



Valorização de resíduos de biomassa: avaliação da potencialidade de aplicação a novos produtos

MARIA INÊS DA COSTA TEIXEIRA

novembro de 2021

Valorização de resíduos de biomassa: avaliação da potencialidade de aplicação a novos produtos

MARIA INÊS DA COSTA TEIXEIRA

15 de Outubro de 2021

Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, ramo opcional de Qualidade

**Valorização de resíduos de biomassa:
avaliação da potencialidade de aplicação a
novos produtos**

Maria Inês da Costa Teixeira

15 de Outubro de 2021

Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, ramo opcional de Qualidade

Orientação

Cristina Delerue Matos, REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto,
Instituto Politécnico de Porto

Manuela M. Moreira, REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto,
Instituto Politécnico de Porto

Virgínia Cruz Fernandes, REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto,
Instituto Politécnico de Porto

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, especialmente ao Departamento de Engenharia Química.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras de dissertação de mestrado Dra. Virgínia Fernandes, Dra. Manuela Moreira e Dra. Cristina Delerue-Matos pela disponibilidade, por toda a ajuda prestada ao longo do desenvolvimento deste relatório, por todos os ensinamentos transmitidos, pela simpatia e principalmente pela paciência durante todo o período de orientação.

Agradeço também á Olena Dorosh, investigadora do GRAQ, por toda a ajuda prestada ao longo do tempo de trabalho que realizamos juntas.

Também gostaria de agradecer a todos os intervenientes do GRAQ por, de forma direta ou indireta, terem contribuído para o bom funcionamento e realização da minha dissertação.

Aos meus Pais pela confiança que sempre depositaram em mim e pelo exemplo constante de luta pelos nossos ideais. E por fim agradeço ao Pedro Costa por todas as palavras de apoio, incentivo e companheirismo.

Apoio Institucional

Este trabalho recebeu suporte financeiro do projeto PTDC/BII-BIO/30884/2017- "BioreVinery: A biorefinery approach to valorize vineyard pruning waste using sustainable extraction and catalytic processes", financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES), cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE 2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI-01-0145-FEDER-030884), UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020 com financiamento da FCT/MCTES, pelo qual agradeço.

Resumo

Atualmente, a indústria agroalimentar portuguesa já começa a prestar especial atenção no que diz respeito ao consumo de matérias-primas e à produção de resíduos. No entanto, a sua principal aplicação continua a ser a alimentação animal ou o uso como fertilizantes. Recentemente, demonstrou-se que os resíduos resultantes das podas, nomeadamente da indústria vinícola, podem ser potenciais fontes de compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde. Deste modo, a recuperação destes compostos a partir de resíduos e posterior aplicação num produto alimentar ou cosmético permitiria às empresas reduzir os custos de tratamento e até mesmo criar lucros adicionais, o que se refletiria na sua competitividade.

Numa primeira fase deste trabalho, pretende-se extrair diferentes compostos bioativos a partir de resíduos de biomassa, nomeadamente das podas dos mirtilos, aplicando a extração convencional e a extração assistida por microondas. Os extratos obtidos foram caracterizados por diferentes métodos espectrofotométricos, tais como TPC, TFC, DPPH, FRAP e ABTS, para avaliar as suas propriedades benéficas e os resultados expressos em teor de peso seco de biomassa (dw). Das técnicas de extração testadas, a extração assistida por microondas foi a que se revelou mais eficiente. Relativamente às amostras analisadas, a variedade *Duke 2019* foi a que obteve TPC mais elevado ($67,9 \pm 1,7$ mg GAE/g dw). No que diz respeito à atividade antioxidante, diferentes ensaios produziram respostas diferentes, sendo que no método FRAP destacou-se a variedade *Bluecrop 2019* ($49,3 \pm 3,5$ mg AAE/g dw), no método DPPH[•] a amostra *Duke 2020* foi a que obteve melhores resultados ($92,2 \pm 5,0$ mg TE/g dw) e no método ABTS^{•+} a amostra *Duke 2019* (101 ± 6 mg AAE/g dw). Posteriormente, determinou-se por HPLC-DAD quais os compostos individuais que estão a contribuir para as propriedades exibidas pelos extratos obtidos. Nesta análise usou-se a variedade *Duke 2019* sendo que os compostos identificados em maior concentração foram os ácidos elágico e vanílico, e da família dos flavonoides destacou-se a catequina e a epicatequina para ambas as técnicas de extração testadas.

Numa segunda fase foi realizada uma avaliação da presença de múltiplos contaminantes nas amostras em estudo. Para isso, analisou-se a presença de pesticidas (organoclorados, organofosforados e piretróides), policlorobifenilos e retardantes de chama. Utilizou-se o método de extração QuEChERS e uma limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e de seguida foram analisados os compostos por

cromatografia gasosa acoplada a dois detetores diferentes (GC-FPD e GC-ECD). Após a análise de todas as amostras, apenas foi detetado e quantificado o cloropirifos-metilo na amostra de podas de mirtilo (*Bluecrop 2019*). Apesar de não existir legislação para este tipo de amostra, quando avaliada a concentração detetada segundo a Diretiva 2005/72/CE da Comissão da União Europeia para mirtilos, a concentração encontrada é abaixo do limite máximo permitido. Desta forma foi possível verificar que os extratos analisados das podas dos mirtilos encontram-se seguros relativamente aos contaminantes avaliados neste trabalho, para poderem ser incorporados em diversas aplicações como por exemplo na indústria alimentar.

Palavras-Chave: podas de mirtilos, valorização, extração convencional, extração assistida por microondas, polifenóis, atividade antioxidante, contaminantes, pesticidas

Abstract

Currently, the Portuguese agri-food industry is beginning to pay special attention to the consumption of raw materials and the production of waste. However, its main application remains in animal feed or as fertilisers. Recently, it has been shown that wastes from pruning, particularly from the wine industry, may be a potential source of bioactive compounds with health-enhancing properties. Thus, the recovery of these compounds from waste and subsequent application in food or cosmetic products would allow to the companies to reduce treatment costs and even create additional profits, which would be reflected in their competitiveness.

In the first phase of this work, is intended to extract different bioactive compounds from biomass residues, namely blueberry pruning, applying conventional and microwave-assisted extractions. The obtained extracts were characterized by different spectrophotometric methods, such as total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), DPPH, FRAP, and ABTS, to evaluate their beneficial properties. From the tested extraction techniques, microwave-assisted extraction reveals to be more efficient. Concerning the analysed samples, *Duke 2019* variety presented the highest TPC (67.9 ± 1.7 mg GAE/g dw). Regarding the antioxidant activity, different assays produced different results, namely in the FRAP method the *Bluecrop 2019* variety was highlighted (49.3 ± 3.5 mg AAE/g dw), in the DPPH• method the *Duke 2020* sample was the one who obtained the best results (92.2 ± 5.0 mg TE/g dw) and in the ABTS^{•+} method the *Duke 2019* sample also highlighted (101 ± 6 mg AAE/g dw). Subsequently, it was determined by HPLC-DAD which individual compounds were contributing to the properties displayed by the obtained extracts. In this analysis, the *Duke 2019* variety was used and the compounds identified in the highest concentration were the ellagic and vanillic acids, and from the flavonoid family it was highlighted the catechin and epicatechin for both extraction techniques tested.

In the second phase of this work, a chemical hazard assessment was carried out in the samples under study. For this, all the samples were analyzed and the presence of multiple contaminants such as pesticides (organochlorine, organophosphorus and pyrethroids), PCB and Flame Retardants were evaluated. The QuEChERS extraction method and a dispersive solid phase extraction cleaning (d-SPE) were used as a extraction method and the compounds were analyzed by gas chromatography (GC-FPD and GC-ECD). After the analysis of all samples, only chlorpyrifos-methyl was found and

quantified in a *Bluecrop 2019* sample. Although there is no legislation for this type of sample, the concentration found was in accordance (below maximum residue level) with Directive 2005/72/EC of the Commission of the European Union for blueberries. Thus, it was possible to verify that the extracts analyzed from the pruning of blueberries are safe, for the compounds under study, in order to be incorporated in several applications, namely in food.

Keywords: blueberry pruning, valorization, convencional extraction, microwave-assisted extraction, polyphenols, antioxidant activity, contaminants, pesticides

Índice

Agradecimentos	iii
Apoio Institucional	iv
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice de tabelas	xii
Índice de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xvi
Capítulo 1 Introdução	1
1.1. Economia circular vs economia linear	1
1.2. Mirtilos.....	3
1.2.1. Produção	4
1.2.2. Resíduos gerados durante a produção	4
1.3. Polifenóis	5
1.3.1. Classificação	6
1.3.2. Distribuição na planta	11
1.3.3. Polifenóis presentes nos resíduos de mirtilos.....	12
1.4. Métodos de extração de compostos fenólicos.....	12
1.4.1. Extração convencional.....	13
1.4.2. Extração assistida por microondas	14
1.5. Métodos de identificação e quantificação de compostos fenólicos	15
1.5.1. Métodos espectrofotométricos	15
1.5.2. Métodos cromatográficos	15
1.6. Avaliação da presença de contaminantes.....	16
1.6.1. Pesticidas	18
1.6.2. Poluentes orgânicos	23

1.6.3. Retardantes de chama	25
1.7. Técnicas de extração de contaminantes	28
1.7.1. QuEChERS.....	29
1.7.2. Extração em fase sólida.....	30
1.8. Métodos de identificação e quantificação de contaminantes.....	32
1.8.1. Cromatografia Gasosa.....	32
1.8.2. Cromatografia gasosa com detetor de Chama fotométrica (GC-FPD)	34
1.8.3. Cromatografia gasosa com detetor de Captura de eletrões (GC-ECD).....	35
Capítulo 2 Objetivos.....	36
Capítulo 3 Materiais e Métodos.....	37
3.1. Reagentes	37
3.2. Preparação das amostras	40
3.3. Métodos de extração de compostos fenólicos.....	41
3.3.1. Extração Convencional	41
3.3.2. Extração Assistida por Microondas.....	41
3.4. Métodos espectrofotométricos para a determinação do teor de polifenóis e atividade antioxidante	42
3.4.1. Determinação do Teor de Polifenóis Totais (TPC).....	42
3.4.2. Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFC).....	43
3.4.3. Determinação do Poder Redutor pelo método FRAP	43
3.4.4. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH.....	43
3.4.5. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método ABTS	44
3.5. Determinação do perfil fenólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	44
3.6. Extração de pesticidas, PCBs e retardantes de chama de podas de mirtilos....	45
3.6.1. QuEChERS.....	45
3.6.2. Análise Cromatográfica de pesticidas, POP e retardantes de chama	47
3.7. Análise estatística	50

Capítulo 4 Resultados e Discussão	51
4.1. Teor de polifenóis e flavonoides totais	51
4.2. Atividade antioxidante	54
4.3. Composição fenólica determinada por HPLC-DAD	58
4.4. Identificação e quantificação de pesticidas, PCBs e Retardantes de Chama nas podas dos mirtilos	63
4.4.1. Identificação dos contaminantes após a análise de GC.....	63
4.4.2. Avaliação da presença de contaminantes em podas de mirtilos.....	66
4.4.3. Validação do método analítico	68
4.4.4. Quantificação dos pesticidas em amostras de podas de mirtilos.....	69
Capítulo 5 Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	71
Bibliografia	73
ANEXOS	79

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Classificação dos polifenóis ^[14]	6
Tabela 1.2 Perigos associados aos alimentos ^[32]	17
Tabela 1.3 Classificação dos pesticidas ^[33]	21
Tabela 1.4. Vantagens e desvantagens da extração em fase sólida ^[43,44]	32
Tabela 1.5 Vantagens e Desvantagens da Cromatografia Gasosa.....	33
Tabela 3.1 Lista de pesticidas, PCB e retardantes de chama.....	38
Tabela 4.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos das podas de mirtilos obtidos pela CE e MAE da variedade Duke 2019; os resultados encontram-se expressos como média $\pm$ desvio padrão (mg composto/100 g amostra seca).	60
Tabela 4.2. Identificação de OCP, Pretróides, PCB e Retardantes de Chama com os respectivos tempos de retenção	64
Tabela 4.3 Tempos de retenção dos pesticidas identificados	66
Tabela 4.4 Parâmetros da curva de calibração na matriz.	69
Tabela 4.5. Concentração de pesticidas presentes na amostra	69
Tabela A0.1 Dados das curvas de calibração usadas para a quantificação dos compostos fenólicos	79

Índice de figuras

Figura 1.1 Economia Circular vs Economia Linear ^[5]	2
Figura 1.2. Mirtilos (folha e fruto)	3
Figura 1.3. Estrutura química geral do ácido hidroxibenzóico (A) e do ácido hidrocixinâmico (B) ^{[16,[17]}	7
Figura 1.4 Estrutura fundamental de algumas das principais famílias de flavonoides presentes na natureza ^[20]	8
Figura 1.5 Estrutura do tanino hidrolisável pentagaloilglucose ^[20]	9
Figura 1.6 Estruturas de 3-flavanóis ⁽²⁰⁾	10
Figura 1.7 Estruturas de proantocianidinas diméricas ^[20]	10
Figura 1.8 Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido ^[20] .	11
Figura 1.9 Técnicas de extração convencionais e mais avançadas; CE, conventional extraction; PLE, pressurized liquid extraction; UAE, ultrasound-assisted extraction; MAE, Microwave assisted extgraction; SFE, supercritical fluid extraction (adaptado de [25]).	13
Figura 1.10 Classificação dos pesticidas por alvo de ação (adaptado de [33]).	18
Figura 1.11. Venda de pesticidas entre 2015 e 2018	20
Figura 1.12. Volume de vendas de pesticidas no ano de 2018.....	20
Figura 1.13 Estrutura molecular dos PCB ^[36]	24
Figura 1.14 Estrutura química genérica da Bifenilo Polibromado (PBB).....	27
Figura 1.15 Estrutura química genérica do éter difenílico polibromado (PBDE)	28
Figura 1.16 Descrição do processo SPE ^[44]	31
Figura 1.17. Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa [44].	33
Figura 3.1. Corte dos ramos de podas (variedade Duke).....	40
Figura 3.2. Moinho (Retsch ZM200)	40
Figura 3.3. Peneiro (Retsch AS200)	41
Figura 3.4. Vasos de extração microondas contendo as amostras, evidenciando-se o vaso de controlo contendo as sondas de temperatura e de pressão	42
Figura 3.5 Esquema representativo do método QuEChERS (1ª etapa da extração))	46
Figura 3.6. Esquema representativo do procedimento de limpeza (d-SPE) (2ª etapa da extração)	47
Figura 4.1. Teor de polifenóis totais TPC obtido para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); os resultados correspondem à	

média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg de equivalentes ácido gálico/g amostra seca (mg GAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	52
Figura 4.2. Teor de flavonoides totais obtidos para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg de equivalentes catequina /g amostra seca (mg CE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	53
Figura 4.3. Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH• para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg Trolox equivalentes/g amostra seca (mg TE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	55
Figura 4.4. Atividade antioxidante determinada pelo método ABTS ^{•+} para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg ácido ascórbico equivalentes/g amostra seca (mg AAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	56
Figura 4.5. Poder redutor pelo método FRAP para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg ácido ascórbico equivalentes/g amostra seca (mg AAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	58
Figura 4.6 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD a 280 nm para a) mistura de padrões de polifenóis de concentração 5 mg/L e b) extratos da variedade Duke 2019 obtidos por extração convencional (linha preta) e por extração assistida por microondas (linha rosa); identificação dos picos: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) (+)-catequina, (4) ácido clorogénico, (5) ácido vanílico, (6) ácido cafeico, (7) ácido sirínico, (8) (-)-epicatequina, (9) ácido p-cumárico, (10) ácido trans-ferúlico, (11) ácido sinápico, (12) naringina, (13) ácido 3,5-di-cafeiolquínico, (14) quercetina-3-O-galactósido, (15) rutina, (16) floadedzina, (17) ácido elágico, (18) ácido 3,4-di-O-cafeiolquínico; (19) miricetina, (20) ácido cinâmico, (21) kaempferol-3-O-glucósido, (22) kaempferol-3-O-rutinósido,	

(23) naringenina, (24) quercetina, (25) floretina, (26) tilirosídeo, (27) kaempferol, (28) apigenina e (29) crisina.....	59
Figura 4.7 Cromatograma de um padrão de concentração 25 µg/L composto por Pesticidas (piretroides e OCP), Retardantes de Chama e PCBs.	63
Figura 4.8 Cromatograma de um padrão de concentração 25 µg/L de Pesticidas (OCP e PIR).	64
Figura 4.9 Cromatograma referente a um padrão composto por 6 pesticidas OPP.....	66
Figura 4.10 Comparação entre cromatogramas do padrão de 25 µg/L composto por Retardantes de Chama,, PCB, OCP e Piretróides, (linha preta) e o extrato da amostra Bluecrop 2020 (linha roxa).....	67
Figura 4.11 Cromatograma comparativo entre pesticidas (linha preta) e a amostra Bluecrop 2019 (linha azul) com o padrão de 25 µg/L.....	68

Lista de abreviaturas

AAE – ácido ascórbico equivalente (abreviatura do inglês ascorbic acid equivalents)

CE – Extração Convencional (abreviatura do inglês convencional extraction)

CV – Coeficiente de variação

DSA – Dosagem semanal admissível

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva (abreviatura do inglês dispersive solid phase extraction)

dw – Amostra seca (abreviatura do inglês dry weight)

EFSA – Autoridade europeia para a Segurança Alimentar (abreviatura do inglês European Food Safety Authority)

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FEAC – capacidade antioxidante expressa em Ferro II equivalente (abreviatura do inglês Fe(II) equivalente antioxidant capacity)

GAE – Ácido gálico equivalente (abreviatura do inglês gallic acid equivalent)

GC- ECD – Cromatografia gasosa com captura de elétrons (abreviatura do inglês gas chromatography with electron capture detector)

GC-MS – Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (abreviatura do inglês gas chromatography – mass spectrometry)

GC-FPD – Cromatografia gasosa – chama fotométrica (abreviatura do inglês gas chromatography with flame photometric detector)

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de díodos (abreviatura do inglês high performance liquid chromatography with diode-array detection)

JECFA – Comité de profissionais em aditivos alimentares (abreviatura do inglês Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MAE – Extração Assistida por Microondas (Abreviatura do inglês Microwave Assisted Extraction)

OPP – Organofosforados

PBB – Bifenilo polibromado

PBDE - Éter difenílico polibromado

PCB - Policlorobifenilos

POP – Poluentes orgânicos persistentes

RE – Rutina equivalente

TE –Trolox equivalente

TFC – Teor de Flavonoides Totais (abreviatura do inglês total flavonoid content)

TPC- Teor de Polifenóis Totais (abreviatura do inglês total phenolic content)

Capítulo 1 Introdução

1.1. Economia circular vs economia linear

O consumismo está fortemente enraizado na sociedade contemporânea caracterizando-se por uma produção em massa de bens e, conseqüentemente, pelo seu consumo excessivo. Este modo de vida pode ser considerado resultado da revolução industrial, uma vez que este conduziu a uma produção mais fácil e barata, ignorando assim os limites ambientais [1]. Esta visão mais alargada do processo pode resumir-se a [1]:

- 1) Utilização de terras férteis e extração de recursos naturais como por exemplo de minas, alguns combustíveis fósseis, entre outros;
- 2) Utilização destes recursos para produzir produtos para venda;
- 3) Utilização dos produtos até serem depositados como lixo no final da sua vida útil.

Este processo é conhecido como **economia linear** (Figura 1.1). De facto, inicialmente, a revolução industrial trouxe alguns benefícios como riqueza económica, oportunidades de emprego e melhor qualidade de vida nos países desenvolvidos. O principal problema associado à economia linear é que esta depende de dois grandes pressupostos [1]:

- i. Será sempre necessário a extração de recursos do ambiente;
- ii. Será sempre necessário um lugar para depositar os produtos que não são mais desejados.

Atualmente, devido ao desenvolvimento da ciência e às preocupações com o ambiente, conclui-se que os dois pressupostos identificados não são possíveis e que a economia linear não é sustentável [2,3].

De forma a ser possível alcançar esse estado de sustentabilidade, as indústrias necessitam de ultrapassar a transição de um recurso fóssil para uma economia baseada no processamento de matérias-primas renováveis e se possível apostar na reutilização e/ou valorização dos resíduos produzidos. É neste sentido que surge a **economia circular** (Figura 1.1) [4].

Nos últimos anos, a economia circular tem sido um tema recorrente nas agendas, internacional, Europeia e nacional, sendo um conceito estratégico que assenta nos princípios da redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia. Esta

assume-se como um elemento-chave para promover a dissociação entre o crescimento económico e o aumento no consumo de recursos [5].

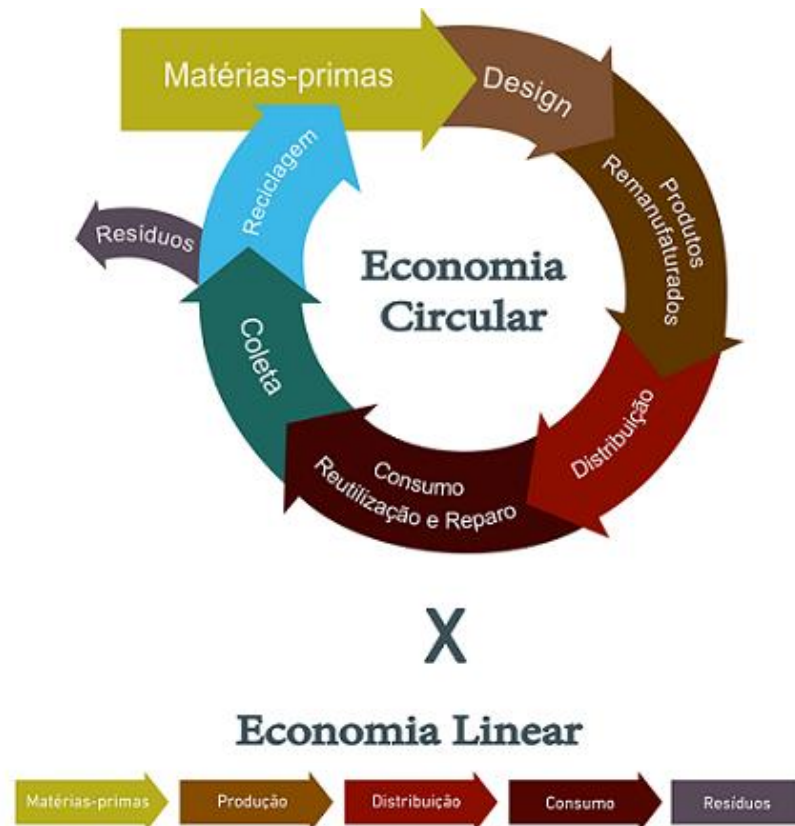


Figura 1.1 Economia Circular vs Economia Linear [5]

Numa economia circular, o valor dos produtos e materiais é mantido durante o maior tempo possível, a produção de resíduos e a utilização de recursos reduzem-se ao mínimo e, quando os produtos atingem o final da sua vida útil, os recursos mantêm-se na economia para serem reutilizados e voltarem a gerar valor [5]. Esta mudança de paradigma de modelo económico potencia a maximização do valor económico do produto, mas simultaneamente assume-se como um desafio para os diferentes setores de atividade económica nacional [5].

No contexto da economia circular, a valorização de resíduos orgânicos urbanos provenientes de podas tem um grande apelo ambiental e de sustentabilidade. Atualmente, uma das utilizações das podas é na compostagem. O emprego do composto na manutenção de áreas verdes potencializa a recuperação ambiental, o aproveitamento da matéria orgânica e reduz a contaminação de áreas com disposição em aterros [5].

A atual transição de uma economia linear para uma economia circular diz respeito principalmente à forma como os resíduos são ponderados, passando de um material sem

valor para um recurso precioso. Esta transição resultou numa crescente necessidade de investigar a composição dos resíduos, em particular os provenientes da indústria alimentar, e explorá-los como uma potencial fonte de compostos bioativos, particularmente de polifenóis [4].

1.2. Mirtilos

O mirtilo, com o nome científico *Vaccinium myrtillus*, é uma fruta que pertence à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae*, na qual se encontra o género *Vaccinium*. É uma planta caducifólia, ou seja, perde as suas folhas nas épocas frias do ano [6]. O mirtilo é uma planta de porte arbustivo originária da América do Norte e Euroasiática, que se adapta bem ao clima temperado [7]. As flores apresentam a corola com pétalas brancas ou rosa, de forma tubular ou em forma de sino. As folhas são simples, de forma oval a lanceolada adquirindo uma tonalidade roxa no Outono. O sistema radicular é superficial, sendo as raízes muito finas, não dispondo de pêlos radiculares [6].

O seu fruto em forma de baga quando maduro adquire a coloração azul arroxeadada e apresenta um formato achatado (Figura 1.2). A baga de mirtilo contém elevada concentração de compostos fenólicos (tais como ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas) comparativamente com outros frutos. Sendo conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, a baga de mirtilo é bastante apreciada particularmente nos países Nórdicos [7].



Figura 1.2. Mirtilos (folha e fruto)

1.2.1. Produção

De acordo com os dados da Food and Agriculture Organization (FAO) [8], no ano de 2019, o primeiro produtor mundial de mirtilos foram os Estado Unidos da América com uma produção anual de cerca de 308760 toneladas, enquanto Portugal ocupa o 10º lugar dos países produtores de mirtilo com uma produção anual total de 11060 toneladas. Em 2012, Portugal encontrava-se no 18º lugar com 255 toneladas produzidas, verificando-se um crescimento na sua produção em 7 anos de aproximadamente 43% [8].

Neste momento é o pequeno fruto que ocupa maior área no país, caracterizando-se a sua cultura por pequenas plantações no solo, principalmente localizadas na região norte. No entanto, tem-se observado um enorme interesse no seu cultivo por diversas empresas estrangeiras que se instalaram na região do sudoeste alentejano, estando estas a praticar a cultura do mirtilo em substrato. A cultura do mirtilo em substrato pode ser realizada tanto ao ar livre como em cultura protegida [9].

1.2.2. Resíduos gerados durante a produção

Grande parte dos resíduos agrícolas é deixada no próprio terreno de cultivo, servindo como proteção ao solo ou como adubo fornecedor de nutriente. O aproveitamento dos elementos nutritivos dos resíduos agrícolas também pode ocorrer através do seu processamento simples, como a compostagem [10]. A emissão de gases com efeito de estufa como dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) e óxidos de azoto (NO_x) ocorre na queima de resíduos agrícolas e por este motivo é importante encontrar soluções que evitem a queima dos resíduos produzidos [12].

No contexto da agricultura industrial, os principais resíduos do cultivo de grãos, frutas, e hortaliças são o bagaço, as cascas, sementes, bagas, as folhas e as hastes provenientes de podas. Além da reciclagem e compostagem para a produção de fertilizantes, os resíduos agrícolas possuem grande valor a nível de composição de nutrientes, e podem ser a matéria-prima para outros produtos industriais. A título de exemplo, na cultura da laranja, graças às características físico-químicas das sementes ricas em ácidos gordos é possível produzir óleos comestíveis para aplicações alimentares. O setor agroalimentar produz milhões de toneladas de resíduos potencialmente úteis para serem reaproveitados. Além disso, é necessário ter em consideração os recursos

despendidos durante o processo de plantação, como a água ou o solo, o que faz com que seja importante impedir que materiais os resíduos sejam desperdiçados prematuramente, quando ainda podem ter um ciclo de vida prolongado. Estudos recentes revelam que os resíduos agroindustriais podem ser subprodutos da própria indústria alimentar, em forma de pó ou extrato, para utilizar para melhorar as propriedades nutricionais dos alimentos [11].

1.3. Polifenóis

O termo “polifenóis” foi criado para substituir o termo usado “taninos vegetais” que incluía os compostos fenólicos solúveis em água com peso molecular entre 500 e 3000 Da (unidades de Dalton). Estes compostos apresentam propriedades especiais como por exemplo a capacidade de precipitar alcaloides, entre outras proteínas [13].

Os polifenóis são um dos principais grupos de compostos que se encontram nos metabolitos secundários de plantas. A sua distribuição quantitativa varia, uma vez que é influenciada por vários fatores, como o tipo de planta, órgãos e genética. Estes compostos são mais frequentemente produzidos e acumulados nas camadas subepidermais de tecidos vegetais quando expostos ao *stress* e também a ataques patogénicos. A sua síntese e concentração dentro do tecido vegetal depende da fase de crescimento e desenvolvimento da planta e dos fatores bióticos e abióticos que a rodeiam [14].

Inicialmente os compostos fenólicos eram apenas associados ao sabor, odor, cor e amargura de alguns alimentos. No entanto, ao longo do tempo foram-lhe sendo reconhecidas a sua importância e os seus benefícios para a saúde tornando-se um tema bastante estudado [11]. Atualmente, o termo polifenóis é usado para designar compostos que incluem os ácidos fenólicos simples e os taninos condensados altamente polimerizados. Esta variedade estrutural dificulta a sua caracterização, quantificação e estudo, com a agravante dos polifenóis de diferentes plantas serem quimicamente distintos e apresentarem diferentes graus de polimerização [13].

Nos dias de hoje está amplamente estabelecido que estes compostos trazem inúmeros benefícios à saúde humana e é-lhes reconhecida a sua importância numa alimentação equilibrada. Os polifenóis apresentam ainda propriedades antimutagénicas e antineoplásicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, de proteção das células endoteliais e vasos sanguíneos e neuroprotetoras [15]. As atividades terapêuticas dos compostos fenólicos são reconhecidas há vários anos, havendo estudos demonstrando o seu uso

enquanto medicamento natural para tratamento de doenças do foro circulatório, respiratório, digestivo e do trato urinário [15].

1.3.1. Classificação

Os polifenóis podem ser divididos em várias famílias e subfamílias que se encontram descritas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Classificação dos polifenóis ^[14]

Classes	Sub-classes	Exemplos
Ácidos fenólicos	Ácidos Hidroxibenzóicos	Ácido vanílico, ácido gálico
	Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido clorogénico, ácido cafeico
Flavonoides	Flavonas	Tageretina, apigenina
	Chalconas	Floretina, arbutina
	Isoflavonas	
	Dihidrocalcona	
	Biflavononas	
	Antiocinidinas	Malvidina, cianidina
	Flavandióis	
	Proantocianidinas	
	Flavonoides	Naringenina, naringina
	Flavonol	Catequina, epicatequina
	Dihidroflavonois	
	Aurona	
Taninos	Elagitanino	
	Galotanino	
	Taninos Condensados	
Estilbenos		Resveratrol, astrigina
Lignanós		

Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são constituídos por um ou mais anéis aromáticos e possuem pelo menos um grupo hidroxilo. Geralmente, são divididos em dois grupos, nomeadamente os ácidos hidroxibenzóicos (Figura 1.3A), constituídos por sete átomos de carbono e os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 1.3B), que possuem nove átomos de carbono [16].

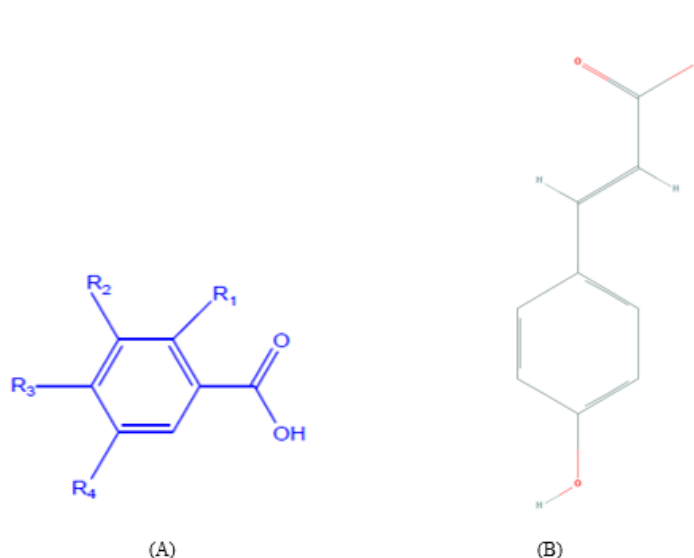


Figura 1.3. Estrutura química geral do ácido hidroxibenzóico (A) e do ácido hidroxicinâmico (B) [16],[17]

Os ácidos fenólicos são estruturas relativamente simples, e a quantidade e arranjo dos grupos hidroxilo são responsáveis pelas diferentes estruturas e compostos. Nas plantas, os ácidos fenólicos contribuem para a absorção de nutrientes, a síntese proteica, a atividade enzimática, a fotossíntese e atuam como componentes estruturais. Por outro lado, as cumarinas desempenham um papel essencial no crescimento e na defesa das plantas [14].

As cumarinas são uma classe de metabólitos secundários que estão amplamente presentes em plantas e exibem vários efeitos farmacológicos, bioquímicos e terapêuticos [18].

Flavonoides

Os flavonoides, também designados por bioflavonoides, são um dos subgrupos dos compostos fenólicos e apresentam a estrutura representada na Figura 1.4. Estes compostos apresentam baixo peso molecular e podem ser encontrados em diversas espécies vegetais [19].

Os flavonoides são formados por dois anéis aromáticos, geralmente unidos por um anel heterocíclico. Devido à sua estrutura fenólica, possuem um grande poder antioxidante, uma vez que podem ser multisubstituídos e formar assim estruturas químicas diversificadas. Como observado na Tabela 1.1., este subgrupo está dividido em várias classes tais como flavonóis, antocianidinas, entre outras [16].

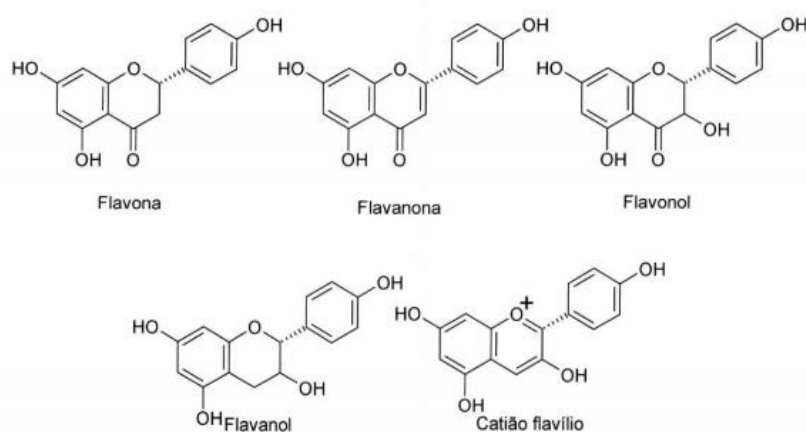


Figura 1.4 Estrutura fundamental de algumas das principais famílias de flavonoides presentes na natureza [20]

Os flavonoides não são sintetizados pelo organismo, sendo por isso importante o seu consumo através de uma alimentação saudável e equilibrada que promove ao organismo benefícios, tais como [21]:

- Regulação dos níveis de colesterol, o que ajuda a prevenir doenças cardiovasculares
- Diminuição dos sintomas da menopausa
- Combate a infeções, pois possui atividade antimicrobiana
- Auxilia na absorção de vitamina C
- Ajuda a prevenir doenças neurodegenerativas, uma vez que evita danos nas células nervosas devido à sua atividade antioxidante.

Taninos

Os taninos são por definição compostos polifenólicos solúveis em água com elevada massa molecular que se obtêm através da polimerização de polifenóis simples, e apresentam a capacidade de interagirem com proteínas [20]. Os taninos podem ser divididos em taninos hidrolisáveis e em taninos não hidrolisáveis, também designados por taninos condensados [20].

Os taninos hidrolisáveis (Figura 1.5) são polifenóis constituídos por um açúcar, geralmente a glucose, ligado a compostos fenólicos, nomeadamente o ácido gálico ou o ácido elágico, formando os galotaninos e os elagitaninos respetivamente [20].

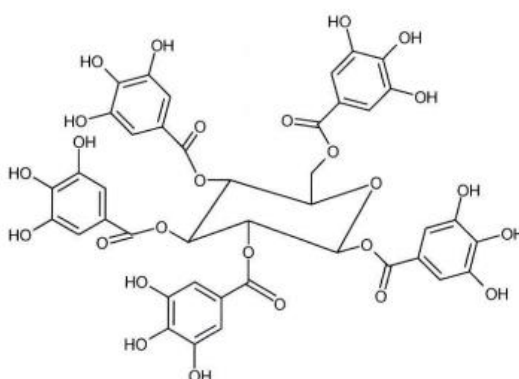


Figura 1.5 Estrutura do tanino hidrolisável pentagalolilglucose [20]

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros formados pela policondensação de catequinas e leucoantocianidinas [20]. Na natureza, os 3-flavanóis variam no grau de hidroxilação dos anéis aromáticos A e B e na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel pirâmico C. As estruturas mais simples são as catequinas e as galocatequinas (Figura 1.6) [20].

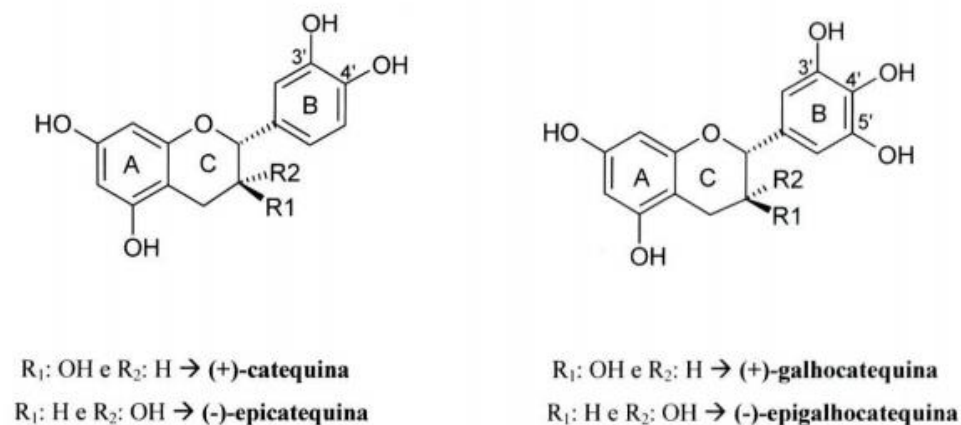


Figura 1.6 Estruturas de 3-flavanóis ^[20]

Os taninos condensados (proantocianidinas) são constituídos por duas ou mais unidades de catequinas ou galocatequinas e variam entre si no grau de polimerização, no tipo de ligação interflavanólica (C4-C6 ou C4-C8) e no grau de esterificação com o ácido gálico [20].

As proantocianidinas dividem-se em procianidinas (derivadas da catequina e epicatequina) e prodelfinidinas (derivadas da galocatequina e epigalocatequina) (Figura 1.7) [20].

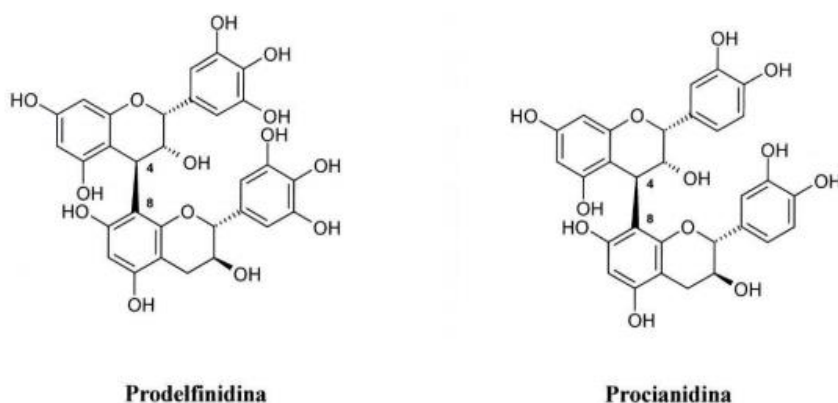


Figura 1.7 Estruturas de proantocianidinas diméricas ^[20]

Os nomes de procianidinas e de prodelfinidinas resulta do facto destes compostos se decomporem por aquecimento em meio ácido, dando origem a cianidina e delfinidina, respetivamente (Figura 1.8) [20].

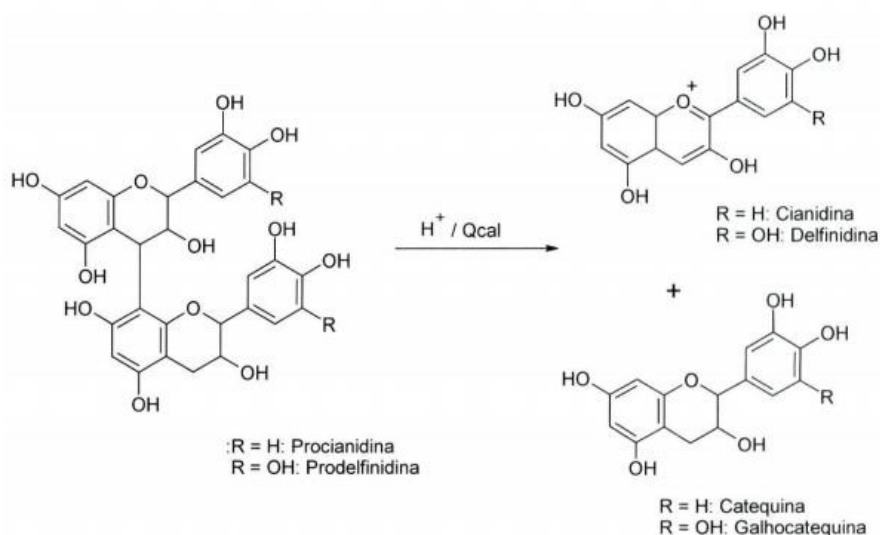


Figura 1.8 Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido [20]

1.3.2. Distribuição na planta

Os polifenóis encontram-se intensamente difundidos no reino vegetal. Estes compostos encontram-se distribuídos por toda a planta: nos tecidos germinativos (como uma possível proteção contra o frio), nas folhas (mais frequentes nas páginas superiores), nas raízes (atuando como barreira química à penetração e colonização das raízes por organismos patogénicos), nas sementes (associados à manutenção da dormência, e apresentam propriedades alelopáticas e bactericidas) e no caule e casca (implicados na regulação do crescimento dos tecidos e na inibição da atividade microbiana). Uma vez que estes compostos se encontram normalmente retidos em vacúolos ou na superfície cerosa das plantas, não interferem com o metabolismo das plantas. No entanto, quando se dá a rutura das células, os polifenóis ficam livres e inativam enzimas, precipitam proteínas e formam ligações com os ácidos nucleicos da célula [13].

1.3.3. Polifenóis presentes nos resíduos de mirtilos

A contribuição de polifenóis nos produtos alimentares engloba fenótipos de cor, odor, estabilidade oxidativa, entre outros [22]. No entanto, os valores reportados dos polifenóis em mirtilos e folhas de mirtilo variam muito dependendo da técnica de extração utilizada. Por exemplo, foi relatado que o TPC varia entre 0,85 e 2,81 mg GAE/g dw. Wang *et al.* [23] reportou que, utilizando uma extração convencional com acetona e água como solventes primários, as variedades *Duke* e *Bluecrop* apresentam um TPC de $231,8 \pm 5,1$ e $212,7 \pm 1,8$ mg GAE/g dw respectivamente, e um TFC de $105,3 \pm 8,6$ e $89,6 \pm 9,1$ mg CE/dw. Sobre a composição fenólica individual, Wang *et al.* [23] reportou a presença de ácido p-cumárico ($97,5 \pm 0,1$ µg/dw), ácido ferúlico ($26,7 \pm 1,1$ µg/dw), quercetina ($211,2 \pm 0,3$ µg/dw), catequina ($187,6 \pm 1,1$ µg/dw) e resveratrol ($51,5 \pm 0,1$ µg/dw) na variedade mirtilo *Duke*. Na variedade *Bluecrop*, a quercetina não foi detetada, mas os restantes compostos acima mencionados foram (ácido p-cumárico, $80,7 \pm 0,1$; ácido ferúlico, $32,4 \pm 1,1$; catequina $262,9 \pm 1,0$; resveratrol, $64,9 \pm 0,1$ µg/dw). Quanto às folhas dos mirtilos, Vodnar *et al.* (2020) [24] quantificou os seguintes compostos para as variedades *Duke* e *Bluecrop*, respectivamente, $6,03 \pm 0,07$ e $5,21 \pm 0,05$ mg/dw de catequina; $0,52 \pm 0,01$ e $0,54 \pm 0,01$ mg/dw de ácido clorogénico; $4,49 \pm 0,05$ e $2,62 \pm 0,02$ mg/dw de ácido cafetárico; $4,23 \pm 0,05$ e $2,73 \pm 0,02$ mg/dw de ácido dicafeioilquínico; $17,64 \pm 0,1$ e $19,10 \pm 0,1$ mg/dw de rutina; e $2,25 \pm 0,06$ e $2,07 \pm 0,04$ mg/dw de quercetina.

1.4. Métodos de extração de compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos tem sido tradicionalmente realizada recorrendo a extrações convencionais [25]. Estas geralmente são baseadas no uso de solventes orgânicos e no tempo que o solvente demora a ser consumido, o que pode resultar em erros bastante complexos nos métodos analíticos. Mesmo que a extração de solventes resulte numa boa recuperação de compostos fenólicos, existem alguns inconvenientes associados, tais como a exigência de uma enorme quantidade de solventes, o tempo de extração ser muito longo podendo ocorrer a degradação dos compostos-alvo e a escolha dos solventes pode ser limitada devido à sua adequabilidade para aplicações alimentares [26].

O recente desenvolvimento de técnicas de extração mais avançadas veio ajudar a superar as dificuldades dos métodos mais tradicionais [26]. Estas novas técnicas de extração vieram permitir uma redução no consumo de solventes (orgânicos), extrações mais rápidas e a possibilidade de recuperar estes compostos de uma forma mais verde [25]. Na Figura 1.9 encontra-se esquematizado as técnicas de extração, tanto tradicionais como mais avançadas, geralmente usadas na recuperação de compostos fenólicos [25].

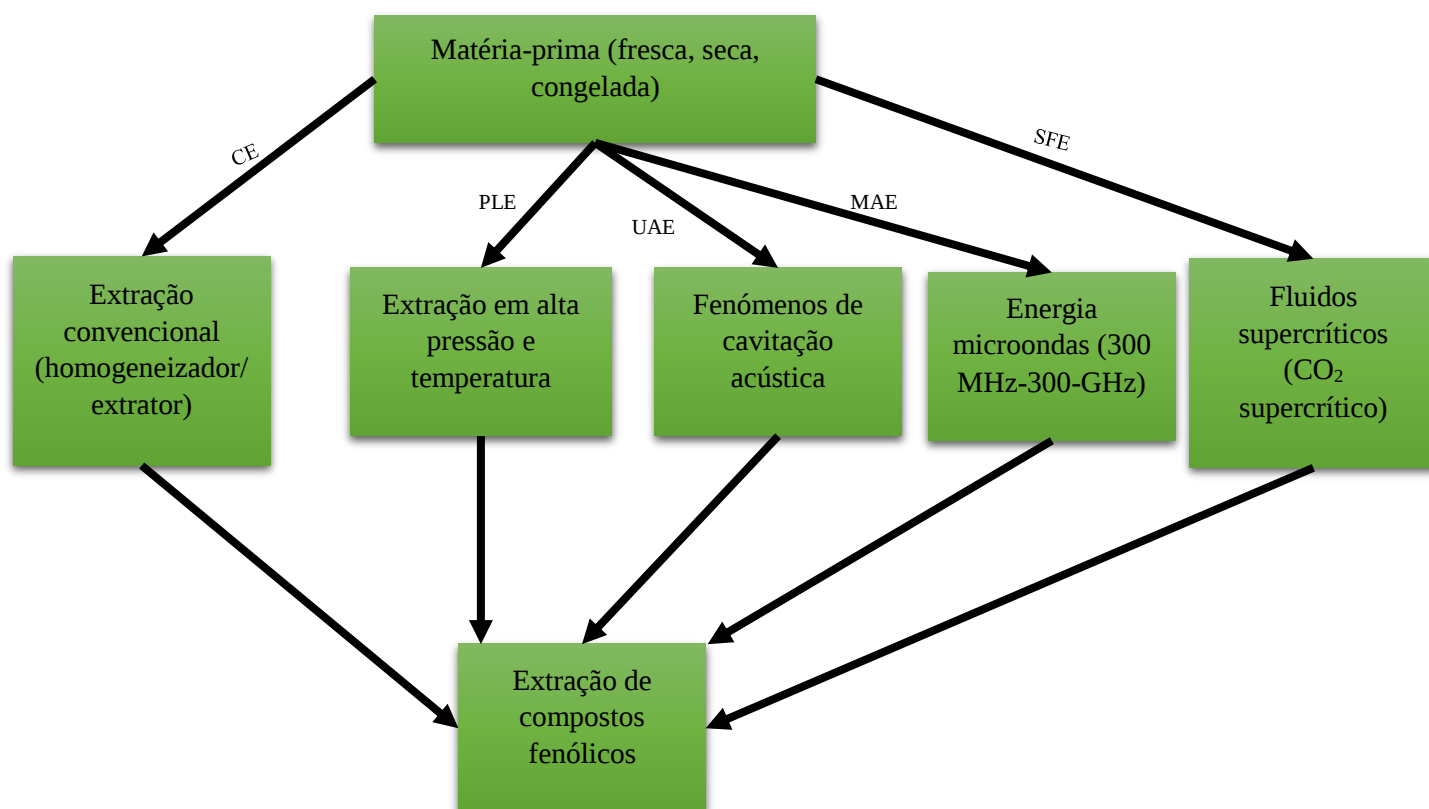


Figura 1.9 Técnicas de extração convencionais e mais avançadas; CE, conventional extraction; PLE, pressurized liquid extraction; UAE, ultrasound-assisted extraction; MAE, Microwave assisted extraction; SFE, supercritical fluid extraction (adaptado de [25]).

De seguida irá ser descrito em maior detalhe as técnicas que foram aplicadas no presente trabalho, nomeadamente a extração convencional e a extração assistida por microondas.

1.4.1. Extração convencional

A extração convencional (CE da abreviatura em inglês *conventional extraction*) também designada por extração sólido-líquido (SLE do inglês *solid liquid extraction*), consiste numa extração direta dos compostos-alvo de materiais vegetais utilizando diferentes solventes, tais como metanol, etanol, acetona. Estes solventes podem ser

usados sozinhos ou numa mistura de solventes em fase aquosa usando um extrator, como por exemplo um homogeneizador durante um determinado período de tempo [14,26].

Os solventes utilizados na CE podem extrair também alguns compostos indesejados, tais como clorofilas, gorduras, ceras, entre outros componentes. Neste caso, são necessários procedimentos adicionais para remover estes compostos, que aumentam o tempo e os custos de extração, bem como podem resultar em potenciais perdas de polifenóis. Nestes casos para remover as partículas indesejadas, geralmente usa-se um fracionamento adicional por extração líquido-líquido, por exemplo com acetato de etilo ou hexano, seguido de cromatografia de coluna ou uma extração em fase sólida [26].

A solubilidade dos compostos fenólicos depende principalmente da sua natureza química e da sua polaridade. Além disso, os compostos fenólicos podem formar complexos com outros componentes vegetais, tais como hidratos de carbono e proteínas, e estas interações podem afetar a solubilidade dos polifenóis nos solventes que, por sua vez, irão afetar os rendimentos de extração [26].

1.4.2. Extração assistida por microondas

A extração assistida por microondas (MAE do inglês *microwave-assisted extraction*) é um processo que utiliza energia de microondas para aquecer o solvente em contacto com uma amostra de modo a extrair os compostos de interesse da matriz para o solvente. A capacidade de aquecer rapidamente a mistura de solvente e amostra é uma das principais vantagens desta técnica [27]. Além disso, através da utilização de recipientes fechados, a extração pode ser realizada a temperaturas elevadas acelerando a transferência de massa dos compostos-alvo da matriz [28].

Uma das principais vantagens do recurso a MAE é a redução do tempo de extração, devido à diferença entre o tipo de aquecimento aplicado comparativamente com o usado na CE, boa reprodutibilidade e na utilização de energia de microondas. Adicionalmente, a MAE permite uma redução significativa no consumo de solventes e a possibilidade de múltiplas extrações numa só corrida. A eficiência da MAE é influenciada pela escolha de diversos parâmetros de extração, nomeadamente, o solvente, a temperatura e o tempo de extração [27,28].

1.5. Métodos de identificação e quantificação de compostos fenólicos

1.5.1. Métodos espectrofotométricos

A determinação do TPC pode ser determinada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O TPC é um método não específico uma vez que o reagente de Folin-Ciocalteu reage com todas as espécies redutoras presentes na solução. Em condições alcalinas, o reagente composto por tungstênio e molibdênio mudam da cor amarelo para azul depois de reagirem com espécies redutoras.

O TFC é um método que mede a formação do composto flavonóide-alumínio.

A determinação do poder redutor (FRAP) baseia-se na redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) para a forma ferrosa (Fe^{2+}) através da reação com os compostos antioxidantes presentes na solução. A redução do Fe(III) para Fe(II) resulta na mudança de cor de amarelo para verde ou azul, dependendo do poder redutor dos extratos [30].

O DPPH é um radical livre muito estável que é reduzido a hidrazina na presença de compostos antioxidantes. Quanto maior for o poder redutor dos extratos, maior serão os valores de absorvância, que correspondem a uma mudança de cor de purpura para um amarelo brilhante.

Através do método ABTS pode-se medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O radical ABTS^+ obteve-se através da reação de uma solução de ATBS 7 mM (10 mL) com persulfato de potássio (2,45 mM) incubados a temperatura ambiente e no escuro durante aproximadamente 16 h.

1.5.2. Métodos cromatográficos

A técnica de HPLC (abreviatura do inglês *high performance liquid chromatography*) surgiu nos finais dos anos 60 e advém da evolução da cromatografia líquida clássica. O HPLC é um dos muitos métodos cromatográficos de análise e separação de misturas químicas sendo que apresenta inúmeras vantagens comparativamente a outras técnicas [31]:

- É de aplicação praticamente universal;
- Apresenta uma notória precisão;

- Existe uma vasta gama de equipamentos, colunas e outros materiais necessários que permitem o uso de HPLC para quase todas as aplicações;
- A maioria dos laboratórios que funcionam com análises de misturas químicas estão equipados de HPLC, sendo muitas vezes a técnica de eleição.

Quando a injeção é automática, o seu fundamento tem por base a disposição das amostras num tabuleiro com vários poços (*rack*) para dar início à injeção automática (*autosampler*) na coluna cromatográfica. O(s) solvente(s) é(são) continuamente bombeado(s) através da coluna e os componentes da amostra que são eluídos, abandonam continuamente a coluna para posterior deteção. O sinal resultante do detetor é representado em função do tempo e é designado de cromatograma em que os picos correspondem a eluições dos componentes da amostra [31].

A separação depende do tipo de coluna e pode feita ser de duas maneiras distintas:

- Separação isocrática, quando a composição do solvente (um eluente ou mistura de eluentes) permanece sempre a mesma ao longo da separação, ou seja, a mesma composição ao longo de toda a corrida sendo esta mais lenta. Separa um número limitado de analitos e a largura dos picos resultantes, aumenta com o tempo;
- Separação por gradiente, quando a composição da fase móvel varia durante a análise e é composta por 2 a 4 eluentes. Este tipo de separação diminui os tempos de retenção, forma picos mais nítidos e separa analitos mais complexos.

Um computador controla toda a operação durante as análises por HPLC sendo a única intervenção manual, a colocação das amostras no tabuleiro. Além desta automatização de todo o processo, a HPLC é caracterizada pelo uso de bombas de alta pressão para uma separação mais rápida, colunas reutilizáveis e mais efetivas, maior separação e melhor controlo do processo para se obter resultados precisos e reproduzíveis [31].

1.6. Avaliação da presença de contaminantes

A avaliação da segurança alimentar é crucial para se evitar situações de perigo para a saúde humana ou até problemas de saúde pública. Esta avaliação segue regras e avalia diversos perigos, tais como os apresentados na Tabela 1.2. Apesar de não existirem regras nem protocolos específicos para os subprodutos agrícolas como é o caso das podas dos

mirtilos a avaliação da presença de contaminantes deve ser realizada para que se possa fazer uma aplicação segura destes mesmos subprodutos quer na alimentação, cosmética, etc.

Ao longo de toda a cadeia, a avaliação dos perigos deve ser assegurada através de controlo adequado ao longo da mesma, garantindo assim todos os processos de intervenção preventiva em relação aos potenciais perigos que podem ocorrer em qualquer etapa. São três os tipos de perigos potenciais, os Perigos Biológicos, os Perigos Químicos e os Perigos Físicos. Na tabela 1.2 pode-se ver quais os perigos associados aos alimentos (biológicos, químicos e físicos) e que podem ser reservatórios ou veículos de vários perigos que coloquem em risco a saúde pública [32].

Tabela 1.2 Perigos associados aos alimentos [32]

Risco Biológico	Parasitas	Bactérias patogénicas formadoras de esporos e não esporuladas			
Risco Químico	alergénicos	Aditivos alimentares (conservantes, coadjuvantes de fabricação)	Substâncias proibidas (metais pesados: chumbo, cádmio, etc..)	Resíduos veterinários (antibióticos, estimulantes de crescimento)	Resíduos químicos (tintas de impressão, pesticidas, fluidos de limpeza)
Risco Físico	Osso	Caroço de fruta	Vidro	Metais e Plásticos	Pedras e madeira

Os resíduos provenientes da agricultura poderão ser fontes de poluição ambiental caso não lhes seja dado um destino adequado, ou poderão ser fontes de contaminação de solos, água ou mesmo do ar, com os consequentes efeitos nos ecossistemas e na saúde pública [32].

A utilização destes resíduos sem qualquer controlo pode ter efeitos negativos no ambiente, se os mesmos apresentarem algum risco associado [32].

Os maiores riscos associados aos resíduos agrícolas estão relacionados com a presença de concentrações elevadas de nutrientes, contaminação de metais pesados, pesticidas e outros compostos orgânicos [32].

1.6.1. Pesticidas

Devido ao elevado aumento populacional a nível mundial, é necessário usar certos recursos que permitam que as culturas agrícolas não sejam afetadas por pragas e que possam ter um rápido crescimento. Para tal são usadas substâncias como os adubos, que facilitam o crescimento das plantações e os pesticidas para as proteger das pragas [33].

Segundo a Comissão Europeia um pesticida é “algo que previne, destrói ou controla um organismo nocivo (praga) ou doença, ou protege as plantas ou produtos vegetais durante a produção, armazenamento e transporte” [34].

Classificação de pesticidas

Os pesticidas podem ser divididos em dois tipos de classificação: química e por alvo de ação. A figura 1.10 apresenta a classificação dos pesticidas por alvo de ação [33].

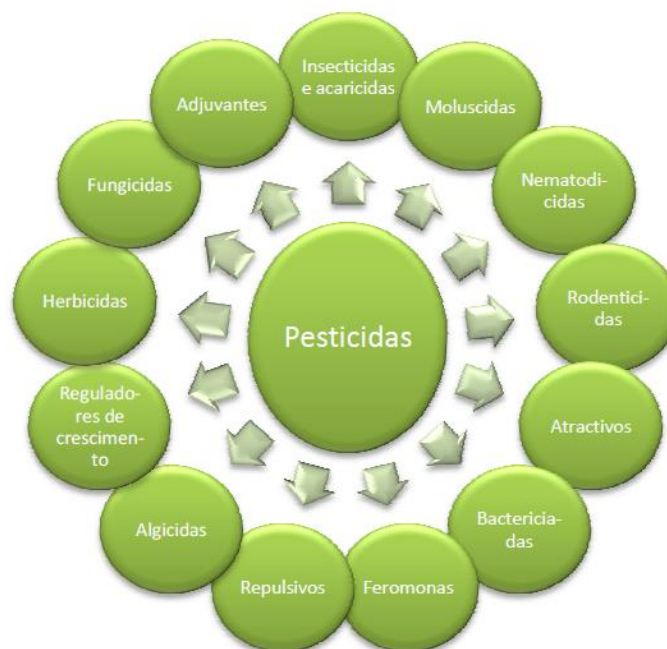


Figura 1.10 Classificação dos pesticidas por alvo de ação (adaptado de [33]).

Dentro da classificação por alvo de ação podemos encontrar os inseticidas, que são usados para combater pragas de insetos e de outros artrópodes; os acaricidas que ajudam a combater os ácaros; os moluscidas, que são usados para combater caracóis e lesmas, os nematicidas, que combatem nematóides principalmente os que se alimentam de raízes; os

rodenticidas que são usados para combater espécies roedoras; os algicidas têm por objetivo controlar as algas e os fungicidas combatem o aparecimento de fungos [33,34].

Para além destes temos também os atrativos que atraem as pragas para algo semelhante a uma armadilha; os bactericidas que ajudam no combate de microrganismos nocivos; as feromonas que são produtos bioquímicos utilizados para interromper o comportamento de acasalamento de insetos; os repulsivos que afastam as pragas de insetos, como o mosquito, e algumas aves; os herbicidas que combatem as ervas daninhas e outras plantas indesejáveis; os reguladores de crescimento que vão alterar o crescimento da floração ou a taxa de reprodução das plantas e os adjuvantes que são substâncias adicionadas à calda proporcionando determinadas propriedades [33].

Relativamente à classificação química os pesticidas podem ser agrupados de acordo com os grupos funcionais que possuem. Entre os diversos grupos podemos encontrar os seguintes [33]:

- Organoclorados;
- Organofosforados;
- Organossulfurados;
- Carbamatos;
- Formamidinas;
- Tiocianatos;
- Dinitrofenóis;
- Organoestânicos;
- Piretróides.

Pesticidas em Portugal

De acordo com o estudo efetuado pelo Instituto Nacional de Estatística o grupo de pesticidas mais vendido em Portugal entre 2015 e 2018 é o dos Fungicidas. (Figura 1.11) [35].

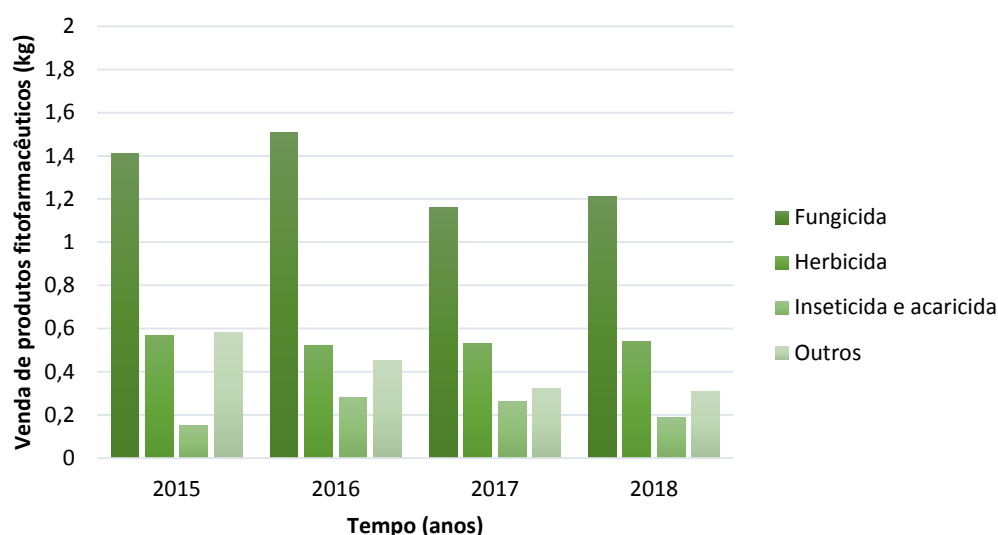


Figura 1.11. Venda de pesticidas entre 2015 e 2018

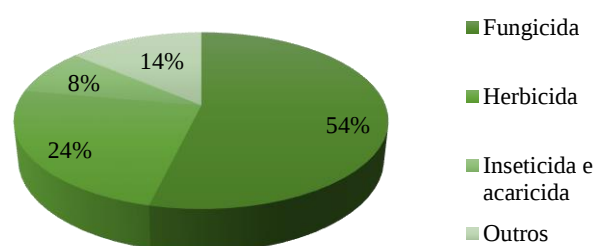


Figura 1.12. Volume de vendas de pesticidas no ano de 2018

Analisando ambos os gráficos das figuras 1.11 e 1.12 pode-se afirmar que no ano de 2018 os fungicidas foram os pesticidas mais usados em Portugal, visto que representam cerca de 54% do total de vendas. Já os herbicidas representam apenas 24% das vendas sendo que têm evidenciado uma taxa de crescimento de 2% face ao ano de 2015. Relativamente aos inseticidas/acaricidas estes representam 8% do total de vendas no ano de 2018 tendo-se verificado um decréscimo de 4% relativamente ao ano de 2017.

A tabela 1.3 apresentada as classificações por grupo de pesticidas, tendo em conta as substâncias ativas mais usadas em Portugal.

Tabela 1.3 Classificação dos pesticidas ^[33]

Grupo de Pesticida	Substância ativa (nome comercial)
Organofosforados	Cloropirifos
	Dimetoato
Derivados de aniline	Propanil
	Metalaxil
Derivados de triazinicos	Metribuzina
	Atrazina
	Terburilazina
	Amitrol
Tiacarbamatos	Molinato
Derivados do ácido fenoxiacético	2,4-D
	MCPA
	Triclopir
Derivados de acetamida	Alacloro
	S-metolacloro
	Cimoxanil
Benzotiadiazole	Bentazona
Derivados de ureia	Diruão
	Linurão
	Clortolurão
Azol	Tebuconazol

As substâncias ativas descritas na tabela 1.3 são maioritariamente herbicidas, fungicidas e por fim alguns inseticidas [33,34].

Riscos

Muito embora os pesticidas têm ação benéfica sobre o controlo de pragas, eles apresentam preocupações e danos a nível ambiental visto que [33]:

- Contaminam o ar, água, solo e alimentos, já que os pesticidas podem sofrer arrastamento devido ao vento, à lixiviação ou ao escoamento superficial;
- Risco para o Homem e animais domésticos quando expostos direta ou indiretamente aos pesticidas, causando efeitos adversos no sistema imunitário e endócrino dos seres vivos;
- Aparecimento de outras pragas devido aos danos exercidos sobre a fauna aquando da utilização de pesticidas;
- Perda da eficácia dos pesticidas, uma vez que os insetos e as ervas daninhas se tornam resistentes a estas substâncias;
- Acumulação de resíduos na cadeia alimentar, devido à substância ativa e aos respetivos produtos de degradação e de reação presentes nos produtos agrícolas após aplicação de pesticidas;
- Diminuição da biodiversidade.

Um aspeto importante a ter em consideração nos pesticidas é o seu grau de toxicidade que pode ser medido tendo em conta os efeitos que estes poderão ter quando são ingeridos e inalados, quando estão em contacto com a pele e com os olhos. Também podem-se manifestar a longo prazo quando o ser vivo está exposto, de uma forma continuada, a determinados pesticidas. Assim sendo estes poderão ter efeitos mais graves podendo provocar cancro, anomalias genéticas, efeitos anómalos na reprodução e desenvolvimento de fetos e efeitos adversos no sistema nervoso [34].

De acordo com a caracterização toxicológica torna-se necessário colocar essa informação no rótulo identificativo substanciado produto comercial e também deverão estar escritas as frases de segurança e de risco, de modo a assegurar um bom uso e manuseamento dos produtos [33].

1.6.2. Poluentes orgânicos

Poluentes Orgânicos Persistentes

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) são compostos orgânicos resistentes à degradação química, fotolítica e biológica e têm uma origem essencialmente antropogénica [36].

Em geral estes compostos possuem baixa solubilidade em água, mas uma alta solubilidade em lípidos o que, consequentemente provoca a sua acumulação nos tecidos adiposos. A persistência diz respeito ao intervalo de tempo que um composto é capaz de permanecer no ambiente antes de ser degradado noutros compostos mais simples. Esta característica, associada ao facto de serem altamente solúveis em lípidos, potencia a sua perigosidade ao nível da cadeia alimentar, e consequentemente, os riscos de exposição dos consumidores de topo, como é o caso do ser humano [36].

A Decisão 19/13 do Conselho Diretivo da Organização das Nações Unidas para o Ambiente aprovada pelo Governo em fevereiro de 1997, identificou doze POPs prioritários sendo eles o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), aldrina, dieldrina, endrina, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex, toxafeno, dioxinas, furanos e policlorobifenilos (PCB) [36].

Policlorobifenilos (PCB)

Os PCB representam um grupo de substâncias químicas que, devido às suas propriedades dielétricas, possuíram uma vasta utilização industrial durante os anos 80 e eram essencialmente utilizados em equipamentos elétricos como transformadores e condensadores [36].

Os PCB constituem uma família de 209 compostos cuja estrutura consiste em anéis de benzeno ligados em número variável. Estes anéis podem estar substituídos por átomos de cloro. A fórmula empírica dos PCB é $C_{12}H_{10}Cl_n$ (figura 1.13), sendo que o valor de n pode variar entre 1 e 10 [28].

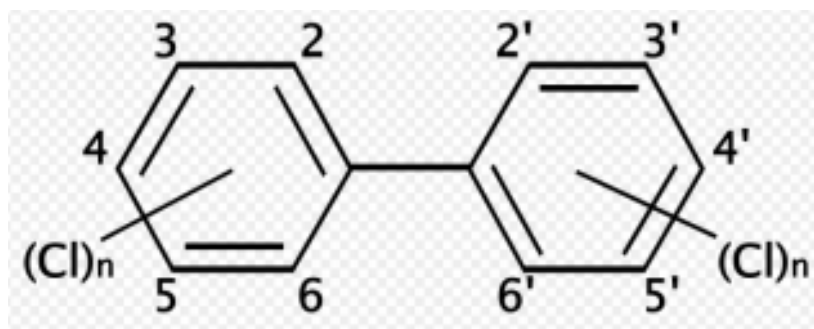


Figura 1.13 Estrutura molecular dos PCB [36]

Estes compostos são de origem exclusivamente sintética, tendo a sua produção sido iniciada nos EUA na 2ª década do século XX. A síntese era realizada por cloração da molécula de bifenilo utilizando cloro gasoso. A estrutura molecular dos PCB confere-lhes um conjunto de propriedades físico-químicas muito particulares, tais como, a resistência a altas temperaturas impedindo que inflamem com facilidade, são maus condutores elétrico e apresentam uma elevada estabilidade química e térmica, são dificilmente oxidáveis, entre outros [36].

Devido às suas características, os PCB apresentam uma enorme variedade de aplicações industriais, comerciais e domésticas em todo mundo, nomeadamente em material elétrico como reguladores de tensão e interruptores, lubrificantes, óleos industriais plásticos e produtos de borracha, entre outro tipo de aplicações [36].

Pelo facto dos PCB serem POP, eles podem caracterizar-se pela sua resistência à degradação pelas vias química, fotolítica e biológica, características que favorecem a persistência destas substâncias no ambiente durante muito tempo e o seu transporte para longas distâncias (bioacumulação). Os PCB apresentam ainda a capacidade para se bioamplificar (acumulação progressiva ao longo da cadeia alimentar) em condições ambientais específicas, podendo atingir concentrações toxicológicas elevadas [36,37].

Atualmente, a libertação de PCB para o ambiente pode ainda ocorrer, nomeadamente através de situações de descargas indevidas de fluidos contendo PCB, fugas de equipamentos elétricos, armazenamento irregular de resíduos, entre outras [36].

Para além dos efeitos nocivos dos PCB sobre o ambiente, a exposição aos compostos está também associada a diversos problemas a nível da saúde pública. A absorção de PCB pelos seres vivos pode processar-se através da pele, por inalação e pela cadeia alimentar, sendo esta última a causa de contaminação mais comum. Dentro do organismo, estes compostos são transportados através da corrente sanguínea para os vários músculos e para o fígado. Por serem altamente lipofílicos, os PCB têm tendência

a depositar-se nos tecidos adiposos viscerais, onde vão estimular as enzimas do fígado, alterando a sua função [37].

Consoante a dosagem de exposição, são esperados os seguintes efeitos [37]:

- 9 ppm: danos no sistema imunitário;
- 13 ppm: redução da quantidade de hormonas sexuais nos homens;
- 47 ppm: diminuição no crescimento infantil

A dose letal de PCB situa-se entre 0,5 g/kg e 11,3 g/kg de massa corporal [37].

1.6.3. Retardantes de chama

Os polímeros sintéticos, empregues nos mais variados bens de consumo, na indústria e também na construção civil, foram criados devido ao crescimento populacional e o consequente aumento de novos produtos. A maioria destes polímeros é constituída à base de derivados de petróleo, portanto são inflamáveis, havendo assim a necessidade de promover medidas que ajudem a retardar a propagação das chamas.

Foram assim criados os retardantes de chamas pelos egípcios em 450 A.C, que utilizavam alume para diminuir a inflamabilidade da madeira, e mais tarde em 200 A.C foram os romanos que começaram a utilizar o alume e o vinagre em mistura com o mesmo objetivo [38].

Os retardantes de chama aumentam o tempo que um material leva para iniciar o seu processo de combustão ou tornam a propagação da chama mais lenta, depois de já se ter iniciado a combustão. Num incêndio, os polímeros com retardantes de chama devem proporcionar intervalos de tempo maiores que possibilite escapar do fogo, menos geração de calor e menos geração de monóxido de carbono. Estes compostos devem fornecer um efeito durável ao produto com a adição de pequenas quantidades, devem ser de fácil incorporação, não ter efeitos corrosivos nos equipamentos de mistura e processamento, não se decomporem ou reagirem com o polímero durante o processamento, entre outras [39].

Atualmente existem 175 produtos químicos classificados como retardantes de chamas que se encontram divididos em 4 grandes grupos [38]:

- a) Inorgânicos (hidróxidos de alumínio, antimónio e estanho);
- b) Orgânicos halogenados (clorados e bromados);
- c) Organofosforados;

d) À base de nitrogénio

Estes compostos têm o poder de retardar a propagação das chamas por meio de ações físicas ou por ações químicas [38].

No caso das ações físicas, estes agem por meio de arrefecimento quando os compostos libertam partículas de água ao serem expostos ao calor, ou pela formação de uma camada protetora que envolve os materiais. Relativamente às ações químicas, na presença de calor, os retardantes de chama reagem com o ar produzindo gases incombustíveis que reduzem a quantidade de oxigénio que seria utilizado pela combustão ou, ainda, inibem a combustão ao reagir com os polímeros na fase sólida, formando uma camada protetora rica em carbono [38].

Retardantes de chama bromados

Estes retardantes de chama bromados (BFRs) estão entre os mais usados no mundo devido ao seu baixo custo, alta eficiência contra a propagação de chamas e fórmulas adaptáveis a quase todos os polímeros [38].

Os BFRs podem ser divididos em 3 grandes subgrupos, dependendo do modo de incorporação em polímeros [38]:

- Monómeros (estirenos bromados e butadieno bromados);
- Reativos (tetrabromobisfenol A);
- Aditivos (bifenilos polibromados, éter difenílicos polibromados, hexabromociclododecano e tetrabromobisfenol A).

Os monómeros bromados são usados na produção de polímeros bromados, os reativos são ligados quimicamente ao polímero e os aditivos são apenas misturados aos polímeros. Os aditivos são mais propensos a serem lixiviados para o ambiente [38].

Os retardantes de chama bromados, reativos e aditivos, ou seja, as bifenilos polibromados (PBB), os éter difenílicos polibromados (PBDE), o tetrabromobisfenol A (TBBP-A) e os isómeros de hexabromociclododecano (HBCD) devido à sua grande produção e uso tem atraído atenções nos últimos anos. Estes retardantes de chama bromados são de uma forma geral persistentes, lipofílicos e apresentam elevado potencial para a bioacumulação, sendo prejudiciais aos ecossistemas, e produzem grandes quantidades de fumo de gases tóxicos em incêndios [38].

Bifenilos polibromados (PBBs)

Na figura 1.14 esta representada a estrutura química dos (PBBs). A sua aplicação limitou-se a termoplásticos utilizados em equipamentos eletrónicos de uso doméstico e industrial [38].

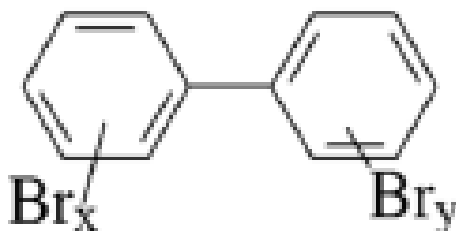


Figura 1.14 Estrutura química genérica da Bifenilo Polibromado (PBB)

Estes compostos podem ter entre 1 a 10 átomos de hidrogénio substituíveis por bromo. A sua produção comercial envolve um número restrito de compostos onde apenas 42 congéneres de PBBs foram sintetizados em laboratório. Em termos comerciais existem na forma de 3 misturas [38]:

- a) Hexabromobifenil (HxBB)
- b) Octabromobifenil (OBB)
- c) Decabromobifenil (DBB)

Estes compostos foram identificados ao longo do tempo como responsáveis por diversos problemas de contaminação ambiental e de saúde pública. A absorção dos PBBs pelos organismos ocorre de forma rápida e inversamente proporcional ao número de bromos na molécula. Devido à sua característica de lipofilicidade as maiores concentrações são encontradas, principalmente, nos tecidos hepáticos e adiposos. Os efeitos da contaminação podem ir desde défice na função neuromuscular, na atividade locomotora e atraso no crescimento [38].

Éter difenílico polibromados (PBDE)

Os PBDEs (figura 1.15) foram produzidos principalmente na forma de 3 misturas: Penta-BDE, octa-BDE e deca-BDE [38].

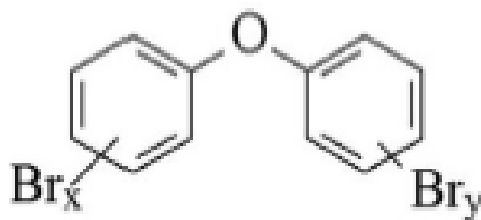


Figura 1.15 Estrutura química genérica do éter difenílico polibromado (PBDE)

Devido às suas propriedades, os PBDEs são resistentes à degradação físico-química e biológica e, conseqüentemente apresentam alta persistência no ambiente. São lipofílicos e hidrofóbicos, podendo bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia trófica. Apresentam toxicidade para os organismos e, devido à sua baixa pressão de vapor, podem ser transportados a longas distâncias [38].

Os PBDEs não são quimicamente ligados aos polímeros, podendo então ser separados da matriz polimérica durante algumas atividades como incineração de componentes eletroeletrônicos e bens de consumo, ou deposição de lixo eletrônico e transformadores em lixo comum, resultando na introdução desses compostos no ambiente [38].

Uma vez no ambiente estes compostos podem ser encontrados em sedimentos ou na biota. Os níveis mais elevados são normalmente encontrados em zonas industriais e com maior densidade populacional [38].

Estes compostos são altamente tóxicos para organismos tendo como prováveis conseqüências a desregulação endócrina, cancerígena e deficiência neurológica. Sendo os PBDEs muito semelhantes com as hormonas recetoras da tiroide, pode haver uma competição entre eles e causar alterações ao nível da tiroide [38].

1.7. Técnicas de extração de contaminantes

As amostras ambientais são complexas e alguns dos elementos podem interferir com os compostos de interesse, por isso a etapa de extração deve permitir obter extratos adequados de serem analisados. O aparecimento de obstáculos nas análises, como a presença de compostos indesejáveis, promoveu o desenvolvimento de novas técnicas de extração já que os métodos existentes não permitiam obter resultados satisfatórios ou

eram caros, laboriosos ou difíceis de implementar. Os métodos de extração permitem que compostos a estudar sejam separados da amostra em estudo e dos possíveis interferentes, de forma a ser possível a sua determinação. Os métodos de extração variam consoante a matriz e, por isso, a sua escolha vai interferir no resultado final. Outro aspeto importante a considerar na escolha do método de extração é o seu custo assim como as suas vantagens em termos ambientais. Os processos de extração tradicionais, como a extração líquido-líquido (LLE), extração sólido-líquido (por exemplo, Soxhlet) e a extração em fase sólida (SPE) utilizam uma elevada quantidade de solventes orgânicos e, por isso, são processos muito dispendiosos e pouco amigos do ambiente. Neste trabalho serão abordados o método SPE (extração em fase sólida) e método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*).

1.7.1. QuEChERS

QuEChERS é o acrónimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*, que, por si só, representam as principais características deste método, pois, é considerado rápido, fácil, de baixo custo, eficiente, robusto e seguro, criado inicialmente para a deteção de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais.

O método QuEChERS é um método que possibilita a extração e purificação dos analitos utilizando um solvente orgânico, num meio com grande excesso de sais, que possibilita a extração de compostos polares e não polares, pelo facto do adsorvente se concentrar na matriz da amostra e não interagir com os analitos alvos, sendo esta uma das suas maiores vantagens [48].

O primeiro passo deste método é a extração por partição de uma amostra homogeneizada e humedecida para um solvente orgânico, induzida por mistura de sais. Alguns dos sais utilizados são as misturas de sulfato de magnésio (exsicante), cloreto de sódio, acetato de sódio, citrato e hidrogeno-citrato de sódio (tampão pH). Os solventes mais utilizados são acetona, acetato de etilo e acetonitrilo, no final é realizada uma centrifugação para que a extração possa ser concretizada [49].

O segundo passo da extração consiste numa limpeza de impurezas o que faz com que seja um passo opcional e que depende da matriz da amostra e do método de análise. Esta limpeza pode ser feita através de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). No final pode-se realizar uma análise direta por métodos cromatográficos [48,49].

O Método QuEChERS apresenta algumas vantagens tais como:

- i. Tratamento de amostra muito fácil e rápido: o extrato final contém o analito num solvente com boa flexibilidade para a análise analítica e possível injeção direta em cromatografia líquida. Para a análise em cromatografia gasosa é habitual acrescentar um passo de troca de solvente;
- ii. Elevada eficiência laboratorial por redução do tempo de preparação da amostra, do volume de solventes e dos resíduos gerados;
- iii. Elevada recuperação principalmente, de pesticidas;
- iv. É uma alternativa às extrações tradicionais líquido-líquido e em fase sólida;
- v. Desenvolvida para análise de múltiplos analitos: pesticidas, retardantes de chama, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) em diversas amostras (frutos, vegetais e outros alimentos, solos). Em amostras contendo teores de água elevada (amostra com baixo teor de água a eficiência da extração pode ser melhorada com a adição de água).

Para que o método tenha o seu máximo de eficiência existem alguns parâmetros que podem ser otimizados tais como o solvente de extração, o tempo de extração, o teor de água na amostra, a razão amostra/solvente, os sais adicionados, a quantidade desses mesmos sais adicionados, o pH e velocidade de agitação utilizada [50].

Três versões do método QuEChERS foram validados com sucesso em vários laboratórios através da AOAC Internacional e Comitê Europeu para Padronização e laboratórios de investigação. Na literatura estão reportadas muitas versões modificadas da abordagem QuEChERS adaptadas às necessidades do analito e amostras em estudo. [41,42]

Este método é um dos estudados neste trabalho para a determinação de pesticidas e outros contaminantes ambientais das podas dos mirtilos.

1.7.2. Extração em fase sólida

A SPE (extração em fase sólida) é utilizada principalmente para amostras líquidas, e com a finalidade principal eliminar os interferentes e simultaneamente de concentrar a amostra antes de seguirem para análise por métodos cromatográficos [43].

Este processo foi desenvolvido com o objetivo de completar as lacunas apresentadas pela extração líquido-líquido. Consiste em colocar a amostra numa coluna onde se encontra uma fase sólida compacta. Deste modo o analito é purificado e

concentrado por eluição com um solvente apropriado. O processo de extração é dividido em várias etapas como se pode observar na Figura 1.16 [43].

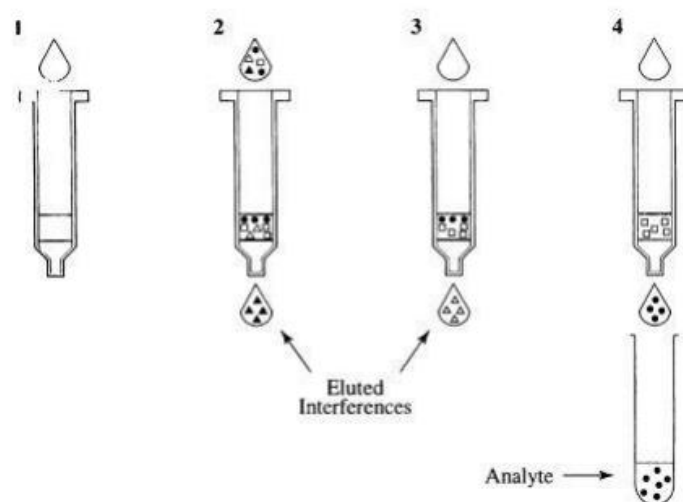


Figura 1.16 Descrição do processo SPE [44]

Os passos 2 e 3 retratam os processos que ocorrem na eluição dos interferentes, onde os primeiros interferentes (triângulos preenchidos) não têm qualquer afinidade com o sólido e são separados de imediato, de seguida passa-se um solvente adequado pela coluna para a separação de outro interferente (triângulos sem preenchimento) [43].

Por fim, no passo 4, utiliza-se o solvente que fará a eluição do analito pretendido para posterior análise. Outro processo de extração utilizado é a eluição direta do analito, as separações intermédias referidas no método anterior não existem, ficando todos os interferentes retidos na coluna. O solvente que é utilizado é selecionado atendendo às características dos compostos a estudar sendo apenas esses a sofrer eluição [43 e 45]

A fase sólida do cartucho e o respetivo mecanismo de retenção têm que ser selecionados, tendo em conta o composto ou grupo que se pretende analisar, sendo necessário avaliar a polaridade. Existem, portanto, cartuchos de fase normal, fase reversa e de permuta iónica. A fase normal envolve adsorção do analito por uma superfície polar. As interações podem ser pontes de hidrogénio, dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido. Contrariamente, a fase reversa envolve solutos orgânicos em solventes polares como é o caso da água em contacto com fases sólidas apolares. O mecanismo de interação é não polar, onde estão presentes forças de Van der Waals [43]. A permuta iónica ocorre num soluto orgânico no estado iónico presente num solvente polar ou apolar e um adsorvente com a carga iónica contrária. A energia presente nestas ligações é elevada e permite que

solutos polares sejam removidos com eficácia de solventes polares. Na Tabela 1.4 pode-se observar as vantagens e desvantagens da extração em fase sólida [44,45]

Tabela 1.4. Vantagens e desvantagens da extração em fase sólida ^[43,44]

Vantagens	Desvantagens
Menor consumo de solvente orgânico	Tempo elevado de análise
Não formação de emulsões	Altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais com multivias
Facilidade de automação	Dificuldade em selecionar o adsorvente adequado para a aplicação desejada
Altas percentagens de recuperação do analito	Cartuchos utilizados apenas uma vez
Volumes reduzidos de resíduos tóxicos	Baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho
Capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito	Para amostras muito contaminadas, pode ocorrer passagem de impurezas

1.8. Métodos de identificação e quantificação de contaminantes

A cromatografia é o método analítico mais utilizado para a análise de pesticidas. É uma técnica de separação e de identificação de diferentes compostos. Esta separação depende do comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Para a separação de grupos de compostos mais apolares o método mais utilizado é a cromatografia gasosa (GC). Relativamente aos detetores, especificamente para os pesticidas organofosforados e organoclorados os mais utilizados são o detetor de chama fotométrica (FPD) e detetor de captura eletrónica (ECD), respetivamente.

1.8.1. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação, onde os componentes da amostra se separam entre duas fases, sendo uma a fase estacionária e a outra a fase móvel gasosa. De acordo com o tipo de fase estacionária, a cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido, em que a fase estacionária é um sólido, e gás-líquido, sendo a fase estacionária líquida [44]. Os principais constituintes de um sistema cromatográfico podem ser observados na Figura 1.17 [44].

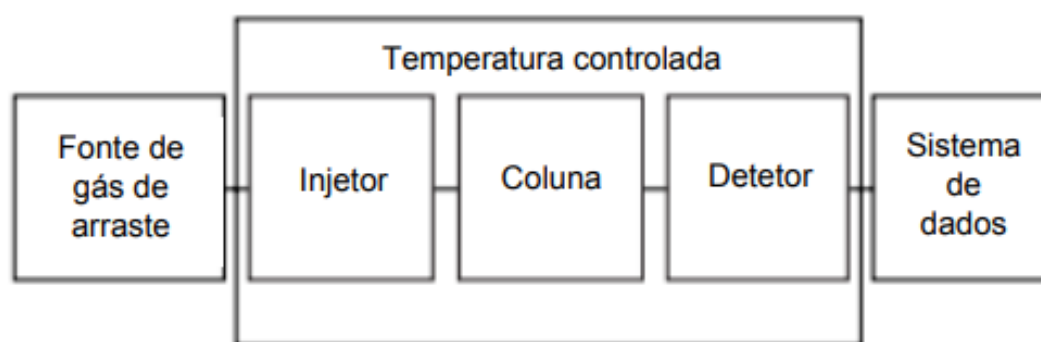


Figura 1.17. Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa [44]

A cromatografia gasosa, tal como todas as técnicas analíticas, apresenta vantagens e desvantagens na sua utilização. Algumas delas podem ser observadas na tabela 1.5.

Tabela 1.5 Vantagens e Desvantagens da Cromatografia Gasosa

Vantagens	Desvantagens
Rapidez de análise	Limitado a amostras voláteis
Alta eficiência e resolução	Não é aconselhável para amostras instáveis termicamente
Alta sensibilidade	Técnica difícil de executar para amostras sólidas grandes
Alta precisão	Elevado custo do equipamento e manutenção
Pequeno volume de amostra	

Gás de arraste

A fonte de gás de arraste fornece ao sistema o gás inerte que servirá de fase móvel. Esse gás pode ser azoto ou hélio, sendo a escolha baseada nos princípios de separação e no custo associado à sua utilização [44]. Outro gás que pode ser utilizado é o hidrogénio, este apresenta-se mais eficiente do que os anteriores, contudo o seu custo elevado e o seu maior risco de acidente excluem-no na grande maioria das situações [44].

Injetor

O processo analítico inicia-se pela injeção da amostra no injetor. A amostra é introduzida no sistema cromatográfico a uma temperatura elevada e controlada de forma a garantir vaporização da amostra. A injeção da amostra pode ser feita manualmente ou de forma autónoma com a utilização de um injetor automático (*autosampler*) [44].

Os modos de injeção em cromatografia gasosa podem ser *split* ou *splitless*. Em modo *split*, o volume recolhido pela agulha não entra totalmente para a coluna, parte do analítico vai para uma outra corrente que não a da coluna. Este método é utilizado quando se trata de amostras muito concentradas que podem prejudicar a coluna capilar [44]. No modo *splitless* o analito é totalmente injetado na coluna.

Coluna

Após a passagem pelo injetor a amostra entra na coluna e inicia-se a separação dos compostos de acordo com a afinidade com a fase estacionária [46]. A coluna é o cerne de todo o processo e está inserida num forno que torna possível a criação de rampas de temperatura adequadas para os diferentes tipos de análise. Os dois tipos de colunas utilizadas em GC são as compactadas e as capilares, com a característica mútua de poderem possuir a fase estacionária nos estados líquido ou sólido. As primeiras colunas a serem utilizadas foram as compactadas, no entanto, cerca de 80% das análises realizadas hoje em dia utilizam as colunas capilares devido à alta eficiência, maior rapidez e maior capacidade de separação de misturas complexas devido ao seu tamanho (até 100 m).

1.8.2. Cromatografia gasosa com detetor de Chama fotométrica (GC-FPD)

O detetor FPD (detetor de chama fotométrica) é utilizado para detetar compostos de enxofre e fósforo, como por exemplo os OPP, que usam uma chama de difusão de hidrogénio para decompor e excitar os fragmentos deixados após a combustão desses compostos para um estado eletrónico mais elevado. Estas espécies regressam ao seu estado neutro e emitem espectros de bandas características, que são então isolados por um filtro e monitorizados por um detetor fotomultiplicador [45].

1.8.3. Cromatografia gasosa com detetor de Captura de elétrons (GC-ECD)

Como referenciado anteriormente na cromatografia gasosa as substâncias voláteis são transportadas por um gás na coluna, interagindo com a fase estacionária (sólida ou líquida) que está ligada a um material sólido.

O detetor ECD (detetor de captura de elétrons) é utilizado na detecção de compostos altamente eletronegativos, sendo seletivo para o grupo dos compostos halogenados. Possui um emissor, que emite um elétron, causando a ionização do gás transportador e consequentemente, um aumento súbito de elétrons. Estes elétrons provocam uma corrente elétrica constante entre os dois eletrodos que constituem o detetor, na ausência de substâncias ou espécies que possam capturá-los [45].

Na presença de compostos com grupos funcionais eletronegativos que capturam os elétrons, como os compostos halogenados, a intensidade da corrente elétrica diminui bruscamente, permitindo assim a identificação de tais substâncias.

A resposta do detetor surge num cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades dependem da concentração da substância e da sensibilidade do detetor [45].

A junção desses detetores com a cromatografia gasosa confere ao sistema uma elevada sensibilidade e precisão na análise de substâncias voláteis com concentrações vestigiais [45].

Capítulo 2 Objetivos

Este projeto foi realizado no âmbito da disciplina de dissertação de mestrado de engenharia química do ramo de qualidade do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP). Foi realizado no centro de investigação Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) do ISEP que pertence ao Laboratório Associado para a Química Verde da Rede de Química e Tecnologia (LAQV/REQUIMTE).

O objetivo geral deste projeto foi determinar a potencialidade de utilização de podas de mirtilos em outros produtos como cosméticos e/ou alimentos.

Os objetivos mais específicos do projeto centram-se na preparação de extratos com recursos a técnicas verdes, nomeadamente extração convencional e extração assistida por microondas, caracterização dos extratos avaliando a bioatividade através de métodos espectrofotométricos nomeadamente TPC, teor de flavonoides totais (TFC), FRAP, ABTS e DPPH, identificação de compostos com bioatividade por cromatografia líquida de alta eficiência, avaliação da segurança química das podas analisando a presença de contaminantes por cromatografia gasosa.

Capítulo 3 Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Os reagentes e padrões usados durante o trabalho experimental encontram-se listados a seguir:

- 2,2-azinobis (3-etilbenzotizolina-6-ácido sulfónico)diamónio sal (ABTS, 97%, Sigma-Aldrich);
- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, 99%, Fluka);
- 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, 99%, Fluka);
- (±)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromane-2-ácido carboxílico (Trolox, 97%, Sigma-Aldrich);
- (+)- Catequina hidratada ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich);
- Ácido clorídrico (Merck);
- Ácido fórmico ($\geq 98\%$, Merck, Darmstadt);
- Ácido gálico monohidratado (GA, $\geq 98\%$, Fluka);
- Acetato de sódio tri-hidratado (99%, Panreac);
- Acetonitrilo (Carlo Erba, France)
- Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3 , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich);
- Cleanups (Sigma aldrich);
- Cloreto de Alumínio (99,52%, Panreac);
- Cloreto de ferro (III)-hexahidratado ($\geq 99\%$, Riedel-de Haen);
- Cloropirifos (Sigma-Aldrich);
- Cloropirifos metil (Sigma-Aldrich);
- Clorfenvinfos (Sigma-Aldrich);
- Dimetoato (Sigma-Aldrich);
- Dispersão SPE (2mL, Fatty Sample, AOAC, Agilent Technologies);
- Etanol Absoluto ($\geq 99\%$, Fisher);
- Folin Ciocalteu's (FC) (Sigma-Aldrich);
- Hidróxido de sódio ($> 99\%$, Labkem);
- L(+)-Ácido ascórbico ($\geq 99,7\%$, Riedel-de Haen);

- Malatão (Sigma-Aldrich);
- Nitrato de sódio (99%, M&B);
- n-Hexano (Sigma-aldrich);
- Original QuEhERS Extract Tubes (Agilent Technologies);
- Persulfato de potássio ($\geq 99,5\%$, Sigma-aldrich);
- Paratão metil (Sigma-Aldrich);

Na tabela 3.1 apresenta-se a listagem de pesticidas, PCB e retardantes de chama estudados.

Tabela 3.1 Lista de pesticidas, PCB e retardantes de chama

Família	Compostos	Estrutura química	Massa Molecular (g/ml)	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g/cm ³)	Toxicidade
OCP	α -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	288	1,87	Classificação B2: cancerígeno
	HCB	C ₆ Cl ₆	284,78	322,2	2,049	Classificação B2: cancerígeno
	β -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	60	1,89	Classificação B2: cancerígeno
	lindano	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	323,4		Classificação B2: cancerígeno
	ζ -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	-	1,87	Classificação B2: cancerígeno
	aldrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,91	145	1,6	Classificação B2: cancerígeno
	IS			-	-	-
	Endossulfão I	C ₅₁ H ₆₀ N ₂ S	733,1	-	-	-
	p,p'-DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,03	336		
	Dieldrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91	330	1,75	Classificação B2: cancerígeno
	Endrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91		1,7	Classificação D: Não cancerígeno
	Endossulfão II	-	-	-	-	-
	p,p'-DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320,04	193	1,38	Classificação B2: cancerígeno
	DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,49	260	0,99	Classificação B2: cancerígeno
	Metoxicloro	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	345,65	346	1,41	Classificação B2: cancerígeno
Piretróides	Bifentrina	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,9	-	1,2	-
	Cialotrina	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	449,8	187-190	1,25	Classificação Grupo D: Não cancerígeno
	Permetrina	C ₂₁ Cl ₂ H ₂ OO ₃	391,3	220	1,19 - 1,27	-
	Ciflutrina	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	434,3	-	1,34	Classificação: provavelmente não é cancerígeno

	Cipermetrina	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	416,3	-	1,25	Classificação Grupo C: possivelmente cancerígeno
	Fenvalerate	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	419,9	39,5 - 53,7	1,17	Classificação Grupo E: Evidência de não cancerígeno
	Deltametrina	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505,2	-	-	-
OPP	Dimetoato	$C_8H_{12}NO_3PS_2$	229,26	117	1,30	-
	Cloropirifos-metilo	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,59	42	1,40	-
	Paratião-metilo	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	2913	6		-
	Malatão	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,35	156-157 a 0,7 mmHg	1,23	-
	Cloropirifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,59	42	1,40	-
	Clorofeninfos	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	359,56	-	-0	-
Retardantes de chama	BDE 28	$C_{12}H_7Br_3O$	406,89	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 47	$C_{12}H_6Br_4O$	485,79	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 100	$C_{12}H_5Br_5O$	564,7	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 99	$C_{12}H_5Br_5O$	564,7	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 154	$C_{12}H_4Br_6O$	643,6	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 153	$C_{12}H_4Br_6O$	643,6	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	BDE 183	$C_{12}H_3Br_7O$	722,5	-	-	Classificação B2: cancerígeno
PCB	PCB 28	$C_{12}H_7Cl_3$	257,5	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	PCB 118	$C_{12}H_5Cl_5$	326,4	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	PCB 101	$C_{12}H_5Cl_5$	326,4	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	PCB 153	$C_{12}H_4Cl_6$	360,9	-	-	Classificação B2: cancerígeno
	PCB 180	$C_{12}H_3Cl_7$	395,3	-	-	Classificação B2: cancerígeno

3.2. Preparação das amostras

As podas de mirtilos utilizadas no presente trabalho foram gentilmente fornecidas pela empresa Mirtidão, LDA (Povolide, Viseu, Portugal) e correspondem às podas do ano de 2019 e 2020 tendo sido selecionadas de forma aleatória. As variedades fornecidas foram a *Duke* e a *Bluecrop*. A variedade *Duke* possui um período de maturação precoce, de meados de Maio, apesar de ter uma floração tardia. É uma variedade conhecida pela sua elevada produtividade de frutos de tamanho grande. A variedade *Bluecrop* é geralmente colhida em meados de Junho, e são plantas extremamente resistentes, e o seu fruto é de tamanho médio.

As amostras foram cortadas em tamanhos mais pequenos (cerca de 5 cm, Figura 3.1.) de forma a serem moídas (Figura 3.2.) e posteriormente peneiradas (Figura 3.3.).



Figura 3.1. Corte dos ramos de podas (variedade Duke)

Durante a etapa de peneiração separou-se diversos tamanhos, mas a fração obtida entre 710 μm - 1mm foi a utilizada nos ensaios experimentais.



Figura 3.2. Moinho (Retsch ZM200)



Figura 3.3. Peneiro (Retsch AS200)

3.3. Métodos de extração de compostos fenólicos

3.3.1. Extração Convencional

O método de extração convencional foi realizado de igual forma para ambas as variedades de podas, em duplicado, de acordo com o procedimento previamente descrito por Moreira *et al* [46]. Para isso, usou-se 0,5 g de amostra com 20,0 mL de etanol 50% que foi colocado num banho (OVAW BSC127 E) a 55°C em agitação (100 rpm) durante 2 horas. Após isso, as amostras foram centrifugadas (Thermo Electron LED GmbH Am Kalkberg 37520 Osterode am Harz) durante 20 min a 4000 rpm para que o resíduo sólido sedimentasse. De seguida, recolheu-se o sobrenadante que foi colocado em eppendorfs e armazenados a -20°C para posterior análise.

3.3.2. Extração Assistida por Microondas

A MAE (CEM Corporation 3100 Smith Farm Road Matthews, NC 28105-5044) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Moreira *et al.* [46]. Para tal, usou-se 0,1g de amostra que foram extraídas com 20,0 mL de etanol 50%. Cada amostra foi extraída em duplicado com agitação e num dos vasos, denominado de vaso de controlo (Figura 3.4.), foi colocado as sondas de temperatura e de pressão para controlar os parâmetros de extração abaixo descritos:

- Potência: 1200 w;
- Rampa de temperatura: 20 min (esta reflete o tempo que se demora a atingir a temperatura de extração desejada);

- Temperatura de extração: 100°C que foi mantida durante 20 min;
- Pressão máxima permitida: 200 psi;
- Agitação: 2 (média)



Figura 3.4. Vasos de extração microondas contendo as amostras, evidenciando-se o vaso de controlo contendo as sondas de temperatura e de pressão

3.4. Métodos espectrofotométricos para a determinação do teor de polifenóis e atividade antioxidante

3.4.1. Determinação do Teor de Polifenóis Totais (TPC)

A solução de reação consistiu em 25 μL de água ultrapura (branco) ou solução padrão (ácido gálico) ou amostra, 75 μL de água ultrapura e 25 μL de reagente FC (1:1). Depois de 6 minutos no escuro, adicionou-se 100 μL de carbonato de sódio (75 g/L) a cada poço. A microplaca foi colocada ao abrigo da luz durante 90 minutos, e ao fim deste tempo foi medida a absorvância a 760 nm num leitor de microplacas (Multi Mode Microplate Reader (leitor de placas LP), Biotek, SynergyTM HT W/TRF (Model Number SIAFRT; Serial Number: 267577)). A curva de calibração foi preparada usando o padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalentes ácido gálico/g de amostra seca (mg GAE/g dw). Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.4.2. Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFC)

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Moreira *et al.* [49]. O procedimento consiste em adicionar a cada poço da microplaca 100 µL de água ultrapura, 10 µL de solução de nitrato de sódio (50g/L), e 25 µL de água ultrapura (branco) ou solução padrão (catequina) ou amostra. Depois de 5 minutos no escuro, adicionou-se 15 µL de cloreto de alumínio (100g/L), e depois de mais 1 minuto no escuro adicionou-se 50 µL de hidróxido de sódio (1 mol/L). A microplaca foi colocada ao abrigo da luz durante 10 minutos, e introduziu-se a microplaca para ser lida a sua absorvância a 510 nm após submetida a uma agitação média durante 10 segundos. A catequina foi usada como solução padrão e os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina/g de amostra seca (mg CE/g dw). As análises foram realizadas em triplicado.

3.4.3. Determinação do Poder Redutor pelo método FRAP

O ensaio original foi desenvolvido por Benzi and Strain [50], tendo sido adaptado para este tipo de amostras tal como descrito em detalhe por Moreira *et al.* [49]. O reagente FRAP foi preparado usando uma mistura de padrão acetato (pH 3,6; 300 mmol/L), TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine; 40 mmol/L) em solução de HCl (40 mmol/L) e FeCl₃.6H₂O (20 mmol/L) numa proporção de 10:1:1, respetivamente.

Para a análise adicionou-se 180 µL de reagente FRAP aos poços da microplaca juntamente com 20 µL de água ultrapura (branco) ou solução padrão ou amostra. A absorvância foi lida a 593 nm no leitor de placas depois de um período de encubação a 37°C durante 10 minutos. A curva de calibração foi preparada com ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido ascórbico/g de amostra seca (mg AAE/g dw). Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.4.4. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH

O procedimento do DPPH foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Moreira *et al.* [49].

Na análise adicionou-se 200 µL de solução etanólica de DPPH (0,1 mmol/L) a 25 µL de padrão ou amostra. O branco contém 225 µL de etanol e como controlo usou-se 225 µL de reagente DPPH. A mistura incubou durante 30 minutos no escuro e foi submetida a uma agitação a velocidade lenta durante 30 segundos. A absorvância foi lida

a 517 nm. A curva de calibração foi obtida usando trolox. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de trolox/g de amostra seca (mg TE/g dw). As análises foram realizadas em triplicado.

3.4.5. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método ABTS

Através do método ABTS pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O radical ABTS⁺ obteve-se através da reação de uma solução de ATBS 7 mM (10 mL) com persulfato de potássio (2,45 mM) e a solução resultante foi incubada a temperatura ambiente e no escuro durante aproximadamente 16 h. Uma vez formado o radical ATBS⁺ filtrou-se a solução com filtro de nylon (0,22 µm) e diluiu-se em 100 mL de água ultrapura. Leu-se a sua absorvância a 734 nm até se obter um valor aproximado de 0,700. Conforme a necessidade de acerto foi-se adicionando água ou solução de ABTS.

Na análise adicionou-se 20 µL de água ultrapura em todos os poços da microplaca incluindo no branco, padrões e amostras. No caso do controlo adicionou-se 200 µL de ABTS e 180 µL aos restantes poços da microplaca. A solução incubou durante 6 minutos no escuro e foi submetida a uma agitação a velocidade média durante 30 segundos. A absorvância foi lida a 734 nm. A curva de calibração foi obtida usando ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido ascórbico/g de amostra seca (mg AAE/g dw). As análises foram realizadas em triplicado.

3.5. Determinação do perfil fenólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A identificação e quantificação dos polifenóis nos extratos das podas de mirtilos foi realizada por HPLC com deteção de díodos (HPLC-DAD).

Os eluentes usados foram filtrados através de um filtro de nylon de 0,22 µm sob vácuo e desgaseificados num banho de ultrasons durante 15 minutos. As soluções stock dos padrões foram preparadas em metanol a níveis de concentração de 2000 mg/L e armazenadas a -20°C. Os padrões de calibração foram dissolvidos numa mistura de metanol:água 50:50 (v/v) por diluição da quantidade adequada da solução de stock. As análises do HPLC foram realizadas num sistema *Shimadzu* HPLC equipado com uma coluna *Phenomenex* Gemini C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e uma pré-coluna com as mesmas características, que foi mantida a 25°C, utilizando o método descrito por Moreira

et al. [48]. A fase móvel é composta por (A) água e (B) metanol ambos com 0,1% de ácido fórmico e foram aplicados nas seguintes proporções e intervalos de tempo:

- 0 -13 min: 20-26% B
- 13-18 min: 26,5% B
- 18-25 min: 26,5-30% B
- 25-50 min: 30-45% B
- 50-60 min: 45-50% B
- 60-70 min: 50-55% B
- 70-90 min: 55-70% B
- 90-100 min: 70-100% B

seguido de 100% B durante 5 minutos e retorno a 20% B em 10 min e 5 min de acondicionamento antes da injeção seguinte.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de podas de mirtilos foi efetuada através da comparação do tempo de retenção e dos espectros UV-Vis dos picos detetados com os obtidos para os padrões puros. Os espectros UV foram registados num intervalo de 190-600 nm, e a quantificação foi feita a 280 nm, 320 nm e 360 nm dependendo do máximo de absorção de cada um dos padrões. Na Tabela A1 (em anexo) encontram-se listados os padrões de polifenóis, assim como os seus limites de deteção e quantificação usados para a validação do método cromatográfico. A quantidade de compostos fenólicos individuais encontrados em cada extrato, resultante de injeções em triplicado, foi expressa em mg/100g de amostra seca.

3.6. Extração de pesticidas, PCBs e retardantes de chama de podas de mirtilos

3.6.1. QuEChERS

A realização da extração por QuEChERS permitiu extrair um total de 39 contaminantes (27 Pesticidas, 7 Retardantes de chama e 5 PCBs) nas amostras e posteriormente, através de uma extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) foi realizada uma limpeza do extrato permitindo eliminar outros interferentes. O QuEChERS utilizado foi o denominado por *Original* e é composto por 4g de MgSO₄ e 1 g de NaCl e a limpeza foi realizada utilizando um d-SPE composto por 150mg MgSO₄, 50mg PSA, 50 mg C18 e 5 mg de carvão. As amostras de podas de mirtilos foram previamente trituradas

utilizando um moinho (Retsch ZM200). E peneiradas (Retsch AS200) de forma a separar os grãos moídos por diversos tamanhos.

O procedimento realizado para a extração por QuEChERS consistiu em pesar cerca de 2 g de amostra (podas de mirtilos triturada com o tamanho $<0,08\text{mm}$) seguida da adição de 10 mL de acetronitrilo; a mistura foi ao vortex durante 1 min e centrifugou-se (4500 rpm, 5 min), adicionou-se posteriormente ao QuEChERS Original. A mistura foi novamente ao vortex durante 1 min e centrifugada (4500 rpm, 5 min). Após a centrifugação adicionou-se o sobrenadante a um tubo de 2 mL contendo d-SPE. Este segundo passo (d-SPE) consiste na “limpeza” do extrato. A mistura incluída no tubo de 2 mL foi agitada 1 min no vortex e centrifugada (4500 rpm, 5 min).

Colocou-se 800 μL de sobrenadante num vial de vidro e levou-se a secar em fluxo de nitrogénio. Redissolveu-se no mesmo volume de n-hexano e foi injetado posteriormente no GC. As figuras 3.5 e 3.6 apresentam esquemas do procedimento adotado para a extração de contaminantes e limpeza do extratos das amostras de podas de mirtilos.

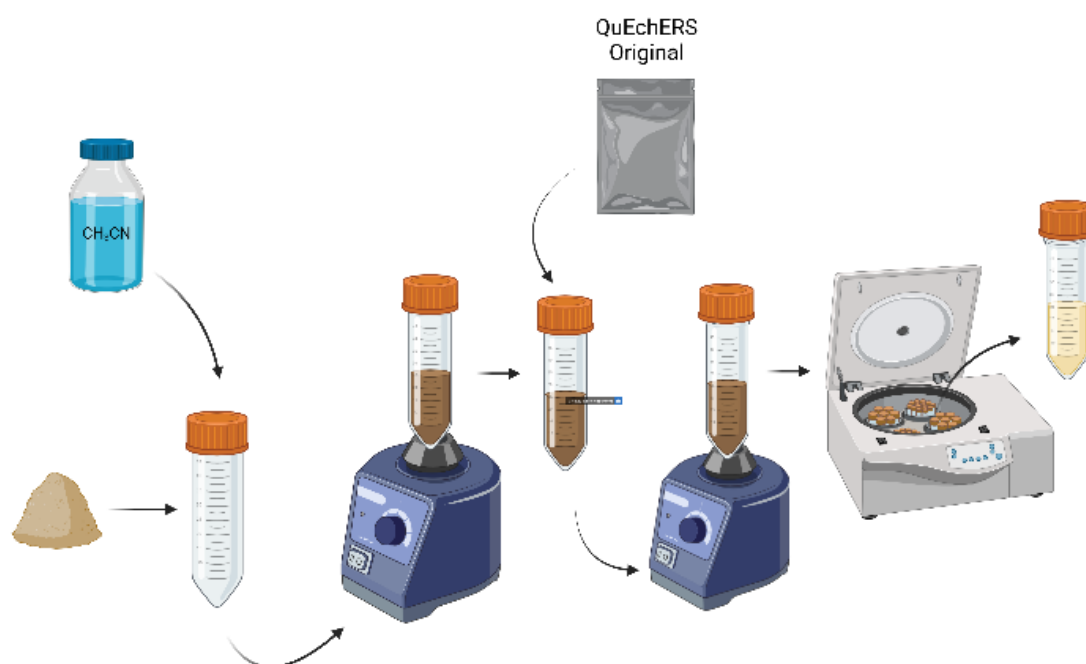


Figura 3.5 Esquema representativo do método QuEChERS (1ª etapa da extração))

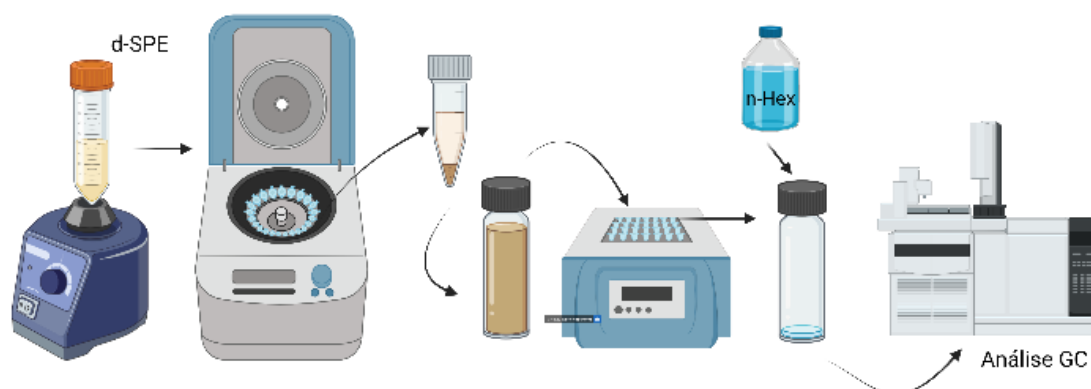


Figura 3.6. Esquema representativo do procedimento de limpeza (d-SPE) (2ª etapa da extração)

3.6.2. Análise Cromatográfica de pesticidas, POP e retardantes de chama

Como referido anteriormente os extratos obtidos após a extração por QuEChERS foram analisados por cromatografia gasosa.

3.6.2.1. Análise de pesticidas, POP e retardantes de chama por cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons (GC-ECD)

Os compostos orgânicos halogenados (14 OCP, 7 BDE, 5 PCB e 7 PIR) foram determinados com um cromatógrafo gasoso com um detetor de captura de elétrons (GC-ECD) (GC-2010, Shimadzu) equipado com uma coluna Zebron-5 MS de dimensões 30 m x 0.25µm x 0.25 m. Foram utilizados dois programas com diferentes parâmetros. Um programa (método 1) foi utilizado para a análise de pesticidas 14 OCP e 7 PIR e outro programa (método 2) para múltiplos contaminantes 10 OCP, 7 BDE, 5 PCB e 7 PIR.

No primeiro programa (método 1) a temperatura inicial do forno foi programada para começar a 40°C, depois 30°C/min até 250°C durante 11 min, e por fim um aumento de 10°C por minuto até 290°C durante 9 minutos. A injeção foi realizada a 250°C em modo *splitless* e a deteção foi realizada a 300°C. O hélio foi usado com gás de arrasto com um fluxo contante de 1,0 mL/min.

No segundo programa (método 2) a temperatura inicial do forno foi programada para começar a 40°C, depois 15°C/min até 120°C durante 1 min, seguida de um aumento de 10°C até 150°C que durou 1 min, depois um aumento de 5°C/min até 180°C durante 1

minuto, depois mais 5°C/min até 200°C durante um minuto e por fim um aumento de 5°C/min até 290°C durante 20 min.

A injeção foi realizada a 250°C em modo *splitless* e a detecção foi realizada a 300°C. O hélio foi usado com gás de arrasto com um fluxo constante de 1,0 mL/min.

3.6.2.2. *Análise de pesticidas organofosforados por Cromatografia Gasosa com detetor de chama fotométrica*

Os pesticidas organofosforados (OPP) foram analisados usando um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 acoplado com chama fotométrica com filtro de fósforo. A separação foi realizada através de uma coluna Zebron-XLB de dimensões 30 m x 0,25 µm x 0,25. O programa de forno foi otimizado para separar os OPP da seguinte forma (método 3): durante 1 minuto a 100°C, aumentando 20°C/min até 150°C e manteve-se por 1 minuto, depois aumentou 2°C/min até 180°C durante mais 2 minutos e finalmente mais 20°C/min até 270°C durante 1 minuto. A injeção foi realizada a 250°C em modo *splitless* e a detecção foi realizada a 290°C. O hélio foi usado com gás de arrasto com um fluxo constante de 92,2 kPa, 25,4 cm/s a uma velocidade linear e o fluxo da coluna a 1,0 L/min. Foi injetado 1 µL de volume de amostra.

3.6.2.3. *Validação do método analítico*

Preparou-se 7 padrões (15, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µg/L) usando o extrato *Duke 2020* pois, de acordo com os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos era a amostra mais promissora. Estes padrões foram necessários para a realização da curva de calibração e cálculo dos parâmetros de validação analítica tais como o LOQ, LOD e coeficientes de variação.

Quando um método é utilizado para determinar baixas concentrações de um analito numa amostra é necessário considerar dois limites analíticos: limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ).

O LOD é o teor mínimo do analito que pode ser detetado numa amostra, com determinado nível de confiança. Através de uma calibração linear é possível determinar o LOD utilizando a equação 3.6.2.1.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (3.6.2.1)$$

Onde:

$S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão dos valores

b corresponde ao valor da ordenada na origem da reta de calibração

O LOQ é a mínima quantidade a partir da qual é possível quantificar um analito, com determinada exatidão e precisão. Através de uma calibração linear é possível determinar o LOQ utilizando a equação 3.6.2.2.

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (3.6.2.2)$$

Sendo:

$S_{y/x}$ o desvio padrão dos valores

b o valor da ordenada na origem da reta de calibração

Outro parâmetro importante a determinar foi o coeficiente de variação (CV) ou variação de repetibilidade. A repetibilidade representa a precisão de um método efetuado em condições semelhantes, isto é, representa a precisão para diferentes ensaios efetuados para uma mesma amostra ou padrão, nas mesmas condições. Este CV é dado pela equação 3.6.2.3.

$$CV (\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.6.2.3)$$

Sendo:

S_r : desvio padrão relativo

$\bar{x}$ = média dos resultados obtidos

3.7. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de três réplicas. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism, version 6. Para avaliar as diferenças entre as amostras e entre as técnicas de extração usadas, a *one-way* ANOVA foi usada. O teste de *Tukey's multiple comparisons* foi usado para a comparação das médias, sendo que para $p < 0.05$ é considerado existir diferenças estatisticamente significativas.

Capítulo 4 Resultados e Discussão

4.1. Teor de polifenóis e flavonoides totais

Na Figura 4.1 encontram-se representados os valores do TPC obtidos para as variedades de podas de mirtilos *Duke* e *Bluecrop* nos anos de 2019 e 2020 para as duas técnicas de extração testadas. Através da análise dos resultados obtidos é possível verificar que o extrato da variedade *Duke* 2019 preparado através da MAE apresenta um teor de compostos fenólicos mais elevado ($67,9 \pm 1,7$ mg GAE/g dw). Por outro lado, de todos os extratos analisados, a variedade *Bluecrop* 2019 obtida pela CE apresenta o TPC mais baixo ($52,1 \pm 1,3$ mg GAE/g dw).

De acordo com a pesquisa bibliográfica não foram encontrados estudos científicos que reportassem a extração de compostos fenólicos das podas dos mirtilos. Deste modo, foi efetuada uma comparação dos teores obtidos com os reportados para as folhas de mirtilo. Os valores de TPC são similares aos reportados por Wu H *et al.* [49]. Neste estudo os autores analisaram as folhas dos mirtilos de cultivos do sudeste da china, reportando para a variedade *Bluecrop* um teor de $91,80 \pm 0,03$ mg GAE/g dw e para a variedade *Duke* de $78,71 \pm 0,04$ mg GAE/g dw. Apesar dos valores serem próximos, esta diferença poderá estar relacionada com as condições de extração usadas por estes autores [49], em que utilizaram a extração assistida por ultrassons durante 20 min e 10 mL de metanol contendo 0,5% de ácido fórmico como solvente de extração. Acresce o facto de não serem o mesmo tipo de amostras (folhas e hastes das podas), colhidas em locais diferentes (China e Portugal) com influência do clima e da natureza dos solos de cultivo e possivelmente em períodos diferentes de maturação, contribuem para as diferenças encontradas. Adicionalmente, efetuou-se uma comparação dos valores de TPC obtidos no presente estudo com os reportados na literatura para outro tipo de podas, nomeadamente das vinhas [49]. Moreira *et al.* [45] reportaram um teor de $32,49 \pm 2,70$ mg GAE/g dw aplicando a extração subcrítica com água durante 40 min a 150°C. Este valor é cerca de 2 vezes inferior ao obtido no presente estudo por MAE, indicando que as podas de mirtilos representam uma fonte natural de antioxidantes mais promissora.

Relativamente às diferenças obtidas entre as duas técnicas de extração testadas, verificou-se que a MAE é mais eficiente que a CE uma vez que permitiu extrair maior teor de compostos fenólicos. Estas diferenças poderão ser explicadas com a sua maior capacidade de destruir a ligação entre a parede celular e os polifenóis facilitando deste

modo a sua libertação [48]. Além disso, o uso de uma temperatura mais elevada por um curto período de tempo pode também justificar os valores obtidos para a MAE. Deste modo, a MAE parece ser a técnica de extração mais promissora para a recuperação de compostos fenólicos das podas dos mirtilos.

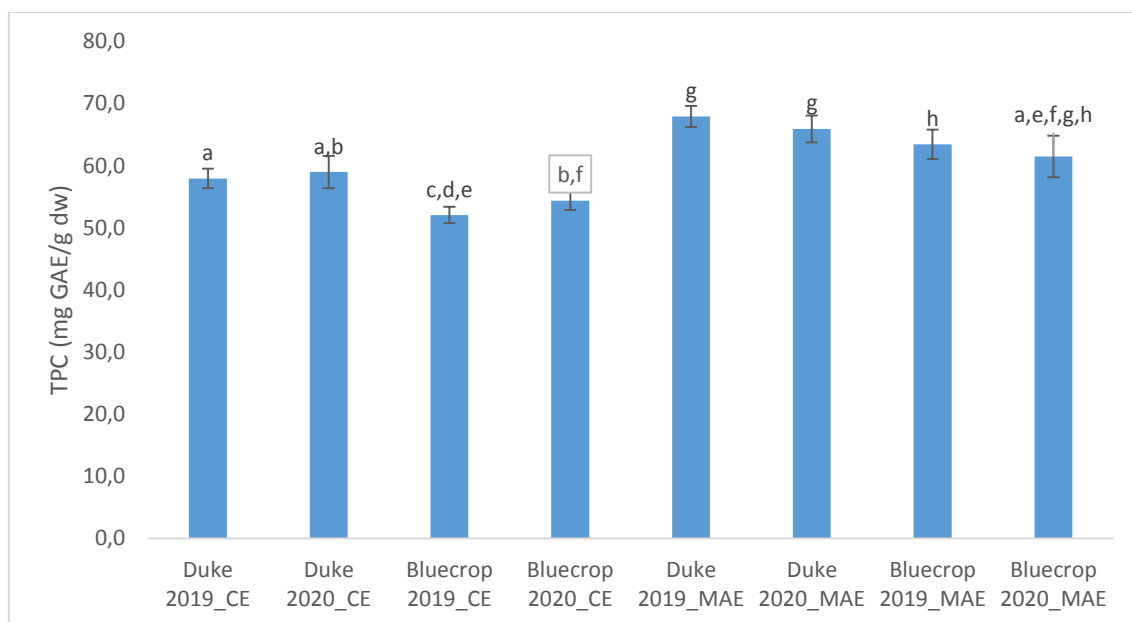


Figura 4.1. Teor de polifenóis totais (TPC) obtido para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg de equivalentes ácido gálico/g amostra seca (mg GAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Na Figura 4.2 encontram-se representados os valores do TFC obtidos para as variedades Duke e Bluecrop nos anos de 2019 e 2020 para ambas as extrações testadas.

Após a análise dos resultados obtidos foi possível verificar que a variedade Bluecrop 2019 possui um TFC superior ($56,0 \pm 2,4$ mg GAg dw) às restantes amostras analisadas. Por outro lado, o extrato da variedade Duke 2020 obtido através da CE possui o teor mais baixo de flavonoides ($38,9 \pm 1,6$ mg GAg dw). De facto, tal como se verificou anteriormente para o TPC, a MAE revelou-se mais eficiente na recuperação dos compostos da família dos flavonoides apresentando valores mais elevados comparativamente à CE. No entanto, apesar de vários autores reportarem uma boa correlação entre os valores obtidos para ambos os métodos espectrofotométricos [50], no caso do presente trabalho a correlação entre os valores foi baixa ($r^2=0.4146$). Esta diferença poderá estar relacionada com erros associados aos próprios métodos aplicados; por exemplo, TPC é uma metodologia não específica uma vez que o reagente de Folin-

Ciocalteau reage com todas as espécies redutoras presentes na solução, o que poderá em parte justificar as diferenças obtidas.

Comparando os valores obtidos com os da literatura, verificou-se que Wu H *et al.* [49] para a variedade *Bluecrop* obteve $96,60 \pm 0,64$ mg RE/g dw e para a variedade *Duke* obteve $56,28 \pm 0,18$ mg RE/g dw. Tal como se verificou anteriormente para o método do TPC, existe uma diferença entre os dados do presente estudo e os reportados por estes autores. Esta diferença pode estar relacionada com os aspetos anteriormente apontados e ainda pelo facto do método de extração utilizado por Wu H *et al.* [49], ser a extração assistida por ultrassons, e também com o uso de uma solução padrão de quantificação diferente (rutina), sendo que neste trabalho utilizou-se a catequina.

Tal como comparado no método TPC, também neste caso se comparou os dados com os reportados por Moreira *et al.* [45] para as podas de videiras. Neste estudo os autores obtiveram um TFC de $10,07 \pm 0,94$ mg CE/g dw aplicando o mesmo método de extração mencionado anteriormente (extração subcrítica com água, 40 min a 150°C). Este valor é inferior ao obtido para as podas de mirtilos possivelmente devido ao diferente método de extração usado indicando que, em termos de TFC, as podas de mirtilos apresentam uma quantidade superior sendo assim mais promissora a sua aplicação.

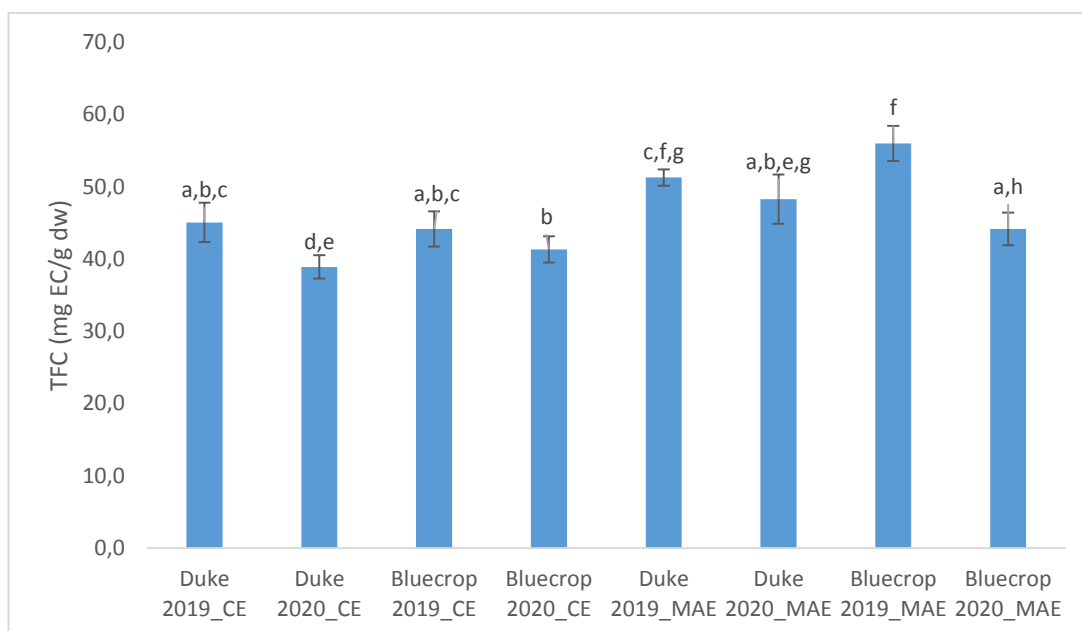


Figura 4.2. Teor de flavonoides totais obtidos para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg de equivalentes catequina /g amostra seca (mg EC/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2. Atividade antioxidante

Está bem descrito na literatura que deve ser utilizado mais do que um ensaio para avaliar a atividade antioxidante. Neste trabalho foram utilizados três métodos *in vitro* complementares. Neste caso, o método FRAP é baseado na capacidade da amostra em reduzir o ferro (é utilizado o mecanismo de transferência de elétron único), enquanto os métodos DPPH• e ABTS•⁺ envolvem a redução de um radical livre caracterizado por um mecanismo baseado na transferência de átomo de hidrogénio. A vantagem de combinar diferentes métodos para avaliar as propriedades antioxidantes está no fato de que nem todos os redutores de ferro são antioxidantes, e alguns antioxidantes não são capazes de reduzir o ferro.

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante dos diferentes extratos de podas de mirtilo determinada pelo método DPPH• encontram-se representados na Figura 4.3. Analisando os valores obtidos verificou-se que a variedade *Duke 2020* é a que apresenta maior atividade antioxidante para ambas as técnicas de extração testadas ($71,0 \pm 1,0$ e $92,2 \pm 5,0$ mg TE/g dw para a CE e MAE, respetivamente). Por outro lado, a amostra *Bluecrop 2019* preparada pela CE foi a que revelou menor capacidade de reduzir o DPPH• a hidroxina ($60,1 \pm 0,5$ mg TE/g dw).

Comparando os resultados obtidos com os descritos na literatura por Wu H *et al.* [49] verifica-se que no presente estudo se obteve valores mais baixos. Para a redução do radical DPPH, Wu H *et al.* [49] reportou para a variedade *Bluecrop* $14,0 \pm 2,6$ mg TE/g dw e para a variedade *Duke* obteve $11,0 \pm 0,4$ mg TE/g dw. Tal como já foi anteriormente referido, esta diferença poderá estar relacionada com as diferenças nos métodos de extração aplicados, assim como nas próprias condições de extração e também com a origem das variedades que foram estudadas.

Em acordo com os resultados obtidos anteriormente para os métodos TPC e TFC, também os extratos com maior atividade antioxidante foram os preparados recorrendo à MAE. Estes dados permitiram confirmar mais uma vez que esta técnica é mais eficiente para remover um maior teor de compostos com atividade antioxidante das podas dos mirtilos comparativamente à CE.

Relativamente à correlação obtida entre os métodos do TPC e TFC com o método DPPH•, os valores de coeficiente de correlação foram de 0.9426 e 0.4567, respetivamente. Estes dados indicam-nos que a maioria dos compostos que poderão estar a contribuir para a atividade antioxidante dos extratos não deverão pertencer à família dos flavonoides. No

entanto, uma posterior análise do perfil fenólico por HPLC dos extratos das podas de mirtilos permitirá avaliar com maior rigor estes resultados.

Os resultados obtidos pelo método DPPH também foram comparados com os resultados reportados por Moreira *et al.* [45] para as podas de videiras. Neste estudo, os autores obtiveram um valor de $17,89 \pm 0,93$ mg TE/g dw aplicando o mesmo método de extração mencionado anteriormente (extração subcrítica com água, 40 min a 150°C). Este valor é inferior ao obtido para as podas de mirtilos indicando que estas serão mais promissoras no que respeita à atividade antioxidante comparativamente às podas das videiras.

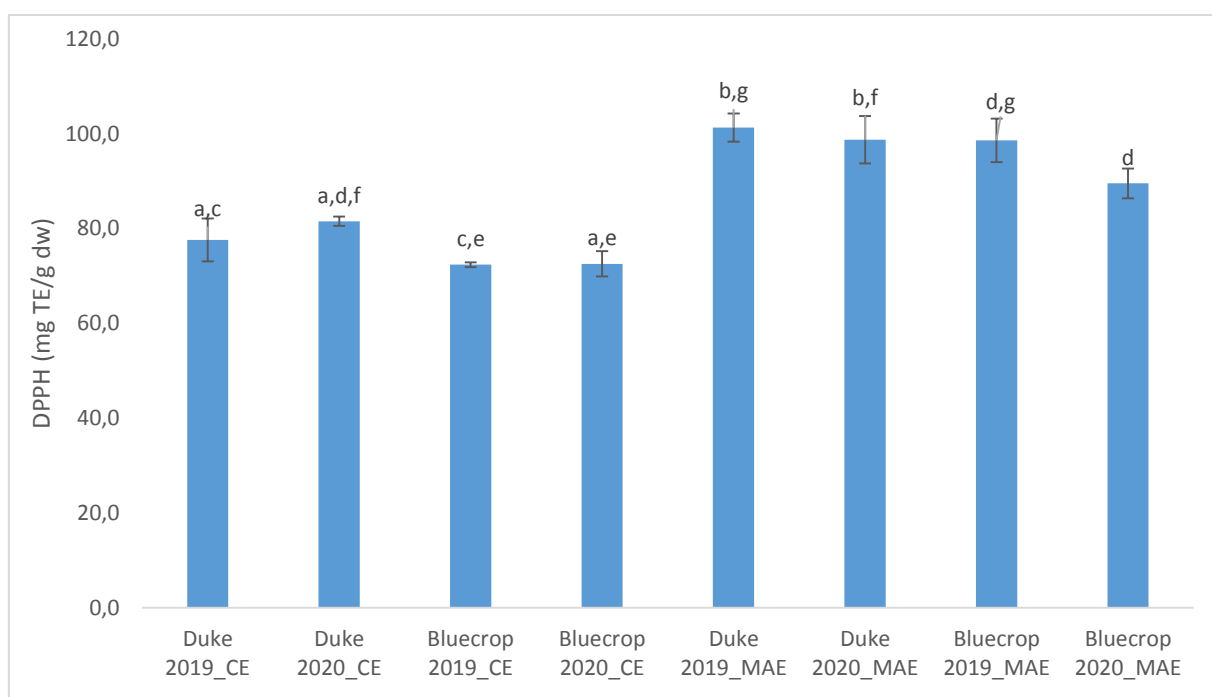


Figura 4.3. Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH* para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg Trolox equivalentes/g amostra seca (mg TE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para o método ABTS^{•+} encontram-se representados na Figura 4.4. Os valores obtidos variam entre $72,4 \pm 5,2$ e 101 ± 6 mg AAE/g dw correspondendo às amostras de *Bluecrop* 2019 para CE e *Duke* 2019 para a MAE, respetivamente.

Uma comparação direta dos valores obtidos com os reportados por Wu H *et al.* [49] para as folhas de mirtilos não é possível de efetuar, uma vez que estes autores utilizaram o padrão de trolox para exprimir os resultados. No entanto, estes autores [49] reportaram

uma tendência contrária à do presente estudo, em que a variedade *Bluecrop* apresenta uma capacidade para captar radicais ABTS ligeiramente superior à variedade *Duke* (314 ± 37 e 304 ± 22 $\mu\text{mol TE/g DW}$, respetivamente).

Os dados obtidos permitiram verificar mais uma vez que os extratos de podas de mirtilos obtidos por MAE foram mais eficientes a reduzir o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ comparativamente aos extratos obtidos pela CE. Além disso, verificou-se o mesmo tipo de correlação que a reportada anteriormente para o método DPPH $^{\bullet}$ entre os dados do TPC vs $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($r^2=0.9362$) e TFC vs $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($r^2=0.5832$) demonstrando, novamente, que a maioria dos compostos que poderão estar a contribuir para a atividade antioxidante dos extratos das podas de mirtilo não deverão pertencer à família dos flavonoides.



Figura 4.4. Atividade antioxidante determinada pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para as variedades *Duke* e *Bluecrop* para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg ácido ascórbico equivalentes/g amostra seca (mg AAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para o método FRAP encontram-se representados na Figura 4.5. De acordo com os dados obtidos verifica-se que o extrato com maior capacidade para

reduzir o ferro é a variedade *Bluecrop 2019* obtido por MAE ($49,3 \pm 3,5$ mg AAE/g dw). Por outro lado, o extrato da variedade *Duke 2020* obtida por CE é o que apresenta menor atividade antioxidante determinada pelo método FRAP ($36,4 \pm 2,3$ mg AAE/g dw).

Wu H *et al.* [49] também determinaram a capacidade dos extratos de folhas de mirtilos em reduzir o ferro. No entanto, não é possível efetuar uma comparação direta dos valores obtidos com os do presente estudo uma vez que foram utilizados padrões de quantificação diferentes. Wu H *et al.* [49] reportou a mesma tendência que a obtida para as podas de mirtilos com a variedade *Bluecrop* a exibir uma maior capacidade para reduzir o ferro do que a variedade *Duke* (938 ± 85 e 548 ± 37 $\mu\text{mol FEAC/g dw}$).

Tal como verificado para as metodologias anteriores aplicadas, os extratos obtidos por MAE são os que apresentam valores de atividade antioxidante superiores, tendo-se demonstrado mais uma vez a sua eficiência na recuperação de compostos fenólicos comparativamente com a CE.

Os resultados obtidos pelo método FRAP também foram comparados com os resultados reportados por Moreira *et al.* [45] para as podas de videiras. Neste estudo, os autores obtiveram um valor de $40,65 \pm 2,18$ mg AAE/g dw aplicando o mesmo método de extração mencionado anteriormente (extração subcrítica com água, 40 min a 150°C). Este valor é inferior ao obtido para a variedade *Bluecrop 2019* pelo método MAE mas superior à variedade *Duke 2020* através do método de CE. Esta diferença pode ser explicada pelo método de extração também diferente indicando que este método obtém melhores resultados que o método de CE.

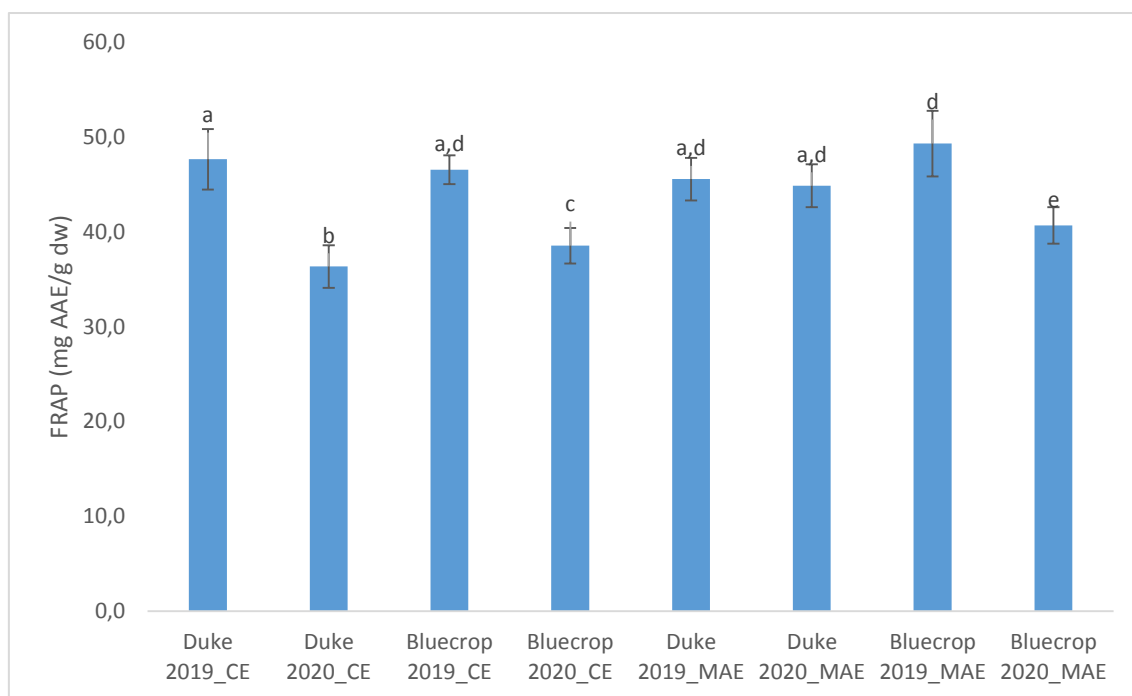


Figura 4.5. Poder redutor pelo método FRAP para as variedades Duke e Bluecrop para as extrações convencional (CE) e microondas (MAE); resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão e estão expressos em mg ácido ascórbico equivalentes/g amostra seca (mg AAE/g dw). Barras com letras diferentes significa que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Apesar de vários autores demonstrarem diferenças entre os anos de colheitas [51], no presente trabalho nenhuma das variedades e nenhum dos anos de colheita das podas destacou-se exibindo maiores teores de polifenóis e flavonoides, assim como de atividade antioxidante. As diferenças significativas foram obtidas para os extratos preparados pelas diferentes técnicas de extração, CE ou MAE. Assim, de modo a permitir determinar quais os compostos responsáveis pelas propriedades determinadas, caracterizou-se o perfil fenólico dos extratos das podas de mirtilos. Para isso selecionou-se uma das variedades, *Duke 2019*, e identificou-se e quantificou-se por HPLC os compostos fenólicos que contribuíram para as propriedades exibidas quer pelos extratos preparados recorrendo à CE e à MAE.

4.3. Composição fenólica determinada por HPLC-DAD

De forma a ser possível identificar quais os compostos nas amostras de poda de mirtilo que poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante anteriormente

demonstrada, foi realizada uma análise por HPLC e obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 4.6 para a variedade *Duke 2019*.

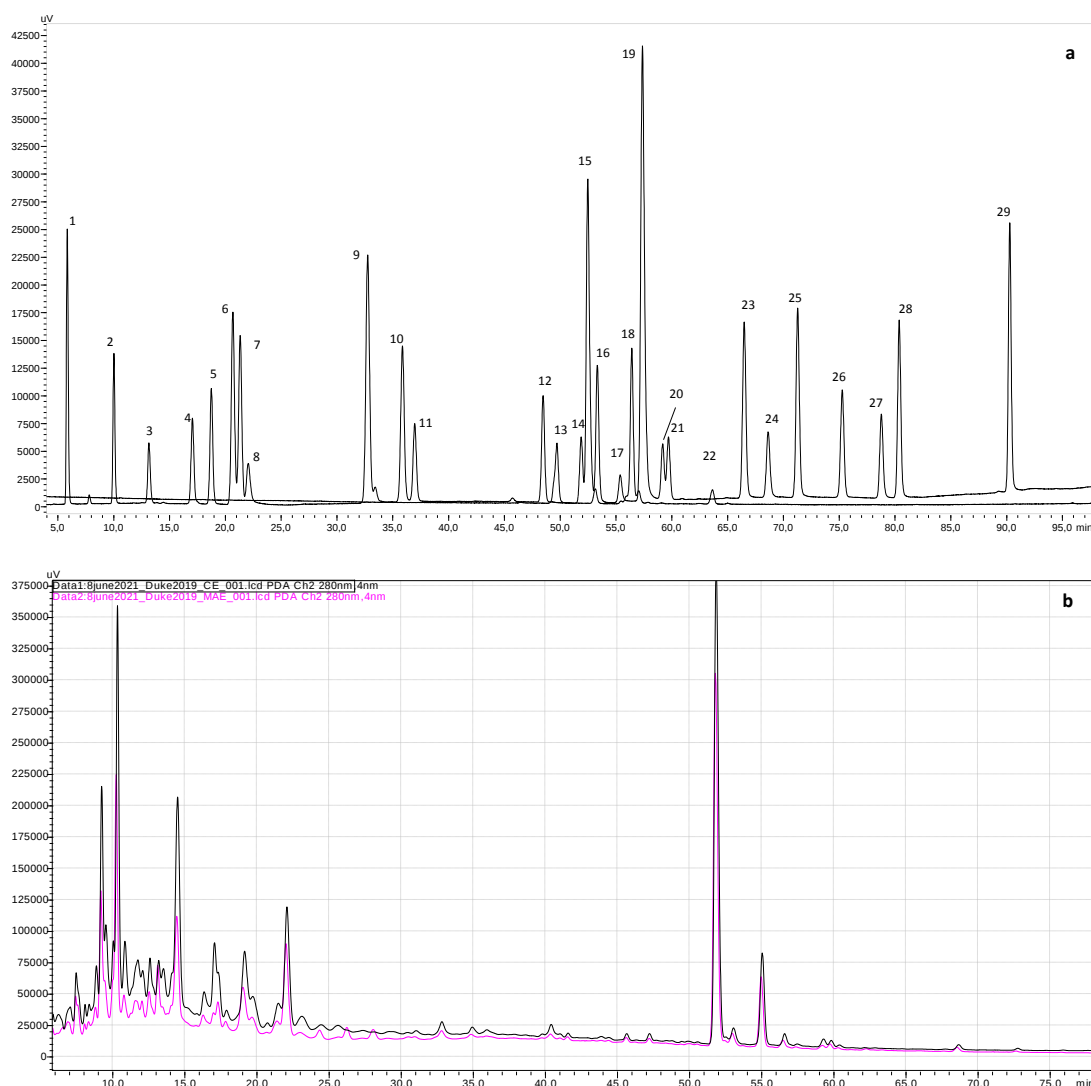


Figura 4.6 Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD a 280 nm para a) mistura de padrões de polifenóis de concentração 5 mg/L e b) extratos da variedade *Duke 2019* obtidos por extração convencional (linha preta) e por extração assistida por microondas (linha rosa); identificação dos picos: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) (+)-catequina, (4) ácido clorogênico, (5) ácido vanílico, (6) ácido cafeico, (7) ácido sirínico, (8) (-)-epicatequina, (9) ácido *p*-cumárico, (10) ácido *trans*-ferúlico, (11) ácido sinápico, (12) naringina, (13) ácido 3,5-di-cafeiolquínico, (14) quercetina-3-*O*-galactósido, (15) rutina, (16) florezina, (17) ácido elágico, (18) ácido 3,4-di-*O*-cafeiolquínico; (19) miricetina, (20) ácido cinâmico, (21) kaempferol-3-*O*-glucósido, (22) kaempferol-3-*O*-rutinósido, (23) naringenina, (24) quercetina, (25) floretina, (26) tilirosideo, (27) kaempferol, (28) apigenina e (29) crisina.

Os principais compostos fenólicos individuais identificados e quantificados por HPLC nos extratos das podas de mirtilo da variedade *Duke 2019* obtidos por CE e MAE encontram-se reportados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos das podas de mirtilos obtidos pela CE e MAE da variedade Duke 2019; os resultados encontram-se expressos como média $\pm$ desvio padrão (mg composto/100 g amostra seca).

Composto	mg composto/100 g amostra seca	
	Duke 2019 CE	Duke 2019 MAE
<u>Ácidos fenólicos</u>		
Ácido gálico	32,3 $\pm$ 1,6	153 $\pm$ 8
Ácido protocatéquico	67,2 $\pm$ 3,4	258 $\pm$ 13
Ácido clorogénico	5,84 $\pm$ 0,29	8,36 $\pm$ 0,42
Ácido vanílico	188 $\pm$ 9	582 $\pm$ 29
Ácido cafeico	1,48 $\pm$ 0,07	6,61 $\pm$ 0,33
Ácido sirínico	ND ^a	245 $\pm$ 12
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,66 $\pm$ 0,13	11,1 $\pm$ 0,6
Ácido ferúlico	0,48 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,03
Ácido sinápico	0,53 $\pm$ 0,03	3,44 $\pm$ 0,17
Ácido 3,5-di-cafeoilquínico	11,4 $\pm$ 0,6	5,25 $\pm$ 0,26
Ácido elágico	163 $\pm$ 8	518 $\pm$ 26
Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	25,8 $\pm$ 1,3	84,4 $\pm$ 4,2
Ácido cinâmico	0,34 $\pm$ 0,02	ND
Total Ácidos Fenólicos	499	1876
<u>Flavonoides</u>		
Catequina	468 $\pm$ 23	442 $\pm$ 22
Epicatequina	447 $\pm$ 22	900 $\pm$ 45
Naringina	18,1 $\pm$ 0,9	2,17 $\pm$ 0,11
Quercetin-3-O-galactósido	146 $\pm$ 13	524 $\pm$ 26
Rutina	21,1 $\pm$ 1,1	83,0 $\pm$ 4,2
Miricetina	3,9 $\pm$ 0,2	15,1 $\pm$ 0,8
Kaempferol-3-O-glucósido	40,5 $\pm$ 2,0	97,3 $\pm$ 4,9

Kaempferol-3-O-rutinósido	27,7 ± 1,4	110 ± 5
Naringenina	0,20 ± 0,01	2,74 ± 0,14
Quercetina	13,8 ± 0,7	59,3 ± 3,0
Tiliroside	0,88 ± 0,04	3,01 ± 0,15
Kaempferol	0,28 ± 0,01	2,03 ± 0,10
Total Flavonoides	1187	2241
<u>Outros compostos</u>		
Floredzina	0,11 ± 0,01	2,07 ± 0,10
Floretina	0,08 ± 0,00	5,33 ± 0,27
Apigenina	0,48 ± 0,02	1,44 ± 0,07
Crisina	1,19 ± 0,06	3,44 ± 0,17
Total outros	1,86	12,5
Total Compostos Fenólicos	1688	4129

Como se pode verificar pela análise da Tabela 4.1 foram identificados e quantificados diversos compostos fenólicos pertencentes a diferentes famílias. De acordo com os dados obtidos verificou-se que a família dos flavonoides é a que apresenta maior contribuição para o total de compostos identificados e quantificados em comparação com a família dos ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos, em particular os ácidos vanílico e elágico foram os compostos identificados em maior quantidade nas variedades *Duke 2019*. Para ambos os ácidos, a MAE permitiu recuperar maior quantidade destes compostos que a EC. Relativamente aos compostos pertencente à subclasse dos flavonoides, a catequina e a epicatequina foram os principais responsáveis pelo teor total de flavonoides. No entanto, é de salientar o teor elevado obtido de epicatequina para a MAE comparativamente ao obtido por CE (447 ± 22 vs 900 ± 45 mg/100 g dw, respetivamente). Relativamente aos compostos presentes em menor quantidade, dentro

da família dos ácidos fenólicos, destacou-se o ácido cinâmico que para a CE obteve um valor de $0,34 \pm 0,02$ mg/100 g dw e que no caso da MAE nem foi detetado.

No estudo realizado por Wu H *et al.* [50] foram identificados 23 compostos fenólicos incluindo 9 ácidos fenólicos e 13 flavonoides. Estes autores reportaram que os compostos identificados em maior quantidade das amostras de mirtilos analisadas foram o ácido cafeoilquínico, a quercetina e compostos de kaempferol glicosilados. Além de estarmos a comparar tipos de amostras diferentes, as técnicas de extração para a recuperação dos compostos polifenólicos também foram diferentes o que poderá justificar as diferenças encontradas no perfil fenólico.

Os dados obtidos para as podas de mirtilo também foram comparados com os reportados por Moreira *et al.* [49] para as podas de videiras. Neste trabalho, os autores observaram que a classe dos ácidos fenólicos foi o que apresentou maior contributo para o total de compostos identificados sendo que o ácido gálico foi o que apresentou maior concentração com valores entre os 527 ± 26 e 1014 ± 51 mg/100 g dw. Por outro lado, os ácidos 4-hidroxibenzóico, *p*-cumárico e cinâmico foram os que apresentaram concentrações mais baixas. Mais uma vez esta diferença de valores poderá estar relacionada não só com as diferenças entre as amostras, mas também com o método de extração aplicado (os autores usaram a extração subcrítica com água).

4.4. Identificação e quantificação de pesticidas, PCBs e Retardantes de Chama nas podas dos mirtilos

4.4.1. Identificação dos contaminantes após a análise de GC

Numa primeira abordagem foram testadas diferentes misturas de contaminantes por GC-ECD e GC-FPD. A injeção dos padrões e das amostras e todo o procedimento foram realizados de acordo com o procedimento apresentado anteriormente (secção 3.6.2.1), de modo a manter a uniformidade entre todas as análises. Após injeção de um padrão de concentração 25 µg/L obtiveram-se dois cromatogramas, um cromatograma obtido utilizando o método 1 do GC-ECD onde estão representados OCP e PIR e outro cromatograma utilizando o método 2 onde se apresentam pesticidas OCP e PIR, retardantes de chama e PCB. Apesar de os métodos apresentarem alguns compostos em comum, os dois métodos foram estudados com o objetivo de ser avaliado o maior número possível de compostos em simultâneo e as análises feitas em duplicados em alguns compostos. Os cromatogramas obtidos encontram-se nas figuras 4.7 e 4.8. Na figura 4.7 é possível observar o cromatograma onde estão representados os picos correspondentes à injeção de um padrão misto de 25 µg/L de 11 OCP, 7 PIR, 7 retardantes de chama e 5 PCB. Na figura 4.8 apresenta-se o cromatograma relativo à injeção de um padrão 25 µg/L de 14 OCP e 9 Piretróides.

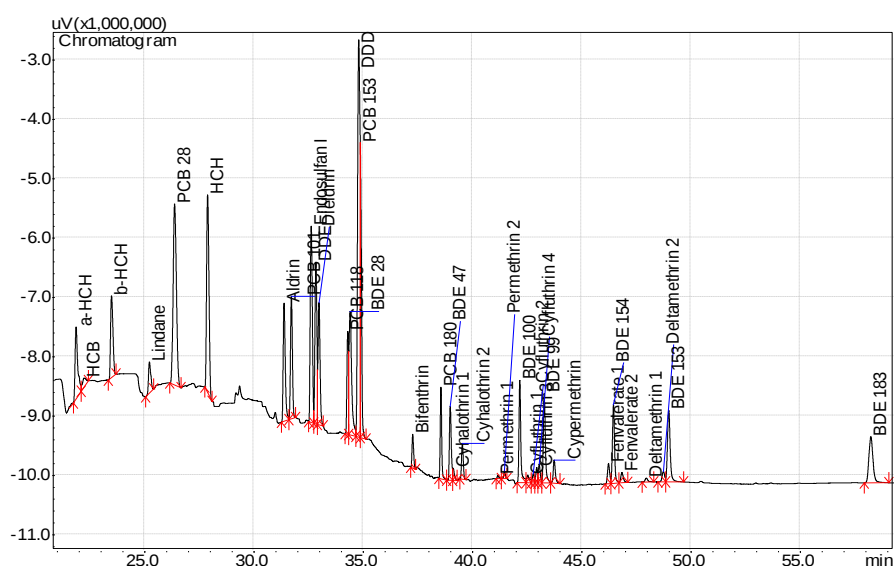


Figura 4.7 Cromatograma de um padrão de concentração 25 µg/L composto por Pesticidas (piretroides e OCP), Retardantes de Chama e PCBs.

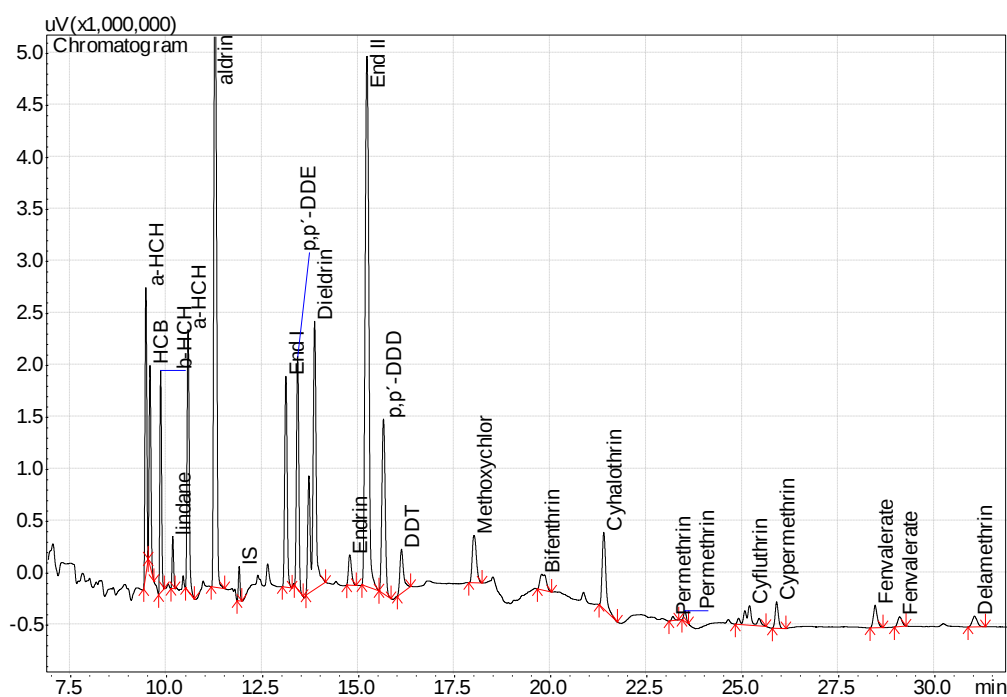


Figura 4.8 Cromatograma de um padrão de concentração 25 µg/L de Pesticidas (OCP e PIR)

Após injeção foram identificados 36 picos que correspondem aos compostos apresentados na tabela 4.2 onde também se apresenta os tempos de retenção dos compostos.

Tabela 4.2. Identificação de OCP, Piretróides, PCB e Retardantes de Chama com os respectivos tempos de retenção

Família	Compostos	Tempos de retenção (min)
OCP	α-HCH	9,459
	HCB	9,565
	β-HCH	9,845
	Lindano	10,160
	ζ-HCH	10,558
	Aldrina	11,260
	IS	11,888
	Endosulfão I	13,105

	p,p'-DDE	13,411
	Dieldrina	13,853
	Endrina	14,766
	Endosulfão II	15,215
	p,p'-DDD	15,645
	DDT	16,115
	Metoxicloro	18,003
Piretróides	Bifentrina	19,768
	Cialotrina	21,380
	Permetrina I	23,179
	Permetrina II	23,492
	Ciflutrina	25,175
	Cipermetrina	25,880
	Fenvalerato I	28,444
	Fenvalerato II	29,081
	Deltametrina	31,031
PCB's	PCB 28	26,358
	PCB 101	31,704
	PCB 118	34,287
	PCB 153	34,856
	PCB 180	38,548
Retardantes de Chama	BDE 28	34,392
	BDE 47	38,974
	BDE 100	42,158
	BDE 99	43,274
	BDE 154	46,444
	BDE 153	48,976
	BDE 183	58,223

Um padrão de 50 µg/L composto por 6 OPP foi injetado no GC-FPD nas condições anteriormente mencionadas (secção 3.6.2.2) e foram identificados 6 picos como indicado na figura 4.9 bem como os tempos de retenção apresentados na tabela 4.3.

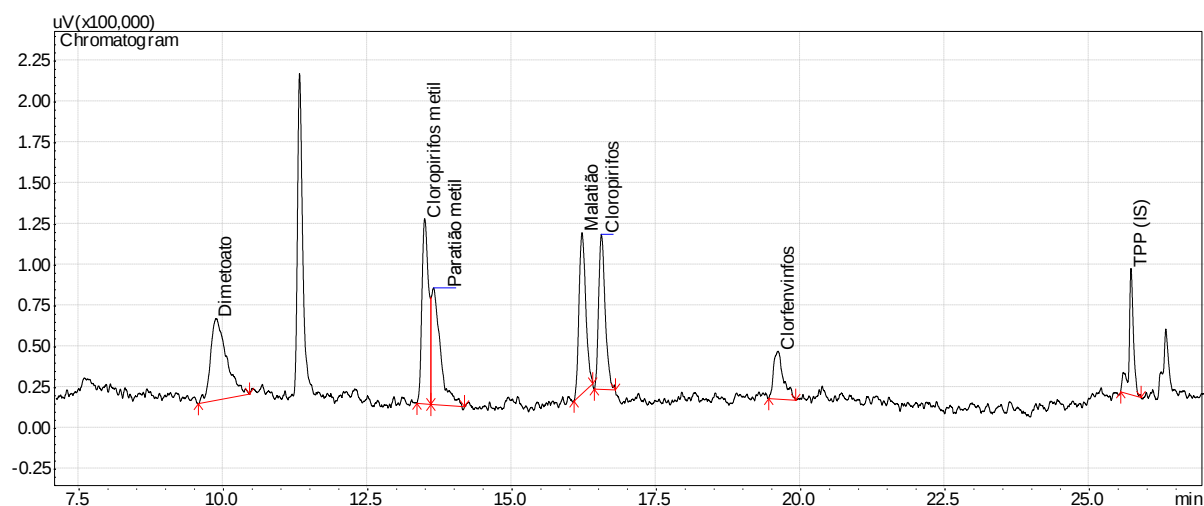


Figura 4.9 Cromatograma referente a um padrão composto por 6 pesticidas OPP.

Tabela 4.3 Tempos de retenção dos pesticidas identificados

Pesticidas	Tempo de retenção (min)
<i>Dimetoato</i>	10,1
<i>Clorpirifos-metil</i>	13,8
<i>Paratião-metil</i>	14,0
<i>Malatião</i>	16,7
<i>Clorpirifos</i>	17,0
<i>Clorfenvinfos</i>	20,1

4.4.2. Avaliação da presença de contaminantes em podas de mirtilos

Os extratos obtidos após a extração por QuEChERS foram todos analisados por GC-ECD e GC-FPD pelos dois métodos cromatográficos. Os cromatogramas obtidos foram avaliados qualitativamente por comparação com os cromatogramas dos padrões representados na seção 4.4.1. A título de exemplo comparou-se o cromatograma da amostra *Bluecrop 2020* obtido por GC-ECD com o cromatograma de múltiplos contaminantes (OCP, PIR, PCB e retardantes de chama) com o padrão de 25 µg/L, que se encontra representado na figura 4.10. Nesta figura é possível verificar que nenhum dos

picos da amostra corresponde aos picos dos compostos, concluindo assim que não existe correspondência. Foi possível verificar que em nenhuma das amostras foram identificados pesticidas OCP e PIR, PCB ou retardantes de chama. Apesar de não serem detetados os OCP, PIR, PCB e retardantes de chama nas amostras de podas de mirtilo, Fernandes *et al* [52] reporta a presença de alguns desses compostos em podas de videiras. Fernandes *et al* [52] identificou cinco compostos diferentes ($>LOD$) em diferentes amostras de podas de videiras, nomeadamente aldrina, p,p'-DDE, α -HCH, PCB101 e PCB28; no entanto, apenas α -HCH ($5,85 \pm 0,32$ - $5,99 \pm 0,25$ $\mu\text{g/kg}$) e aldrina ($2,44 \pm 0,15$ $\mu\text{g/kg}$) foram quantificados acima do LOQ. No presente trabalho, em algumas das amostras estudadas também foram observados alguns picos correspondentes a alguns dos compostos reportados no estudo de Fernandes *et al.* [52], nomeadamente BDE47, BDE99, BDE154, PCB180, β -HCH e lindano, mas os seus níveis estavam abaixo do LOD.

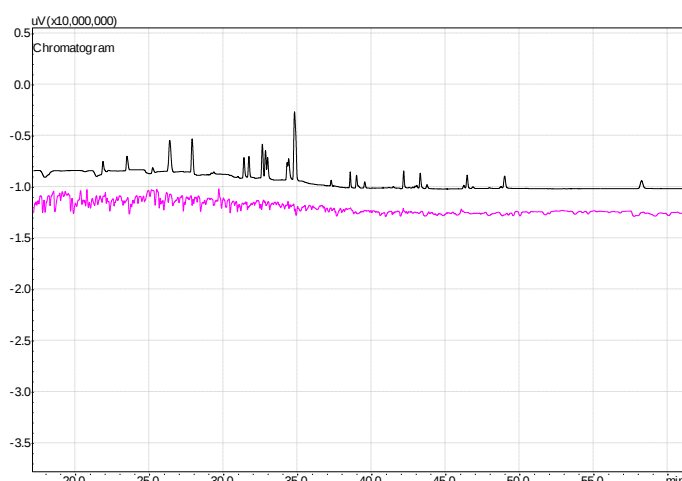


Figura 4.10 Comparação entre cromatogramas do padrão de 25 $\mu\text{g/L}$ composto por Retardantes de Chama, PCB, OCP e Piretróides, (linha preta) e o extrato da amostra Bluecrop 2020 (linha roxa)

A mesma abordagem foi seguida comparando os cromatogramas obtidos por GC-FPD do extrato de podas de mirtilo e o padrão composto por 6 OPP. Na figura 4.11 é possível observar o cromatograma comparativo entre a amostra *Bluecrop 2019* e os pesticidas no padrão de 25 $\mu\text{g/L}$.

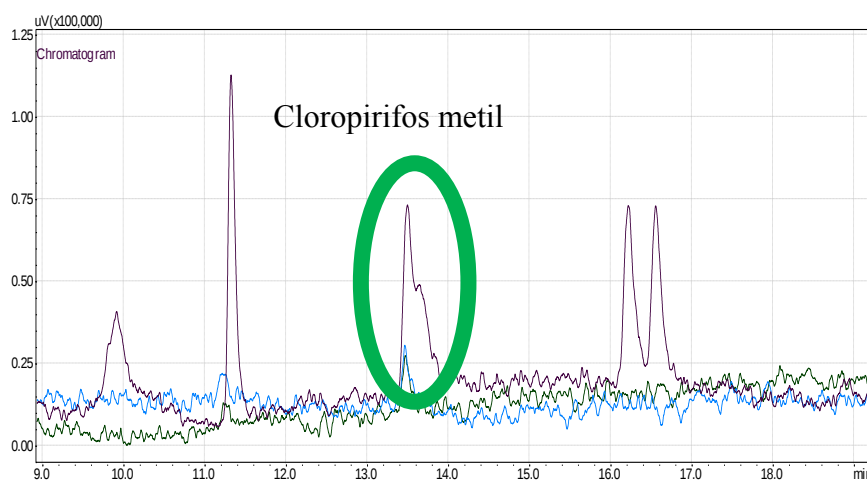


Figura 4.11 Cromatograma comparativo entre pesticidas (linha preta) e a amostra Bluecrop 2019 (linha azul) com o padrão de 25 µg/L

Através da figura 4.11 é possível identificar um pico na amostra (realçado a verde) correspondente ao cloropirifos-metil sendo este o único composto identificado na amostra *Bluecrop 2019*. Nas restantes amostras (*Duke 2019* e *2020* e a *Bluecrop 2020*) não foram detetados pesticidas. Apesar de não existir na literatura trabalhos de avaliação de pesticidas organofosforados em podas de mirtilos, Fernandes *et al.* [52] detetou cloropirifos em 3 amostras de outros frutos vermelhos, nomeadamente os morangos.

4.4.3. Validação do método analítico

Após avaliação qualitativa da presença de OPP por GC-FPD identificou-se um pesticida (cloropirifos-metil) no tempo de retenção (13.843 min) na amostra *Bluecrop 2019* como referido anteriormente e por esse motivo foi necessário quantificar o composto identificado. Para a quantificação foram estudados vários parâmetros analíticos como a linearidade, limites de deteção e quantificação da metodologia analítica aplicada.

Para a avaliação da linearidade do método prepararam-se 7 padrões preparados com a matriz (2g de podas de mirtilos *Duke 2020*) e IS (TPP – Fosforo trifenil 2500µg/L) 1.13 µg/kg, 1.88 µg/kg, 3.75 µg/kg, 5.63 µg/kg, 7.50 µg/kg, 9.38 µg/kg, 11.25 µg/kg) usando o extrato *Duke 2020* de uma amostra isenta de pesticidas. Estes padrões foram usados para a elaboração da curva de calibração na matriz. A tabela 4.5 apresenta todos os parâmetros analíticos estudados.

Tabela 4.4 Parâmetros da curva de calibração na matriz.

	Dimetoato	Cloropirifos- metil	Paratião- metil	Malatião	Cloropirifos	Clorfenvinfos
Declive	306568	257912	214412	216960	243195	94839
Intercepção	-379198	-154875	-245327	145943	-127223	-13076
correlação	0,9990	0,9990	0,9990	0,9800	0,9996	0,9990
S_{y/x}	54749	43374	47985	203962	32901	18732
LOD 8µg/kg	0,54	0,50	0,67	2,82	0,41	0,59
LOQ(µg/kg)	1,79	1,68	2,24	9,40	1,35	1,98

Analisando os valores obtidos e apresentados na tabela 4.5 podemos concluir que o método foi bastante preciso sendo que os valores de correlação se encontram coerentes ou seja estão muito próximos entre si e próximos de 1.

4.4.4. Quantificação dos pesticidas em amostras de podas de mirtilos

A partir dos dados da reta de calibração e a respetiva área do pico identificado na amostra *Bluecrop 2019* foi calculada a concentração de cloropirifos-metil na amostra. Na tabela 4.6 é possível observar a concentração em µg/kg de cloropirifos-metil na amostra e os respetivos LOQ e LOD obtidos.

Tabela 4.5. Concentração de pesticidas presentes na amostra

Composto	Concentração (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Dimetoato	ND	0,54	1,79
Cloropilifos Metil (no tempo de retenção 13,411)	4,27	0,5	1,68
Paratião metil	ND	0,67	2,24
Malatião	ND	2,82	9,40
Clorofenvinfos	ND	0,59	1,98

ND – não detetado

Como é possível verificar na tabela a concentração obtida para os cloropirifos-metil foi de 4,27 µg/kg estando este valor acima do LOQ o que permitiu a sua quantificação pelo método validado.

Segundo a Diretiva 2005/72/CE da Comissão da União Europeia o limite máximo de cloropirifos-metil nos mirtilos o limite é 0,01 mg/kg. Apesar de não existir legislação para as amostras de podas de mirtilos em estudo, consultando a diretiva 2005/72/CE para o respetivo fruto o valor obtido para o cloropirifos-metil na nossa amostra foi de 0,0043 mg/kg, podemos assim concluir que este composto se encontra abaixo do valor máximo estabelecido para o fruto.

Capítulo 5 Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

Os mirtilos são um fruto cuja produção tem crescido mundialmente nos últimos anos. Uma das consequências desta produção é a quantidade de podas geradas após a época da colheita. Por isso, o grande desafio é encontrar soluções alternativas para a aplicação das podas dos mirtilos, considerando não só o valor económico, mas principalmente ambiental. Deste modo, o principal objetivo do presente trabalho era verificar a possibilidade de utilizar as podas de mirtilos para recuperar compostos bioativos, nomeadamente polifenóis. Adicionalmente, pretendeu-se determinar a segurança química dos extratos de podas de mirtilos, explorando o seu potencial para aplicações na indústria, tais como a cosmética e alimentar.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que ambas as técnicas de extração (CE e MAE) são técnicas adequadas para a recuperação de compostos bioativos com propriedades antioxidantes das podas dos mirtilos. No entanto, das técnicas testadas destacou-se a MAE como sendo a mais eficiente uma vez que permitiu obter teores de polifenóis e flavonoides totais, assim como atividade antioxidante superior comparativamente aos extratos obtidos por CE. Dos extratos analisados, a variedade em que se obteve um TPC superior foi a *Duke 2019* ($67,9 \pm 1,7$ mg GAE/g dw), sendo que para o TFC a variedade *Bluecrop 2019* foi a que destacou ($56,0 \pm 2,4$ mg CE/g dw). Relativamente à atividade antioxidante dos extratos produzidos obtiveram-se resultados diferentes em cada uma das metodologias aplicadas, sendo que para o método FRAP destacou-se a amostra *Bluecrop 2019* ($49,3 \pm 3,5$ mg AAE/g dw), no método DPPH* a amostra *Duke 2020* ($92,2 \pm 5,0$ mg TE/g dw) e no método ABTS^{•+} a amostra *Duke 2019* (101 ± 6 mg AAE/g dw).

Como se pode verificar dos extratos analisados não houve uma variedade ou época de colheita que se destacasse comparativamente às restantes. No entanto, a variedade *Duke 2019* foi selecionada para se determinar quais os compostos fenólicos que estariam a contribuir para as propriedades antioxidantes exibidas. A análise do perfil fenólico por HPLC-DAD revelou que os ácidos vanílico e elágico foram os compostos pertencentes à família dos ácidos fenólicos que contribuíram maioritariamente para o teor de polifenóis identificado e quantificado nas podas dos mirtilos. Relativamente aos compostos pertencentes à família dos flavonoides, a catequina e a epicatequina foram os que apresentaram maior concentração

Na avaliação da presença de contaminantes não foram identificados PCB, retardantes de chama, pesticidas OCP e PIR por GC-ECD. No entanto analisando os OPP por GC-FPD na amostra *Bluecroop 2019*, o cloropirifos-metil foi detetado e quantificado (4,27 µg/kg). Apesar de não existir legislação aplicada às amostras em estudo, quando comparado o valor obtido com a legislação europeia para frutos, a concentração obtida encontra-se abaixo do valor máximo estabelecido (0,01 mg/kg). Tendo em conta a avaliação de contaminantes dos extratos de mirtilo em termos de pesticidas (OCP, OPP e PIR), retardantes de chama bromados e PCBs, podemos concluir que os extratos são seguros e que poderão ser aplicados em diferentes áreas como nutracêutica, alimentar e/ou farmacêutica.

Bibliografia

- [1] Prieto-Sandoval V, Jaca C, Ormazabal M (2018). *Towards a consensus on the circular economy*. Journal of Clean Production 179:605-15
- [2] Clarck G, 2014, *The industrial Revolution. Handboo of Economic Growth*. Elsevier Ltd, vol 2, pp 217-62
- [3] Kuzmina K, Prendeville S, Waljer D, Charnley F (2019). *Future scenarios for fast-moving consumer goods in a circular economy*. Futures. 107: 74-88
- [4] Siracusa L, Ruberto G (2018). *Not Only What is Food is Good- Polyphenols from Edible and Nonedible Vegetables Waste. Polyphenols is Plants*. Watson R, 2º ed, pp. 3-21.
- [5] Direção-Geral das Atividades Económica. República Portuguesa “Regime Geral de Gestão de Resíduos (RGGR)”. Disponível em: [Direção-Geral das Atividades Económicas \(dgae.gov.pt\)](https://dgae.gov.pt). (Consultado a 20 de Janeiro de 2021).
- [6] Caldas A. (2014). *Avaliação das Propriedades Antioxidantes do Bagaço de Mirtilo como Potencial Conservante Alimentar*, Tese de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 21pp
- [7] Santos L. (2015). *Fenologia do Vaccinium corymbosum cv Duke em várias regiões de Portugal Continental*, Tese de Mestrado em Engenharia Agronómica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 17pp
- [8] Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: [FAOSTAT](http://faostat.fao.org/). (Consultado a 15 de Janeiro de 2021)
- [9] Oliveira P, Silva A. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. AGROnegócios. “Resultados de quatro anos de produção de mirtilos em cultura” protegida (15 de agosto de 2017) Disponível em: [Resultados de quatro anos de produção de mirtilo em cultura protegida | Portal Agronegócios.eu \(agronegocios.eu\)](http://agronegocios.eu). (Consultado a 17 de janeiro de 2021).
- [10] Torres G & Tarifa L (2012). *Dossiê Técnico: Aproveitamento de Resíduos Agrícolas*, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 4pp.
- [11] Bona E. (2021) *Design com bio-resíduos: uma proposta de design circular através da ressignificação e upcycling de cacas de fruta*, Tese de Mestrado em Design Industrial e de Produto, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 56pp

- [12] Calouro F, SPI- Sociedade Portuguesa de Inovação Consultadoria Empresarial e Fomento da Inovação, S.A *Atividades Agrícolas e Ambiente*, Principia, Publicações Universitárias e Científicas, 9pp
- [13] Machado M. (2005). *Degradação Biológica de Polifenóis*, Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, ramo de Gestão e Tratamento de Resíduos Industriais, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 14pp
- [14] Dorosh O. (2019). *Portuguese vine-canex extracts as a source of bioactive compounds for incorporation in cosmetic products*, Tese de Mestrado em Biotecnologia para a Sustentabilidade, Universidade Nova de Lisboa, 4pp
- [15] Dias K. (2016). *Avaliação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa*, Tese de Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 4pp
- [16] Torres C. (2014). *Síntese de metabolitos de polifenóis presentes no azeite com atividade antiaterogénica e citoprotetora*, Tese de Mestrado em Química, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 9pp
- [17] National Library of Medicine “Hydroxycinnamic acid”. National Center of Biotechnology Information. Disponível em: [4-Hydroxycinnamic acid | C9H8O3 - PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxycinnamic-acid). (Consultado a 19 de Março de 2021)
- [18] Tavares S, Lima V (2021). *Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream celular signaling: a systematic review of the literature*. Review Fisioterapia 150 (75):104842
- [19] Matos B. (2012). *Valorização de Subprodutos da Vinha e do Vinho: impacto do tempo e métodos de preservação nas suas características*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 7-9pp
- [20] Póvoas MJ. (2006). *Estudo dos fenómenos físico-químicos que estão associados ao sabor dos alimentos. Interação das proteínas com os polifenóis*. Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 33-34pp
- [21] Tua Saúde (2020). “O que são Flavonoides e principais benefícios” Disponível em: [O que são Flavonoides e principais benefícios - Tua Saúde \(tuasaude.com\)](https://tuasaude.com/flavonoides/). (Consultado a 11 de fevereiro de 2021).

- [22] Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2: 270–278
- [23] Wang, H., Guo, X., Hu, X., Li, T., Fu, X., & Liu, R. H. (2017). *Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (Vaccinium spp.)*. Food Chemistry, 217: 773–781.
- [24] Vodnar, D. C., Cris, G., & Mocan, A. (2020). *The Chemical and Biological Profiles of Leaves from Commercial Blueberry Varieties*. Plants, 9 : 1–19.
- [25] D. Martins Teixeira, R. Ferreira Patão, A. Varela Coelho, C. Teixeira da Costa. (2006). *Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from Ficus carica leaves*. Journal of Chromatography A 1103 22-28
- [26] Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagu RD, Godbut S, Valério JR. (2011) *Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends*. Critical Reviews Bioatechnoly. 31:227-49
- [27] Ramos S. (2016). *Desenvolvimento e otimização de extração de antioxidantes de matrizes alimentares por QuEChERS*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 9-10pp
- [28] Francisco T. (2016). *Determinação dos antibióticos enrofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina em farinha de aves ou penas por extração assistida por microondas (MAE) seguida de cromatografia líquida RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS*. Tese de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [29] Fernandes V.C, Domingues V.F, Mateus N, Delerue-Matos C. (2012). *Pesticides residues in Portuguese strawberries grow in 2009-2010 using integrated pest management and organic farming*. Environmental Science and Pollution Research. 19, 4184-4192
- [30] I. Jardim, (2010). *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*, Scientia Chromatographica, 2:13-25.
- [31] Lopes M (2018). *Controlo da qualidade dos vinhos – Detecção de Sambucus nigra L. em vinhos do Douro e do Porto por HPLC*. Tese de Mestrado em

- Tecnologia e Ciência Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 49-58pp
- [32] Vasco E, Dias M, Oliveira L. *Avaliação da exposição a contaminantes com base num estudo de dieta total conduzido em Portugal*. Artigos breves_ nº8. Alimentação e Nutrição. Instituto Nacional de Saúde. Alimentação e nutrição
- [33] Ribeiro R. (2010). *Contaminação Ambiental por Pesticidas: Análise Metodológica*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Ramo de Tecnologias de Proteção Ambiental, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2-19pp
- [34] European Commission. “Pesticides”. Disponível em: [Pesticides | Food Safety \(europa.eu\)](https://ec.europa.eu/food/safety/pesticides/). (Consultado a 10 de março de 2021.)
- [35] Instituto Nacional de Estatística. Disponível em: [Portal do INE](https://inec.pt/). (Consultado a 11 de março de 2021.)
- [36] Agência Portuguesa do Ambiente (APA), Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, *Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo*, Janeiro de 2010, 1-2pp.
- [37] Agência Portuguesa do Ambiente (APA), Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Março de 2010, *Plano Nacional de Descontaminação e Eliminação de PCB*, 12-16pp.
- [38] Pieroni M & Leonel J & Fillmann G. (2017). *Retardantes de chama*. Química Nova, 40: 317-326.
- [39] Disciplina “Materiais e Aplicações” do 1º semestre do 2º ano do Mestrado em Engenharia Química do ISEP, Capítulo 12, slides 48 e 58
- [40] Fernandes V.C, Domingues V.F, Mateus N, Delerue-Matos C. (2019) *Organochlorine Pesticides Residues in strawberries from integrated pest management and organic farming*. Journal of agricultural and food chemistry. 52:1339-1345
- [41] Disciplina “Amostragem e Métodos Analíticos Avançados” do 1º semestre do 1º ano do Mestrado em Engenharia Química do Ramo de Qualidade do ISEP, Capítulo 3, slide 37-39
- [42] Disciplina “Amostragem e Métodos Analíticos Avançados” do 1º semestre do 1º ano do Mestrado em Engenharia Química do Ramo de Qualidade do ISEP, Capítulo 3, slide 23-29

- [43] Machado T. (2017). *Determinação vestigial de pesticidas em alimentos: novos desafios analíticos*, Tese de Mestrado em Engenharia Química, ramo de Energia e Biorrefinaria, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 10pp
- [44] Barbosa S. (2012). *Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD*, Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências da Universidade do Lisboa, 11pp
- [45] Moreira, Manuela M., M. Fátima Barroso, João Vasconcellos Porto, M. J. Ramalhosa, Jaroslava Švarc-Gajić, Letícia Estevinho, Simone Morais, and Cristina Delerue-Matos. (2018) *Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds*. Science of The Total Environment 634:831-842.
- [46] Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira ICFR. (2010); *Targeting excessive free radical with peels and juice of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange*. Food and Chemical Toxicology. 48: 99-106
- [47] Benzie IF, strain JJ. (1995). *The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidante*. Analytical Biochemistry. 239:70-6
- [48] Moreira, M. M., Rodrigues, F., Dorosh, O., Pinto, D., Costa, P. C., Švarc-Gajić, J., & Delerue-Matos, C. (2020). *Vine-canes as a source of value-added compounds for cosmetic formulations*. Molecules, 25: 1–17.
- [49] Wu H, Chai Z, Hutabarat R, Zeng Q, Niu L, Li D, Yu H, Huang W. (2019). *Blueberry leaves from 73 different cultivars in southeastern China as nutraceutical supplements rich in antioxidants*. Food Reserarch International 122: 548-560.
- [50] Ferreyra, Susana, Andrea Antonioli, Rubén Bottini, and Ariel Fontana. (2019). *Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cane residues from different grape varieties*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 100:376-383
- [51] Dorosh O, Fernandes V, Moreira M, Delerue-Matos, C (2021). *Occurrence of pesticides and environmental contaminants in vineyards: Casa study of Portuguese grapevines canes*. Science of the Total Environmental 791:148-395
- [52] Fernandes V, Freitas J, Pacheco J, Oliveira J.M, Domingues V, Delerue-Matos C (2018). *Magnetic dispersive micro solid-phase extraction and gas*

chromatography determination of organophosphorus pesticides in strawberries.

Journal of Chromatography A, 1566: 1-12.

ANEXOS

1. Parâmetros cromatográficos para a quantificação individual dos compostos fenólicos

Tabela A0.1 Dados das curvas de calibração usadas para a quantificação dos compostos fenólicos

Comprimento de onda	Compostos fenólicos	m	b	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	R ²
280 nm	Ácido gálico	54220	57.7	0.12	0.4	1
	Ácido protocatéquico	32064	1024.1	0.104	0.346	1
	Catequina	13826	3020.6	0.568	1.895	0.9999
	Ácido vanílico	27244	-1444.5	0.292	0.972	1
	Ácido sirínico	61262	2088.3	0.165	0.551	1
	Epicatequina	15117	1175.1	0.558	1.861	0.9999
	Naringina	36536	1384.3	0.095	0.317	1
	Floridzina	47726	78.3	0.125	0.416	1
	Ácido elágico	44947	-30767	3.096	10.319	0.9973
	Ácido cinâmico	183447	2472.4	0.079	0.263	1
	Naringenina	68101	-2515.6	0.186	0.619	1
	Floretina	71734	83.5	0.302	1.007	1
	Crisina	88535	-3130.7	0.226	0.755	1
320 nm	Ácido Clorogénico	50102	-2513	0.227	0.756	1
	Ácido cafeico	119039	-7458.7	0.417	1.389	0.9999
	Ácido <i>p</i> -cumárico	146520	-33763	1.704	5.681	0.9991

	Ácido ferúlico	113051	1551.7	0.096	0.319	1
	Ácido sinápico	102960	-2051.2	0.167	0.555	1
	Ácido 3,5-di-cafeoilquínico	62289	-11003	0.341	1.138	0.9991
	Resveratrol	214953	-7893.6	0.204	0.681	1
	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	28503	31.5	0.383	1.276	0.999
320 nm	Tiliroside	67386	-1771.3	0.198	0.658	1
	Apigenina	100189	-7276.5	0.495	1.65	0.9999
360 nm	Quercetina-3-O-galactósido	50266	1185	0.12	0.399	1
	Quercetina-3-O-glucopiranosido	124699	-1003.2	0.072	0.241	1
	Rutina	83207	1936.9	0.087	0.289	1
	Miricetina	71396	-37358.4	1.809	6.029	0.999
	Kaempferol-3-O-glucósido	30767	-172.7	0.266	0.888	1
	Kaempferol-3-O-rutinósido	36775	369.2	0.171	0.57	1
	Quercetina	68254	-6404.8	0.308	1.026	1
	Kaempferol	77717	-4347.4	0.281	0.935	1