



# CERNAS

Centro de Estudos  
de Recursos Naturais,  
Ambiente e Sociedade

## **1º Encontro de Doutorandos e Pós-Doutorados do CERNAS**

**ESAC - Coimbra, 8 de Julho de 2022**

## Indice

Influence of storage conditions on the physicochemical, sensory and microbiological characteristics of hazelnuts.....	5
Characterization and valorization of ovine and caprine cheese whey for value added products	9
Sheep's and goat's frozen yoghurts produced with ultrafiltration whey concentrates .....	12
Extraction of phenolic compounds from cherry seeds .....	16
Smart valorisation of organic side streams for food and feed by the Black Soldier Fly using a circular economy approach .....	20
Study about attitudes, perceptions and knowledge regarding edible insects in Portugal.....	25
Disentangling the metabolic fluxes of black soldier fly for optimized waste bioconversion ..	29
Influence of production mode, organic and conventional, and fruit maturation stage on the composition and quality of sweet pepper, <i>Capsicum annum</i> L.....	33
Bioactive Composition of Pomegranate By-products of Big Full Cultivar .....	34
Eco Valorization of Eucalyptus globulus Bark and Branches through Liquefaction .....	35
Agroecology as a tool towards sustainable food systems transition .....	40
Potential value of <i>Solanum linnaeanum</i> and <i>S. sisymbriifolium</i> for plant-parasitic nematodes management .....	42
Evaluation of multiple pesticides on soil and their impact on food quality – a sustainable framework .....	46
Soil pollution under orchards in central-eastern Portugal: sources, risks and potential solutions .....	50
Efficiency of water use in almond orchards, using emerging technologies.....	54
Phosphorus recovery from municipal solid waste digestate aiming at its valorization as a fertilizer .....	55
Avaliação do ciclo de vida e pegada de carbon do Dendê (Óleo de Palma). Análise de sustentabilidade em áreas degradadas na Amazônia Brasileira .....	60
Runoff generation under eucalypt and pines at the tree to catchment scale.....	64
Avaliação do efeito mitigador do Biochar na disseminação de Genes de Resistência a Antibióticos em chorumes.....	68
Soil carbon dynamics in different agricultural management practices under changing climate in the Mediterranean.....	70
Microplásticos em ambiente urbano – Estudo de caso da cidade de Coimbra .....	75
Human interactions with urban green spaces and implications for well-being in a changing world.....	79
Da Lavoura à Ciência: Uma Cultura Global – Tradução Especializada em Ciências Agrárias: Um Guia de Tradução a Partir do Estudo de Corpus Comparável do Género Textual Artigo Científico.....	83
Perception of clinical analysis laboratory technicians on .....	85
waste management in this sector in São Tomé and Príncipe .....	85

Capabilities for Young Entrepreneurship in Portuguese Rural Territories: designing a place-based diagnostic model through systemic thinking and co-construction.....	89
Conciliação entre a Agricultura e a conservação da biodiversidade .....	93
Estuary Governance in a context of global change: contributions to participatory planning and multilevel management .....	94

# Extraction of phenolic compounds from cherry seeds

**Yuliya Dulyanska<sup>1\*</sup>, Raquel P. F. Guiné<sup>2</sup>, Luísa Cruz-Lopes<sup>3</sup>, Bruno Esteves<sup>4</sup> José Vicente Ferreira<sup>5</sup>, Idalina Domingos<sup>6</sup>, Maria João Lima<sup>7</sup>, Paula M. R. Correia<sup>8</sup>, Manuela Ferreira<sup>9</sup>, Anabela Fragata<sup>10</sup>, Ana Paula Cardoso<sup>11</sup>, Maria João Barroca<sup>12</sup>, Aida Moreira da Silva<sup>13</sup>**

<sup>1\*</sup>[yudulyanska@esav.ipv.pt](mailto:yudulyanska@esav.ipv.pt); <sup>2</sup>[raquelguine@esav.ipv.pt](mailto:raquelguine@esav.ipv.pt); <sup>3</sup>[lvalente@estv.ipv.pt](mailto:lvalente@estv.ipv.pt); <sup>4</sup>[bruno@estgv.ipv.pt](mailto:bruno@estgv.ipv.pt); <sup>5</sup>[jvf@estgv.ipv.pt](mailto:jvf@estgv.ipv.pt); <sup>6</sup>[ijd@estgv.ipv.pt](mailto:ijd@estgv.ipv.pt); <sup>7</sup>[mjoalima@esav.ipv.pt](mailto:mjoalima@esav.ipv.pt); <sup>8</sup>[paulacorreia@esav.ipv.pt](mailto:paulacorreia@esav.ipv.pt); <sup>9</sup>[mmcferreira@gmail.com](mailto:mmcferreira@gmail.com); <sup>10</sup>[afragata@estgl.ipv.pt](mailto:afragata@estgl.ipv.pt); <sup>11</sup>[a.p.cardoso@esev.ipv.pt](mailto:a.p.cardoso@esev.ipv.pt); <sup>12</sup>[mjbarroca@esac.pt](mailto:mjbarroca@esac.pt); <sup>13</sup>[aidams@esac.pt](mailto:aidams@esac.pt)

## Resumo

Os resíduos agroalimentares provaram ser um biorecurso que pode ser usado para obter uma variedade de materiais, ingredientes e produtos químicos valiosos. Neste trabalho foram testadas as condições ótimas para extração de compostos bioativos dos caroços de cereja com diferentes solventes e temperaturas. Os critérios escolhidos basearam-se na capacidade de extração mais eficiente, buscando técnicas mais limpas e com menor impacto no meio ambiente. Alguns solventes de extração foram testados em diferentes combinações e temperaturas. Os extratos obtidos foram avaliados utilizando métodos espectrofotométricos quanto a compostos fenólicos totais, bem como algumas famílias de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos mostraram que a maior extração de compostos fenólicos totais foi a 70 °C com razão água:etanol de 60:40 (% v/v) (2,65 mg GAE/g), enquanto os máximos resultados para flavonoides foram obtidos a 80 °C e solução aquosa etanólica 50% (7,26 mg QE/g). O maior valor para orto-difenóis foi de 21,47 mg GAE/g para 50 °C e solução água:etanol 50:50. As maiores quantidades de proantocianidinas e flavonóis foram obtidas para solução 50:50 a 70 °C (6,43 mg CE/g e 3,88 mg QE/g, respetivamente), enquanto a mesma solução a 80 °C permitiu obter o máximo de ácidos fenólicos (1,68 mg CAE/g). A extração de antocianinas varia significativamente com a concentração e temperatura, sendo mais alta na faixa de 35-40 °C, quando se utiliza uma solução de água:etanol 80:20. Em conclusão, verificou-se que os extratos de caroços de cereja obtidos possuem compostos bioativos relevantes com aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica ou cosmética.

Palavras-chave: Extração, antocianinas, compostos fenólicos, caroço de cereja.

## Abstract

Agri-food waste has proved to be a valuable bioresource that can be used to obtain a variety of valuable materials, ingredients and chemicals. The optimum conditions for extracting bioactive compounds from sweet cherry seeds (SCS) with different solvents and temperatures were tested in this work. The choice criteria were based on the most efficient extracting capacity while looking for cleaner techniques with lower health or environmental impacts. Some extracting solvents were tested in different combinations and temperatures. The obtained extracts were evaluated for total phenolic compounds, as well as some families of phenolics, using spectrophotometric methods.

The results obtained showed that the highest extraction of total phenolic compounds was at 70 °C with 60:40 ratio water:ethanol (2.65 mg GAE/g), while maximum flavonoids were obtained at 80 °C and 50% ethanolic aqueous solution (7.26 mg QE/g). The highest value for ortho-diphenols was 21.47 mg GAE/g for 50 °C and water:ethanol 50:50 solution. The highest proanthocyanidins and flavonols were obtained for 50:50 solution at 70 °C (6.43 mg CE/g and 3.88 mg QE/g, respectively), while the same solution at 80 °C allowed obtaining maximum phenolic acids (1.68 mg CAE/g). The extraction of anthocyanins was found to vary significantly with concentration and temperature, being highest in the range 35–40 °C, when using an 80:20 water:ethanol solution. In conclusion, it was found that extracts obtained from sweet cherry seeds have relevant bioactive compounds that might be applied in the food, pharmaceutical or cosmetic industries.

Keywords: Extraction; anthocyanins; phenolic compounds; cherry seeds.

## Introdução

Os resíduos agroalimentares são um biorecurso valioso que pode originar uma variedade de materiais, ingredientes e produtos químicos convenientes (Lin et al., 2013; Pfaltzgraff et al., 2013), e já foram identificadas oportunidades de aplicação na indústria de transformação alimentar da simbiose industrial na valorização de resíduos. Porque o desperdício alimentar tem um grande potencial para proporcionar benefícios sociais e ambientais, vários países estão a promover estratégias para a sua valorização (Mirabella et al., 2014). Além dos benefícios ecológicos, há também um ganho económico para as empresas, vinculado à integração de ingredientes recuperados nas cadeias de abastecimento de alimentos humanos

(Garcia-Garcia et al., 2019). A cereja doce (*Prunus avium L.*) é amplamente cultivada (Proietti et al., 2019), e os consumidores apreciam muito os frutos devido às suas excelentes características organolépticas (Švarc-Gajić et al., 2018). A pesquisa mostrou que a cereja tem um alto valor nutricional e um importante conteúdo de compostos bioativos (Martínez-Esplá et al., 2014). A produção global de cereja é de cerca de 4,0 milhões de toneladas por ano. A cota na produção de cereja em 2021/2022 nos principais países produtores foi a seguinte: Turquia (21,4%), seguida pela União Europeia (16,6%), China (14,9%), Chile (9,9%) e Estados Unidos (9,8%) (Stone Fruit: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service, 2021).

A indústria de frutas minimamente processadas descarta grandes percentagens de subprodutos, como cascas, sementes ou mesmo polpa que não é utilizada por motivos específicos de qualidade. No entanto, esses resíduos podem apresentar teores semelhantes de compostos bioativos ou até superiores às partes efetivamente utilizadas, como a polpa. Esses compostos bioativos incluem, por exemplo, compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas (Mirabella et al., 2014). Os caroços de cereja resultam do seu processamento para a produção de doces, sumos e geleias. Geralmente, os caroços são considerados como resíduos de produção, o que tem ganhado grande interesse devido aos aspetos ambientais relacionados com a gestão de resíduos. Por outro lado, está bem documentado que os resíduos da produção, como cascas, caroços e bagaço, contêm compostos bioativos de alto valor (Tomson et al., 2020). Os diferentes compostos fenólicos presentes nas matrizes vegetais, apresentam propriedades antioxidantes e podem desempenhar um papel importante na prevenção de formação radicais livres e proteger contra doenças degenerativas. Assim, o presente trabalho centra-se na valorização de caroços de cereja, que são resíduos provenientes de indústrias de fabricação de alimentos. O potencial de extração de vários solventes orgânicos e diferentes condições de extração, nomeadamente tipo de solvente e temperatura, foi investigado de forma a maximizar o rendimento de extração dos compostos bioativos. As substâncias bioativas avaliadas nos extratos foram compostos fenólicos totais e diferentes famílias de compostos fenólicos.

## Material e métodos

Os caroços de cereja para este estudo foram obtidos na Nutrofertil, uma empresa de gestão de resíduos, localizada em Tondela, no distrito de Viseu (Portugal). As amostras foram pré-secas ao sol, moídas num moinho de facas Retsch SMI (Retsch GmbH, Haan, Alemanha) e crivadas posteriormente num crivo Retsch AS200 (Retsch GmbH, Haan, Alemanha) com agitação mecânica durante 30 min a 50 rpm. A fração acima de 0,425 mm (> 35 mesh) foi secada numa estufa durante 24 horas a 40 °C, para uma melhor conservação durante o armazenamento até à utilização posterior.

Foi efetuada uma experiência preliminar (fase 1) a fim de determinar o melhor método de extração para novos ensaios. As extrações preliminares foram efetuadas à temperatura ambiente sob agitação magnética usando diferentes solventes de extração: metanol, água e solução água-etanol 50:50 (% v:v). Uma outra extração foi realizada com água em banho ultrassónico. Com base nos resultados da fase 1, as experiências seguintes (fase 2) foram efetuadas com base numa metodologia semelhante, mas diferentes condições de processamento, nomeadamente o solvente de extração foi agora reduzido a misturas de água:etanol em várias proporções (50:50; 60:40; 80:20; 100:0 (% v:v)) e a extração foi realizada a diferentes temperaturas (35 °C, 50 °C, 70 °C e 80 °C), sempre sob agitação magnética durante 40 minutos. Alguns ensaios complementares foram feitos para investigar melhor os resultados obtidos para as antocianinas e compostos fenólicos totais.

Para determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais usou-se o método de Folin-Ciocalteu. A absorvância foi medida em 760 nm e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g). A determinação de antocianinas foi realizada em meio ligeiramente ácido na faixa de

comprimento de onda de 490-550 nm (Khoddami et al., 2013) e o teor de antocianinas no extrato foi expresso em microgramas de equivalentes de malvidina-3-glicosídeo (Mv3G) por grama de amostra ( $\mu\text{g Mv3G/g}$ ) (Matos, 2015). A determinação de proantocianidinas (taninos condensados) foi realizada por meio do ensaio de vanilina (Butler et al., 2002). A absorvância foi medida a 500 nm e os resultados expressos como miligramas equivalentes de catequina por grama ( $\text{mg CE/g}$ ). O cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) foi utilizado para quantificar o teor de flavonoides (Costa, 2018). O teor de ortodifenóis foi determinado colorimetricamente pela complexação dos ortodifenóis com os íons molibdato (Maestro Durán et al., 1991). A determinação de ácidos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método de Arnov, medindo absorvância a 490 nm do complexo formado entre ácidos fenólicos e molibdato de sódio - nitrito de sódio como equivalente ao ácido caftárico. A quantificação de flavonóis foi realizada a 440nm, e os resultados finais foram apresentados em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra ( $\text{mg QE/g}$ ). Todos os resultados foram calculados como valor médio e desvio padrão de três réplicas de medições espectrofotométricas para cada amostra.

## Resultados e discussão

Analisando os resultados obtidos para os compostos fenólicos totais, antocianinas e flavonoides nos extratos obtidos no ensaio preliminar (fase 1), verificou-se que os solventes mais eficientes para a recuperação dos polifenóis foram a água ou então mistura de água e etanol, utilizando agitação magnética (extraíndo aproximadamente 1,3 mg GAE/g em ambos os casos e sem diferenças estatisticamente significativas entre eles). As condições de extração menos interessantes foram água com agitação por ultrassons ou metanol com agitação magnética. O metanol também foi ineficiente na extração de flavonoides, que foram máximos para soluções de 50% água:etanol ( $1,04 \pm 0,06 \text{ mg QE/g}$ ). Por outro lado, o metanol extraiu a maior quantidade de antocianinas, mais de 250  $\mu\text{g Mv3G/g}$ . Estes resultados indicaram as condições mais adequadas para serem utilizadas nas seguintes experiências.

Os resultados das experiências realizadas na fase 2 mostram que a melhor proporção para recuperar compostos fenólicos totais a 35°C foi água:etanol 50:50 ( $1,54 \pm 0,14 \text{ mg GAE/g}$ ) sem diferenças significativas para a proporção 60:40 ( $1,41 \pm 0,01 \text{ mg GAE/g}$ ). Observou-se que um maior teor de água reduz significativamente os compostos fenólicos totais no extrato. Em termos globais verificou-se que o aumento da temperatura, bem como o aumento da percentagem de etanol, produz elevadas concentrações de flavonoides, sendo máximas a 80 °C e 50:50 ( $7,26 \pm 0,05 \text{ mg QE/g}$ ). De notar que a amostra com a maior quantidade de ortodifenóis ( $21,47 \pm 0,40 \text{ mg DE GAE/g}$ ) foi obtida a 50 °C e a solução mais eficiente foi água:etanol 50:50. As melhores condições para maximizar a concentração de proanthocyanidinas foram a temperatura de 70 °C e relação água:etanol 50:50 ( $6,43 \pm 0,38 \text{ mg CE/g}$ ), embora não significativamente diferente da relação 60:40. A temperatura menos eficiente para a extração de flavonóis foi de 50 °C em todas as concentrações e o valor mais elevado foi alcançado com uma solução de 50:50 a 70 °C (cerca de 4 mg QE/g). Relativamente à quantidade de ácidos fenólicos, a extração a 70 °C e 80 °C apresentou um resultado de rendimento significativo em comparação com os resultados da extração a 35 °C e 50 °C. A quantidade mais elevada foi obtida a 80 °C com a solução água:etanol 50:50 ( $1,68 \pm 0,05 \text{ mg CAE/g}$ ).

No que diz respeito aos resultados da extração de antocianinas totais, observou-se que o teor máximo foi de  $66,08 \pm 0,49 \mu\text{g Mv3G/g}$  a 35 °C e utilizando uma solução com uma relação 80:20. Para confirmar estes dados, realizou-se um teste confirmatório, para o qual foi escolhida a relação 80:20 água:etanol e a extração foi efetuada a temperaturas diferentes em torno de 35 °C (variando de 30 a 45 °C). Tal como anteriormente observado para a temperatura de 35 °C, foi obtido um aumento ainda maior da quantidade extraída a 40°C ( $125,37 \pm 3,90 \mu\text{gMV3G/g}$ ), que parece ser a melhor temperatura para a extração de antocianinas.

## Conclusões

Este trabalho mostrou que a extração com solução água:etanol 50:50 foi mais eficiente para a maioria das famílias de compostos fenólicos estudados, apenas com exceção dos compostos fenólicos totais (a melhor razão foi de 60:40) e antocianinas (a melhor razão foi de 80:20). Atualmente procura-se a utilização de métodos de extração menos impactantes no ambiente, numa abordagem mais sustentável, que permita a recuperação máxima de compostos bioativos utilizando solventes ecologicamente corretos e custos mínimos de processamento. Os extratos de compostos bioativos obtidos a partir de caroço de cereja podem encontrar outras aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica ou cosmética, contribuindo assim para a eco-valorização dos resíduos agrícolas ou industriais e para os princípios da economia circular.

## Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto VALCER (PROJ/IPV/ID&I/021). Este trabalho foi suportado pela FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia. Os autores agradecem aos centros de investigação CERNAS (UIDB/00681/2020), CI&DEI (UIDB/05507/2020) e UCISA:E (UIDB/00742/2020) e ao Instituto Politécnico de Viseu.

## Referências bibliográficas

- Butler, L. G., Price, M. L., & Brotherton, J. E. (2002, May 1). Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf00114a020>
- Costa, É. A. da. (2018). Desenvolvimento de um método de análise de catequina e quercetina em extratos de espécies vegetais e fitoterápicos. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/23961>
- Garcia-Garcia, G., Stone, J., & Rahimifard, S. (2019). Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. *Journal of Cleaner Production*, 211, 1339–1356. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.269>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., Koutinas, A. A., Kopsahelis, N., Stamatelatos, K., Dickson, F., Thankappan, S., Mohamed, Z., Brocklesby, R., & Luque, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6(2), 426–464. <https://doi.org/10.1039/C2EE23440H>
- Maestro Durán, R., Borja Padilla, R., Martín, A., Fiestas Ros de Ursinos, J. A., & Alba Mendoza, J. (1991). Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Grasas y Aceites* 42 (4), 271–276 (1991). <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/8315>
- Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., & Serrano, M. (2014). Preharvest Application of Oxalic Acid Increased Fruit Size, Bioactive Compounds, and Antioxidant Capacity in Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(15), 3432–3437. <https://doi.org/10.1021/jf500224g>
- Matos, S. R. (2015). Influência da localização geográfica de produção nas propriedades de mirtilos “*Vaccinium Corymbosum* L.” cv Bluecrop. <https://repositorio.ipv.pt/handle/10400.19/3222>
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>
- Pfaltzgraff, L. A., Bruyn, M. D., Cooper, E. C., Budarin, V., & Clark, J. H. (2013). Food waste biomass: A resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, 15(2), 307–314. <https://doi.org/10.1039/C2GC36978H>
- Proietti, S., Moscatello, S., Villani, F., Mecucci, F., Walker, R. P., Famiani, F., & Battistelli, A. (2019). Quality and Nutritional Compounds of *Prunus Cerasus* L. Var. *Austera* Fruit Grown in Central Italy. *HortScience*, 54(6), 1005–1012. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13960-19>
- Stone Fruit: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service. (n.d.). Retrieved August 7, 2021, from <https://www.fas.usda.gov/data/stone-fruit-world-markets-and-trade>
- Švarc-Gajić, J., Cerdà, V., Clavijo, S., Suárez, R., Mašković, P., Cvetanović, A., Delerue-Matos, C., Carvalho, A. P., & Novakov, V. (2018). Bioactive compounds of sweet and sour cherry stems obtained by subcritical water extraction. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(6), 1627–1635. <https://doi.org/10.1002/jctb.5532>
- Tomsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., & Cinkmanis, I. (2020). Characterization of dried horseradish leaves pomace: Phenolic compounds profile and antioxidant capacity, content of organic acids, pigments and volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 246(8), 1647–1660. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03521-z>