



Impacto do meio ambiente na composição do mel: um caso de estudo no Parque Natural de Montesinho

INÊS MARTINS CASAL

novembro de 2022

Impacto do meio ambiente na composição do mel: um caso de estudo no Parque Natural de Montesinho

Outubro 2022

AUTOR

Inês Martins Casal

ORIENTAÇÃO

Professora Doutora Cristina Delerue-Matos

Doutora Virgínia Cruz Fernandes

Doutora Marta Oliveira

Agradecimentos

A realização desta dissertação seria, inquestionavelmente, dificultada sem a colaboração de diversas pessoas, que foram incansáveis no apoio e apreço que me demonstraram. Assim, não posso deixar de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a todos.

Às minhas orientadoras, Dr^a Cristina Delerue-Matos, Dr^a Virgínia Cruz Fernandes e Dr^a Marta Oliveira, pela orientação, disponibilidade e possibilidade de aprendizagem no desenvolvimento do projeto. Em especial, à Dr^a Virgínia Cruz Fernandes pelo grande apoio nesta fase, pela disponibilidade em todas as dúvidas que iam surgindo, pela ajuda na compreensão dos conceitos, pela paciência e pelo voto de confiança que me deu na execução do projeto, sem a qual teria sido extremamente difícil, se não impossível, atingir esta meta.

Aos meus pais, Manuel e Georgina, por me deixarem sempre seguir os meus sonhos, pelo sacrifício, apoio, suporte, amor e encorajamento que me deram ao longo destes anos.

Aos meus avós, família e amigos que sempre me auxiliaram e foram os alicerces dos valores que construí e inspiração em momentos mais complicados.

À Mariana, amiga desde o primeiro momento, por todas as gargalhadas, abraços, sermões e lágrimas, por todo o carinho e motivação, por estes anos em que foste o meu pilar. Ao Hap, por sempre acreditar em mim, pelos abraços, pelo amor, por suportar o meu mau feitio. À Yara, pela paciência, pelo carinho e pela amizade.

Este trabalho recebeu apoio do projeto “Honey+ - New reasons to care honey from the Natural Park of Montesinho: A bioindicator of environmental quality & its therapeutic potential” (MTS/SAS/0077/2020) da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais.

Resumo

O mel integra, em Portugal, um papel bastante importante a nível socioeconómico, em virtude das inúmeras propriedades nutricionais e terapêuticas. As constantes deslocações das abelhas para produzir o mel podem indicar informações sobre a poluição ambiental. A atração das abelhas pelas plantas faz com que estes insetos polinizadores tenham contacto com inúmeros contaminantes ambientais, revelando importantes pareceres sobre as condições envolventes. Neste sentido e de modo a garantir a segurança alimentar do consumidor é fundamental desenvolver metodologias analíticas que determinem os resíduos de contaminantes no meio envolvente, com o intuito de interceder a origem da contaminação no mel.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica, baseada na extração por QuEChERS e na análise por cromatografia gasosa, para a determinação do impacto ambiental no mel, analisando um espectro de contaminantes em matrizes vegetais, recolhidas no Parque Natural de Montesinho. O desenvolvimento e otimização da metodologia extrativa foi conseguida pela elaboração de testes de otimização, com diferentes condições experimentais, alterando a quantidade de carbono na fase de limpeza, a utilização ou não de agitação ultrassónica e o uso de diferentes sais de QuEChERS, permitindo obter uma gama de taxas de recuperação de [37,3- 145,8] %.

Na validação do método realizaram-se as curvas de calibração. A linearidade das curvas de calibração na gama de concentrações [0,996-12,450] µg/kg foi aceitável, uma vez que o coeficiente de determinação foi superior a 0,99. Os limites de deteção e de quantificação variaram de 0,709 a 1,734 µg/kg e 2,365 a 5,779 µg/kg, respetivamente. Em relação ao desvio padrão relativo é possível afirmar que os valores se encontram dentro do nível normalmente reconhecido, ou seja, inferior a 20 %.

Com o objetivo de monitorizar a presença de contaminantes, estudou-se as amostras de plantas. Os principais contaminantes encontrados foram os pesticidas DDE, α-endossulfão e fenvalerato, seguidos do contaminante PCB 28 e BDE 47, sendo a localidade mais atingida Merize e o Carvalho a planta mais contaminada.

Palavras-Chave: Contaminantes, Mel, Plantas, Extração, QuEChERS

Abstract

In Portugal, honey plays a very important socioeconomic role due to its numerous nutritional and therapeutic properties. The constant movements of bees to produce honey may provide information about environmental pollution. The attraction of bees to plants means that these pollinating insects have contact with numerous environmental contaminants, revealing important insights about the surrounding conditions. In this sense, to ensure consumer food safety, it is essential to develop analytical methodologies that determine the residues of contaminants in the environment, to intercept the origin of contamination in honey.

The present work aimed to develop and validate an analytical methodology, based on QuEChERS extraction and gas chromatography analysis, for the determination of environmental impact in honey, analyzing a spectrum of contaminants in plant matrices, collected in the Natural Park of Montesinho. The development and optimization of the extraction methodology was achieved by performing optimization tests, with different experimental conditions, changing the amount of carbon in the cleaning phase, the use or not of ultrasonic agitation and the use of different QuEChERS salts, allowing a range of recovery rates of [37.3- 145.8] %.

The calibration curves were performed in the method validation. The linearity of the calibration curves in the concentration range [0.996-12.450] $\mu\text{g}/\text{kg}$ was acceptable, since the coefficient of determination was higher than 0.99. The limits of detection and quantification ranged from 0.709 to 1.734 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2.365 to 5.779 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. About the relative standard deviation, it can be stated that the values are within the normally recognized level, in other words, less than 20 %.

To monitor the presence of contaminants, the plant samples were studied. The main contaminants found were the pesticides DDE, α -endosulfan and fenvalerate, followed by the contaminant PCB 28 and BDE 47, being Marize the most affected location and Carvalho the most contaminated plant.

Keywords: Contaminants, Honey, Plants, Extraction, QuEChERS

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas	xiii
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento do trabalho	1
1.2 Objetivos do trabalho	2
1.3 Organização da Dissertação.....	2
Capítulo 2. Estado de Arte	3
2.1 Parque Natural de Montesinho.....	3
2.1.1 Vegetação.....	5
2.1.2 Apicultura.....	9
2.2 O mel: caracterização e indicador ambiental.....	11
2.2.1 Produção de mel: Abelhas.....	11
2.2.2 Caracterização do mel.....	11
2.2.3 Mel como indicador ambiental.....	13
2.3 Contaminação ambiental	14
2.4 Extração e deteção de contaminantes.....	27
2.4.1 Extração de contaminantes.....	27
2.4.2 Deteção de contaminantes.....	32
Capítulo 3. Materiais e métodos	35
3.1 Amostragem.....	35
3.1.1 Preparação e conservação das amostras.....	40

3.2	Contaminantes.....	40
3.3	Condições Cromatográficas.....	42
3.4	Procedimento experimental.....	43
3.4.1	Extração de contaminantes pelo método QuEChERS e testes de otimização	43
3.4.2	Avaliação da eficiência de extração - Ensaios de recuperação	46
3.4.3	Procedimento final adotado	47
3.4.4	Validação do método analítico.....	48
Capítulo 4.	Resultados e Discussão	51
4.1	Identificação dos contaminantes por cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons (GC-ECD)	51
4.2	Identificação dos contaminantes por cromatografia gasosa com detetor de chama fotométrica (GC-FPD).....	52
4.3	Desenvolvimento e otimização do método de preparação de amostra..	53
4.3.1	Otimização da metodologia de extração - Teste 1.....	55
4.3.2	Otimização da metodologia de extração - Teste 2.....	56
4.3.3	Otimização da metodologia de extração - Teste 3 e 4.....	57
4.3.4	Otimização da metodologia de extração - Teste 5 e 6.....	58
4.3.5	Otimização da metodologia de extração - Teste 7 e 8.....	60
4.3.6	Otimização da metodologia de extração - Teste 9.....	62
4.3.7	Otimização da metodologia de extração - Teste 10.....	63
4.4	Método de validação	64
4.5	Resíduos de contaminantes em amostras de plantas do PNM.....	68
4.5.1	Abordagem por local de amostragem.....	77
4.5.2	Abordagem por espécie	78
	Conclusões e Perspetivas futuras	85
	Referências Bibliográficas	89

Índice de Figuras

Figura 2.1– Localização Parque Natural de Montesinho (Montesinho, 2022).	3
Figura 2.2 – Urze vermelha (<i>Erica australis</i> ssp. <i>Aragonesis</i>).	6
Figura 2.3 – Giesta de flor amarela (lado esquerdo) e Giesta de flor branca (lado direito).	6
Figura 2.4 – Carqueja (<i>Pterospartum tridentatum</i>).	6
Figura 2.5 – Castanheiro (<i>Castanea sativa</i>).	7
Figura 2.6 – Carvalho negral (<i>Quercus pyrenaica</i>).	8
Figura 2.7 – Cerejeira brava (<i>Prunus avium</i>).	8
Figura 2.8 – Medronheiro (<i>Arbutus unedo</i>).	9
Figura 3.1 – Mapa com locais de recolha de amostragem no PNM.	35
Figura 3.2 – Condições da separação cromatográfica.	42
Figura 3.3 – Condições da coluna cromatográfica.	43
Figura 3.4 – Esquematização do procedimento adotado para a pesquisa de contaminantes.	48
Figura 4.1 –Cromatograma obtido na pesquisa de 19 POPs (9 OCP, 6 BDE e 4 PCB) e 5 PYRs.	51
Figura 4.2 – Cromatograma obtido para pesquisa de 6 OPEs e 6 OPPs.	53
Figura 4.3 – Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> (cor preta) e o cromatograma obtido <i>post-spiking</i> (cor rosa), teste 1.	55
Figura 4.4 – Extrato final obtido para a solução <i>post-spiking</i> (lado esquerdo) e <i>pre-spiking</i> (lado direito), do teste 2.	56
Figura 4.5 - Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> (cor preta) e o cromatograma obtido <i>post-spiking</i> (cor rosa), teste 2.	57
Figura 4.6- Extrato final obtido para a solução <i>post-spiking</i> (lado esquerdo) e <i>pre-spiking</i> (lado direito), do teste 3.	58
Figura 4.7 - Extrato final obtido para o extrato final do teste 5 (lado esquerdo) e do teste 6 (lado direito).	59
Figura 4.8 - Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> no teste 6 (cor preta) e o cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> (cor rosa), teste 5.	59

Figura 4.9 - Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> (cor preta) e o cromatograma obtido <i>post-spiking</i> (cor rosa), teste 7.....	60
Figura 4.10 – Sinal obtido para os contaminantes com menores taxas de recuperação.....	61
Figura 4.11 - Extrato final obtido para o extrato final do teste 7 (lado esquerdo) e do teste 8 (lado direito).	61
Figura 4.12 - Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> para o teste 7 (cor preta) e o cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> (cor rosa), teste 8.....	62
Figura 4.13 - Comparação entre cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> para o teste 7 (cor preta), o cromatograma padrão (cor rosa) e cromatograma obtido <i>pre-spiking</i> para o teste 9 (cor azul).....	63
Figura 4.14 – Frequências de detecção, em %, e gama de concentrações, em µg/kg, dos contaminantes encontrados nas amostras.....	73
Figura 4.15 – Percentagem de contaminantes detetados em cada região do PNM.	77
Figura 4.16 – Número de amostras contaminadas da planta Carvalho, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	78
Figura 4.17 - Número de amostras contaminadas da planta Urze, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	79
Figura 4.18 - Número de amostras contaminadas da planta Carqueja, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	79
Figura 4.19 - Número de amostras contaminadas da planta Esteva, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	80
Figura 4.20 - Número de amostras contaminadas da planta Giesta, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	81
Figura 4.21 - Número de amostras contaminadas da planta Castanheiro, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	81

Figura 4.22 - Número de amostras contaminadas da planta Medronho, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	82
Figura 4.23 - Número de amostras contaminadas da planta Cerejeira, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	82
Figura 4.24 - Número de amostras contaminadas da planta Silva, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	83
Figura 4.25 - Número de amostras contaminadas da planta Trevo, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.	83

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Lista de diversos contaminantes, bem como as suas principais propriedades.	18
Tabela 2.2 – Características dos diferentes métodos de extração para matrizes sólidas, bem como as suas vantagens e desvantagens.	29
Tabela 3.1 – Caracterização dos locais de recolha de amostragem.....	36
Tabela 3.2 – Lista de amostras de plantas recolhidas no Parque Natural do Montesinho, bem como a respetiva espécie e local de recolha.	36
Tabela 3.3 – Lista de contaminantes pesquisados em cada amostra.	40
Tabela 3.4 – Condições cromatográficas do GC- ECD utilizadas para determinação de contaminantes.....	42
Tabela 3.5 - Condições cromatográficas do GC- FPD utilizadas para determinação de contaminantes.....	43
Tabela 3.6 – Testes desenvolvidos para a otimização do procedimento experimental.	44
Tabela 3.7 – Composição de cada solução padrão utilizada na construção das curvas de calibração.....	49
Tabela 4.1 – Lista de contaminantes detetados no cromatograma e respetivos tempos de retenção, em minutos.....	52
Tabela 4.2 – Lista de contaminantes detetados no cromatograma e respetivos tempos de retenção, em minutos.....	53
Tabela 4.3 - Dados estatísticos das curvas de calibração para todos os contaminantes estudados, bem como as recuperações (RE) e os efeitos de matriz (ME) associados a cada composto (n=3).....	65
Tabela 4.4 – Contrações médias de contaminantes ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em diferentes amostras de plantas (n=3).....	70

Abreviaturas

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BDEs	Éteres difenílicos polibromados
CE	Comissão europeia
DDD	Diclorodifeniltricloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
ECD	Detetor de captura de eletrões
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (<i>Food and agriculture organization of the United Nation</i>)
FIC	Detetor de ionização por chama
FPD	Detetor de chama fotométrica
GC	Cromatografia Gasosa
GC- FPD	Cromatografia gasosa acoplada com o detetor de chama fotométrica
GCB	Carvão
GC-ECD	Cromatografia gasosa acoplada com o detetor de captura de eletrões
GPC	Cromatografia líquida de permeação de gel
HCB	Hexaclorobenzeno
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEC	Cromatografia líquida de permuta iónica

LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
MAE	Extração assistida por microondas
ME	Efeito matriz
MS	Espectrometria de massa
OCPs	Pesticidas organoclorados
OPEs	Retardantes de chama fosforados
OPPs	Pesticidas organofosforados
PAHs	Hidrocarbonetos poliaromáticos
PAN	Programa Apícola Nacional
PCBs	Bifenilos policlorados
PNM	Parque Natural do Montesinho
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PRYs	Pesticidas piretróides
PSA	Amina secundária primária
PTEs	Elementos potencialmente tóxicos
QuEChERS	Método de extração denominado de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
R ²	Coefficiente de determinação
RE	Taxa de recuperação
RSD	Desvio Padrão Relativo

SE	Extração líquido-líquido
SEC	Cromatografia líquida de exclusão molecular
SFE	Extração com fluido supercrítico
SOX	Soxhlet
SPE	Extração em fase sólida
SPE	Extração de fase sólida
SPME	Micro extração em fase sólida
TBEP	Tris (2-butoxietil) fosfato
TCD	Detetor de condutividade térmica
TCEP	Tris (2-carboxietil)fosfite
TEHP	Tri (2-etil-hexilo) fosfato
TiBP	Tri-isobutil fosfato
TnBP	Tri-n-butil fosfato
TPP	Trifenilfosfato
TToP	Fosfato de trietil
WHO	<i>World Health Organization</i>

Capítulo 1. Introdução

1.1 Enquadramento do trabalho

A crescente preocupação com a contaminação ambiental interligada à saúde pública levou a comunidade científica, empresas e classes políticas, a investir na pesquisa de contaminantes e na criação de metodologias que o permitissem, de forma rápida e eficiente. A problemática assenta, não só na alteração das características finais do produto, como representa uma ameaça para a saúde humana.

O mel é produzido pelas abelhas, a partir do néctar e da melada das plantas que estas recolhem. O processo de amadurecimento do mel, onde ocorre a transformação do produto recolhido (néctar ou melada) no produto final (mel), dá-se no organismo das mesmas e, posteriormente, em favos, descrevendo-se numa série de transformações bioquímicas (conversão da sacarose em glicose e frutose, por exemplo) e evaporação de água.

Quimicamente, o mel traduz-se numa solução aquosa concentrada de açúcares, sendo altamente higroscópica e uma matriz bastante complexa. A sua composição depende do local onde o néctar ou a melada foi recolhido, ou seja, da espécie vegetal. Das suas propriedades, destacam-se as antibacterianas, uma vez que inibe o crescimento dos microrganismos.

A industrialização da agricultura, o uso de pesticidas e antibióticos, para satisfazer as necessidades e controlar pragas, levam à contaminação de culturas e, conseqüentemente, do produto final, o mel. Além disto, o aumento da poluição ambiental afeta as plantas, o solo e a qualidade dos alimentos. A contaminação do mel pode ocorrer de forma direta, onde há contaminação na atividade apícola através da utilização de pesticidas, acaricidas, entre outros, ou de forma indireta, onde se empregam contaminantes nas práticas agrícolas ou derivam do meio ambiente, como por exemplo os bifenilos policlorados (PCBs), os metais pesados e os aditivos de plásticos como os retardantes de chama.

Neste sentido, surge o projeto denominado Honey +, que visa valorizar o mel do Parque Natural do Montesinho, explorando novas potencialidades além do seu valor

nutricional, e pesquisar a presença de contaminantes, utilizando o mel como indicador de qualidade ambiental.

O presente trabalho centra-se na via indireta de contaminação do mel, onde se avalia a presença de contaminantes nas plantas do meio envolvente da atividade apícola do Parque.

1.2 Objetivos do trabalho

O trabalho realizado tem como objetivos estudar o estado de contaminação das plantas, que constituem a flora do Parque Natural de Montesinho, e que atraem insetos polinizadores, com o propósito de verificar a influência na qualidade do mel e, conseqüentemente, saber se o mel pode ser considerado um bioindicador da qualidade do ambiente.

1.3 Organização da Dissertação

Esta Dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos.

No capítulo 1, faz-se uma breve introdução à temática do trabalho, refere-se sucintamente os objetivos do mesmo e expõe-se a organização da Dissertação. No capítulo 2, apresenta-se o estado da arte referente ao Parque Natural de Montesinho e à exposição das abelhas, bem como os estudos realizados para a deteção de contaminantes. O capítulo 3 aborda a área experimental do trabalho, onde se apresentam os materiais e métodos referentes à caracterização e determinação dos contaminantes presentes nas amostras de plantas. No capítulo 4 são demonstrados aos resultados obtidos e elabora-se a discussão dos mesmos. No capítulo 5 concluiu-se acerca do trabalho realizado e dos resultados obtidos. No capítulo 6 encontram-se as referências bibliográficas, que suportam a escrita da dissertação.

Capítulo 2. Estado de Arte

2.1 Parque Natural de Montesinho

O Parque Natural de Montesinho (PNM) nasce, em 1979, do desafio de criar e proteger determinadas áreas, tendo em conta o seu valor ambiental, paisagístico e patrimonial, considerando-se uma das maiores áreas protegidas de Portugal (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019; Museu Virtual da Biodiversidade, 2022).



Figura 2.1– Localização Parque Natural de Montesinho (Montesinho, 2022).

Situado no Nordeste Transmontano de Portugal Continental (Figura 2.1), inserido nos concelhos de Vinhais e Bragança, o Parque Natural de Montesinho apresenta uma área de cerca de 75 mil hectares, constituída por uma séria de planaltos ondulados e profundos vales, bem como algumas serras, destacando-se a Serra de Montesinho, a norte de Bragança, e a Serra da Coroa, a norte de Vinhais. Esta reserva, localizada na terra fria transmontana, apresenta granitos, rochas ultrabásicas, pequenas manchas calcárias e xistos, sendo esta última a rocha predominante (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019; Montesinho, 2022).

O PNM caracteriza-se pela extensa diversidade de fauna e flora. Devido à variabilidade geológica e ao clima característico, a flora é muito variada, encontrando-se espécies raras no mundo (Montesinho, 2022).

A fauna e a vegetação predominantes do Parque Natural de Montesinho destacam-se, em contexto nacional, pela sua extensa diversidade e quantidade de espécies raras, nomeadamente endemismos ibéricos ou lusitânicos. A interligação entre as condições orográficas, geológicas e climáticas que predominam na região, cultiva inúmeras espécies

raras e de enorme beleza, que atribuem uma elevada importância no que diz respeito à conservação da Natureza (Montesinho, 2022).

Neste sentido, surge a classificação como Parque Natural, cuja finalidade é salvaguardar os valores únicos presentes, que surgem da alternância e integração harmoniosa dos habitats, resultando em espaços de elevada naturalidade e complexidade, com um dos índices de biodiversidade mais elevados registados em Portugal.

O Parque Natural de Montesinho é caracterizado pelas práticas quotidianas antigas, relacionadas com costumes ancestrais provenientes da população que lá habita. Contudo, denota-se a evolução marcada pelas inovações tecnológicas e mobilidade de pessoas.

A distribuição geográfica da população no PNM demonstra um povoamento muito disperso, condicionado pelas condições geomorfológicas do território e pelo défice de acessos e a complexidade dos mesmos. No decorrer dos anos, a rede viária tem vindo a ser melhorada e aumentada, de modo a apresentar um melhor conforto aos que interagem com a área protegida (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

No que concerne à evolução demográfica do PNM, é possível aferir a tendência regressiva do interior do país, onde o índice de jovens na área tem vindo a diminuir e observa-se a crescente população envelhecida e com elevada taxa de dependência (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

Ao longo dos anos, foram os recursos naturais disponíveis que ditaram a economia da região. As atividades agrícolas, silvícolas e pecuárias foram, e continuam a ser, imprescindíveis para a economia, bem como a exploração de recursos mineiros, como o ouro, ferro e estanho (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

A transformação de matérias-primas locais permite evoluir as produções artesanais, que marcam a cultura das populações. Importante referir que a maioria das produções satisfazem as necessidades quotidianas, ainda que em produções de forma vestigial, sendo exemplos a tecelagem do linho e lã, para produção de agasalhos e lençóis, e a cestaria de vima, para uso doméstico ou agrícola (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

Ao longo do tempo, a sociedade está intrinsecamente ligada a processos de evolução. No entanto, as populações que habitam no Parque Natural apresentam um certo conservadorismo, marcado pela devoção que apresentam pelo património, e pela preservação das tradições e práticas sociais e económicas. Ainda assim, verifica-se diversas alterações nos edifícios (degradação e abandono) e o aparecimento de outros estilos, devido à emigração, aumento do poder económico e aparecimento de novos materiais mais acessíveis (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

Com o objetivo de colmatar o abandono e aproveitar as potencialidades associadas aos valores naturais e culturais do PNM, procurou-se dinamizar a região, com a implementação do turismo, nomeadamente o turismo natural. Para o efeito, foram criadas casas de natureza, espaços rurais, moradias turísticas e parques de campismo, que promovem a promoção desta nova fonte económica. A totalidade destas atividades promovem o emprego de diversas pessoas no PNM e apoiam o dinamismo económico do interior do país (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019; Montesinho, 2022; Museu Virtual da Biodiversidade, 2022).

2.1.1 Vegetação

A vegetação e flora que caracterizam o Parque Natural de Montesinho, apresenta elevada diversidade e riqueza de habitats, criada pela conjugação das condições geológicas, climáticas, orográficas e ação humana. O parque representa uma área bastante importante a nível europeu, uma vez que existem inúmeras espécies em vias de extinção e pretende-se conservar a natureza.

2.1.1.1 Matos

Os matos, habitats constituídos por urzais, estevais e giestais, cobrem grande parte dos solos abandonados pela agricultura, orlas de bosques ou terrenos anteriormente ocupados por um bosque autóctone.

Em terrenos de elevada altitude, os solos degradados são invadidos pela urze vermelha *Erica australis ssp. Aragonesis* (Figura 2.2), que atribui uma coloração característica à paisagem. Por outro lado, os solos menos danificados e mais profundos são dominados pelas giestas de flor amarela (*Cytisus scoparius* e *C. striatus*) e giestas de

flor branca (*C. multiflorus*) (Figura 2.3) (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).



Figura 2.2 – Urze vermelha (*Erica australis* ssp. *Aragonesis*).



Figura 2.3 – Giesta de flor amarela (lado esquerdo) e Giesta de flor branca (lado direito).

Ainda incluídas nas espécies arbustivas, a carqueja (Figura 2.4) é também, das mais referidas e preferidas pelas comunidades, devido às suas inúmeras utilizações.



Figura 2.4 – Carqueja (*Pterospartum tridentatum*).

Importante salientar que os matos, em especial os que ocupam os territórios a maior altitude, constituem biótopos bastante importantes para algumas espécies da fauna selvagem.

2.1.1.2 Soutos

Os soutos de castanheiros (Figura 2.5) encontram-se associados a terrenos agrícolas, ocupados por culturas perenes, que percorrem o PNM. Estes apresentam um papel fundamental, sendo indispensável a sua presença para a manutenção da vida do parque e ocorrência de espécies, que habitam exclusivamente nesse ecossistema. Os castanheiros, apesar de serem vulneráveis a doenças e pragas, são evidências da história e do património natural da região transmontana (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).



Figura 2.5 – Castanheiro (*Castanea sativa*).

2.1.1.3 Carvalhais

Ao longo do Parque Natural de Montesinho, de sul até à serra da Nogueira, é possível observar os bosques de carvalho negral *Quercus pyrenaica* (Figura 2.6), característicos da vegetação arbórea autóctone. Uma vez considerados os mais importantes bosques de carvalho negral da Europa, devido à sua extensão e estado de conservação, estes são devotados pela comunidade faunística e contribuem para a diversidade botânica desta área (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

Os carvalhais revelam propriedades bastante importantes na conservação da flora, nomeadamente de espécies em vias de extinção em outras áreas europeias, tornando assim, o parque uma reserva natural imprescindível de preservar. São, ainda, biótopos de

extrema importância para certas espécies de animais, observando-se a presença de significativa de mamíferos, aves, e anfíbios que caracterizam o parque (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).



Figura 2.6 – Carvalho negral (*Quercus pyrenaica*).

2.1.1.4 Ecossistemas Ribeirinhos

Os ecossistemas ribeirinhos, localizados nas margens dos cursos de água, apresentam grande variabilidade entre si, manifestando uma grande importância no que diz respeito à conservação da fauna e da flora do Parque Natural. A elevada diversidade de espécies neste habitat reflete a adaptação das plantas às adversas condições climáticas dos rios e ribeiros (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019). Estes são caracterizados por diversas plantas rasteiras, múltiplos fetos, e plantas arbustivas, cerejeira brava (Figura 2.8), que aproveitam a frescura, sombra e humidade típicas da zona.



Figura 2.7 – Cerejeira brava (*Prunus avium*).

2.1.1.5 Ervededo

Em localidades como o Ervededo é possível notar a presença de ervedeiros, tradicionalmente apelidados por medronheiros (*Arbutus unedo*). Esta espécie autóctone permite a produção de bebidas alcoólicas, nomeadamente aguardente, uma vez que o seu fruto, medronho, quando maduro apresenta teor alcoólico (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

O medronheiro (Figura 2.8) cobre a paisagem do Parque Natural de Montesinho, sendo uma espécie arbustiva facilmente adaptável a diversos solos.



Figura 2.8 – Medronheiro (*Arbutus unedo*).

2.1.2 Apicultura

A atividade apícola encontra-se tradicionalmente associada à agricultura, sendo, geralmente, considerada um complemento ao rendimento das explorações. No entanto, a apicultura traduz-se numa atividade fulcral para a agricultura, conservando a biodiversidade, através da polinização, que mantém a diversidade genética das plantas e o equilíbrio ecológico dos *habitats*.

O setor apícola relaciona a exploração integrada e economicamente sustentável do espaço rural com a ligação humana a esse meio. Assim, esta atividade deve ser analisada pelas condições de produção, pelos produtos finais desta, como o mel, o pólen, a cera, o própolis e a geleia real, bem como pela atuação do homem no meio rural, benefícios indiretos na produção de alimentos e ação das abelhas na polinização e fertilização (Ricardo, 2013).

Ao longo dos anos, este setor tem vindo progredir, adquirindo um crescente interesse por parte das indústrias, nomeadamente cosmética e farmacêutica, e do consumidor final nos seus produtos (Ricardo, 2013).

Em Portugal é possível notar a simbiose perfeita entre as condições naturais favoráveis e o potencial do meio rural para a prática da atividade apícola. Neste sentido, de modo a apoiar e a promover o setor estabeleceu-se normas (Regulamento nº 917/2004) e criou-se o Programa Apícola Nacional (PAN). Esta atividade é exercida por pequenos agricultores, como complementação da atividade agrícola, verificando-se uma baixa produtividade e fraca formação técnica dos apicultores (Ricardo, 2013).

O Parque Natural de Montesinho apresenta as condições ideais para o desenvolvimento da atividade apícola, potenciando a sua prática e expansão.

A biodiversidade da flora apícola presente na reserva natural oferece alimento para as abelhas. A flora apícola é um fator condicionante da atividade apícola, uma vez que fornece as quantidades de néctar e pólen necessárias à proliferação das colónias de abelhas e dos produtos apícolas, desencadeando uma recolha constante por parte do apicultor.

No decorrer da paisagem do Parque Natural é possível observar, como já mencionado, a presença de inúmeras espécies arbustivas e subarbustivas, florestais e culturas agrícolas, que são de elevado interesse apícola. O rosmaninho, o medronheiro, a esteva, a giesta, a urze, o castanheiro e o carvalho negral são algumas das espécies que apresentam interesse e potencial no desenvolvimento da atividade apícola na região (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2019).

É de salientar que, consoante a origem floral do mel, as propriedades organolépticas (cor e sabor, por exemplo) do mel variam, distinguindo e valorizando o produto final. No entanto, esta atividade é, também, condicionada por fatores internos e externos à flora, como por exemplo a humidade, precipitação e temperatura ambiente.

A Apimonte, localizada no Parque Natural de Montesinho, é um dos exemplos do decorrer da atividade no meio rural, onde é possível observar a atividade das abelhas no seu *habitat* natural e consumir o produto final, o mel de castanheiro, já premiado pela sua excelente qualidade (Apimonte, 2020).

2.2 O mel: caracterização e indicador ambiental

2.2.1 Produção de mel: Abelhas

As abelhas distinguem-se como polinizadores eficientes e essenciais, que preservam a biodiversidade e asseguram a produtividade dos ecossistemas naturais e agrícolas. Além disto, promovem a economia, devido à produção de mel e outros produtos inerentes ao processo apícola (Jovetić et al., 2018). Vivem em colónias com apenas uma abelha rainha e milhares de obreiras e zangãos, interrelacionando-se através de interações químicas, nomeadamente a produção de feromonas. As feromonas são segregadas por inúmeras glândulas e reconhecidas pelo olfato, permitindo, assim, a estimulação e controlo de todas as funções das abelhas (Moreira & Farinha, 2011).

Vários estudos apontam para o declínio do número de abelhas, a nível mundial, que se justifica pelo chamado “distúrbio do colapso da colónia”, relacionado com diversos fatores, nomeadamente as práticas apícolas, os químicos integrados e os agentes biológicos, que conjugados contribuem para o stress das abelhas, enfraquecendo-as e levando à morte da colónia (Jovetić et al., 2018).

2.2.2 Caracterização do mel

Segundo a Diretiva 2001/110/CE, do Conselho europeu, o mel é uma “substância açucarada natural produzida pelas abelhas *Apis mellífera*, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia” (Directiva 2001/110/CE Do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, Relativa Ao Mel, 2001). A Comissão do Codex Alimentarius, dirigida pela *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (FAO) e pela *World Health Organization* (WHO) expõem uma idêntica definição para mel, sem explicitar a espécie de abelha que o produz, como a diretiva anteriormente supracitada.

A Diretiva 2001/110/CE e o *Codex Alimentarius* garantem a qualidade e autenticidade do mel, definindo normas que limitam a intervenção humana na alteração da composição do mel, conservando o seu carácter natural.

Em Portugal, a diretiva europeia foi substituída pelo Decreto-lei nº 214/2003, de 18 de setembro, que determina a produção e comercialização do mel, regulando a classificação do produto, a rotulagem, os métodos de análise e os parâmetros de qualidade (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003).

O mel pode ser classificado tendo em conta a sua origem ou o modo de produção e/ou de apresentação. Assim, consoante a origem, o mel divide-se em mel de néctar (ou mel de flores), sendo obtido a partir do néctar das plantas, ou em mel de melada, obtido, essencialmente, a partir de excreções de insetos sugadores de plantas ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003; Almeida, 2010).

O mel de flores apresenta duas variedades distintas, sendo elas monofloral ou multifloral, dependendo da quantidade de pólen de uma determinada planta ou de várias. Esta classificação assenta numa análise polínica, que permite contabilizar o número de grãos de pólen e indicar as flores em que as abelhas coletaram o néctar, apresentando um papel preponderante na classificação botânica do mel (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003).

Neste sentido, quando um mel, após a análise polínica, apresenta um teor superior a 45 % de pólen de uma planta ou flor distingue-se como monofloral, à exceção do mel de rosmaninho (teor superior a 10 %) e do mel de castanheiro (teor superior a 70%). Portugal apresenta condições excecionais para a produção de mel monofloral de qualidade. No Parque Natural de Montesinho, os principais tipos de mel monoflorais são o mel de castanheiro e rosmaninho (Almeida, 2010)

No caso do mel multifloral, como o próprio nome indica, apresenta inúmeras espécies botânicas, sem que nenhuma prevaleça em relação às restantes (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003).

Relativamente ao modo de produção e/ou de apresentação, os méis podem ser classificados como mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel prensado e mel filtrado. O mel em favos corresponde ao mel armazenado pelas abelhas nos alvéolos de favos, produzidos recentemente pelas próprias abelhas, ou de finas folhas de cera gravada, constituídas exclusivamente por cera de abelha e que não possuam criação, vendidos em secções de favos ou inteiros. O mel com pedaços de favos é o mel que

apresenta um ou mais pedaços de mel em favos. Em relação ao mel escorrido e centrifugado, apenas varia o processo de obtenção, sendo que o escorrido é obtido por escorrimento de favos desoperculados, que não apresentem criação, e o centrifugado é obtido por centrifugação. O mel obtido pela compressão de favos sem criação, com aplicação ou não de tratamento térmico, denomina-se por mel prensado. Por fim, o mel filtrado distingue-se como o mel obtido por eliminação de matérias orgânicas e inorgânicas estranhas à sua composição, retirando uma fração importante de pólen (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003).

A composição do mel assenta, essencialmente, em açúcar (glucose e frutose) e outras substâncias, como ácidos orgânicos, enzimas e partículas sólidas resultantes da sua colheita (Fakhri et al., 2019). Propriedades como a tonalidade, o sabor e aroma, variam consoante a origem vegetal. Quanto à sua textura, o mel pode ser fluido, espesso ou cristalizado (parcial ou totalmente) (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro do Ministério da Agricultura, 2003).

A natureza e composição do mel está intrinsecamente relacionada com fatores bióticos e abióticos, nomeadamente o tipo de flora, o processamento e armazenamento do mel, e com as condições climáticas do meio (Fakhri et al., 2019).

Importa referir que o mel é definido como um produto natural, sendo proibida a adição de qualquer ingrediente alimentar ao mel, incluindo aditivos alimentares, e a remoção dos componentes específicos deste alimento. Assim, é possível realçar o seu papel na saúde e bem-estar, apresentando inúmeros benefícios e potencial a nível alimentar, destacando-se o seu valor nutricional. É possível, ainda, destacar as suas propriedades biológicas, fisiológicas e farmacológicas, salientando-se a sua capacidade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e antibacteriana (Fakhri et al., 2019).

2.2.3 Mel como indicador ambiental

Ao longo dos anos, o mel e a sua qualidade têm sido cada vez mais objeto de estudo, uma vez que este alimento é um ótimo bioindicador de contaminação química e, conseqüentemente, indicador de contaminação ambiental (Fakhri et al., 2019; Pohl et al., 2017)

A proteção sanitária dos apiários previne possíveis ameaças que podem afetar a saúde das abelhas, que, posteriormente, irão afetar a qualidade do mel produzido. A Diretiva 2001/110/CE determina os parâmetros mínimos de qualidade exigidos para o mel, que devem ser respeitados na Europa (Belas et al., 2014).

2.3 Contaminação ambiental

Com vista na monitorização ambiental, o mel é um bioindicador de contaminação química, quer indiretamente, através do meio ambiente ou das práticas agrícolas, quer diretamente pela apicultura. As fontes de contaminação difíceis de controlar, fontes primárias, compreendem o pólen, as abelhas, o ar ambiente e o néctar das flores. Já as fontes secundárias, derivam do processo apícola e devem ser geridas, de acordo com as boas práticas de fabrico (Belas et al., 2014). A exposição das abelhas a contaminantes é decorrente da prática agrícola inadequada, para controlo de surtos de doenças ou proteção das plantações, e do consumo de produtos contaminados, como o pólen, tendo em conta que estes persistem no solo e nas águas, sendo absorvidos pelas plantas (Fakhri et al., 2019; Xiao et al., 2022).

A poluição do ar, pelas indústrias e tráfego, a contaminação de águas pelos descartes industriais, o cultivo extensivo, são exemplos de fontes antropogénicas, que resultam na contaminação das colmeias e, conseqüentemente, do mel. De salientar que, diversos estudos apontam a atividade antropogénica, contaminação de águas, solos e ar como as principais causas de modificações nas características do mel, revelando importantes informações sobre a poluição ambiental e contaminação (Pohl et al., 2017).

O presente estudo tem como objetivo monitorizar a contaminação ambiental no mel através das suas fontes de contaminação indiretas, nomeadamente a flora. São exemplos de contaminantes os poluentes orgânicos persistentes (POPs), os elementos potencialmente tóxicos (PTEs) e compostos fosforados (retardantes de chama fosforados (OPE) e pesticidas organofosforados (OPP)).

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são substâncias químicas que se distinguem pelas suas características bioacumuladoras, pela resistência à degradação ambiental, transportabilidade a longas distâncias e elevada toxicidade (ASAE., 2022;

Girones et al., 2021). A Convenção de Estocolmo, com o objetivo de proteger a saúde humana e ambiental, proibindo e/ou eliminando, gradualmente, a utilização e produção de POPs, definiu uma lista de 12 poluentes a ter em atenção, sendo eles pesticidas (aldrina, dieldrina, endrina, clordano, heptacloro, DDT, toxafeno e mirex), químicos de aplicação industrial (hexaclorobenzeno e bifenilos policlorados) e resíduos de atividades (dioxinas e furanos) (ASAE., 2022).

Os pesticidas são substâncias químicas, normalmente aplicadas na agricultura, silvicultura e campos domésticos, para a prevenção e controlo de pragas e ervas daninhas, por exemplo. Geralmente, os pesticidas podem dividir-se tendo em conta o seu grau de toxicidade, os organismos alvos sob os quais podem atuar, modos de ação e classe química. Além dos critérios anteriores, podem ainda ser classificados de acordo com a sua natureza química, considerando-se naturais ou sintéticos. As famílias de pesticidas mais reconhecidas são pesticidas organoclorados (OCPs), pesticidas organofosforados e pesticidas piretróides (PYRs) (Liang et al., 2022a).

Os pesticidas organoclorados pertencem à classe dos hidrocarbonetos clorados e são usualmente aplicados no controlo de pragas. São exemplos de OCPs os acaricidas, inseticidas e fungicidas, cujas suas propriedades distintivas centram-se na resistência à degradação, persistência no meio ambiente, bioacumulação e elevada toxicidade (Kang et al., 2022). De salientar que, estes compostos apresentam baixa solubilidade em água, promovida pelo carácter lipídico, pelo que se acumulam em gorduras, uma vez que não são metabolizados, permanecendo na cadeia alimentar (Barriada-Pereira et al., 2003). Compostos como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorobenzeno (HCB), dieldrina pertencem a este grupo. A maioria dos OCPs foram, gradualmente, substituídos por outros pesticidas, uma vez que a sua elevada toxicidade promoveu a gestão da sua utilização por parte das entidades governamentais (Liang et al., 2022b).

Relativamente aos pesticidas organofosforados, salienta-se a crescente utilização face aos outros pesticidas e podem classificar-se em inseticidas, fungicidas e herbicidas (Herrera-Herrera et al., 2019; Liang et al., 2022b). Comparando os OCPs e OPPs, verifica-se um menor impacto ambiental e uma maior taxa de degradação nestes últimos. Dos inúmeros compostos que fazem parte deste grupo, o paratião e o dimetoato são dos inseticidas organofosforados mais tóxicos e são empregues no controlo de pragas (Liang et al., 2022b).

Os piretróides são pesticidas sintéticos, desenvolvidos com o objetivo de controlar pragas na agricultura, uma vez que exibem características inseticidas capazes, sob uma vasta variedade de insetos, e baixa toxicidade para o ser humano, surgindo como alternativa aos OCPs e OPPs (Duan et al., 2022; S. Singh et al., 2022). Os PYRs são distinguidos em dois grupos: piretróides tipo 1, aqueles que não apresentam um grupo ciano na sua estrutura química (permetrina e bifentrina, por exemplo) e tipo 2, originados a partir dos piretróides tipo 1 com adição de um grupo ciano à sua estrutura (deltametrina e cipermetrina, por exemplo) (S. Singh et al., 2022). Fatores como o baixo custo de produção, ampla aplicação como inseticida e segurança estão na origem da sua ampla aplicação. Importa referir que a utilização de piretróides afeta os solos, tendo impacto direto nas plantas, visto que causam desequilíbrios de nitrogénio nos solos (Liang et al., 2022b).

O Regulamento (CE) nº 396/2005 define os limites máximos de resíduos para um extenso espectro de pesticidas. São exemplos de pesticidas o dimetoato, ometoato e permetrina (Silvina et al., 2017).

Os bifenilos policlorados são compostos orgânicos aromáticos clorados, classificados como POPs, devido à sua estabilidade térmica e química (Li et al., 2021; Munawar et al., 2021). A sua estrutura química é particularizada pela estrutura bifenil substituída por cloros (um a dez) e, de acordo com a quantidade e posição de cloros, é possível obter inúmeros congéneres (Hannah et al., 2022). Os PCBs foram produzidos de modo a satisfazer diversas necessidades do Homem, nomeadamente para tintas, transformadores, selantes (Hannah et al., 2022; Terzaghi et al., 2022). Contudo, estes compostos são caracterizados pela persistência no meio ambiente, propriedades carcinogénicas e toxicidade, que tornam a sua utilização restrita mundialmente (Hannah et al., 2022; Needham & Ghosh, 2019).

Os éteres difenílicos polibromados, BDEs, são contaminantes persistentes e tóxicos para o ser humano e para o ambiente. São tradicionalmente empregues como retardantes de chama bromados, em inúmeras aplicações, nomeadamente eletrodomésticos, têxteis, plásticos e equipamentos eletrónicos. No entanto, o descarte de resíduos, deposição atmosférica em aterros, descargas de águas residuais industriais são outras das principais fontes de libertação de BDEs no ecossistema, sendo que estes contaminantes não se degradam e têm tendência para ser absorvidos e acumular no meio

ambiente (Novak et al., 2017; Tan et al., 2022). Os BDEs são os retardantes de chama mais comumente utilizados, uma vez que apresentam elevada eficiência de extinção de incêndios e boa compatibilidade com uma ampla gama de polímeros (Lao et al., 2023).

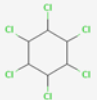
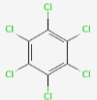
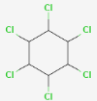
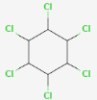
Sendo os BDEs compostos com elevada transportabilidade, bioacumulação, toxicidade e persistência, sendo definidos como POPs, surgem alternativas como os retardantes de chama organofosforados, designadamente os ésteres organofosforados (OPEs) (Lao et al., 2023).

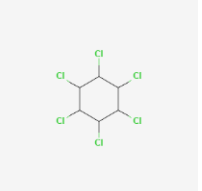
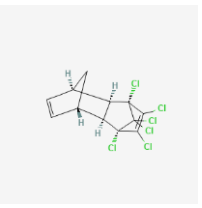
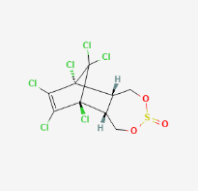
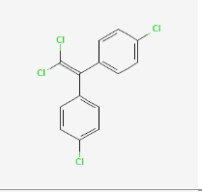
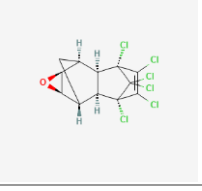
Os ésteres organofosforados são compostos orgânicos antropogênicos e são classificados com base na estrutura química, nomeadamente de acordo com os grupos funcionais da cadeia lateral, em OPEs halogenados (TCEP, por exemplo) e OPEs alquil e aril não halogenados (TnBP, por exemplo) (Zou et al., 2022). Estes contaminantes apresentam uma extensa diversidade de aplicações como retardantes de chama e plastificantes, em equipamentos eletrónicos, plásticos, moveis, têxteis, entre outros (Bi & Su, 2023; Zhu et al., 2022). Tal como os restantes contaminantes, estes são produzidos em elevadas quantidades e, portanto, o ecossistema é permanentemente exposto a estes, por meio de inalação, consumo e persistência em água, vegetação e ar (Bi & Su, 2023).

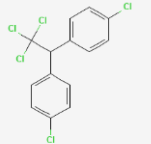
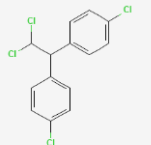
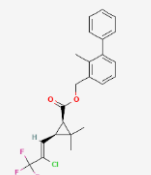
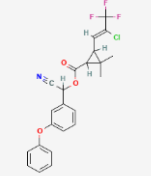
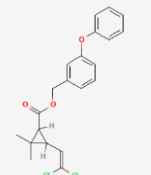
A crescente preocupação com os contaminantes presentes no meio envolvente e, conseqüentemente, no ser humano conduz à monitorização destes compostos em diversas matrizes, principalmente matrizes vegetais e alimentares.

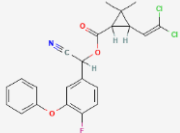
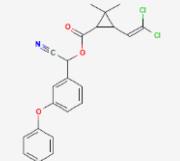
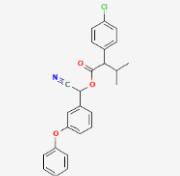
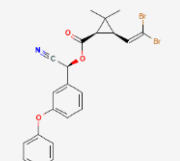
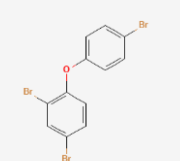
A Tabela 2.1 enuncia os diversos contaminantes pesquisados nas matrizes vegetais do PNM, bem como as suas principais propriedades.

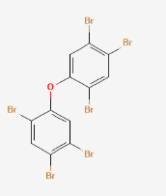
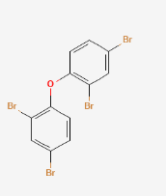
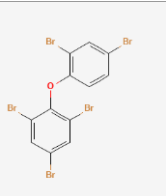
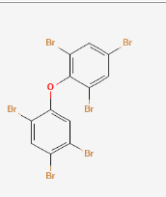
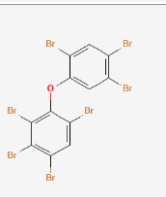
Tabela 2.1 – Lista de diversos contaminantes, bem como as suas principais propriedades.

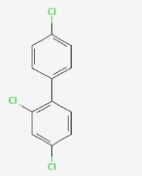
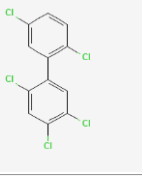
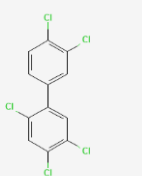
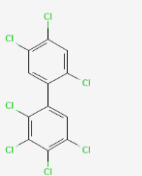
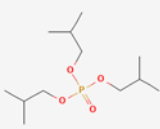
Contaminante	Grupo	Estrutura química	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Ponto ebulição (°C)	Toxicidade	Referência
Hexaclorociclohexano (α-HCH)	Pesticidas organoclorados (OCPs)		$C_6H_6Cl_6$	290,8	323,4	Grupo 2B	(National Center for Biotechnology Information, 2022a)
Hexaclorobenzeno (HCB)			C_6Cl_6	284,8	325,0	Grupo 2B	(National Center for Biotechnology Information, 2022o)
β-HCH			$C_6H_6Cl_6$	290,8	323,4	Grupo 2B	(National Center for Biotechnology Information, 2022a)
Lindane (γ-HCH)			$C_6H_6Cl_6$	290,8	323,4	Grupo 1	(National Center for Biotechnology Information, 2022a)

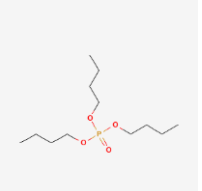
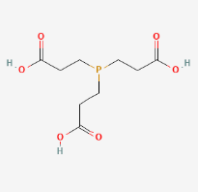
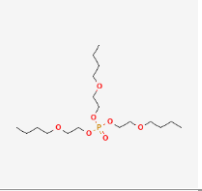
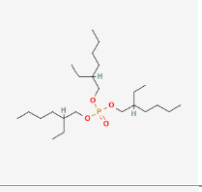
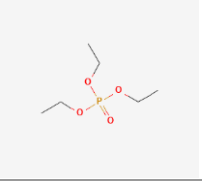
Z- HCH		$C_6H_6Cl_6$	290,8	323,4	Grupo 1	(National Center for Biotechnology Information, 2022a)
Aldrina		$C_{12}H_8Cl_6$	364,9	145,0	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022ai; PubChem Annotation Record for ALDRIN, 2022)
Endosulfão		$C_9H_6Cl_6O_3S$	406,9	106,0	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022g; Stoytcheva, 2011)
Diclorodifenildicloroetileno (DDE)		$C_{14}H_8Cl_4$	318,0	336,0	Grupo 2B	(National Center for Biotechnology Information, 2022d)
Dieldrina		$C_{12}H_8Cl_6O$	380,9	330,0	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022ad)

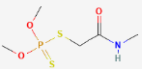
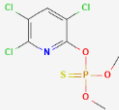
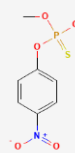
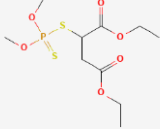
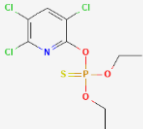
Diclorodifeniltricloroetano (DDT)			$C_{14}H_9Cl_5$	354,5	260,0	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022e)
Diclorodifeniltricloroetano (DDD)			$C_{14}H_{10}Cl_4$	320,0	350,0	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022k, 2022ag)
Bifentrina			$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	422,9	453,2	Grupo 2B	(National Center for Biotechnology Information, 2022ag)
Cialotrina	Piretróides (PYRs)		$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449,8	n.d	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022ae)
Permetrina			$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	391,3	> 290,0	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022w, 2022z)

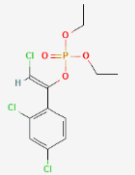
Ciflutrina			$C_{22}H_{18}Cl_2FNO_3$	434,3	496,3	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022z)
Cipermetrina			$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	416,3	200,0	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022c)
Fenvalerato			$C_{22}H_{22}ClNO_3$	419,9	n.d	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022h)
Deltametrina			$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505,2	535,8	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022x)
BDE 28	Retardantes de chama-Éteres difenílicos polibromados (BDEs)		$C_{12}H_7Br_3O$	406,9	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022ah)

BDE 153			$C_{12}H_4Br_6O$	643,6	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022ac)
BDE 47			$C_{12}H_6Br_4O$	485,8	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022y)
BDE 100			$C_{12}H_5Br_5O$	564,7	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022ab)
BDE 154			$C_{12}H_4Br_6O$	643,6	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022aj)
BDE 183			$C_{12}H_3Br_7O$	722,5	n.d	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022ak)

PCB 28	Bifenilos policlorados (PCBs)		$C_{12}H_7Cl_3$	257,5	n.d	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022q)
PCB 101			$C_{12}H_5Cl_5$	326,4	n.d	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022v)
PCB 118			$C_{12}H_5Cl_5$	326,4	n.d	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022t)
PCB 180			$C_{12}H_3Cl_7$	395,3	n.d	Grupo 2A	(National Center for Biotechnology Information, 2022u)
Tri-isobutil fosfato (TiBP)	Retardantes de chama – Ésteres Organofosforados (OPEs)		$C_{12}H_{27}O_4P$	266,3	264,0	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022r)

Tri-n-butil fosfato (TnBP)		$C_{12}H_{27}O_4P$	266,3	289,0	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022s)
Tris (2-carboxietil)fosfito (TCEP)		$C_9H_{15}O_6P$	250,2	n.d	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022aa)
Tris (2-butoxietil) fosfato (TBEP)		$C_{18}H_{39}O_7P$	398,5	[200 – 230]	Grupo 4	(National Center for Biotechnology Information, 2022n)
Tri (2-etil-hexilo) fosfato (TEHP)		$C_{24}H_{51}O_4P$	434,6	220	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022m)
Fosfato de trietil (TToP)		$C_6H_{15}O_4P$	182,1	215	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022l)

Dimetoato	Organofosforados (OPPs)		$C_5H_{12}NO_3PS_2$	229,3	117,0	Grupo 2B	(Martins, 2015; National Center for Biotechnology Information, 2022f)
Clorpirifos-metilo			$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	332,5	n.d	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022p)
Paratião – metilo			$C_8H_{10}NO_5PS$	263,21	154,0	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022j)
Malatião			$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,4	[156-157]	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022i)
Clorpirifos			$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,6	160	Grupo 2	(National Center for Biotechnology Information, 2022b)

<p>Clorfenvinfos</p>			$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	359,6	[167-170]	Grupo 3	(National Center for Biotechnology Information, 2022af)
-----------------------------	--	--	------------------------	-------	-----------	---------	---

Legenda: n.d – Não definido

2.4 Extração e detecção de contaminantes

De modo a proteger a segurança, qualidade e autenticidade do mel, é fundamental o estudo de possíveis contaminantes. A análise do mel permite, aos consumidores, reconhecer as propriedades nutricionais, toxicológicas e a presença de componentes ambientais, preservando a saúde humana. Além disto, identificar os componentes do mel proporciona aos apicultores, adaptar as suas técnicas de colheita e extração de mel, que se relacionam com a qualidade final do produto. Os agricultores são, indiretamente, atingidos por esta análise, uma vez que é possível verificar o efeito do cultivo das plantas e das práticas agrícolas de uma área, nas características do mel (Pohl et al., 2017).

Neste âmbito, têm sido desenvolvidos diversos estudos, que pretendem encontrar métodos analíticos eficazes para a determinação e quantificação de possíveis contaminantes no mel e no meio envolvente, nomeadamente as plantas.

2.4.1 Extração de contaminantes

A preparação da amostra possibilita a concentração ou isolamento do analito em estudo, bem como a eliminação de possíveis interferentes, que podem influenciar a viabilidade dos resultados e danificar equipamentos, como os sistemas cromatográficos. Idealmente, procura-se que a metodologia permita a investigação de inúmeros contaminantes, com uma percentagem de recuperação próxima de 100%, bem como apresente uma elevada capacidade de remoção dos compostos interferentes da matriz, boa precisão e robustez, baixo custo de análise, rapidez, segurança e simplicidade (Almeida, 2010).

Importante referir que a etapa de preparação de amostra é crucial para o processo de detecção, particularmente em matrizes complexas, uma vez que apresentam diversos compostos que podem interferir na quantificação, obtendo-se resultados falaciosos, sendo a otimização desta etapa imprescindível.

A etapa crucial na preparação de amostra assenta na técnica de extração, uma vez que facilita a eliminação de possíveis componentes interferentes da matriz. O processo de extração de contaminantes é regado pelas propriedades físico-químicas de cada composto, nomeadamente a polaridade, a afinidade com os solventes, a solubilidade, o peso molecular e a volatilidade (Almeida, 2010).

Como já salientado, em amostras com matrizes complexas é fundamental que a análise química dos analitos seja precedida por uma preparação prévia da mesma. Em concreto, a pré-concentração ou isolamento das quantidades vestigiais de contaminantes presentes nas amostras de plantas é a etapa crítica do procedimento, sendo o procedimento extrativo condicionado por inúmeros fatores, como as quantidades vestigiais em que os contaminantes se encontram, a complexidade da matriz e a natureza química do analito estudado. Além de todos os fatores referidos, a seleção do método de preparação de amostra deverá ter em conta o método de deteção a implementar, para quantificação do analito.

Em matrizes vegetais, as metodologias de extração de contaminantes mais comuns são extração com solventes, extração líquido-líquido (*Solvent Extaction* – SE), extração com fluido supercrítico (*Super Critical Fluid Extraction* – SFE), extração de fase sólida (*Solid-phase Extraction* – SPE), microextração em fase sólida (*Solid-phase Microextraction* – SPME) e, mais recentemente, a metodologia QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) (Ho & Hsieh, 2001; kardani et al., 2022a; Lino & da Silveira, 1997; Senosy et al., 2022; Wu et al., 2021). De salientar que todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens, sendo, por vezes, combinadas com o objetivo de obter uma elevada capacidade extrativa.

A Tabela 2.2 sintetiza as características das diversas metodologias acima descritas, bem como as suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2.2 – Características dos diferentes métodos de extração para matrizes sólidas, bem como as suas vantagens e desvantagens.

	Técnicas de extração				
	Extração em fase sólida (SPE)	Microextração em fase sólida (SPME)	Extração assistida por microondas (MAE)	Extracção em fluido supercrítico (SFE)	Extracção por Soxhlet
Metodologia	Técnica de extração onde os compostos de interesse de uma matriz complexa ficam retidos seletivamente. As etapas de extração são o condicionamento das colunas SPE, com adsorventes adequados, a aplicação da amostra, a lavagem com solventes e a eluição dos analitos.	Técnica desenvolvida em pequenas dimensões (micro) e sem uso de solventes orgânicos. Baseada em equilíbrios simultâneos, onde os compostos de interesse adsorvem à superfície de uma fibra de sílica revestida, que possui afinidade com o composto.	Técnica desenvolvida com a finalidade de obter uma extração rápida. Os analitos de interesse são aquecidos por microondas e transferidos para os solventes orgânicos. O solvente é aquecido a uma temperatura superior à sua de ebulição, num vaso fechado, que não absorve radiação microondas.	Técnica utilizada para extrair compostos não polares e moderadamente polares de matrizes sólidas. A amostra é adicionada a um reservatório, onde passa um fluido supercrítico. Usualmente, utiliza-se como fluido o dióxido de carbono. A pressão do fluido, a temperatura, o fluxo e os co-solventes utilizados são variáveis que afetam a extração.	Técnica mais antiga de extração de matrizes sólidas. A amostra é adicionada a um cartucho e extraída por condensação do solvente em refluxo. O processo é demorado e contínuo.
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Elevadas taxas de recuperação; • Possibilidade de automação; • Pequenos volumes de solventes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de automação; • Inexistência ou pequenos volumes de solventes; • Extração rápida e simples. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extração rápida e múltipla; • Pequenos volumes de solvente; • Elevadas temperaturas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extração rápida; • Pequenos volumes de solvente; • Elevadas temperaturas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica tradicional e conhecida;

Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Extração lenta; • Elevado custo; • Possibilidade de existência de interferentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dependente da afinidade dos analitos com a fibra; • Otimização demorada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvente necessita de absorver radiação microondas; • Tempo de arrefecimento dos vasos; • Possibilidade de degradação dos analitos em estudo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Otimização demorada (inúmeros parâmetros para otimizar). 	<ul style="list-style-type: none"> • Extração demorada; • Elevados volumes de solvente; • Possibilidade de degradação dos analitos em estudo; • Possibilidade de existência de interferentes.
Referências	(Barbosa, 2012 ; Boyaci et al., 2015 ; Soares, 2016)	(Soares, 2016)	(Martins, 2015)	(Martins, 2015)	(Soares, 2016)

Em 2003 foi introduzida uma nova técnica extrativa para preparação de amostra, designada por QuEChERS. Sendo um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, foi inicialmente desenvolvido para a extração de resíduos de pesticidas presentes em amostras de alimentos, contudo, revelou-se bastante promissor para diferentes tipos de matrizes. O principal objetivo do desenvolvimento deste novo método foi colmatar as limitações dos métodos tradicionais de extração (Kardani et al., 2022b).

A metodologia QuEChERS consiste numa combinação de extração sólido-líquido e a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (Anastassiades et al., 2003; Martins, 2015; Soares, 2016). O procedimento de extração por QuEChERS pode ser dividido em duas etapas essenciais. Primeiramente, dá-se a extração com solvente orgânico, onde se adiciona a um tubo a amostra em estudo, o solvente orgânico (normalmente acetonitrilo) em proporções desejadas, um agente exsiccante (sulfato de magnésio, por exemplo) e um sal (cloreto de sódio, por exemplo), seguem-se as etapas de agitação e centrifugação. A adição do sal cloreto de sódio promove o efeito da força iónica, denominado por “*salting out*”, que possibilita a separação entre a fase orgânica e a fase aquosa, sendo possível a recolha da fase onde persistem os contaminantes (fase orgânica), que sofre posteriormente o procedimento de limpeza. Esta etapa de limpeza, segunda na metodologia QuEChERS, é crucial para a quantificação do analito, uma vez que possibilita a limpeza do extrato final, eliminando compostos que podem causar efeitos matriciais (como por exemplo, lípidos, açúcares, ácidos gordos, clorofila) (Pszczolińska et al., 2022). A sua execução é similar à primeira, compreendendo etapas como a agitação e centrifugação, no entanto, adiciona-se adsorventes, como a amina secundária primária (PSA), o carvão (GCB) e a sílica C18, capazes de purificar o extrato. A utilização do polímero PSA está relacionada com a remoção de moléculas polares, ácidos gordos, açúcares, ácidos orgânicos, que possam estar presentes na matriz da amostra, já a adição da sílica C18 permite a eliminação de lípidos, sendo aplicada em amostras com elevadas quantidades de gordura. A utilidade do GCB passa pela redução do teor de gordura da amostra e pela remoção de pigmentos (clorofila, por exemplo) e esteróis presentes na matriz (Kardani et al., 2022).

De referir que existem três métodos QuEChERS principais, nomeadamente o método original, onde se utiliza como solvente de extração acetonitrilo e cloreto de sódio na composição dos sais adicionados, que melhora a extração e reduz as interferências polares (Anastassiades et al., 2003); a norma europeia EN 15662, onde, além do cloreto

de sódio, adicionam-se diversos citratos, cujo objetivo é preservar os analitos mais sensíveis e tamponar a solução; e, finalmente, o método dispersivo AOAC, onde a combinação acetonitrilo e ácido acético é solvente de extração e, na composição dos sais de QuEChERS utiliza-se acetato de sódio, de modo a tamponar a solução e proteger os analitos sensíveis às variações de pH (Bragança et al., 2012; Soares, 2016).

Em comparação com procedimentos de extração convencionais, a metodologia QuEChERS apresenta elevadas recuperações (> 85%), elevada precisão, menores quantidades de solventes, menor geração de resíduos e extratos mais limpos e com menores interferências (Bragança et al., 2012; Martins, 2015). Além destas vantagens, a sua implementação é bastante simples, uma vez que as etapas de extração e purificação ocorrem ao mesmo tempo.

Em suma, a análise de resíduos de contaminantes em matrizes vegetais, como é o caso das plantas recolhidas no PNM, é bastante sensível, devido à complexidade da matriz e à persistência de elevadas quantidades de coextrativos, como a clorofila, nos extratos, dadas as características não voláteis da mesma. Neste sentido, o desenvolvimento de estratégias alternativas para eliminar os interferentes e minimizar os efeitos da matriz (ME) é o desafio da etapa de preparação de amostras (Pszczolińska et al., 2022).

2.4.2 Detecção de contaminantes

Os métodos cromatográficos são os mais comuns para a deteção, identificação e quantificação de quantidades residuais de contaminantes em matrizes vegetais, sendo crucial ter em atenção os padrões de contaminantes, o efeito da matriz, a técnica de extração e a escolha do método para identificação e quantificação (Almeida, 2010; Barbosa, 2012).

O método físico-químico de separação, cromatografia, baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, através de distintas interações entre duas fases imiscíveis, denominadas por fase móvel (líquido ou gás) e fase estacionária (sólida ou líquida), que possibilitam a identificação e quantificação de cada componente. Os componentes que permanecem na fase estacionária, persistem no sistema cromatográfico durante mais tempo do que os compostos com afinidade pela fase móvel, dando-se assim a separação (Almeida, 2010).

O método cromatográfico pode ser classificado em Cromatografia Gasosa (CG), caso o componente seja termicamente estável, ou a Cromatografia Líquida (CL), quando o componente é termicamente instável ou possui baixa volatilidade (Almeida, 2010). Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás e a fase estacionária pode ser líquida (GLC) ou sólida (GSC). A cromatografia líquida, consoante o tipo de sólido que integra a fase estacionária, pode ser distinguida em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de permuta iónica (IEC), de exclusão molecular (SEC) e de permeação de gel (GPC).

2.4.2.1 Cromatografia Gasosa

Para a deteção e quantificação de resíduos de contaminantes é, vulgarmente, utilizada a cromatografia gasosa, sendo esta muitas vezes combinada com diversos detetores sensíveis, como por exemplo, o detetor de captura de eletrões (ECD) ou o de ionização por chama (FID), o que proporciona uma elevada resolução e sensibilidade, bem como uma análise de misturas complexas, com elevada rapidez e em concentrações vestigiais (Barbosa, 2012).

Na cromatografia gasosa, os componentes voláteis da amostra são injetados e separados com base na sua partição entre a fase móvel (gás) e a fase estacionária (líquida ou sólida), contida na coluna cromatográfica. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente ou um filme de um líquido pouco volátil, ligado a um sólido inerte. O gás, também designado como fase móvel, pretende arrastar a amostra ao longo da coluna e deve ser quimicamente inerte, para que não interaja com a amostra. Normalmente, o gás utilizado é o hélio.

A interação entre os componentes da amostra presentes na fase móvel, e a fase estacionária permite que cada componente fique retido na coluna em tempos distintos, promovendo a separação das substâncias e, conseqüentemente, a sua distinção. Após a desagregação de cada componente da mistura, os analitos são medidos pelo detetor, dando origem a uma resposta, cromatograma, com picos ou bandas de diferentes intensidades, dependentes da concentração da substância e da sensibilidade do detetor (Skoog et al., 1998; Soares, 2016).

Fatores como a volatilidade e solubilidade das substâncias da amostra influenciam a sua separação, uma vez que, quanto maior a volatilidade do componente, maior a sua tendência em permanecer vaporizada e, conseqüentemente, maior a rapidez com que se

desloca na coluna. Relativamente à solubilidade, uma substância solúvel na fase estacionária apresenta maior afinidade com a mesma, pelo que o seu tempo de retenção no sistema será maior, do que uma substância insolúvel.

Como já referido, os componentes da amostra são identificados pelo detetor. Os detetores mais utilizados na cromatografia gasosa são os de ionização de chama (FID), para pesquisa de hidrocarbonetos; os de condutividade térmica (TCD), sendo detetores universais; os de captura de eletrões (ECD), para pesquisa de compostos halogenados; o de chama fotométrica (FPD), para a deteção de compostos com fósforo e enxofre e, finalmente, os de espetrometria de massa (MS), detetores universais (Skoog et al., 1998).

A determinação de resíduos de contaminantes presentes em amostras vegetais é, usualmente, aferida através de cromatografia gasosa acoplada com o detetor de captura de eletrões (GC-ECD). A separação de componentes com este método baseia-se na reação de espécies eletronegativas com eletrões térmicos, formando iões carregados negativamente. A quantidade de analito presente na amostra é proporcional à perda dos eletrões (Skoog et al., 1998). Os eletrões térmicos, de baixa energia, resultam da ionização do gás de arraste pela emissão de um eletrão, pelo emissor do detetor, originando um fluxo de eletrões e, conseqüentemente, uma corrente elétrica constante. Na presença de grupos funcionais eletronegativos, captadores de eletrões, a intensidade da corrente elétrica diminui, uma vez que estes já não são captados pelos dois elétrodos que constituem o detetor. Esta alteração dá origem ao cromatograma (Barbosa, 2012).

Outro detetor bastante promissor no estudo de contaminantes, é o detetor de chama fotométrica, uma vez que apenas deteta compostos com átomos de enxofre e fósforo. A sensibilidade deste detetor a estes átomos tornou-se bastante relevante na pesquisa de pesticidas organofosforados (Liu et al., 2020).

Capítulo 3. Materiais e métodos

Neste capítulo encontra-se descrito o procedimento experimental utilizado durante o período de trabalho. Apresenta-se, ainda, a lista de amostras utilizadas, bem como as espécies, a otimização do plano experimental, os ensaios de recuperação e os métodos de extração e quantificação que foram realizados durante todo o trabalho.

3.1 Amostragem

Para o desenvolvimento deste projeto, foi necessária a recolha de inúmeras espécies de plantas, que pintam as paisagens do Parque Natural, para que se possa obter um resultado fidedigno e representativo.

A Figura 3.1 e a Tabela 3.1 permitem localizar os locais de amostragem, bem como as zonas envolventes.

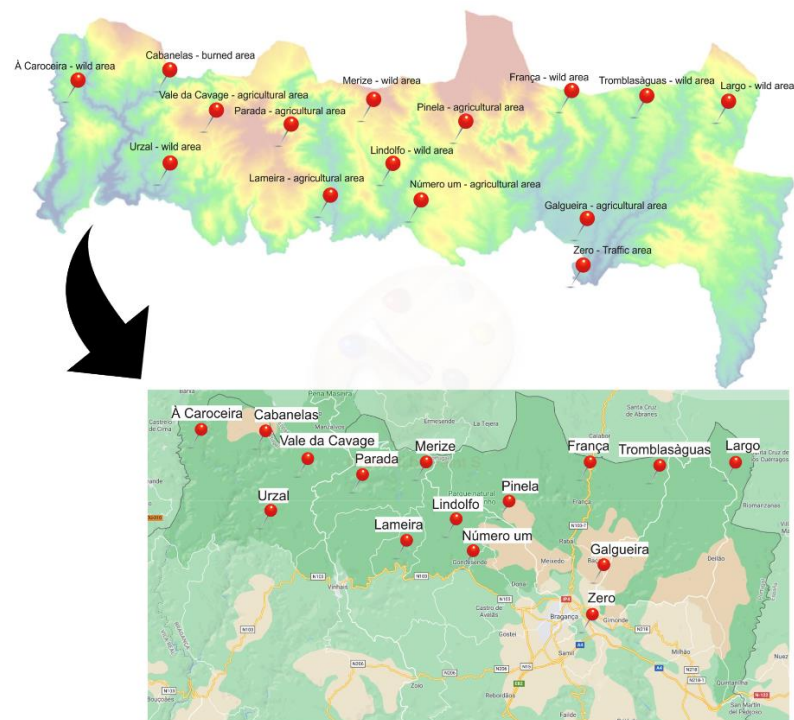


Figura 3.1 – Mapa com locais de recolha de amostragem no PNM.

Tabela 3.1 – Caracterização dos locais de recolha de amostragem.

Locais	Proximidades						
	Aldeia	Cidade	População	Tráfego	Área de cultivo agrícola	Área selvagem	Área recentemente ardida
Sabariz	< 2 km	[5-10] km	< 2 km	Pouco tráfego (< 2 km)	< 2 km	< 2 km	-
Lindolfo	< 2 km	-	< 2 km	Pouco tráfego (< 2 km)	< 2 km	< 2 km	-
Pinela	< 2 km	>10 km	< 2 km	Pouco tráfego (< 2 km)	< 2 km	-	-
Merize	< 2 km	>10 km	< 2 km	Pouco tráfego (< 2 km)	< 2 km	< 2 km	-
Cabanclas	-	-		Sem tráfego	-	< 2 km	< 2 km
Vale de Cavage	< 2 km	-		Sem tráfego	< 2 km	< 2 km	-
Nuzedo de Cima	-	-		Sem tráfego	-	< 2 km	-
Aldeia Quiraz	< 2 km	-		Sem tráfego	-	-	-
Montesinho	< 2 km	-		Moderado tráfego (< 2 km)	< 2 km	< 2 km	-
Guadramil	[2-5] km	-		Sem tráfego	-	-	-

A identificação das amostras teve em conta o local de recolha e a espécie de planta, sendo o local numerado primeiro e depois a espécie. Na Tabela 3.2 apresenta-se a lista de amostras recolhidas (HP: *Honey Plant*).

Tabela 3.2 – Lista de amostras de plantas recolhidas no Parque Natural do Montesinho, bem como a respetiva espécie e local de recolha.

Amostragem	Local de Recolha	Planta		Nome Científico	Identificação da Amostra
HP_	1.Sabariz	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_1.1
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_1.3

		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_1.4
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_1.9
	2.Lindolfo	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_2.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_2.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_2.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_2.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_2.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_2.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_2.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_2.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_2.9
		10	Esteva	<i>Cistus sp.</i>	HP_2.10
	3.Pinela	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_3.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_3.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_3.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_3.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_3.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_3.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_3.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_3.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_3.9
	4.Merize	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_4.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_4.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_4.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_4.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_4.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_4.6
7		Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_4.7	
8		Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_4.8	
9		Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_4.9	

		10	Esteva	<i>Cistus sp.</i>	HP_4.10
	5.Cabanclas	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_5.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_5.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_5.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_5.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_5.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_5.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_5.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_5.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_5.9
		10	Esteva	<i>Cistus sp.</i>	HP_5.10
	6.Vale de Cavage	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_6.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_6.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_6.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_6.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_6.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_6.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_6.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_6.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_6.9
		7.Nuzedo de Cima	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>
	2		Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_7.2
	3		Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_7.3
	4		Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_7.4
	5		Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_7.5
	6		Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_7.6
	7		Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_7.7
	8		Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_7.8
	9		Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_7.9
		1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_8.1

	8.Aldeia Quiraz	2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_8.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_8.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_8.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_8.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_8.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_8.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_8.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_8.9
		9.Montesinho	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>
	2		Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_9.2
	3		Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_9.3
	4		Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_9.4
	5		Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_9.5
	6		Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_9.6
	7		Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_9.7
	8		Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_9.8
	9		Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_9.9
	10.Guadramil	1	Carvalho	<i>Quercus sp.</i>	HP_10.1
		2	Urze	<i>Erica sp.</i>	HP_10.2
		3	Giesta	<i>Cytisus sp.</i>	HP_10.3
		4	Castanheiro	<i>Castanea sativa Mill.</i>	HP_10.4
		5	Trevo e outros	<i>Trifolium sp.</i>	HP_10.5
		6	Cerejeira	<i>Prunus avium L.</i>	HP_10.6
		7	Medronho	<i>Arbutus unedo L.</i>	HP_10.7
		8	Carqueja	<i>Pterospartum tridentatum (L.) Willk.</i>	HP_10.8
		9	Silva	<i>Rubus sp.</i>	HP_10.1

3.1.1 Preparação e conservação das amostras

Após a recolha das amostras nas diversas localidades do Parque Natural, estas necessitavam de uma etapa de preparação prévia, de modo a serem, posteriormente, submetidas ao procedimento de extração.

Inicialmente, as amostras de plantas foram recolhidas grosseiramente, no PNM, e armazenadas em sacos, rotulados com a espécie e o local de recolha. Seguidamente, as plantas foram cortadas e trituradas, utilizando a picadora (Krupps), e armazenadas em frascos de vidro, previamente desinfetados. Até ao processo de extração de contaminantes, as amostras foram armazenadas a -18 °C numa arca.

3.2 Contaminantes

A Tabela 3.3 apresenta a lista de contaminantes procurados em cada amostra e respetivas marcas, sendo que todos os compostos são de elevado grau de pureza e com grau de padrão analítico. Acrescentou-se ainda a técnica cromatográfica usada em cada caso, com o detetor acoplado.

Tabela 3.3 – Lista de contaminantes pesquisados em cada amostra.

Contaminantes		Marca	Metodologia
Pesticidas	Hexaclorociclohexano (α -HCH)	Sigma Aldrich	GC- ECD
	Hexaclorobenzeno (HCB)		
	β -HCH		
	Lindano (γ -HCH)		
	Z- HCH		
	Aldrina		
	Endosulfão		
	Diclorodifenildicloroetileno (<i>p,p'</i> -DDE)		
	Dieldrina		
	Diclorodifeniltricloroetano (<i>o,p'</i> -DDT)		
	Diclorodifeniltricloroetano (<i>p,p'</i> -DDD)		
	Bifentrina		
	Cialotrina		

	Permetrina		
	Ciflutrina		
	Cipermetrina		
	Fenvalerato		
	Deltametrina		
Retardantes de chama- Éteres difenílicos polibromados	BDE 28	Isostandards Material	
	BDE 47		
	BDE 100		
	BDE 153		
	BDE 154		
	BDE 183		
Policlorobifenilos	PCB 28	Sigma Aldrich / Techno Spec	
	PCB 101		
	PCB 118		
	PCB 180		
Retardantes de chama- Ésteres Organofosforados	Tri-isobutil fosfato (TiBP)	Sigma Aldrich	GC- FPD
	Tri-n-butil fosfato (TnBP)		
	Tris (2-cloroetil) fosfato (TCEP)		
	Tris (2-butoxietil) fosfato (TBEP)		
	Tri (2-butoxietil) fosfato (TEHP)		
	Fosfato de trietil (TTop)		
Organofosforados	Dimetoato	Sigma Aldrich	
	Cloropirifos-metilo		
	Paratião – metilo		
	Malatião		
	Cloropirifos		
	Clorfenvinfos		

3.3 Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica efetuada no GC- ECD ocorreu numa coluna Zebtron XLB (30.0 m x 0.25x0.25 mm) da Phenomenex, utilizando como gás de arraste o hélio.

Na Figura 3.2 e na Tabela 3.4 encontram-se as condições cromatográficas utilizadas na deteção de contaminantes por GC- ECD.

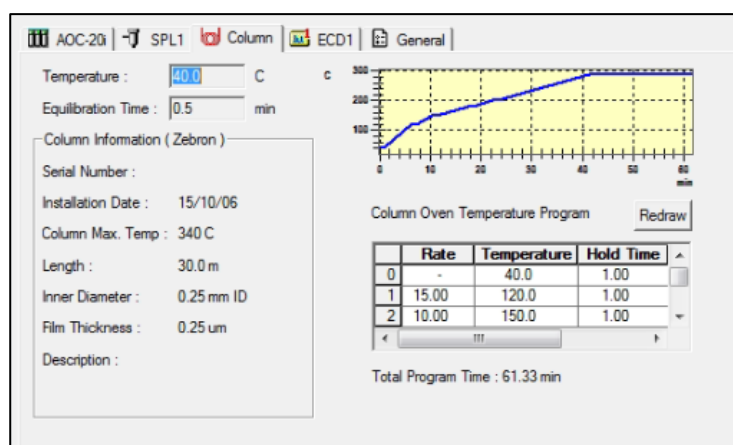


Figura 3.2 – Condições da separação cromatográfica.

Tabela 3.4 – Condições cromatográficas do GC- ECD utilizadas para determinação de contaminantes.

Condições cromatográficas	
Volume de injeção	1,00 µL
Tipo de injeção	<i>Splitless</i>
Temperatura de injeção	250 °C
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min
Tempo de análise	60,0 min
Temperatura da coluna	40,0 °C

A separação cromatográfica do GC- FPD ocorreu numa coluna Zebtron ZB-5MSi (30.0 m x 0.25x0.25 mm) da Phenomenex, utilizando como gás de arraste o hélio.

Na Figura 3.3 e na Tabela 3.5 encontram-se as condições cromatográficas utilizadas para determinação de contaminantes por GC- FPD.

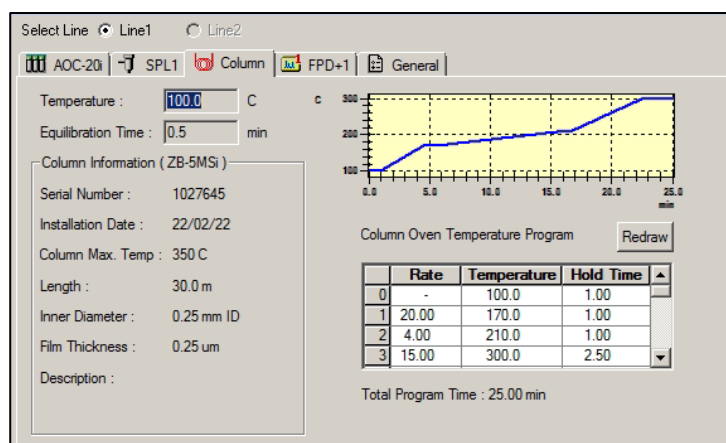


Figura 3.3 – Condições da coluna cromatográfica.

Tabela 3.5 - Condições cromatográficas do GC- FPD utilizadas para determinação de contaminantes.

Condições cromatográficas	
Volume de injeção	1,4 µL
Tipo de injeção	<i>Splitless</i>
Temperatura de injeção	250 °C
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min
Tempo de análise	30,0 min
Temperatura da coluna	100,0 °C

3.4 Procedimento experimental

Tendo-se como objetivo a pesquisa de contaminantes, a extração e limpeza das amostras foram elaboradas por meio do método de QuEChERS (Agilent *Product*, QuEChERS *Extract Tubes*, *EN Method*) e uma extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (*Dispersive SPE 2mL*, *Fatty Samples*, AOAC), onde se avaliou a eficiência da extração através do cálculo das recuperações e se estudou o efeito de matriz.

3.4.1 Extração de contaminantes pelo método QuEChERS e testes de otimização

A eficiência da metodologia QuEChERS é influenciada por diversos parâmetros de extração, como o solvente de extração, os sais de QuEChERS a utilizar, a quantidade de carbono a utilizar na fase de limpeza, a quantidade de água a utilizar na hidratação das plantas, o tempo de hidratação e o tipo de homogeneização da amostra: mecânica (ultrassons) ou manual.

Na Tabela 3.6 estão descritos os procedimentos de extração e os testes de otimização desenvolvidos ao longo do projeto, bem como os parâmetros otimizados, como a quantidade de carbono, o tipo de homogeneização, a hidratação da planta (quantidade de água a adicionar antes da etapa extrativa) e o tipo de sais de QuEChERS adicionados.

Tabela 3.6 – Testes desenvolvidos para a otimização do procedimento experimental.

Testes de otimização	Matriz	Parâmetros a otimizar	Procedimento
Teste 1	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)		<ul style="list-style-type: none"> • Pesou-se 1,5 g de amostra e adicionou-se 10 mL de acetonitrilo e 1 mL de água e homogeneizou-se a solução no ultrassom; • Adicionou-se os sais de QuEChERS <i>EN Method</i> e agitou-se vigorosamente por 1 min; • Centrifugou-se por 5 min, a 4500 rpm; • Retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou-se a um tubo de 2 mL, que continha a fase sólida dispersiva e 50,0 mg de carbono; • Agitou-se por 1 min e centrifugou-se a 4500 rpm, durante 5 min; • Recolheu-se 800 µL do extrato final para um vial e evaporou-se a solução, com auxílio do fluxo de nitrogénio; • Redissolveu-se com 400 µL de n-hexano e transferiu-se para um vial com <i>insert</i>, 140 µL e adicionou-se no mesmo 10 µL de padrão interno.
Teste 2	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Quantidade de carbono:</u> 30,0 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 1, diferindo na quantidade de carbono adicionada na etapa de limpeza.
Teste 3	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Homogeneização:</u> sem auxílio do ultrassom; • <u>Quantidade de carbono:</u> 25,0 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesou-se 1,5 g de amostra e adicionou-se 10 mL de acetonitrilo e 1 mL de água e homogeneizou-se a solução; • Adicionou-se os sais de QuEChERS <i>EN</i> e agitou-se vigorosamente por 1 min; • Centrifugou-se por 5 min, a 4500 rpm; • Retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou-se a um tubo de 2 mL, que continha a fase sólida dispersiva e 25,0 mg de carbono; • Agitou-se por 1 min e centrifugou-se a 4500 rpm, durante 5 min;

			<ul style="list-style-type: none"> • Recolheu-se 800 µL do extrato final para um vial e evaporou-se a solução, com auxílio do fluxo de nitrogénio; • Redissolveu-se com 400 µL de n-hexano e transferiu-se para um vial com <i>insert</i>, 140 µL e adicionou-se no mesmo 10 µL de padrão interno.
Teste 4	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Hidratação das plantas</u>: sem adição de água; 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 3, diferindo na etapa de hidratação das plantas (não se adiciona água).
Teste 5	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Hidratação das plantas</u>: adição de 1 mL água; • <u>Homogeneização</u>: sem auxílio do ultrassom; • <u>Quantidade de carbono</u>: 25,0 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionou-se 1 ml de água após a pesagem, agitou-se durante 2 min no vórtex e deixou-se a solução em repouso, durante 15 min, para hidratação; • Adicionou-se 10 mL de acetonitrilo, agitou-se, novamente, a solução, por 2 min, e adicionou-se os sais de QuEChERS EN; • Adicionou-se 25 mg de carbono na etapa de limpeza do extrato final; • O restante procedimento decorreu de igual modo ao do teste 3.
Teste 6	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Quantidade de carbono</u>: 13,0 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 5, diferindo na quantidade de carbono adicionada na etapa de limpeza.
Teste 7	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Hidratação das plantas</u>: adição de 2 mL água; • <u>Quantidade de carbono</u>: 15,0 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 5, diferindo na quantidade de água adicionada na hidratação das plantas e na quantidade de carbono adicionada na etapa de limpeza.
Teste 8	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Quantidade de carbono</u>: 7,5 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 7, diferindo na quantidade de carbono adicionada na etapa de limpeza.
Teste 9	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Hidratação das plantas</u>: adição de 4 mL água; • <u>Quantidade de carbono</u>: 7,5 mg. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento análogo ao do teste 7, diferindo na quantidade de água adicionada na hidratação das plantas e na quantidade de carbono adicionada na etapa de limpeza.
Teste 10	Planta (<i>Cytisus sp.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Homogeneização</u>: sem auxílio do ultrassom; • <u>Hidratação das plantas</u>: adição de 2 mL água; 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionou-se 2 ml de água após a pesagem, agitou-se durante 2 min no vórtex e deixou-se a solução em repouso, durante 15 min, para hidratação;

		<ul style="list-style-type: none"> • <u>Quantidade de carbono:</u> 15,0 mg • <u>Sais de QuEChERS:</u> método AOAC. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionou-se 10 mL de acetonitrilo, agitou-se, novamente, a solução, por 2 min, e adicionou-se os sais de QuEChERS AOAC; • Adicionou-se 15,0 mg de carbono na etapa de limpeza do extrato final; • O restante procedimento decorreu de igual modo.
--	--	--	--

3.4.2 Avaliação da eficiência de extração - Ensaio de recuperação

Como já mencionado, a otimização do procedimento experimental é fundamental para a viabilidade dos resultados, pelo que se tornou crucial a otimização de inúmeros parâmetros do processo. Neste âmbito, foram efetuados 10 ensaios de recuperação avaliando diferentes metodologias, de modo a chegar ao procedimento adequado e eficiente que permitia analisar o maior número de contaminantes em simultâneo.

No decorrer dos ensaios de recuperação, definiu-se duas metodologias em relação à contaminação da matriz que foram comparadas, com o objetivo de avaliar a eficiência do procedimento analítico. As amostras foram contaminadas com a mistura de contaminantes das diversas famílias, em diferentes fases do procedimento, nomeadamente antes do processo de extração (*pre-spiking*) e após o mesmo (*post-spiking*).

Em relação à contaminação *pre-spiking*, contaminaram-se as matrizes vegetais antes do processo de extração, que se encontravam previamente pesadas num tubo de 50 mL, com 830 µL de solução mãe de padrão misto de contaminantes, com concentração de 150 µg/L em todos os pesticidas orgânicos persistentes (POPs) e PYR (nível de contaminação final de 25,0 µg/L) e com 800 µL de solução mãe de padrão misto, com concentração de 150 µg/L em todos os OPE e OPP (nível de contaminação final de 20,0 µg/L). De seguida, adicionou-se 10 mL de acetonitrilo e 2 mL de água, agitando-se a amostra. O restante procedimento decorreu segundo a metodologia QuEChERS descrito na Tabela 3.6.

Relativamente ao ensaio *post-spiking*, após o processo de extração e limpeza da amostra, antes da injeção no sistema cromatográfico, adicionou-se ao *insert* a solução

padrão mista de contaminantes e o extrato final obtido. Para os contaminantes em estudo, adicionou-se 25 µL de cada solução mãe de padrão misto, de concentração 150 µg/L (nível de contaminação final de 25,0 µg/L) e 100 µL do extrato final obtido, perfazendo o volume de 150 µL no *insert*. De seguida, o vial com *insert* foi analisado nos sistemas GC-ECD e GC-FPD.

3.4.3 Procedimento final adotado

Após os diversos testes de otimização, com o objetivo de aferir o melhor método de extração e limpeza, estabeleceu-se o procedimento abaixo descrito.

Procedimento:

1. Pesar cerca de 1,5 g de amostra triturada e colocar num tubo de 50 mL;
2. Adicionar 2 mL de água, agitar no vórtex e deixar repousar por 15 min, para hidratação das plantas;
3. Após hidratação, adicionar 10 mL de acetonitrilo;
4. Adicionar os sais de QuEChERS AOAC no tubo de 50 mL;
5. Agitar vigorosamente o tubo e agitar no vórtex, durante 2 min;
6. Colocar o tubo na centrífuga a 4500 rpm, durante 5 min;
7. De modo a limpar o extrato obtido, transferir o sobrenadante para um tubo de 2 mL, que contém a fase sólida dispersiva (d-SPE), composta por 50,0 mg de PSA, 50,0 mg de C18EC, 150,0 mg de sulfato de magnésio e 15,0 mg de carbono;
8. Agitar o tubo vigorosamente e levar ao vórtex, durante 2 min;
9. Colocar o tubo na centrífuga a 4500 rpm, durante 5 min;
10. Retirar cerca de 1 mL do sobrenadante do extrato final para um vial e secar, no evaporador com fluxo de nitrogénio;
11. Redissolver o conteúdo no volume correspondente de n-hexano;
12. Adicionar 10 µL de padrão interno (trifenilfosfato (TPP) para o sistema cromatográfico GC-FPD, e diclorobenzofenona para o sistema cromatográfico GC-ECD) num vial com *insert* e adicionar 140 µL do extrato final no mesmo;
13. Analisar o extrato por cromatografia gasosa.

A Figura 3.4 esquematiza o procedimento adotado para a pesquisa de diversos contaminantes em amostras de plantas.

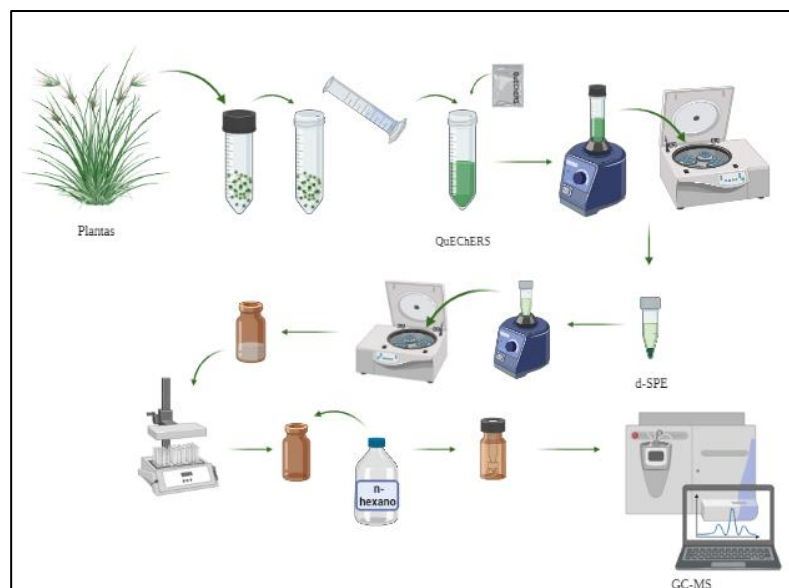


Figura 3.4 – Esquematização do procedimento adotado para a pesquisa de contaminantes.

3.4.4 Validação do método analítico

A validação do método experimental é um processo crucial para a sua implementação, que permite identificar se o método é confiável e robusto e se conduz a resultados válidos. O desempenho da metodologia depende do estabelecimento da metodologia de extração, das condições cromatográficas e da realização de estudos preliminares caracterizadores do método, como a seletividade, linearidade e sensibilidade.

No decorrer do estudo, verificou-se a linearidade da resposta dos sistemas cromatográficos GC-ECD e GC-FPD, relação entre concentração do analito e a área do pico correspondente, para todos os contaminantes, numa gama de concentrações de 0,996 a 12,450 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A área do pico obtida pela injeção direta da solução padrão com determinada concentração em contaminantes, em função da concentração de analito pesquisado permitiu construir as curvas de calibração. A Tabela 3.7 apresenta os volumes de concentração padrão de contaminantes a adicionar aos vias.

Tabela 3.7 – Composição de cada solução padrão utilizada na construção das curvas de calibração.

Padrão	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Concentração final (µg/L)	10	15	25	50	75	100	125
Volume de contaminante (µL)	10	15	25	50	75	100	125

No decorrer do trabalho experimental utilizou-se sempre a média de três injeções para quantificar o contaminante. Os valores de recuperação (RE), expressos em percentagem, foram calculados através da seguinte expressão:

$$RE (\%) = \frac{\hat{Área}_{pre}}{\hat{Área}_{post}} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que:

$\hat{Área}_{pre}$ – Área do pico do analito obtido pelo extrato de amostra com analitos (*pre-spiking*);

$\hat{Área}_{post}$ – Área do pico do analito obtido pelo extrato de *post-spiking*.

De modo a compreender a influência da matriz no sinal obtido, calculou-se o efeito matriz (ME), dado pela equação 3.2 (Cruz Fernandes et al., 2020).

$$ME = \frac{\hat{Área}_{post}}{\hat{Área}_{padrão}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde:

$\hat{Área}_{padrão}$ – Área do pico do analito obtido para a solução padrão de contaminantes.

Através das curvas de calibração traçadas para cada composto foi possível calcular os limiares analíticos do método cromatográfico, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O limite de deteção indica a concentração mínima que permite identificar o analito com uma certeza estatística razoável, distinto de ruído. Já o limite de quantificação é dado pela concentração mínima de analito a partir da qual é possível a sua quantificação, com uma determinada exatidão e precisão (RELACRE, 2000). Estes limiares foram calculados a partir das seguintes expressões (Miller & Miller, 2010):

$$LOD (\mu g/L) = 3 \times \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$LOQ (\mu g/L) = 10 \times \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 3.4}$$

Em que:

$S_{y/x}$ – Desvio padrão da regressão linear ($\mu g/L$);

b – Declive da reta de regressão linear.

O desvio padrão da regressão linear é dado pela seguinte equação:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n_i - 2}} \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde:

y_i – Sinal obtido para um determinado nível de concentração;

\bar{y} – Valor correspondente estimado pela regressão linear;

n_i – Número de pontos utilizados na regressão linear

Capítulo 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo pretende-se apresentar os resultados do desenvolvimento de uma metodologia para a deteção e quantificação de resíduos de contaminantes em matrizes vegetais, utilizando a metodologia QuEChERS e as técnicas cromatográficas GC-ECD e GC-FPD. Os compostos estudados encontram-se supracitados no capítulo anterior.

Os resultados obtidos serão demonstrados de acordo com as metas definidas no início do projeto. Como já mencionado anteriormente, o principal objetivo do trabalho centra-se na deteção do maior número de contaminantes em simultâneo, numa matriz vegetal proveniente do PNM. Neste sentido, iniciou-se o projeto com a injeção de um padrão misto de todos os compostos nos sistemas cromatográficos GC-ECD e GC-FPD. Posteriormente, procurou-se otimizar o procedimento experimental a adotar (testes de otimização), validar o mesmo e aplicá-lo em todas as amostras obtidas, de modo a alcançar resultados fidedignos.

4.1 Identificação dos contaminantes por cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD)

Através de análise por GC-ECD, pesquisou-se inúmeros resíduos de contaminantes numa amostra, resultando o cromatograma apresentado na Figura 4.1.

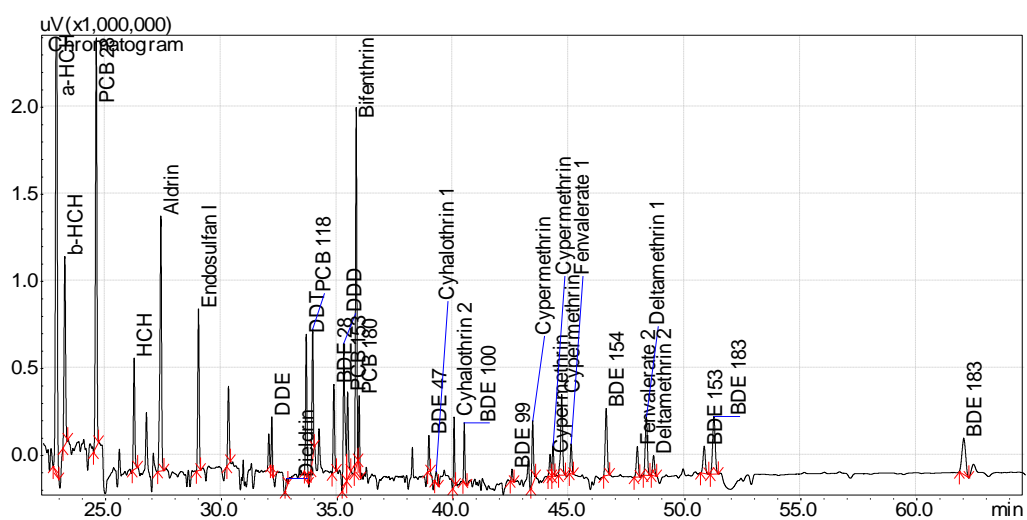


Figura 4.1 –Cromatograma obtido na pesquisa de 19 POPs (9 OCP, 6 BDE e 4 PCB) e 5 PYRs.

A Tabela 4.1 regista os tempos de retenção de cada contaminante estudado.

Tabela 4.1 – Lista de contaminantes detetados no cromatograma e respetivos tempos de retenção, em minutos.

Contaminantes	Tempo de retenção (min)	
Pesticidas	α -HCH	22.885
	ζ -HCH	26.236
	β -HCH	23.246
	Aldrina	27.389
	α -Endosulfão	29.011
	p,p'- DDE	32.177
	Dieldrina	32.822
	p,p'- DDT	33.661
	o,p'- DDD	35.284
	Bifentrina	35.817
	Cialotrina 1 (Isómero)	39.266
	Cialotrina 2 (Isómero)	40.039
	Cipermetrina (Isómero)	43.430
	Cipermetrina (Isómero)	44.181
	Cipermetrina (Isómero)	44.306
	Cipermetrina (Isómero)	44.681
	Fenvalerato 1 (Isómero)	45.087
	Fenvalerato 2 (Isómero)	47.943
	Deltametrina 1 (Isómero)	48.333
Deltametrina 2 (Isómero)	48.648	
BDE	BDE 28	34.852
	BDE 47	38.951
	BDE 100	40.479
	BDE 153	50.829
	BDE 154	46.601
	BDE 183	51.247
	BDE 183	62.024
PCB	PCB 28	24.601
	PCB 101	40.479
	PCB 118	33.937
	PCB 180	35.943

4.2 Identificação dos contaminantes por cromatografia gasosa com detetor de chama fotométrica (GC-FPD)

Através de análise por GC-FPD, pesquisou-se inúmeros resíduos de contaminantes numa amostra, resultando o cromatograma apresentado na Figura 4.2.

com a matriz e polaridade compatível com a maioria dos compostos, quando comparado com outros solventes (Huang et al., 2019).

Posteriormente à adição do solvente de extração, há diversos fatores que influenciam a performance do método de preparação de amostra, tais como o tipo de homogeneização, o método de extração e o de limpeza da amostra.

As plantas apresentam uma matriz bastante complexa, constituída por uma grande quantidade de compostos, como a clorofila (pigmento), polifenóis, ácidos gordos e ácidos orgânicos (Dawra et al., 2022; UniversityAgro, 2022), que devem ser extraídos e retirados do extrato, uma vez que afetam a separação cromatográfica. De modo a minimizar este problema, selecionou-se uma etapa de limpeza, utilizando diversos adsorventes, antes da injeção no sistema cromatográfico. Nesta etapa aplicou-se o método de extração em fase sólida dispersiva, utilizando um tubo que continha uma mistura de adsorventes (PSA (50,0 mg), C18 EC (50,0 mg), sulfato de magnésio (150,0 mg) e carbono (7,5-50 mg)). O PSA permite remover os ácidos gordos, açúcares e outros componentes, que apresentam tendência para a formação de pontes de hidrogénio. O adsorvente C18 proporciona a remoção de lípidos e outros interferentes não polares. O sulfato de magnésio tem como objetivo absorver a água presente no extrato, promovendo a concentração dos compostos na fase orgânica (Cajka et al., 2012; Huang et al., 2019). Devido à presença da clorofila, as soluções extraídas apresentam coloração verde, pelo que se optou por adicionar uma quantidade variável de carbono à fase sólida dispersiva, que pretende adsorver a clorofila presente na amostra e diminuir desta forma a coloração indesejada.

Após a evaporação do extrato com um fluxo reduzido de nitrogénio, o solvente utilizado para redissolver o resíduo foi o n-hexano, uma vez que é o solvente mais apropriado para as análises em cromatografia gasosa e que apresenta afinidade com os compostos estudados, proporcionando melhor resolução cromatográfica nos contaminantes analisados.

O desenvolvimento e otimização do procedimento foi conseguido pela elaboração de 10 testes, com diferentes condições experimentais, como por exemplo a quantidade de carbono, a utilização ou não de agitação ultrassónica e o uso de diferentes sais de QuEChERS, mencionadas no capítulo anterior (secção 3.4.1). Na otimização destas condições, efetuou-se a contaminação da amostra de planta, antes (*pre-spiking*) e após

(*post-spiking*) a etapa de extração, de acordo com a secção 3.4.2, com a finalidade de comparar os resultados e avaliar a eficiência da extração. O objetivo foi extrair o maior número de contaminantes com taxas de recuperação aceitáveis (entre os 70 e os 120%), variação definida pelas normas europeias (European Commission, 2021). De referir que, inicialmente, apenas se otimizou o processo para os contaminantes estudados no sistema GC-ECD (POPs e PYRs).

4.3.1 Otimização da metodologia de extração - Teste 1

O primeiro teste foi o ponto de partida para a otimização do procedimento experimental. Este baseou-se no método de extração QuEChERS EN, com hidratação de plantas (adição de 1 mL de água), homogeneização mecânica (ultrassom) e adição de 50,0 mg de carbono na etapa de limpeza.

Após obtenção do extrato final obtido da solução *pre-spiking*, elaborou-se o extrato *post-spiking* e injetaram-se ambos os extratos no sistema cromatográfico. A comparação dos sinais obtidos para ambos os extratos se encontram na Figura 4.3.

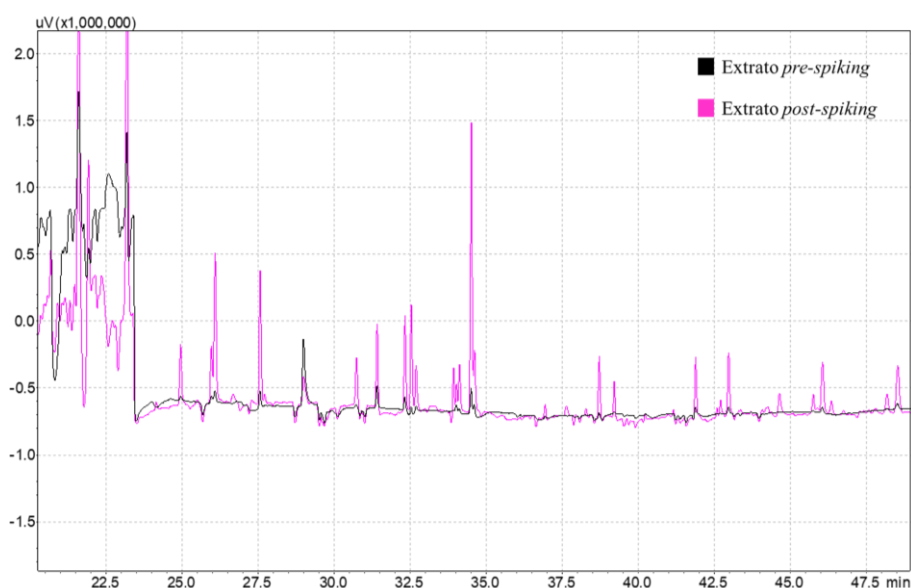


Figura 4.3 – Comparação entre cromatograma obtido *pre-spiking* (cor preta) e o cromatograma obtido *post-spiking* (cor rosa), teste 1.

Após injeção no sistema cromatográfico e leitura dos cromatogramas, verificou-se que não se observaram os picos dos compostos estudados (recuperações próximas de zero na maioria dos compostos) para o extrato *pre-spiking*, podendo ser justificado pela

quantidade de carbono utilizada na limpeza (d-SPE) que pode ser responsável pela absorção dos contaminantes por este adsorvente. Alguns autores reportam que compostos químicos planares têm uma maior afinidade para se adsorverem no carbono (Tankiewicz & Berg, 2022), conduzindo a taxas de recuperação mais baixas. Assim, adaptou-se o procedimento, alterando a quantidade de carbono.

4.3.2 Otimização da metodologia de extração - Teste 2

No teste de otimização 2 foi testada influência da quantidade de carbono. Neste teste foi reduzida a quantidade de carbono para cerca de **30,0 mg de carbono**, obtendo-se um extrato com alguma coloração esverdeada. Essa coloração esverdeada devida à presença de clorofila no extrato, prejudica o desempenho cromatográfico interferindo na análise cromatográfica (Pszczolińska et al., 2022). A Figura 4.4 apresenta o extrato final obtido para as soluções de *post-spiking* e *pre-spiking*, no decorrer do teste 2.

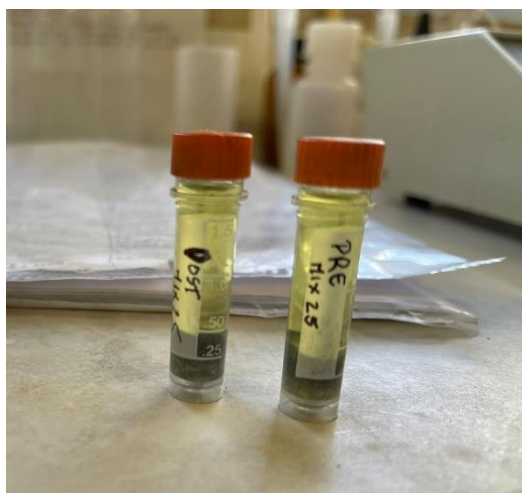


Figura 4.4 – Extrato final obtido para a solução *post-spiking* (lado esquerdo) e *pre-spiking* (lado direito), do teste 2.

Com base na figura anterior, é possível observar a coloração verde no extrato, que é incrementada com a utilização do equipamento ultrassons para homogeneização do extrato, uma vez que promovia a elevada extração de pigmentos (como a clorofila), prejudicando a sua remoção no processo de limpeza. Como já referido, a presença de pigmentos afeta a análise no sistema cromatográfico. No entanto, a redução da quantidade de carbono, para limpeza do extrato, não era uma estratégia, pois o carbono continuou a adsorver os contaminantes estudados.

Após análise das soluções obtidas por GC, constatou-se que, para a solução *pre-spiking*, as percentagens de recuperação eram bastante baixas, verificando-se a perda total dos compostos estudados, e o cromatograma não se apresentava limpo, registrando bastantes interferentes, devido aos compostos extraídos da matriz em estudo. Na Figura 4.5 observa-se os cromatogramas obtidos para o extrato *pre* e *post-spiking*.

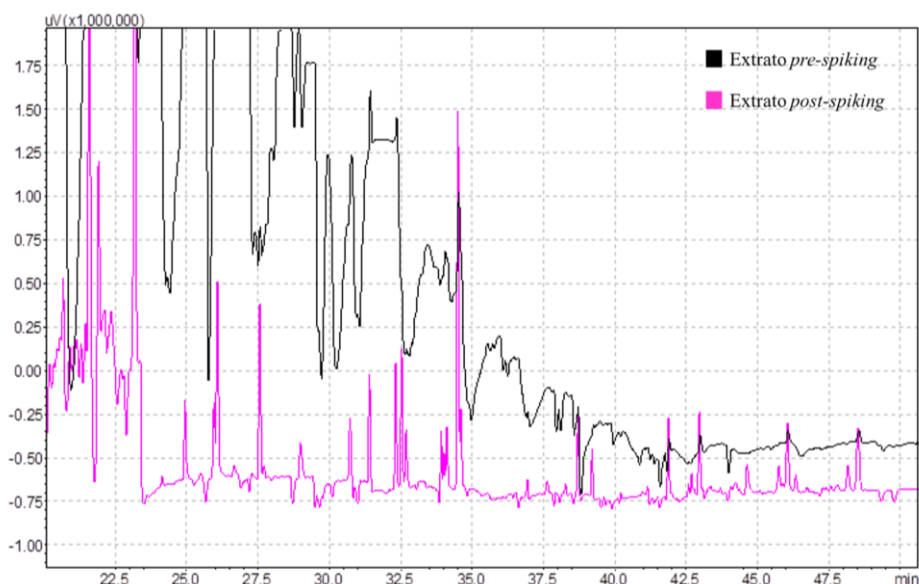


Figura 4.5 - Comparação entre cromatograma obtido *pre-spiking* (cor preta) e o cromatograma obtido *post-spiking* (cor rosa), teste 2.

Neste sentido, procurou-se uma nova adaptação ao protocolo inicial e, de acordo com pesquisas bibliográficas, optou-se pela exclusão da etapa de homogeneização pela técnica de ultrassom nos restantes testes, uma vez que promovia a extração de pigmentos como a clorofila e a absorção excessiva dos contaminantes nos adsorventes usados no passo de limpeza.

4.3.3 Otimização da metodologia de extração - Teste 3 e 4

A realização dos testes 3 e 4 teve como intuito colmatar as lacunas dos testes anteriores. O procedimento do teste 3 decorreu **sem homogeneização mecânica** (ultrassons) e com adição de **25,0 mg de carbono**. Após observação do extrato final, este encontra-se mais limpo e sem coloração (Figura 4.6). No entanto, após análise por GC, comparando os cromatogramas obtidos para os ensaios de *pre-spiking* e *post-spiking*, as taxas de recuperação continuaram bastante baixas.

De modo a aumentar as recuperações obtidas, manteve-se a inutilização da homogeneização mecânica porque se verificou uma diminuição da coloração verde proveniente da clorofila e manteve-se a adição de 25,0 mg de carbono, do teste anterior. Contudo, **retirou-se a etapa de adição de água**, no momento de adição do solvente de extração. Ainda assim, as taxas de recuperação dos compostos encontravam-se abaixo do pretendido, como no teste anterior.



Figura 4.6- Extrato final obtido para a solução *post-spiking* (lado esquerdo) e *pre-spiking* (lado direito), do teste 3.

4.3.4 Otimização da metodologia de extração - Teste 5 e 6

De modo a contornar os resultados desfavoráveis, procedeu-se à alteração do procedimento inicial, e de forma a promover a hidratação das plantas antes do passo de contaminação inicial, adicionou-se 1 ml de água após a pesagem da amostra. De seguida, agitou-se durante 2 min no vórtex e deixou-se a solução em repouso, durante 15 min, para hidratação. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de acetonitrilo, agitou-se, novamente, a solução, por 2 min, e adicionou-se os sais de QuEChERS EN. Na etapa de limpeza foi usado o *clean-up* habitual com a adição de 25,0 mg de carbono. O restante procedimento decorreu de igual modo.

Após análise no sistema cromatográfico, verificou-se um aumento das taxas de recuperação (30 %), face ao extrato obtido no teste anterior, o que indicou que a hidratação da matriz e a ausência de homogeneização com auxílio de ultrassons eram parâmetros influenciadores na otimização do processo de extração. Neste seguimento, todos os ensaios efetuados a partir deste teste, não contemplavam a homogeneização mecânica e usaram diferentes quantidades de água para hidratação da matriz vegetal.

No entanto, as taxas de recuperação ainda não se encontram favoráveis para se replicar nas restantes amostras, pelo que se pretendeu observar o efeito da quantidade de carbono no teste anterior. Deste modo, realizou-se o teste 6, onde se elaborou um *clean-up* a partir do extrato anterior, com apenas 13,0 mg de carbono. A Figura 4.7 demonstra as diferenças entre o extrato final obtido para o teste 5 e 6.

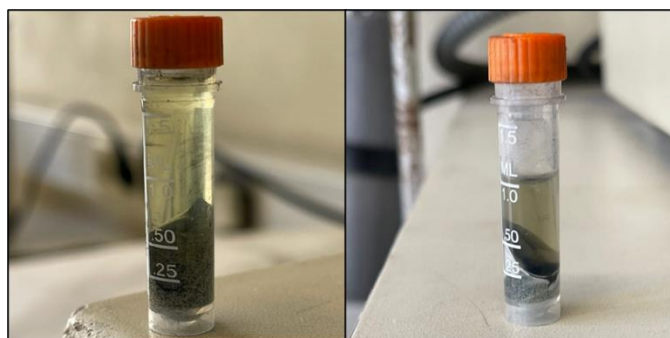


Figura 4.7 - Extrato final obtido para o extrato final do teste 5 (lado esquerdo) e do teste 6 (lado direito).

Observando a figura anterior, verifica-se que ambos os extratos se encontram praticamente incolores, sendo os pigmentos adsorvidos, também, pela baixa quantidade de carbono.

A Figura 4.8 compara os sinais obtidos para o teste 5 e para o *clean-up* (teste 6).

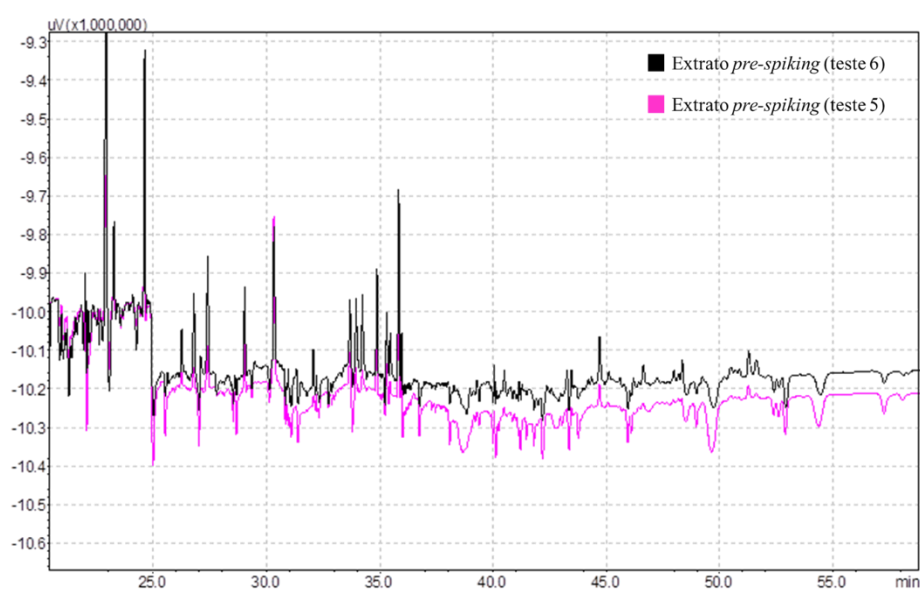


Figura 4.8 - Comparação entre cromatograma obtido pre-spiking no teste 6 (cor preta) e o cromatograma obtido pre-spiking (cor rosa), teste 5.

Comparando os sinais obtidos para os testes 5 e 6, verificou-se um aumento do sinal, ou seja, das áreas dos picos correspondentes aos compostos no teste 6. Pela análise qualitativa do cromatograma obtido, verificou-se que o carbono tinha influência na adsorção de contaminantes, pelo que a diminuição da sua quantidade utilizada favoreceu os resultados, em relação aos testes anteriores. No entanto, as taxas de recuperação ainda se encontravam bastante baixas, numa gama entre 14,5 e 111,3%, sendo que a maioria (91%) se encontrava abaixo dos 70 % (valor desejável).

4.3.5 Otimização da metodologia de extração - Teste 7 e 8

O teste 7 surge da necessidade de obter uma melhor resposta, sem perdas tão significativas de contaminantes. Assim, analogamente ao procedimento adotado para o teste 5, adicionou-se de **2 mL de água** à amostra, sofrendo hidratação por 15 min, homogeneizou-se no vórtex e, posteriormente, adicionou-se 10 mL de acetonitrilo. Na fase de limpeza adicionou-se **15,0 mg de carbono**.

Após injeção dos extratos no sistema cromatográfico, obtiveram-se os cromatogramas representados na Figura 4.9.



Figura 4.9 - Comparação entre cromatograma obtido *pre-spiking* (cor preta) e o cromatograma obtido *post-spiking* (cor rosa), teste 7.

Com base no cromatograma obtido (*pre-spiking*) e comparando com um cromatograma padrão (*post-spiking*), verificou-se um aumento significativo nas taxas de recuperação, para 98 % (em média).

No entanto, verificou-se que os picos dos compostos mais apolares apresentavam taxas de recuperação bastante inferiores (Figura 4.10).

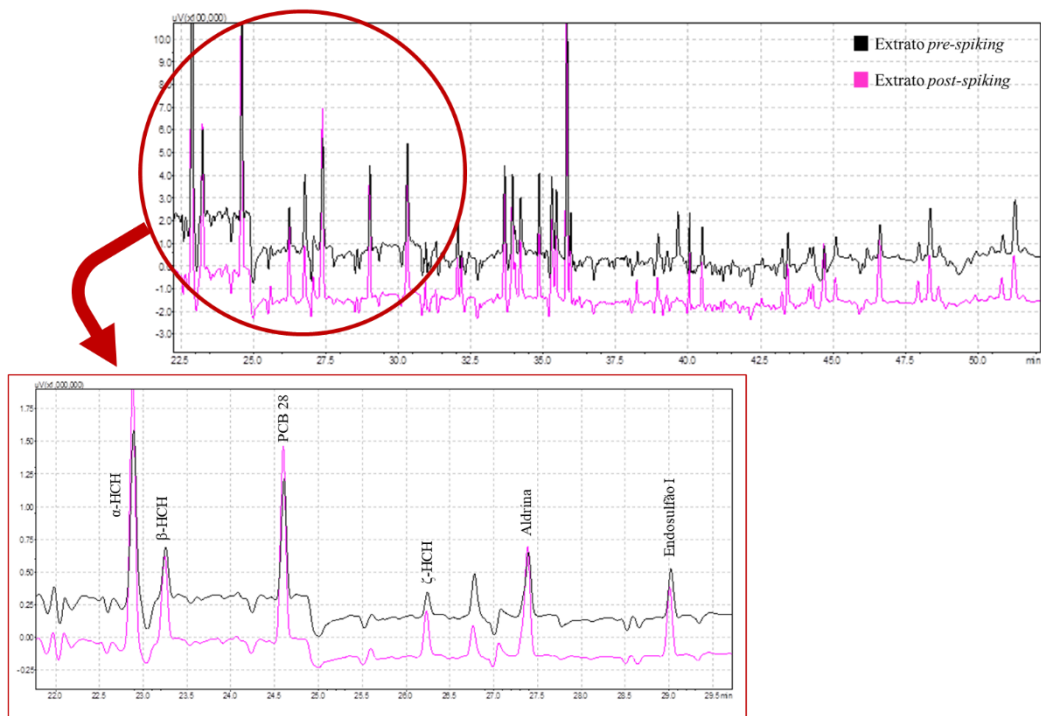


Figura 4.10 – Sinal obtido para os contaminantes com menores taxas de recuperação.

As recuperações médias obtidas para os compostos indicados na figura anterior variaram de 54,7% (ζ -HCH) a 73,2% (α -HCH), sendo que apenas o pesticida α -HCH apresenta um valor dentro da gama aceitável de recuperações, [70-120] %. Uma possível justificação para estas perdas de analito pode estar relacionada com a quantidade de carbono adicionada, sendo que são compostos com uma grande afinidade, pelo que ficam retidos no adsorvente.

Com base nos resultados obtidos para o teste 7, decidiu-se proceder à execução de um *clean-up* a partir do extrato anterior, com apenas 7,5 mg de carbono. A Figura 4.11 demonstra as diferenças entre o extrato final obtido para o teste 7 e 8.

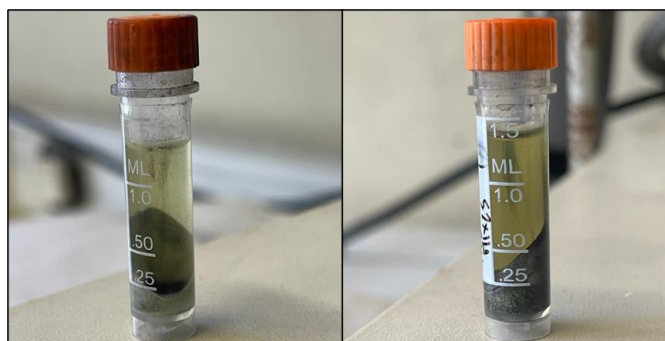


Figura 4.11 - Extrato final obtido para o extrato final do teste 7 (lado esquerdo) e do teste 8 (lado direito).

Porém, após execução da análise, aferiu-se taxas de recuperação baixas para os mesmos compostos apolares, pelo que a quantidade de carbono não tinha influência nesta fase do processo. Além disso, as recuperações dos outros compostos também diminuíram, uma vez que o extrato se encontrava menos limpo e com mais interferências, como se pode observar pelos cromatogramas apresentados na Figura 4.12.



Figura 4.12 - Comparação entre cromatograma obtido *pre-spiking* para o teste 7 (cor preta) e o cromatograma obtido *pre-spiking* (cor rosa), teste 8.

4.3.6 Otimização da metodologia de extração - Teste 9

O teste 9 surge de uma nova tentativa de aproximar as taxas de recuperação ao ideal, [70-120] %, para todos os compostos. Assim, adotou-se o procedimento do teste 7, contudo, adicionando-se **4 mL de água** ao invés de 2 mL, na etapa de hidratação da planta. Na fase de limpeza adicionou-se 7,5 mg de carbono.

Após injeção no sistema cromatográfico e análise do cromatograma obtido, verificou-se uma diminuição acentuada das recuperações de cada composto, pelo que esta modificação do procedimento regrediu a obtenção de melhores resultados. A Figura 4.13 retrata a comparação entre 3 cromatogramas: o cromatograma onde as taxas de recuperação variaram entre o limite aceitável (teste 7), o cromatograma padrão e o cromatograma do teste 9.

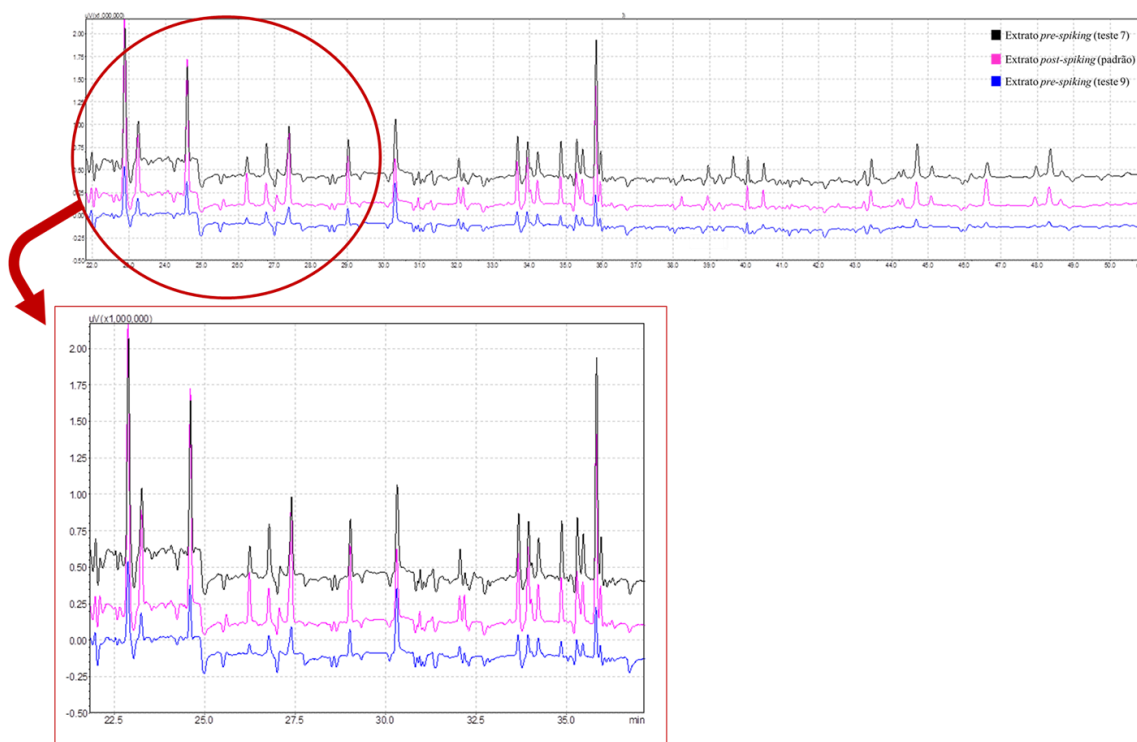


Figura 4.13 - Comparação entre cromatograma obtido *pre-spiking* para o teste 7 (cor preta), o cromatograma padrão (cor rosa) e cromatograma obtido *pre-spiking* para o teste 9 (cor azul).

Com base nos resultados, decidiu-se adotar o procedimento do teste 7, onde se alcançou melhores resultados para todos os contaminantes em estudo.

4.3.7 Otimização da metodologia de extração - Teste 10

A realização do teste 10, após definição do procedimento, teve como objetivo compreender a influência da utilização de outros sais de QuEChERS, nomeadamente a modificação para o método AOAC. Elaborou-se uma extração em branco, de modo a observar o efeito de matriz.

No entanto, verificou-se que esta modificação não registava alterações nos resultados obtidos, e a influência da matriz era idêntica. Assim sendo, adotou-se este método para a etapa de extração.

Em resumo, a etapa de desenvolvimento e otimização do procedimento experimental, para a pesquisa e deteção de contaminantes em matrizes vegetais, teve como parâmetros influenciadores o tipo de homogeneização (com ou sem técnica de ultrassons), a hidratação da planta antes do processo extrativo e a quantidade de carbono a aplicar na etapa de limpeza. Estes parâmetros revelaram-se determinantes na obtenção

de taxas de recuperação dentro do limite aceitável, pelo que o melhor teste desenvolvido decorreu sem auxílio de ultrassons, com hidratação da planta (2 mL de água adicionada à planta, deixando hidratar por 15 min) e com a adição de 15,0 mg de carbono na etapa de limpeza, onde se obteve uma gama de recuperações médias de [54,7-142,0] %.

Como trabalho futuro, seria fundamental continuar as experiências, modificando outros parâmetros da etapa extrativa, eliminando interferentes da matriz, de modo a detetar o maior número de contaminantes com recuperações dentro do desejável.

4.4 Método de validação

De modo a validar o método e a obter uma quantificação precisa dos resíduos de contaminantes, elaboraram-se curvas de calibração na matriz, para compensar os efeitos da mesma. Após extração e limpeza da amostra HP_8.3, adicionou-se a mistura padrão de contaminantes em concentrações crescentes de 0,996, 1,494, 2,490, 4,980, 7,470, 9,960 e 12,450 µg/kg.

A linearidade das curvas de calibração na gama de concentrações desejada foi aceitável, uma vez que o coeficiente de determinação (R^2) foi superior a 0,99. Os Limites de Detecção (LOD) e os Limites de Quantificação (LOQ) variaram de 0,709 a 1,734 µg/kg e 2,365 a 5,779 µg/kg, respetivamente. Em relação ao Desvio Padrão Relativo (RSD) é possível afirmar que os valores se encontram dentro do nível normalmente reconhecido, ou seja, inferior a 20 %, à exceção do isómero de éster organofosforado, TToP (1). A Tabela 4.3 demonstra os dados estatísticos das curvas de calibração obtidas para todos os contaminantes estudados, bem como as recuperações e efeitos de matriz obtidos.

Tabela 4.3 - Dados estatísticos das curvas de calibração para todos os contaminantes estudados, bem como as recuperações (RE) e os efeitos de matriz (ME) associados a cada composto (n=3).

Contaminantes		Equação da Regressão Linear	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSD (%)	RE (%)	ME
Pesticidas	α-HCH	$A = 3 \times 10^6[\alpha - \text{HCH}] + 264587$	0,9939	1,279	4,263	3,6	73,2	0,8
	β-HCH	$A = 883618[\beta - \text{HCH}] - 160353$	0,9938	1,289	4,296	8,4	60,5	0,8
	ζ-HCH	$A = 540165[\zeta - \text{HCH}] + 217804$	0,9909	1,535	5,116	5,0	54,7	0,4
	Aldrina	$A = 1 \times 10^6[\text{Aldrina}] + 676900$	0,9903	1,613	5,377	4,9	62,3	0,4
	α-Endossulfão	$A = 640085 [\text{End. I}] + 171773$	0,9931	1,365	4,550	5,2	72,6	0,5
	p,p'-DDE	$A = 216265 [\text{DDE}] + 203369$	0,9981	0,709	2,365	2,7	37,3	0,2
	Dieldrina	$A = 31847 [\text{Dieldrina}] - 10146$	0,9951	1,118	3,727	7,9	145,8	3,9
	o,p'-DDT	$A = 548586 [\text{DDT}] + 411893$	0,9906	1,591	5,302	3,7	96,3	0,5
	p,p'-DDD	$A = 898608 [\text{DDD}] + 405607$	0,9983	0,806	2,688	4,6	80,8	0,4
	Bifentrina	$A = 2 \times 10^6 [\text{Bifentrina}] + 1 \times 10^6$	0,9965	1,176	3,920	3,9	101,5	0,5
	Cialotrina 1	$A = 37925 [\text{Cia. 1}] + 426188$	0,9904	1,734	5,779	3,7	77,1	0,6
	Cialotrina 2	$A = 445028[\text{Cia. 2}] + 486616$	0,9937	1,546	5,154	4,4	120,4	0,2
	Cipermetrina (1)	$A = 400452 [\text{Ciper. 1}] + 159329$	0,9929	1,492	4,974	3,7	111,2	0,4
	Cipermetrina (2)	$A = 117000 [\text{Ciper. 2}] + 28092$	0,9937	1,295	4,317	4,8	142,1	0,7
	Cipermetrina (3)	$A = 181459 [\text{Ciper. 3}] + 43251$	0,9955	1,103	3,677	4,0	142,2	0,6
	Cipermetrina (4)	$A = 466177 [\text{Ciper. 4}] + 246393$	0,9950	1,377	4,589	4,4	91,2	0,5
	Fenvalerato 1	$A = 173957[\text{Fenvalerato 1}] + 47688$	0,9967	0,933	3,109	6,1	131,7	0,5
	Fenvalerato 2	$A = 241472 [\text{Fenvalerato 2}] + 131981$	0,9960	1,035	3,448	4,9	99,8	0,6
Deltametrina 1	$A = 571303[\text{Delta. 1}] + 250334$	0,9920	1,587	5,290	4,4	130,7	0,5	
Deltametrina 2	$A = 166235 [\text{Delta. 2}] + 133378$	0,9933	1,343	4,478	6,9	92,1	0,7	
BDE	BDE 28	$A = 400715 [\text{BDE 28}] + 210529$	0,9920	1,468	4,894	4,6	113,8	0,7

	BDE 47	$A = 126787 [BDE\ 47] + 64387$	0,9950	1,251	4,170	7,1	117,0	0,6
	BDE 99	$A = 52248[BDE\ 99] + 67310$	0,9962	1,226	4,086	3,6	115,5	0,5
	BDE 100	$A = 296942 [BDE\ 100] + 217063$	0,9946	1,201	4,004	4,6	114,6	0,5
	BDE 153	$A = 274516 [BDE\ 153] + 83152$	0,9967	0,934	3,113	5,6	93,6	0,7
	BDE 154	$A = 811322 [BDE\ 154] - 48186$	0,9915	1,637	5,457	6,1	57,3	0,7
	BDE 183 (1)	$A = 581382 [BDE\ 183.1] + 164924$	0,9984	0,781	2,604	4,5	139,1	0,6
	BDE 183 (2)	$A = 451891 [BDE\ 183.2] + 338991$	0,9961	1,219	4,064	4,7	112,6	0,6
PCB	PCB 28	$A = 2 \times 10^6 [PCB\ 28] + 247508$	0,9923	1,433	4,777	4,4	59,5	0,6
	PCB 118	$A = 479663 [PCB\ 118] + 526081$	0,9957	1,282	4,272	3,9	72,2	0,5
	PCB 153	$A = 413059 [PCB\ 153] + 338019$	0,9957	1,154	3,847	4,4	80,8	0,5
	PCB 180	$A = 325627 [PCB\ 180] + 227303$	0,9965	0,967	3,222	11,4	106,7	0,5
OPP	Dimetoato	$A = 195266 [Dimetoato] - 44993$	0,9995	0,426	1,421	7,4	39,2	0,7
	Cloropirifos-metilo	$A = 161542 [Cloro. Meti] - 106852$	0,9986	0,969	3,231	7,1	96,3	0,6
	Paratião - metilo	$A = 209794 [Para. Meti] - 125955$	0,9995	0,572	1,906	9,9	97,2	0,6
	Malatião	$A = 173506 [Malatião] + 35319$	0,9965	1,093	3,644	6,6	91,7	0,5
	Cloropirifos	$A = 164167 [Clorpirifos] - 33560$	0,9985	0,721	2,403	7,0	98,4	0,5
	Clorfenvinfos	$A = 66989 [Clorfenvinfos] + 2933,4$	0,9969	1,037	3,457	6,9	110,6	0,6
OPE	TiBP	$A = 52420 [TiBP] + 86576$	0,9933	1,453	4,844	8,7	113,5	0,4
	TnBP	$A = 97750 [TnBP] + 54823$	0,9962	0,911	3,037	11,2	118,0	0,6
	TCEP	$A = 65898 [TCEP] + 104,03$	0,9935	1,191	3,970	13,0	121,2	0,3
	TBEP	$A = 40782 [TBEP] + 17639$	0,9967	0,833	2,776	7,3	116,5	0,6
	TEHP	$A = 42870 [TEHP] + 2562,1$	0,9925	1,266	4,219	11,4	107,0	0,7
	TToP (1)	$A = 12555 [TToP. 1] - 8597,3$	0,9984	0,576	1,919	24,7	90,9	0,7
	TToP (2)	$A = 21610 [TToP. 2] - 1436,3$	0,9992	0,451	1,504	16,2	101,6	0,4
	TToP (3)	$A = 11464 [TToP. 3] - 7346,3$	0,9981	0,775	2,584	17,7	97,2	0,6

Tendo por base os testes de recuperação estimou-se a sensibilidade do método. A Tabela 4.3 regista as recuperações médias correspondentes a todos os contaminantes pesquisados, verificando-se que estas variam de 37,3% (DDE) a 145,8% (dieldrina).

Por observação da tabela anterior, é possível afirmar que os valores de recuperação para os pesticidas (OCP, PYR e OPP), variaram entre 37,3% e 145,8%, com valores de RSD entre 2,7% e 8,4%. De salientar que, apenas 11 pesticidas (55%), se encontram na faixa aceitável de recuperação ([70-120] %). Em relação aos retardantes de chama BDE, a gama de recuperações médias tomou valores entre 57,3% (BDE 154) e 139,1% (BDE 183 (1)), sendo que 6 (75 %), dos 8 pesquisados, se encontram na gama de recuperações aceitável. As recuperações obtidas para os PCBs encontram-se na gama [59,5-106,7] %, sendo o PCB 28 o único composto fora da gama aceitável de recuperações, tomando um valor de 59,5%. Relativamente aos pesticidas organofosforados, as recuperações médias variaram entre 39,2% e 110,6%. Finalmente, dos 8 compostos OPE estudados, 87,5 % apresentaram recuperações médias favoráveis, dentro de uma gama de valores de [90,9-118,0] %.

A título de conclusão é possível aferir que a família OPE verifica melhores taxas de recuperação, relativamente às restantes, uma vez que se obtiveram melhores resultados. Importa referir que a maioria dos compostos (69,6%) apresentaram valores de recuperação dentro da faixa aceitável de recuperações, [70-120] %.

São reconhecidas as inúmeras vantagens da utilização de métodos cromatográficos acoplados a detetores no que concerne à sensibilidade, seletividade e velocidade de análise. No entanto, é necessário ter em conta o efeito matriz, onde ocorre a coeluição cromatográfica entre interferente e contaminante, traduzindo-se em picos menos definidos, numa quantificação menos precisa, baixa detetabilidade e maior incerteza do método. De modo a contornar este efeito, é possível utilizar diversas técnicas cromatográficas ou melhorar a preparação de amostras, sendo exemplo a utilização de curvas de calibração padrão com correspondência de matriz, a diluição da amostra e a limpeza de amostra. A eliminação do efeito matriz é viável, porém é necessária uma otimização cuidadosa da etapa de preparação de amostra (Uclés et al., 2017; Zhang et al., 2017).

O ME é calculado pela razão entre o sinal de padrões com correspondência de matriz e o sinal de padrões em solvente. Observando a tabela anterior, verifica-se a existência de efeito matriz numa gama de valores de 0,2-3,9, sendo que o valor mais baixo corresponde aos compostos DDE e cialotrina 2 e o valor mais elevado ao composto dieldrina.

Analisando a Tabela 4.3, os valores de ME para os pesticidas, encontravam-se entre 0,2 (DDE e cialotrina 2) e 3,9 (dielldrina). Em relação aos compostos BDE e PCB, os valores do efeito matriz foram mais constantes, compreendidos entre 0,5 e 0,7. Os valores ME dos compostos fosforados (retardantes de chama fosforados (OPE) e pesticidas organofosforados (OPP)) estavam na gama de 0,3-0,7, entre os quais o composto TCEP apresenta o valor mais baixo e os compostos dimetoato, TEHP e TToP (1) o valor mais elevado. De salientar que todas as famílias de contaminantes apresentam resultados similares para o efeito matriz.

Relacionando os resultados obtidos para o efeito matriz e a gama de valores adequada, [0,8-1,2], é de salientar que apenas dois contaminantes (α -HCH e β -HCH) se localizam dentro destes valores, apresentando um valor de efeito matriz de 0,8. A limpeza de amostra, fase contemplada no processo extrativo, pode reduzir os efeitos de matriz, no entanto, não os eliminou permanentemente, existindo um número elevado de componentes co-eluídos que suprimem ou aprimoram o sinal ao analisar as amostras vegetais, afetando a quantificação de contaminantes negativamente.

4.5 Resíduos de contaminantes em amostras de plantas do PNM

Com o objetivo de monitorizar a presença de contaminantes no PNM e aplicar o método validado, foram estudadas 41 amostras de plantas, recolhidas no Parque em outubro de 2021, em 10 áreas distintas do mesmo. Vinte e nove das amostras testadas (71 %) continham, pelo menos, um contaminante acima do LOD.

Dos 24 pesticidas validados, detetou-se (acima do LOD) 6 compostos, durante a pesquisa. Em relação aos retardantes de chama bromados (BDE), verificou-se a presença de 2, dos 7 estudados. No que diz respeito aos compostos PCB, encontrou-se 2 dos 4 estudados, com valores superiores ao LOD. Dos compostos detetados acima do valor

limite de detecção, 3 pesticidas (α -endossulfão, DDE e fenvalerato 1), 2 BDEs (BDE 47 e BDE 183) e 2 PCBs (PCB 28 e PCB 153) apresentavam amostras com valores superiores aos limites de quantificação estimados ($>$ LOQ). Os compostos fosforados (OPE e OPP) não foram detetados em nenhuma amostra. A Tabela 4.4 regista os resultados obtidos para amostras com resíduos de contaminantes.

Tabela 4.4 – Constrações médias de contaminantes (µg/kg) em diferentes amostras de plantas (n=3).

Amostras	Concentração de Contaminantes (µg/kg)									
	β -HCH	α-Endosulfão	DDE	Cipermetrina	Fenvalerato 1	Fenvalerato 2	BDE 47	BDE 183 (I)	PCB 28	PCB 153
HP_1.1	-	< LOD	0,724 (< LOQ)	-	3,118 (> LOQ)	-	-	-	-	-
HP_2.1	< LOD	< LOD	-	-	11,802 (> LOQ)	-	-	-	-	-
HP_3.1	2,567 (< LOQ)	< LOD	1,288 (< LOQ)	-	2,780 (< LOQ)	-	-	-	3,114 (< LOQ)	-
HP_4.1	-	-	1,260 (< LOQ)	-	1,811 (< LOQ)	-	-	-	< LOD	-
HP_7.1	-	< LOD	1,929 (< LOQ)	3,896 (< LOQ)	-	1,571 (< LOQ)	-	< LOD	3,000 (< LOQ)	-
HP_9.1	2,378 (< LOQ)	< LOD	6,123 (> LOQ)	-	-	-	-	-	< LOD	-
HP_2.2	< LOD	< LOD	-	-	-	-	-	3,983 (> LOQ)	-	-
HP_5.2	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-	-	-	1,615 (< LOQ)	-
HP_10.2	< LOD	< LOD	0,781 (< LOQ)	-	-	-	-	< LOD	-	-
HP_1.4	< LOD	< LOD	1,304	-	-	-	-	-	-	-

			(< LOQ)							
HP_3.4	< LOD	< LOD	0,780 (< LOQ)	-	-	-	-	-	< LOD	-
HP_4.4	< LOD	< LOD	1,759 (< LOQ)	-	-	-	-	-	< LOD	-
HP_6.4	< LOD	< LOD	1,520 (< LOQ)	-	-	-	-	-	< LOD	-
HP_8.4	< LOD	-	2,265 (< LOQ)	-	-	-	-	-	< LOD	-
HP_8.6	-	< LOD	3,154 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_5.7	< LOD	< LOD	2,443 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_7.7	< LOD	< LOD	2,725 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_3.8	< LOD	5,349 (> LOQ)	2,884 (> LOQ)	-	-	-	-	-	6,770 (> LOQ)	-
HP_4.8	-	4,838 (> LOQ)	2,471 (> LOQ)	-	-	-	-	-	7,097 (> LOQ)	-
HP_5.8	-	4,717 (> LOQ)	1,800 (< LOQ)	-	-	-	-	-	1,526 (< LOQ)	-
HP_7.8	-	7,156 (> LOQ)	2,962 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_10.8	-	-	0,744 (< LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_1.9	-	< LOD	3,024 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_2.9	< LOD	< LOD	1,094 (< LOQ)	-	-	-	-	-	-	-

HP_3.9	< LOD	< LOD	1,134 (< LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_6.9	-	< LOD	1,375 (< LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_8.9	-	-	2,562 (> LOQ)	-	-	-	-	-	-	-
HP_1.10	-	-	-	-	-	-	5,619 (> LOQ)	-	< LOD	-
HP_4.10	-	-	-	-	-	-	7,397 (> LOQ)	-	< LOD	5,671 (> LOQ)

Legenda: Valor inferior ao LOD (< LOD); Valor superior ao LOD e inferior ao LOQ (< LOQ); Valor superior ao LOQ (> LOQ).

Entre os resíduos de contaminantes detetados nas amostras, o pesticida DDE apresenta maior frequência detetada (definida como a percentagem de amostras contaminada das 41 amostras analisadas), com um valor de 59 %. Segue-se o PCB 28 (15 %), o α -endossulfão e o fenvalerato (10 %), β -HCH e BDE 47 (5 %) e, por fim, cipermetrina, fenvalerato 2, BDE 183 e PCB 153 (2 %).

A Figura 4.14 sintetiza as frequências detetadas e respetiva gama de concentrações de cada contaminante encontrado nas amostras.

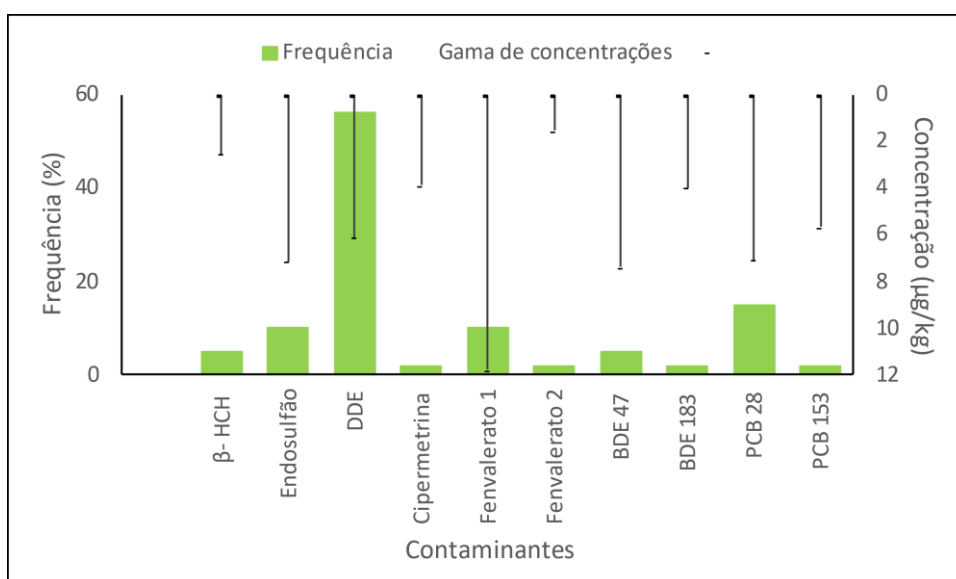


Figura 4.14 – Frequências de deteção, em %, e gama de concentrações, em $\mu\text{g}/\text{kg}$, dos contaminantes encontrados nas amostras.

Por observação da Figura 4.14, o composto DDE foi o mais frequentemente detetado, numa gama de concentrações de [0,724 - 6,123] $\mu\text{g}/\text{kg}$. Seguindo-se o PCB 28, onde as concentrações variaram entre [0,006 - 7,097] $\mu\text{g}/\text{kg}$, o α -endossulfão, [0,001 - 7,156] $\mu\text{g}/\text{kg}$, o fenvalerato 1, [0,041 - 11,802] $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em menor frequência de deteção, surgem compostos como o β -HCH ([0,346 - 2,567] $\mu\text{g}/\text{kg}$), o BDE 47 ([5,619 - 7,397] $\mu\text{g}/\text{kg}$) e o BDE 183 ([0,031 - 3,983] $\mu\text{g}/\text{kg}$).

O diclorodifeniltricloroetano, vulgarmente conhecido por DDT, integra a família dos pesticidas organoclorados, sendo classificado como um poluente orgânico persistente. O DDT permite o controlo de parasitas na agricultura, que estavam intrinsecamente ligados à propagação de doenças (malária, por exemplo). A sua utilização foi desautorizada em grande parte dos países na década de 1970, devido ao seu efeito acumulativo no organismo e degradação (Fitzpatrick et al., 2000; ToxFAQsTM, 2022;

Yipei et al., 2022). No entanto, este composto é capaz de persistir no ambiente durante anos. É metabolizado em diclorodifenildicloroetileno, DDE, e outros produtos de degradação. A exposição humana ao DDT e DDE pode ocorrer por ingestão de produtos contaminados ou alimentos cultivados em solos contaminados, o que leva à acumulação gradual de metabolitos no organismo.

Neste sentido, o facto do composto DDE ser o mais frequentemente detetado pode justificar-se pela persistência do DDT e sua degradação ao longo dos anos, no ambiente sendo bastante importante a sua monitorização, de modo a diminuir o seu consumo e exposição.

Vários estudos apontam para a presença de DDT e DDE em amostras alimentares e ambientais, como chás e solos, demonstrando que estes pesticidas ainda se encontram presentes no quotidiano, apesar da sua exclusão por parte das entidades competentes (J. Ma et al., 2016; Salihovic et al., 2016; Siraj, 2021). No entanto, para plantas, os estudos ainda são escassos e pouco assertivos, daí a importância desta monitorização.

O endossulfão é um pesticida organoclorado, bastante aplicado na agricultura, sendo, portanto, a sua monitorização bastante importante, uma vez que é extremamente tóxico e a sua utilização já foi proibida por parte das entidades governamentais (Hwang & Kim, 2022; V. Singh & Singh, 2014). Contudo, a deteção de endossulfão ainda é recorrente em matrizes vegetais, alimentares e águas (Sathishkumar et al., 2021). (V. Singh & Singh, 2014) publicou que a concentração de endossulfão em amostras de plantas (*Sonchus oleraceus* Linn.; *Digitaria longiflora*; *Panicum poludosom* L.; *Chloris virgata*; *Sphenoclea zeylamica*; *Vetiver zizanioides*) variou de 14 a 343 ng/g. (Fang et al., 2018) avaliou a presença de endossulfão em várias matrizes que se encontravam localizadas num sítio tipicamente contaminado com este pesticida, reportando que a gama de concentrações médias do pesticida, em cascas de árvores, era [23,0-278,0] ng/g. Comparando as concentrações reportadas com as obtidas neste estudo, verifica-se que as amostras estudadas apresentam quantidades vestigiais de endossulfão.

O controlo eficaz de doenças e pragas na agricultura é a maior motivação para a utilização de HCH, resultando em consequências adversas no ambiente e na saúde. A substituição de HCH (mistura de isómeros em proporções distintas: 0–67% de α -, 5–6% de β -, 13–15% de γ - e 6% de δ -HCH) pelo lindano (90% γ -HCH), promoveu a geração e

descarga de resíduos de isómeros α e β , bem como de outros subprodutos, para o ambiente (Y. Ma et al., 2020). É de salientar que, os isómeros de HCH apresentam maior volatilidade, solubilidade em água e transportabilidade, o que promove a sua dispersão (Tripathi et al., 2019), sendo uma possível explicação para a presença do composto β -HCH nas amostras em estudo. (Barriada-Pereira et al., 2003) utilizou a extração assistida por microondas para determinar a presença de pesticidas organoclorados em amostras de vegetação, obtendo elevadas concentrações para os isómeros α , [1,37-8,27] mg/kg, e β , [2,20-12,70] mg/kg. Por comparação, as amostras estudadas apresentam níveis de β -HCH bastante inferiores ao estudo publicado.

Segundo a Convenção de Estocolmo, os bifenilos policlorados são classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (UNEP, 2001). Estes compostos são produzidos indiretamente como subprodutos dos processos industriais e, devido a características como a elevada estabilidade, bioacumulação na cadeia alimentar e transportabilidade atmosférica de elevado alcance, persistem no ambiente e ameaçam a saúde humana e ecossistemas (Cui et al., 2015, 2019). (Cui et al., 2019) verificou que as concentrações de PCBs na relva eram bastante baixas, variando entre [0,20-2,14] ng/g. Ainda no âmbito de matrizes vegetais, (Barone et al., 2016) investigou a presença de PCBs em chás comercializados, obtendo uma gama de concentrações de [0,50-2,11] ng/g (chá preto) e [0,50-3,61] ng/g (chá verde) para o PCB 28, e, para o PCB 153, em amostras de chá preto uma gama de concentrações de [$<$ LOD-0,10] ng/g e de [$<$ LOD-0,84] ng/g, para o chá verde. Assim, é possível aferir que a presença destes contaminantes é verificada em quantidades vestigiais, tal como nas amostras em estudo.

Ainda no âmbito dos POPs, surgem os éteres difenílicos polibromados, que se destacam pelas inúmeras aplicações como retardantes de chama, em produtos industriais e de quotidiano, como plásticos, roupas, tintas, equipamentos eletrónicos, entre outros (Beltrán et al., 2022; Geng et al., 2021; Shaoyong et al., 2022). Normalmente, de todos os BDEs reconhecidos, o BDE 47 é o mais abundantemente detetado no ambiente (Beltrán et al., 2022; Geng et al., 2021). Embora tenha sido restringida a sua utilização, estes compostos encontram-se acumulados no ambiente e nas cadeias alimentares, devido às suas características persistentes e bioacumulativas, o que é comprovado pelas amostras estudadas, onde se detetou a presença dos compostos BDE 47 e BDE 183. Diversos estudos expõem a presença de concentrações relativamente elevadas de BDE 47 e BDE

183 em plantas, sedimentos e solos (Geng et al., 2021; Zhao et al., 2019) , pelo que estes compostos ainda persistem em matrizes vegetais.

De frisar que, apesar de compostos retardantes de chama fosforados não terem sido detetados nas amostras em estudo, as matrizes vegetais recolhidas no PNM indicam a presença de microplásticos e respetivos aditivos, dado que foi possível quantificar amostras com compostos BDEs.

O fenvalerato é um piretróide sintético, amplamente utilizado como inseticida na agricultura, de modo a combater e controlar pragas de inúmeros insetos (Khan et al., 2021; Wei et al., 2010). A exposição da população a este inseticida advém de resíduos presentes nos alimentos, uma vez que este é frequentemente aplicado nas práticas agrícolas. É de referir a sua toxicidade elevada para organismos aquáticos, no entanto, para mamíferos não apresenta toxicidade (Reed et al., 1983).

A presença de fenvalerato tem vindo a ser monitorizada em amostras alimentares derivadas de plantas, devido à preocupação crescente com o consumo de contaminantes. (Wan et al., 2021), através do procedimento QuEChERS, quantificaram 19 piretróides em amostras de chá, encontrando-se 10,7% das amostras contaminadas com fenvalerato, sendo a maior concentração de 79 µg/kg. Contudo, matrizes vegetais iguais às estudadas, não têm sido alvo de estudos, não sendo possível a comparação.

A cipermetrina é um pesticida sintético, cujo objetivo é controlar pragas de insetos e aumentar a produção, em campos industriais e agrícolas e eliminar mosquitos, baratas e outros insetos, em residências (Bhatt et al., 2022; Chibee et al., 2021; Salako et al., 2020). Este inseticida não tem vindo a sofrer estudos de monitorização, pelo que a comparação dos resultados obtidos com valores reportados na literatura não pode ser efetuada.

Importa referir que estudos sobre a monitorização de contaminantes em plantas são relativamente raros e escassos, pelo que a comparação dos resultados com a literatura é bastante complicada, o que torna, por outro lado, este projeto bastante interessante e primordial.

4.5.1 Abordagem por local de amostragem

A percentagem de contaminantes encontrados na amostragem das diferentes regiões do PNM encontra-se representada na Figura 4.15.

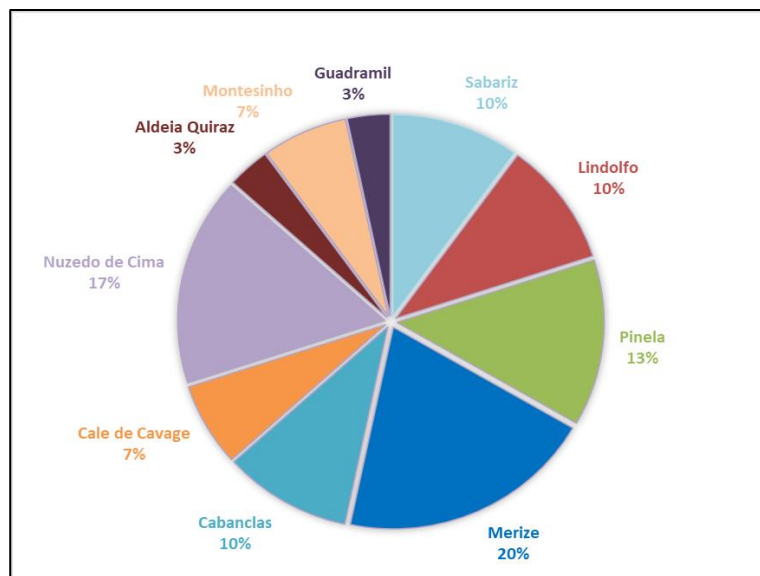


Figura 4.15 – Percentagem de contaminantes detetados em cada região do PNM.

Observando a figura anterior, é possível afirmar que o local Merize apresenta maior percentagem de contaminação, onde se detetou seis contaminantes (α -endossulfão, DDE, fenvalerato 1, BDE 47, PCB 28 e PCB 153) dos 32 pesquisados. A maioria destes contaminantes apresentavam uma concentração considerável (acima do LOQ). Merize é um local de cultivo agrícola e área selvagem, pelo que, a presença de contaminantes, pode justificar-se pela utilização destes compostos no controlo de pragas, por parte dos agricultores, ou pelo tráfego e proximidade a localidades com atividade humana.

Segue-se Nuzedo de Cima e Pinela, zona selvagem e agrícola, onde foram detetados cinco e quatro contaminantes, respetivamente, dos 32 pesquisados. Ambas são zonas agrícolas onde, ao longo dos anos, a exposição a contaminantes utilizados na atividade agrícola foi constante e contínua, uma vez que a maioria da população residente nas áreas vizinhas vive exclusivamente desta atividade, tornando-se necessário assegurar esta atividade e produção de alimentos.

4.5.2 Abordagem por espécie

No decorrer do trabalho pesquisou-se a presença de contaminantes em 10 espécies distintas de plantas, recolhidas no PNM.

Com base nos resultados obtidos, a planta que apresentava maior nível de contaminação era a amostra de carvalho (*Quercus sp.*), onde se detetou a presença de 6 contaminantes (valores superiores ao LOD). A Figura 4.16 traduz o anteriormente descrito.

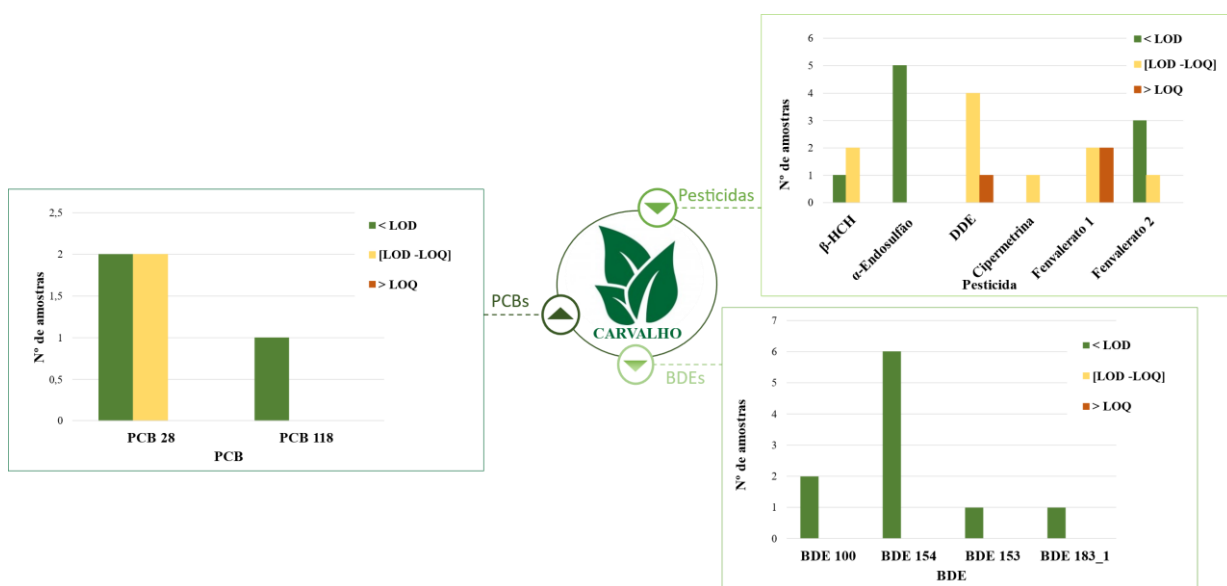


Figura 4.16 – Número de amostras contaminadas da planta Carvalho, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

Por observação da Figura 4.16, é possível aferir que, no que diz respeito à família dos pesticidas, verificou-se amostras com concentrações entre os limiares analíticos, ou seja, entre os valores LOD e LOQ (barras amarelas), para os contaminantes β -HCH, DDE, cipermetrina, fenvalerato 1 e fenvalerato 2. Neste sentido, afirma-se que estas amostras se encontravam contaminadas, no entanto, foi impossível quantificar as concentrações dos pesticidas (valores inferiores ao LOQ). De salientar ainda a presença de DDE e fenvalerato 1 em 3 amostras, onde era possível a sua quantificação, uma vez que apresentavam valores superiores ao LOQ (barra laranja). As barras verdes indicam valores inferiores ao limite de deteção, pelo que não é possível detetar com rigor a presença dos resíduos de contaminantes.

Numa análise similar à anterior, a Figura 4.16 demonstra que não se detetou a presença de retardantes de chama BDEs na amostra de carvalho. De referir que, quanto à família dos PCBs, detetou-se a presença de PCB 28 em 2 amostras (valores superiores ao LOD e inferiores ao LOQ).

As amostras de urze e carqueja apresentaram 3 dos contaminantes estudados (Figura 4.17 e 4.18).

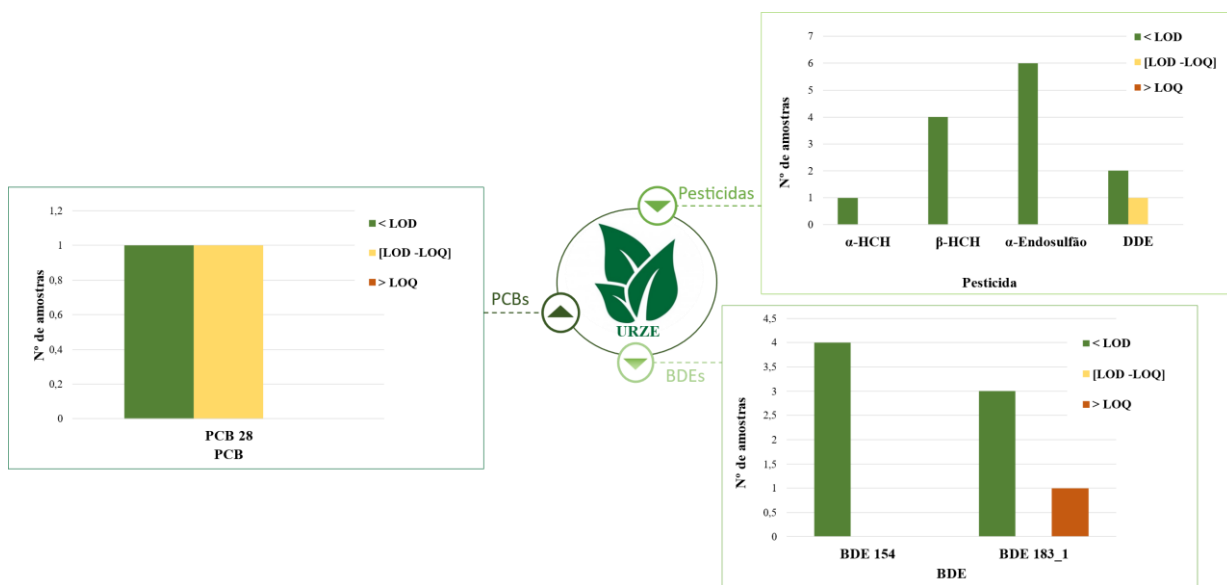


Figura 4.17 - Número de amostras contaminadas da planta Urze, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

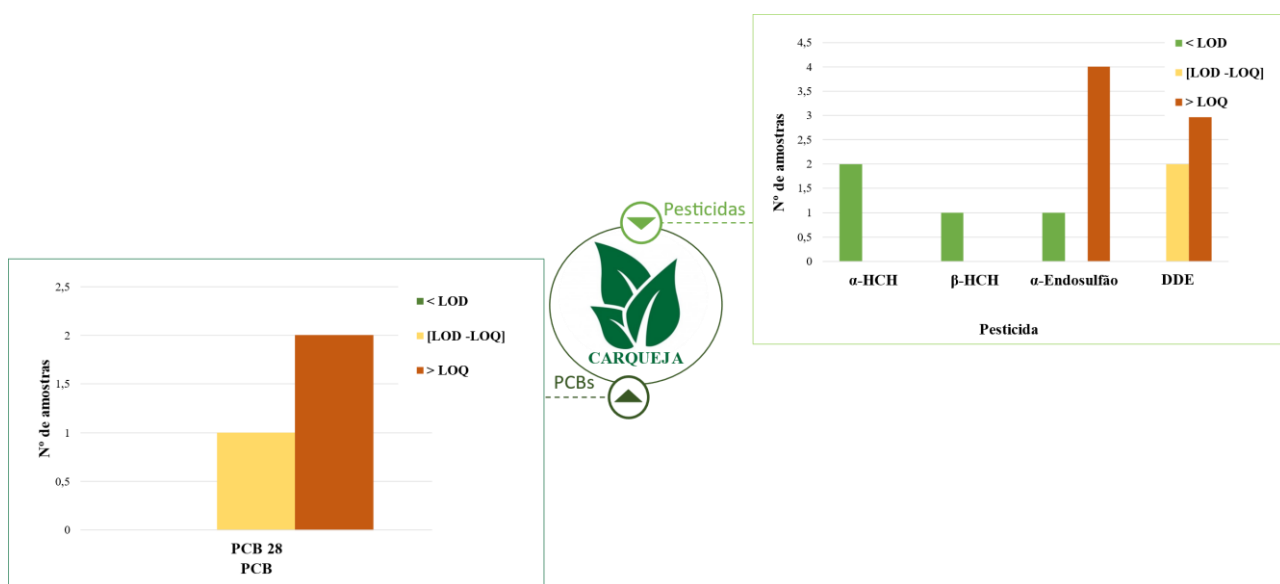


Figura 4.18 - Número de amostras contaminadas da planta Carqueja, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

Observando as figuras anteriores, pode-se constatar que as amostras de urze apresentavam resíduos de contaminantes como DDE, PCB 28 e BDE 183 (barras amarela e laranja). Já as amostras de carqueja encontravam-se contaminadas com α -endossulfão, DDE e PCB 28, em quantidades superiores aos limites de quantificação (4,550, 2,365, 4,777 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respetivamente), representadas pelas barras laranjas.

Após extração e análise das amostras de esteva e giesta, verificou-se a presença de resíduos de apenas 2 contaminantes, sendo eles o PCB 28 e BDE 47, no caso das amostras de esteva, em quantidades superiores ao LOQ (barra laranja), e, nas amostras de giesta, o PCB 28 e BDE 183, com valores entre o LOQ e LOQ (barra amarela) e valores superiores ao LOQ (barra laranja), pela mesma ordem. As Figuras 4.19 e 4.20 demonstram os resultados obtidos.

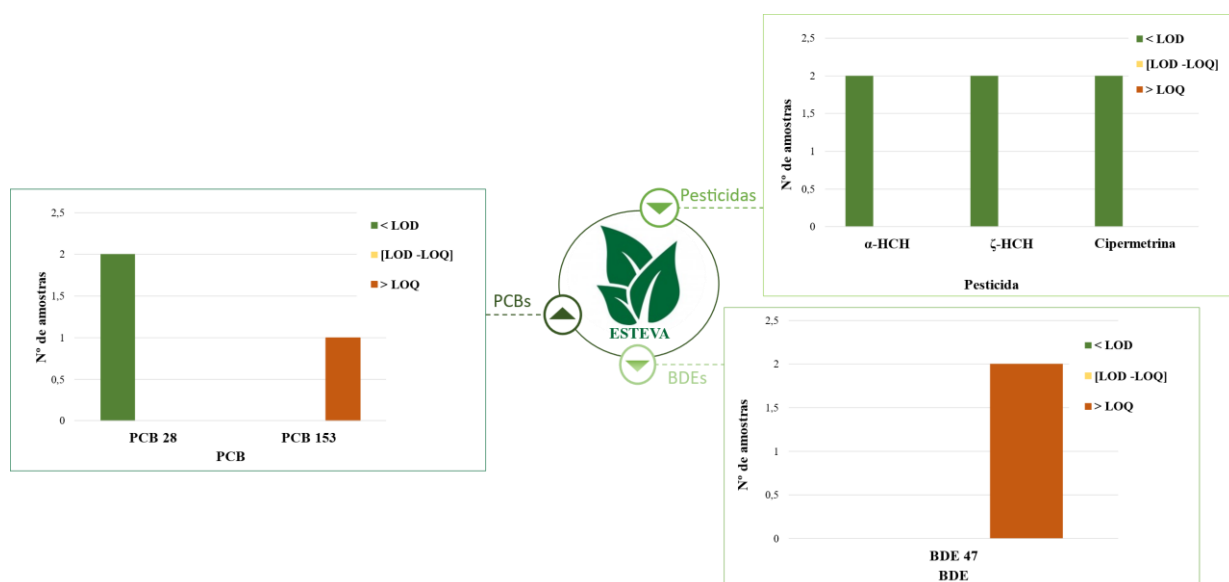


Figura 4.19 - Número de amostras contaminadas da planta Esteva, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

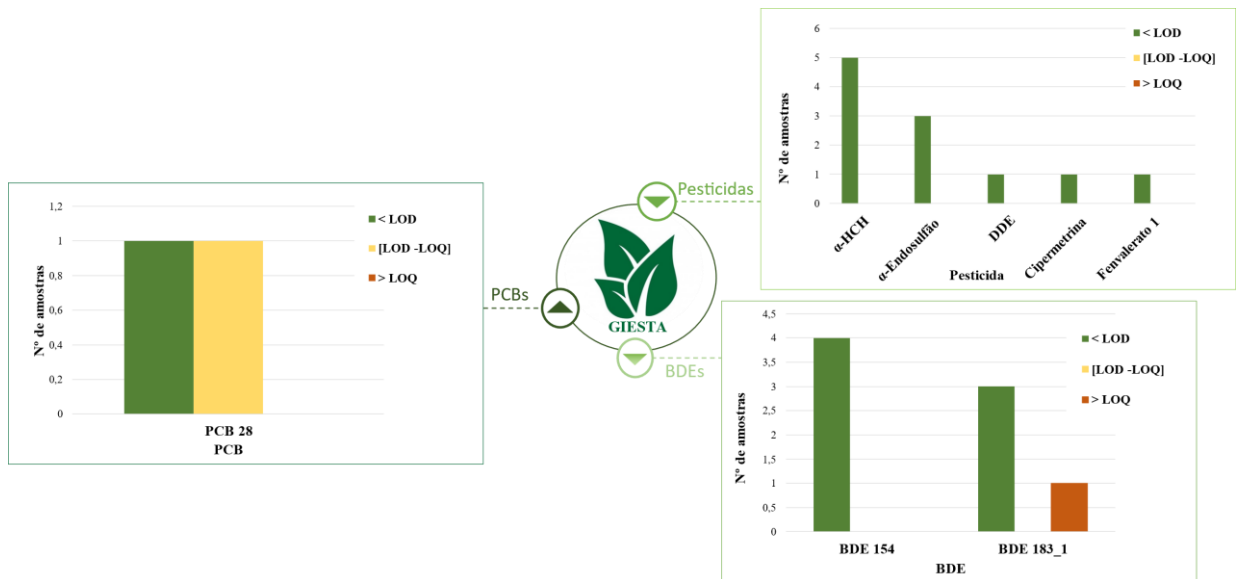


Figura 4.20 - Número de amostras contaminadas da planta Giesta, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

Nas amostras de castanheiro, medronho, cerejeira e silva detetou-se a presença de um contaminante, uma vez que apenas um apresentava concentrações superiores ao limite de deteção. Nas Figuras 4.21 a 4.24 apresentam-se os resultados obtidos para as espécies de plantas referidas.

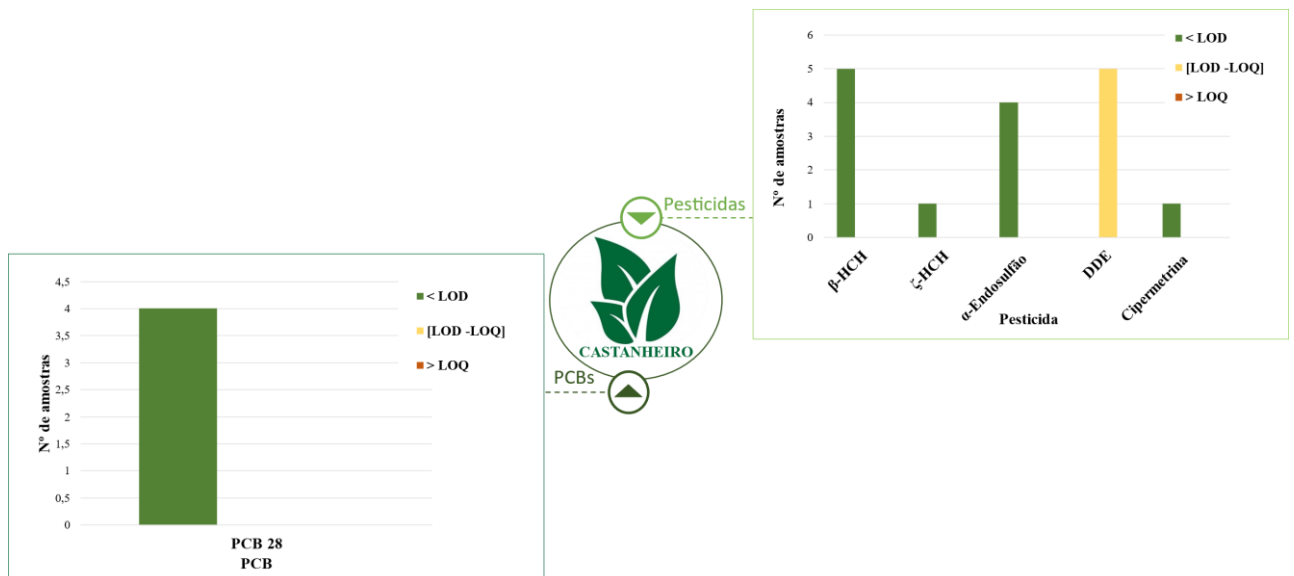


Figura 4.21 - Número de amostras contaminadas da planta Castanheiro, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.



Pesticidas

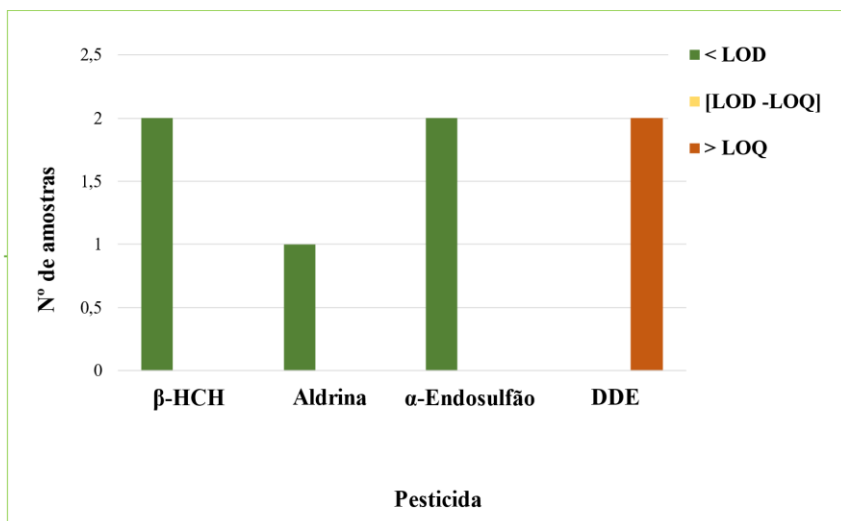


Figura 4.22 - Número de amostras contaminadas da planta Medronho, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.



Pesticidas

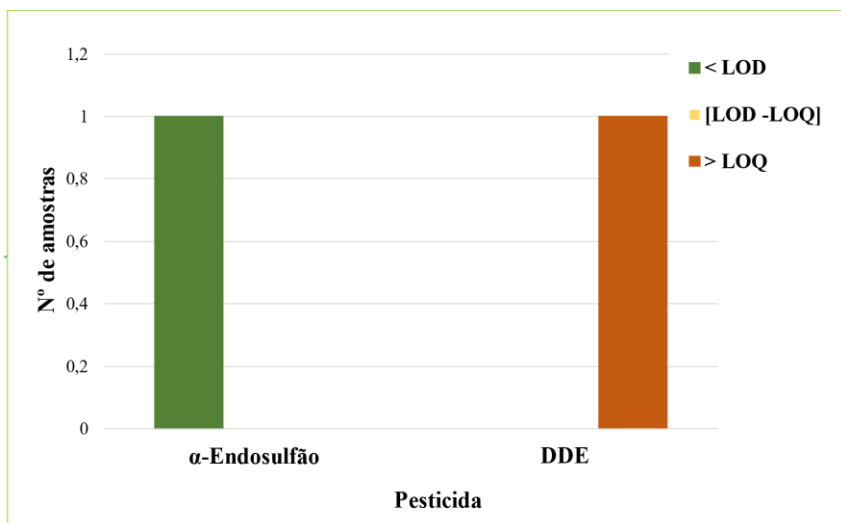


Figura 4.23 - Número de amostras contaminadas da planta Cerejeira, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

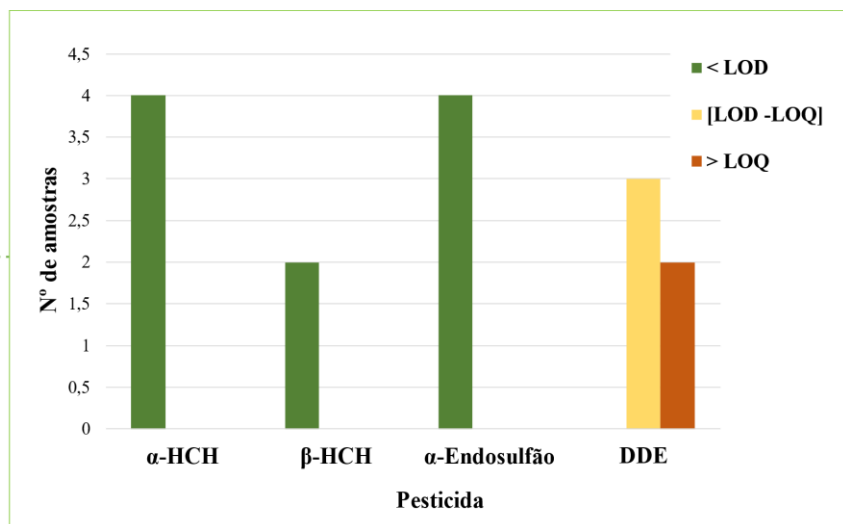


Figura 4.24 - Número de amostras contaminadas da planta Silva, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

Por oposição, nas amostras de trevo não se constatou a presença de resíduos de qualquer composto pesquisado (valores inferiores ao LOQ - barra verde), pelo que não se encontravam contaminadas (Figura 4.25).

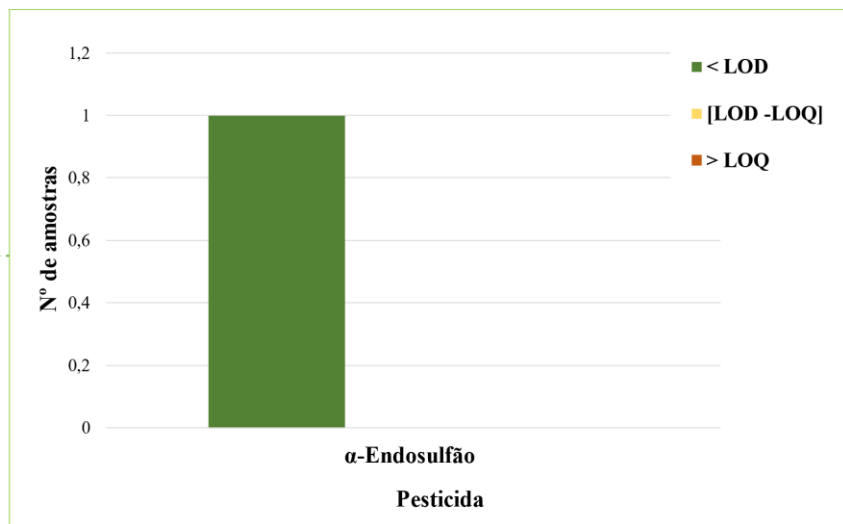


Figura 4.25 - Número de amostras contaminadas da planta Trevo, com valores inferiores ao LOD, entre LOD e LOQ e acima do LOQ, para cada contaminante pesquisado.

Conclusões e Perspetivas futuras

O mel apresenta inúmeras propriedades nutricionais e terapêuticas e tem vindo a ser valorizado globalmente. Ao longo dos anos, o mel e a sua qualidade têm sido cada vez mais objeto de estudo, uma vez que este alimento é um ótimo bioindicador de contaminação química e, conseqüentemente, indicador de contaminação ambiental.

Com vista à monitorização ambiental, o mel pode ser um possível bioindicador de contaminação química, quer indiretamente, através do meio ambiente ou das práticas agrícolas, quer diretamente pela apicultura. São exemplos de contaminantes os poluentes orgânicos persistentes (pesticidas, inseticidas), os elementos potencialmente tóxicos e compostos fosforados (retardantes de chama fosforados e pesticidas organofosforados).

O trabalho realizado teve como objetivos estudar o estado de contaminação das plantas que constituem a flora do PNM e que atraem insetos polinizadores com o propósito de verificar a influência na qualidade do mel e, conseqüentemente, saber se o mel pode ser considerado um bioindicador da qualidade do ambiente.

Inicialmente, desenvolveu-se e otimizou-se uma metodologia baseada na extração por QuEChERS e análise por cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões (GC- ECD) ou chama fotométrica (GC-FPD), dependendo dos contaminantes a pesquisar.

Tradicionalmente, para amostras vegetais, são utilizadas técnicas extrativas como o soxhlet, ultrassons e agitação mecânica, onde se utilizam elevadas quantidades de solventes orgânicos e tóxicos. Recentemente, têm surgido novas técnicas extrativas menos poluentes e mais rápidas para a extração de amostras vegetais, como a extração assistida por microondas, microextração em fase sólida e a extração por QuEChERS. A aplicação de metodologias mais amigas do ambiente e mais rápidas torna a extração por QuEChERS uma alternativa promissora, sendo que permite uma redução significativa do volume de solvente a utilizar e a possibilidade de extração de um elevado número de amostras num curto período. A eficiência da extração por QuEChERS é significativamente influenciada por parâmetros como o tipo de agitação aplicado (ultrassons ou manual), a quantidade de água a aplicar à matriz vegetal para sua hidratação, e a quantidade de carbono a utilizar na fase de limpeza. Para o sucesso na implementação desta metodologia foi fundamental a realização de testes de otimização, onde se alterou todos os fatores que interferem no processo extrativo. Estes estudos

permitiram concluir que a utilização de ultrassons promovia a elevada extração de pigmentos (como a clorofila), prejudicando a sua remoção no processo de limpeza, dado que estes pigmentos devem ser removidos, pois afetam a análise cromatográfica. A fase de hidratação da planta é fundamental, de modo a todos os contaminantes e outros compostos químicos da matriz serem libertados para a solução aquosa. A quantidade de carbono afeta, tanto positivamente, como negativamente a extração, dependendo da quantidade a utilizar. Para quantidades de carbono elevadas, este adsorvente é responsável pela absorção dos contaminantes, uma vez que compostos químicos planares têm uma maior afinidade para se adsorverem no carbono, conduzindo a taxas de recuperação baixas. Pelo contrário, quando utilizadas quantidades muito baixas de carbono no, os extratos não ficam limpos, conduzindo a cromatogramas com picos pouco definidos e alguns interferentes, conseqüentemente, sem recuperações aceitáveis. A não utilização de ultrassons, a adição de água para hidratação (2 mL) e a utilização de uma quantidade intermédia de carbono na fase de limpeza (15 mg) revelaram-se eficazes na etapa de extração, conduzindo a taxas de recuperação aceitáveis, [54,7-142,0] %.

Após otimização das diversas etapas que constituem o procedimento QuEChERS, procedeu-se à validação da metodologia para a extração dos contaminantes em amostras de plantas, recolhidas no PNM, elaborando-se as curvas de calibração. A linearidade das curvas de calibração, na gama de concentrações [0,996-12,450] µg/kg, foi aceitável, uma vez que o coeficiente de determinação foi superior a 0,99. Os limites de deteção e os limites de quantificação variaram de 0,709 a 1,734 µg/kg e 2,365 a 5,779 µg/kg, respetivamente. Em relação ao desvio padrão relativo é possível afirmar que os valores se encontram dentro do nível normalmente exigido, ou seja, inferior a 20 %, à exceção do isómero de éster organofosforado, TToP (1).

Com o objetivo de monitorizar a presença de contaminantes no PNM e aplicar o método validado, foram estudadas 41 amostras de plantas (carvalho; urze; giesta; castanheiro; trevo e outros; cerejeira; medronho; carqueja; silva; esteva), recolhidas no PNM, em 10 áreas distintas. Posteriormente, extraiu-se as amostras utilizando as condições otimizadas e injetou-se os extratos nos sistemas cromatográficos GC-ECD (pesquisa de POPs, BDEs e PCBs) e GC-FPD (pesquisa de OPPs e OPEs).

Dos 14 pesticidas validados, detetou-se (acima do LOD) 6 compostos. Em relação aos BDEs, verificou-se a presença de 2, dos 7 estudados. No que diz respeito aos

compostos PCB, encontrou-se 2 dos 4 estudados, com valores superiores ao LOD. Dos compostos detetados acima do valor limite de deteção, 3 pesticidas (α -endossulfão, DDE e fenvalerato 1), 2 BDEs (BDE 47 e BDE 183) e 2 PCBs (PCB 28 e PCB 153) apresentavam amostras com valores superiores aos limites de quantificação estimados (> LOQ). Os compostos fosforados (OPE e OPP) não foram detetados em nenhuma amostra. O composto DDE foi o mais frequentemente detetado, numa gama de concentrações de [0,724 - 6,123] $\mu\text{g}/\text{kg}$, seguindo-se o PCB 28, onde as concentrações variaram entre [0,006 - 7,097] $\mu\text{g}/\text{kg}$, o α -endossulfão, [0,001 - 7,156] $\mu\text{g}/\text{kg}$, o fenvalerato 1, [0,041 - 11,802] $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em menor frequência de deteção, surgem compostos como o β -HCH ([0,346 - 2,567] $\mu\text{g}/\text{kg}$), o BDE 47 ([5,619 - 7,397] $\mu\text{g}/\text{kg}$) e o BDE 183 ([0,031 - 3,983] $\mu\text{g}/\text{kg}$).

De referir que, além da abordagem geral, foram feitas a abordagem para cada espécie de planta e a abordagem por localidade, de modo a explicar os resultados obtidos. Relativamente a cada espécie estudada, verificou-se que a planta que apresentava maior nível de contaminação era a amostra de carvalho, onde se detetou a presença de 6 contaminantes (valores superiores ao LOD), β -HCH, DDE, cipermetrina, fenvalerato 1 e fenvalerato 2, PCB28. Segue-se as amostras de urze e carqueja que apresentaram 3 contaminantes (DDE, PCB 28 e BDE183 (1) e α -endossulfão, DDE, PCB 28, respetivamente). As restantes amostras apresentavam menos de dois contaminantes.

Em relação à abordagem por localidades, é possível afirmar que o local Merize apresenta maior percentagem de contaminação, onde se detetou seis contaminantes (α -endossulfão, DDE, fenvalerato 1, BDE 47, PCB 28 e PCB 153) dos 32 pesquisados. A maioria destes contaminantes apresentavam uma concentração considerável (acima do LOQ).

Concluindo, e de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, é possível afirmar que a utilização da metodologia QuEChERS como processo extrativo e a análise cromatográfica poderá ser aplicada, futuramente, em amostras de plantas. De salientar ainda que, apesar de o PNM, ser uma reserva natural, a recorrente a aplicação de pesticidas na atividade agrícola e apícola, bem como as fontes de contaminação antropogénicas denunciam o impacto ambiental nas plantas podendo vir a afetar a qualidade do mel.

Em termos de perspectivas futuras, de modo a dar seguimento ao trabalho desenvolvido, seria interessante otimizar a etapa de redução de interferentes presentes na matriz de plantas, bem como estudar a relação destes resultados com os valores de contaminantes presentes no mel e outras amostras ambientais do PNM (água, solo e ar) e confirmar por GC-MS os resultados positivos, sendo esta a técnica cromatográfica recomendada para uma confirmação de resultados de monitorização.

Referências Bibliográficas

- Almeida, C. M. V. B. (2010). *Detecção de contaminantes no mel* [Tese de Mestrado em Segurança Alimentar]. Universidade de Lisboa.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Apimonte. (2020). *Apimonte*. <https://www.apimonte.pt/pt/> (Acedido em 20/11/2021).
- ASAE., A. de S. A. e E. (2022). *POPs - Convenção Estocolmo*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/pops-convencao-estocolmo.aspx> (Acedido em 07/10/2022).
- Barbosa, S. C. B. (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 - Universidade de Lisboa .
- Barone, G., Giacomini-Stuffler, R., & Storelli, M. M. (2016). Evaluation of trace metal and polychlorinated biphenyl levels in tea brands of different origin commercialized in Italy. *Food and Chemical Toxicology*, 87, 113–119. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.12.008>
- Barriada-Pereira, M., Concha-Graña, E., González-Castro, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., & Fernández-Fernández, E. (2003). Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. *Journal of Chromatography A*, 1008(1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01061-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01061-6)
- Belas, A., Almeida, C., Epifânio, A. F., Carrapiço, B., Vaz, Y., & São Braz, B. (2014). Qualidade do mel nacional; Quality of national honey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109, 112–119.
- Beltrán, E. M., González-Doncel, M., García-Mauriño, J. E., Hortigüela, P. G., & Pablos, M. V. (2022). Effects of life cycle exposure to dietary 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl

- ether (BDE-47) on medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 245, 106133. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2022.106133>
- Bhatt, P., Rene, E. R., Huang, Y., Wu, X., Zhou, Z., Li, J., Kumar, A. J., Sharma, A., & Chen, S. (2022). Indigenous bacterial consortium-mediated cypermethrin degradation in the presence of organic amendments and Zea mays plants. *Environmental Research*, 212, 113137. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113137>
- Bi, R., & Su, G. (2023). Dietary intake assessment of known and unknown organophosphate esters (OPEs) in foodstuffs via high-resolution mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, 854, 158452. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158452>
- Boyaci, E., Rodríguez-Lafuente, Á., Gorynski, K., Mirnaghi, F., Souza-Silva, É. A., Hein, D., & Pawliszyn, J. (2015). Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica Chimica Acta*, 873, 14–30. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2014.12.051>
- Bragança, I., Plácido, A., Paíga, P., Domingues, V. F., & Delerue-Matos, C. (2012). QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of The Total Environment*, 433, 281–289. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.06.035>
- Cajka, T., Sandy, C., Bachanova, V., Drabova, L., Kalachova, K., Pulkrabova, J., & Hajslova, J. (2012). Streamlining sample preparation and gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. *Analytica Chimica Acta*, 743, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.06.051>
- Chibee, G. U., Ojelabi, O. M., Fajana, H. O., Akinpelu, B. A., Kehinde, T. O., Awodiran, O. M., Obuotor, E. M., & Owojori, O. J. (2021). Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853. *Environmental Advances*, 5, 100074. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2021.100074>
- Directiva 2001/110/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, relativa ao mel, Diretiva (2001).

- Cruz Fernandes, V., Luts, W., Delerue-Matos, C., & F. Domingues, V. (2020). Improved QuEChERS for Analysis of Polybrominated Diphenyl Ethers and Novel Brominated Flame Retardants in Capsicum Cultivars Using Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 3260–3266. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07041>
- Cui, S., Fu, Q., Ma, W. L., Song, W. W., Liu, L. Y., & Li, Y. F. (2015). A preliminary compilation and evaluation of a comprehensive emission inventory for polychlorinated biphenyls in China. *Science of The Total Environment*, 533, 247–255. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.06.144>
- Cui, S., Hough, R., Fu, Q., Qi, X., Liu, D., Cooper, P., Li, P., & Zhang, Z. (2019). Concentrations and uptake pathways of polychlorinated biphenyls from soil to grass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109428. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.109428>
- Dawra, M., Nehme, N., Rayess, Y. el, Beyrouthy, M. el, Taillandier, P., & Bouajila, J. (2022). Folk medicinal applications, phytochemical composition and biological activities of some Lebanese endemic plants. *South African Journal of Botany*, 150, 511–527. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2022.07.048>
- Decreto-lei n.º 214/2003, de 18 de Setembro do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, Pub. L. No. Diário da República n.º 216/2003, Série I-A (2003). <https://dre.tretas.org/dre/166248/decreto-lei-214-2003-de-18-de-setembro> (Acedido em 27/10/2021).
- Do, D., Silveira, N., Barbara, C. ;, Euzébio, C., & Dias De Oliveira, P. (sem data). *Impactos dos contaminantes do mel na cadeia produtiva* (Vol. 2, Issue 4).
- Duan, Y., Wang, D., Xu, Z., Yu Supplementary data, S., Zhang, X., & Liu, Z. (2022). Sensitive determination of pyrethroid insecticide residues in tea using a molecularly imprinted fiber array based on homemade solid-phase microextraction coatings. *Microchemical Journal*, 182, 107897. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107897>

- European Commission. (2021). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed. *Document No. SANTE/11312/2021*.
- Fakhri, Y., Abtahi, M., Atamaleki, A., Raoofi, A., Atabati, H., Asadi, A., Miri, A., Shamloo, E., Alinejad, A., Keramati, H., & Mousavi Khaneghah, A. (2019). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in honey: A global systematic review and meta-analysis and risk assessment. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 498–506. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.07.011>
- Fang, Y., Nie, Z., Yang, J., Die, Q., Tian, Y., Liu, F., He, J., Wang, J., & Huang, Q. (2018). Spatial distribution of and seasonal variations in endosulfan concentrations in soil, air, and biota around a contaminated site. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *161*, 402–408. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.06.013>
- Fitzpatrick, L. J., Dean, J. R., Comber, M. H. I., Harradine, K., & Evans, K. P. (2000). Extraction of DDT [1,1,1,-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] and its metabolites DDE [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene] and DDD [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane]) from aged contaminated soil. *Journal of Chromatography A*, *874*(2), 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00101-1)
- Geng, Q., Guo, M., Wu, H., Peng, J., Zheng, G., Liu, X., Zhai, Y., & Tan, Z. (2021). Effects of single and combined exposure to BDE-47 and PFOA on distribution, bioaccumulation, and toxicity in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *228*, 113014. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.113014>
- Girones, L., Oliva, A. L., Negrin, V. L., Marcovecchio, J. E., & Arias, A. H. (2021). Persistent organic pollutants (POPs) in coastal wetlands: A review of their occurrences, toxic effects, and biogeochemical cycling. *Marine Pollution Bulletin*, *172*, 112864. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2021.112864>
- Hannah, T. J., Megson, D., & Sandau, C. D. (2022). A review of the mechanisms of by-product PCB formation in pigments, dyes and paints. *Science of The Total Environment*, *852*, 158529. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158529>

- Herrera-Herrera, A. v., González-Sálamo, J., Socas-Rodríguez, B., & Hernández-Borges, J. (2019). Organophosphorus Pesticides (OPPs) in Bread and Flours. *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*, 53–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00005-8>
- Ho, W. H., & Hsieh, S. J. (2001). Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 428(1), 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01219-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01219-8)
- Huang, Y., Shi, T., Luo, X., Xiong, H., Min, F., Chen, Y., Nie, S., & Xie, M. (2019). Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 275, 255–264. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.094>
- Hwang, J. I., & Kim, J. E. (2022). Uptake of endosulfan isomers from soils by leafy vegetable lettuce: A comparative study between model-predicted and field-experimented results. *Science of The Total Environment*, 844, 157056. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157056>
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. (2019). *PARQUE NATURAL DE MONTESINHO*. <https://natural.pt/protected-areas/parque-natural-montesinho?locale=pt> (Acedido em 15/12/2021).
- Jovetić, M. S., Redžepović, A. S., Nedić, N. M., Vojt, D., Đurđić, S. Z., Brčeski, I. D., & Milojković-Opsenica, D. M. (2018). Urban honey - The aspects of its safety. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 69(3), 264–274. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3126>
- Kang, Y., Zhang, R., Yu, K., Han, M., Pei, J., Chen, Z., & Wang, Y. (2022). Organochlorine pesticides (OCPs) in corals and plankton from a coastal coral reef ecosystem, south China sea. *Environmental Research*, 214, 114060. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.114060>
- Kardani, F., Jelyani, A. Z., Dahanzadeh, M., & Rashedinia, M. (2022). Modified QuEChERS sample preparation method and applied for the analysis of 30 pesticide residues in iran tea in 2020–2021 using gas chromatography-tandem mass

- spectrometry. *Applied Food Research*, 2(2), 100197. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100197>
- kardani, F., jelyani, A. zarei, & dahanzadeh, M. (2022a). Determination of 250 pesticide residues in the Iranian vegetables assessed during 2019–2020 using the modified QuEChERS method along with gas chromatography - mass spectrometry. *Applied Food Research*, 2(1), 100106. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100106>
- kardani, F., jelyani, A. zarei, & dahanzadeh, M. (2022b). Determination of 250 pesticide residues in the Iranian vegetables assessed during 2019–2020 using the modified QuEChERS method along with gas chromatography - mass spectrometry. *Applied Food Research*, 2(1), 100106. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100106>
- Khan, M. M., Hafeez, M., Siddiqui, J. A., Ullah, F., Shah, S., Iftikhar, A., Rehman, S. U., Rajput, S. A., Ali, D., Almarzoug, M. H. A., & Sudheer, S. (2021). Residual toxicity and sublethal effects of fenvalerate on the development and physiology of *Spodoptera exigua* reared on different hosts. *Journal of King Saud University - Science*, 33(7), 101593. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101593>
- Lao, Z., Li, H., Liao, Z., Liu, Y., Ying, G., Song, A., Liu, M., Liu, H., & Hu, L. (2023). Spatiotemporal transitions of organophosphate esters (OPEs) and brominated flame retardants (BFRs) in sediments from the Pearl River Delta, China. *Science of The Total Environment*, 855, 158807. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158807>
- Li, Y., Bako, C. M., Saktrakulkla, P., Lehmler, H. J., Hornbuckle, K. C., & Schnoor, J. L. (2021). Interconversion between methoxylated, hydroxylated and sulfated metabolites of PCB 3 in whole poplar plants. *Science of The Total Environment*, 785, 147341. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.147341>
- Liang, Z., Mahmoud Abdelshafy, A., Luo, Z., Belwal, T., Lin, X., Xu, Y., Wang, L., Yang, M., Qi, M., Dong, Y., & Li, L. (2022a). Occurrence, detection, and dissipation of pesticide residue in plant-derived foodstuff: A state-of-the-art review. *Food Chemistry*, 384, 132494. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132494>
- Liang, Z., Mahmoud Abdelshafy, A., Luo, Z., Belwal, T., Lin, X., Xu, Y., Wang, L., Yang, M., Qi, M., Dong, Y., & Li, L. (2022b). Occurrence, detection, and dissipation

- of pesticide residue in plant-derived foodstuff: A state-of-the-art review. *Food Chemistry*, 384, 132494. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132494>
- Lino, C. M., & da Silveira, M. I. N. (1997). Extraction and clean-up methods for the determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 769(2), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00026-5)
- Liu, Y., Liu, S., Zhang, Y., Qin, D., Zheng, Z., Zhu, G., Lv, Y., Liu, Z., Dong, Z., Liao, X., & Li, X. (2020). The degradation behaviour, residue distribution, and dietary risk assessment of malathion on vegetables and fruits in China by GC-FPD. *Food Control*, 107, 106754. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106754>
- Ma, J., Pan, L. bo, Yang, X. yang, Liu, X. ling, Tao, S. yang, Zhao, L., Qin, X. peng, Sun, Z. jin, Hou, H., & Zhou, Y. zhang. (2016). DDT, DDD, and DDE in soil of Xiangfen County, China: Residues, sources, spatial distribution, and health risks. *Chemosphere*, 163, 578–583. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.08.050>
- Ma, Y., Yun, X., Ruan, Z., Lu, C., Shi, Y., Qin, Q., Men, Z., Zou, D., Du, X., Xing, B., & Xie, Y. (2020). Review of hexachlorocyclohexane (HCH) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) contamination in Chinese soils. *Science of The Total Environment*, 749, 141212. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141212>
- Martins, N. M. C. (2015). *Análise Vestigial de Pesticidas em Azeite: Aplicação de Polímeros Molecularmente Impressos* [Tese de Doutoramento em Ciências Agrárias]. Universidade de Évora.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (Pearson Education, Ed.; 6^a Edição).
- Montesinho, A. (2022). *Parque Natural de Montesinho*. <https://amontesinho.pt/regiao/parque-natural-de-montesinho/> (Acedido em 05/01/2022).
- Moreira, Luís., & Farinha, Nuno. (2011). *Guia Prático da Biologia da Abelha* (FNAP, Vol. 1). Manual de Apicultura. <http://fnap.pt/web/wp-content/uploads/Guia->

[Pr%C3%A1tico-da-Biologia-da-Abelha-vol1.pdf](#) (versão PDF do documento descarregada em 20/11/2021).

Munawar, A., Akram, M. S., Javed, M. T., & Shahid, M. (2021). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Characteristics, toxicity, phytoremediation, and use of transgenic plants for PCBs degradation. *Handbook of Bioremediation: Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions*, 677–687. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819382-2.00043-0>

Museu Virtual da Biodiversidade. (2022). *Parque Natural de Montesinho*. Universidade de Évora. <https://www.museubiodiversidade.uevora.pt/areas-classificadas/parque-natural-de-montesinho/> (Acedido em 15/12/2021).

PubChem Annotation Record for ALDRIN, PubChem (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022a). *PubChem Compound Summary for CID 727, Lindane*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lindane> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022b). *PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022c). *PubChem Compound Summary for CID 2912, Cypermethrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cypermethrin> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022d). *PubChem Compound Summary for CID 3035, p,p'-DDE*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p_p-DDE (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022e). *PubChem Compound Summary for CID 3036, Clofenotane*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clofenotane> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022f). *PubChem Compound Summary for CID 3082, Dimethoate.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethoate> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022g). *PubChem Compound Summary for CID 3224, Endosulfan.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Endosulfan> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022h). *PubChem Compound Summary for CID 3347, Fenvalerate.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenvalerate> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022i). *PubChem Compound Summary for CID 4004, Malathion.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malathion> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022j). *PubChem Compound Summary for CID 4130, Methyl parathion.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-parathion> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022k). *PubChem Compound Summary for CID 6294, p,p'-DDD.* PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p_p_-DDD (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022l). *PubChem Compound Summary for CID 6535, Triethyl phosphate.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethyl-phosphate> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022m). *PubChem Compound Summary for CID 6537, Tris(2-ethylhexyl) phosphate.* PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tris_2-ethylhexyl_-phosphate (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022n). *PubChem Compound Summary for CID 6540, Tris(2-butoxyethyl) phosphate*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tris_2-butoxyethyl_phosphate (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022o). *PubChem Compound Summary for CID 8370, Hexachlorobenzene*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexachlorobenzene> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022p). *PubChem Compound Summary for CID 21803, Chlorpyrifos-methyl*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos-methyl> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022q). *PubChem Compound Summary for CID 23448, 2,4,4'-Trichlorobiphenyl*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_4-Trichlorobiphenyl (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022r). *PubChem Compound Summary for CID 31355, Triisobutyl phosphate*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triisobutyl-phosphate> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022s). *PubChem Compound Summary for CID 31357, Tributyl phosphate*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tributyl-phosphate> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022t). *PubChem Compound Summary for CID 35823, 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2_4-trichloro-5-3_4-dichlorophenyl_benzene (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022u). *PubChem Compound Summary for CID 37036, 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pcb-180> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022v). *PubChem Compound Summary for CID 37807, 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl*. PubChem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-2,4-trichloro-5-\(2,5-dichlorophenyl\)benzene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-2,4-trichloro-5-(2,5-dichlorophenyl)benzene) (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022w). *PubChem Compound Summary for CID 40326, Permethrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Permethrin> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022x). *PubChem Compound Summary for CID 40585, Deltamethrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deltamethrin> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022y). *PubChem Compound Summary for CID 95170, 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2,2,4,4-tetrabromodiphenyl-ether> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022z). *PubChem Compound Summary for CID 104926, Cyfluthrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyfluthrin> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022aa). *PubChem Compound Summary for CID 119411, Tris(2-carboxyethyl)phosphine*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tris-2-carboxyethyl-phosphine> (Acedido em 10/10/2022).

National Center for Biotechnology Information. (2022ab). *PubChem Compound Summary for CID 154083, 1,3,5-Tribromo-2-(2,4-dibromophenoxy)benzene*. PubChem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1,3,5-Tribromo-2-\(2,4-dibromophenoxy\)benzene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1,3,5-Tribromo-2-(2,4-dibromophenoxy)benzene) (Acedido em 10/10/2022).

- National Center for Biotechnology Information. (2022ac). *PubChem Compound Summary for CID 155166, 2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/155166> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ad). *PubChem Compound Summary for CID 969491, Dieldrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dieldrin> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ae). *PubChem Compound Summary for CID 5281873, Cyhalothrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyhalothrin> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022af). *PubChem Compound Summary for CID 5377784, Chlorfenvinphos*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorfenvinphos> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ag). *PubChem Compound Summary for CID 6442842, Bifenthrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bifenthrin> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ah). *PubChem Compound Summary for CID 12110098, 2,4-Dibromo-1-(4-bromophenoxy)benzene*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dibromo-1-4-bromophenoxy_benzene (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ai). *PubChem Compound Summary for CID 12310947, Aldrin*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aldrin> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022aj). *PubChem Compound Summary for CID 15509898, 2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15509898> (Acedido em 10/10/2022).
- National Center for Biotechnology Information. (2022ak). *PubChem Compound Summary for CID 15509899, 2,2',3,4,4',5',6'-Heptabromodiphenyl ether*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15509899> (Acedido em 10/10/2022).

- Needham, T. P., & Ghosh, U. (2019). Four decades since the ban, old urban wastewater treatment plant remains a dominant source of PCBs to the environment. *Environmental Pollution*, 246, 390–397. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.12.016>
- Novak, P., Zuliani, T., Milačić, R., & Ščančar, J. (2017). Development of an analytical method for the determination of polybrominated diphenyl ethers in mussels and fish by gas chromatography—Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1524, 179–187. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.09.059>
- Pohl, P., Bielawska-Pohl, A., Dzimitrowicz, A., Jamroz, P., Welna, M., Lesniewicz, A., & Szymczycha-Madeja, A. (2017). Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 67–77. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.05.009>
- Pszczolińska, K., Shakeel, N., & Barchanska, H. (2022). A simple approach for pesticide residues determination in green vegetables based on QuEChERS and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104783. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104783>
- Reed, W. T., Ehmann, A., Lee, P. W., Barber, G. F., & Bishop, J. L. (1983). The fate and impact of pydrin® insecticide (fenvalerate) on non-target systems following field applications. *Natural Products*, 213–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-029223-6.50038-0>
- RELACRE. (2000). *Guia 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.
- Ricardo, S. I. A. (2013). *A Exportação do Mel Português: Um Estudo Exploratório sobre as Motivações, Barreiras e Estratégias* [Tese de Mestrado em Empreendedorismo e Internacionalização]. Instituto Superior de Contabilidade e Administração do Porto.
- Salako, A. F., Amaeze, N. H., Shobajo, H. M., & Osuala, F. I. (2020). Comparative acute toxicity of three pyrethroids (Deltamethrin, cypermethrin and lambda-cyhalothrin) on guppy fish (*Poecilia reticulata* Peters, 1859). *Scientific African*, 9, e00504. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00504>

- Salihovic, S., Ganna, A., Fall, T., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., van Bavel, B., Lind, P. M., Ingelsson, E., & Lind, L. (2016). The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. *Environment International*, 88, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.12.015>
- Sathishkumar, P., Mohan, K., Ganesan, A. R., Govarthanam, M., Yusoff, A. R. M., & Gu, F. L. (2021). Persistence, toxicological effect and ecological issues of endosulfan – A review. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125779. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.125779>
- Senosy, I. A., Lu, Z. H., Zhou, D. D., Abdelrahman, T. M., Chen, M., Zhuang, L. Y., Liu, X., Cao, Y. W., Li, J. H., & Hua Yang, Z. (2022). Construction of a magnetic solid-phase extraction method for the analysis of azole pesticides residue in medicinal plants. *Food Chemistry*, 386, 132743. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132743>
- Shaoyong, W., Liu, Y., Xu, B., Pan, B., Xianmi, X., Wang, Y., & Jin, M. (2022). Exposure to BDE-47 causes female infertility risk and induces oxidative stress and lipotoxicity-mediated ovarian hormone secretion disruption in mice. *Science of The Total Environment*, 842, 156885. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156885>
- Silvina, N., Florencia, J., Nicolás, P., Cecilia, P., Lucía, P., Abbate, S., Leonidas, C. L., Sebastián, D., Yamandú, M., Verónica, C., & Horacio, H. (2017). Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. *Science of The Total Environment*, 581–582, 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.01.011>
- Singh, S., Mukherjee, A., Jaiswal, D. K., de Araujo Pereira, A. P., Prasad, R., Sharma, M., Kuhad, R. C., Shukla, A. C., & Verma, J. P. (2022). Advances and future prospects of pyrethroids: Toxicity and microbial degradation. *Science of The Total Environment*, 829, 154561. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154561>
- Singh, V., & Singh, N. (2014). Uptake and accumulation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfan sulfate in naturally growing plants of contaminated area.

- Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104(1), 189–193.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2014.02.025>
- Siraj, J. (2021). Organochlorine pesticide residues in tea and their potential risks to consumers in Ethiopia. *Heliyon*, 7(7), e07667.
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07667>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (1998). *Princípios de Análise Experimental* (5ª Edição).
- Soares, R. M. C. (2016). *Detection of synthetic musks and UV-filters in *Carpobrotus edulis* by QuEChERS/GC-MS* [Tese de Mestrado em Bioengenharia]. Faculdade de Engenharia do Porto.
- Stoytcheva, O. O. E.-M. (2011). Pathology of Endosulfan. Em *Pesticides in the Modern World* (p. Ch. 15). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/17318>
- Tan, D. D., Mu, D., Wu, H. Q., Li, Y., Liu, X. H., Sun, J., & Ji, Z. Y. (2022). Establishment of a comprehensive method to derive seawater quality criteria of BDE-47 in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 113762.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.113762>
- Tankiewicz, M., & Berg, A. (2022). Improvement of the QuEChERS method coupled with GC–MS/MS for the determination of pesticide residues in fresh fruit and vegetables. *Microchemical Journal*, 181, 107794.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107794>
- Terzaghi, E., Raspa, G., Zanardini, E., Morosini, C., Anelli, S., Armiraglio, S., & di Guardo, A. (2022). Life cycle exposure of plants considerably affects root uptake of PCBs: Role of growth strategies and dissolved/particulate organic carbon variability. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126826.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126826>
- ToxFAQs™. (2022). *DDT, DDE e DDD*.
https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/ToxFAQS_Foreign_Language_PDFs/tfacts35_p_ortuguese.pdf (versão PDF do documento descarregada em 29/07/2022).

- Tripathi, V., Edrisi, S. A., Chaurasia, R., Pandey, K. K., Dinesh, D., Srivastava, R., Srivastava, P., & Abhilash, P. C. (2019). Restoring HCHs polluted land as one of the priority activities during the UN-International Decade on Ecosystem Restoration (2021–2030): A call for global action. *Science of The Total Environment*, 689, 1304–1315. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.06.444>
- Uclés, S., Lozano, A., Sosa, A., Parrilla Vázquez, P., Valverde, A., & Fernández-Alba, A. R. (2017). Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, 174, 72–81. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.05.068>
- UNEP. (2001, Dezembro). *Regionally based assessment of persistent toxic substances: Central and North East Asia regional report* /. 115. <http://digitallibrary.un.org/record/487287/files/central-and-north-east-asia-report.pdf> (versão PDF do documento descarregada em 16/09/2022).
- UniversityAgro. (2022, Janeiro 22). *Chemical composition of plants*. <https://universityagro.ru/en/agrochemistry/chemical-composition-of-plants/> (Acedido em 24/07/2022).
- Wan, J., He, P., Chen, Y., & Zhu, Q. (2021). Comprehensive target analysis for 19 pyrethroids in tea and orange samples based on LC-ESI-QqQ-MS/MS and LC-ESI-Q-ToF/MS. *LWT*, 151, 112072. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112072>
- Wei, H., Wang, J., Li, H. S., Dai, H. G., & Gu, X. J. (2010). Sub-Lethal Effects of Fenvalerate on the Development, Fecundity, and Juvenile Hormone Esterase Activity of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). *Agricultural Sciences in China*, 9(11), 1612–1622. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60258-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60258-3)
- Wu, P., Wang, P., Gu, M., Xue, J., & Wu, X. (2021). Human health risk assessment of pesticide residues in honeysuckle samples from different planting bases in China. *Science of The Total Environment*, 759, 142747. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142747>
- Xiao, J., He, Q., Liu, Q., Wang, Z., Yin, F., Chai, Y., Yang, Q., Jiang, X., Liao, M., Yu, L., Jiang, W., & Cao, H. (2022). Analysis of honeybee exposure to multiple pesticide

- residues in the hive environment. *Science of The Total Environment*, 805, 150292. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150292>
- Yipei, Y., Zhilin, L., Yuhong, L., Meng, W., Huijun, W., Chang, S., & Yan, H. (2022). Assessing the risk of diabetes in participants with DDT DDE exposure- A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*, 210, 113018. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113018>
- Zhang, K., Wong, J. W., Safarpour, H., & Krynitsky, A. J. (2017, Janeiro 7). Important Considerations Regarding Matrix Effects When Developing Reliable Analytical Residue Methods Using Mass Spectrometry. *LCGC North America*, 444–451.
- Zhao, J., Zhang, M., Zhang, W., Liu, F., Huang, K., & Lin, K. (2019). Insight into the tolerance, biochemical and antioxidative response in three moss species on exposure to BDE-47 and BDE-209. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 445–454. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.06.044>
- Zhu, K., Sarvajayakesavalu, S., Han, Y., Zhang, H., Gao, J., Li, X., & Ma, M. (2022). Occurrence, distribution and risk assessment of organophosphate esters (OPEs) in water sources from Northeast to Southeast China. *Environmental Pollution*, 307, 119461. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.119461>
- Zou, X., Hou, S., Wu, S., Liu, K., Huang, R., Zhang, W., Yu, J., Zhan, Z., & Pang, H. (2022). The first detection of organophosphate esters (OPEs) of a high altitude fresh snowfall in the northeastern Tibetan Plateau. *Science of The Total Environment*, 838, 155615. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155615>