desvio-padrão)

3.7. Atividade antioxidante total

O Quadro 15 representa os valores de atividade antioxidante pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP que foram obtidos para as cerejas após os diferentes tratamentos. Pela análise do Quadro 15 verifica-se que, de uma maneira geral, a atividade antioxidante das cerejas foram significativamente mais elevadas com a fertilização Mg (T₃ e T₄), o que pode estar relacionado com a maior concentração de polifenóis (fenóis totais, flavonoides e antocianinas totais, Quadro 13), e principalmente devido à elevada concentração de ácidos hidroxicinâmicos: ácido neoclorogénico, ácido *p*-cumárico e ácido clorogénico,

dos flavan-3-ols catequina e epicatequina e das antocianinas cianidina-3-*O*-rutinósido e cianidina-3-*O*-glucósido (Quadro 14A e 14B). Estes resultados vão de encontro ao observado por Gonçalves *et al.* (2004) e Prvulovic *et al.* (2011).

Quadro 15. Atividade antioxidante pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP, para a cereja doce, nos diferentes tratamentos utilizados.

Tratamento	ABTS ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	DPPH (% de inibição)	FRAP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
T ₀	67,61±18,94 ^b	40,10±4,43 ^b	36,94±2,92 ^b
T ₁	29,88±15,30 ^a	32,96±3,79 ^a	27,82±1,63 ^a
T ₂	23,49±5,78 ^a	36,62±2,88 ^{ab}	30,24±1,64 ^a
T ₃	72,59±12,99 ^b	53,66±6,68 ^c	44,33±3,87 ^c
T ₄	61,36±11,69 ^b	51,55±2,55 ^c	42,58±3,52 ^c

(para o mesmo parâmetro, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, para um nível de probabilidade de 0,05, médias(n=9) ± desvio-padrão)

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

Este estudo tinha como objetivo analisar o efeito da aplicação da fertilização magnésiana e potássica na qualidade, composição fenólica e atividade antioxidantes dos frutos da cv. de cerejeira Burlat. Consideramos que o objetivo foi plenamente alcançado e as principais conclusões retiradas deste estudo são:

- Nas folhas, os resultados evidenciaram efeitos significativos nos teores de macro e micronutrientes. Para os macronutrientes, os maiores efeitos foram observados no caso do Ca, com a fertilização magnésiana a promover valores mais elevados deste elemento que a adubação potássica. No caso dos micronutrientes, os efeitos mais notados foram observados para o Zn e Mn, com a aplicação de Mg e K a promover uma diminuição e aumento dos respetivos teores.

- Os frutos com aplicação de ENERMAX[®] (K) apresentaram-se mais pesados, de maior calibre e com área das células da hipoderme e do parênquima de reserva de maiores dimensões, com implicação positiva na firmeza do fruto. Já o teor em sólidos solúveis totais aumentou em cerejas com aplicação de K e Mg.

- A aplicação de KITPLANT Mg[®] em dose baixa promoveu um aumento da cor e teor de polifenóis das cerejas da cv. Burlat, facto que se refletiu numa atividade antioxidante mais elevada e, conseqüentemente, num aumento da qualidade e benefícios nutricionais.

- A atividade antioxidante das cerejas foram significativamente mais elevadas com a fertilização Mg, o que pode estar relacionado com a maior concentração de polifenóis (fenóis totais, flavonoides e antocianinas totais), e principalmente devido à elevada concentração de ácidos hidroxicinâmicos: ácido neoclorogénico, ácido *p*-cumárico e ácido clorogénico, dos flavan-3-ols catequina e epicatequina e das antocianinas cianidina-3-*O*-rutinosídeo e cianidina-3-*O*-glucósido.

Em suma, a aplicação de ENERMAX[®] pode ser utilizada com o objetivo de melhorar os atributos sensoriais da cereja, tornando-a mais atrativa para o consumidor, enquanto que com o KITPLANT Mg[®] o objetivo será aumentar a capacidade antioxidante.

Apesar dos resultados obtidos neste trabalho serem muito promissores, reportam apenas a um ano de estudo; considera-se assim ser necessário que mais anos serão

necessários para corroborar os resultados, de maneira a que se consiga retirar conclusões mais robustas. Futuramente, deverá ser considerado no delineamento do novo ensaio experimental diferentes doses de nutrientes, bem como a mistura dos 2 nutrientes, de maneira a que se consiga conciliar os dois objetivos: obter frutos maiores e com melhores propriedades antioxidantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas G., Khan M. Q., Jamil M., Tahir M. e Hussain F., 2009. Nutrient uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum*) as affected by zinc application rates. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 389–396. ISSN Print: 1560–8530; ISSN Online: 1814–9596.

Aires A., Carvalho R., Rosa E.A.S., Saavedra M.J., 2013. Phytochemical characterization and antioxidant properties of organic baby-leaf watercress produced under organic production system. *CyTA - Journal of Food* 11, 343-351.

Albuquerque T. G., Silva M. A., Oliveira M. B. P. P. e Costa H. S., 2018. Analysis, identification and quantification of anthocyanins in fruit juices. *Fruit Juices*, chapter 34, 693 – 737.

Balbino, L.R., 1968. O método Egner-Riehm na determinação do fósforo e potássio assimiláveis em solos de Portugal. *Revista Agronómica*. 51: 47-63.

Benites V. M., Carvalho M. C. S., Resende A. V., Polidoro J. C., Bernardi A. C. C. e Oliveira F. A., 2015. Potássio, cálcio e magnésio na agricultura brasileira, 16, 1-71. ISBN: 8598519057.

Benzie I. F. F. e Strain J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. e Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bravo L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, review article. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.

Bremner, J. M., e Mulvaney C.S., 1982. Nitrogen. In: *Methods of Soil Analysis* (A. L. Page et al., ed.) *Agronomy Monograph* 9, Part 2, 2nd ed. American Society of Agronomy, Madison, WI. Total. 595-624

Brinate S. V. B., Martins L. D., Rosa G. N. G. P., Cunha V. V., Sotero A. J., Amaral J. F. T., Junior W. C. J. e Tomaz M. A., 2015. Copper can influences growth, disease control and production in arabica coffee trees. *Australian Journal of Crop Science* AJCS 9(7):678-683. ISSN:1835-2707.

Borges L. L., Lúcio T. C., Gil E. S. e Barbosa E. F., 2011. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*, 7, 12.

Caballero B., Finglas P. M. e Toldrá F., 2016. *Encyclopedia of Food and Health*. ISBN 978-0-12-384947-2.

Cardoso L. M., Leite J. P. V. e Peluzio M. C. G., 2011. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. Artigo de revisão. *Revista Colombiana de Ciências Químicas Farmacéuticas*, 40 (1), 116-138.

Chaovanalikit A. e Wrolstad R. E., 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. Vol. 69, Nr. 1, *Journal of Food Science* 67-72.

Correia S., Schoutten R., Silva A. P. e Gonçalves B., 2018. Sweet cherry fruit cracking mechanisms and prevention strategies: A review. *Scientia Horticulturae* 240, 369–377.

Costa F.M.M., 2006. Avaliação das características agronômicas da cerejeira ‘de saco’ na região da Cova da Beira. Tese de Mestrado em Agricultura e Horticultura Sustentáveis. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia.

Crespi A. L., Castro A. S. e Bernardos S., 2005. *A Flora da Região Demarcada do Douro*, Vol. II (Sistemática e Taxonomia). João Azevedo Editor. ISBN: 972-9001-82-0.

Crisosto C.H., Crisosto G., Neri F. 2006. Understanding tree fruit quality based on consumer acceptance. *Acta Horticulturae*. 712, 183-190.

Dewanto V., Wu, X., Adom K. K., e Liu R. H., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.

Dibb, D.W. e Thompsn Jr. W.R., 1985. Interaction of potassium with other nutrients. pp. 515-533. In Munson, R.D. (Ed.). Potassium in agriculture. Madison: ASA, CSSA, SSA.

Edel K. H., Marchadier E., Brownlee C., Kudla J. e Hetherington A. M., 2017. The evolution of calcium-based signalling in plants. *Current Biology* 27, R667–R679, July 10.

Faquin V., 2005. Nutrição mineral de plantas. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a distância: solos e meio ambiente. UFLA / FAEPE.

Fan M., Ding H., Zhang G., Hu X. e Gong D., 2019. Relationships of dietary flavonoid structure with its tyrosinase inhibitory activity and affinity. *LWT - Food Science and Technology* 107, 25–34.

Faniadis D., Drogoudi P. D. e Vasilakakis M. 2010. Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae* 125, 301–304.

FAO., 2019 - Cherry Production. United Nations: Statistical Database-Agriculture, Food and Agricultural Organisation (FAO). Disponível online: <http://www.fao.org/faostat> (Acesso em 25 de Junho 2019).

Ferreira J., 2015. A cereja - um fruto de Maio mas só para alguns quintais. Esmeraldazul, revista online de Cristina Sales, Medicina Funcional Integrativa.

Ferretti G., Bacchetti T., Belleggia A. e Neri D., 2010. Cherry antioxidants: from farm to table, review article. *Molecules* 2010, 15, 6993-7005; doi:10.3390/molecules15106993. ISSN 1420-3049.

Foster-Poweel., Holt S. H.A. e Brand-Miller J. C., 2002. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002^{1,2}. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 5–56.

Garcia B., Coelho J., Costa M., Pinto J., e Paiva-Martins F., 2012. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1727–1732.

Giménez, M.J., Serrano, M., Valverde, J.M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., Guillén, F., 2016. Preharvest salicylic acid and acetylsalicylic acid treatments

preserve quality and enhance antioxidant systems during postharvest storage of sweet cherry cultivars, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1220-1228.

Girard B. e Kopp T. G., 1998. Physicochemical Characteristics of Selected Sweet Cherry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 471-476.

Glimn-Lacy J. e Kaufman P. B., 2006. *Botany illustrated, Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families*, second edition. Springer. ISBN-13: 978-0-387-28870-3.

Gomes, M.P., e A.A. Silva., 1962. Um novo diagrama triangular para classificação básica da textura do solo. *Estudos Agronômicos*. 3: 1-9.

Gonçalves A. C., Bento C., Jesus F., Alves G., Silva L. R., 2019. Sweet cherry phenolic compounds: identification, characterization, and health benefits, chapter 2. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59.

Gonçalves B., 2006. *Ecofisiologia da cerejeira (Prunus avium L.)*, composição fenólica e atividade antioxidante dos frutos. Tese de Doutorado, UTAD.

Gonçalves B., Landbo A.K., Let M., Silva A.P., Rosa E., Meyer A.S. 2004. Storage affects the phenolic profiles and antioxidant activities of cherries (*Prunus avium L.*) on human low-density lipoproteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1013-1020.

Gonçalves B., Landbo A. K., Knudsen D., Silva A. P., Pereira J. M., Rosa E. e Meyer A. S., 2004. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 523-530.

Gonçalves B., Silva A. P., Pereira J. M., Bacelar E., Rosa E. e Meyer A. S., 2007. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium L.*). *Food Chemistry* 103, 976-984.

GPPA, 2006. *Anuário Hortofrutícola*. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral.

Gutfinger T., 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(11), 966-968.

Hafeez B., Khanif Y. M. e Saleem M., 2013. Role of zinc in plant nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3(2): 374-391.

Harborne J. B. e Williams C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504. PII: S0031-9422(00)00235-1.

Havsteen B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67– 202. PII: S0163-7258(02)00298-X.

Houba, V.G., Novozamsky I., e Tenminghoff E., 1995. *Soil Analysis Procedures*. Department of soil science and plant nutrition, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

Kalra Y.P., e Maynard D.G., 1991. *Methods manual for forest soil and plant analysis*. For. Can. Northwest Reg., North. For. Cent. Edmonton, Alberta, Canada.

Kim D., Heo H. J., Kim Y. J., Yang H. S. e Lee C. Y., 2005. Sweet and Sour Cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9921-9927.

Kjeldahl J.Z., 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Analytical Chemistry* 22: 366.

Lee J., Durst R. W. e Wrolstad R. E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

Leghari S. J., Wahocho N. A., Laghari G. M., HafeezLaghari A., MustafaBhabhan G., HussainTalpur K., Bhutto T. A., Wahocho S. A. e Lashari A. A., 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9), 209-218. ISSN-1995-0756. EISSN-1998-1066.

Lopes T. J., Xavier M. F., Quadri M. G. N. e Quadri M. B., 2007. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology (CAST)*, 13(3), 291-297. ISSN 2317-2436.

López-Lefebre L.R., Rivero R.M., Garcia P.C., Sanchez E., Ruiz J.M. e Romero L., 2002. Boron effect on mineral nutrients of tobacco. *Journal of Plant Nutrition* 25: 509-522.

Loureiro G., Nave A. e Carvalho A., 2003. Folha viva, jornal dos clubes da Floresta do Projecto Prosepe Floresta com Vida. N. 25.

LQARS, 2001. Manual de fertilização das culturas. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 221.

Marschner H., 1985. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition. ISBN: 9780124735439, 9780080571874.

McCauley A., Jones C. e Jacobsen J., 2011. Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms. Nutrient Management Module, 9. MSU extension.

Mengel K. e Kirkby E. A. 1979. Principles of Plant Nutrition 2nd Edition. International Potash Institute Berne, Switzerland.

Mikiciuk G., Mikiciuk M., Moździer E., Statkiewicz M. e Chylewsa U., 2015. The effects of foliar nutrition with InCa fertilizer on the chemical composition of leaves and fruits of sweet cherry. Journal of Ecological Engineering, 16(2), 116-119.

Muhammad S., Sanden B. L., Saa S., Lampinen B. D., Smart D. R., Shackel K. A., DeJong T. M. e Brown P. H., 2017. Optimization of nitrogen and potassium nutrition to improve yield and yield parameters of irrigated almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. webb). Scientia Horticulturae 228, 204–212.

Murphy J., e Riley J.P., 1962 - A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. Analytical Chimica Acta 27: 31-36.

Nicoué E. É., Savard S. e Belkacemi K., 2007. Anthocyanins in wild blueberries of quebec: extraction and identification, 5626-5635.

Nilsson J., Pillai D., Önning G., Persson C., Nilsson A., e Akesson B., 2005. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Molecular Nutrition and Food Research, 49: 239-246.

Nussinovitch A., 2010. Plant Gum Exudates of the World – Sources, Distribution, Properties, and Applications. ISBN: 978-1-4200-5223-7.

Nyomora A. M. S., Brown P. H., Pinney K. e Polito V. S., 2000. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. Journal American Society of Horticultural Science 125(2):265–270.

O'Brien, T. P. e McCully, M. E., 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Melburn: Termarcaphy.

Oliveira G. L. S., 2015. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH*: estudo de revisão. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, 17(1), 36-44.

Oliver D. P., Hannam R. J., Tiller K. G., Wilhelm, N. S., Merry, R. H., and Cozens, G. D. 1994. The effects of zinc fertilization on cadmium concentration in wheat grain. Journal of Environmental Quality 23: 705–11.

Prvulović D., Malenčić D., Popović M., Ljubojević M. e Ognjanov V., 2011. Antioxidant properties of sweet cherries (*Prunus avium* L.) - Role of phenolic compounds. International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 5 (11), 676 – 679. ISNI:0000000091950263.

Quadrado A. C., Barroso M. e Rodrigues F., 2014. Fruticultura I. Apontamentos para a disciplina de “Produção Agrícola – Módulo 7 – Fruticultura I” do curso de Técnico de Produção Agrária. Escola Profissional Agrícola Conde de S. Bento.

Rajaie M., Ejraie A.K., Owliaie H.R. e Tavakoli A.R., 2009. Effect of zinc and boron interaction on growth and mineral composition of lemon seedlings in a calcareous soil. International Journal of Plant Production 39: 105-119.

Remón S., Venturini M. E., Lopez-Buesa P. e Oria R., 2003. Burlat cherry quality after long range transport: optimisation of packaging conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies 4, 425–434.

Ricardo C.P. e Teixeira A.N., 1993. Moléculas Biológicas. 4a edição. Didáctica Editora. 277.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. e Paganga G., 1996. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, review article. Free Radical Biology & Medicine, 20(7) ,933-956. SSDI 0891-5849(95)02227-9.

Robbins S., Chaplin M. H. e Dixon A. R., 1982. The effect of potassium soil amendments, trenching and foliar sprays on the mineral content, growth, yield and fruit quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.) and prune (*Prunus domestica* L.), Communications in Soil Science and Plant Analysis, 13:7, 545-560.

Rodrigues A., Chagas G. e Orgaz M.D.M., 2012. XXXII Jornadas Científicas de la AME (Alcobendas - Madrid): Meteorología y Calidad del Aire. FIS – Comunicações. ISBN: 84-695-6430-7.

Rowley S. D., 2013. Phosphorous and Potassium fertility management for maximizing tart. Cherry fruit quality and productivity on alkaline soils. Master of Science, Utah State University.

Ruhl E. H., Fuda A. P. e Treeby M. T., 1992. Effect of potassium, magnesium and nitrogen supply on grape juice composition of Riesling, Chardonnay and Cabernet Sauvignon vines. Australian Journal of Experimental Agriculture, 32, 645-9.

Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A. e Saura-Calixto F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 270-276.

Santos A. S. A., 2008. Cerejais. A árvore e o fruto. Projectos: PAMAF 2059, AGRO 86 e AGRO 941. 343.

Santos J.Q., 1965. Aspectos da correção da acidez do solo. Anais do Instituto Superior de Agronomia. 27: 11-67.

Santos J.Q., 2002. The municipal solid waste compost (MSWC): its importance to the Portuguese agriculture. Revista de Ciências Agrárias XXV(1-2): 28-39.

Santos J.Q., 2015. Fertilização. Fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos. Publindustria, 442 p.

Sauget G., 1945 – 1965 - Les CERISIERS Les CERISES A Montferrand. Á VOS PLUMES.

Sekse L., 1995. Fruit cracking in sweet cherries (*Prunus avium* L.). Some physiological aspects-a mini review. Scientia Horticulturae 63, 135-141. SSDI 0304-4238(95)00806-3.

Serradilla M. J., Hernández A., López-Corrales M., Ruiz-Moyano S., Córdoba M. G. e Martin A., 2016. Composition of the Cherry (*Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L.; Rosaceae). Chapter 6, Nutritional Composition of Fruit Cultivars.

Siddhuraju P. e Becker K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155.

Silva A.A., 1967. Determinação da textura do solo. Método da pipeta de robinson. *Pedologia* 2: 129-139

Silva J., Silva E. S. e Silva P. S. L., 2002. Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis nas diferentes partes do fruto da pinheira (*Annona squamosa* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 24, 2, 562-564, Agosto.

Simmonds M.S.J. e Preedy V.R., 2015. Nutritional composition of fruit cultivars. 1st ed., Kindle Edition. ISBN-10: 0124081177.

Singleton V. L. e Rossi J. A. Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *This Week's Citation Classic*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-58.

Smith M. A. L., Marley K. A., Seigler D., Singletary K. W., e Meline B., 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science*, 65(2), 352-356.

Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. 2015. Cherry. In *Food Composition and Nutrition Tables*. 8th edition, CRC Press, Boca Raton, 951.

Strasburger E., Noll F., Schenck H. e Schimper A. F. W., 2002. *Tratado de Botánica*, 8ª edición catellana. Ediciones Ômega. ISBN 84-282-0979-0.

Stratil P., Klejdus B., e Kuban V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607-616.

Thomas G.W., 1982. Exchangeable cations. In: Page, A. L. (Ed.) - *Methods of soil analysis Part 2. Chemical and microbiological properties (Second Edition)*. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 159-165.

USDA-U.S. Department of Agriculture, 2017. Nutrient values and weights. Fruits 09070 Sweet Cherry. National Nutrient Database for Standard Reference. The National Agricultural Library. Available online at: <http://ndb.nal.usda.gov>

Venturini M.E., Oria R. e Blanco D., 2002. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. Food Microbiology, 19, 15-21. doi:10.1006/fmic.2001.0443.

Voss, D. H. (1992) – Relating colourimeter measurement of plant colour to the royal horticultural society colour chart. HortScience, 27(12), 1256-1260.

Welk E., Rigo D. e Caudullo G., 2016. *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species | Tree species. 140-141.