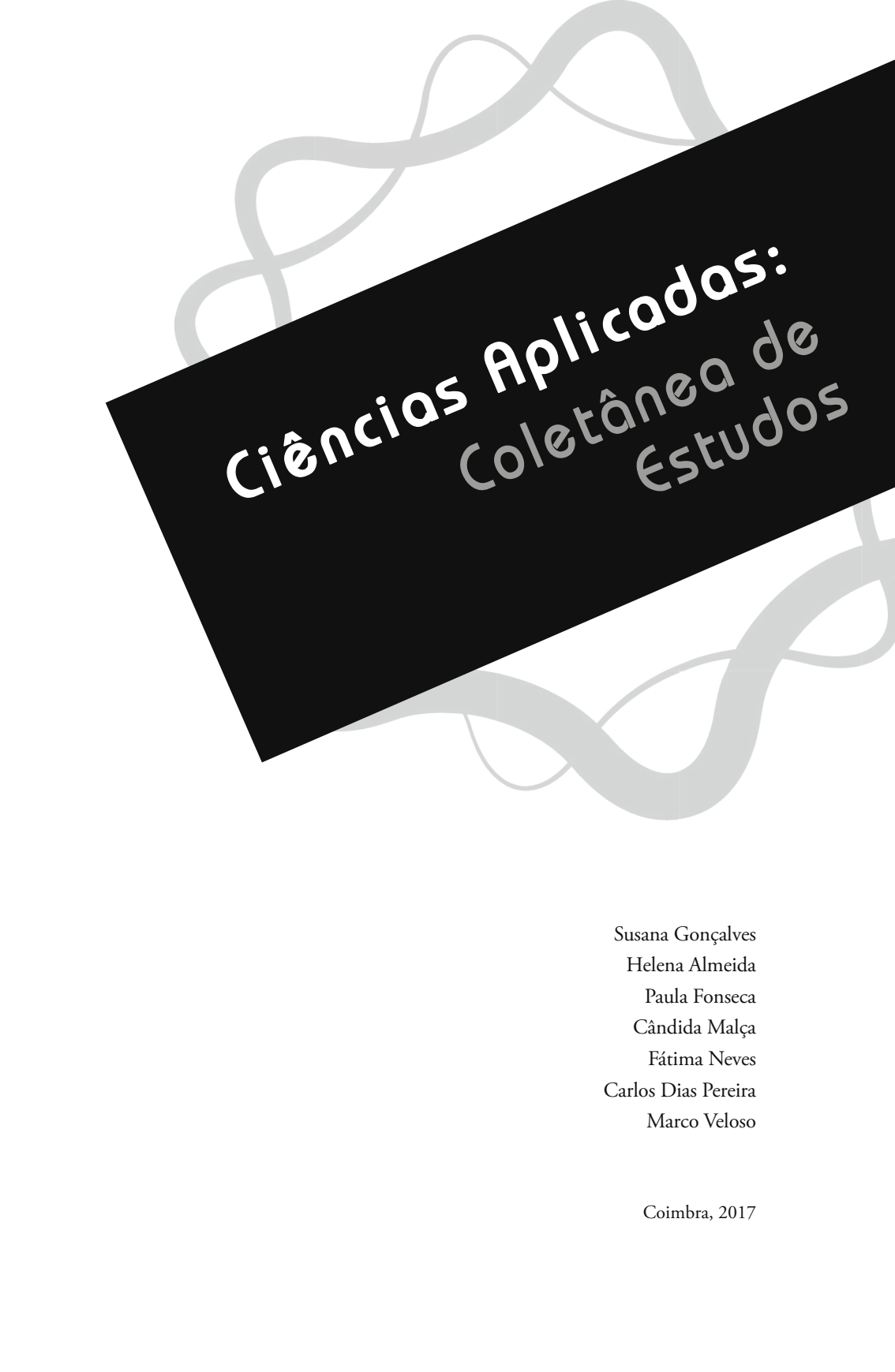


Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação

Susana Gonçalves
Helena Almeida
Paula Fonseca
Cândida Malça
Fátima Neves
Carlos Dias Pereira
Marco Veloso

Ciências Aplicadas:
Coletânea de
Estudos



Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Susana Gonçalves

Helena Almeida

Paula Fonseca

Cândida Malça

Fátima Neves

Carlos Dias Pereira

Marco Veloso

Coimbra, 2017

Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

*Coord. Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida
Malça, Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso*

ISBN: 978-989-99463-0-9 (impresso)

ISBN: 978-989-99463-1-6 (ebook)

©2017, CINEP/IPC

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte deste livro pode ser impressa, fotocopiada, ou reproduzida ou utilizada de alguma forma ou por meio mecânico, eletrónico ou outro, ou em qualquer espaço de armazenamento de informação ou sistema de busca eletrónico sem permissão por escrito dos editores.

Paginação, grafismo e capa: MediaLab/CINEP

Foto da capa: Susana Gonçalves

Impressão: Várzea da Rainha, Lda

Depósito Legal:



www.cinep.ipc.pt
cinep@ipc.pt

Índice

Nota Introdutória	7
Parte 1. Domínio das Ciências da Educação e do Desporto	9
Integrar desenvolvimento pessoal com aprendizagens académicas e profissionais: Um estudo qualitativo através de uma unidade curricular no ensino superior	
Joana Pereira Teixeira e Nuno Conceição	11
Aprender com Projetos de Investigação, o seu Papel como Ferramenta Educacional	
Marta Henriques e António Ferreira	37
Uma abordagem multidisciplinar para o ensino de técnicos em jogos desportivos coletivos	
Filipe Manuel Clemente, Fernando Manuel Lourenço Martins e Rui Sousa Mendes	57
Parte 2. Domínio das Ciências Agrárias e Alimentares	81
Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais à Base de Tomilho Bela-luz: um Projeto com Reconhecido Interesse para a Indústria Alimentar e para o Consumidor	
Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David Gomes, Marta Henriques, Fernanda M. Ferreira e Carlos Dias Pereira	83
Parte 3. Domínio das Ciências da Saúde	111
Disruptores Endócrinos: um Problema de Saúde Pública e Animal	
Ana Paula Gomes Fonseca	113
Estudo QSAR 3D de complexos tricarbonilo de Re E Tc com afinidade estabelecida para os recetores 5HT_{1A}	
Zélia Barbosa	147

Como o cérebro processa a informação semântica em indivíduos com e sem Perturbações do Processamento Auditivo (Central): da investigação ao ensino e à prática clínica

Carla Matos Silva, Maria Armanda Costa e Isabel Barahona da Fonseca 165

Irradiação da linha celular de linfoma difuso de grandes células B em dose única efeitos celulares e moleculares

Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Tiago Sales, Ricardo Teixo, Rita Silva, Jéssica Estrela, Mafalda Laranjo, João Casalta-Lopes, Clara Rocha, Paulo César Simões, Ana Bela Sarmento, Maria Filomena Botelho e Manuel Santos Rosa 189

Parte 4. Domínio das Engenharias 233

Iluminação do Centro Histórico da Aldeia de Casteição: Proposta de Intervenção

Patrícia Santos e Abreu 235

Autoaprendizagem com Projetos de I&D: Estudo de Caso no Âmbito das Infraestruturas de Transporte

Silvino Dias Capitão 257

Projeto PhISEC: 8 anos de Ensino de Engenharia Aplicada

Pedro Ferreira e Carlos Alcobia 277

Coordenadores 293

Nota Introdutória

Esta publicação tem como propósito divulgar estudos de investigação aplicada conduzidos, individualmente ou em equipas de investigação, por docentes do Instituto Politécnico de Coimbra (IPC). Os estudos apresentados distribuem-se por vários domínios científicos, ilustrando bem a diversidade de áreas de investigação desenvolvidas no IPC.

Alguns dos capítulos relatam processos de investigação aplicada desenvolvidos ao longo de vários anos, com participação de vários docentes do IPC e de outras instituições; outros descrevem estudos feitos com o envolvimento direto de estudantes, ilustrando o potencial da articulação entre os processos de investigação e de ensino; finalmente, outros capítulos apresentam estudos financiados por entidades de apoio à investigação ou por entidades da comunidade. Muitos destes trabalhos respondem a problemas singulares da sociedade pela proposta de soluções aplicáveis que beneficiarão a comunidade em geral ou, concretamente, a necessidades de entidades específicas que equacionaram os problemas e solicitaram o estudo. Em qualquer dos casos, trata-se de estudos com impacto relevante e efetivo na vida quotidiana, procurando cumprir uma das missões fundamentais do ensino superior politécnico que é a sua proximidade à comunidade e a problemas concretos das entidades, empresas e organizações com quem estabelece sinergias e cooperação.

Os estudos incluídos neste livro estão organizados em domínios científicos e técnicos pluridisciplinares, a saber: Ciências da Educação e do Desporto, Ciências Agrárias e Alimentares, Ciências da Saúde e Engenharias.

Com esta coletânea de estudos, o CINEP procura contribuir para a difusão do conhecimento científico atual que está a ser produzido no IPC e para o avanço das ciências aplicadas.

Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira & Marco Veloso



Parte 1

Domínio das Ciências da
Educação e do Desporto

**Integrar desenvolvimento pessoal com
aprendizagens académicas e profissionais:
Um estudo qualitativo através de uma
unidade curricular no ensino superior**

Joana Teixeira e Nuno Conceição

Artigo integrado na

Parte 1 "Domínio das Ciências da Educação e do Desporto"
da publicação.

Páginas do artigo

11 a 35

Título da Publicação

Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação

Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação

Fevereiro de 2017

Editor

CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Joana **Teixeira**

Mestre em Psicologia Clínica, tendo-se especificado no ramo da Psicoterapia Cognitiva-Comportamental e Integrativa. Na área clínica focou-se sobretudo no trabalho com crianças e adolescentes, tendo prática de acompanhamento psicológico e intervenção comunitária com estas populações. Na área da investigação tem como principal trabalho, a sua dissertação de Mestrado, intitulada: “O que estão estudantes de Psicologia Clínica e Enfermagem a desenvolver? Estudo qualitativo sobre o desenvolvimento pessoal, mudança e fatores influenciadores”.

Nuno **Conceição**

Doutorado em Psicologia Clínica, e Professor Auxiliar Convidado na Faculdade de Psicologia da Universidade de Lisboa, e Psicoterapeuta Integrativo. Principais interesses de investigação: Estratégias Gerais, Princípios Gerais e Mecanismos de Mudança em Psicoterapia, Tomada de Decisão Clínica em Psicoterapia Integrativa; Integração em Perturbação Dissociativa de Identidade; Treino de Psicoterapeutas e de Investigadores.



Integrar desenvolvimento pessoal com aprendizagens académicas e profissionais: Um estudo qualitativo através de uma unidade curricular no ensino superior

Joana Teixeira e Nuno Conceição

Enquadramento Teórico

Treino e Desenvolvimento de Profissionais

Treinar e desenvolver profissionais pode promover aprendizagem, que é considerada um processo de maturação intelectual, social e emocional, de mudança de comportamento, de descoberta de significado, de desenvolvimento de competências, de interligação de processos e resultados finais (e.g. Joy-Matthews, Megginson, & Surtees, 2004; Michael & Modell, 2003). Lindgren e Fisk (1976) referem-se ao processo de educação como o conjunto de situações que permite, facilita e estimula a aprendizagem. Percebe-se, assim, que a aprendizagem não é a mera aquisição de competências específicas, mas o desenvolvimento aos mais diversos níveis. Rønnestad e Skovholt (2003) abordam o conceito de desenvolvimento como uma mudança no funcionamento humano, que envolve algum tipo de mudança e uma continuidade ao longo do tempo.

Desenvolvimento profissional

Segundo Orlinsky *et al.*, (2005) e Rønnestad e Skovholt (2003), o desenvolvimento de profissionais implica o aumento progressivo das competências e capacidades envolvidas em todas as facetas do seu trabalho. Este é um processo longo, lento, contínuo e, por vezes, errático, que se



desenrola ao longo de toda a carreira e conduz à construção de uma identidade profissional.

Rønnestad e Skovholt (2003) identificam inclusive seis fases do desenvolvimento de profissionais para dar expressão a esta continuidade, a este processo, que tende a ser para a vida. Folkes-Skinner, Elliot e Wheeler (2010) referem que o início do treino é o período durante o qual os estudantes sofrem mudanças mais drásticas ao nível do seu crescimento e onde há mais potencial para se desenvolverem. Salienta-se que este é um período com algumas lacunas ao nível da literatura, importando investigar o desenvolvimento nas fases iniciais, logo ao nível do ensino superior.

Desenvolvimento profissional de estudantes

Tal como Dennhag e Ybrandt (2013), diversos estudos referem que o treino promove, efetivamente, o desenvolvimento de competências.

Espera-se que com treino intensivo, os estudantes inexperientes ao nível da prática, progridam na aprendizagem das competências técnicas e profissionais, uma vez que têm um maior potencial para a mudança, uma maior motivação que tornam o processo mais rápido (e.g. Bennett-Levy & Beedie, 2007).

Por outro lado, diversos autores referem que as dificuldades percecionadas pelos próprios estudantes têm sido pouco investigadas (e.g. Beutler *et al.*, 2004; Orlinsky & Rønnestad, 2005). No entanto, estas são importantes para perceber como se pode melhorar o treino de profissionais.

Os fatores referidos na literatura como influenciadores do processo de aprendizagem e de desenvolvimento em estudantes do ensino superior são diversos. Passam pela capacidade de combinar as experiências da vida pessoal com as da vida profissional, pela importância de aplicar práticas de autocuidado, pela utilização de qualidades e recursos pessoais, pela motivação, pelas metodologias de ensino utilizadas e pelas relações interpessoais estabelecidas (e.g. Clegg & Bufton, 2008; Lindgren & Fisk, 1976; Orlinsky

& Rønnestad, 2005; Simons, Dewitte, & Lens, 2004).

É de notar ainda que em estudos de Howard, Inman, e Altman (2006) e Hill, Sullivan, Knox e Schlosser (2007), em que são abordados os incidentes críticos, momentos significativos de aprendizagem que influenciam o desenvolvimento dos estudantes. Alguns dos incidentes críticos apontados são a luta com o autoconhecimento e a autoeficácia enquanto profissionais, as preocupações em relação a assumir o papel de profissional, e o equilíbrio entre as expectativas e a realidade.

Desenvolvimento Pessoal

Rogers (1985, p.249) afirmou: “cheguei à conclusão de que a única coisa que se aprende de modo a influenciar significativamente o comportamento é um resultado da descoberta de si, de algo que é captado pelo indivíduo”.

Já Pascual-Leone *et al.* (2012) abordam o conceito de desenvolvimento pessoal como o crescimento do *self* numa esfera privada, a um nível intrapessoal, feito das experiências internas dos indivíduos, quer ao longo do processo de treino quer ao longo da sua carreira profissional.

Edmunds e Richardson (2009) acrescentam ainda que o desenvolvimento pessoal pode ser composto pelas mudanças dos estudantes enquanto pessoas, durante a sua educação a nível superior. Sanford (1969, tal como citado por Leung, 2013) salienta como aspeto do desenvolvimento pessoal uma organização de complexidade que envolve o indivíduo como um todo. As suas emoções, cognições e comportamentos são inseparáveis e estão em interação. É, como o desenvolvimento profissional, um processo contínuo e progressivo, composto por uma sucessão de mudanças que refletem a interação entre o indivíduo e o ambiente que o rodeia.

Na literatura de estudos sobre o desenvolvimento de estudantes são mencionadas diversas características que devem estar presentes durante o processo de desenvolvimento pessoal: a capacidade de reflexão e autorreflexão;

as relações interpessoais que o indivíduo estabelece; a mudança na forma como estas se desenrolam ou são percecionadas; a promoção de competências sociais, relacionais e comunicacionais; o aumento da empatia com o outro; o desenvolvimento de uma identidade pessoal e profissional e a sua integração; a promoção de confiança, de autoestima, de automonitorização, de autoconhecimento; a autorregulação emocional; a criatividade; a flexibilidade; o aumento da abertura à experiência; a capacidade de *insight*, e o desenvolvimento de um pensamento original, independente e flexível; o crescimento intelectual (e.g. Clegg & Bufton, 2008; Cord & Clements, 2010; Dreher, Feldman, & Numan, 2014; Edmunds & Richardson, 2009; Lindgren & Fisk, 1976; Leung, 2013; Pascual-Leone *et al.*, 2012, 2013; Rønnestad & Skovholt, 2003). Sublinham-se ainda fatores que promovem o desenvolvimento pessoal, como o confronto com perspetivas diferentes das do próprio, o encorajamento e o contacto com profissionais mais experientes, colegas, amigos e familiares, e as experiências da vida pessoal, bem como momentos de terapia pessoal e de supervisão (e.g. Ewen, Rowles, & Watkins, 2012; Leijen & Kullasepp, 2013; Orlinsky & Rønnestad, 2005).

Importância do desenvolvimento pessoal para o desenvolvimento profissional

Apesar de diversos autores indicarem o papel fundamental do desenvolvimento pessoal de estudantes e futuros profissionais (e.g. Hill *et al.*, 2007; Pascual-Leone *et al.*, 2012; Rønnestad & Skovholt, 2003) pouco se sabe sobre as experiências internas subjetivas dos estudantes durante o seu período de aprendizagem.

Assim, consideram-se várias fontes de evidência a favor da importância do desenvolvimento pessoal para o desenvolvimento profissional. Segundo Orlinsky e Rønnestad (2005), da perspetiva da maioria dos terapeutas, a psicoterapia é uma questão, não apenas de procedimentos, mas também de como é feita e de quem a faz. E, numa relação terapêutica, aqueles que participam nela fazem-no e experienciam-no enquanto pessoas, havendo uma

participam nela fazem-no e experienciam-no enquanto pessoas, havendo uma influência da forma relacional utilizada e da afetividade pessoal na resposta aos pacientes. Theriault e Gazzola (2005) referem que as qualidades pessoais dos terapeutas parecem até ser mais cruciais do que as técnicas interventivas. E Totton (2006) chega mesmo a afirmar que os terapeutas dependem mais da experiência, intuição e sensibilidade humana do que das técnicas ou da perícia. Efetivamente, a maioria das abordagens modernas de terapia serão baseadas na noção de que o autoconhecimento contribui para a eficácia profissional e o bem-estar pessoal (e.g. Orlinsky *et al.*, 2005; Vasco *et al.*, 1993).

Rogers (1985, p.253) defende que o treino em psicoterapia “é uma aprendizagem que provoca uma modificação, quer seja no comportamento do indivíduo, na orientação da ação futura que escolhe ou nas atitudes e personalidade. É uma aprendizagem penetrante, que não se limita a um aumento de conhecimentos, mas que entranha profundamente em todas as parcelas da sua existência.”.

Com efeito, diversos autores apontam o treino na área da psicoterapia como promotor do desenvolvimento do *self*. Ou seja, ao aprender a cuidar do outro, aprende-se a cuidar de si próprio. As novas competências e capacidades são utilizadas para promover o desenvolvimento pessoal do terapeuta. De facto, vários estudos (Hill *et al.*, 2007; Folkes-Skinner *et al.*, 2010; Pascual-Leone *et al.*, 2012; Rønnestad & Skovholt, 2003) mostram que estudantes na área da psicoterapia se podem desenvolver a nível pessoal, adquirindo e enaltecendo diversas características.

Daí que, segundo Pascual-Leone *et al.* (2013), enquanto aprender técnicas de intervenção se revela muito importante para o desenvolvimento profissional, é também essencial perceber qual o impacto do treino e da aprendizagem no domínio pessoal dos estudantes. Isto, para que se possa encontrar formas mais eficazes de treino e de prática e estabelecer objetivos realistas para o desenvolvimento de profissionais. E, ainda, prevenir sentimentos de incompetência, inadequação, *stress*, ansiedade e *burnout*, comumente experienciados entre estudantes, mas também em profissionais, sobretudo

na área dos cuidados (aqueles que trabalham nas áreas da saúde, dos serviços humanos, da educação, ou seja, o trabalho com os outros e no cuidado aos outros (Norcross, 2010)).

Deste modo, o desenvolvimento pessoal parece ser crucial no treino de futuros terapeutas ou até profissionais na área dos cuidados em geral, porque fornece ferramentas que serão de extrema importância na prática profissional. Hill, Stahl e Roffman (2007) referem mesmo que, inicialmente, no treino de terapeutas, é mais importante haver um foco do estudante em si próprio do que no trabalho com os clientes. Desta forma, poderá promover-se o autoconhecimento, a automonitorização e a auto-consciencialização, essenciais para a prática clínica. Finalizando, segundo Leijen e Kullasepp (2013) o treino deve promover a desconstrução do *self* de forma a enquadrar o *self* pessoal com o *self* profissional, e deve criar ferramentas conceptuais para que esta integração possa ser realizada. Assim, em que medida a multiplicidade de *selves* do estudante universitário de psicologia clínica (ou mesmo de outras áreas de cuidados como enfermagem, ensino ou medicina) é explicitamente contemplada e estimulada, parece ser um foco de investigação claramente relevante.

Metodologia

Questão de Investigação

Considerando a literatura, a presente investigação questiona “Qual o impacto de uma Unidade Curricular (UC) semestral para o desenvolvimento de estudantes na área de Psicologia Clínica?”. A partir desta questão derivam outras duas: “Qual o impacto e as mudanças experienciadas a nível profissional, e sobretudo a nível pessoal?” e “Quais os fatores que influenciaram estes processos de desenvolvimento profissional e pessoal?”.



Objetivos da investigação

1. Compreender o potencial de impacto de um semestre letivo no desenvolvimento académico/profissional e pessoal de estudantes de Psicologia Clínica, com o foco principal no contributo de uma UC semestral específica.
2. Perceber se estes estudantes, ainda sem prática clínica, passam por processos de desenvolvimento pessoal, durante o semestre em que esta UC ocorreu.
3. Descrever quais as mudanças mais significativas ao nível do desenvolvimento pessoal durante esse período de tempo.
4. Analisar quais os fatores que influenciam, tanto facilitando como inibindo, o desenvolvimento académico/profissional e pessoal de estudantes de Psicologia Clínica.

Participantes

A amostra compôs-se por estudantes do 4º ano do Mestrado Integrado em Psicologia, da Faculdade de Psicologia da Universidade de Lisboa, com frequência e aprovação na UC Estudo de Casos em Psicoterapia com Adultos. A UC pretende promover a aquisição de competências e atitudes sobre a intervenção psicoterapêutica com adultos com diversos tipos de perturbações, e uma reflexão clínica sobre casos específicos fazendo a ponte para a integração em psicoterapia. A utilização de uma abordagem cognitivo-comportamental numa perspetiva transdiagnóstica serve de pretexto para ensinar integração em psicoterapia, numa perspetiva transteórica. As atividades em sala de aula, bem como a avaliação contínua e final desta UC, promovem ativamente a integração do *self* pessoal com o *self* profissional.

Esta amostra foi escolhida pela facilidade de acesso para os investigadores; por constituir uma população estudantil; e pela área de estudos ser equivalente

a uma profissão de potenciais futuros cuidadores. É constituída por 18 participantes caucasianos e de nacionalidade portuguesa (14 do sexo feminino), que responderam de forma completa às perguntas, e com idades compreendidas entre os 21 e os 46 anos (idade média de 25 anos).

Procedimentos de Recolha de Dados

A recolha dos dados foi realizada após a atribuição das classificações da UC, de forma a que as respostas não fossem alvo de desejabilidade social.

Garantindo o anonimato, a participação voluntária e a caracterização sociodemográfica de todos os participantes, com recurso à plataforma *online Qualtrics*, foi pedido aos mesmos que respondessem de forma detalhada, reflexiva e específica a seis questões de resposta aberta (Apêndice A). Estas procuram explorar e avaliar as experiências de aprendizagem e desenvolvimento profissional e pessoal, de estudantes universitários ao longo de um semestre bem como a influência da UC. As perguntas foram desenvolvidas pelos investigadores, numa adaptação de questões utilizadas por Pascual-Leone *et al.* (2012, 2013):

O que é que consigo fazer que não conseguia antes de frequentar esta Unidade Curricular?

Que qualidades desenvolvi ao longo desta UC, enquanto psicólogo(a) em formação?

Quais são algumas áreas em que encontrei dificuldades ao longo desta UC, enquanto psicólogo(a) em formação?

Como é que esta UC me afetou/influenciou a nível pessoal? Pode ter alterado as minhas perceções em relação a mim, aos outros, ou às relações que estabeleço; se sim, como?

Há algum(ns) aspeto(s) na sua experiência de aprendizagem, durante este semestre, que o(a) tenham ajudado particularmente no seu desenvolvimento enquanto psicólogo(a) em formação?

Há algum(ns) aspeto(s) na sua experiência de aprendizagem, durante este semestre, que tenham dificultado ou impedido o seu desenvolvimento enquanto psicólogo(a) em formação?



Procedimentos de Análise de Dados

O procedimento adotado foi a Análise Temática (Braun & Clarke, 2006), um método qualitativo, analítico, flexível, que pode ser aplicado independentemente de abordagens teóricas ou epistemológicas.

A análise foi conduzida através de 5 momentos que se interligam e influenciam: (1) utilizando como recurso o *software* NVivo 10, procedeu-se a uma codificação inicial dos dados, dividindo-os e agrupando-os em categorias; (2) agruparam-se as categorias em potenciais temas (captam e apreendem o que é importante em relação à questão de investigação), reagrupando-se todos os dados relevantes nos temas ou categorias superiores; (3) definiram-se as categorias superiores, bem como as categorias de nível inferior (subcategorias), anteriormente criadas, a partir do conteúdo semântico das respostas fornecidas; (4) reagruparam-se e renomearam-se as subcategorias e as categorias, após uma segunda análise de todos os dados, tendo em mente a questão de investigação, os objetivos do estudo e a literatura; (5) reviu-se a análise dos dados, um ano após a recolha e análise dos dados iniciais, sujeitando-os a um novo reagrupamento de forma a aumentar a coesão dos resultados.

Resultados e Discussão

Foram encontradas cinco categorias superiores, *Competências e conhecimentos académicos adquiridos*, *Dificuldades sentidas*, *Desenvolvimento pessoal*, *Fatores promotores da aprendizagem e do desenvolvimento* e *Fatores dificultadores da aprendizagem e do desenvolvimento*. É de salientar que os resultados são apresentados na íntegra em formato gráfico, discutindo-se apenas os mais relevantes.

A categoria superior *Competências e conhecimentos académicos adquiridos* (n = 16) reporta mudanças, aprendizagens e ganhos a nível de conhecimentos e competências.

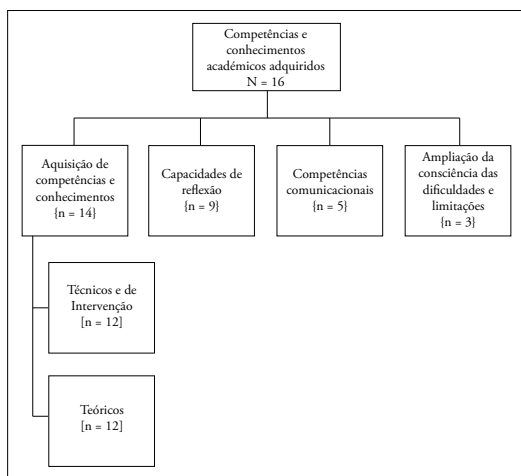


Figura 1. Categoria superior Competências e conhecimentos académicos adquiridos e subcategorias

Emergiu desta a subcategoria *Aquisição de competências e conhecimentos* ($n = 14$), considerada muito relevante¹, da qual surgem duas subcategorias, consideradas relevantes, *Técnicos e de Intervenção* ($n = 12$) - ganhos e aprendizagens de técnicas e ferramentas para a intervenção - e *Teóricos* ($n = 12$) - aprendizagens e ganhos de conhecimento teórico.

Estes resultados vão ao encontro da literatura (e.g Bennett-Levy & Beedie, 2007), corroborando que o treino pode promover a aquisição de competências técnicas e de intervenção.

A segunda subcategoria a surgir, como relevante, designa-se *Capacidades de reflexão* ($n = 9$) e reflete o ganho da capacidade de busca contínua e focada pela compreensão do próprio e dos outros, e dos fenómenos e processos com que os estudantes se deparam (Rønnestad & Skovholt, 2003).

¹ $n = 1$ a $n = 6$ categoria pouco relevante; $n = 7$ a $n = 12$ categoria relevante; $n = 13$ a $n = 18$ categoria muito relevante.



A literatura mostra que estas competências de reflexão são fundamentais para o desenvolvimento, tanto profissional como pessoal de estudantes e profissionais (e.g. Denhag & Ybrandt, 2013; Leung, 2013),

A categoria superior *Dificuldades sentidas* (n = 18) engloba todas as dificuldades experienciadas pelos estudantes.

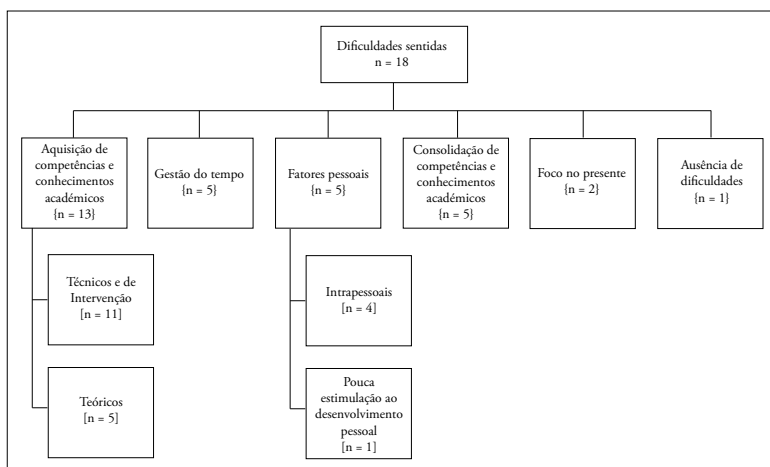


Figura 2. Categoria superior Dificuldades sentidas e subcategorias

Neste tema foi encontrada uma subcategoria relevante, *Aquisição de competências* e conhecimentos académicos (n = 13), sugerindo dificuldades ao nível do ganho e aprendizagem de conhecimentos e competências. Foi ainda encontrada uma subcategoria, *Técnicos e de intervenção* (n = 11), descrevendo dificuldades na aprendizagem de técnicas e ferramentas de intervenção.

Estes resultados podem sugerir a existência de incidentes críticos, tal como definidos por Howard, Inman e Altman (2006), como momentos significativos de aprendizagem ou pontos de viragem, que assumem uma contribuição significativa para o crescimento académico/profissional. Sank e Prout (1978, tal como citado por Howard, Inman e Altman, 2006)

conceptualizam diversos incidentes críticos em terapeutas principiantes, por exemplo a aprendizagem de novas técnicas. Os resultados apresentados sugerem a presença de incidentes críticos, tanto com dificuldades como com sucessos ao nível da aquisição de competências técnicas e de intervenção, e apesar de não tão significativo, de competências teóricas.

Para além disso, os estudantes podem também estar a expressar desejar saber mais, mais cedo na sequência de aprendizagem, esquecendo que estão ainda apenas na Universidade, e que muitos anos formativos os podem esperar após finalizado o Mestrado.

A terceira categoria superior, *Desenvolvimento pessoal* (n = 18), envolve todos os aspetos mencionados pelos participantes que se refiram a crescimento, a mudança ao nível pessoal, em integração com as aprendizagens a nível académico/profissional.

O facto de todos os participantes terem mencionado algum aspeto em que sentiram mudanças a nível pessoal, sugere que a frequência da UC em particular e o semestre letivo em geral tiveram um impacto no seu processo de desenvolvimento pessoal, o que corrobora resultados de estudos anteriores (Pascual-Leone *et al.*, 2012, 2013).

A primeira subcategoria, *Ampliação da consciência* da experiência e do self (n = 18), é considerada muito relevante, tendo sido mencionada por todos os participantes. Envolveu um aumento da consciência, atenção e capacidades de reflexão, por parte dos participantes, das suas experiências internas, sensações, sentimentos, pensamentos e comportamentos e a sua interligação, bem como a consciência das características e qualidades, dificuldades e limitações do próprio. Um participante reporta, por exemplo: “Sim, ajudou-me a conhecer-me melhor e a questionar e interligar os meus pensamentos, ações e reações. Ajudou-me também a refletir sobre a minha maneira de ser.”



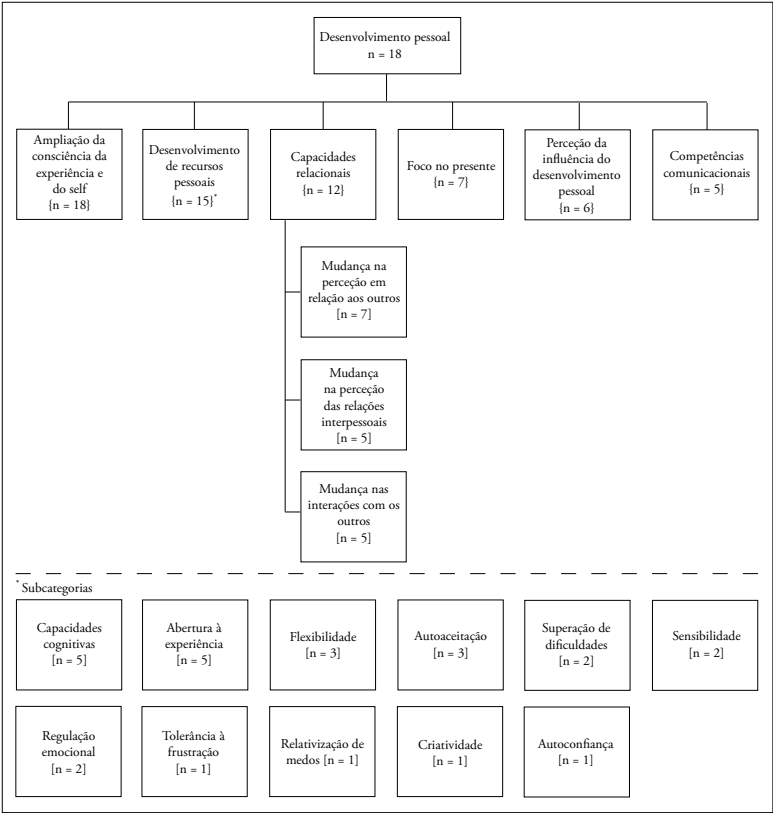


Figura 3. Categoria superior Desenvolvimento Pessoal e respetivas subcategorias.

Esta subcategoria parece sugerir que os participantes ganharam capacidades de *insight* e introspeção que são reportadas na literatura como fundamentais para o desenvolvimento profissional (e.g. Cord & Clements, 2010; Lindgren & Fisk, 1976). No mesmo sentido, Sanford (1969, tal como cit. por Leung, 2013) salientou como aspetos do desenvolvimento pessoal uma organização de complexidade crescente, como se parece aqui observar. Os resultados parecem revelar que os participantes estão, não apenas, a desenvolver-se a nível pessoal como também a ganhar ferramentas para que este desenvolvimento se torne num processo contínuo, ao longo da carreira profissional, ou mesmo da sua vida, sem dissociarem ambos os selves, pessoal e profissional.

Aliás, a segunda subcategoria, *Desenvolvimento de recursos pessoais* (n = 15), apareceu efetivamente como muito relevante. Dentro desta foram encontradas 11 subcategorias de qualidades e capacidades pessoais que os participantes revelaram ter desenvolvido. Neste sentido, parece que um elevado número de participantes ganhou ferramentas que promovem o desenvolvimento do *self*. Esta subcategoria parece reforçar a ideia de que o desenvolvimento a nível académico/profissional pode promover e/ou até beneficiar do desenvolvimento pessoal (Rønnestad e Skovholt, 2003). Como sugerem Lindgren e Fisk (1976), as qualidades pessoais facilitam o processo de desenvolvimento de estudantes e a UC frequentada parece ter tido algum efeito transformador no desenvolvimento dos estudantes enquanto pessoas.

A terceira subcategoria, *Capacidades relacionais* (n = 12), encontrou-se entre o relevante e o muito relevante. Representa as capacidades de relação com os outros, onde se encaixam três subcategorias: *Mudança na perceção em relação aos outros* (n = 7), - “(...) vejo os outros com outros olhos, vejo-os como um todo” - *Mudança na perceção das relações interpessoais* (n = 5), - “Entendi que sou responsável pelas situações e relações que estabeleço.” - e *Mudança nas interações com os outros* (n = 5) - “Esta UC alterou sobretudo a maneira como perceciono e lido com as minhas emoções, o que depois acabou por afetar a forma como lido com os outros.”

Tal como evidenciado por Orlinsky e Rønnestad (2005), as competências relacionais básicas parecem ser promovidas durante o período de treino, o que reforça os resultados encontrados. Os estudantes de Psicologia, inerentemente, refletem bastante sobre o outro e as suas experiências, o que pode estar a influenciar esta mudança de perceção e a melhoria das relações estabelecidas.

A subcategoria seguinte, *Foco no presente* (n = 7), reporta uma maior atenção e capacidade de focalização no momento presente. A emergência desta subcategoria parece revelar que está a surgir nestes estudantes a capacidade de combinar as experiências da vida pessoal com as da vida profissional (e.g. Leijen & Kullasepp, 2013), aplicando práticas fundamentais ao autocuidado,

como a utilização de estratégias de *mindfulness* que promovem o foco no presente e a atenção (Germer, 2004). Esta UC em estudo procura promover a aprendizagem destas estratégias de *mindfulness*, quer consigo mesmo, quer na intervenção com futuros clientes/pacientes, tendo também componentes práticas de avaliação que incluem estas faculdades.

Uma subcategoria que, segundo o critério de relevância, aparece entre o pouco relevante e o relevante, mas que parece ser interessante discutir é a *Perceção da influência do desenvolvimento pessoal* (n = 6) - “Compreendi a importância da genuinidade e do desenvolvimento pessoal e autoconhecimento para a boa prática de psicoterapia”. Esta subcategoria engloba afirmações explícitas por parte dos participantes que sugerem compreensão de que o desenvolvimento pessoal influencia o desenvolvimento profissional bem como o contrário.

Aquilo que estes participantes reportaram parece ir ao encontro dos objetivos do estudo, bem como dos objetivos, hipóteses e descobertas de outros estudos (e.g. Pascual-Leone *et al.*, 2012, 2013). Este resultado parece reforçar a importância do desenvolvimento pessoal para o desenvolvimento profissional, sugerindo que a consciência desta influência pode ajudar e facilitar o processo de desenvolvimento do *self*.

A quarta categoria superior refere-se aos *Fatores promotores da aprendizagem e do desenvolvimento* (n = 16).

Aqui, emerge uma subcategoria relevante, *Método de ensino* (n = 9), demonstrando o método de ensino e os materiais utilizados no treino como promotores da aprendizagem e do desenvolvimento, com cinco subcategorias adjacentes, *Visualização de vídeos* (n = 6), *Realização de trabalhos práticos* (n = 6), *Leituras* (n = 2), *Discussões* (n = 2), *Aulas* (n = 1).

Estes resultados parecem ir ao encontro da literatura sobre os fatores que influenciam, de forma positiva, a aprendizagem e o desenvolvimento (e.g. Rønnestad e Skovholt, 2003).

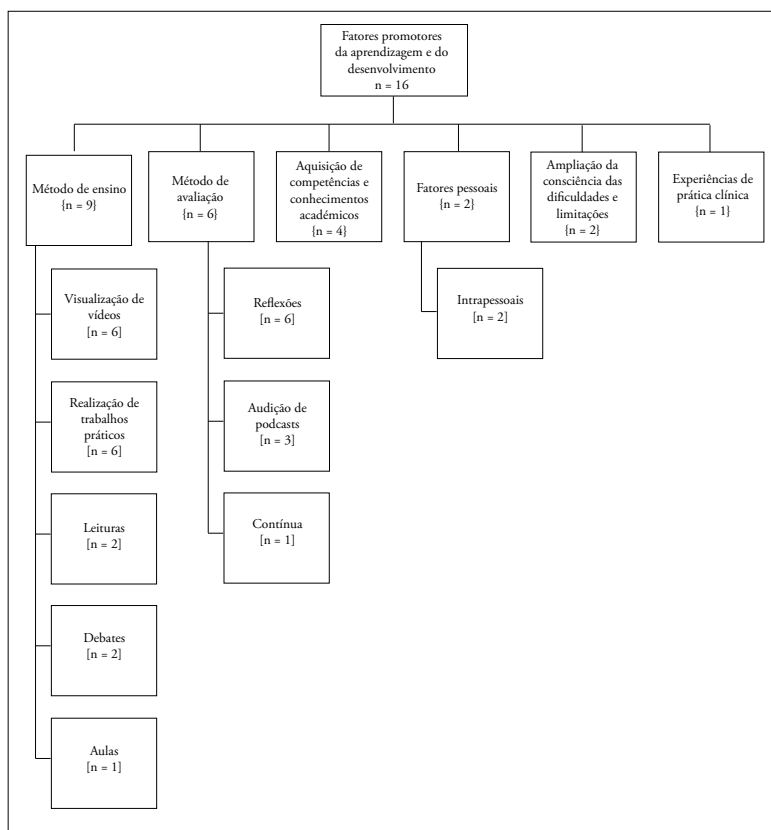


Figura 4. Categoria superior Fatores promotores da aprendizagem e do desenvolvimento e respectivas subcategorias.

Uma subcategoria que apareceu no limite entre a pouca relevância e a relevância, que é interessante referir, *Método de avaliação* (n = 6), fez referência aos métodos utilizados para avaliar os conhecimentos e aprendizagens adquiridas como facilitadores do processo de desenvolvimento, com três subcategorias incluídas, *Reflexões* (n = 6), *Audição de podcasts* (n = 3), *Contínua* (n = 1).

Este é um resultado interessante, já que um método de avaliação contínua, com recurso às reflexões pessoais, tal como utilizado na UC, parece promover e facilitar o desenvolvimento. Para além dos habituais textos de apoio teóricos,



esta UC fazia uso de: a) vídeos de mestria de terapeutas experientes e vídeos de *coping* dos discentes a experimentar intervenções terapêuticas específicas; b) transcrição dos seus próprios vídeos de *coping*; c) elaboração e apresentação de *powerpoints* a explicitar aspectos comuns e distintivos de pelo menos duas perturbações por aula; d) *podcasts* sobre faculdades de *mindfulness* no dia-a-dia; e) escalas de auto-relato típicas de contextos clínicos ou de investigação para serem administradas por si próprios; f) leituras complementares e emparelhadas direcionadas para o paciente/cliente e para o terapeuta, em torno de módulos de intervenção terapêutica de natureza transdiagnóstica. Todos estes estímulos com potencial de ativação do *self* pessoal, promoviam claramente uma psicologia a duas pessoas, uma psicoterapia em modelo contextual/relacional (*versus* modelo médico), que serviam de pretextos para reflexões escritas em torno do impacto que haviam tido em ambos os *selves* pessoal e académico/profissional face a um cliente/paciente hipotético no futuro.

Por último, apresenta-se a categoria superior *Fatores dificultadores da aprendizagem e do desenvolvimento* (n = 17).

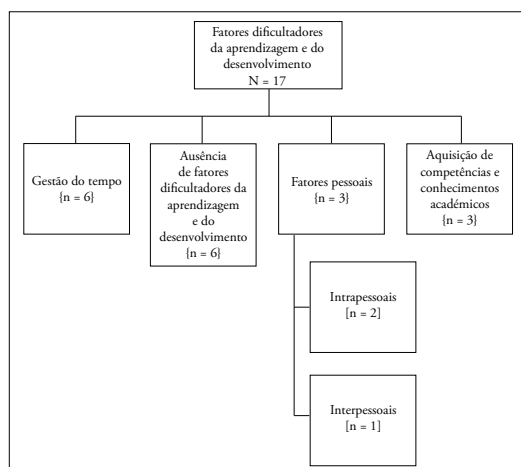


Figura 5. Categoria superior Fatores dificultadores da aprendizagem e do desenvolvimento e respetivas subcategorias.

Na amostra não surge nenhuma subcategoria como relevante. No entanto, estes resultados não são sinónimo de que não existem fatores que dificultam o processo de desenvolvimento. A forma como o estudo foi construído pode ter beneficiado a reflexão relativamente às características positivas do processo de desenvolvimento.

Ainda assim, um terço dos participantes revelou questões ao nível de gestão de tempo, o que levanta questões relativamente à preparação dos conteúdos programáticos quer de uma UC em particular, quer das várias UC's que compõem um semestre em geral, de forma a ter os discentes mais disponíveis e com mais recursos para a aprendizagem, desenvolvimento e mudança que podem ficar inibidas nesta fase.

Conclusão

Consideramos que a UC, bem como todo o semestre, a que o estudo se refere, tiveram um impacto nos estudantes desta amostra, tanto ao nível do seu desenvolvimento académico/profissional como pessoal. Foi observada a aquisição de conhecimentos e procedimentos de natureza teórica, técnica e interventiva, bem como a aquisição de capacidades de reflexão e de ampliação da experiência, com importância para o desenvolvimento académico/profissional dos estudantes. As mudanças relatadas como mais significativas no desenvolvimento pessoal foram uma maior consciência da experiência e do self, o desenvolvimento de recursos pessoais, e as interações com os outros. Os fatores apontados como os que mais influenciaram o processo de aprendizagem e desenvolvimento foram os métodos de ensino e de avaliação utilizados.

Como limitações e, consequentemente, possíveis direções futuras, podem considerar-se a amostra, podendo o estudo beneficiar de um maior número de participantes, mais heterogéneos, de diferentes anos letivos, e também com frequência de outros anos do curso. Separar o impacto diferenciado de uma unidade curricular do impacto de outras não foi objetivo do estudo, até



porque todo o semestre de um conjunto de quatro deste Mestrado Integrado está pensado de forma complementar e sequencial. Mas, apesar de poder ser uma limitação atual, pode também constituir uma avenida de trabalho futuro. Pode também ser estudado, em comparação com a população de estudantes de psicologia, estudantes de outras áreas dos cuidados ou outras áreas distintas.

Algo que fica por investigar são as experiências anteriores às exploradas neste estudo, não havendo nenhuma forma objetiva de medir o impacto discreto e específico, comparando o antes e o depois. Ainda assim, a formulação das perguntas foi desenhada de forma a evocar um processo de comparação das experiências anteriores com as atuais. De futuro, podem vir a ser realizados estudos longitudinais que se preocupem em capturar os impactos diferenciados dos diversos módulos que compõem um Mestrado Integrado. Em geral, considera-se relevante o aprofundamento do estudo dos fatores que influenciam o processo de desenvolvimento.

Apesar das diversas limitações entendemos o presente estudo como uma demonstração suficientemente relevante e rigorosa de que o treino ao nível académico/profissional pode funcionar como um contexto mais explícito de exercício ao desenvolvimento pessoal, uma vez que foram reportadas diversas transformações pessoais a par da aquisição de competências de desenvolvimento académico/profissional, em estudantes sem experiência de prática clínica.

Assim, quanto às implicações práticas, sugere-se que o processo de ensino e treino no ensino superior possa ter mais em atenção a importância do desenvolvimento pessoal para o desenvolvimento académico e profissional dos estudantes, assim como para o seu futuro no mundo do trabalho. O (re)pensar das metodologias de ensino e de avaliação, também ao serviço da promoção do desenvolvimento pessoal de estudantes dos tempos que correm, pode facilitar que o seu desenvolvimento se prolongue, de forma mais explícita, para o seu futuro profissional como um processo que corra mais contínuo, fluído, integrado e produtivo.

Esta dança, a ser explicitamente facilitada entre o *self* académico/profissional e

o *self* pessoal, faz ecoar alguns ditos de Paulo Freire, com quem terminamos: “Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes”, “É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal maneira que num dado momento a tua fala seja a tua prática”, e “A humildade exprime uma das raras certezas de que estou certo: a de que ninguém é superior a ninguém”.



Referências

- Bennett-Levy, J. & Beedie, A. (2007). The ups and downs of cognitive therapy training: What happens to trainees' perception of their competence during a cognitive therapy training course? *Behavioural and Cognitive Psychotherapy*, 35, 61-75.
- Beutler, L. E., Malik, M., Alimohame, S., Harwood, T. M., Talebi, H., Noble, S., & Wong, E. (2004). Therapist variables. In M.J. Lambert (Ed.), *Bergin and Garfield's handbook of psychotherapy and behavior change* (5^a ed., pp. 227-306). New York: Wiley.
- Braun, V. & Clarke, V. (2006) Using thematic analysis in psychology. *Qualitative Research in Psychology*, 3(2), 77-101.
- Clegg, S. & Bufton, S. (2008). Student support through personal development planning: retrospection and time. *Research Papers in Education*, 23, 435-450.
- Cord, B. & Clements, M. (2010). Pathway for student self-development: A learning orientated internship approach. *Australian Journal of Adult Learning*, 50(2), 287-307.
- Dennhag, I. & Ybrandt, H. (2013). Trainee psychotherapists' development in self-rated professional qualities in training. *Psychotherapy*, 50, 158-166.
- Dreher, D. E., Feldman, D. B., & Numan, R. (2014). Controlling parents survey: Measuring the influence of parental control on personal development in college students. *College Student Affairs Journal*, 32(1), 97-111.
- Edmunds, R. & Richardson, J. (2009). Conceptions of learning, approaches to studying and personal development in UK higher education. *British Journal of Educational Psychology*, 79, 295-309.
- Ewen, H. H., Rowles, G. D., & Watkins, J. F. (2012). Professional and personal development in contemporary gerontology doctoral education. *Educational Gerontology*, 38, 42-55.
- Folkes-Skinner, J., Elliott, R., & Wheeler, S. (2010). "A baptism of fire": A

- qualitative investigation of a trainee counsellor's experience at the start of training. *Counselling and Psychotherapy Research*, 10, 83-92.
- Hill, C.E., Stahl, J., & Roffman, M. (2007). Training novice psychotherapists: Helping skills and beyond. *Psychotherapy: Theory, Research, and Practice*, 44, 364-370.
- Hill, C. E., Sullivan, C., Knox, S., & Schlosser, L. Z. (2007). Becoming psychotherapists: Experiences of novice trainees in a beginning graduate class. *Psychotherapy: Theory, Research, Practice, Training*, 44, 434-449.
- Howard, E. E., Inman, A. G., & Altman, A. N. (2006). Critical incidents among novice counselor trainees. *Counselor Education and Supervision*, 46, 88-102.
- Joy-Matthews, J., Megginson, D., & Surtees, M. (2004). *Human Resource Development*. London: Kogan Page.
- Leijen, A. & Kullasepp, K. (2013). All roads lead to Rome: Developmental trajectories of student teachers' professional and personal identity development. *Journal of Constructivist Psychology*, 26, 104-114.
- Leung, A. S. M. (2013). Learning through personal development at the Hong Kong Institute for Vocational Education. *International Journal of Learning & Development*, 3, 2164-4063.
- Lindgren, H. C. & Fisk, L. W., Jr. (1976). *Psychology of Personal Development*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Michael, J. A. & Modell, H. I. (2003). *Active Learning in Secondary and College Science Classrooms. A Working Model for Helping the Learner to Learn*. New Jersey: Lawrence Erlbaum.
- Norcross, J. C. (2000). Psychotherapist self-care practitioner-tested, research-informed strategies. *Professional Psychology: Research and Practice*, 31(6), 710-713.

- Orlinsky, D. E., & Rønnestad, M. H. (2005). *How psychotherapists develop*. Washington, DC: American Psychological Association.
- Pascual-Leone, A., Wolfe, B., J., & O'Connor, D. (2012). The reported impact of psychotherapy training: Undergraduate disclosures after a course in experiential psychotherapy. *Person-Centered & Experiential Psychotherapies*, 11, 152-168.
- Pascual-Leone, A., Rodriguez-Rubio, B., & Metler, S. (2013). What else are psychotherapy trainees learning? A qualitative model of students' personal experiences based on two populations. *Psychotherapy Research*, 23, 578-591.
- Rogers, C. R. (1985). *Tornar-se pessoa* (7ª ed.). Moraes Editores.
- Rønnestad, M. H. & Skovholt, T. M. (2003). The journey of the counselor and therapist: Research findings and perspectives on professional development. *Journal of Career Development*, 30, 5-44.
- Simons, J., Dewitte, S., & Lens, W. (2004). The role of different types of instrumentality in motivation, study strategies, and performance: Know why you learn, so you'll know what you learn! *British Journal of Educational Psychology*, 74, 343-360.
- Theriault, A. & Gazzola, N. (2005). Feelings of inadequacy, insecurity, and incompetence among experienced therapists. *Counselling and Psychotherapy Research*, 5, 11-18.
- Totton, N. (2006). Munching through the rainforest: Expertise and its resistance. *European Journal of Psychotherapy and Counselling*, 8, 423-427.
- Vasco, A. B., Garcia-Marques, L., & Dryden, W. (1993). "Psychotherapist know thyself!": Dissonance between metatheoretical and personal values in psychotherapists of different theoretical orientations. *Psychotherapy Research*, 3, 181-196.



Aprender com Projetos de Investigação, o seu Papel como Ferramenta Educacional

Marta Henriques & António Ferreira

Artigo integrado na

Parte 1 "Domínio das Ciências da Educação e do Desporto"
da publicação.

Páginas do artigo

37 a 55

Título da Publicação

Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação

Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação

Fevereiro de 2017

Editor

CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Marta **Henriques**

Doutorada em Engenharia Química na especialidade de Processos Químicos pela Universidade de Coimbra, é mestre em Engenharia Bioquímica (2005) e licenciada em Engenharia Química (2001). É Professora Adjunta no Politécnico de Coimbra, Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da ESAC, e coordenadora do Curso Técnico Superior Profissional em Qualidade Alimentar. Leciona aos cursos de Licenciatura em Biotecnologia, Engenharia Alimentar e Mestrado em Engenharia Alimentar. É investigadora integrada no CERNAS/IPC, no grupo de Ciências e Engenharia Alimentar, e foca-se na valorização de subprodutos da indústria alimentar para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores tendo em vista a sustentabilidade industrial. Colaborou e coordenou vários projetos nacionais e internacionais de I&D. É autora e co-autora em 2 patentes, tendo publicado diversos artigos e capítulos de livros em revistas e edições científicas da especialidade.

António **Ferreira**

Professor Adjunto no Politécnico de Coimbra, no Departamento de Ambiente da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC). Licenciado em Geografia pela Universidade de Coimbra (1988) e doutorado em Ciências Aplicadas ao Ambiente pela Universidade de Aveiro (1996). É o coordenador Científico do CERNAS (Centro de Estudos em Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade) desde 2013, tendo pertencido à sua Comissão Executiva desde a fundação até 2011, enquanto coordenador da linha de investigação em Ambiente. É o coordenador do Mestrado em Gestão Ambiental da ESAC desde a sua criação em 2009. A sua investigação aborda temas relacionados como a gestão de recursos naturais, a gestão ambiental e o desenvolvimento sustentável. Publicou mais de 50 artigos em revistas científicas internacionais referenciadas pela ISI/web of knowledge e Scopus, e mais de 250 capítulos de livros e apresentações orais e em painel em conferências nacionais e internacionais. Coordenou cinco projectos (2 internacionais) e participou como chefe de equipa ou investigador em 28 outros projectos (15 internacionais). Ganhou dois prémios internacionais na área do ambiente e desenvolvimento sustentável.



Aprender com Projetos de Investigação, o seu Papel como Ferramenta Educacional

Marta Henriques & António Ferreira

A formação de profissionais altamente qualificados e de elevado desempenho vai muito para além do conhecimento transmitido na sala de aula. Os profissionais de elevada performance devem adquirir competências específicas que, necessariamente, requerem experiência e contacto com problemas complexos concretos. A ideia será a preparação de profissionais com capacidade de enfrentar o desconhecido, ou pelo menos terem o conhecimento e a capacidade para a resolução de desafios ou problemas imprevistos.

Estas competências são extremamente difíceis de alcançar num contexto de sala de aula convencional, especialmente quando no decurso da sua transmissão não exista um elevado grau de envolvimento das partes na resolução de problemas e situações muito concretas. Para além de que, qualquer situação de aula, mesmo prática, não tem a dimensão do imprevisível que se afigura como o critério fulcral na seriação e seleção dos melhores profissionais.

Argumentamos pois, que o envolvimento em atividades de investigação durante a formação académica é fundamental para a capacitação de profissionais de alto desempenho, pois proporciona oportunidades para desenvolver capacidades de reflexão, resistência, resiliência, análise crítica e síntese.

Este capítulo apresenta uma reflexão em como a educação através da participação em projetos de investigação pode ajudar os estudantes na sua preparação para a vida profissional.

Estado da Arte

Muitos estudos abordam a questão da integração dos estudantes no Ensino Superior, nomeadamente na identificação das principais dificuldades encontradas na sua adaptação ao sistema educativo, nas suas expectativas pessoais em relação à obtenção do seu diploma, à instituição de ensino superior que frequentam, às relações humanas e mesmo à forma como o conhecimento lhe é transmitido. O ingresso numa Instituição de Ensino Superior é uma grande mudança na vida dos jovens estudantes que têm de lidar com questões que são de suma importância no seu desempenho, tais como a falta de segurança, o contacto com situações novas e a sua interação com pessoas com diferentes *backgrounds*. Estes aspetos têm induzido alterações significativas na forma como as Instituições de Ensino Superior ensinam e transferem o conhecimento, conduzindo à mudança dos métodos utilizados pelos professores para estimular as competências individuais dos alunos e os seus processos de aprendizagem, tornando-os mais atrativos.

No entanto, a principal preocupação das Instituições de Ensino Superior parece ser sido esquecida: será que os seus diplomados estão preparados para enfrentar os desafios colocados pela sociedade e pelo mercado de trabalho que é cada vez mais volátil?

O trabalho, entendido como um conjunto de técnicas e atitudes individuais ou de grupo em relação a uma instituição (empresa, corporação, etc.) onde se desenvolvem as atividades laborais, é um conceito em dissolução (Amaral & Magalhães, 2004). A natureza do que é entendido por trabalho está a mudar. Ou seja, o trabalho no sentido de “profissão” está a extinguir-se: (1) como resultado da crescente fragilidade na relação salarial; (2) através do aumento da volatilidade das empresas (isto é, quanto maiores mais tendem a subdividir-se até se evaporarem nos “paraísos fiscais”); e (3) passou a estar assente em competências. O trabalho assume formas mais voláteis de produção distribuição e consumo. O que permanece parece ser definido por “competências” adquiridas diretamente através do treino e da experiência (Amaral & Magalhães, 2004).



As “carreiras” estão a ser substituídas por “trabalhos”, e a economia exige formas flexíveis quer de organização, quer dos recursos humanos. A “chave” para estar empregado nos dias de hoje é a flexibilidade. Isto implica necessariamente que as competências sociais, pessoais, interpessoais e técnicas, fundamentais para uma carreira profissional bem-sucedida, só podem ser fornecidas através da experiência “hands-on” ou “on-the-job” (Ferreira *et al.*, 2006). É fundamental a aquisição de competências que permitam aos profissionais manterem-se em atividade ao longo da sua vida ativa. De fato, estar ciente das inovações e ser capaz de aprender e melhorar continuamente é essencial para um bom desempenho profissional, num mundo em constante mudança e cada vez mais competitivo (Friedman, 1999), podendo fazer a diferença entre estar ativo ou desempregado.

Na atual tendência de democratização do ensino superior, como forma de promover a igualdade de oportunidades, de aumentar a competitividade e de procurar a excelência, reduzindo ao mesmo tempo o orçamento global ou, pelo menos, o orçamento *per capita*, é difícil promover experiências de ensino do tipo “hand-on” ou “on-the-job” a um maior número de alunos, apesar do enorme impacto positivo que isso teria na inserção dos estudantes no mercado de trabalho. Um dos maiores desafios que se coloca atualmente ao ensino superior é proporcionar oportunidades de investigação a um número crescente de estudantes, sem com isso expandir de forma significativa as necessidades em recursos docentes (Firmage *et al.*, 2005).

Por outro lado, as instituições de ensino superior estão cada vez mais envolvidas em atividades de investigação científica, não só na perspectiva de angariação de fundos para funcionamento mas também com o objetivo de aumentar o seu prestígio e “nome”, avançando na fronteira do conhecimento que pode constituir a diferenciação dos seus graduados no mercado de trabalho.

O treino no desenvolvimento de novas competências e conhecimento não é um problema novo. Já no passado, as instituições de formação e o próprio mercado de trabalho demoravam por vezes um período significativo para se adaptarem às novas tecnologias (Bessen, 2015). As competências em falta



estão frequentemente relacionadas com a componente tecnológica e são normalmente adquiridas através da experiência profissional, não na escola. Por esta razão, e apesar dos níveis mais elevados de escolaridade dos recém-formados, os empregadores podem enfrentar limitações nas competências que estes possuem (Bessen, 2015).

O *status quo* estabelece parâmetros que tornam obsoleta grande parte do que é feito na educação. Há a ilusão de que a educação resolverá todos os problemas no futuro, conduzindo-nos à sociedade desejada. É claro que precisamos de algum tipo de educação para alavancar e progredir para uma melhor sociedade (Jucker, 2002), no entanto falar ou ensinar para a mudança só é útil quando conduz a uma ação efetiva (Schumacher, 1993). Por isso, se não fizermos simultaneamente tudo o que estiver ao nosso alcance para transformar os nossos sistemas políticos, económicos e sociais em estruturas mais sustentáveis, poderemos também esquecer a parte da educação (Jucker, 2002, Ferreira *et al.*, 2006).

Devido aos caprichos do mercado de trabalho e ao rápido avanço do conhecimento nas mais diversas áreas profissionais, o conhecimento de ponta fornecido pela pesquisa realizada por professores e investigadores nas instituições de ensino superior raramente é capaz de proporcionar uma vantagem competitiva aos seus jovens diplomados ao longo da sua vida profissional. No entanto, a atitude de resiliência de indagação e demanda que são o cerne da investigação, pode fazer a diferença ao longo de uma carreira. Por essa razão, defendemos uma aprendizagem baseada na investigação e a inclusão dos estudantes de ensino superior em projetos de investigação. Isto é de extrema importância no contexto atual, particularmente na Europa, onde as perspectivas de emprego para os jovens são particularmente sombrias (Primorac, 2015), e onde se observa o desaparecimento dos empregos chamados “tradicionais” como resultado do desenvolvimento tecnológico (Bessen, 2015).

Hoje em dia, muitos setores de atividade sofrem com o processo da globalização, o que leva a uma maior incerteza para os indivíduos, uma vez que empregos, comunidades e locais de trabalho podem ser instantaneamente transformados



por forças tecnológicas e econômicas anónimas e instáveis (Friedman, 1999). Adicionalmente, devido aos avanços tecnológicos, o trabalhador médio viu os seus salários e carreiras estagnados. No entanto, a tecnologia também é responsável pela criação de novas oportunidades, especialmente para aqueles que detêm as novas competências exigidas pelo mercado de trabalho (Bessen, 2015)

O maior obstáculo à implementação das novas tecnologias/conhecimento é a preparação de profissionais com habilidades para a sua implementação. De facto, as Instituições de Ensino Superior detêm um corpo docente com sólida experiência, que sendo especialista em determinadas áreas do conhecimento/tecnologia não está minimamente familiarizado com as principais explosões tecnológicas e do conhecimento. Verifica-se muitas das vezes uma capacidade de adaptação limitada dos membros do corpo docente, primeiro porque são formatados para ensinar o que sabem, e segundo porque há uma resistência individual para mudar e para se manter o que se conhece. Segundo Bessen (2015) as instituições de formação são de adaptação lenta. Neste contexto, ter uma mente aberta, astuta pela investigação é uma grande vantagem para acompanhar os avanços do conhecimento e da tecnologia. Nalguns casos, apesar de raros, as mudanças podem ser induzidas pelos professores que simultaneamente conduzem e desenvolvem investigação.

Por outro lado, as qualificações necessárias para ensinar em qualquer Sistema de Ensino Superior, implicam que cada professor na sua área específica de conhecimento/tecnologia precise de pelo menos 3 ou 4 anos de preparação científica (necessária para realizar o seu doutoramento) e às vezes de uma preparação pedagógica. Por este motivo, as Instituições de Ensino Superior têm um problema semelhante, ou até mais grave, quando comparado com o das empresas que precisam de profissionais com sólidas competências nas novas tecnologias/conhecimento. E, no entanto, até que as Instituições de Ensino Superior e o mercado de trabalho se aproximem, os benefícios das novas tecnologias/conhecimento serão limitados e não amplamente partilhados (Bessen, 2015).

A pergunta chave que se coloca é, como é que as Instituições de Ensino

Superior podem preparar profissionais nos saberes/tecnologias emergentes, quando a sua própria estrutura é demasiado rígida para acompanhar as constantes mudanças, e que competências profissionais têm de ser induzidas nos estudantes e jovens profissionais para que possam lidar com as constantes alterações e revoluções tecnológicas e terem simultaneamente uma ativa e plena vida profissional. Argumentamos que a aprendizagem baseada na investigação é uma excelente ferramenta para preparar profissionais com as competências humanas, estratégicas e tecnológicas necessárias para impulsionar as sociedades, embora tenhamos de assumir que algumas competências-chave não são ensinadas na escola mas adquiridas através da experiência (Bessen, 2015).

Pretendemos neste capítulo explorar como uma abordagem de ensino prática, do tipo “hands-on”, pode contribuir para a qualificação dos diplomados, e em especial o papel que a investigação pode ter na preparação de profissionais altamente qualificados. Defendemos que fazer parte de um projeto de investigação, durante a frequência do curso superior, fornece a experiência necessária para ter sucesso. A pesquisa ajuda os alunos a aprender, a fazer perguntas e a encontrar respostas, a pensar de forma crítica, a trabalhar bem em equipa e a comunicar de forma eficaz com outras pessoas sobre assuntos complexos.

O papel educativo na transferência do conhecimento/tecnologia

A aprendizagem é tradicionalmente considerada como a aquisição e armazenamento do conhecimento. Nos últimos anos, o paradigma da transmissão do conhecimento tem sido questionado pela epistemologia construtivista que considera a aprendizagem uma construção ativa do conhecimento, não apenas o acumular de informações. A aprendizagem é uma atividade cognitiva onde os alunos constroem o conhecimento, interpretando as suas perceções com base nos seus prévios conhecimentos e crenças. Assim, a aprendizagem é entendida como um processo contínuo em que o indivíduo constrói e reconstrói a sua conceção do mundo (Tynjala, 1998).

Para ser eficaz, a educação é fundamental a todos os níveis, de forma a

proporcionar a regeneração económica que será alcançada através da transferência e cooperação tecnológica e deve incluir todos os estratos da sociedade, nomeadamente os decisores, profissionais, utilizadores e operadores. O envolvimento de toda a comunidade é crucial, uma vez que numa sociedade em constante aprendizagem o comportamento de cada grupo reforça todos os outros (Ferreira *et al.*, 2006).

A educação e a formação são vitais para todas e quaisquer atividades económicas. Uma força de trabalho bem preparada permite que governos, empregadores e trabalhadores atinjam os seus objetivos de desenvolvimento, facilitando a transferência e a assimilação de *know-how* e novas tecnologias ambientalmente saudáveis, adequadas e socialmente aceites (Hale, 1995).

A melhoria dos processos de aprendizagem e do desenvolvimento de competências profissionais, pessoais, interpessoais e sociais, é de suma importância para se ter sucesso num mundo cada vez mais competitivo, e implica uma mudança na forma como os profissionais são instruídos e treinados. Mais do que receber e armazenar conhecimento, as novas teorias de aprendizagem enfatizam o facto de que a aprendizagem é uma construção ativa de conhecimento e não uma receção passiva da informação (Tynjala, 1998).

A educação tem que ser sustentada por um ensino interdisciplinar e holístico capaz de promover uma aprendizagem mais profunda, por oposição à tradicional aprendizagem superficial (Graverholz, 2001), onde os alunos têm a tendência para uma "aprendizagem just-in-time". Nesse sentido, os alunos adquirem conhecimentos e competências apenas para um determinado momento de necessidade, ou seja, para os exames, e não de uma forma sólida durante os programas educacionais formais destinados a preparar os indivíduos para o futuro (Ury *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2006).

As mudanças na formação académica estão de acordo com alguns desenvolvimentos internacionais no domínio das competências pessoais, que visam fazer com que os alunos desenvolvam o pensamento crítico, ou que vão para além da informação dada na sala de aula, com o objetivo integrador

de trazer novos conhecimentos, competências, compreensão e experiência durante atividades de resolução de problemas concretos, e que oferecem aos alunos a melhor forma e oportunidade de preparação para uma aprendizagem independente ao longo da vida. Atualmente, apesar de limitados, alguns espaços epistemológicos e pragmáticos estão já a permitir que os alunos se comprometam de forma crítica com um conhecimento mais técnico, assim como na sua aplicação mais engenhosa (Waghid, 2000). Deve existir um empenho por parte dos alunos, não para fazer “isto ou aquilo”, mas para aprenderem a pensar, a compreender-se e a imaginarem-se. Uma abordagem eclética da educação prática é necessária para que a aquisição e aplicação dos factos “knowing-that” e competências “knowing-how” adquira uma forma racional que melhoraria e expandiria o ensino e a aprendizagem além da sua atual redução ao conteúdo factual é técnico (Waghid, 2000).

O maior desafio educacional dos dias de hoje, num contexto de rápidas mudanças como resultado da globalização (Friedman, 1999), é como preparar os profissionais para lidar com as alterações económicas e técnicas da sociedade, a fim de se manterem ativos e com um papel positivo no próprio desenvolvimento económico e social.

Os profissionais têm de reconhecer e identificar as várias dimensões e complexidade dos problemas, que necessitam de uma atitude mais proactiva e do desenvolvimento de soluções integradas. A formação destes profissionais deve ter como foco o desenvolvimento de competências societais, éticas, criativas, pessoais e interpessoais, para além da mera aquisição das competências técnicas, por forma a alcançar a sustentabilidade da própria sociedade. Um dos objetivos de maior importância para as Instituições de Ensino Superior é fomentar as competências necessárias para que os seus licenciados possam entrar no mercado de trabalho e preservar ou melhorar a sua própria empregabilidade ao longo da vida profissional.



A investigação permite a prática

A educação é geralmente considerada um pilar do desenvolvimento de aptidões e competências. No entanto, a educação por si só, sem ação, dificilmente contribuirá de forma significativa para a aquisição de competências nos novos campos do conhecimento/tecnologia, necessários para impulsionar a sociedade.

A abordagem por resolução de problemas permite a integração do conhecimento especializado na educação. Desempenha um papel central no desenvolvimento de conhecimentos especializados, convertendo o conhecimento formal em conhecimento e aptidões informais específicas, e que ocorre quando esse mesmo conhecimento formal é usado na resolução de problemas. Diferentes tarefas do tipo resolução de problemas são muito mais úteis do que a mera avaliação da informação factual e/ou reprodução do conhecimento dos livros de texto tal como é apresentado (Tynjälä, 1998). Com o foco na resolução de problemas e o envolvimento em situações reais, os programas de educação devem criar espaço para escolhas fora da educação tradicional, aumentando a exposição dos alunos à prática empresarial, economia, política, questões de trabalho e às matérias que ampliarão a sua compreensão sobre a interação humana (Waghid, 2000). O modelo autoritário de instrução, que domina muitos programas de educação, tende a sufocar ou retardar o desenvolvimento intelectual. Os estudantes amadurecem intelectualmente somente quando expostos a um ambiente que permite e estimula o pensamento crítico (Hale, 1995).

Um problema frequente das aulas práticas é que não são estruturadas para oferecer competências para a resolução de problemas. Os estudantes passam a maior parte do seu tempo na resolução de exercícios cuidadosamente projetados. Ao contrário destes exercícios, os problemas reais não são de tão fácil abordagem e ou de solução única e isso resulta na falta de especialização no reconhecimento e definição de problemas (Hale, 1995). Valo (2000) defende a importância de proporcionar aos alunos uma experiência fora do campus, nomeadamente ao nível de estágios profissionalizantes e pré-profissionais no local de trabalho, para que adquiram conhecimentos ao nível situacional,

interpessoal, do processo, do controlo e da prática. O uso de problemas da vida real para motivar os alunos, desafiá-los a pensar profundamente sobre os conteúdos realmente significativos e capacitá-los a trabalhar em colaboração são práticas que produzem benefícios para os próprios estudantes (David, 2008).

A aprendizagem baseada na investigação baseia-se na utilização do próprio processo investigativo como uma ferramenta para a aquisição de conhecimentos. A vantagem deste tipo de aprendizagem é que os estudantes têm a oportunidade não só de aprender conceitos mas também de praticar competências relacionadas com a própria investigação, tais como testar hipóteses, recolher e analisar dados (Phithiyanuwat & Bunterm, 1998).

Preparação dos alunos numa filosofia de projeto

Os sistemas educacionais precisam de se tornar proactivos e desenvolver uma gama de programas educativos para estudantes de todos os níveis (Vega *et al.*, 2003). Isso pode ser alcançado através da implementação de uma educação baseada em projetos que apresenta uma abordagem privilegiada de aprendizagem através da implementação de ações concretas em casos de estudo piloto (Ferreira *et al.*, 2006). O design dos cursos negligencia metas fundamentais, focando-se em vez disso nos resultados de módulos específicos. Isso dificulta aos alunos estabelecerem as conexões fundamentais entre os tópicos e verem o assunto como um todo integrado (Entwistle & Hounsell, 1975).

A qualidade da aprendizagem dos alunos melhora à medida do progresso dos seus estudos. A classificação do "esforço organizado" e das "abordagens profundas", que procuraram o envolvimento e a compreensão sobre determinado assunto, são geralmente mais elevadas para os estudantes do último ano do que para os do primeiro ano. Os alunos, por sua vez também valorizam mais uma aprendizagem focada e que promove a compreensão ao invés daquela que se foca somente na memorização. Ao longo dos cursos, as "abordagens mais profundas" vão-se tornando cada vez mais complexas, e as diferenças entre as várias temáticas mais vincadas.



Em resposta à forma como os alunos devem "pensar e praticar" cada tema, as descobertas indicam que uma aprendizagem de alta qualidade lhes exige a capacidade de se envolverem num determinado assunto nas suas várias dimensões. A "forma de pensar e praticar" não só abrange o conhecimento, mas também as competências, estratégias e convenções necessárias para analisar e dar resposta a um problema específico, a um nível mais avançado. Os projetos de investigação colaborativos são considerados uma ferramenta valiosa na exposição mais profunda a um tópico e facilitam as interações autênticas entre aluno e professor (Howard *et al.*, 2000).

Num contexto de crescente incerteza do mercado de trabalho e da necessidade de profissionais com competências em conhecimento/tecnologias emergentes, os alunos com experiência de investigação estarão em vantagem competitiva, uma vez que foram treinados numa filosofia de projeto, que é o sistema aconselhado para o desenvolvimento das novas tecnologias, do conhecimento e das competências e, portanto, com os melhores salários. De fato, os avanços na tecnologia ou no conhecimento são conduzidos principalmente sob uma filosofia de projeto, onde as novas ideias e tecnologias são testadas. Os projetos diferem dos negócios pelo seu caráter inovador e por serem a partida mais lucrativos.

Desenvolvimento de novas competências e conhecimentos ao longo da vida

A capacidade dos jovens diplomados entrarem e sobreviverem profissionalmente é de suma importância, especialmente porque a previsibilidade do curso e das "trajetórias" da vida, ..., dá lugar a um itinerário individualizado no qual a gestão pessoal é de vital importância na "negociação" da mudança que tem de ser feita (Bynner & Parsons, 2002). Isso é particularmente importante na Europa, onde as "inflexibilidades" do mercado de trabalho são apontadas como a principal causa de deixar sem emprego uma fração cada vez significativa de membros das famílias, especialmente jovens, que desejam trabalhar (Carnoy, 1997; Primorac, 2015).

Na chamada "sociedade de risco" (Beck, 1986) a incerteza aumenta em relação

às escolhas feitas, e a probabilidade de escolhas erradas levarem a condições de vida inferiores também aumenta (Bynner & Parsons, 2002). Sob as condições de certificação da sociedade de risco, as competências adquiridas através da experiência laboral tornam-se cada vez mais importantes na manutenção de uma posição no mercado de trabalho. Aqueles que não estão capacitados desses atributos em termos de "capital humano", e que são considerados muito importantes pelos empregadores, enfrentam maiores dificuldades, não só para entrar no mercado de trabalho, mas também para manter qualquer tipo de carreira profissional gratificante (Bynner & Parsons, 2002). Abbott (1988) descreve uma sequência para o trabalho profissional:

- Diagnóstico
- Inferência
- Tratamento

Na fase de Diagnóstico reúnem-se as necessidades relevantes na construção de uma imagem e, em seguida, coloca-se essa imagem na categoria de diagnóstico adequada. A Inferência é o puro ato profissional que a partir da informação do diagnóstico indica um leque de Tratamentos e abordagens a aplicar assim como os seus resultados previsionais. Os efeitos dos Tratamentos aplicados são paralelos aos do diagnóstico. Tal como o Diagnóstico, o Tratamento impõe uma estrutura subjetiva sobre os problemas com os quais uma profissão trabalha.

Numa carreira profissional com sucesso, para além das competências técnicas, são necessárias várias outras competências (Ferreira *et al.*, 2006), nomeadamente:

- capacidade de inovação para um desenvolvimento sustentável
- capacidade de utilização dos recursos disponíveis de forma otimizada
- capacidade para trabalhar em equipas multidisciplinares
- capacidade para prever a reação das populações à implementação de um projeto
- rigor e ética profissional
- capacidade de coordenação e liderança de equipas multidisciplinares
- capacidade de comunicação (não-verbal, escrita, oral, multimédia, quer em língua materna quer noutra língua)



- capacidade de auto-motivação
- capacidade de trabalho
- capacidade de negociação, argumentação, e mediação de conflitos
- competências pessoais (empatia, confiança, autoconsciência, capacidade de adaptação e de iniciativa)
- capacidade de atualização das competências adquiridas ao longo da vida profissional ativa

Os recém-graduados que conseguem o seu primeiro emprego precisam de apoio para se transformarem em profissionais de sucesso. Muito deles precisam mais de apoio social e emocional em vez de ajuda no uso prático do conhecimento académico. Mais tarde, já nas suas carreiras, esses mesmos indivíduos precisam de uma ampla gama de oportunidades de desenvolvimento que lhes permitam continuamente ampliar e aprofundar os seus conhecimentos (Brown 2009). Em muitos casos, precisam de encontrar formas de não se limitarem à sua profissão e trabalhar com membros de outros grupos profissionais, cujo vocabulário, instituições e carreiras profissionais podem ser desconhecidos. O treino na investigação trará vantagens competitivas em todas essas competências. Adicionalmente, o investimento na ciência e na inovação não só contribui para o aumento da competitividade empresarial, mas coloca o profissional como parte da estratégia de desenvolvimento da própria empresa, melhorando simultaneamente a perspetiva da sua carreira e a solidez da instituição para a qual trabalha.

Conclusão

Num contexto de rápido avanço da tecnologia e do conhecimento que impactam o carácter inovador e competitivo das empresas e dos negócios, a preparação de profissionais de alto desempenho é de suma importância. Hoje em dia, uma empresa com serviços e/ou bens inovadores tem maiores margens de lucro e, portanto, melhores hipóteses de sobrevivência e bem-estar do que aquelas que exploram tecnologias/conhecimentos comuns.

Neste cenário, ser capaz de fazer a ligação entre a investigação e os negócios, assim como a inclusão da experiência de investigação na carreira profissional do pós-graduado, é de suma importância. Dado que os alunos incorporados em trabalhos de investigação são capazes de compreender o papel da criatividade e inovação no desempenho da empresa, são capazes de implementar um sistema para facilitar o processo de criação de produtos e serviços inovadores, e estão também melhor preparados para enfrentar os requisitos do mercado de trabalho mais exigente. Fazerem parte na necessidade de inovação para estarem na vanguarda do negócio, permite aos profissionais estarem atentos e serem capazes de enfrentar riscos, e construir um conhecimento mental e técnico, e um sistema financeiro, para os reduzir. Portanto, permite-lhes desenvolver um conjunto de capacidades semelhantes às dum investigador, o que valoriza as empresas onde trabalham e a eles próprios.

A inclusão de alunos em projetos de investigação pode ser de extrema relevância na aquisição de competências que serão relevantes para o seu próprio progresso durante a vida profissional, para atingirem melhores desempenhos e um nível mais elevado na estrutura da empresa, ou até conseguirem empregos em melhores empresas. Para as Instituições de Ensino Superior, ter antigos alunos bem inseridos na matriz produtiva, referidos como profissionais de alta qualidade, é o cumprimento de sua missão e a melhor publicidade de uma boa reputação.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto UID/AMB/00681/2013, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Referências

- Abbott, A. (1988). *The system of professions*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Amaral, A., & Magalhães, A. (2004). Epidemiology and the Bologna saga. *Higher Education*, 48, 79-100.
- Beck, U. (1986). *Risk society Towards a New Modernity (Theory, Culture and Society Series)*. London: Sage, 260.
- Bessen J. (2015). Toil and Technology. IMF Journal. Finance & Development, March 2015, 16-19.
- Brown, A. (2009). Developing expertise - moving beyond a focus on workplace competence, assessment and qualifications, Beyond Current Horizons Programme Evidence Papers. Retrieved from <http://www.beyondcurrenthorizons.org.uk/developing-expertise-moving-beyond-a-focus-on-workplace-competence-assessment-and-qualifications/>
- Bynner, J., & Parsons, S. (2002). Social exclusion and the transition from school to work: The case of young people not in education, employment, or Training (NEET). *Journal of Vocational Behaviour*, 60, 289-309.
- Carnoy, M. (1997). The great work dilemma: education, employment and wages in the new global economy. *Economics of Education Review*, 16 (3), 247-254.
- David, J.L. (2008). What Research Says About ... / Project-Based Learning. *Teaching Students to Think*. 65 (5), 80-82.
- Entwistle, N., & Hounsell, D. (1975). How students learn. Institute for Research and Development in Post-Compulsory Education, University of Lancaster, Lancaster, 199.

- Ferreira, AJD., Lopes MAR., & Morais JPF. (2006). Environmental Management and audit schemes implementation as an educational tool for sustainability. *Journal of Cleaner Production*, 14, 973-982.
- Firmage, DH., Tietenberg, TH., & Cole FR. (2005). Research-based Learning in an Introductory Environmental Studies Course. Retrieved from <http://www.colby.edu/environmentalstudies/about/innovative-teaching/>
- Friedman, TL. (1999). The Lexus and the Olive tree - Understanding Globalisation. New York: Farrar, Straus & Giroux, 490.
- Graverholz, L. (2001). Teaching holistically to achieve deep learning. *College Teaching*, 49, 44-51.
- Hale, M. (1995). Training for environmental technologies and environmental management. *Journal Cleaner Production*, 3 (1-2), 19-23.
- Howard, J., Mitchell, D., Spennemann, D., & Webster-Mannison, M. (2000). Is today shaping tomorrow for tertiary education in Australia? A comparison of policy and practice. *International Journal of Sustainability in Higher Education*, 2, 83-96.
- Jucker, R. (2002). "Sustainability? Never heard of it" Some basics we shouldn't ignore when engaging in education for sustainability. *International Journal of Sustainability in Higher Education*, 3 (1), 8-18.
- Phithiyanuwat, S., & Bunterm, T. (1998). Research-Based Learning. The Journal of Research Methodology. Bangkok: Department of Educational Research, Faculty of Education, Chulalongkorn University.
- Primorac, M. (2015). Jobs slowly recovering from crisis, favoring higher Skills. *IMF Survey Magazine*. February 2015.
- Schumacher, EF. (1993). Small is Beautiful: A study of economics as if people mattered, London: Vintage.

- Tynjala, P. (1998). Writing as a tool for constructive learning: Students' learning experiences during an experiment. *Higher Education*, 36, 209-230.
- Ury, C.J., Johnson, C.V., & Meldrem, J.A. (1997). Teaching a heuristic approach to information retrieval. *Research Strategies*, 15 (1), 39-47.
- Valo, M. (2000). Experiencing work as a communications professional: Students' reflections on their off-campus work practice. *Higher Education*, 39, 151-179.
- Vega, C.A. de, Ojeda-Benítez, S., & Ramírez-Barreto, M.E. (2003). Mexican educational institutions and waste management programmes: a University case study. *Resources Conservation and Recycling*, 39, 283-296.
- Waghid, Y. (2000). Reconceptualising engineering education: Creating spaces for outcomes and dialogical agape. *Higher Education*, 40, 259-276.



Uma abordagem multidisciplinar para o ensino de técnicos em jogos desportivos coletivos

Filipe Manuel Clemente, Fernando Manuel
Lourenço Martins & Rui Sousa Mendes

Artigo integrado na

Parte 1 "Domínio das Ciências da Educação e do Desporto"
da publicação.

Páginas do artigo

57 a 79

Título da Publicação

Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação

Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação

Fevereiro de 2017

Editor

CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Filipe Manuel **Clemente**

Professor adjunto convidado no Instituto Politécnico de Viana do Castelo - Escola Superior de Desporto e Lazer de Melgaço (ESDL-IPVC) e membro integrado do Instituto de Telecomunicações, Delegação da Covilhã, Portugal. Doutoramento em Ciências do Desporto - Treino Desportivo pela Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra (2015). Atual coordenador do Curso Técnico Superior Profissional em Treino Desportivo (ESDL-IPVC). Autor de mais de 130 artigos científicos com peer-review dos quais 38 indexados na Web of Knowledge e com impact factor. Guest-editor em 2 special issues (Sports Performance and Exercise na revista SpringerPlus e Performance in Soccer na revista Sports - mdpi) e editor de 3 outras revistas científicas relacionadas com a sua especialização. Revisor em mais de 10 revistas científicas com impact factor. As suas principais áreas de investigação abrangem o treino desportivo e performance em modalidades coletivas, análise de jogo com métodos computacionais, fisiologia do exercício e novas tecnologias aplicadas ao desporto. ORCID: orcid.org/0000-0001-9813-2842; DeGóis: <http://www.degois.pt/visualizador/curriculum.jsp?key=4791146915345058>

Fernando Manuel Lourenço **Martins**

Licenciatura em Matemática Ensino, Mestrado em Matemática e Doutoramento em Matemática na Universidade da Beira Interior. Professor adjunto na Escola Superior de Educação de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra, e Diretor do curso de Educação Básica na mesma instituição. Investigador e Coordenador Científico do grupo de Matemática Aplicada no Instituto de Telecomunicações, Delegação da Covilhã, coeditor da coleção Sports Performance and Exercise da Springer Plus Journal e membro do corpo editorial da revista científica SpringerPlus. Coordenador Científico e investigador da Unidade de Investigação Aplicada em Ciências do Desporto da Escola Superior de Educação do Instituto Politécnico de Coimbra, bem como investigador do Laboratório RoboCorp pertencente ao Instituto de Investigação Aplicada do Instituto Politécnico de Coimbra. Mais detalhes: http://www.researchgate.net/profile/Fernando_Martins13



Rui Sousa **Mendes**

Doutorado em Ciências da Motricidade - Controlo Motor e Aprendizagem pela Faculdade de Motricidade Humana de Lisboa, com orientação do Professor Doutor Mário Godinho. Professor na Escola Superior de Educação de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra (ESEC-IPC) desde 1990. Atual presidente da mesma instituição. Entre outras funções assumiu, também, a coordenação do Curso de Desporto e Lazer da ESEC-IPC, coordenação do Curso de Mestrado em Jogo e Motricidade na Infância, presidência do conselho pedagógico e presidência do conselho científico. Investigador da Unidade de Investigação Aplicada em Ciências do Desporto da Escola Superior de Educação do Instituto Politécnico de Coimbra, bem como investigador do Laboratório RoboCorp pertencente ao Instituto de Investigação Aplicada do Instituto Politécnico de Coimbra. Autor de mais de 130 artigos científicos com revisão por pares e orientador de mestrandos e doutorandos das áreas da motricidade humana e ciências do desporto. Mais detalhes: https://www.researchgate.net/profile/Rui_Mendes4

Uma abordagem multidisciplinar para o ensino de técnicos em jogos desportivos coletivos

Filipe Manuel Clemente, Fernando Manuel Lourenço Martins
& Rui Sousa Mendes

O processo de formação de estudantes do ensino superior no âmbito das Ciências do Desporto e Educação Física é um processo contínuo que carece de investimento teórico/prático para potenciar a intervenção dos candidatos a futuros técnicos desportivos. No caso específico da preparação dos estudantes para o processo laboral, existem carência identificadas na estrutura formativa, fundamentalmente devido à reduzida exposição dos estudantes a problemas de investigação-ação e às competências práticas indispensáveis ao ser técnico (Papacharisis, Goudas, Danish, & Theodorakis, 2005).

Na investigação dedicada ao estudo de treinadores desportivos peritos, identificaram-se quatro estágios no processo formativo (Schempp, McCullick, & Mason, 2006): *i*) iniciante; *ii*) competente; *iii*) proficiente; e *iv*) perito. Por definição, os treinadores iniciantes (novatos) possuem menos que três anos de experiência profissional e centram mais a sua preocupação no comportamento dos praticantes do que na transmissão de conhecimento (Jiménez, Lorenzo, & Ibañez, 2009). Com a experiência, os treinadores adquirem competências que lhes permite reduzir o tempo despendido em tarefas não relacionadas com o treino, possibilitando-lhes mais tempo para incrementar a performance dos praticantes. Assim, o treinador competente é descrito quando utiliza a experiência anterior para resolver novos problemas e/ou situações (Jiménez *et al.*, 2009).

Em jogos desportivos coletivos, foi possível verificar que os treinadores peritos enfatizam a instrução tática, seguido da instrução geral e da instrução técnica



medindo a duração e frequência das mesmas ao longo da prática (Horton, Baker, & Deakin, 2005). O recurso ao elogio e ao encorajamento é igualmente bastante utilizado apesar da sua reduzida duração (Wiman, Salmoni, & Hall, 2010). Intervenções de repreensão, crítica ou punição não-verbal foram os comportamentos menos utilizados pelos treinadores analisados (Horton *et al.*, 2005). No entanto, apesar da caracterização das ações dos treinadores peritos, a forma de como o seu nível foi alcançado no processo de evolução é reduzidamente debatido.

De facto, considerar o treinador perito é muito mais do que o considerar um treinador com experiência. Apesar da relevante importância da experiência no processo de atribuição de significado ao conhecimento e à capacidade de desenvolver e refinar o processo de treino, importa considerar distintos fatores para determinar o treinador de perito. Assim, por outras palavras a definição de perito e, a seleção dos técnicos especializados deve ter em conta fatores como a experiência cognitiva do treinador e a capacidade de interpretar e explicar processos e conhecimentos relacionados com a sua experiência (Nash, Martindale, Collins, & Martindale, 2012).

Consequentemente, no âmbito do plano de formação curricular em instituições de ensino superior, o tempo de prática em qualidade promovida pelo refinamento das experiências e evolução dos métodos de treino é um fator impreterivelmente determinante para o sucesso e desenvolvimento do treinador em formação (Cushion *et al.*, 2003). Para o efeito, é importante um corpo de conhecimento ajustável que produza esquemas mentais tendo como base o que o treinador percebe, produz e avalia da sua prática. Esses esquemas mentais, muitas vezes criados de forma autónoma e inconsciente são produto das experiências acumuladas e dos constrangimentos e possibilidades relativos ao contexto em que desenvolve a sua prática (Wacquant, 1995). Desta forma, esta prática inconsciente de esquemas mentais que otimizam o processo de planeamento, implementação e avaliação do treino representam um fator mutável e pessoal de cada treinador, dependendo da sua história e interpretação social dos eventos (Cushion *et al.*, 2003).



No âmbito do enquadramento do ser e formar treinadores, parece evidente que o tempo de exposição dos estudantes de graduação de Ciências do Desporto a situações enriquecedoras de aplicação dos conhecimentos teóricos na prática é reduzida. Adicionalmente, em muitas ocasiões o ensino de modalidades coletivas de invasão ainda persiste em modelos tradicionais com estilos de ensino centrados no professor, onde os estudantes assumem a posição de praticantes e não a de potenciais técnicos desportivos. Assim, novos modelos de ensino de estudantes de graduação afiguram-se necessários, apesar de na literatura não existirem casos destacados de modelos para tal finalidade.

No caso do modelo de educação desportiva (*Sport Education Model*), existe uma aproximação da vivência de experiências desportivas mas no âmbito do ensino da educação física. Tendo a origem do modelo resultado do trabalho desenvolvido por Siedentop, importa destacar que o mesmo se assume como um modelo curricular e de ensino desenvolvido para programas de educação física escolar (Siedentop, 1994). Este modelo alternativo enfatiza a relevância de um ensino desportivo através do conhecimento próprio do que é o jogo e das suas mais diversas componentes associadas (Siedentop, 1994). No modelo, os estudantes não só aprendem de forma mais completa e entusiasta como também coordenam e geram a sua experiência desportiva. Igualmente, também aprendem a responsabilizar-se e adquirem competências de trabalho em grupo.

Partindo da base do modelo de Siedentop, o presente artigo teve como objetivo divulgar os resultados obtidos da constituição de um modelo de formação de técnicos desportivos no âmbito dos jogos desportivos coletivos, onde os estudantes assumem distintos papéis associados à sua profissionalização e à aplicação dos conhecimentos teóricos em situações de ensino-aprendizagem. Adicionalmente, o presente modelo teve como objetivo promover o relacionamento interpessoal constituindo equipas de trabalho com papéis distintos no sentido de alcançar o objetivo comum, a otimização do processo de treino.

Metodologia

Participantes

Participaram no presente estudo 33 estudantes (22 do sexo masculino, $20 \pm 1,9$; 11 do sexo feminino, $19 \pm 0,8$) do curso de Desporto da Escola Superior de Educação de Coimbra. Os estudantes participaram em 8 sessões experimentais do modelo multidisciplinar em que, em cada sessão, o tempo total de intervenção foi de aproximadamente 90 minutos. Os estudantes foram devidamente informados sobre a sua participação no estudo consentindo, voluntariamente, a recolha de dados para realização do presente artigo.

Organização do modelo

O modelo de intervenção consistiu em distribuir diferentes tarefas e papéis aos estudantes criando situações de ensino-aprendizagem e cooperação entre membros da equipa técnica. Os estudantes foram agrupados, aleatoriamente e de forma equitativa, em 8 grupos. Cada grupo teve 5 funções a saber: *i*) grupos em prática (assumiram o papel de praticantes, sendo responsáveis pelo comprometimento com a tarefa); *ii*) grupo a treinar (planeando e aplicando uma sessão de treino de 60 minutos com fase preparatória, fase fundamental e retorno à calma); *iii*) grupo a analisar (responsável por utilizar ferramentas de análise de jogo que permitiram avaliar o desempenho individual e coletivo dos praticantes); *iv*) grupo a controlar (responsável por monitorizar a frequência cardíaca e volume de carga dos praticantes, utilizando o POLAR TEAM APP com 10 sensores); *v*) grupo a entrevistar (responsável por entrevistar os praticantes no término da sessão utilizando, para tal, entrevistas semiestruturadas focando-se na qualidade dos exercícios propostos).

Para todos os grupos encarregues de intervir como membros do staff técnico, procedeu-se ao seu acompanhamento no dia anterior à intervenção, procurando dissipar questões e providenciar a informação necessária à utilização dos



materiais. As sessões decorreram ao longo de um período de 8 semanas, com uma sessão em cada. Os grupos, numerados de 1 a 8, foram distribuídos ao longo do tempo pelos diferentes papéis.

O plano de rotação foi providenciado numa sessão inicial de explicação do modelo. Na referida sessão foram ainda constituídos os grupos de trabalho, os critérios de êxito, as ponderações avaliativas. Em períodos intermédios, foram ainda disponibilizadas sessões adicionais em formato de *workshop* para a aprendizagem da manipulação dos distintos instrumentos de avaliação e monitorização, bem como, associados ao plano didático e metodológico do planeamento. Em casos pontuais os workshops foram ministrados por docentes em missão ERASMUS. Para cada sessão foram previamente definidos os conteúdos táticos de treino, bem como, os níveis de exigência fisiológica..

Implementação do modelo

Como referido anteriormente, os processos associados às diferentes tarefas foram executados durante os momentos de intervenção. As sessões prática decorreram no campo de futebol de onze relvado e com os equipamentos necessários à prática. Após equipas, os grupos de “praticantes”, foram imediatamente intervencionados pelo grupo “controlar”, encarregues de inserir os dados de cada praticante no POLAR TEAM APP e sincronizar o sensor (cardiofrequencímetro) com o praticante.

Durante o período de sincronização dos cardiofrequencímetros, os grupos “a analisar” e “a treinar” encarregavam-se de preparar o processo interventivo. Importa realçar que, os grupos pertencentes ao staff, trabalhavam em cooperação integrando informações e partilhando-as de forma a otimizar o processo de prática. Em casos concretos, o grupo “a treinar” partilhava o plano de treino e a intensidade desejada com o grupo “a controlar”. Este último grupo, ao monitorizar a frequência cardíaca, encarregava-se de verificar se as intensidades

atingidas pelos praticantes eram condizentes com o planeado. Em casos de valores acima ou abaixo do planeado, o grupo “a controlar” encarregava-se de informar de imediato o grupo “a treinar” de forma a estes procederem ao ajustamento da tarefa e/ou do feedback ou instruções aos praticantes.

O grupo “a analisar” focou-se em utilizar processos de observação de jogo a partir de filmagens no sentido de identificar o comportamento técnico/tático dos praticantes. Adicionalmente, o grupo “a entrevistar” encarregou-se por, após a intervenção, proceder à entrevista dos praticantes com questões por si projetadas sobre a qualidade do processo de treino e o alcançar dos objetivos e conteúdos do treino.

Análise Quantitativa

Durante o processo interventivo procedeu-se à recolha de variáveis fisiológicas (frequência cardíaca) e técnicas (volume de jogo, índice de eficiência e pontuação da performance) no caso dos praticantes. A frequência cardíaca foi mensurada através do recurso a cardiofrequencímetros (modelo H7 heart rate sensor, Polar, Finland) com frequência de amostragem de 1 segundo. A intensidade de prática foi monitorizado instantaneamente através da visualização da percentagem de frequência cardíaca máxima (%FCmax) no *iPad* com a aplicação POLAR TEAM APP. Tal visualização disponibiliza a frequência cardíaca de todos os praticantes num único ecrã, como verificável na Figura 1.

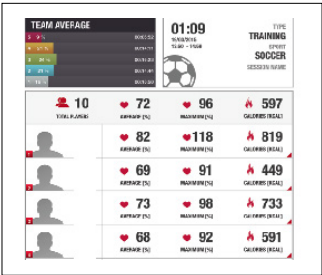


Figura 1. Visualização da monitorização da frequência cardíaca dos praticantes

No caso da análise de jogo, os observadores procederam à recolha de dados do desempenho técnico dos praticantes durante as sessões de treino. Para tal, recorreram à utilização do instrumento de observação TSAP (*Performance Assessment in Team Sports*) (Gréhaigne, Godbout, & Bouthier, 1997). Do registo resultaram três variáveis dependentes: *i*) índice de volume de jogo; *ii*) índice de eficiência; e *iii*) pontuação da performance. A observação das gravações procedeu-se recorrendo ao *software VirtualDub*.

Análise Qualitativa

Como forma de analisar o processo de percepção dos praticantes no que se refere à qualidade das tarefas, adequabilidade, intensidade e conteúdos promovidos pelos treinadores, procedeu-se à realização de entrevistas semiestruturadas (Berg, 2007). As questões de base foram estipuladas pelo grupo “a entrevistar” considerando os tópicos de interesse para a entrevista. A entrevista aos praticantes e aos treinadores decorreram imediatamente após o término da sessão. Para o efeito, os estudantes utilizaram câmaras digitais de filmagem, bem como, gravadores de voz. O tratamento da informação transcrita pelos estudantes, foi realizada posteriormente. Na comparação entre entrevistas aos distintos praticantes e treinadores, recolheram-se as afirmações convergentes.

Adicionalmente, no término do programa de intervenção, aplicaram-se as seguintes questões aos estudantes: 1. em comparação com modelos regulares de ensino de desportos coletivos (professor leciona e estudantes praticam), quais as vantagens e desvantagens do modelo de ensino integrado adotado em Desportos Coletivos II? 2. De que forma considera que os diferentes papéis e tarefas assumidas durante o modelo podem interessar para o seu percurso formativo? 3. Sugira alterações ao modelo, nomeadamente, na inserção ou remoção de papéis e tarefas a assumir.

Procedimentos Estatísticos

As relações entre as variáveis de intensidade de prática (%FCmax planeada; %FCmax praticantes; PSE – percepção subjetiva de esforço) foram investigadas utilizando o teste de coeficiente r de Pearson. Confirmados os pressupostos da normalidade e homogeneidade da amostra, procedeu-se à aplicação do teste estatístico tendo os seus valores correlação sido classificados como (Hopkins, Hopkins, & Glass, 1996): muito fraca, 0-0,1; fraca, 0,1-0,3; moderada, 0,3-0,5; forte, 0,5-0,7; muito forte, 0,7-0,9; quase perfeita, 0,9-1; e perfeita, 1.

Para avaliar se o tipo de treino (RAA – Resistência Anaeróbia Alática; RAL – Resistência Anaeróbia Lática; RA – Resistência aeróbia) e os formatos de jogo (1v1, 2v2, 3v3 e 4v4) afetavam significativamente os valores de volume de jogo, índice de eficiência e pontuação da performance recorreu-se à MANOVA multivariada do teste *post-hoc Bonferroni* (Maroco, 2012). A dimensão do efeito (*partial eta square*) foi classificado da seguinte forma (Pierce, Block, & Aguinis, 2004): pequeno, 0,14-0,36; moderado, 0,37-0,50; forte, 0,51-1. Todos os testes estatísticos foram executados com o *software SPSS Statistics* (versão 22, IBM SPSS, Chicago, IL) para um $p\text{-value} < 0,05$.

Resultados

A presente secção de resultados foi agrupada em três categorias de análise: *i*) intensidade do estímulo de treino; *ii*) exercitação técnico/tática; e *iii*) destaques das entrevistas.

Intensidade do estímulo

Análise Quantitativa

Os valores médios atingidos pelos jogadores possibilitaram identificar a intensidade de prática em cada fase da sessão. Todos os valores encontram-se descritos na seguinte tabela 1.



Tabela 1. Estatística descritiva (média ± desvio-padrão) dos valores de intensidade em cada sessão de prática

		SP 1 - RAA	SP 2 - RAA	SP 3 - RAL	SP 4 - RAL	SP 5 - RA	SP 6 - RA	SP 7 - RA	SP 8 - RA
Planeamento (%FCmax)*	Preparatória	65 ± 0,0	65 ± 0,0	65 ± 0,0	65 ± 0,0	60 ± 0,0	60 ± 0,0	60 ± 0,0	60 ± 0,0
	Fundamental	90 ± 0,0	90 ± 0,0	85 ± 0,0	85 ± 0,0	80 ± 0,0	80 ± 0,0	80 ± 0,0	80 ± 0,0
	Retorno à Calma	55 ± 0,0	55 ± 0,0	55 ± 0,0	55 ± 0,0	50 ± 0,0	50 ± 0,0	50 ± 0,0	50 ± 0,0
%FCmax	Preparatória	76 ± 3,4	73 ± 2,5	78 ± 2,8	69 ± 3,1	66 ± 4,2	70 ± 3,7	64 ± 2,6	65 ± 2,9
	Fundamental	93 ± 4,3	91 ± 4,6	89 ± 3,8	91 ± 4,4	86 ± 3,6	87 ± 4,6	83 ± 4,9	84 ± 3,7
	Retorno à Calma	67 ± 2,7	64 ± 3,1	65 ± 2,6	62 ± 3,9	64 ± 2,9	58 ± 4,8	56 ± 3,3	57 ± 2,6
PSE (0-20)	Preparatória	14 ± 0,9	15 ± 1,1	13 ± 0,7	14 ± 0,6	13 ± 0,4	14 ± 0,6	12 ± 0,3	12 ± 0,4
	Fundamental	19 ± 0,6	18 ± 1,3	18 ± 1,2	17 ± 0,8	15 ± 0,9	16 ± 1,4	15 ± 1,1	15 ± 0,9
	Retorno à Calma	12 ± 0,6	11 ± 0,3	10 ± 0,8	11 ± 0,8	11 ± 1,1	10 ± 0,8	8 ± 1,2	9 ± 1,4

* No planeamento (associado ao valor estimado dos treinadores) apenas existiu um valor conferido, logo não existem valores médios e desvios-padrão

A partir dos testes de correlação entre variáveis de FC e PSE foi possível verificar correlações muito fortes, no tipo de treino RAA, entre as variáveis *FCPlan* e *FCpra* ($r = 0,991$; $p\text{-value} = 0,001$), *PCplan* e *PSEpra* ($r = 0,973$; $p\text{-value} = 0,001$) e *FCpra* e *PSEpra* ($r = 0,978$; $p\text{-value} = 0,001$). No tipo de treino RAL verificaram-se, igualmente, correlações muito fortes entre as variáveis *FCPlan* e *FCpra* ($r = 0,968$; $p\text{-value} = 0,001$), *PCplan* e *PSEpra* ($r = 0,979$; $p\text{-value} = 0,001$) e *FCpra* e *PSEpra* ($r = 0,917$; $p\text{-value} = 0,010$). No tipo de treino RA verificaram-se correlações muito fortes entre as variáveis *FCPlan* e *FCpra* ($r = 0,976$; $p\text{-value} = 0,001$), *PCplan* e *PSEpra* ($r = 0,909$; $p\text{-value} = 0,001$) e *FCpra* e *PSEpra* ($r = 0,938$; $p\text{-value} = 0,001$).

Na análise entre fases do treino, a partir dos testes de correlação entre variáveis de FC e PSE foi possível verificar correlações muito fortes, na fase de treino preparatória, entre as variáveis *FCPlan* e *FCpra* ($r = 0,802$; $p\text{-value} = 0,017$) e correlações fortes entre as variáveis *PCplan* e *PSEpra* ($r = 0,630$; $p\text{-value} = 0,094$) e *FCpra* e *PSEpra* ($r = 0,564$; $p\text{-value} = 0,146$). Na fase fundamental verificaram-se correlações muito fortes entre as variáveis *FCPlan* e *FCpra* (r

= 0,899; $p\text{-value}$ = 0,002), *PCplan* e *PSEpra* (r = 0,933; $p\text{-value}$ = 0,001) e *FCpra* e *PSEpra* (r = 0,922; $p\text{-value}$ = 0,001). No retorno à calma verificaram-se correlações muito fortes entre as variáveis *FCplan* e *FCpra* (r = 0,749; $p\text{-value}$ = 0,032) e *FCpra* e *PSEpra* (r = 0,862; $p\text{-value}$ = 0,006) e correlações fortes entre as variáveis *PCplan* e *PSEpra* (r = 0,626; $p\text{-value}$ = 0,097).

Exercitação Técnica/tática

Análise Quantitativa

Através da aplicação da *multivariate* MANOVA no cruzamento entre fatores tipo de treino e formato de jogo verificou-se a não existência de diferenças estatisticamente significativas no compósito (agregado de variáveis dependentes) multivariado das variáveis dependentes (*Maior Raiz de Roy* = 0,001; F = 0,001; $p\text{-value}$ = 1,000; η_p^2 = 0,001; *Dimensão do Efeito Muito Fraco*). Face aos resultados obtidos, procedeu-se à execução de duas MANOVA one-way para cada variável independente.

Na análise da variância efetuada para o fator tipo de treino, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nas variáveis dependentes de volume de jogo (F = 9,805; $p\text{-value}$ = 0,019; η_p^2 = 0,797; *Dimensão do Efeito Muito Forte*) e pontuação da performance (F = 34,441; $p\text{-value}$ = 0,001; η_p^2 = 0,932; *Dimensão do Efeito Muito Forte*). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre tipos de treino na variável dependente de índice de eficiência (F = 0,418; $p\text{-value}$ = 0,679; η_p^2 = 0,143; *Dimensão do Efeito Fraco*). Os valores de post hoc podem ser verificados na tabela 2.

Na análise da variância efetuada para o fator formato de jogo, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nas variáveis dependentes de volume de jogo (F = 10,181; $p\text{-value}$ = 0,024; η_p^2 = 0,884; *Dimensão do Efeito Muito Forte*) e pontuação da performance (F = 19,518; $p\text{-value}$ = 0,008; η_p^2 = 0,936; *Dimensão do Efeito Muito Forte*). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre tipos de treino na variável dependente de índice de eficiência



Tabela 2. *Análise descritiva (média ± desvio-padrão) e valores de post hoc entre tipos de treino nas variáveis dependentes de eficácia técnica*

	RAA	RAL	RA
Volume de Jogo	18,28 ± 1,32 ^c	16,34 ± 0,59	13,82 ± 1,30 ^a
Índice de Eficiência	0,40 ± 0,13	0,19 ± 0,05	0,26 ± 0,30
Pontuação da Performance	12,91 ± 0,46 ^{b,c}	9,49 ± 1,63 ^{a,c}	6,79 ± 0,51 ^{a,b}

Diferença estatisticamente significativa na comparação comRAA^a; RAL^b; e RA^c para um p<0.05

($F = 1,130$; $p\text{-value} = 0,437$; $n_p^2 = 0,459$; *Dimensão do Efeito Forte*). Os valores de post hoc podem ser verificados na seguinte tabela 3

Tabela 3. *Análise descritiva (média ± desvio-padrão) e valores de post hoc entre tipos de treino nas variáveis dependentes de eficácia técnica*

	1v1	2v2	3v3	4v4
Volume de Jogo	18,28 ± 1,32 ^d	16,34 ± 0,59	14,70 ± 0,54	12,94 ± 1,30 ^a
Índice de Eficiência	0,40 ± 0,13	0,19 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,43 ± 0,40
Pontuação da Performance	12,91 ± 0,46 ^{c,d}	9,49 ± 1,63 ^{a,c}	7,01 ± 0,17 ^a	6,56 ± 0,75 ^a

Diferença estatisticamente significativa na comparação com1v1^a; 2v2^b; 3v3^c; e 4v4^d para um p<0.05

Destaques das entrevistas

No decorrer da implementação do modelo, procedeu-se à realização e aplicação de um questionário aos estudantes no sentido de perceber o nível de adequabilidade do ensino às suas expectativas académicas e profissionais.

No que se refere às respostas providenciadas à questão 1, seguem-se alguns exemplos da percepção dos estudantes:

A nível de desvantagens não consigo encontrar muitas porque este modelo promove a aprendizagem mais fácil da modalidade, e das competências que temos de atuar. Consegue-nos colocar num âmbito mais de prática e mais ligado ao âmbito de trabalho. Promove a pesquisa prévia para poder ensinar, entrevistar, analisar, controlar, e poder praticar com mais técnica, conhecimento e ajuda.

De facto, a pesquisa de métodos de trabalho e a capacidade de gerir o plano de intervenção, assume-se como um fator diferenciador e com regularidade nomeado pelos estudantes:

As vantagens deste modelo são que os alunos conseguem ter um contacto mais próximo no que diz respeito a planeamento e execução do treino, tanto a nível de observações, planos de treino, entrevistas pós-treino e medições de frequências cardíacas.

No âmbito das respostas dos estudantes à segunda questão, seguem-se algumas das respostas:

Estes diferentes papéis assumidos durante o modelo, podem beneficiar para o meu percurso formativo, de forma a eu ganhar experiência em planear e dar uma aula, o que me vai ajudar bastante pois quero seguir treino de alto rendimento. Desta maneira, acho que este modelo é uma mais valia para o meu percurso formativo pois ajuda a trabalhar e ter a percepção das tarefas de um treinador/ professor, o que é, o que eu quero seguir futuramente.

De facto, o assumir de papéis e tarefas associadas ao treino desportivo, planeamento e avaliação assumem-se como destaques comuns às percepções dos estudantes:

É bastante interessante poder passar por varias funções que não iríamos ter oportunidade de experimentar. Ajuda nos a perceber o papel de cada função assim como nos ajuda a decidir o futuro.

No que se refere às sugestões de melhoria, a remoção do papel de entrevistador é destacado na maioria das respostas:

Acho que a tarefa de entrevistar não é muito relevante para a maioria dos alunos porque não incide muito nos objectivos dos mesmos.

Outras respostas similares podem ser verificadas de seguida:

Relativamente a este modelo, acho que um dos papéis menos importantes, é o da



entrevista, pois as respostas são demasiado rápidas e curtas por parte dos praticantes o que não beneficia os jornalistas.

Para além do destaque dos possíveis papéis a substituir, verificaram-se sugestões associadas à inserção de novas tarefas:

Um dos papéis a inserir podia ser o de preparador físico, de modo a que houvesse uns treinadores responsáveis pela parte técnica e tática da aula, e outros pela parte física.

Discussão e Conclusão

Uma das principais tarefas impostas aos treinadores neste estudo piloto foi a de, seguindo as orientações metodológicas, planear as sessões de treino de acordo com os conteúdos e objetivos previamente definidos. A partir da análise quantitativa efetuada através da monitorização da frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço, verificou-se que ambos os instrumentos se revelam fortemente associados, servindo de instrumentos válidos para ajustar os exercícios de treino (Coutts, Rampinini, Marcora, Castagna, & Impellizzeri, 2009). Adicionalmente, verificaram-se valores muito fortes de correlação entre o planeamento e estimativa de intensidade de prática sugerida pelos treinadores e os valores alcançados e percebidos pelos praticantes. Tais resultados evidenciam a capacidade dos estudantes “treinadores” identificarem os jogos e tarefas mais apropriadas para aumentar a intensidade dos praticantes, indo ao encontro da capacidade evidenciada por treinadores experientes no futebol. O alcançar dos objetivos definidos para a intensidade poder-se-ão justificar pelo acompanhamento em tempo real do perfil de intensidade dos praticantes, considerando alguns comentários a propósito:

O POLAR TEAM e os nossos colegas do controlo ajudaram-nos a verificar se os jogadores estavam no nível que queríamos. Quando não estavam na intensidade planeada mudámos a tarefa e resultou logo!

Para além do comentário sobre a utilidade da monitorização para o ajustamento

das tarefas propostas, outro grupo de treinadores destacou a utilidade do instrumento para aumentar o encorajamento:

Quando os nossos jogadores não estavam com a frequência cardíaca que pretendíamos, bastava aumentar o encorajamento individual para a intensidade disparar.

Importa realçar que o fator de encorajamento encontra-se associado ao aumento da intensidade de prática, tal como reportado pela literatura em jogos reduzidos no futebol (Courtts *et al.*, 2009). Esta opção pedagógica foi reforçada pela informação instantânea providenciada pelos sistemas de monitorização. Ainda no que se refere à avaliação, a identificação do nível de eficiência técnica potenciou igualmente a compreensão sobre os efeitos de diferentes jogos reduzidos no desempenho e aperfeiçoamento de comportamentos táticos e ações técnicas. Tais ajustamentos decorreram da capacidade de identificar os principais constrangimentos da tarefa que potenciam o desenvolvimento dos conteúdos definidos (Clemente, 2012). No fundo, os estudantes foram conduzidos pelos sistemas de informação a utilizarem os princípios pedagógicos para o desenvolvimento de jogos reduzidos e condicionados, tal como expectável em treinadores profissionais (Tan, Chow, & Davids, 2012).

Para além da manifestação regular dos estudantes sobre a aplicabilidade do modelo e vantagens curriculares do mesmo, destacaram-se ainda as menções ao plano motivacional:

Desta forma é muito mais interessante porque aqui somos nós que aprendemos por nós próprios. O professor apenas nos orienta! Para além disso, o facto de não só a minha qualidade técnica e tática determinarem a minha avaliação é muito mais motivador. Desta forma, posso mostrar que apesar de não se perita na prática, posso ser bastante profissional enquanto técnica!

Apesar de não existirem estudos comparativos para o presente modelo, o facto é que em estudos que avaliaram a motivação dos praticantes no modelo do *Sports Education* foi possível identificar um aumento no prazer pela prática, maior



índices motivacionais ou aumento do conhecimento tático (Clarke & Quill, 2003; Wallhead & Ntoumanis, 2004). De facto, para além do contexto de comprometimento pela prática, importa realçar que os modelos de participação inclusivos e baseados em estilos de ensino de produção, auxiliam na fidelização dos estudantes pela prática regular e assídua (Wallhead & O'sullivan, 2005).

No presente modelo de ensino foi notório o acréscimo do relacionamento interpessoal, fruto da necessidade de a equipa técnica (composta por diferentes grupos) cooperar para um objetivo comum. Tal estratégia potenciou as vias de comunicação, trabalho cooperativo e comprometimento com um projeto comum. Tal facto é verificável pela seguinte resposta de um dos estudantes:

Tínhamos que estar sempre em contacto uns com os outros porque o trabalho de um dependia do dos outros. Eu como treinador tive que estar sempre “em cima” dos analistas para saber se as minhas tarefas estavam a corresponder ao planeamento.

De facto a cooperação exigida, à semelhança do modelo *Sports Education*, regista o acréscimo de comunicação entre companheiros, apra além do entusiasmo resultante da autonomia nas tomadas de decisão partilhadas e o assumir de papéis de liderança (Wallhead & Ntoumanis, 2004).

Sumariamente, o presente modelo de ensino baseado em estilos de ensino de produção, configura uma forma partilhada de aplicar conhecimentos teóricos em processos de ensino-aprendizagem controlados e devidamente orientados. A partir dos *workshops* providenciados os estudantes adquiriram as bases necessárias à instrumentalização dos matérias de avaliação, controlo e monitorização, bem como, se apropriaram das orientações necessárias para a execução de planos de treino ajustados aos conteúdos definidos. O assumir de diferentes papéis e funções propiciaram o envolvimento num sistema cooperativo e a maximizaram a percepção de como profissionalmente será possível construir equipas de trabalho multifacetadas e multidisciplinares que desenvolvem tarefas diferentes tendo um objetivo comum. Como fatores a corrigir em futuras aplicações do modelo, os estudantes identificaram o facto

de os grupos carecerem de maior distribuição equitativa entre géneros visto o presente modelo ter concedido liberdade para os estudantes se organizarem autonomamente pelos grupos. Igualmente, realçou-se que em futuros modelos será relevante adicionar maior carga letiva e instrumentos complementares de monitorização como GPS (*Global Positioning System*) e acelerómetros. Igualmente, foi sugerida a criação de uma plataforma informática de partilha de documentação bibliográfica associada ao planeamento metodológico e monitorização.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado no âmbito do financiamento FCT 43/ID/2014.



Referências

- Berg, B. L. (2007). *Qualitative research methods for the social sciences*. Boston, USA: Pearson & Allyn Bacon.
- Clarke, G., & Quill, M. (2003). Researching Sport Education in Action: A Case Study. *European Physical Education Review*, 9(3), 253–266.
- Clemente, F. M. (2012). Princípios pedagógicos dos teaching games for understanding e da pedagogia não-linear no ensino da educação física. *Movimento*, 18(2), 315–335.
- Coutts, A. J., Rampinini, E., Marcora, S. M., Castagna, C., & Impellizzeri, F. M. (2009). Heart rate and blood lactate correlates of perceived exertion during small-sided soccer games. *Journal of Science and Medicine in Sport / Sports Medicine Australia*, 12(1), 79–84.
- Cushion, C. J., Armour, K. M., & L., J. R. (2003). Coach education and continuing professional development: Experience and learning to coach. *Quest*, 55, 215–230.
- Gréhaigne, J. F., Godbout, P., & Bouthier, D. (1997). Performance assessment in team sports. *Journal of Teaching in Physical Education*, 16, 500–516.
- Hopkins, K. D., Hopkins, B. R., & Glass, G. V. (1996). *Basic statistics for the behavioral sciences*. Boston: Allyn and Bacon.
- Horton, S., Baker, J., & Deakin, J. (2005). Expert in action: A systematic observation of 5 national team coaches. *International Journal of Sport Psychology*, 36(4), 299–319.
- Impellizzeri, F. M., Rampinini, E., & Marcora, S. M. (2005). Physiological assessment of aerobic training in soccer. *Journal of Sports Sciences*, 23(6), 583–92.
- Jiménez, S., Lorenzo, A., & Ibañez, S. J. (2009). Development of Expertise in Spanish Elite Basketball Coaches. RICYDE. *Revista Internacional de Ciencias Del Deporte*, 5(17), 19–32.



Maroco, J. (2012). *Análise Estatística com utilização do SPSS [Statistical analysis with SPSS]*. Lisbon, Portugal: Edições Silabo.

Nash, C., Martindale, R., Collins, D., & Martindale, A. (2012). Parameterising expertise in coaching: Past, present and future. *Journal of Sports Sciences*, 30(10), 985–994.

Papacharisis, V., Goudas, M., Danish, S. J., & Theodorakis, Y. (2005). The Effectiveness of Teaching a Life Skills Program in a Sport Context. *Journal of Applied Sport Psychology*, 17(3), 247–254.

Pierce, C. A., Block, R. A., & Aguinis, H. (2004). Cautionary Note on Reporting Eta-Squared Values from Multifactor ANOVA Designs. *Educational and Psychological Measurement*, 64(6), 916–924.

Schempp, P., McCullick, B., & Mason, I. (2006). The development of expert coaching. In R. Jones (Ed.), *The sports coach as educator: Reconceptualising sports coaching* (pp. 145–161). London, UK: Routledge.

Siedentop, D. (1994). *Sport education: Quality PE through positive sport experiences*. Champaign, IL, USA: Human Kinetics Publishers.

Tan, C. W. K., Chow, J. Y., & Davids, K. (2012). “How does TGfU work?”: examining the relationship between learning design in TGfU and a nonlinear pedagogy. *Physical Education and Sport Pedagogy*, 17(4), 331–348.

Wacquant, L. (1995). Pugs at work: Bodily capital and bodily labour among professional boxers. *Body and Society*, 1(1), 65–89.

Wallhead, T. L., & Ntoumanis, N. (2004). Effects of a Sport Education Intervention on Students’ Motivational Responses in Physical Education. *Journal of Teaching in Physical Education*, 23, 4–18.

Wiman, M., Salmoni, A., & Hall, C. (2010). An examination of the definition and development of expert coaching. *International Journal of Coaching Science*, 4(2), 37–60.



Parte 2

Domínio das Ciências
Agrárias e Alimentares

**Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais
à Base de Tomilho Bela-luz: um Projeto com
Reconhecido Interesse para a Indústria
Alimentar e para o Consumidor**

Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David Gomes, Marta
Henriques, Fernanda M. Ferreira & Carlos Dias Pereira

Artigo integrado na
Parte 2 "Domínio das Ciências Agrárias e Alimentares"
da publicação.

Páginas do artigo
83 a 109

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Filipa **Carvalho**

Licenciada em Biotecnologia pela Escola Superior Agrária de Coimbra (2013). Estudante de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (2015-2017). Destaca-se a participação no projeto de Investigação e Empreendedorismo "Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo: os benefícios da redução do teor de sal e da eliminação de produtos químicos durante o processo de cura" e, a participação em comunicações científicas visando a divulgação do mesmo.

Ana **Rodrigues**

Licenciada em Biotecnologia em 2013 na Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra. Entre 2014 e 2015 foi promotora de um projeto de investigação, desenvolvimento e inovação que visou o estudo das propriedades do tomilho bela-luz e a sua aplicação na produção biológica de queijo, no âmbito do programa Passaporte para o Empreendedorismo. Atualmente frequenta o curso de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Instituto Politécnico de Castelo Branco.

David **Gomes**

Professor Adjunto convidado do Instituto Politécnico de Coimbra, Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária. Tem colaborado na lecionação das unidades curriculares Oficinas Tecnológicas de Processamento de Lácteos, Introdução à Tecnologia Alimentar e Embalagens de Produtos Alimentares. Mestre em Agropecuária (2009) e Especialista em Indústrias Alimentares (2015) é responsável pela Oficina Tecnológica de Lacticínios (OTL). Tem participado em diversos trabalhos de investigação e determinações específicas com carácter experimental, desenvolvidas na OTL e em laboratório. Dá apoio a empresas do sector de lacticínios, através de protocolos e parcerias estabelecidas com a ESAC.



Marta **Henriques**

Doutorada em Engenharia Química na especialidade de Processos Químicos pela Universidade de Coimbra, é mestre em Engenharia Bioquímica (2005) e licenciada em Engenharia Química (2001). É Professora Adjunta no Politécnico de Coimbra, Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da ESAC, e coordenadora do Curso Técnico Superior Profissional em Qualidade Alimentar. Leciona aos cursos de Licenciatura em Biotecnologia, Engenharia Alimentar e Mestrado em Engenharia Alimentar.

É investigadora integrada no CERNAS/IPC, no grupo de Ciências e Engenharia Alimentar, e foca-se na valorização de subprodutos da indústria alimentar para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores tendo em vista a sustentabilidade industrial. Colaborou e coordenou vários projetos nacionais e internacionais de I&D. É autora e co-autora em 2 patentes, tendo publicado diversos artigos e capítulos de livros em revistas e edições científicas da especialidade.

Fernanda M. **Ferreira**

Licenciada em Bioquímica pela Universidade de Coimbra (1993). Pela mesma universidade obteve o grau de Mestre em Biologia Celular (1998) e de Doutor em Biologia (2006).

Iniciou a sua atividade profissional em 2005/2006 na Escola Superior Agrária de Coimbra, onde atualmente é Professor Adjunto. Tem lecionado unidades curriculares nas áreas da Biologia, Fisiologia Celular e Bioenergética, Química Alimentar e Ecotoxicologia. Tem participado em diversos trabalhos de investigação, nas áreas da Toxicologia Bioquímica, Bioenergética Mitocondrial, aplicada também às Plantas Aromáticas e Medicinais. Tem atualmente 29 publicações científicas em revistas internacionais da especialidade. É Investigador no CITAB/UTAD.

Carlos **Dias Pereira**

Licenciado em Medicina Veterinária pela FMV/UTL (P), Mestre em ciências alimentares pela Universidade de Reading (UK) e Doutor em Ciência e Engenharia dos Alimentos pela Universidade de Santiago de Compostela (ES). Professor Coordenador na Escola Superior Agrária de Coimbra e director do Instituto de Investigação Aplicada do Politécnico de Coimbra. Membro efectivo do Centro de Estudos dos Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS). Desde 2003 coordenou diversos projectos de I&D desenvolvidos na ESAC, bem

como projectos e parcerias no âmbito da educação/desenvolvimento a nível internacional, nomeadamente em países da CPLP. É autor/co-autor de 16 publicações em revistas internacionais, de 4 capítulos de livros e de 5 livros. É também autor/co-autor de cerca de 80 comunicações em congressos internacionais, sob a forma de comunicações orais ou poster.



Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais à Base de Tomilho Bela-luz: um Projeto com Reconhecido Interesse para a Indústria Alimentar e para o Consumidor

Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David Gomes, Marta
Henriques, Fernanda M. Ferreira & Carlos Dias Pereira

A crescente preocupação da população com a qualidade e segurança dos alimentos, nomeadamente com a ingestão de aditivos alimentares que possam causar efeitos nefastos no organismo e no ambiente, tem dinamizado a procura de alternativas naturais e biológicas desses produtos. No caso da produção industrial de queijo recorre-se regularmente à utilização de antibióticos (natamicina) ao longo do período de maturação, de forma a garantir o controlo do crescimento microbiano. Contudo, esta prática não se revela eficaz para todos os tipos de microrganismos e a sua aplicação nem sempre é feita nas concentrações adequadas.

A utilização de plantas aromáticas na produção artesanal de queijo não é algo determinantemente inovador, sendo já uma prática comum em algumas regiões do país, mas com um cunho marcadamente empírico, numa perspetiva etnobotânica e etnofarmacológica. Partindo do pressuposto que o uso empírico destas espécies e os saberes e práticas a elas associadas foram ratificados e confirmados ao longo de gerações de consumidores, é de considerar o seu potencial fitoquímico, fitofarmacêutico e nutritivo (Fernandes, 2010).

Tem-se assistido a um crescente interesse no estudo das propriedades dos compostos bioativos destas plantas, mais concretamente dos benefícios que podem ter para a saúde quando aplicados a alimentos. Neste contexto, o que é efetivamente novidade e de grande interesse económico, industrial e social, é a obtenção e o estudo dos princípios ativos das ervas aromáticas e a validação



da sua eficiência quando aplicados na produção de queijos, visando padrões de qualidade e segurança alimentar mais elevados.

Tomilho bela-luz

As espécies do género *Thymus* são arbustos perenes herbáceos, utilizados normalmente como especiarias e/ou plantas medicinais (Evans & Edward, 1998). O *Thymus mastichina* L. é uma planta da família *Labiatae*, endémica da Península Ibérica. Em Portugal, esta espécie encontra-se distribuída por todo o país, exceto nas regiões calcárias, e a sua época de floração ocorre entre abril e junho (Franco, 1983).

É igualmente designado por Tomilho bela-luz ou “sal puro” e caracteriza-se pela qualidade dos seus princípios ativos (Gordo *et al.*, 2012), que para além das suas vantagens culinárias, são também excelentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Fraternali *et al.*, 2003). Essas propriedades contribuem não só para melhorar as características organoléticas dos produtos alimentares onde são aplicados, mas também para aumentar o seu período de conservação. Na indústria alimentar, a utilização de antioxidantes é já uma prática comum, e tem como objetivo a prevenção ou redução das reações de oxidação nos alimentos, de forma a garantir a qualidade alimentar por períodos mais longos e aumentar o seu tempo de prateleira. Alguns desses antioxidantes sintéticos têm sido alvo de discussão, nomeadamente no que respeita à sua segurança para o consumidor, refletindo a necessidade de se encontrarem antioxidantes naturais com capacidade de os substituir (Delgado *et al.*, 2014).

Neste contexto, aliando os conhecimentos adquiridos por duas alunas ao longo do percurso académico na licenciatura em biotecnologia, à experiência de um grupo de docentes e técnicos qualificados em diversas áreas complementares, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra, foi constituída uma equipa de trabalho focada no estudo do potencial antioxidante e antimicrobiano do *Thymus mastichina* L. e da possibilidade da sua aplicação na indústria alimentar, mais concretamente no queijo curado. Pretendeu-se



desenvolver produtos naturais à base desta planta aromática, que mantivessem ou potenciasses as suas características e pudessem ser usados no aumento do valor nutricional dos alimentos, ou no combate ao desenvolvimento microbiano.

Desenvolvimento de novos produtos à base do Tomilho bela-luz

A primeira etapa do estudo proposto passou pela produção de dois tipos de extratos de *T. mastichina* L. Submeteram-se 25 g da planta seca a processos de extração com água (decoção) ou com etanol (maceração), visando obter um extrato aquoso e um extrato etanólico, respetivamente. No caso da preparação do extrato aquoso (EA), após arrefecimento da solução procedeu-se à sua filtração sob vácuo, à liofilização do filtrado e armazenamento a -18 °C. Para o extrato etanólico (EE), a solução foi filtrada sob vácuo e armazenada nas mesmas condições.

Capacidade antioxidante dos extratos

A capacidade antioxidante de ambos os extratos (Tabela 1) foi avaliada por dois métodos colorimétricos: o método DPPH, descrito por Sharma & Bhat (2009) e o método ABTS, baseado na técnica descrita por Miller & Rice (1997).

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos presente no extrato aquoso (EA) e no extrato etanólico (EE) de *Thymus mastichina* L. (*, ** $p<0,001$, quando comparados com o controlo)

Método	Extrato Aquoso (EA)	Extrato Etanólico (EE)
ABTS (IC50 $\mu\text{L mg}^{-1}$)	16,8 $\pm$ 3,2*	24,9 $\pm$ 4,0
DPPH (IC50 $\mu\text{L mg}^{-1}$)	38,6 $\pm$ 1,2**	81,6 $\pm$ 1,9
Fenóis totais (nmol EAG mg^{-1})	257,0 $\pm$ 23,5**	9,2 $\pm$ 3,8

Segundo esta metodologia, foi possível verificar que o extrato aquoso desta planta aromática apresenta maior capacidade antioxidante (Singleton *et al.*, 1999) que se traduz em menores valores pelos métodos ABTS e DPPH, e

maior conteúdo em compostos fenólicos do que o extrato etanólico (Tabela 1). Estes resultados permitem inferir que uma das mais-valias da introdução do extrato aquoso na indústria alimentar, será o seu contributo para o aumento do valor nutricional e da capacidade antioxidante dos alimentos.

Extrato aquoso como substituto do sal do queijo curado

A denominação empírica de “sal puro” atribuída a esta planta, reflete o seu carácter de intensificador de sabor quando aplicado a alimentos. Neste sentido, a possibilidade da redução do teor de sal usado na confeção de produtos alimentares pelo recurso ao extrato aquoso do Tomilho bela-luz, revelou-se um desafio extremamente interessante e promissor, não só pela diminuição do conteúdo de NaCl, como também pelo aumento do valor nutricional do alimento.

O queijo curado é um alimento, que em geral, tem uma concentração de sal relativamente elevada, e por consequência a população que sofre de problemas de hipertensão arterial vê-se limitada às possibilidades do seu consumo.

A influência da aplicação de extratos de Tomilho bela-luz em queijo curado, não tinha sido até aqui estudada, não permitindo prever quais as alterações físico-químicas, nutricionais, e sobretudo organoléticas que ocorreriam no produto. Neste sentido, foi necessário planear e desenvolver ensaios à escala semi-industrial com o intuito de avaliar as características do coadjuvante proposto como antioxidante natural e substituto do sal usado no fabrico de queijo, quando aplicado diretamente na coalhada.

Este estudo consistiu na confeção e comparação de queijos curados produzidos com extrato aquoso (0,15% m/m) e queijos com formulação denominada como tradicional. Avaliou-se em paralelo o processo de salga em salmoura, ou salga por espalhamento de sal à superfície, resultando no final quatro variedades de queijo: queijo com extrato aquoso com salga à superfície (EA.S); queijo com extrato aquoso em salmoura (EA.SM); queijo tradicional com salga à superfície



(T.S) e o queijo tradicional em salmoura (T.SM).

Os queijos curados de vaca (120 g) foram produzidos na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) e usados como modelos para aplicação do extrato aquoso de Tomilho. O leite de vaca pasteurizado foi normalizado a $3,5 \pm 0,1\%$ de gordura. Após coagulação, a coalhada foi cortada com liras e realizou-se um prévio dessoramento da massa. Nesta fase, diluiu-se o extrato aquoso de Tomilho num pequeno volume de água, sendo de seguida adicionado a metade da massa e homogeneizado. Esta, por sua vez continuou o dessoramento em moldes plásticos durante 24 h, numa câmara refrigerada. No dia seguinte, um lote de queijos foi desenformado e colocado em salmoura (com 19 °Baumé) durante 10 min (metade do tempo requerido para o tamanho do queijo em questão) de forma a tentar reduzir até 50% do sal presente no produto final. Num lote distinto, a salga dos restantes queijos foi efetuada pelo espalhamento de sal à superfície, controlando a sua quantidade de forma a reduzir novamente 50% do sal presente no produto final. Nos queijos com formulação tradicional, a salga em salmoura e por espalhamento à superfície foram realizadas de acordo com o tempo em salmoura e percentagem de sal totais. Após confeção, todos os queijos sofreram um processo de cura de 45 dias.

Avaliação nutricional e físico-química dos queijos

A avaliação das características nutricionais dos queijos decorreu no final do processo de cura e consistiu na quantificação da humidade, humidade isenta de gordura (HIG), teor de gordura e teor de sal, (Figura 1a-c). As características físico-químicas avaliadas foram a textura (Figura 1d), pH, acidez titulável, cor (Tabela 2) e a atividade da água (a_w).

Analisando o gráfico da Figura 1a) é possível verificar que de um modo geral, o método de salga não influenciou a percentagem de humidade nos queijos. As amostras com EA apresentaram valores de humidade e humidade isenta de gordura (HIG) ligeiramente menores, especialmente para o caso da variedade EA.SM. Estes queijos, onde se associa a adição de extrato aquoso de Tomilho

com o método de salga por salmoura, serão à partida um produto mais duro e consequentemente menos amanteigado, comparativamente com os exemplares produzidos de acordo com a formulação convencional.

A quantidade de água retida na massa constitui também um fator importante no processo de cura, no sabor e aroma do queijo bem como na sua conservação, já que, quanto maior o teor de humidade, mais rápida será a proteólise. Neste caso, todos os queijos podem ser classificados em termos de consistência como queijos de pasta semi-mole uma vez que apresentam valores de HIG entre 61 e 69% (NP 1598).

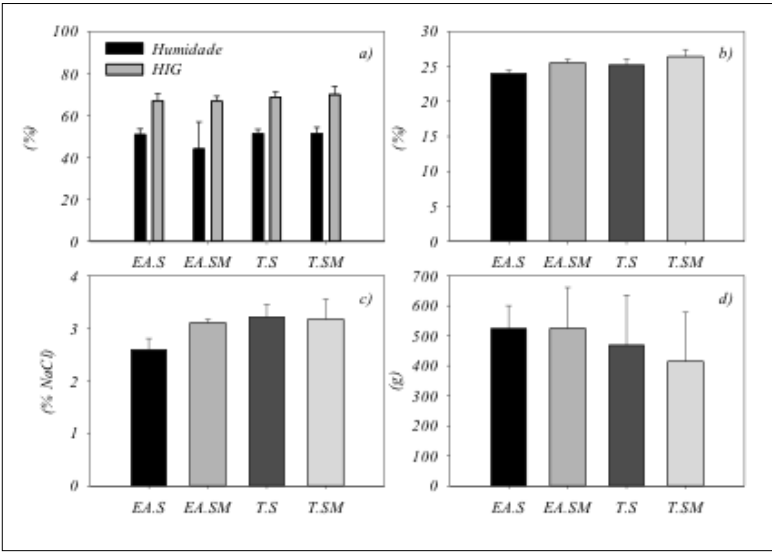


Figura 1. Composição e textura dos queijos após 45 dias de cura ($9,2\pm0,58$ °C e $92,4\pm3,1\%$ HR): a) humidade e humidade isenta de gordura (HIG) (%); b) gordura (%); c) cloretos (% NaCl) e d) dureza (g).

Relativamente ao teor de gordura (Figura 1b) verifica-se que, o método de salga é o fator que mais influência exerce. No entanto, a presença de EA de Tomilho também provoca uma diminuição no teor de gordura nos queijos, o que pode indicar que a concentração de NaCl afeta a composição físico-química dos

mesmos. Neste caso concreto, o espalhamento de sal à superfície e a utilização de EA permitem obter queijos com menos 2% de matéria gorda. Deste modo, a salga por salmoura apresenta-se como mais eficiente na remoção de humidade do interior do queijo, obtendo-se um produto final mais denso.

A percentagem de sal (NaCl) dos queijos (Figura 1c) foi inferida através da quantificação de cloretos presentes nas amostras. É possível verificar que os queijos produzidos pela metodologia tradicional apresentam percentagens de sódio semelhantes ($\approx 3,2\%$). Isto comprova que independentemente do método de salga utilizado, os queijos adquirem uma concentração de sal semelhante. Verifica-se também que a utilização do redutor de sal permite diminuir essa concentração, especialmente quando é aplicado o método de salga por espalhamento à superfície. Neste caso, regista-se uma redução de aproximadamente 12,5% do teor de sal nos queijos EA.S, em comparação com as amostras sujeitas à salmoura (EA.SM). Quando se recorre ao método de salmoura, e apesar de se ter reduzido o tempo previsto para metade do que seria aplicado na salmoura tradicional (T.SM), nas amostras EA.SM praticamente não se verifica uma redução no teor de sal dos queijos. Neste caso, é possível deduzir que a transferência do sal da salmoura para o queijo acontece principalmente nos primeiros minutos de contacto, possivelmente devido à pequena dimensão dos queijos testados e à elevada concentração da salmoura inicial ($19\text{ }^{\circ}\text{B}$). Desta forma, seria recomendada a diminuição dessa concentração inicial e simultaneamente a redução do tempo de salga.

De forma a determinar dureza dos queijos, realizou-se a análise do perfil de textura (em inglês TPA) através do texturómetro *Stable Micro Systems Texture Analyzer*. O tratamento dos resultados foi realizado pelo *Specific Expression PC Software*. A Figura 1d) mostra que não existem diferenças significativas na dureza dos queijos com EA, independentemente do método de salga praticado, e que estes apresentam os valores mais elevados de entre os tipos de queijo produzidos. Isto pode ser explicado pelo seu maior grau de dessoramento e humidade ligeiramente inferior. Já os queijos tradicionais (T.S e T.SM) mostram diferenças entre si, dado que a salga realizada por espalhamento permite a obtenção de

um produto final com casca mais rígida devido à maior concentração de sal à superfície e à sua secagem mais intensa.

Na Tabela 2 apresentam-se os resultados da acidez titulável e do pH dos queijos. Verifica-se que os queijos com extrato aquoso apresentam uma acidez titulável intermédia comparativamente aos queijos produzidos de forma tradicional. Isto demonstra que a incorporação direta do extrato aquoso na coalhada não penaliza a atividade das culturas bacterianas utilizadas no fabrico do queijo. Tendo em conta que estas culturas são responsáveis pelo metabolismo da lactose em ácido láctico, explica-se o aumento da acidez e consequentemente redução do pH ao longo do tempo de cura. Outro aspeto interessante, reside no facto da presença de EA aparentar regular a acidez dos queijos, podendo de alguma forma condicionar o metabolismo celular na produção de ácido.

Tabela 2. *Acidez titulável (% ácido láctico), pH e cor ($L^*a^*b^*$ e ΔE^*) dos queijos após 45 dias de cura ($9,2\pm0,58\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $92,4\pm3,1\%$ HR)*

Queijo	Acidez Titulável	pH	Cor			
			L^*	a^*	b^*	ΔE^*
EA.S	$0,46\pm0,01$	$5,40\pm0,24$	$70,3\pm10,98$	$6,57\pm6,29$	$14,54\pm1,85$	$28,47\pm10,56$
EA.SM	$0,48\pm0,14$	$5,52\pm0,20$	$75,58\pm10,21$	$3,19\pm4,79$	$15,32\pm3,89$	$23,49\pm10,18$
T.S	$0,30\pm0,02$	$5,68\pm0,33$	$76,54\pm10,15$	$-0,10\pm3,58$	$2,14\pm2,43$	$23,54\pm10,63$
T.SM	$0,64\pm0,14$	$5,46\pm0,22$	$81,51\pm9,95$	$-10,55\pm5,03$	$9,112\pm1,50$	$23,15\pm9,97$

A cor dos queijos (Tabela 2) foi avaliada pelo sistema Hunter CIEL^{*}a^{*}b^{*}, em termos de coordenadas individuais e pelo diferencial de cor (ΔE^*) com o colorímetro HP-2132, *Zhejiang Top Instruments Co*, previamente calibrado com uma placa padrão amarela ($L_p^* = 98,9$; $a_p^* = -2,5$ e $b_p^* = 5,6$). Foi possível observar que a cor dos queijos produzidos não é homogênea, o que é demonstrado pela grande dispersão nos resultados obtidos para cada coordenada.

Passados 45 dias de cura, a luminosidade média (L^*) dos queijos com EA de Tomilho é ligeiramente inferior. Contudo, a influência da utilização do extrato na cor do produto final é mais evidente analisando as coordenadas a^* e b^* .

As amostras EA.S e EA.SM apresentaram valores de a^* positivos (direção do vermelho) e mais afastados do valor a^* do padrão. Em relação à coordenada b^* , os valores positivos mais elevados confirmam que o extrato aquoso confere ao queijo uma cor amarela mais intensa. Em termos de variação global da cor (ΔE^*) o queijo com aplicação do extrato aquoso e sujeito ao processo de salga à superfície (EA.S) é o que se afasta mais do padrão amarelo.

A atividade da água (a_w) foi determinada para a pasta e casca dos queijos sujeitos à salga por salmoura, com e sem extrato aquoso (EA.SM e T.SM). Este parâmetro está intimamente relacionado com a humidade do alimento, permitindo determinar a sua capacidade de conservação e de propagação microbiana. Com base nos resultados obtidos depreende-se que a adição do redutor de sal na coalhada e consecutiva redução do período de salmoura, não origina qualquer alteração na a_w do produto final (casca e pasta) dadas as semelhanças com o queijo tradicional. Para ambos os casos, os valores da a_w obtidos são típicos destes produtos, variando entre 0,85 e 0,9.

Análise sensorial aos queijos

As provas sensoriais dos queijos foram realizadas com um painel de provadores não treinado, com o intuito de avaliar a perceção do consumidor em geral. Ou seja, avaliou-se a capacidade de diferenciação dos produtos com extrato aquoso de Tomilho bela-luz, face aos queijos com formulação tradicional. Para tal, os provadores efetuaram provas triangulares, nas quais lhes foi solicitada a identificação da amostra diferente de entre as três apresentadas (2 iguais e uma diferente), e ainda a identificação da amostra da sua preferência. Dos 21 provadores, apenas 47,6% conseguiu identificar corretamente a amostra diferente, bem como, 57,1% deu preferência à formulação com extrato aquoso de Tomilho relativamente à do queijo tradicional. Face a estes resultados, é possível concluir que não existiu uma diferenciação estatisticamente significativa entre os dois tipos de queijo, e que a apreciação positiva dos queijos com o novo produto valida a sua aplicação e possível utilização durante o fabrico.

O extrato aquoso de Tomilho bela-luz aplicado na confeção de alimentos atua como um intensificador de sabor, enaltecendo o sabor dos alimentos e assim potenciando a redução da quantidade de sódio adicionada. Esta propriedade permitirá que os produtos apresentem um valor nutricional acrescentado devido às propriedades antioxidantes do extrato em questão, além de apresentarem benefícios para a população que sofre de problemas de hipertensão e que se vê sujeita às limitações de consumo de um alargado leque de produtos.

Potencialidades e limitações do redutor de sal

São inúmeros os benefícios da utilização do extrato aquoso liofilizado de Tomilho bela-luz na confeção de queijo curado. Vão desde a valorização de uma planta aromática autóctone, à possibilidade da produção de queijos com menor teor de sal, maior valor nutricional, e com características físico-químicas semelhantes ou melhoradas comparativamente aos queijos de confeção tradicional. No presente estudo o queijo curado foi utilizado como veículo experimental. No entanto, existem inúmeras áreas alimentares que poderão usufruir das propriedades do EA, por exemplo os preparados cárneos e a confeção de pratos, são alguns exemplos da versatilidade e potencial deste produto.

No entanto, no decorrer deste estudo foram identificadas algumas potenciais dificuldades relativamente ao *scale-up* do processo para a indústria. Um dos problemas encontrados foi a necessidade de evitar perdas do produto durante o processo produtivo dos queijos e, por isso este ter de ser aplicado manualmente à coalhada após separação do soro. Isto porque, como o EA é solúvel em água, e por isso no soro, a sua adição antes do dessoramento proporcionaria a sua perda durante esta operação. A nível industrial esta alteração teria que ser equacionada com a possibilidade de alterações no próprio processo/equipamento. Outra questão está relacionada com o preço final do produto, uma vez que o processo de liofilização é relativamente dispendioso e o rendimento de extração dos compostos ativos é reduzido (19,97%). Neste sentido uma análise económica



aos custos de produção será fundamental.

Extrato etanólico como antimicrobiano natural na substituição de fármacos no controlo microbiano do queijo curado

Na produção industrial de queijo é comum o uso da natamicina durante o processo de cura, para limitar o desenvolvimento microbiano e consequentes perdas na produção. Embora seja considerado um composto GRAS (*Generally Recognized As Safe*), quando aplicado em quantidades excessivas pode conduzir a problemas de segurança alimentar (Rencüzoğullari *et al.*, 2009). Devido a este facto é comum uma maior exigência quanto ao uso deste antimicótico, que se reflete em limitações na exportação de queijo curado que não respeitem limites exigidos pelos países que os importam. Por outro lado, na produção de queijos curados com denominação de origem protegida (DOP), o impedimento legal do uso de produtos sintéticos e consequente desenvolvimento microbiano conduz a perdas de produção avultadas.

Com o intuito de vir a substituir a aplicação de fármacos durante o período de maturação do queijo e de encontrar uma alternativa natural para utilização nos produtos DOP avaliou-se o poder antimicrobiano do extrato etanólico.

Eficiência antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*

Após recolha e isolamento dos fungos mais comuns nas câmaras de cura e, que proliferam à superfície do queijo curado de origem bovina, realizaram-se testes *in vitro* e *in vivo* onde o crescimento microbiano foi monitorizado ao longo do tempo, de forma a analisar a eficiência do extrato etanólico (EE) de Tomilho bela-luz.

Os fungos isolados para os testes *in vitro* foram o *Mucor* s.p. e o *Penicillium* s.p. Estes testes consistiram na avaliação da performance de inibição do extrato etanólico (EE), da natamicina (CP - controlo positivo) e a sua comparação com o controlo negativo (CN), isto é, sem qualquer inibidor.

Analisando o desenvolvimento microbiano em termos do diâmetro do halo para cada estirpe, quer graficamente (Figura 2) quer em placa de Petri (Figura 3) os resultados obtidos demonstraram uma óbvia diminuição no halo de crescimento dos fungos testados quando expostos ao extrato etanólico de Tomilho, comparativamente ao controlo negativo e à natamicina (antibiótico comercial).

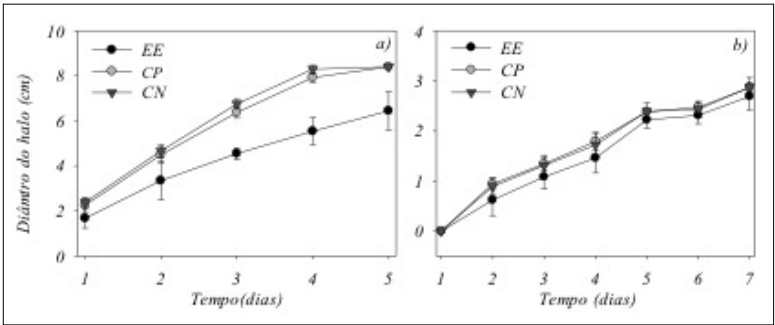


Figura 2. Evolução do diâmetro do halo de crescimento de colónias de: a) *Mucor* sp. e b) *Penicillium* sp., na presença de extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).

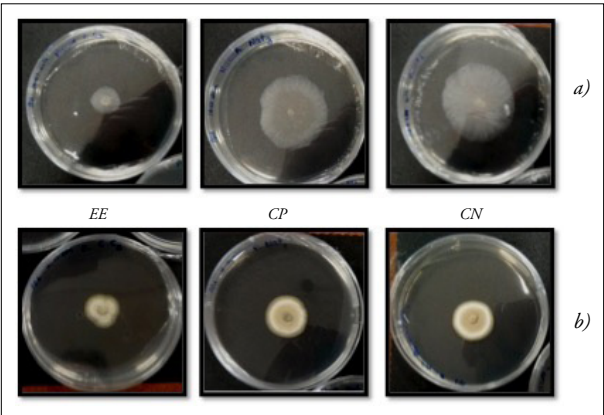


Figura 3. Diâmetro do halo de crescimento de colónias de: a) *Mucor* sp. ao fim de 2 dias e b) *Penicillium* sp. ao fim de 4 dias, na presença de extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).

Pode-se também observar a diminuição da eficiência da natamicina ao longo do tempo e, os resultados obtidos para este caso aproximam-se dos do controlo negativo. Estas observações permitem equacionar que o extrato etanólico de *T. mastichina* L. é um potencial substituto para os antibióticos tipicamente utilizados no fabrico industrial de queijo curado, podendo também ser usado durante a produção dos queijos de denominação de origem protegida.

De forma a comprovar os resultados obtidos em ambiente controlado de laboratório, procedeu-se à realização de testes *in vivo* (Figura 4) usando queijos curados de origem bovina. Neste caso procedeu-se à aplicação direta dos produtos sobre os queijos produzidos com leite cru, os quais foram submetidos às condições normais de maturação na câmara de cura (aproximadamente 11 °C e humidade relativa de 85%). Nestas condições, foi possível demonstrar e confirmar que, numa situação real de produção, o EE apresenta uma eficiência semelhante ou superior à natamicina, diminuindo efetivamente o desenvolvimento de fungos no queijo curado.

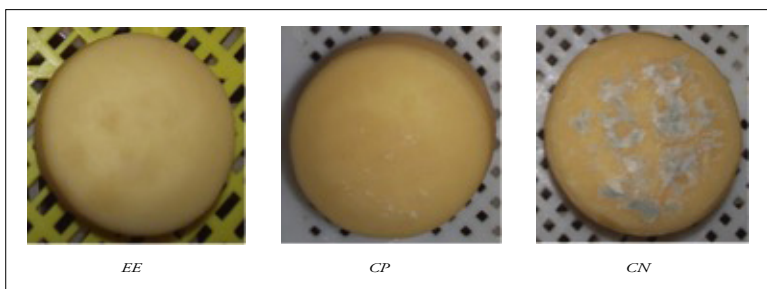


Figura 4. Desenvolvimento de bolores e leveduras à superfície do queijo de origem bovina durante o processo de cura, 8 dias após aplicação do extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).

Performance sobre a microbiota dos queijos

A análise do desenvolvimento da flora microbiana foi efetuada para avaliar se os efeitos do EE podem garantir os parâmetros de qualidade dos queijos curados e, comprovar os resultados dos estudos anteriores. Esta análise foi feita

comparando a evolução dos principais grupos de microrganismos patogênicos ou contaminantes em queijos tratados com EE e com natamicina.

Os ensaios aos queijos realizaram-se aos dias 1, 8, 16, 24 e 40 após tratamento com cada um dos produtos, e consistiram na recolha de amostras da superfície do queijo (10 g), em triplicado, para quantificação de *Staphylococcus* spp. (em meio *Baird-Parker Agar Base*), *Pseudomonas* spp. (em meio *Pseudomonas Agar F*, PAF), *Enterobacteriaceae* (em meio *Violet Red Bile Glucose Agar*, VRBGA) e determinação de bolores e leveduras (em meio *Potato Dextrose Agar*, PDA). O procedimento utilizado baseou-se no efetuado por Ramos *et al.*, (2012).

A Figura 5 permite concluir que de um modo geral, o extrato etanólico apresenta resultados semelhantes ou melhores do que a natamicina. Para o caso dos *Staphylococcus* spp. os resultados obtidos, quer para o EE quer para a natamicina, apresentaram uma evolução semelhante durante o período de maturação, atingindo valores praticamente nulos no final desse período. Quanto às *Enterobacteriaceae*, verificou-se um crescimento exponencial nos primeiros 16 dias, contudo, após este período o $\text{Log}_{10} \text{UFC/g}$ diminui 3 ordens de magnitude para os queijos tratados com natamicina e tende para zero na presença de extrato etanólico. Este facto poderá ser explicado pelo aumento da competição microbiana das espécies que apresentam maior aptidão replicativa face às condições a que estão sujeitas. Relativamente às *Pseudomonas* spp., fungos e leveduras, todos apresentam um padrão de crescimento semelhante. Nos primeiros 16 dias de maturação observaram-se contagens superiores para o caso do tratamento com EE, no entanto, verifica-se uma inversão desta tendência até ao final do período de maturação. Esta diminuição varia entre uma a duas ordens de magnitude.

Nas amostras de queijo curado sem tratamento (dados não apresentados), tal como esperado, verificou-se um desenvolvimento microbiano mais acentuado praticamente para todos os substratos estudados. Apesar de todos os queijos apresentarem contagens semelhantes no início da maturação, no caso dos queijos sem tratamento há um aumento significativo de microrganismos nos



últimos dias de cura. Por sua vez os queijos que receberam o tratamento com extrato etanólico mostraram as menores contagens no final do período de maturação.

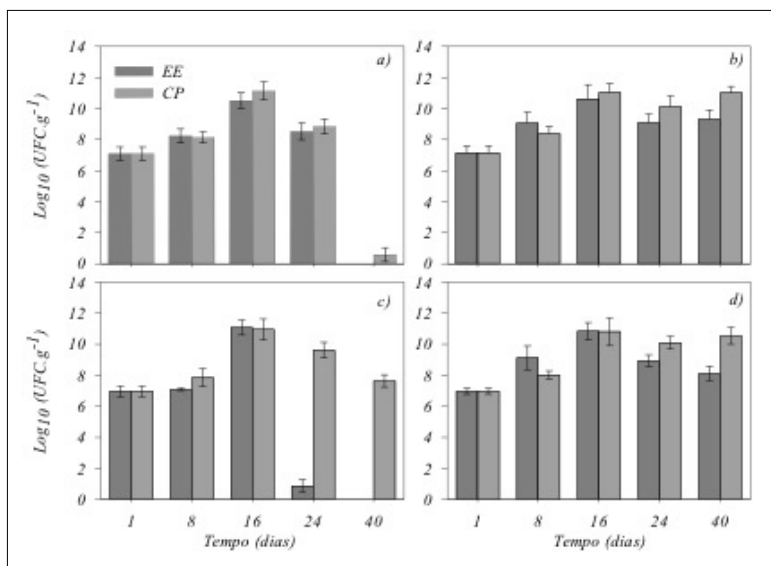


Figura 5. Contagens de: a) *Staphylococcus* spp., b) *Pseudomonas* spp., c) *Enterobacteriaceae* e d) bolores e leveduras (Log₁₀ UFC.g⁻¹) em queijos tratados com extrato etanólico (EE) e natamicina (CP) durante a maturação.

A aplicação do extrato etanólico na produção de queijo curado, tanto em modo tradicional como em modo de produção biológica, permite obter um produto final isento de fármacos, facto que para o consumidor representa uma maior segurança alimentar e ainda a redução da probabilidade de desenvolvimento de resistência a antibióticos e, paralelamente garante ao produtor um produto com maior valor acrescentado, tornando-o competitivo face à concorrência.

Eficiência como agente fumigador em câmaras de cura

Com o intuito de conferir ao produto um leque de aplicações mais vasto, testou-se a sua eficácia como agente fumigador/nebulizador das câmaras de cura e

analisou-se a carga microbiana presente nesta atmosfera antes e após aplicação do extrato etanólico (1 h, 2 e 4 dias) (Abelho, 2012). Os resultados obtidos, apresentados na Figura 6, dizem respeito à contagem de microrganismos totais em meio PCA (*Plate Count Agar*) e contagem de bolores e leveduras em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*).

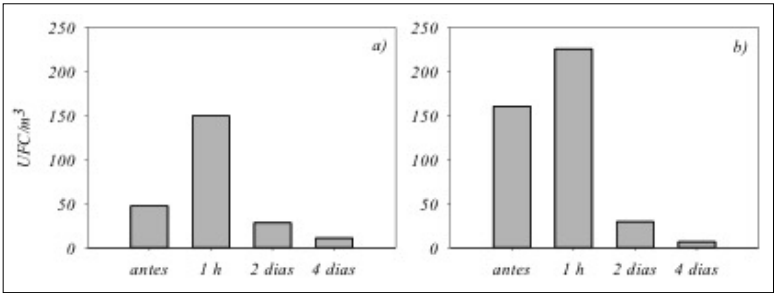


Figura 6. Contagens de: a) microrganismos totais, b) bolores e leveduras (UFC/m³) do ar da câmara de maturação antes e depois da fumigação: 1 h, 2 dias e 4 dias.

A evolução da contaminação microbiana no ar da câmara de cura (Figura 6) é semelhante para as contagens de microrganismos totais e bolores e leveduras. Antes do processo de fumigação verificaram-se contagens de 47 e 160 UFC/m³ para o primeiro e segundo caso, respetivamente. Ao fim de 1 hora, a contagem de ambas as categorias de microrganismos atinge um valor máximo, mas decai exponencialmente ao fim de 2 e 4 dias, registando valores inferiores às contagens antes da pulverização com o extrato etanólico. A tendência geral após a fumigação, foi a redução significativa do desenvolvimento microbiano até ao quarto dia da experiência. O facto de ao fim de 1 h se terem registado valores superiores aos observados antes da aplicação do EE, poderá ser explicado pelo método de amostragem, uma vez que esta foi feita por sedimentação dos microrganismos presentes no ar interior da câmara. Assim, nas horas subsequentes à nebulização ocorreu um aumento da sedimentação dos microrganismos presentes no ar e, consequentemente o aumento das contagens microbianas. Estas observações permitem também inferir que não é aconselhável a colocação dos queijos na câmara de cura pouco tempo após a realização da fumigação (1-2 h), sob pena



da carga microbiana depositada nos queijos ser ainda maior, apesar do efeito antimicrobiano do extrato. Verificou-se ainda uma atuação mais vincada do extrato na redução dos bolores e leveduras presentes no ar da câmara de maturação, indicando uma maior especificidade para este grupo.

O extrato etanólico de Tomilho bela-luz, caracterizado pelas suas propriedades antimicrobianas, apresenta ainda capacidade de desinfecção de diversas superfícies que estejam em contacto com alimentos, por exemplo bancadas de manipulação, utensílios de preparação de alimentos ou até mesmo os próprios produtos alimentares e/ou as suas embalagens.

Potencialidades e limitações do extrato etanólico

Durante os estudos realizados, pode concluir-se que o extrato etanólico de Tomilho bela-luz poderá ser uma mais-valia para a indústria queijeira, pois apresenta resultados bastante promissores. A sua performance como agente microbiológico aproxima-se, e por vezes supera, o poder antimicrobiano da natamicina contra algumas estirpes específicas de microrganismos. Desta forma, os produtores em geral poderão usufruir dos benefícios de um produto natural e biológico, que pode ser utilizado diretamente no queijo ou como agente de fumigação em câmaras de cura. Contudo, uma das principais dificuldades está associada à sua aprovação como novo aditivo alimentar, nomeadamente, no que concerne à determinação das concentrações máximas permitidas. Estes processos são normalmente morosos e dispendiosos, implicando a realização de testes de toxicidade *in vivo*, o que se poderá traduzir num longo período até que o produto tenha a validação dos requisitos legais indispensáveis para comercialização.

Reconhecimento do interesse científico e tecnológico da investigação

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado anteriormente foi submetido a vários concursos dedicados à inovação tecnológica, ideias de



negócio, empreendedorismo e de produtos inovadores relacionados com a alimentação ou alimentos. Da participação nestes concursos (Tabela 3) tem resultado o reconhecimento do interesse tecnológico deste tema, uma vez que os trabalhos propostos chegaram à fase final arrecadando vários prémios e menções honrosas.

Tabela 3. *Prémios e distinções obtidos pela equipa e comunicações científicas realizadas no âmbito da investigação*

Data	Evento	Comunicação/ Prémio/ Distinção	Tema / Projeto
1 Nov 2013	Concurso: Passaporte para o Empreendedorismo Programa estratégico para o Empreendedorismo e Inovação	Duas bolsas de investigação de 12 meses	Projeto nº 1007 - Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo: os benefícios da redução do teor de sal e eliminação de produtos químicos durante o processo de cura.
27 Nov 2013	IV Conferência CEF 2013, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra	Comunicação em formato de poster	<i>Thymus mastichina</i> L. profits to dairy industry: potential antimicrobial and antioxidant activity.
23 Dez 2013	Concurso: Smart Rural Ideia Challenge 2013 Empreendedorismo de Base Rural	2º Prémio. Categoria: inovação tecnológica	<i>MAP 4 Cheese</i> - Produção de coadjuvantes/ingredientes naturais para aplicação na indústria alimentar (ou em queijarias).
10 Fev 2014	Concurso: Ideias de Negócio ARRISCA-C 2013	Prémios MoviPoc e IDDNET-Technology Network. Categoria: ideias de negócio	Produção de coadjuvantes/ ingredientes naturais para aplicação na produção de queijos
19 Fev 2014	Workshop Produtos Naturais: aplicações (bio)tecnológicas, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária (ESAC)	Comunicação oral	Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo.
27 Set 2014	Concurso: 11ª Edição do Concurso Regional de Empreendedorismo - Construir Futuros na região de Coimbra, Poliemprende 2014	Um dos cinco finalistas do concurso	Produção de revestimentos de origem natural para aplicação em queijos curados
16 Out 2014	Concurso: Food & Nutrition Awards	3ª Menção Honrosa. Categoria: investigação & desenvolvimento	ReduzSal - Substituto à base de tomilho bela-luz que permite reduzir o sal usado no queijo curado
17-20 Dez 2014	XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society (SPB), Coimbra	Comunicação em formato de poster	<i>Thymus mastichina</i> L. as substitute of synthetic antibiotics in dairy industry.
27 Mar 2015	I Concurso InovCluster de produtos alimentares inovadores	2º Prémio	Queijo de ovelha curado com incorporação de Tomilho bela-luz
23 Mai 2015	Concurso DISRU.PT Summit	Vencedor do concurso DISRU.PT Startup Pitch	<i>MAP4Cheese</i> - Antimicrobianos de origem natural para queijo curado



Já entre a comunidade científica, a seleção do trabalho desenvolvido para apresentações orais (Carvalho *et al.*, 2014) ou em formato de poster em congressos nacionais (Carvalho *et al.*, 2013), internacionais (Ferreira *et al.*, 2014) e *workshops* (Tabela 3) evidencia a inovação deste tema e o seu interesse científico.

Não menos importante será salientar que o financiamento para a investigação é fundamental, quer em termos de recursos humanos quer em recursos materiais. Este trabalho teve como grande impulsionador, duas bolsas de 12 meses recebidas no âmbito do Concurso Passaporte para o Empreendedorismo inserido no Programa Estratégico para o Empreendedorismo e a Inovação (+e+i) aberto à sociedade civil. Este programa, de acordo com o Impulso Jovem, pretende estimular jovens empreendedores qualificados a desenvolverem o seu projeto de empreendedorismo inovador, que se encontre em fase de ideia, facultando um conjunto de ferramentas técnicas e financeiras.

Conclusão

A investigação aqui apresentada e os resultados obtidos são extremamente promissores e demonstram grande potencialidade na utilização de dois produtos à base do Tomilho bela-luz para aplicação na indústria alimentar: o extrato aquoso, como substituto do sal nos alimentos e o extrato etanólico como substituto dos fármacos usados no controlo microbiano.

A utilização do extrato aquoso na confeção de queijo curado permitiu a redução de 12,5% de sal no produto final, sem afetar os parâmetros físico-químicos e nutricionais das amostras produzidas face às de confeção convencional. A análise sensorial demonstrou que os provadores não conseguem identificar os queijos com aplicação de EA, dando preferência a este produto, usando a justificação de se tratar de um queijo com um sabor mais intenso.

O comportamento antimicrobiano do extrato etanólico de Tomilho bela-luz comprova a sua utilidade no controlo do crescimento de fungos e leveduras

durante o processo de maturação de queijo curado, tomando uma posição competitiva face ao antibiótico convencional.

Para além das vantagens inúmeradas anteriormente, podemos destacar ainda que a utilização destes produtos contribui para o enriquecimento nutricional, em antioxidantes e óleos essenciais, dos alimentos onde podem ser aplicados. Contudo, estudos posteriores de caracterização química e toxicológica serão necessários de forma a validar a eficiência destes produtos à escala industrial, otimização e aperfeiçoamento da tecnologia para o seu *scale-up* e ainda o estudo de viabilidade económica do processo.

Devido à sua origem natural, e às suas propriedades específicas, os extratos de Tomilho bela-luz constituem uma importante alternativa para o futuro da indústria de lacticínios, bem como da indústria alimentar, em geral. No entanto, não é expectável que se verifique uma completa substituição dos produtos tradicionalmente utilizados, uma vez que existirão diferenças de custo, aplicabilidade e também devido à comodidade que existe, para já, na utilização dos produtos mais habituais.



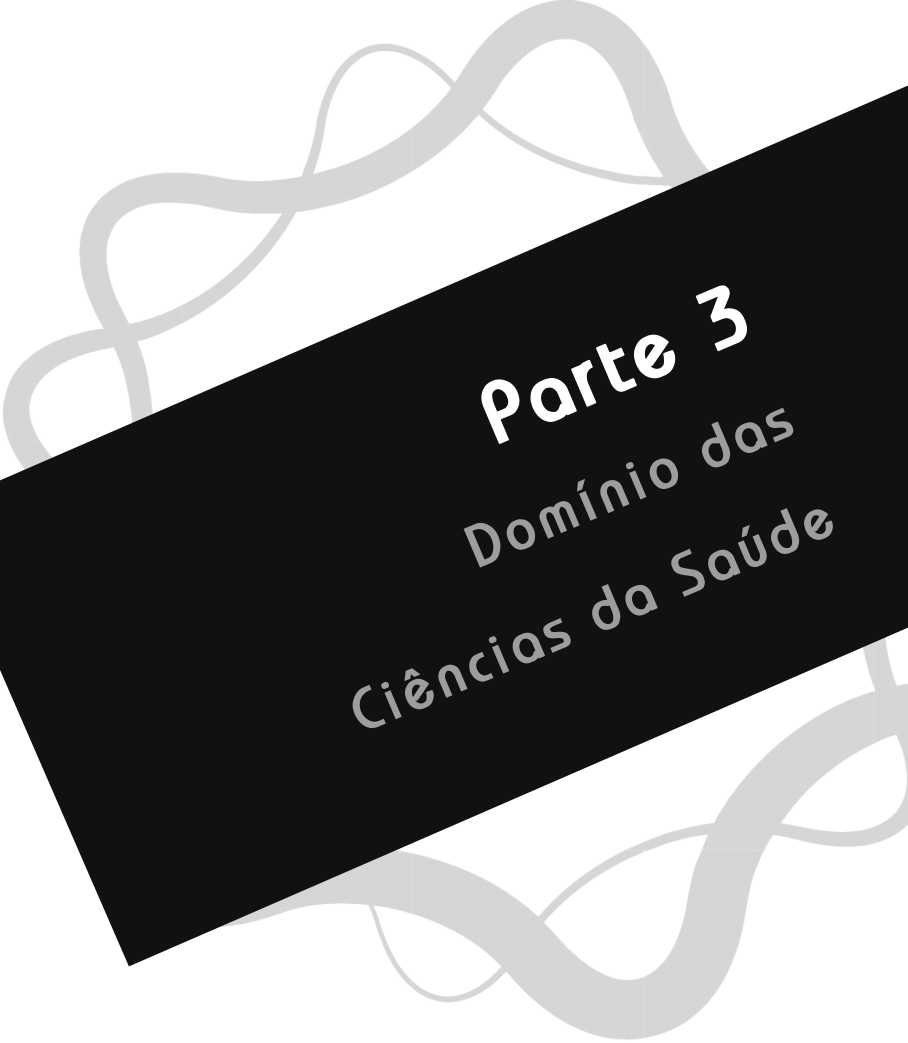
Referências

- Abelho, M. (2012). Parte 2. Qualidade microbiológica do ar e de superfícies. In Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental. Escola Superior Agrária Coimbra, Instituto Politécnico Coimbra, Portugal. pp 25. Retrieved from http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf
- Carvalho, FC., Gomes, D., Abreu, H., Oliveira, MM. & Ferreira, FML. (2013). *Thymus mastichina* L. profits to dairy industry: potential antimicrobial and antioxidant activity. IV Conferência CEF 2013, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 27 Novembro.
- Carvalho, FC., Rodrigues A, Oliveira A, Abreu H, Oliveira MM, Pereira CD, Gomes D, Henriques MHE & Fernanda F. (2014). Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo. Workshop Produtos Naturais: aplicações (bio)tecnológicas, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária (ESAC). Coimbra, 19 Fevereiro.
- Delgado, T., Marinero, P., Manzanera, MC., Asensio, C., Herrero, B., Pereira JA. & Ramalhosa, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (1), 412-418. doi:10.1016/j.lwt.2013.12.041
- Evans, WC. & Edward, TG. (1989). *Trease and Evans Pharmacognosy*. London: Baillière Tindall.
- Fernandes, A. (2010). Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. Retrieved from <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/2593>
- Ferreira, FM., Rodrigues, AS., Carvalho, F., Oliveira, MM., Pereira, CD., Dias, SP, Gomes, D. & Henriques, MHE. (2014). *Thymus mastichina* L. as substitute of synthetic antibiotics in dairy industry. XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society (SPB), Coimbra – Portugal, 17-20 December.



- Franco, JA. (1983). Botânica das labiadas Portuguesas e suas potencialidades. In Primeiras Jornadas Nacionais de Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais. Coimbra: LNETI.
- Fraternal, LD., Giamperi, L. & Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina*. *Journal of Essential Oil Research*, 15 (4), 278-281. doi:10.1080/10412905.2003.9712142
- Gordo, J., Máximo, P., Cabrita, E., Lourenço, A., Oliva, A., Almeida, J., Filipe, M., Cruz, P., Barcia, R., Santos, M. & Cruz, H. (2012), *Thymus mastichina*: chemical constituents and their anti-cancer activity. *Natural Product Communications*, 7 (11), 1491-1494.
- Miller, NJ. & Rice-Evans, CA. (2012). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*, 26 (3), 195-199. doi:10.3109/10715769709097799
- NP 1598 (1983). Queijo. Definição, classificação, acondicionamento e marcação. 2ª Ed., Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- Ramos, O., Fernandes, JF., Silva, SI., Pintado, ME. & Malcata, FX. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (6), 533-552. doi: 10.1080/10408398.2010.500528
- Rencüzoğullari, E., Azirak, S., Canimoglu, S., Parlak S., & Buyukleyla, M. (2009). Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 32 (1), 47-52. doi:10.1080/01480540802431371
- Singleton, V.L, Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sharma, OP., & Bhat, TK. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113 (4), 1202-1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008





Parte 3

Domínio das
Ciências da Saúde



Disruptores endócrinos: um problema de Saúde Pública e Animal

Ana Paula Gomes Fonseca

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
113 a 145

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Ana Paula Gomes **Fonseca**

Ana Paula Fonseca é doutorada em Ciências da Saúde|Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo obtido o grau de mestre em Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo de Qualidade Analítica pela Faculdade de Química da Universidade de Aveiro, licenciada em Farmácia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, licenciada em Geologia pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e detentora do Título de Especialista em Farmácia. Atualmente é professora Adjunta no Departamento de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, coordenadora do Grupo de Investigação Aplicada em Farmácia, coordenadora do Mestrado em Farmácia|Especialização em Farmacoterapia Aplicada da ESTESC, investigadora na Unidade de I&D Química-Física Molecular | Universidade de Coimbra e Presidente do Conselho Pedagógico. Depois de adquirir competências na área da Farmácia e nos Métodos Instrumentais de Análise decorrente de toda a formação académica, os seus interesses atuais de investigação estão focados na área da Farmácia, nomeadamente na monitorização de fármacos, no meio ambiente, em estudos de efetividade de medicamentos e no estudo de sistemas biológicos e farmacologicamente relevantes. Autora de diversos artigos científicos em revistas internacionais indexadas, diversas participações em congressos nacionais e internacionais da área e diversas publicações em atas científicas, é também orientadora de alunos do 1º, 2º e 3º ciclo.



Disruptores endócrinos: um problema de Saúde Pública e Animal

Ana Paula Gomes Fonseca

Atualmente, um dos estudos mais relevantes e expressivos no âmbito da saúde pública, centra-se na presença de micropoluentes no meio ambiente, em concentrações bastante preocupantes. Alguns destes compostos podem produzir efeitos tóxicos na saúde humana e animal, devido à sua presença em águas superficiais e subterrâneas, mesmo que seja em concentrações muito baixas (na ordem dos ng L^{-1}).

Fármacos, disruptores endócrinos (DE) e poluentes orgânicos persistentes, têm sido dos compostos mais pesquisados devido aos seus efeitos nocivos a vários níveis. Os disruptores endócrinos, são suspeitos de causarem efeitos adversos no sistema endócrino de humanos e animais aliado à sua resistência à biodegradação e persistência no meio ambiente causando fenómenos de biomagnificação na cadeia alimentar (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

De entre estas classes de compostos, a mais preocupante tem sido ligada aos DE, já que a literatura descreve efeitos na reprodução de peixes e outros animais, indução de características femininas em peixes machos, redução da quantidade de esperma e aumento da incidência de alguns tipos de cancro no Homem.

Doenças como cancro da mama, útero e próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento da incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas (tiróide), distúrbios na função dos ovários (crescimento folicular e ovulação), fecundação e consequentemente gravidez, entre o aumento de outras doenças, que ainda não se encontram devidamente sustentadas por estudos (Coleman *et al.*, 2005).

Dentro deste conjunto de efeitos adversos, a disrupção endócrina influencia o desenvolvimento, crescimento, reprodução e mesmo o comportamento dos humanos e animais, podendo danificar e alterar diretamente um órgão endócrino, interagir com um recetor de hormonas e/ou alterar o metabolismo de hormonas no sistema endócrino (Bila *et al.*, 2007; Campani, 2010).

As substâncias que possuem capacidade de afetar o sistema endócrino nos humanos e animais, quando expostos a estas, são várias, nomeadamente compostos sintéticos como o 17 α - etinilestradiol (EE2), pesticidas, bisfenol A, entre outros, e compostos naturais como a estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e fitoestrogénios.

Os estrogénios, principalmente o E2 e EE2, têm sido classificados como sendo os maiores responsáveis pela disrupção endócrina, possuindo um alto potencial estrogénico, sendo excretados diariamente por humanos e animais.

As hormonas esteróides são um grupo de compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol e que apresentam em comum um anel ciclopentano-o-perhidrofenantereno. Os esteróides naturais são excretados pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta nos humanos e nos animais e inclui progestogénios, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios.

Os estrogénios naturais são, predominantemente, hormonas femininas e vitais para a manutenção da homeostase dos tecidos reprodutivos, seios, pele e cérebro. Os estrogénios sintéticos, como o EE2, são utilizados como contraceptivos, aplicados em terapia de reposição hormonal, bem como em doenças hormonais (Ying *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2011).

Nos humanos e nos mamíferos, os estrogénios sofrem várias transformações, principalmente, a nível hepático. São, frequentemente, oxidados, hidrolisados e metilados antes da conjugação final com ácido glucorónico ou sulfato. Por exemplo, o E2 é rapidamente oxidado em E1 que pode ser convertida em E3, o principal produto de excreção. Muitos outros metabolitos polares, como o



16-hidroxi-estrona, 16-cetoestrona ou 16-epiestriol, são formados a partir do E2 e podem estar presentes na urina e nas fezes.

Os estrogénios são excretados maioritariamente na forma de conjugados polares inativos. O EE2 é eliminado principalmente na forma conjugada, no entanto, outras transformações metabólicas de menor relevância poderão ocorrer. A questão que se levanta é se estes conjugados dos estrogénios naturais e sintéticos, endocrinamente inativos, podem ser convertidos nas formas ativas no meio ambiente ou nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), aumentando a sua concentração ambiental. Esta hipótese é suportada pela deteção de vários estrogénios na forma não conjugada, como o E2, a E1, o 16 α -hidroxiestrona e o EE2, em efluentes de ETARs em concentrações superiores às que seria de esperar com base nas concentrações das formas excretadas (Ternes *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2002; Bila *et al.*, 2007).

Johnson et al em 2000 procederam ao levantamento e cálculo da excreção de compostos estrogénicos pelos humanos, estimando a excreção diária de estrogénios para homens e mulheres. A excreção através da urina para os homens foi estimada em cerca de 1.6 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 3.9 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 1.5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3. Para as mulheres menarca foi calculada uma excreção de 3.5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 8 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 4.8 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de estriol (E3). Para mulheres na menopausa foi calculada uma excreção de 2.3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 4 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3; na gravidez foram estimadas excreções de 259 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E2, 600 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E1 e 6000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de E3.

A quantidade excretada de EE2, quando usado como contraceptivo oral pelas mulheres, foi estimada em 35 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Baseado nesta excreção diária de estrogénios pelos humanos e no fator de diluição, é esperado existirem no ambiente aquático níveis de estrogénios na ordem dos $\mu\text{g-ng L}^{-1}$ (Ying *et al.*, 2002).

As hormonas esteróides têm sido detetadas em águas residuais, superficiais, subterrâneas, bem como em solos, sedimentos e alimentos, etc. O comportamento e o destino destas hormonas esteróides no ambiente

dependem das suas propriedades físico-químicas, bem como das características do meio ambiente.

Os estrogénios naturais têm maior solubilidade que os esteróides sintéticos. Estudos indicam que todos eles têm uma adsorção moderada aos sedimentos e baixo tempo de semi-vida nos solos e nas águas, sofrendo ambos uma rápida transformação nas ETARs. A taxa de remoção nas ETARs está dependente da conceção da própria ETAR e da quantidade de dejetos (Ying *et al.*, 2002).

Uma característica importante, entre outras, para o estudo destes compostos é a sua hidrofiliidade e hidrofobicidade, já que estas regulam os processos de absorção e distribuição de DE, sendo necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas até alcançarem os respetivos locais de ação (Fatta *et al.*, 2007).

Os efluentes das ETARs são uma complexa mistura de poluentes que poderão apresentar propriedades ou capacidade de provocar disrupção endócrina. A exposição dos seres vivos a estes efluentes, poderá traduzir-se em efeitos negativos a nível individual e, possivelmente, ao nível das populações (Solé *et al.*, 2002).

Assim, a monitorização de estrogénios sintéticos (EE2) e naturais (E1, E2, E3) no meio ambiente tem vindo a ganhar grande interesse, especialmente pelo facto de, frequentemente serem detetados nas ETARs, águas para consumo humano, rios, lagos, solos, alimentos, etc., (Desbrow *et al.*, 1998; Ternes *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002; Park, *et al.*, 2004).

De entre as hormonas estrogénicas, os estrogénios com maior interesse e habitualmente pesquisados no ambiente aquático são o E1, o E2, o E3 e o EE2, devido ao seu potencial como disruptores endócrinos (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003).

A crescente necessidade em conhecer os potenciais impactos da ação de compostos disruptores endócrinos em seres aquáticos, nomeadamente em peixes, conduziu a uma busca urgente de ensaios fiáveis, para a avaliação do



efeito de um determinado composto isoladamente, bem como de misturas complexas, como é o caso dos efluentes domésticos e industriais (Larsson *et al.*, 1999; Örn *et al.*, 2003, Versonnen *et al.*, 2004).

Apesar de ser conhecido o efeito estrogénico de muitos compostos químicos, residem dúvidas sobre se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos ou populações expostas vs tempo de exposição. Com o intuito de avaliar o risco da exposição, são inúmeros os estudos desenvolvidos nesta área, sendo evidente que a existência de substâncias estrogénicas no meio ambiente é um problema de saúde pública, animal e ambiental global em efluentes de ETARs municipais e hospitalares (Kolpin *et al.*, 2002).

No desenvolvimento deste trabalho de investigação pretendeu-se utilizar metodologias, normalmente utilizadas na análise qualitativa e quantitativa (Skoog, Nieman, & Holler, 5ª edição, 2002), nomeadamente cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) com deteção UV, na identificação e quantificação de estrogénios em efluentes com potencial atividade estrogénica, e ainda a quantificação em afluentes de nove ETARS da região central de Portugal, por forma a averiguar a eficiência dos tratamentos de águas residuais. Para tal as amostras recolhidas necessitaram de uma pré-concentração, antes da sua análise, recorrendo-se à técnica de extração em fase sólida (EFS).

Pretendeu-se igualmente fazer estudos de termoestabilidade e fotodegradação dos estrogénios alvos, sob condições de controlo de diversos fatores, tais como: temperatura e radiação solar, utilizando também a espectroscopia UV-visível (UV-Vis), como forma de comparar e reforçar os resultados obtidos por Eletroforese Capilar (EC).

Segundo a bibliografia consultada, a maior parte dos estudos existentes têm sido realizados principalmente em diversas espécies de peixes, pelo que também faz parte integrante deste trabalho de investigação, a quantificação de estrogénios em anfíbios macho (*Rana/Pelophylax perezi*). Estes animais têm pele permeável, vivem na água e no solo, e devido à sua fisiologia e seu ciclo de

vida são expostos a determinadas variações ambientais, sendo particularmente sensíveis à poluição química dos sistemas aquáticos, considerada hoje em dia, uma das possíveis causas para a crescente extinção destes animais.

Determinação dos estrogénios alvo nas ETARS estudadas.

Material e métodos

Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Dionex, equipado com quatro bombas P680, injetor automático ASI-100 e detetor de ultravioleta PDA-100. Na separação dos compostos foi usada uma coluna analítica de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, Restek Pinnacle, DB), com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ em condições isocráticas. A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrilo/água (45:55, v/v), e a quantidade de amostra injetada de 20 μ L, sendo o comprimento de onda de deteção escolhido de 200 nm.

A solução-padrão mãe (0,2500 g L⁻¹) composta por estrona (Sigma, 99%), 17 β -estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17 α -etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em acetonitrilo (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 0,05-10,00 mg L⁻¹ em água ultra-pura e efetuadas as respetivas retas de calibração.

Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultrassons, durante 15 minutos. Posteriormente todas as soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 μ m, antes da análise por CLAE.

Preparação das amostras recolhidas nas ETARs

Foram recolhidas e analisadas amostras de efluentes de várias ETARs com



tratamentos secundários, na região centro de Portugal, nomeadamente nas regiões do Baixo Vouga (Aveiro), Baixo Mondego (Coimbra) e Pinhal Litoral (Leiria). No distrito de Aveiro procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Cacia (Aveiro), ETAR de Aguada de Cima (Águeda) e ETAR da Mealhada. No Concelho de Coimbra procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR do Choupal (Coimbra), ETAR de Taveiro (Coimbra), ETAR de Ceira (Coimbra) e ETAR de Alagoa (Arganil). No Concelho de Leiria procedeu-se à recolha e análise de amostras da ETAR de Pombal e ETAR da Marinha Grande. Todas as amostras de água foram recolhidas três vezes, por períodos temporais diferentes (uma recolha por mês), à entrada e saída de nove ETARs principais localizadas na Região Centro de Portugal, recebendo apenas águas domésticas.

Após a recolha das águas, todas as amostras foram filtradas através de um filtro de microfibras de vidro GF/F 55 MM da Whatman com a ajuda de uma bomba de vácuo, para eliminação dos sólidos em suspensão. Foi sucessivamente filtrada através de um filtro de fibra de vidro de 0,45 µm da Millipore, antes da sua extração em fase sólida (EFS). Após este procedimento, todas as amostras foram acidificadas a pH 2 e armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz. O procedimento experimental de EFS utilizado para as amostras foi sempre realizado 24 h após a recolha, para minimizar a possível atividade microbiana. Após o procedimento de EFS, o produto de eluição foi seco, recorrendo a uma bomba de vácuo, sendo o extrato redissolvido em 1 mL de acetonitrilo. Após esta reconcentração e antes da sua análise por CLAE, as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 µm da Millipore.

Análise das amostras à entrada e saída das ETARs

De referir que os valores de LOD obtidos, na otimização deste método, foram de 0,45 mg L⁻¹ para o E3, 0,24 mg L⁻¹ para o E2, 0,11 mg L⁻¹ para o EE2 e 0,089 mg L⁻¹ para a E1 (Miiller&Miller, 2005.XVI). Os coeficientes de correlação (R^2) das retas de calibração de cada estrogénio, foram sempre

Na generalidade as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,13-0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,16-0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona (Tab 1 e 2). As concentrações dos estrogénios encontradas à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,11 a 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,15-0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona (Tabela 1 e 2). De salientar, que embora o estriol apresentasse um pico em todos os cromatogramas, a área obtida resultou sempre num valor mais baixo que o LOD calculado na respetiva curva de calibração. De sublinhar ainda que para este composto, por vezes ocorreram algumas dificuldades na utilização do processo EFS-CLAE, nomeadamente na obtenção de resultados reprodutíveis para as baixas concentrações encontradas, mesmo para um número de réplicas igual a cinco.

Concentração dos estrogénios (µg L ⁻¹)	ETAR 1 Jan-Mar		ETAR 8 Jan-Mar		ETAR 9 Jun-Ago		ETAR 3 Fev-Abr		ETAR 6 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR									
	3 000		3 000		3 145		5 000		6 000	
	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	0,16	0,16	0,15
DP	-	-	-	-	-	-	±0,02	±0,01	±0,04	±0,02
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,25	0,19
DP	-	-	-	-	-	-	-	-	±0,02	±0,03
E3	0,24	0,15	n.d.	0,15	n.d.	n.d.	0,25	n.d.	0,16	n.d.
DP	±0,01	±0,02	-	±0,02	-	-	±0,03	-	±0,04	-
EE2	0,13	0,14	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	0,16	n.d.	0,19	n.d.
DP	±0,01	±0,03	-	±0,03	-	-	±0,02	-	±0,02	-

n.d. = não detetado

Tabela 2. *Concentrações dos estrogénios alvo, expressas em µg L⁻¹ (n=3), à entrada e saída das nove ETARS estudadas (entre 20 500 e 203 202 habitantes)*

Concentração dos estrogénios (µg L ⁻¹)	ETAR Jan-Mar		ETAR 5 Jan-Mar		ETAR 2 Jun-Ago		ETAR 4 Fev-Abr	
	Número de habitantes servidos por cada ETAR							
	20 500		50 000		180 000		203 202	
	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b	Ent ^a	Sai ^b
E1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,25
DP	-	-	-	-	-	-	±0,02	±0,02
E2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14	0,10
DP	-	-	-	-	-	-	±0,03	±0,01
E3	0,15	n.d.	0,14	n.d.	0,24	0,12	n.d.	n.d.
DP	±0,02	-	±0,01	-	0,02	0,02	-	-
EE2	0,14	n.d.	0,18	n.d.	0,15	0,12	0,14	n.d.
DP	±0,03	-	±0,02	-	±0,02	±0,02	±0,06	-

^aentrada da ETAR ^bsaída da ETAR DP= desvio padrão n.d. = não detetado
Nota: as concentrações do E3 determinadas estão abaixo do valor de LOD pelo que deverão ser lidas como indicativas somente da presença desta hormona.

Resultados e discussão

Os estrogénios mais frequentemente detetados à entrada de todas as ETARs estudadas foram o E3 (abaixo do LOD) e EE2 (Graf. 1a), mas à saída a concentração mais elevada encontrada foi a de E1 (Figura 1a). Todos os estrogénios naturais e sintéticos foram detetados à entrada das ETARs que servem um número de habitantes entre 5 000 e 203 202. A sua presença à entrada destas ETARs pode ser explicada como sendo consequência natural da excreção humana.

A presença de EE2 nos efluentes é de particular interesse uma vez que há estudos que mencionam a sua toxicidade a baixas concentrações e na ordem dos nanogramas por litro (Johnson & Sumpter, 2001). O E1 e E2 (Figura. 1b e 1c) são os estrogénios mais frequentemente encontrados à saída das ETARs estudadas, particularmente nas que servem maior número de habitantes.

Assim, a ocorrência de E1, E2 e EE2 à saída das ETARs, poderá ser o resultado de uma remoção incompleta destes compostos durante o tratamento, ou a libertação de formas conjugadas ativas destas hormonas, durante o processo de tratamento (Alda & Barceló, 2001; Jonhson et al, 2000).

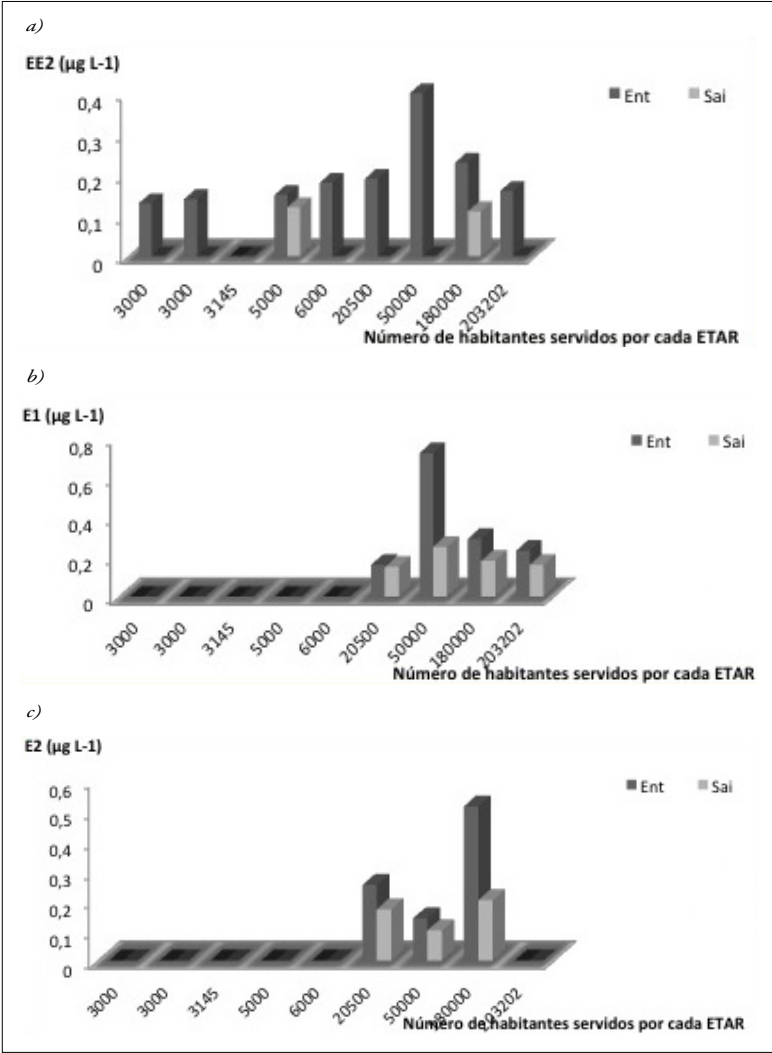


Figura 1. Estrogénios vs entradas e saídas das diferentes ETARs estudadas (n=3); a)-etinilestradiol; b)- estrona; c)- estradiol



Conclusão

As ETARs, por norma, não são concebidas para ter em atenção o tratamento de contaminantes orgânicos, o aparecimento de compostos emergentes, na forma de sub-produtos e seus metabolitos, que persistem após o tratamento das águas residuais, entrando desta forma no ambiente aquático, e posteriormente nas estações de tratamento de água (ETAs) que servem os habitantes. Os três estrogénios naturais, bem como o estrogénio sintético têm sido frequentemente detetadas em descargas de ETARs, devido à sua incompleta remoção durante o tratamento das águas residuais (Yan *et al*, 2009; Sarmah *et al*, 2006; Vulliet *et al*, 2007; Laganá *et al*, 2004).

Neste estudo, foi efetuada uma otimização dos métodos analíticos com base num procedimento experimental EFS-CLAE com deteção UV, para a determinação simultânea dos quatro estrogénios alvo em amostras de água residuais.

Inicialmente cinco métodos diferentes de SPE (descritos no capítulo III) foram testados, com padrões, para a otimização do procedimento a aplicar na quantificação dos estrogénios alvo em amostras reais. Para o método escolhido, efetuaram-se testes de recuperação para cada estrogénio, com resultados muito bons que variam entre 100-120% para a E1, 85 a 110% para o E2, 90 a 120% para o EE2 e 89,8 a 110% para o E3.

Estes resultados confirmaram que o método EFS-CLAE utilizado foi considerado adequado para a aplicação em amostras de águas residuais das diferentes ETARS escolhidas, tendo sido utilizado o mesmo procedimento experimental, em todas as determinações das concentrações dos quatro estrogénios na entrada e saída das mesmas.

Todos os compostos que foram escolhidos para este estudo foram detetados nos afluentes e efluentes das nove ETARS, com concentrações na casa dos nanogramas por litro, indicando uma permanente entrada nos rios, após o tratamento destas águas residuais.

Na generalidade, as concentrações dos estrogénios encontradas à entrada das ETARS estudadas, variaram em intervalos de 0,14-0,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,13-0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,16-0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona. As concentrações dos estrogénios encontradas à saída das mesmas variaram em intervalos de 0,10-0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estradiol, 0,11 a 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etinilestradiol e 0,15-0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona.

As quantidades que eventualmente possam ser ingeridas potenciam a hipótese de bioacumulação nos organismos aquáticos e respetivos efeitos ambientais destes compostos, aparentemente estáveis e biologicamente ativos. Relativamente a este estrogénio, uma possível contribuição para as concentrações de etinilestradiol observadas poderá surgir da parcial conversão de outros princípios ativos constituintes dos contraceptivos orais (ex. noretisterona) e/ ou tratamentos hormonais (Solé *et al.*, 2002).

Estes resultados são semelhantes quando comparados aos valores obtidos em estudos efetuados em outros países, como a Alemanha, Itália e Holanda (Jonhson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Streck, 2009).

Os resultados mostram ainda que os estrogénios pesquisados, podem ser simultaneamente separados e, posteriormente, quantificados usando o método escolhido, em amostras de águas residuais, com uma precisão bastante satisfatória.

Estudo da degradação dos estrogénios

Material e métodos

Todas as medições UV-Vis foram realizadas utilizando um Espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, e células de quartzo com um percurso ótico de 1 cm.

Todas as análises por eletroforese capilar foram efetuadas, utilizando um sistema Beckman P/ACE MDQ equipado com um detetor de matriz de



díodos. As separações electroforéticas foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não revestido, com comprimento total de 50 cm (40 cm de comprimento até á janela ótica), diâmetro interno de 50 μm e diâmetro externo de 375 μm .

Preparação das amostras para medição UV_Vis e análise por eletroforese capilar

As soluções-padrão de E1, E2, E3 e EE2 utilizadas em UV-Vis foram todas preparadas individualmente, num volume apropriado de metanol e com uma concentração de 2 g L⁻¹. Foram feitas diluições de cada solução stock em água com metanol a 5%, obtendo-se uma concentração final de 0,1 g L⁻¹.

O eletrólito de separação utilizado em EC foi preparado diariamente, de forma a conter 10 mM de borato de sódio (Na₂B₄O₇) e ácido cólico 100 mM (C₂₄H₄₀O₅Na.H₂O), ambos da Sigma Aldrich, em água ultra pura, e com um pH final de 9,2. O tempo de utilização do eletrólito foi limitado a 2 dias, uma vez que após esse tempo, as suas características ficavam alteradas, afetando assim o poder separativo do método. A solução-padrão mãe, com a concentração de 2 g L⁻¹ de estrona (Sigma, 99%), 17 β -estradiol (Fluka, 97%), estriol (Sigma, 99%) e 17 α -etinilestradiol (Sigma, 98%) foi preparada em metanol (Panreac Química, SA). A partir desta solução mãe, foram preparadas seis soluções-padrão com concentrações no intervalo entre 1,5-50,0 mg L⁻¹ em solução eletrolítica. Após a sua preparação, todas as soluções foram desgaseificadas utilizando um banho de ultra-sons, durante 15 minutos.

O acondicionamento de um capilar novo foi efetuado da seguinte forma: lavagem com NaOH 1 M, durante 10 min, seguida de uma lavagem com NaOH 0,1 M, durante 30 min, lavagem com água ultra pura, durante 5 min e, por último, uma lavagem com eletrólito, durante 10 min. No entanto, para além do acondicionamento do capilar novo, foram efetuadas lavagens quer no início e final do dia, quer entre análises. As lavagens diárias consistiram em lavagens com NaOH 1 M, NaOH 0,1 M, água e eletrólito, durante 2

min cada, enquanto entre análises, apenas se procedeu à lavagem com NaOH 0,1 M, durante 5 min, água ultra pura, durante 2 min, e eletrólito durante 3 min. Todas as lavagens foram efetuadas à pressão de 20 psi e todas as soluções utilizadas foram filtradas, usando um filtro 0,22 µm de diâmetro de poro, antes de cada análise.

Resultados e discussão

Análise da degradação por espectroscopia UV-Visível

O traçado do espectro individual de cada estrogénio por UV-Vis foi efetuada antes da sua análise por EC, e assim verificar a respetiva degradação ao fim de 7, 14, 21, 28, 35, 63, 91 e 126 dias. O efeito da temperatura foi avaliado em condições de 4° C (frigorífico), 20° C (temperatura ambiente) e 30° C (banho-maria), bem como ao abrigo da luz. Para estudar o efeito da irradiância solar direta foram utilizados tubos de quartzo com as soluções amostra e expostas diretamente à radiação (GPS 40°N 11.885; 8°W 27.650) durante os 126 dias de estudo. O valor de irradiância média foi de 5,4 KWh/m²/dia (Huld e Suri), representado na figura 2.



Figura 2. Valores da irradiância média de cada mês durante o estudo experimental.

Os espectros das diferentes amostras foram todos obtidos entre o intervalo 210 e 300 nm. Os quatro estrogénios mostraram espectros de UV-Vis muito similares apresentando dois picos: um primeiro ao comprimento de onda de

226 nm e um segundo ao comprimento de onda de 281 nm.

Durante todo o estudo experimental, não se observaram alterações significativas nos espectros das amostras que se encontravam ao abrigo da luz e que se encontravam nas condições de temperatura de 4°, 20° e 30°C. Contudo, verificou-se fotodegradação nas amostras que estiveram expostas à radiação solar ao longo dos 126 dias, como nos mostra a figura 3. Comparando as formas dos espectros no dia 0 (início) e no dia 126 (fim), podem-se observar alterações significativas, indicando degradação dos compostos estudados.

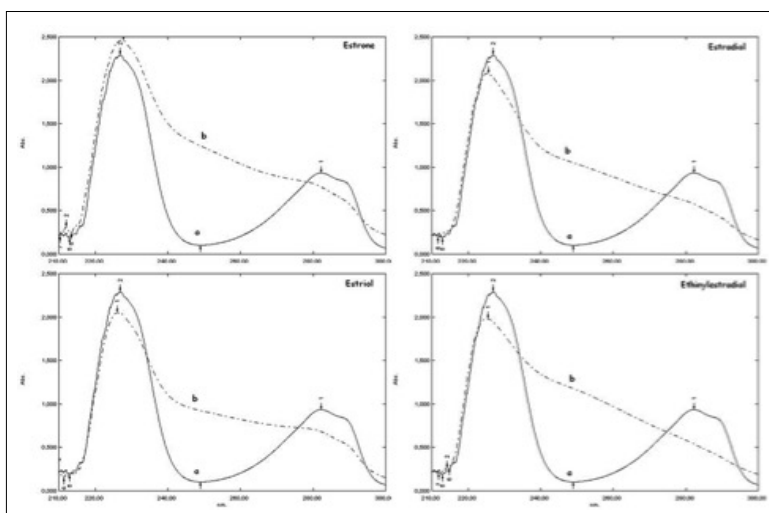


Figura 3. Sobreposição dos espectros, de cada estrogénio, sobre condições de radiação solar directa

Análise da degradação por electroforese capilar de zona

Através da análise dos electroferogramas (Figura 4), pode verificar-se a diminuição das áreas do pico correspondentes a cada estrogénio, ao mesmo tempo que outros picos foram surgindo (assinalados a vermelho), resultantes da degradação dos estrogénios e formação de fotoprodutos

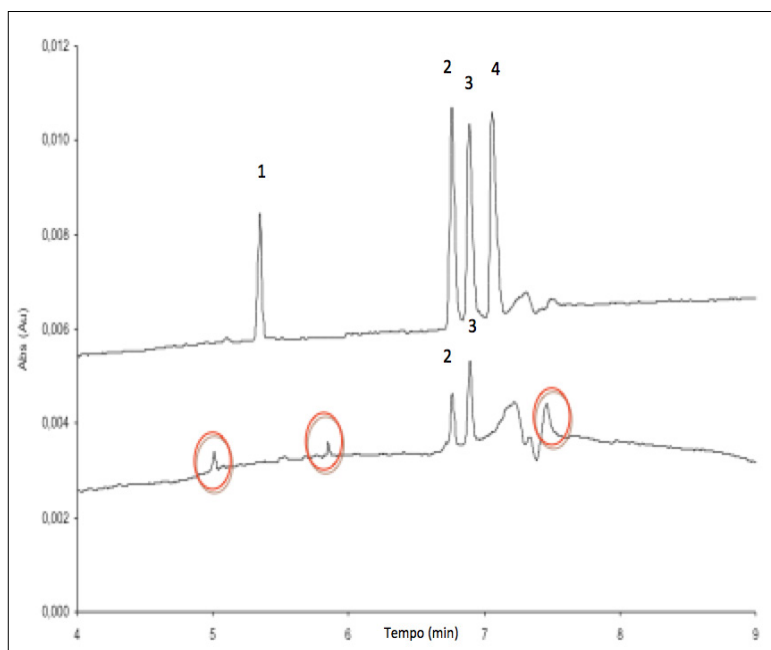


Figura 4. Electroferograma da amostra ao tempo zero (a); depois de 126 dias sob efeito direto da radiação solar (b). Identificação de cada pico: (1) - E3 ; (2)- E2 ; (3) -EE2 (4) E1 – Estrona 0 - picos não identificados (subprodutos?)

Analisando a figura 5 é possível observar que não existe degradação significativa para nenhum dos estrogénios estudados, às temperaturas de 4°, 20° e 30° C e ao abrigo da luz. Por outro lado, sob o efeito da radiação solar direta, a estrona apresenta 100% de degradação após 120 dias de estudo. De todos os estrogénios alvo deste estudo, o EE2 parece ser o estrogénio mais persistente de todos, com cerca de 20% da concentração inicial, após 120 dias de estudo. O estriol apresentou a maior taxa de degradação no início do estudo, apresentando 50% de degradação após 40 dias. Para a estrona apresentar 50% de degradação foram necessários 55 dias, enquanto para o E2 foram 60 dias e para o EE2 75 dias. De salientar ainda, que a taxa de degradação do estriol tornou-se muito lenta após 80 dias de estudo. Pelos resultados obtidos neste estudo, relativamente à degradação destes compostos sob várias condições, é evidente e claro o efeito positivo da radiação solar direta na degradação e eliminação



destes disruptores endócrinos, mesmo em concentrações tão elevadas como as que foram utilizadas neste estudo. Portanto, a luz solar direta nas estações de tratamento de águas residuais, pode aumentar a remoção de alguns destes disruptores, através do processo de fotodegradação.

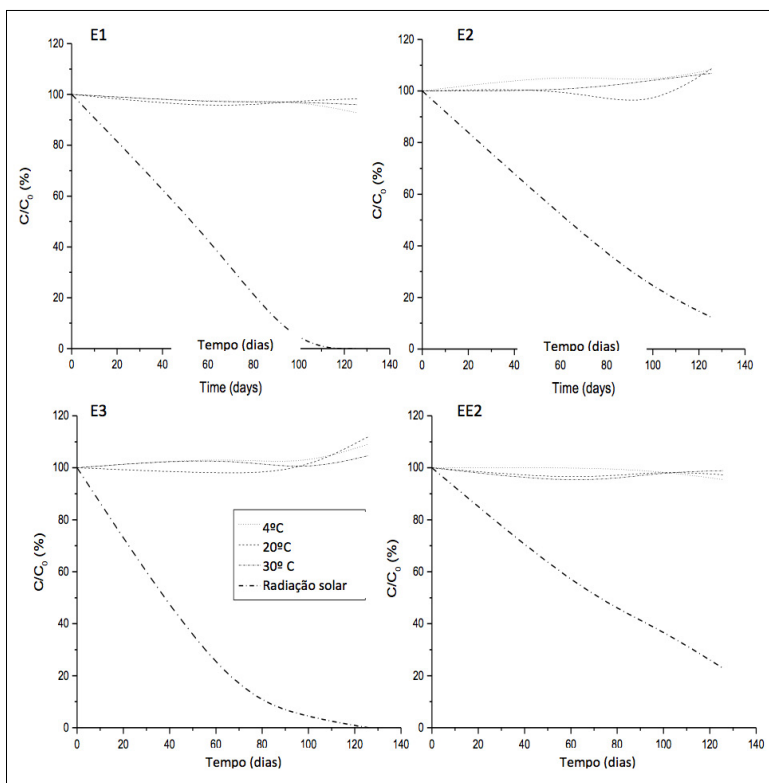


Figura 5. Variação da concentração(%) de cada estrogênio, em função do tempo.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o E1, E2, E3 e EE2 no intervalo de temperaturas de 4°C e 30°C, ao abrigo da luz, não sofrem degradação detetável com os métodos analíticos utilizados neste trabalho. No entanto, sob radiação solar direta observou-se uma mudança nas formas dos espectros obtidos, após

126 dias, para todos os estrogénios estudados. A análise feita por electroforese capilar mostrou que sob a radiação solar direta, a estrona apresentou 100% de degradação após 126 dias. O EE2 foi o único que pareceu ser mais persistente e o E3 foi o que apresentou uma taxa de degradação inicial mais rápida.

Outra observação que poderá ser feita, através da análise dos electroferogramas, é o aparecimento de vários picos correspondendo à formação de sub-produtos derivados da degradação dos estrogénios. Este estudo demonstra que E1, E2, E3 e EE2 podem ser degradados por radiação solar natural e direta, no entanto, outras condições ambientais, tais como: presença de matéria orgânica natural, atividade biológica e variação do teor de oxigénio, devem ser estudadas de modo a poder tirar conclusões mais próximas das que se tirariam tendo em atenção as condições naturais (Fonseca *et al.*, 2010).

Uso de Radioimunoensaio na determinação de estrogénios em anfíbios nos efluentes das ETARS

Material e métodos

Para todas as análises efetuadas, foi utilizado um contador Gamma da Siemens Medical Solutions Diagnostics, uma centrífuga refrigerada da JP Selecta, incubadora da marca Selecta, agitador Vortex da marca Selecta e micropipetas manuais da marca Eppendorf.

Para a determinação do estradiol, foi utilizado um Kit de Estradiol Duplo 125| radioimunoensaio (PIKE2D-6), fornecido pela Siemens Medical Solutions Diagnostics contendo os seguintes reagentes: anti-corpo estradiol liofilizado (E2D1, 5E2D1); estradiol sintético iodado 125I (E2D2), sete padrões de estradiol (E2D3-9), com concentrações de 0, 5, 10, 20, 50, 150 e 500 pg mL⁻¹ em soro humano processado equivalente a 0, 0,02, 0,04, 0,07, 0,18, 0,55 e 1,84 nM L⁻¹ e uma solução precipitante (N6, 5N6) que consiste em gama globulina de cabra anti-coelho.



Para a determinação da estrona foi utilizado um Kit de Estrone-RIA-CT (KIP19100) de uso diagnóstico in vitro, fornecido pela DIAsource ImmunoAssays S.A., contendo os seguintes reagentes: estrona marcada com ^{125}I estabilizada numa solução tampão, conservante de NaN_3 ($< 0,1\%$); seis padrões de estrona, com concentrações de 0, 12,5, 25, 50, 125, 250, 750 pg mL⁻¹; solução controle contendo soro humano e uma solução de lavagem concentrada (70 vezes).

As curvas de calibração foram obtidas usando diferentes concentrações de padrões de antigénio, tendo os valores experimentais calculados através da equação 1, função logística de 4 parâmetros (4PL) (Dudley *et al*, 1985)

$$y = [(A - D) / [1 + (x / C)^B]] + D \quad \text{Equação 1}$$

onde:

y = valor do sinal

x = concentração de antigénio;

A = concentração do padrão zero

B = declive no ponto de inflexão

C = valor de concentração no ponto de inflexão

D = concentração do padrão em excesso

No entanto, a fim de comparar várias curvas padrão, os valores foram normalizados entre 100% (A) e 0% (D), que de acordo com a razão (Schneider *et al*, 2005):

$$Y_N = (Y - D)/(A - D) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde Y_N é a resposta normalizada, A e D são parâmetros da equação 4PL (Schneider *et al.*, 2005), podendo ainda ser expressa pela seguinte razão:

$$\% B/B_0 \quad \text{Equação 3}$$

onde:

B- concentração do padrão zero (D)

B₀ - concentração do padrão em excesso (A)

Locais de amostragem

Foram escolhidos seis locais para o estudo, em quatro pontos da Região Centro de Portugal, dois grupos de controlo e quatro grupos-alvo em rios (efluentes das ETARS acima referidas). Os quatro grupos-alvo estão localizados no rio Mondego (Grupo I), com as coordenadas GPS 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650, Rio Vouga (Grupo II) com as coordenadas GPS 40 N ° 11,885; 8 W ° 27,650, Rio Cértima (Grupo III) com as coordenadas GPS (40 N ° 11,885, 27,650 W 8 °) e Rio Arunca (Grupo IV) com as coordenadas GPS (39 N ° 56,062, 8 ° W 38,202). Estes quatro locais situam-se nas saídas das ETARs, onde as águas residuais depois de tratadas são lançadas nos respetivos rios.

Os dois grupos de controlo (Grupo Controlo I e Grupo de Controlo II) localizados em Coimbra, um numa fonte doméstica e outro numa fonte municipal, com as coordenadas GPS 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650 e 40 ° N 11,885; 8 W ° 27,650, respetivamente, onde havia a certeza que as águas não tinham qualquer razão para conterem quaisquer tipos de contaminantes e, os indivíduos não estiveram expostos a concentrações elevadas dos compostos em estudo.

Amostragem

Para o estudo em causa, recolheram-se amostras de sangue de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Tratando-se de uma espécie protegida por convenções internacionais (Convenção de Berna) e legislação nacional e comunitárias específicas (Anexo V da “Directiva Habitats” Decreto-Lei 140/99 de 24 de Abril, retificado pela Declaração de Retificação n.º 10-AH/99, de 31 de Maio, alterado pelo Decreto-Lei n.º 49/2005, de 24 de Fevereiro, que o republica), solicitou-se ao Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB), uma licença para captura, detenção temporária e recolha de material biológico dos indivíduos.

De salientar, que foi complicado a captura destes indivíduos, já que estes não



abundavam nos locais de amostragem escolhidos. A detenção foi restrita ao tempo necessário para a manipulação dos indivíduos com vista à obtenção de uma amostra de material biológico (sangue) in situ. A captura dos indivíduos foi efetuada recorrendo a redes de mão do tipo “camaroeiro” (dip-nets), sendo, posteriormente, anestesiadas usando clorofórmio embebido em algodão (Figura 6).



Figura 6. Captura das rãs *Rana/Pelophylax perezi* e sua imobilização

Na colheita de sangue dos indivíduos anestesiados, utilizaram-se seringas hipodérmicas (uma por indivíduo, para não ocorrer qualquer tipo de contaminação) para extrair cerca de 1 mL de sangue de cada indivíduo (Ver Figura 7).

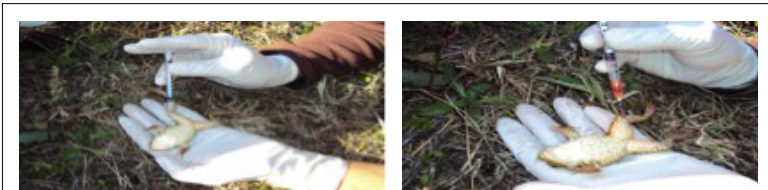


Figura 7. Colheita de material biológico (sangue) das rãs *Rana/Pelophylax perezi*

Após a obtenção de cada amostra biológica, os indivíduos capturados foram todos libertados no respetivo local de captura, não apresentando qualquer tipo de limitação.

Preparação das amostras

Após a recolha de sangue de cada indivíduo, este foi transferido para um tubo,

para colheita de soro, com gel de separação e ativador de coágulos, sendo imediatamente acondicionado numa arca frigorífica a 4°C. Posteriormente, foram transportadas até ao laboratório, para se efetuar os respetivos processamentos. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 g usando uma centrífuga refrigerada da marca JP Selecta, à temperatura de 4 °C, durante 10 min, para total separação da fração de soro. O soro foi então retirado para eppendorfs de 1 mL e armazenados numa arca frigorífica à temperatura de -20 °C, antes da medição dos estrogénios por RIA.

Resultados e discussão

Quantificação dos estrogénios nas amostras de soro

Os níveis dos estrogénios foram quantificados em cada amostra, em triplicado, após o procedimento experimental descrito nos próprios KITS de estradiol (volume de 200 µL) e estrona (volume de 100 µL).

Após a leitura do sinal (contagens por minuto) de cada amostra, converteram-se os valores para pg mL⁻¹, conforme os dados que constam da tabela 3.

Tabela 3. Caraterização e resultados das concentrações de estrogénios nos indivíduos rã-verde Rana/ Pelophylax perezi

	Nº de indivíduos	Género	Estrona média cpm	Estrona média pg/mL	Estradiol média cpm	Estradiol média
Grupo I	4	♂	10258,9	36,75	2595,6	149,431
Grupo II	4	♂	9104,6	53,31	4091,65	37,221
Grupo III	4	♂	8819,4	58,16	2834,05	118,103
Grupo IV	4	♂	6972,35	100,98	4513,3	25,312
Grupo Controle I	4	♂	10439,6	34,52	7553,1	0,0370
Grupo Controle II	4	♂	11869,5	19,34	3963,15	41,798

Analizando os valores das concentrações de estrogénios encontradas nos 24 indivíduos estudados, verifica-se que, os níveis de concentração de estradiol registados são mais elevados que os observados para a estrona, nos grupos experimentais I, III e no grupo de controlo II. O inverso sucede nos grupos experimentais II, IV e grupo de controlo I (Figura 8 e 9).

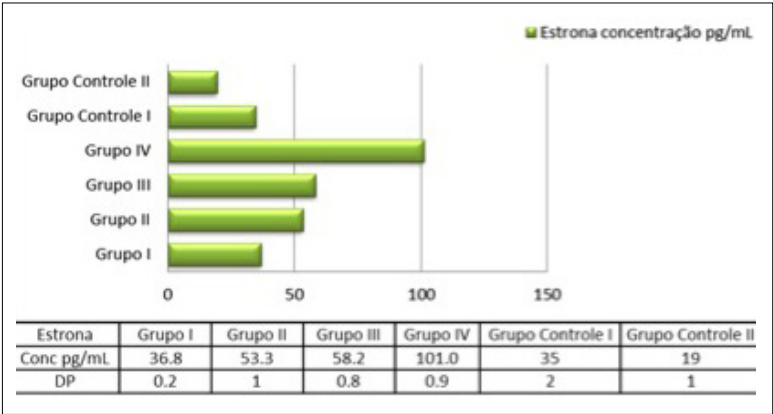


Figura 8. Concentrações de estrona nos indivíduos rá-verde Rana/Pelophylax perezi

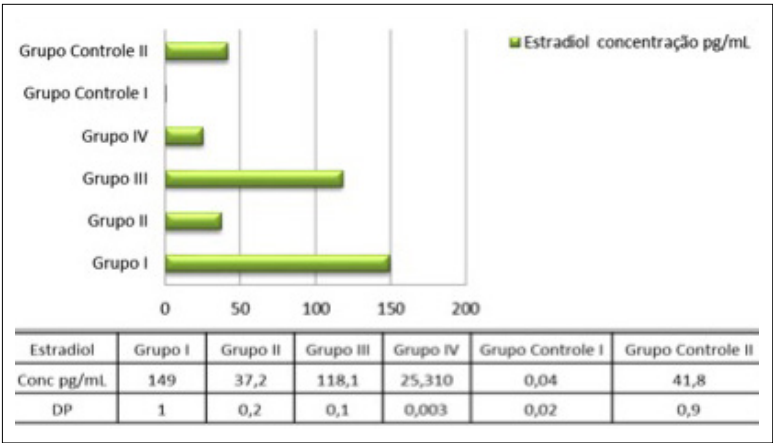


Figura 9. Concentrações de estradiol nos indivíduos rá-verde Rana/Pelophylax perezi

Como na literatura não foram encontrados trabalhos em que a amostra fosse similar, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos, entre os grupos experimentais e o grupo de controlo I e controle II, recorrendo-se ao teste de Kruskal Wallis. A posterior comparação entre pares de grupos (Tab. 4) foi realizada com o teste U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística foi utilizado o Statistical Package for the *Social Sciences*, versão Windows (SPSS 18.0).

Tabela 4. *Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controle I*

	Estradiol (pg/ml)				Estradiol (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p ¹	n	Média	Desvio-padrão	p ¹
Grupo I	4	149	1		4	36,8	0,2	
Grupo II	4	37,2	0,2		4	53	1	
Grupo III	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
Grupo IV	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
Grupo de controlo II	4	0,04	0,02		4	35	2	

¹ Kruskal Wallis Test

Para o estradiol existe um predomínio de valores mais elevados nos grupos experimentais face ao grupo de controlo I, com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$). Nas comparações entre pares de grupos, envolvendo cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo I as diferenças de valores mantêm-se significativas qualquer que seja o par comparado ($p < 0,05$).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos (Tab. 5), igualmente com valores mais elevados para os grupos experimentais. Uma posterior comparação entre pares de grupos revela que tais diferenças são significativas quando em causa os grupos experimentais II a IV e o grupo de controlo I ($p < 0,05$). No par experimental I/controlo I o p observado foi não significativo.

Tabela 5. Comparação entre os pares de grupos e o grupo de controlo II

	Estradiol (pg/ml)				Estradiol (pg/ml)			
	n	Média	Desvio-padrão	p ¹	n	Média	Desvio-padrão	p ¹
Grupo I	4	149	1		4	36,8	0,2	
Grupo II	4	37,2	0,2		4	53	1	
Grupo III	4	118,1	0,1	0,001	4	58,2	0,8	0,001
Grupo IV	4	25,310	0,003		4	101,0	0,9	
Grupo de controlo II	4	41,8	0,9		4	19	1	

¹ Kruskal Wallis Test

No estradiol, quando o grupo de controlo utilizado é o II, nem sempre o predomínio de valores mais elevado se observa nos grupos experimentais. Em concreto os grupos experimentais II e IV apresentam valores mais baixos que os registados no grupo de controlo. As comparações entre conjunto dos grupos envolvidos registam valor significativo ($p=0,001$), mantendo-se essa significância aquando da comparação entre cada um dos grupos experimentais e o grupo de controlo II ($p < 0,05$).

Na estrona a significância estatística permanece para a comparação entre os diversos grupos envolvidos, igualmente com valores de maior grandeza para os grupos experimentais, sendo as diferenças significativas, quer nas comparações realizadas para o conjunto dos grupos ($p=0,001$), quer na comparação entre pares de grupos (experimental I, II e III versus grupo de controlo II; $p < 0,05$).

Sendo os valores de concentração de estradiol tabelados mais elevados que os observados para a estrona nos grupos experimentais I e III e menos elevados nos grupos experimentais II e IV, cruzaram-se estes dados com o número de habitantes servidos pelas ETARS estudadas no capítulo IV, conforme se pode ver na figura 10.

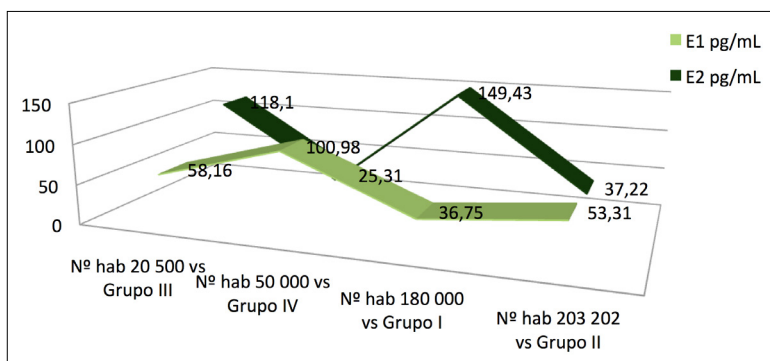


Figura 10. Comparação entre os pares de grupos experimentais e o nº de habitantes que são servidos pelos efluentes das ETARs (rios)

Para a estrona obtiveram-se valores mais elevados para os efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 50 000 habitantes (ETAR 5), existindo um predomínio de valores mais elevados nos efluentes das ETARs que servem um nº de habitantes de 20 500 (ETAR 7) e 180 000 habitantes (ETAR 2), para o estradiol.

De acordo com os resultados obtidos, há uma evidência da persistência de estrona e estradiol à saída das ETARs estudadas, indicando claramente uma ineficiência na remoção destes compostos durante o tratamento das águas residuais, e que são sistematicamente lançadas nos rios, lagos e oceanos, afetando os ecossistemas e a água potável que serve as populações.

Conclusão

Este estudo fornece evidências sugerindo que a prolongada exposição aos efluentes das ETARs pode causar efeitos cumulativos de estrona e estradiol em indivíduos do género masculino de indivíduos de rã-verde *Rana/Pelophylax perezi*. Devido à falta de estudos com valores de referência de concentração de estrogénios nestes indivíduos, é difícil dizer que os efeitos sejam comparáveis aos efeitos observados e descritos nos vários estudos efetuados em vertebrados, tais como feminização, infertilidade masculina, etc., possivelmente resultando num efeito ao nível da



população. Pode-se, no entanto, deduzir que há processos cumulativos de estrogénios nestes indivíduos do género masculino, que têm o seu habitat natural em ambientes de água doce, nos rios estudados, onde os efluentes das ETARs são lançados, com evidente potencial atividade estrogénica, já que os estrogénios pesquisados são hormonas femininas.

De referir ainda que ao longo da captura destes indivíduos ao longo dos rios, se observaram algumas fêmeas (que não estão incluídas neste estudo) que apresentavam algumas modificações anatómicas, nomeadamente uma pele mais fina, membros superiores e inferiores bastante mais alongados que o normal e uma extrema magreza.

De realçar ainda, que estes animais pela sua natural fisiologia e por viverem na água, têm sido permanente expostos à poluição química presente nos sistemas aquáticos, sendo a atividade estrogénica apontada como uma séria causa para declínio global das várias espécies de anfíbios e a crescente extinção destes animais.

Considerações finais

Atualmente a ocorrência de estrogénios naturais e sintéticos, enquanto fármacos e disruptores endócrinos, podem apresentar efeitos adversos nos humanos, organismos aquáticos e terrestres, podendo ser traduzido num preocupante problema de saúde pública, animal e ambiental, a vários níveis.

Estudos demonstram que estes efeitos podem ser detetados a qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos populações e ecossistemas (Solé, Raldua, Barceló, & Porte, 2003). Estudos têm ligado os DE a efeitos biológicos adversos em animais, dando origem a uma preocupação crescente de que níveis baixos possam causar efeitos similares em humanos, dependendo da dose e do tempo de exposição.

A quantificação precisa de estrogénios naturais e sintéticos nos efluentes das ETARs é primordial na avaliação de uma potencial ocorrência de disrupção endócrina nos seres vivos em geral (Ying *et al.*, 2000;), já que são continuamente lançados nos

sistemas aquáticos, sem qualquer restrição (Bila *et al.*, 2007).

Além da excreção natural dos estrogénios naturais pelos humanos e animais, há que ter uma atenção especial para os estrogénios sintéticos, não só os que são utilizados como anticoncecionais e nas terapias hormonais, como também os resíduos hospitalares e da indústria farmacêutica, e até medicamentos com prazo de validade expirado e sua eficiente eliminação.

Em Portugal, as informações sobre a ocorrência de estrogénios no ambiente são ainda algo limitadas. Seria desejável um levantamento detalhado para melhor compreender a distribuição destes compostos no ambiente, especialmente nos efluentes das ETARs, nos solos, nas águas superficiais e em águas subterrâneas. Vários estudos efetuados neste campo, noutros países, têm comprovado a seriedade e a diversidade de problemas que podem advir da exposição a estas substâncias.

Assim, o efeito dos DE, na saúde humana e animal deve ser analisado de forma ordenada e qualitativa, tendo-se em consideração as preocupações e necessidades especiais da sociedade dentro das classes e produtos.

Como conclusão deste estudo, pensamos que num futuro próximo, se deve obrigatoriamente implementar um acompanhamento sistemático na determinação de estrógenos em todas as ETARs, de acordo com o número de habitantes que cada uma serve, bem como a aplicação da legislação específica e vigente, ainda que atualmente seja muito escassa, no controlo destes compostos nos efluentes das ETARs; na não utilização de lamas, provenientes do tratamento das águas residuais, como fertilizantes na agricultura; a separação de águas residuais domésticas, hospitalares e industriais e ainda o controlo de administração de hormonas nas pecuárias e aquaculturas.

Nos últimos anos, e em face dos resultados dos vários estudos relativos à sistemática ocorrência e persistência de estrogénios no ambiente, muitos cientistas e pesquisadores pelo mundo, têm efetuado estudos sobre a melhor forma de remover estes compostos nos tratamentos das águas residuais. Contudo, ainda não se conseguiu um tratamento eficiente nas ETARs para estes compostos e outros igualmente nocivos, sendo este um caminho prioritário e obrigatório, como uma questão pertinente de saúde pública animal e ambiental.



Referências

- Alda, J., & Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 437-447.
- Bila et al, D. M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. vol 30 nº 3 651-666.
- Campani, D. M. (2010). Esteroides em águas residuárias - Estado de arte e Perspectivas de Tratamento - VII Simposio Internacional de Qualidade Ambiental. Esteroides em águas residuárias. Porto Alegre, Brasil.
- Desbrow, C. R., & Brighty, G. C. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent, Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environmental Sci. Technol.* 32 (11), 1549-1558.
- Dudley, R. E. (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* 31, 1264-1271.
- Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A., & Meric, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 515-533.
- Fonseca, A., Lima, D., & Esteves, V. (2010). Study of estrogenic hormones degradation using UV-Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. *Water, Air & Soil Pollution*, 215 (1-4), 441-447.
- Jonhson, A., Belfroid, A., & Di Corcia, A. (2000). *Sci. Total Environ.* 256, 163.
- Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E., Zaugg, S., Barber, L., et al. (2002). Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000: a national reconnaissance. *Environn. Sci. Technol.* 36(6), 1202-1211.
- Laganá, A., Barceló, A., Leva, I., Faberti, A., Fago, G., & Marino, A. (2004). Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 501, 79-88.



- Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A., Olsson, P., et al. (1999). Ethinylloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45, 91-97.
- Miiller, J., & Miller, J. (2005.XVI). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow (England): Prentice Hall, 268 p. ISBN 0-13-129192-0.
- Orn, S., Holbech, H., Madsen, T., Norgreen, L., & Petersen, G. (2003). Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinyestradiol and methyltestosterona. *Aquatic Toxicology*, 65, 397-411.
- Park, I.-S., Kim, J.-H., Cho, S., & Kim, D. (2004). Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 232, 183-193.
- Sarmah, A., Northcott, G., F., L., & Tremblay, L. (2006). A survey of endocrine disrupting chemicals (EDAs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato Region of New Zeland. *Science of the Total Environmemtal*, 355, 135-144.
- Schneider, C., Scholer, H., & Schneider, R. (2004). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids Snyder*, 69, 245-253.
- Solé, M., Barceló, D., & Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *cyprinus Carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology*, 60, 233-248.
- Solé, M., Raldua, D., Barceló, D., & Porte, C. (2003). Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 56, 373-380.
- Streck, G. (2009). Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environmental. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 635-652.

- Skoog, D., Nieman, T., & Holler, F. (2002). *Princípios de análise instrumental*, 5ª edição. Brasil: Bookman.
- Ternes, T., Kreckel, P., & Mueller, J. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science Total Environmental*, 225, 91-99.
- Versnennen, B., & Janssen, C. (2004). Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.*, 19, 198-206.
- Wang, S., Xu, Z., Fang, G., Zhang, Y., & He, J. (2008). Separation and determination of estrone in environmental and drinking water using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. *J. Sep. Sci.*, 30, 1181-1188.
- Wise, A., O'Brien, K., & Wooddruff, T. (2011). Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? . *Environmental Science Technology*, 45, 51-60.
- Yan, W., Feng, Q., Wei, Y., & Lin, J. (2009). Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC-MS. *Chromatographia*, 69, 621-628.
- Ying, G., Kookana, R., & Ru, Y. (2002). Occurrence and fate of hormones steroids in the environment. *Environmental International*, 28, 545-551.

**Estudo QSAR 3D de complexos tricarbonilo
de Re e Tc com afinidade estabelecida
para os recetores 5HT_{1A}**

Zélia Barbosa

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
147 a 163

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Zélia **Barbosa**

Licenciada em Farmácia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Pós graduada em Administração em Serviços de Saúde na opção de gestão de Recursos Humanos pela Escola Superior de Enfermagem Dr. Ângelo da Fonseca, Mestre em Química Inorgânica Biomédica-Aplicações em Diagnóstico e Terapia pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa em Parceria com o Instituto Tecnológico e Nuclear e especialista em Farmácia, Professora Adjunta do Departamento de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra. Com publicações de artigos nacionais e internacionais e apresentação de comunicações em congressos.



Estudo QSAR 3D de complexos tricarbonilo de Re e Tc com afinidade estabelecida para os recetores 5HT_{1A}

Zélia Barbosa

Várias estratégias podem ser utilizadas no desenvolvimento de fármacos. Algumas envolvem alterações de natureza estereoquímica nas moléculas, para que seja melhorada a ligação entre o fármaco e o alvo ou mudança de grupos funcionais ou substituintes de forma a melhorar a farmacocinética e/ou a farmacodinâmica do fármaco que envolvem a síntese de vários análogos. Se forem consideradas todas as combinações possíveis o número de análogos que pode ser sintetizado é infinito. Assim, é claramente vantajosa uma abordagem racional, para decidir quais as alterações a realizar na molécula. A abordagem QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) tem demonstrado ser muito útil na resolução destes problemas. Esta abordagem visa identificar e quantificar as propriedades físico-químicas do fármaco para as correlacionar com a sua atividade biológica. Se essa relação for encontrada, é possível escrevê-la sob a forma de uma equação matemática permitindo assim identificar as propriedades que desempenham um papel importante na farmacocinética ou na farmacodinâmica do fármaco e obter informação sobre as novas estruturas a desenvolver. Esta estimativa antecipada da atividade biológica de uma nova molécula a sintetizar apresenta vantagens evidentes. As propriedades mais comuns num estudo QSAR são as propriedades hidrofóbicas, eletrónicas e estereoquímicas uma vez que é possível quantificar esses efeitos (Patrick, 2005).

Os recetores 5-HT_{1A} pré ou pós-sinápticos desempenham um papel bastante importante na regulação do humor, cognição e controlo motor, funções que se encontram alteradas nos doentes esquizofrénicos, e que são profundamente alteradas pelos agentes anti psicóticos (Caliendo, Santagada, Perissutti &



Fiorino, 2005). Estudos *post mortem* demonstraram a existência de uma redução na densidade dos recetores 5-HT_{1A} em pacientes com doença de Alzheimer (Bowen, Najlerahim, Procter, Francis & Murphy, 1989). O receptor 5-HT_{1A} é um dos recetores associados à proteína G e inibe a atividade da adenilatociclase (B. Kobilka, Frielle, Collins, Yang-Feng, T. Kobilka, Francke, Lefkowitz & Caron, 1987).

Devido à importância deste recetor em patologias do foro psiquiátrico a descoberta de novos ligandos tem sido uma importante área de investigação neurobiológica. Do ponto de vista químico, os ligandos conhecidos podem ser divididos em diferentes classes (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005; Olivier, Soudijn, van Wijngaarden 1999; Oh, Ha, Chi & Lee, 2001; Lopez-Rodriguez, Ayala, Benhamu, Morcillo & Viso, 2002; Pessoa-Mahana, Araya-Maturana, Saitz & Pessoa-Mahana, 2003).

Material e métodos

A estratégia de modelação consistiu em vários passos. O primeiro e mais longo consistiu numa extensa pesquisa bibliográfica de complexos tricarbonilo de Re e de ^{99m}Tc preparados com o objetivo de visualizar os recetores da serotonina 5-HT_{1A} e com a afinidade para este recetor determinada experimentalmente em termos de IC₅₀ por ensaios de competição usando homogenado de hipocampo de cérebro de rato e [³H]-8-OH-DPAT como radioligando.

Desta pesquisa resultaram vinte estruturas distintas que cumpriam estes requisitos.

Na Figura 1 apresentam-se as estruturas dos complexos utilizados neste estudo.

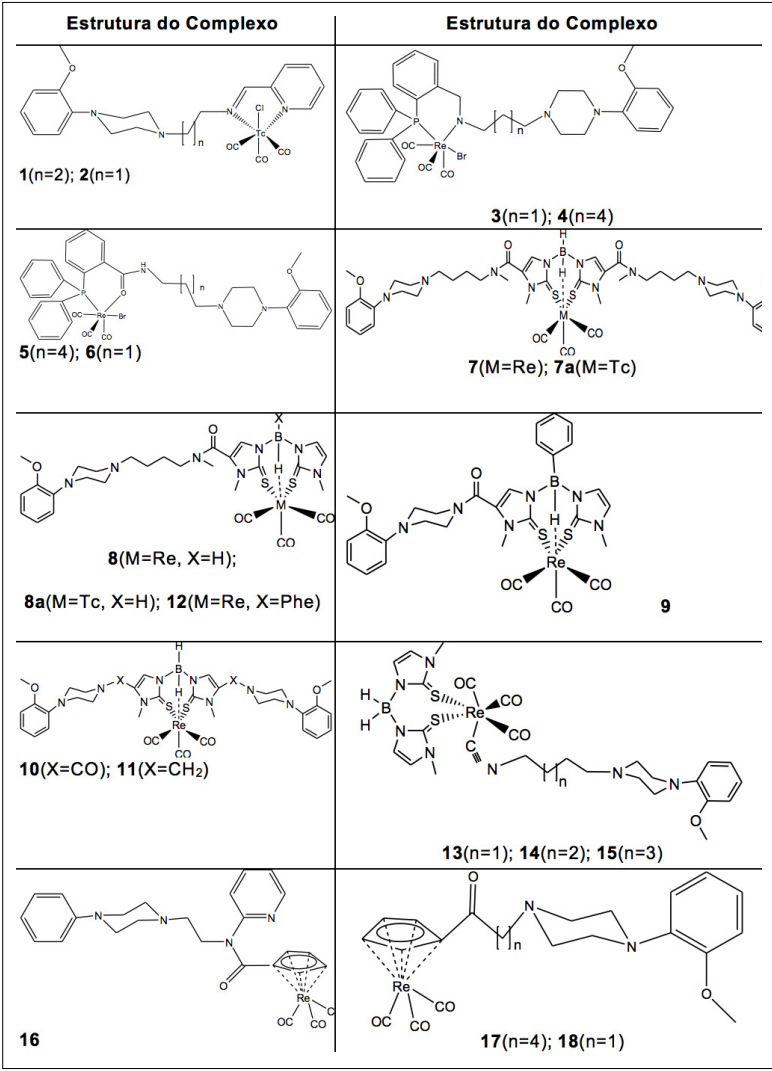


Figura 1. Estrutura dos complexos incluídos no estudo

Na Tabela 1 apresentam-se os valores experimentais da afinidade para o receptor 5-HT_{1A}, bem como o valor do coeficiente de partição octanol/água, usando o programa informático cLogP (versão 4.0; BioByte Corp) um programa validado com um número muito elevado de valores experimentais

de fármacos. Este programa calcula o LogP utilizando o método da adição de fragmentos.

Tabela 1. Valores da afinidade experimental dos complexos com o receptor e do Coeficiente partição octanol/água usando o programa cLogP

Complexo	IC ₅₀ 5HT _{1A} (nM)	cLogP
1	5±4	2,595
2	630	2,391
3	285±4	6,483
4	1100±4	7,748
5	200±4	7,163
6	20±0,1	6,155
7	0,172±0,003	4,369
7a	0,172±0,003	2,264
8	0,71±0,02	1,978
8a	0,71±0,02	1,978
9	9290±212	5,264
10	8130±505	1,722
11	4666±155	4,659
12	0,65±0,01	5,173
13	66,5±1	0,399
14	21,9±0,5	1,538
15	23,2±0,2	4,747
16	71±0	0,423
17	6±0	1,204
18	217±0	0,775

Os compostos **3,5,8,10,12,13** e **18** foram caracterizados por difração de raios-X de cristal único e depositados no CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), sob os números 235824, 235823 (Amlaiky, Ramboz, Boschert, Plassat & Hen, 1992), 157756 (Adham *et al.*,1993;19], 189597 (Sodhi & Sanders-Bush, 2004), 157757, 250856 (Adham *et al.*,1993; Hoyer *et al.*,1994) e 160746 (Oh, Ha, Chi & Lee, 2001), respetivamente, o que constituiu uma

situação ótima para a elaboração da base de dados estrutural, que constituiu o segundo passo.

As estruturas foram modeladas utilizando o programa informático Molecular Modeling Pro Plus (MMP, versão 6.24; ChemSW, Inc.) e em seguida exportadas no formato de base de dados em MS Access (Versão 2003, Microsoft Co).

Os complexos que tinham sido caracterizados por difração de raios-X de cristal único, foram então colocados na base de dados, sem terem sido alvo de qualquer modificação estrutural. No caso dos complexos que não tinham sido caracterizados pela referida técnica, foi utilizada a estrutura cristalográfica mais próxima do composto a modelar a qual foi depois editada em modo 3D até se obter a estrutura pretendida. As estruturas das moléculas editadas, e só as destas, foram posteriormente alvo de minimização energética em todas as secções editadas utilizando algoritmos de Mecânica Molecular (MM2) e seguidamente enviadas para a base de dados (Dyott, Stuper & Zander, 1980).

Os programas de modelação atualmente disponíveis calculam de forma automática uma grande quantidade de descritores moleculares (“propriedades”) de carácter global, utilizando algoritmos rápidos de Mecânica Molecular ou de Mecânica Quântica (semi-empíricos). Estes descritores têm necessariamente de ser complementados com um conjunto alargado de propriedades específicas para o modelo em causa. No caso considerado, e para além dos mais de 140 descritores moleculares calculados pelo programa MMP, foram também calculadas e adicionadas todas as propriedades moleculares, na sua maioria locais, que se julgou poderem de alguma forma influenciar a afinidade da molécula para com o recetor.

Foi também calculado o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, com o programa cLogP versão 4.0; BioByte Corp. (cLogP), cujo valor se adicionou à base de dados

Elaboração da base de dados

A base de dados foi criada no formato Access 2003 (Microsoft Office Access 2003 versão 5.1.2600 Service Pack 2 Compilação 2600). As estruturas tridimensionais dos 20 complexos foram modeladas utilizando o programa MMP sempre que possível recorrendo aos dados de cristalografia e depois gravadas na base de dados utilizando o formato MacroModel file (*.dat, MDL Information Systems Inc) (Mohammadi *et al.*, 1990). O programa permite adicionar várias dezenas de propriedades moleculares calculadas para cada uma das estruturas introduzidas as quais são depois correlacionadas com a respetiva atividade biológica do composto, neste caso, a afinidade para o recetor 5-HT_{1A}.

Avaliou-se diretamente a correlação em bruto de cada uma das propriedades com a variável resposta. Quantificou-se a correlação existente entre todas as propriedades moleculares integrantes da base de dados (matriz correlacional com todas as propriedades moleculares) e a variável resposta $\log 1/IC_{50}$ e selecionados os melhores (leia-se mais correlacionados) descritores moleculares para cada tipo de interação possível (lipofilia, polaridade, comprimento do espaçador, etc.). A base de dados ficou assim com um total de 49 propriedades moleculares.

Procedeu-se então a uma verificação de que forma as variáveis se correlacionavam com a variável resposta simulando a construção de modelos de até 4 variáveis incluindo transformações, (nomeadamente logaritmos), bem como combinações não lineares (multiplicação, divisão, elevação a uma potência).

Resultados

Elaboração de modelos

Após a elaboração da base de dados definitiva procedeu-se ao tratamento estatístico dos dados, tendo em conta a dimensão e representatividade da



amostra. Além disso, é fundamental avaliar os modelos em termos do seu poder de previsão. Para esse efeito, foram utilizados métodos de validação cruzada separando a amostra entre grupo de treino e grupo de teste e por intermédio de análise PRESS (Predicted Residual Sum of Squares).

Numa fase inicial, utilizando o programa Molecular Analysis Pro (Norgwyn Montgomery Software Inc) foram extraídos todos os modelos até 4 variáveis, posteriormente foram ordenados por valores decrescentes de coeficiente de determinação (r^2).

Tabela 2. Modelos com quatro variáveis

Modelos de quatro variáveis para $\log(1/IC_{50})$						
	Variável	Df	Interceção	Coeficiente	r2	Probabilidade
Modelo 1	Ligações de H (Hansen)	19	0,862915	-0,435788	0,815105	0,0000225952
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0208382		
	Coeficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP			-0,24254		
	$\log(1/N^{\circ}$ Grupos Funcionais)			-2,58877		
Modelo 2	(Ligações de H Hansen) ²	19	-0,995683	-0,0252226	0,814513	0,0000231288
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0206987		
	Coeficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP			-0,226637		
	Logaritmo decimal do inverso do n ^o . de grupos funcionais			-2,33126		
Modelo 3	Ligações de H (Hansen)	19	0,771348	-0,447529	0,816557	0,0000213297
	(Coeficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP) ²			-0,0317526		
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0200587		
	Logaritmo decimal do inverso do n ^o . de grupos funcionais			-2,81083		
Modelo 4	(Ligações de H Hansen) ²	19	-1,13653	-0,0257657	0,815044	0,0000226493
	(Coeficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP) ²			-0,0294745		
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0199625		
	Logaritmo decimal do inverso do n ^o . de grupos funcionais			-2,53547		

Com vista à obtenção de modelos fiáveis analisou-se a correlação entre as variáveis usadas pelos modelos obtidos. Em cada modelo não pode haver variáveis fortemente correlacionadas entre si (superior a 0,6).

Da regressão com todas as combinações resultaram quatro modelos válidos com quatro variáveis e com $r^2 > 0,8$ os quais são apresentados na Tabela 2.

Os modelos foram obtidos por regressão linear múltipla (RLM) e sujeitos a uma análise estatística exaustiva incluindo análise PRESS para avaliar a sua significância e capacidade de previsão.

Tabela 3. *Análise de variância dos modelos*

	Origem da variação	df	SS	MS	Estatística	Probabilidade
Modelo 1	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,435788		
	Média	1	50,00292	0,0208382		F=16,53174
	Total (corrigido)	19	42,79628	-0,24254		r²=0,8151
	Regressão	4	34,88344		8,72086	S=0,72631
	Resíduos	15	7,91283	-2,58877	0,52752	
Modelo 2	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,0252226		
	Média	1	50,00292	0,0206987		F=16,46703
	Total (corrigido)	19	42,79628			r²=0,81451
	Regressão	4	34,85812	-0,226637	8,71453	S=0,72747
	Resíduos	15	7,93816	-2,33126	0,52921	
Modelo 3	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,447529		
	Média	1	50,00292	-0,0317526		F=16,69237
	Total (corrigido)	19	42,79628			r²=0,81656
	Regressão	4	34,94562	0,0200587	8,73641	S=0,72345
	Resíduos	15	7,85066	-2,81083	0,52338	
Modelo 4	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,0257657		
	Média	1	50,00292	-0,0294745		F=16,52509
	Total (corrigido)	19	42,79628			r²=0,81504
	Regressão	4	34,88085	0,0199625	8,72021	S=0,72643
	Resíduos	15	7,91543	-2,53547	0,5277	

Nota: probabilidade de significância F ≤0,0001
df- Graus de liberdade; SS- Soma dos quadrados; MS- Quadrado da média; F= Teste F de Fischer

Os resultados da análise estatística dos modelos são apresentados na Tabela 3. Todos os modelos possuem uma análise estatística bastante razoável e uma boa capacidade de previsão, visto que todos possuem r^2 superior a 0,8 e passaram na análise PRESS.

Os resíduos dos quatro modelos apresentam-se distribuídos aleatoriamente. Pode então inferir-se que os quatro modelos apresentados possuem solidez e validade.

Discussão e conclusão

O objetivo deste trabalho foi estabelecer relações estrutura-atividade com utilidade para o processo de desenvolvimento de compostos tricarbonilo de Re e Tc com afinidade para os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}. A estratégia utilizada foi a de utilizar propriedades moleculares estimadas por modelação computacional por permitirem a sua utilização em moléculas ainda não sintetizadas. Os modelos tomaram a forma de equações matemáticas e descrições de farmacóforos.

Na pesquisa bibliográfica efetuada, alguns autores apontam fatores importantes para o sucesso ou insucesso da ligação *in vivo* de uma molécula ao recetor. Este é o caso, por exemplo, do coeficiente partição octanol/água, importante para a afinidade, mas também para a possibilidade dos compostos atravessarem a BHE (Johannsen & Pietzsch, 2002). A facilidade de efetuar ligações de hidrogénio foi também relacionada com a afinidade para o recetor podendo contribuir positiva ou negativamente segundo os autores (Johannsen & Pietzsch, 2002). Outros fatores como tamanho da molécula (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005) e conformação dos anéis são também referidos por outros autores como tendo impacto sobre a afinidade e seletividade (Gastone & Bertolasi, 1979; Huff *et al.*, 1985; Kuipers *et al.*, 1995).

Apesar de existirem estudos estrutura-atividade para os receptores 5HT_{1A}, efetuados com compostos orgânicos, não existem estudos que se dediquem

especificamente a compostos organometálicos. Assim, o objetivo do trabalho apresentado consistiu efetivamente em tentar realizar estudos de estrutura/atividade para os complexos organometálicos de Tc(I) e Re(I) com afinidade para os recetores $5HT_{1A}$. Dada a potencial importância destes compostos para a imagiologia médica foi considerado que o estabelecimento de relações QSAR poderiam ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas moléculas para este fim, tanto ao nível dos compostos a sintetizar como, muitas vezes mais importante, definindo os caminhos que não se devem seguir.

Tendo em conta a variedade de propriedades moleculares incluídas nos estudos (mais de 200) considera-se muito relevante que os modelos desenvolvidos tenham convergido em apenas 4, todas com relevância tendo em conta as interações moleculares que se sabe estarem em jogo.

Nos nossos modelos verificou-se que a variável comprimento do espaçador aparece sob a forma de uma função quadrática. Este tipo de variação significa que a afinidade aumenta com o aumento da cadeia alquílica entre o centro metálico e o farmacóforo do complexo. Mas esta correlação só se verifica até um certo ponto. Ultrapassado este ponto a afinidade diminui. Devemos referir que este efeito já tinha sido constatado experimentalmente (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005; Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999).

Os modelos incluem ainda o fator número de grupos funcionais, que aparece como uma função linear. Este facto leva a concluir que um complexo com um ligando bifuncional tem uma afinidade superior a um complexo idêntico que possua apenas um ligando funcional.

Assim, aquando da síntese de complexo tricarbonilo de Re e ^{99m}Tc com afinidade para os recetores $5-HT_{1A}$ da serotonina deve ter-se em conta:

- A distância entre o centro metálico e o segundo átomo de azoto do farmacóforo. Esta distância não se deve encontrar no intervalo 6,5 – 11 Å.
- O valor do coeficiente de partição octanol/água. Este valor deve estar no intervalo 2 – 4,5.



- A capacidade do complexo efetuar ligações de hidrogénio de Hansen. Este deve estar incluída no intervalo 7 – 10.
- A vantagem em utilizar ligandos bifuncionais.

Seria efetivamente muito interessante que se obtivessem novos dados experimentais que permitissem validar os modelos desenvolvidos. Seria também muito interessante alargar os modelos a outros parâmetros, nomeadamente ao comportamento in vivo dos radiofármacos, tanto a nível da farmacocinética como da farmacodinâmica.

Referências

- Adham N., Kao H-T., Schechter, L.E., Bard, J., Olsen, M., Urquhart, D., Durkin, M., Hartig, P.R., Weinshank, R.L., and Branchek, T.A. (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): A fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Neurobiology*. 90, 408-412.
- Amlaiky, N., Ramboz, S., Boschert, U., Plassat, J-L & Hen, R. (1992). Isolation of a Mouse “5HT_{1E}-like” Serotonin Receptor Expressed Predominantly in Hippocampus. *Journal of biological chemistry*. 267(28), 19761-19764.
- Bowen, D.M., Najlerahim, A., Procter, A.W., Francis, P.T. & Murphy, E. (1989) Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(23), 9504-8.
- Caliendo, G., Santagada, V., Perissutti, E., Fiorino, F. (2005). Derivatives as 5HT_{1A} receptor ligands--past and present. *Current Medicinal Chemistry*. 12(15), 1721-53.
- Dyott, T.M., Stuper, A.J. & Zander, G.S. (1980) MOLY-an interactive system for molecular anlysis. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 20, 28-35.
- Gastone, G. and Bertolasi, V. (1979) Crystal and molecular structures of 2,6-cis-dimethylpiperidyl-N-phenylacetamidine and 2,6-cis-dimethylpiperidyl-N-phenyl-2,2-dimethylpropionamidine. An x-ray crystallographic investigation of the C(sp²)-N(piperidyl) bond. *Journal of the American Chemical Society*. 101(26), 7704 - 7711.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. and Humphrey, P.P.(1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5- hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*. 46(6), 157-203.



- Huff, J.R., King, S.W., Saari, W.S., Springer, J.P., Martin, G.E. & Williams, M. (1985) Bioactive conformation of 1-arylpiperazines at central serotonin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 28(7), 945-948.
- Johannsen, B. & Pietzsch, H.-J. (2002). Development of technetium-99m-based CNS receptor ligands: have there been any advances?. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 29(2), 263-275.
- Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J. & Caron, M.G. (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*. 329(6134), 75-9.
- Kuipers, W., van Wijngaarden, I., Kruse, C.G., van Amstel, M. ter H., Tulp, M. Th. M. and IJzerman, A.P. (1995). N4-Unsubstituted N1-Arylpiperazines as High-Affinity 5-HT_{1A} Receptor Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38(11), 1942-1954.
- Lopez-Rodriguez, M.L., Ayala, D., Benhamu, B., Morcillo, M.J. & Viso, A. (2002), Arylpiperazine derivatives acting at 5-HT_{1A} receptors. *Current Medicinal Chemistry*. 9(4), 443-69.
- Lopez-Rodriguez, M.L., Morcillo, M.J., Rovat, T.K., Fernandez, E., Vicente, B., Sanz, A. M., Hernandez, M. & Orensanz, L. (1999). Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 4. 1-[omega-(4-Arylpiperazin-1-yl)alkyl]-3-(diphenylmethylene) - 2, 5-pyrrolidinediones and -3-(9H-fluoren-9-ylidene)-2, 5-pyrrolidinediones: study of the steric requirements of the terminal amide fragment on 5-HT_{1A} affinity/selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42(1), 36-49.
- Mohammadi, F., Richards, N.G.J., Guida, W.C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. & Still, W.C. (1990). MacroModel - An Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics. *Journal of Computational Chemistry*. 11, 440-467.

- Oh, S.J., Ha, H.J., Chi, D.Y. & Lee, H.K.. (2001). Serotonin receptor and transporter ligands - current status. *Current Medicinal Chemistry*. 8(9), 999-1034.
- Olivier, B., Soudijn, W., van Wijngaarden, I. (1999). The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Progress in Drug Research*. 52, 103-65.
- Patrick, G.L.(2005), *An introduction to Medicinal Chemistry*. New York, NY: Oxford University Press.
- Pessoa-Mahana, H., Araya-Maturana, R., Saitz, C.B. and Pessoa-Mahana, D.C., (2003). A synthetic overview of new molecules with 5-HT_{1A} *binding affinities*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 3(2), 77-93.
- Sodhi, M.S & Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *International Review of Neurobiology*. 59, 111-74.



Como o cérebro processa a informação
semântica em indivíduos com e sem
Perturbações do Processamento Auditivo
(Central): da investigação ao ensino e à
prática clínica

Carla Matos Silva, Maria Armanda Costa
& Isabel Barahona da Fonseca

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
165 a 187

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Carla Matos **Silva**

Licenciada em Audiologia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra (ESTeSC) e Mestre em Bioética pela Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Doutoranda em Ciência Cognitiva na Universidade de Lisboa. Professora - Adjunta na ESTeSC e Diretora do Departamento de Audiologia. Do seu currículo destacam-se várias apresentações de trabalhos em congressos nacionais e internacionais, assim como publicações em revistas nacionais e internacionais.

Maria Armada **Costa**

Professora Auxiliar na Faculdade de Letras da Universidade de Lisboa. Investigadora do Centro de Linguística da Universidade de Lisboa (CLUL).

Isabel Barahona da **Fonseca**

Professora Auxiliar na Faculdade de Letras da Universidade de Lisboa. Investigadora do Centro de Linguística da Universidade de Lisboa (CLUL).



**Como o cérebro processa a informação
semântica em indivíduos com e sem
Perturbações do Processamento Auditivo
(Central): da investigação ao ensino e à
prática clínica**

Carla Matos Silva, Maria Armanda Costa
& Isabel Barahona da Fonseca

A linguagem é por excelência um meio de conhecimento que se encontra em estreita relação com a vivência imediata de cada ser humano com o meio envolvente.

O processamento da palavra implica a ativação de redes semânticas nas quais as palavras, representadas por itens lexicais, criam campos conceptuais (Geeraerts, 2010), sendo que os processos de categorização semântica ocorrem criando maiores ou menores relações de proximidade entre os itens lexicais (Mahon & Caramazza, 2009). Verifica-se que a precisão da resposta e o tempo de reação numa tarefa de decisão lexical melhoram sempre que a palavra alvo é precedida por uma palavra semanticamente relacionada em oposição a um item independente ou desviante (Kutas, & Iragui, 1998).

As teorias sobre o acesso lexical pretendem teorizar como é que o sinal da fala dá acesso a representações num léxico mental (itens armazenados em memória) sendo depois reconhecido como identidade da língua. A fala, que se inicia com a ativação de capacidades perceptoras por um dado estímulo (*input*) e que se espera que culmine no seu reconhecimento, como uma entidade linguística com sentido (*output*), hipoteticamente configurada numa representação mental armazenada em memória. O processo culmina com a identificação do estímulo, ou seja, a sua correspondência com a representação mentalmente ativada (Aitchison, 2002).

Os *Event Related Potentials* (ERPs) refletem o efeito dos estímulos nos sinais EEG, depois de identificados pelos métodos de análise (melhoria da relação sinal/ruído) e correspondem ao efeito conjunto dos potenciais pós-sinápticos de um grande conjunto de neurónios sincronicamente ativos. São um indicador de processamento que tem uma resolução temporal muito elevada, na ordem dos milissegundos. Concentrámo-nos num particular efeito ERP, denominado N400.

O termo N400 é usado como um rótulo heurístico para a atividade cerebral relacionada a estímulo, cujo início ocorre por volta dos 200-600 ms da janela pós-estímulo, com uma morfologia e topografia características e, fundamentalmente, um padrão de sensibilidade em relação a variáveis experimentais (Kutas & Federmeier, 2010). Este ERP negativo surge entre os 250 e 550ms, com um pico máximo nos 400ms e é influenciado pelo processamento de informação semântica. Quanto mais fácil for a adequação entre o significado de uma palavra de conteúdo específico e a especificação semântica do contexto, menor será a amplitude N400 (Hagoort, Hald, Bastiaansen, & Petersson, 2004). Esta visão também pode explicar a constatação de que terminações anómalas, menos esperadas, produzem respostas N400 maiores do que as terminações mais esperadas (sugere-se que a integração é mais difícil quando as expectativas não são cumpridas do que quando são cumpridas) e explica que o priming semântico produza efeitos N400.

Brown & Hagoort (1993) sugerem que a amplitude N400 é um índice de processos de integração semântica da palavra atual no contexto do discurso construído tendo por base as palavras anteriores. Neste ponto de vista, o aumento da amplitude do N400 reflete o aumento da dificuldade de integração da palavra fundamental no contexto da frase anterior. Como alternativa, a amplitude do N400 classifica processos associados com a ativação e recuperação lexical básica (Kutas & Federmeier, 2000). Neste ponto de vista, as amplitudes reduzidas refletem acesso facilitado à informação lexical quando o contexto da palavra ou frase pode pré-ativar os aspetos da representação da palavra fundamental, onde também será considerado o conhecimento do mundo.



O N400 é amplamente descrito como uma consequência do aumento da dificuldade de acesso da informação lexical armazenada em decorrência da anomalia semântica (Osterhout & Holcomb 1995; Lau, Almeida, Hines, & Poeppel, 2009), sendo um dos indicadores eletrofisiológicos cerebrais (ERPs) mais utilizados para o estudo dos processos semânticos e cognitivos envolvidos no acesso e na integração semântica. A utilização de testes psicofisiológicos para evocar componentes cognitivos de ERPs foi implementada e estudada numa série de línguas, no estudo da memória (Marchand, Lefebvre, & Connolly, 2006) e no âmbito da ciência forense (Lefebvre, Marchand, Smith, & Connolly, 2007).

Os ERPs, do ponto de vista dos geradores intracranianos, correspondem à atividade de determinadas regiões neocorticais, onde o sinal provoca uma excitação dos neurónios piramidais no espaço extracelular resultando numa negatividade na região apical das dendrites e num potencial positivo na área do soma. A diferença de voltagem com fluxos iónicos entre os dois polos aproxima-se a um dipolo. O ERP é construído pela somação de dipolos, que transportam uma orientação cortical semelhante e uma atividade sincronizada (Luck, 2005).

As perturbações do processamento auditivo (central) (PPAC) são entendidas como uma perda auditiva funcional em que o indivíduo fica incapacitado de cumprir uma ou mais capacidades do processamento auditivo (central) (PAC), (Musiek & Chermak, 2007; Katz, Chasin, English, Hood, & Tillery, 2014), residindo a maior parte das queixas na dificuldade de compreensão do discurso principalmente em ambientes de escuta difícil com degradação do sinal e/ou ruído competitivo (Schochat, 1997; ASHA, 2005). Baran & Musiek (2001) consideraram que a utilização de uma bateria de testes na avaliação do PAC, constituída por testes audiológicos comportamentais e eletrofisiológicos, não só é prudente como é necessária. Tanto quanto sabemos não existem trabalhos acerca da utilização do N400 para avaliar o PAC, ainda que seja um marcador eletrofisiológico da integração semântica, exatamente onde residem grande parte das queixas dos indivíduos com Perturbações do Processamento Auditivo. Assim, o presente estudo tem como objetivo perceber os aspetos de violação de propriedades do campo semântico, criando

condições de congruência/incongruência, por via auditiva, em indivíduos com e sem Perturbações do Processamento Auditivo Central, utilizando para o efeito testes comportamentais e eletrofisiológicos. Pretende-se, de igual modo, aplicar no ensino e na prática clínica o conhecimento adquirido no âmbito desta investigação.

Metodologia

A presente investigação foi constituída por um estudo comportamental e um estudo eletrofisiológico. No estudo comportamental, registaram-se os tempos de reação (TR) e a precisão de resposta, enquanto no estudo eletrofisiológico registou-se a polaridade da forma de onda, a sua amplitude e respetivo tempo de latência.

A amostra do estudo comportamental foi constituída por 34 jovens (25 do sexo feminino e 9 do sexo masculino), com idade média de $22 \pm 2,2$ anos. Para o estudo eletrofisiológico, a amostra foi constituída por 18 jovens (17 do sexo feminino e 1 do sexo masculino), com idade média de $20,1 \text{ anos} \pm (1,1)$, e com habilitação académica mínima o 12º ano. As condições de inclusão dos sujeitos no estudo foram as seguintes:

- Língua materna – Português Europeu;
- Sem alterações otológicas;
- Sem queixas de hipoacusia;
- Sem diagnóstico de perturbações do processamento auditivo (central);
- Sem queixas ou diagnóstico de patologia neurológica;
- Sem queixas ou diagnóstico de patologia do foro psiquiátrico.
- Livres do consumo de medicação neurológica, psiquiátrica, ou outra que possa interferir com a capacidade de reação.

A amostra foi composta, ainda, por um grupo de três sujeitos com diagnóstico confirmado de perturbações do processamento auditivo (central), dois do sexo feminino e um do sexo masculino com idade média de 20 anos (± 1), cuja



habilitação académica era o 12º ano. Dado tratar-se de um reduzido número de com PPAC, não se realizou estatística inferencial, optando-se por uma análise exploratória do tipo estudo de caso.

Hipóteses

Atendendo a que a condição de incongruência numa série de quatro palavras, criada pela ocorrência de uma palavra desviante relativamente ao campo semântico principal, vai criar efeitos de maior dificuldade de integração da informação linguística:

H1: espera-se que nos testes comportamentais haja um aumento dos TR nas palavras incongruentes comparativamente às palavras congruentes nos indivíduos com e sem PPAC.

H2: espera-se que nos testes eletrofisiológicos se desencadeie uma onda típica da incongruência semântica – N400 nos indivíduos com e sem PPAC.

Depois de salvaguardadas as questões éticas, designadamente a autorização do estudo por parte de uma comissão de ética, assim como a obtenção do termo de consentimento informado livre e esclarecido de todos os participantes, os indivíduos foram submetidos a uma avaliação da audição periférica e central, que incluiu: otoscopia, timpanograma, pesquisa de reflexos estapédicos ipsi e contra-laterais, audiometria tonal simples, cálculo do *Speech reception threshold* (SRT), determinação da percentagem de discriminação vocal a 40dB, *Staggered Spondaic Word Test* (SSW), *Gap in Noise* (GIN) e teste de fala no ruído. Na tabela seguinte podemos analisar os resultados obtidos pelos indivíduos com PPAC nos testes comportamentais utilizados no estudo do processamento auditivo (central). Os restantes indivíduos apresentaram resultados normais nos referidos testes.



Tabela 1. Resultados dos testes de Processamento Auditivo (Central) dos indivíduos com PPAC

Teste	Sujeito A	Sujeito B	Sujeito C	Referencia	Autor
SSW	99,37%	95,62%	93,12%	97,5%	(Katz, 1963) (Martins, 2008)
GIN	OD - 5ms OE - 6ms	OD - 6ms OE - 7ms	OD - 6ms OE - 5ms	OD - 5,49 OE - 5,34	(Martins, 2013)
Fala Filtrada	OD - 50% OE - 57,5%	OD - 42,5% OE - 52,5%	OD - 65% OE - 80%	>77% >78%	(Martins, 2013) (Bellis, 2000)

Num segundo momento da recolha de dados foram realizados testes comportamentais e de ERPs aos respetivos grupos (amostras distintas), sendo os participantes instruídos quanto à natureza e procedimento da experiência. A experiência consistiu em ouvir séries de 4 palavras, em que 3 denotam entidades pertencentes a um campo lexical principal (objetos, frutos, animais) e um quarto item, desviante, pertencente a um outro campo semântico (profissões, peixes, flores), num total de 360 palavras. Foram considerados os seguintes aspetos relativamente à construção dos estímulos para as duas condições experimentais (congruência *versus* incongruência): frequência dos itens na língua, comprimento da palavra (carateres e número de sílabas) e propriedades léxico-semânticas (animado *versus* inanimado). A palavra alvo podia surgir na terceira ou quarta posição (Tabela 2). Posteriormente procedeu-se à gravação dos estímulos, utilizando estratégias para controlar a entoação.

Tabela 2. Exemplos dos estímulos linguísticos utilizados

Campo semântico frutos: <i>pera / maçã / truta / manga; romã / kiwi/ melão / solha</i>
Campo semântico animais: <i>grilo/ corvo / chorão/ mocho; aranha /cigarra / barata /papoila</i>
Campo semântico objetos: <i>gaveta / espelho / bombeiro / relógio; portão / tacho/ colchão / pintor</i>

No estudo comportamental, os sujeitos tinham de decidir sobre a aceitabilidade palavra numa tarefa de decisão de aceitação da congruência relativamente ao campo semântico dominante. Foram registados os tempos de reação (TR) e a precisão das respostas (percentagem de acertos). Os estímulos foram apresentados por auscultadores marca Sennheiser modelo HD 201 a uma

intensidade aproximada de 65dB.

Relativamente ao estudo eletrofisiológico, procedeu-se ao registo do EEG, montagem referencial (mastóide esquerda) com eléctrodos, limpeza do couro cabeludo com álcool e creme abrasivo e posterior colocação dos eléctrodos de cloreto de prata, colocados nas seguintes derivações: F3; P3; T3; T5; F4; P4; T4; T6 e Cz (Sistema Internacional 10/20). Foi ainda utilizado um eléctrodo terra que foi colocado na fronte. Dado o número de canais possíveis ser limitado a nove, optamos pelas derivações acima referidas seguindo as guidelines propostas por Duncan, Barry, Connolly, Fischer, & Michie, (2009).

Ainda antes do início da experiência propriamente dita, foram apresentadas instruções no monitor informando novamente cada participante sobre o procedimento e a tarefa a executar, nomeadamente a atenção aos estímulos: ao longo da experiência foram realizadas tarefas de controlo de atenção relativamente aos estímulos ouvidos. Nesta fase de recolha foi utilizado um equipamento de eletroencefalograma (EEG) com as seguintes características:

- ganho de amplificação do sinal de EEG de 20.000;
- amplitude de 1microvolt;
- frequência de amostragem de 200Hz;
- filtro passa-banda entre 0,1 e 35Hz.

A apresentação dos estímulos foi por via auditiva, pelo que após a colocação dos eléctrodos procedemos à colocação dos auscultadores convencionais de marca Sennheiser, modelo HD 201, sendo a estimulação realizada simultaneamente em ambos os ouvidos, a uma intensidade de 65dB aproximadamente. Garantidas as boas condições de registo e a boa compreensão pelos participantes da natureza da tarefa, iniciou-se a fase experimental, utilizando-se dois computadores, um que serviu de suporte ao programa *Super Lab*, versão 4.0, e o outro para o registo da atividade de EEG. Dada a duração da experiência foram realizadas várias pausas durante as quais realizamos tarefas de controlo de atenção, para compreender se os participantes estavam atentos aos estímulos linguísticos ouvidos.

Após a experiência, os sinais EEG, foram visualmente inspecionados tendo sido rejeitados os que continham artefactos. Foram depois submetidos a *averaging* síncrono com a apresentação do estímulo e regressão à média dos 200 ms do período pré-estímulo (baseline). Esta análise foi realizada em separado para cada sujeito, derivação e categoria do estímulo.

Resultados

Estudo comportamental

Os indivíduos sem PPAC apresentaram 85,7% de respostas corretas, sendo mais rápidos para os itens congruentes comparativamente aos itens incongruentes com uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as respostas corretas versus incorretas com $F(1;6016) = 93,251$ com $P = ,000$ para os itens congruentes e $F(1;2004) = 18,034$ com $P = ,000$ para os itens incongruentes. Verificou-se ainda uma diferença estatisticamente significativa entre os itens congruentes versus incongruentes das respostas corretas com $F(1;6877) = 34,938$ com $P = ,000$, o mesmo não se verificou quando comparamos os itens congruentes com os incongruentes para as respostas incorretas onde o valor de P foi de 0,098.

Tabela 3. *Precisão da resposta e tempo de reação dos indivíduos sem PPAC para os itens congruentes e incongruentes*

	Correta		Incorreta		P (corretas/ incorretas)
	Tempo de Reação (ms)	N (%)	Tempo de Reação (ms)	N (%)	
Congruente	558,43 ± 302,76	5145 (64,1%)	669,49 ± 374,62	873 (10,9%)	,000
Incongruente	610,69 ± 360,75	1734 (21,6%)	715,94 ± 485,60	272 (3,4%)	
P (cong/incong)	,000		0,098		,000

Na tabela 4 verificamos que, à semelhança dos indivíduos sem PPAC, também os indivíduos com PPAC apresentam uma elevada percentagem de respostas

corretas (92,8%). No entanto, apresentam um perfil de resposta oposto aos indivíduos sem PPAC, ou seja apresentam tempos de reação mais rápidos para os itens incongruentes.

Tabela 4. Precisão da resposta e tempo de reação dos indivíduos com PPAC para os itens congruentes e incongruentes

	Correta		Incorreta	
	Tempo de Reação (ms)	N (%)	Tempo de Reação (ms)	N (%)
Congruente	653,64 ± 371,04	498 (70,3%)	954,63 ± 461,48	32 (4,5%)
Incongruente	611,54 ± 288,99	159 (22,5%)	650,11 ± 211,74	19 (2,7%)

Estudo eletrofisiológico

Os resultados da amplitude da forma de onda dos registos eletrofisiológicos, no paradigma da violação de aspetos semânticos em séries de palavras, dos indivíduos sem PPAC revelaram uma amplitude negativa maior nas derivações do hemisfério esquerdo. Obteve-se uma forma de onda de polaridade negativa, com latências na ordem dos 400ms, significativamente mais negativa para as palavras incongruentes do que para as congruentes, ou seja, conseguimos desencadear o efeito N400 nos canais de registo F3, T3, T5, Cz e T4 como podemos constatar da análise da figura 1.

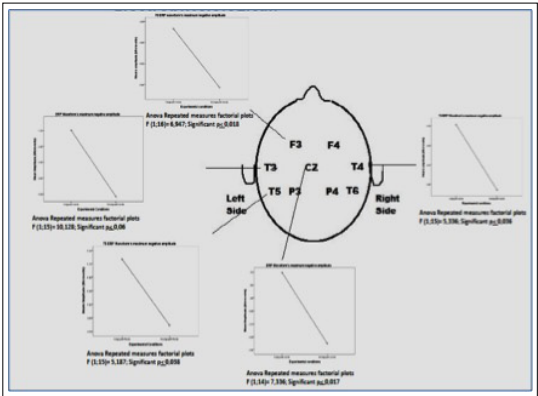


Figura 1. Resultados dos ERP's nos indivíduos sem PPAC

Nos indivíduos com PPAC, os resultados eletrofisiológicos revelaram que os itens incongruentes desencadeiam uma forma de onda positiva em F3, P3, T3, T5, F4 e P4 cuja latência varia dos 375ms aos 555ms, como se pode constatar nas tabelas 5 e 6, não sendo esta forma de registo compatível com o efeito N400.

Tabela 5. Valores das amplitudes e latências das derivações de EEG F3, P3, T3 e T5 dos sujeitos com PPAC. O sinal + corresponde à forma de onda positiva e o sinal – à forma de onda negativa

F3	Congruente Amplitude +	9,22 ±10,65
	Congruente Latência+	491,66 ±96,99
	Incongruente Amplitude+	16,99 ±9,47
	Incongruente Latência+	495 ±79
	Congruente Amplitude-	-15,72 ±24,78
	Congruente Latência-	386,66 ±76,86
	Incongruente Amplitude-	-7,74 ±20,26
	Incongruente Latência-	426,66 ±70,94
P3	Congruente Amplitude +	3,64 ± 1,244
	Congruente Latência+	536,66 ± 148,352
	Incongruente Amplitude+	13,62 ± 8,469
	Incongruente Latência+	496,66 ± 74,218
	Congruente Amplitude-	-3,14 ± 2,064
	Congruente Latência-	470 ± 162,634
	Incongruente Amplitude-	-4,91 ± 18,109
	Incongruente Latência-	435 ± 91,923
T3	Congruente Amplitude +	,19 ± 2,234
	Congruente Latência+	495 ± 113,137
	Incongruente Amplitude+	7,92 ± 2,283
	Incongruente Latência+	552,50 ± 31,819
	Congruente Amplitude-	-3,56 ± 2,800
	Congruente Latência-	500 ± 42,426
	Incongruente Amplitude-	1,21 ± 1,145
	Incongruente Latência-	495 ± 197,989
T5	Congruente Amplitude +	4,3 ± 5,485
	Congruente Latência+	488,33 ± 96,090
	Incongruente Amplitude+	6,53 ± 5,593
	Incongruente Latência+	493,33 ± 101,283
	Congruente Amplitude-	,91 ± 1,118
	Congruente Latência-	418,33 ± 107,741
	Incongruente Amplitude-	-1,31 ± 1,235
	Incongruente Latência-	518,33 ± 105,396

Tabela 6. Valores das amplitudes e latências das derivações de EEG F4, P4, T4 e T6 dos sujeitos com PPAC. O sinal + corresponde à forma de onda positiva e o sinal – à forma de onda negativa

F4	Congruente Amplitude +	1,45 ± ,949
	Congruente Latência+	460 ± 157,400
	Incongruente Amplitude+	4,92 ± 2,398
	Incongruente Latência+	555 ± 52,678
	Congruente Amplitude-	-,80 ± ,455
	Congruente Latência-	375 ± 99,624
	Incongruente Amplitude-	,57 ± 2,146
	Incongruente Latência-	398,33 ± 93,585
P4	Congruente Amplitude +	3,52 ± 2,210
	Congruente Latência+	503,33 ± 94,383
	Incongruente Amplitude+	5,70 ± 5,57
	Incongruente Latência+	405 ± 163,935
	Congruente Amplitude-	-3,47 ± 3,059
	Congruente Latência-	400 ± 91,787
	Incongruente Amplitude-	-3,72 ± 3,616
	Incongruente Latência-	408,33 ± 40,414
T4	Congruente Amplitude +	5,97 ± 3,930
	Congruente Latência+	513,33 ± 14,433
	Incongruente Amplitude+	5,02 ± 3,778
	Incongruente Latência+	496,66 ± 62,516
	Congruente Amplitude-	-,89 ± ,512
	Congruente Latência-	433,33 ± 100,166
	Incongruente Amplitude-	-4,01 ± 1,298
	Incongruente Latência-	398,33 ± 115,902
T6	Congruente Amplitude +	-----
	Congruente Latência+	-----
	Incongruente Amplitude+	-----
	Incongruente Latência+	-----
	Congruente Amplitude-	-----
	Congruente Latência-	-----
	Incongruente Amplitude-	-----
	Incongruente Latência-	-----

Do ponto de vista estritamente do processamento do sinal, as formas de ERPs foram obtidas pelo *averaging* anteriormente descrito. Com vista à apresentação visual das formas de onda dos ERPs computamos a média entre todos os sujeitos por condição experimental, que designamos por *grande média*.

Como pode ser observado, os ERPs grande média dos canais de registo frontal anterior esquerdo (F3), temporal anterior esquerdo (T3), temporal posterior esquerdo (T5), vértex (Cz) e temporal anterior direito (T4) ilustram a resposta eletrofisiológica obtida nos indivíduos sem PPAC, que é mais negativa nos estímulos incongruentes e sugestiva de um N400 (Figuras 2, 4, 6, 8 e 10). A grande média dos três sujeitos com PPAC (Figuras 3, 5, 7, 9 e 11) tem uma forma de onda distinta: obtêm-se ondas positivas tardias do tipo *Late Positive Potentials* (LPP), mais amplas para os estímulos incongruentes.

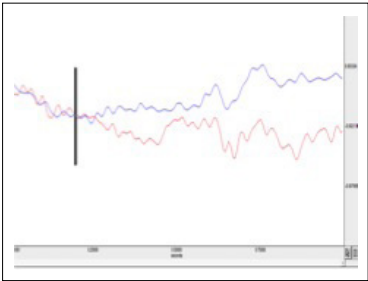


Figura 2 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal F3 dos indivíduos sem PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

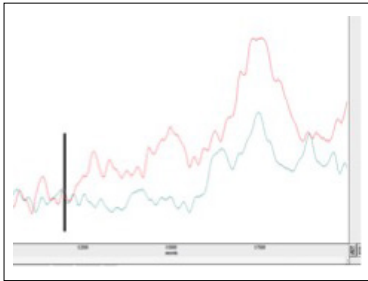


Figura 3 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal F3 dos indivíduos com PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes

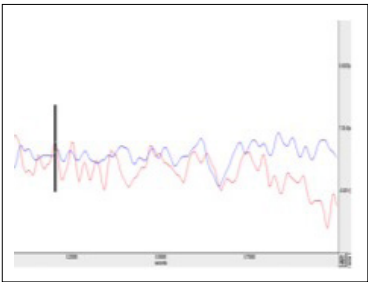


Figura 4 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T3 dos indivíduos sem PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

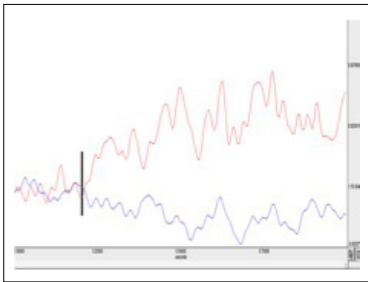


Figura 5 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T3 dos indivíduos com PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes

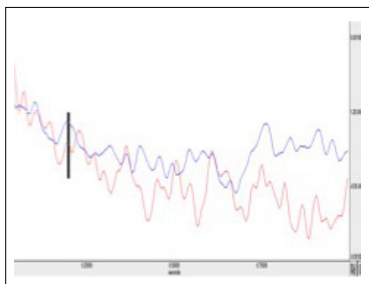


Figura 6 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T5 dos indivíduos sem PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

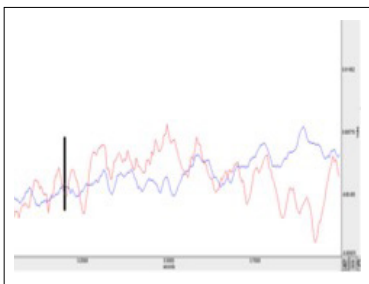


Figura 7 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T5 dos indivíduos com PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

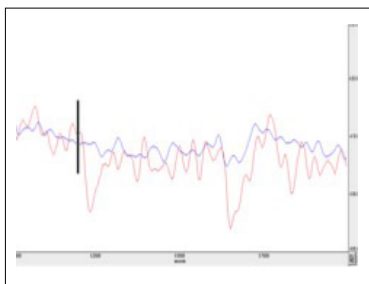


Figura 8 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal Cz dos indivíduos sem PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

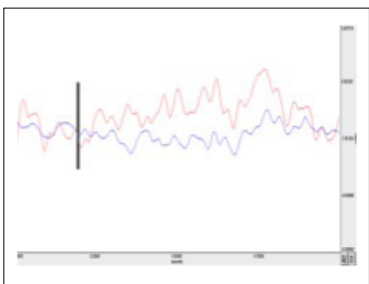


Figura 9 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal Cz dos indivíduos com PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

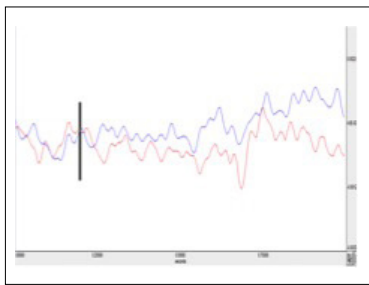


Figura 10 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T4 dos indivíduos sem PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

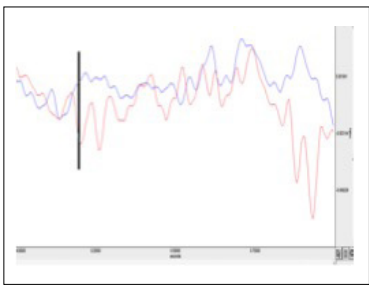


Figura 11 Forma de onda dos ERP's. Grande média para o canal T4 dos indivíduos com PPAC. Curva a azul referente aos itens congruentes e curva vermelha para os itens incongruentes.

Discussão

Os resultados do estudo comportamental revelaram que independentemente da condição de congruência, há tempos de reação mais elevados nos indivíduos com PPAC. Levando-se em conta as condições de congruência, os indivíduos com PPAC mostram um comportamento oposto ao outro grupo, ou seja apresentam tempos de reação mais altos para os itens lexicais congruentes. O maior tempo para a integração semântica de palavras relacionadas nos indivíduos com PPAC poderá aumentar o estado de atenção para detetar a incongruência semântica?

No que concerne ao estudo eletrofisiológico, nos indivíduos sem PPAC, as formas de onda dos ERPs correlacionadas com palavras incongruentes foram marcadas por uma maior negatividade com uma latência de aproximadamente 400ms - o N400. É para nós interessante a resposta ao ERP para a condição de incongruência de indivíduos com PPAC, que é marcada por uma positividade mais elevada na latência de 500ms (LPP). Estes resultados corroboram parte da hipótese inicialmente colocada, na medida em que se observou o efeito N400 nos indivíduos sem PPAC. Na mesma linha dos nossos resultados, Bentin, McCarthy, & Wood (1985) concluíram que quando uma palavra alvo é precedida por uma palavra semanticamente associada (sal - pimenta), a amplitude do N400 é menor do que quando uma palavra alvo é precedida por uma palavra não relacionada (carro - pimenta).

O significado das palavras assim como o conhecimento do mundo são recrutados e integrados muito rapidamente, numa janela de análise de cerca de 400ms, durante a compreensão dos estímulos linguísticos. Os nossos resultados sustentam a tese de que as terminações imprevisíveis mostram um N400 maior do que as terminações mais previsíveis, o que vai ao encontro dos trabalhos de Kutas & Hillyard (1984). O facto da palavra desviante/incongruente gerar uma forma de onda negativa (N400), com maior amplitude comparativamente às palavras que pertencem ao mesmo campo semântico (congruentes), sugere que a amplitude deste ERP é inversamente proporcional à probabilidade



de adequação (*cloze*) da palavra no contexto (Brown & Hagoort, 2004; Kutas & Federmeier, 2010).

Existem vários estudos sobre a aplicação do N400 em indivíduos com perturbações específicas da linguagem, em perturbações do espectro do autismo e em outro tipo de perturbações. Porém, relativamente às PPAC, apenas se encontram recomendações para o incluir na avaliação do processamento auditivo (central) (Katz, *et al.*, 2014).

No estudo do PAC é comumente utilizado um outro tipo de ERP – o P300 em detrimento do N400. Chiappa (1997) refere que a latência do P300 está diretamente relacionada com a velocidade de processamento da informação do indivíduo, ou seja, se o indivíduo apresentar um processamento de informação rápido, com um rápido reconhecimento do estímulo, menor será a latência. Pelo contrário, quanto mais complexa e exigente é a tarefa proposta ao indivíduo, maior será a latência. Nos indivíduos com PPAC, o P300 costuma estar ausente e quando está presente apresenta baixa amplitude e um tempo de latência mais aumentado (Chermak, Hall, & Musiek, 1999). Talvez estes resultados levem à exclusão do N400 na avaliação do processamento auditivo, no entanto estes dois tipos de ERPs refletem processos distintos e são desencadeados em diferentes paradigmas, diferentes estruturas anatómicas envolvidas e diferentes níveis de processamento linguístico.

No nosso estudo os sujeitos sem PPAC desencadearam um ERP compatível com o N400. Nos sujeitos com PPAC, apesar dos indicadores comportamentais indicarem que estes conseguem realizar tarefas de categorização semântica, não observamos o N400, mas uma forma de onda compatível com um LPP - o que sugere que o processo pelo qual ocorre a integração semântica é distinto do dos sujeitos sem PPAC.

É de notar um estudo de Pijnacker, Geurts, Van Lambalgen, Buitelaar, & Hagoort (2010) sobre o processamento semântico em adultos com perturbações do espectro do autismo. Os autores recorreram a frases congruentes e incongruentes sendo que os resultados apontam para ausência do efeito N400 e da negatividade

sustentada. No entanto, e contrariamente às expectativas os resultados mostraram um componente positivo tardio, que foi maior para as frases semanticamente incongruentes do que para as frases congruentes. Porque o contexto da frase teve um efeito modulador numa fase posterior, a integração semântica é talvez menos automática em indivíduos com perturbações do espectro do autismo, e presumivelmente são necessários processos mais elaborados para se chegar a uma interpretação da frase. Como comentamos acima, no nosso estudo este foi o perfil de resposta para o grupo de indivíduos com PPAC, usando as séries de palavras congruentes versus incongruentes como estímulo linguístico. Nos indivíduos com PPAC ao invés de um esperado N400 para os itens incongruentes, obtivemos ondas positivas tardias com amplitude mais elevada para os itens incongruentes.

Conclusão

Neste estudo foram comprovadas, em parte, as nossas hipóteses de investigação na medida em que conseguimos tempos de reação mais elevados para os itens incongruentes apenas nos indivíduos sem PPAC e conseguimos despoletar o efeito N400 nestes mesmos indivíduos nos canais F3, T3, T5, Cz e T4. Todavia, nos indivíduos com PPAC as palavras incongruentes apresentam tempos de reação mais rápidos (nos testes comportamentais) e desencadearam um ERP com uma forma de onda positiva mais ampla.

Se seguirmos a hipótese de que o N400 indexa a difusão da excitação pelas redes semânticas do cérebro (Halgren & Marinkovic, 1995), podemos pensar que estas redes são excitadas nos indivíduos sem PPAC, o que não se observa nos indivíduos com PPAC. Será que a integração da informação semântica, nos indivíduos com PPAC, implica processos distintos? E de que modo diferem estes processos de integração semântica nos indivíduos com PPAC? Quais as estruturas cerebrais implicadas no processamento semântico dos indivíduos com PPAC?

Integrando estes dados eletrofisiológicos com os resultados comportamentais,



relatados em Silva, Costa & Fonseca (2014), mostramos que embora ambos os grupos realizassem a tarefa semântica com precisão, os processos pelos quais alcançam o acesso são diferentes e apontam para a importância de incluir, na avaliação do processamento auditivo, o N400 como um marcador eletrofisiológico do processamento semântico.

São necessários mais estudos de processamento semântico em indivíduos com PPAC, no sentido de perceber se este perfil de resposta se mantém. É preciso determinar os mecanismos e/ou correlatos neurais envolvidos no processamento semântico dos indivíduos com PPAC, que certamente são diferentes dos indivíduos sem PPAC, e que podem estar na origem das queixas sentidas no que se refere à compreensão e discriminação da palavra em ambientes de escuta difícil ou com degradação do sinal (*input*).

Tanto quanto sabemos este é o primeiro estudo referente ao processamento semântico em português europeu e em sujeitos com PPAC, abrindo-se uma nova linha de investigação que deve ser refletida nos planos curriculares do curso de licenciatura em Audiologia para futura aplicação na prática clínica pelos alunos e por profissionais.

Referências

- Aitchison, J. (2002). *Words in the mind: introduction to the lexicon* (3 rd Ed.). Oxford, UK: Blackweel Publishing.
- Asha. (2005). *American Speech Language Hearing Association. (Central) Auditory Processing Disorders*. Retrieved Março 4, 2011, from www. URL:<http://www.asha.org/members/deskref-journals/deskref/default>.
- Baran, J. A., & Musiek, F. E. (2001). Avaliação comportamental do sistema nervoso auditivo central. In F E Musiek & W. F. Rintelmann (Eds.), *Prespectivas Atuais em Avaliação Auditiva* (pp. 371–410). São Paulo: Manole.
- Bellis, T. & B.eck, B. (2000, August 7). *Central Auditory Processing in Clinical Practice*. Retrieved Maio 13, 2015, from Audiology on line: <http://www.audiologyonline.com/articles/central-auditory-processing-in-clinical-1281>
- Bentin, S., McCarthy, G., & Wood, C. (1985). Event-related potentials, lexical decision and semantic priming. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 60 (4), 343-355.
- Brown, C., & Hagoort, P. (1993). The processing nature of the N400: evidence from masked priming. *Journal Cognition Neuroscience*, 5 (1), 34-44.
- Chermak, G., Hall, J., & Musiek, F. (1999). Differential Diagnosis and Management of Central Auditory Processing Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Audiol*, 10, 289-303.
- Chiappa, K. (1997). *Evoked Potentials in Clinical Medicine* (3rd Ed.). Lippincott - Raven Publishers.
- Duncan, C., Barry, R., Connolly, J., Fischer, C., & Michie, P. (2009). Event-related potentials in clinical research: Guidelines for eliciting, recording, and quantifying mismatch negativity, P300, and N400. *Clinical Neurophysiology*, 120 (11), 1883–1908.



- Friederici, A. (2002). Towards a neural basis of auditory sentence processing. *TRENDS in Cognitive Sciences*, 6 (2), 78-84
- Geeraerts, D. (2010). *Theories of Lexical Semantics*. New York: Oxford University Press.
- Hagoort, P., Hald, L., Bastiaansen, M., & Petersson, K. M. (2004). Integration of word meaning and world knowledge in language comprehension. *Science*, 304 (5669), 438-441.
- Hall, J. (2007). *New Handbook of Auditory Evoked Responses*. New York: Editora Person Education.
- Halgren E, Marinkovic K. (1995). Neurophysiological networks integrating human emotions. In: M. Gazzaniga (Ed.). *The cognitive neurosciences*. Cambridge: MIT Press.
- Katz, J., Basil, R. A., & Smith, J. M. (1963). Staggered Spondaic Word Test for Detecting Central Auditory Lesions. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 72 (4), 908-918.
- Katz, J., Chasin, M., English, K., Hood, L., & Tillerry, K. (2014). *Handbook of Clinical Audiology* (7th Ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Kutas, M., & Hillyard, S. (1980). Reading senseless: brain potentials reflect semantic incongruity. *Science*, 207 (4427), 203-205.
- Kutas, M., & Federmeier, K. (2000). Electrophysiology reveals semantic memory use in language comprehension. *Trends in Cognitive Sciences*, 4 (12), 463-70.
- Kutas, M., & Federmeier, K. (2010). Thirty Years and Counting: Finding Meaning in the N400 Component of the Event-Related Brain Potencial (ERP). *Annual Review of Psychology*, 62, 14.1-14.27.
- Kutas, M., & Iragui, V. (1998). The N400 in a semantic categorization task across 6 decades. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 108, 456-471.

- Lau, E., Almeida, D., Hines, P., & Poeppel, D. (2009). A lexical basis for N400 context effects: Evidence from MEG. *Brain & Language*, 111 (3), 161-172.
- Lefebvre, C., Marchand, Y., Smith, S. M., & Connolly, J. F. (2007). Determining eyewitness identification accuracy using event-related brain potentials (ERPs). *Journal of Psychophysiology*, 44, 894-904.
- Luck, S. J. (2005). *An introduction to the event-related potential technique*. Cambridge: MIT Press.
- Mahon, B., & Caramazza, A. (2009). Concepts and Categories: A Cognitive Neuropsychological Perspective. *Annu. Rev. Psychol.*, 60 (1), 27-51.
- Marchand, Y., Lefebvre, C., & Connolly, J. F. (2006). Correlating digit span performance and event related potentials to assess working memory. *Journal of Psychophysiology*, 62, 280-289.
- Martins, J.; Teixeira, A., & Vieira, J. (2008). Testes de Avaliação do *Processamento Auditivo Central*. *Revista Clínica e Investigação em Otorrinolaringologia*, 2 (1), 1-7.
- Martins, J., Alves, M., Pereira, C., & Teixeira, A. (2013). Bateria de Testes de *Processamento Auditivo Central - Dados Normativos para a População adulta - Dados Preliminares*. Porto: Poster apresentado no 60º Congresso Nacional da SPORL
- Musiek, F., & Chermak, G. (2007). *Handbook of (Central) Auditory Processing Disorder*. San Diego: Plural Publishing Inc.
- Osterhout, L., & Holcomb, P. (1995). Event-related potentials and language comprehension. In M. R. Coles (Eds.), *Electrophysiology of mind: event-related brain potentials and cognition* (171-215). New York: Oxford University Press.



- Pijnacker, J., Geurts, B., Van Lambalgen, M., Buitelaar, J., & Hagoort, P. (2010). Exceptions and anomalies: An ERP study on context sensitivity in autism. *Neuropsychologia*, 48, 2940–2951.
- Schochat, E. (1997). Sons Ambientais Competitivos (CES). In L. Pereira & E. Schochat (Eds.) *Processamento Auditivo Central - Manual de Avaliação*. São Paulo: Lovise.
- Silva C. M., Costa, A., & Fonseca, I. (2014). *Electrophysiological and behavioral correlates of semantic processing in subjects with and without auditory processing disorders*. Poster apresentado no HEaring Across the Lifespan (HEAL). Cernobbio. 5-7 June 2014.

Irradiação da linha celular de linfoma difuso de grandes células B em dose única: efeitos celulares e moleculares

Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk, Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves, Tiago Sales, Ricardo Teixeira, Rita Silva, Jéssica Estrela, Mafalda Laranjo, João Casalta-Lopes, Clara Rocha, Paulo César Simões, Ana Bela Sarmento, Maria Filomena Botelho & Manuel Santos Rosa

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
189 a 231

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Fernando **Mendes**

Doutor em Ciências da Saúde, ramo Tecnologias da Saúde pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2016), é Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (2010), licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública (2002) e bacharel em Análises Clínicas e Saúde Pública pela ESTeSC-Coimbra Health School. É Professor Adjunto no Politécnico de Coimbra, na ESTeSC-Coimbra Health School no Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais e coordenador do European Joint Master Degree in Biomedical Laboratory Sciences. Leciona no curso de Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais.

Cátia **Domingues**

É investigador integrado no CNC-IBILI e CIMAGO, grupo da imunoinflamação. Do seu currículo destacam-se várias apresentações de trabalhos em congressos nacionais e internacionais, é autor em um pedido de patente, tendo publicado diversos artigos em revistas e edições científicas. É General Secretary na European Association for Professions in Biomedical Laboratory Sciences e integra ainda o painel de avaliadores externos do ensino superior na Irlanda.

Susann **Schugk**

Employee at Norra Älvsborgs county hospital, Trollhättan/ Sweden since 2013, maj. Position as 2nd in charge at Hematology department since 2015 october. Initiated master program of Biomedical Laboratory science, 120 ECTS, University of Gothenburg/ Sweden since 2013. Master thesis "Effects of Ionizing Radiation on cell lines of Lung cancer and B-cell lymphoma." was fulfilled at the Faculty of Medicine, University of Coimbra and IBILI - Institute for Biomedical Imaging and Life Science, Coimbra. Advanced molecular biology and bioinformatics, 15 ECTS, University of Kristianstad. Applied statistics in health science, 7.5 ECTS, University of Kristianstad. Bachelor degree of 180 ECTS in Biomedical Laboratory science at University of Gothenburg, Sahlgrenska Academy in 2013.



Ana Margarida **Abrantes**

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Doutorada em Ciências da Saúde pela faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, mestre em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e licenciada em Medicina Nuclear pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto publicou até à data 64 artigos em revistas nacionais e internacionais com arbitragem científica. A atividade científica que desenvolve tem como principais áreas de investigação a biofísica, a radiação, a imagem molecular, o cancro e os modelos animais de doenças humanas.

Ana Cristina **Gonçalves**

Doutorada em Ciências da Saúde, ramo Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2016), é Mestre em Nutrição clínica pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2009), licenciado em Biologia Microbiana e Genética pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2004). Leciona no Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. É investigadora no CNC-IBILI (Grupo Biologia do cancro e terapias direccionadas) e CIMAGO (Grupo Cell Signalling, Clinics and Therapeutics in Cancer). É autora e co-autora de diversos artigos publicados em revistas internacionais e de várias apresentações em congressos nacionais e internacionais.

Tiago **Sales**

Licenciado em Bioquímica pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e Mestre em Bioquímica pela Universidade de Coimbra. Foi co-autor em vários artigos científicos e apresentou trabalhos em diversos congressos. Encontra-se neste momento a frequentar o Mestrado de Gestão da Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra. Frequentou também o curso de Competências Empreendedoras de Base tecnológica –CEBT Ibérico 2014. Venceu vários concursos de empreendedorismo como as duas versões do Bioempreende. Promotor do projeto pHControl que neste momento está em fase de pedido de patente provisório.



Ricardo **Teixo**

Licenciado em Bioquímica e Mestre em bioquímica pela Universidade de Coimbra, é atualmente doutorando do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra. Possui diversas publicações em revistas e edições científicas, bem como diversas comunicações em congressos internacionais e nacionais. Possui dois pedidos de patente, tendo também frequentado um curso de empreendedorismo de base tecnológica.

Rita **Silva**

Mestre em Engenharia Biomédica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (2012). Frequentou uma bolsa de Investigação em Neurociências no Domínio de Neurociências (NeRD) do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) em Braga, designada "The role of brain lipid metabolism in the modulation of chronic stress effects". Da bolsa de Investigação resultaram participações em meetings, apresentações de posters científicos e um artigo científico, "The impact of chronic stress on the rat brain lipidome" 2015, publicado na revista Molecular Psychiatry. Actualmente é consultora integrante da equipa de soluções de Billing da Celfocus, na Vodafone Turquia.

Jéssica **Estrela**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública pela ESTeSC - Coimbra Health School (2015). É técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública no Hospital Arcebispo João Crisóstomo - Cantanhede e no Grupo Beatriz Godinho. Do seu currículo destacam-se apresentações de posters científicos e várias publicações de artigos científicos em diversas revistas e edições científicas.

Mafalda **Laranjo**

Concluiu Biologia (BSc Hon) e Biologia Celular e Molecular (MSc) pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Obteve o grau de Doutor em Ciências da Saúde (pré-Bolonha), ramo Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em 2014. Desenvolve a sua actividade científica na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina desde 2007. Publicou 38 artigos em revistas especializadas e 136 trabalhos em



actas de eventos. Possui 142 itens de produção técnica. Co-orientou 3 dissertações de mestrado na área de Ciências da Saúde, além de ter orientado 1 trabalho de conclusão de curso de bach./ licenciatura . Recebeu 9 prémios e/ou homenagens. Entre 2009 e 2013 participou em 8 projectos de investigação, sendo que coordenou 1 destes. Actualmente participa em 4 projectos de investigação. Actua na área de Ciências Médicas com ênfase em Ciências da Saúde.

João **Casalta-Lopes**

Mestre em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, exerce funções como assistente hospitalar de Radioncologia no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. É ainda assistente convidado das unidades curriculares de Biofísica e Oncologia na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e de Oncologia e Estudo de Casos em Radioterapia na Escola Superior de Tecnologia da Saúde.

Clara **Rocha**

Doutoramento em Gestão – Ciência Aplicada à Decisão pela Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra (2012), Mestrado em Gestão da Informação nas Organizações pela Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra (2006), licenciatura em Matemática (ramo Investigação Operacional) realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (1994). É Professora Adjunta no Instituto Politécnico de Coimbra, na ESTeSC-Coimbra Health School no Departamento das Ciências Complementares. É investigadora no INESC Coimbra (Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores) desde 2005.

Paulo César **Simões**

Licenciatura em Engenharia Física (ramo de Instrumentação), pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), em Setembro de 1991. Mestrado em Física (área de Física Tecnológica), pelo Departamento de Física da FCTUC, em Maio de 1995. Título de Especialista em Física Médica na área de Radioterapia, emitido pelo Ministério da Saúde em 28 de fevereiro de 2014. Trabalha actualmente e desde janeiro de 2001 como Técnico Superior de Saúde – Ramo de Física Hospitalar, no Serviço de Radioterapia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Ana Bela **Sarmiento**

Formação académica e profissional: Licenciatura em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC) (1984); Doutoramento em Medicina, FMUC (2002); Especialidade de Hematologia Clínica (2004); Agregação em Hematologia, FMUC (2015) Actualmente é Professora Associada com Agregação de nomeação definitiva em regime de tenure, FMUC. Regente das Unidades Curriculares de Hematologia e de Biologia Molecular Aplicada do Mestrado Integrado em Medicina, FMUC. Professora da Unidade Curricular de Hematologia do Mestrado em Análises Clínicas, FFUC. Investigadora e Membro da comissão coordenadora do Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncobiologia (CIMAGO), FMUC; Investigador (membro integrado) do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC). IBILI (CNC.IBILI). Coordenadora dos cursos de Oncologia do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde da FMUC. Assistente Hospitalar de hematologia do CHUC

Maria Filomena **Botelho**

Médica, professora catedrática de Biofísica da Faculdade de Medicina da UC. Directora do Instituto de Biofísica/Biomatemática da FMUC e Responsável pelo Biotério do IBILI-Sub-Unidade 1 da FMUC e membro do ORBEA. Presidente da Comissão de Ética da Escola Superior de Enfermagem de Coimbra. Especialista em Medicina Nuclear e Competência em Patologia Experimental pela Ordem dos Médicos. Certificada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária como Investigador Coordenador para Experimentação Animal. Áreas de ensino: Biofísica, Dosimetria da Radiação, Radiobiologia e Modelos Animais de Doença Investigadora do consórcio CNC.IBILI e do CIMAGO. Principais áreas de investigação: Biofísica, Desenvolvimento de modelos animais de Doenças Humanas, Oncologia Molecular (da biologia molecular à imagem molecular), terapia fotodinâmica em modelos in vitro e in vivo, Radiofarmácia, Efeitos biológicos da radiação (modelos in vitro e in vivo). Orientação de alunos de mestrado, de doutoramento e bolseiros de pós-doutoramento tanto nacionais com estrangeiros. Actividades científicas: 180 artigos publicados em revistas científicas indexadas com factor de impacto, 6 capítulos de livros, 740 artigos publicados sob a forma de resumos em revistas nacionais e internacionais, 907 apresentações em congressos sob a forma de conferências,



comunicações orais e pósteres. Foi premiada, desde 1988, com 47 prémios, 24 dos quais nos últimos 5 anos.

Manuel Santos **Rosa**

Licenciou-se em Medicina, pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), em 1975, e doutorou-se pela mesma Faculdade em 1989 em Ciências Médicas, 3o Grupo de disciplinas, especialidade de Patologia Geral (Imunologia), por unanimidade, com distinção e louvor. Prestou provas para obtenção do Título de Agregado em Medicina do 3o Grupo, Subgrupo de Imunologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em 1999, tendo sido aprovado por unanimidade. É, desde 2004, Professor Catedrático do 4o Grupo de Disciplinas (Imunologia) e é Regente da Unidade Curricular de Imunologia do Mestrado Integrado em Medicina e colabora em vários mestrados e cursos de pós-graduação.

Exerceu cargos qualificados na Universidade de Coimbra (UC): Membro do Conselho Diretivo da FMUC e Vice-Presidente do Conselho Diretivo (1999-2009); Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (2009-2012); Diretor e Responsável do Centro, Instituto e Serviço de Imunologia da FMUC (2000-2015); Responsável pelo Laboratório e Plataforma de Citometria de Fluxo e Separação Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Membro da Comissão Científica do Programa de Doutoramento da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Coordenador Científico e pedagógico do programa de Saúde sem Fronteiras do Centro de Estudos Ibéricos (Universidades de Coimbra e Salamanca); Diretor da Biblioteca das Ciências da Saúde da UC (2012-2015).





Irradiação da linha celular de linfoma difuso de grandes células B em dose única: efeitos celulares e moleculares

Fernando Mendes, Cátia Domingues, Susann Schugk,
Ana Margarida Abrantes, Ana Cristina Gonçalves,
Tiago Sales, Ricardo Teixo, Rita Silva, Jéssica Estrela,
Mafalda Laranjo, João Casalta-Lopes, Clara Rocha,
Paulo César Simões, Ana Bela Sarmento,
Maria Filomena Botelho & Manuel Santos Rosa

O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é reconhecido como um grupo heterogêneo de doenças hematológicas malignas, que constituem coletivamente o tipo mais comum e agressivo de linfoma não-Hodgkin (LNH) (Ba, 2013; Mendes, Domingues, *et al.*, 2015). Esta patologia constitui cerca de 25% a 40% de todos os diagnósticos de LNH. Ao longo das últimas décadas, a incidência desta neoplasia tem vindo a aumentar cerca de 3% a 4% ao ano (Ba, 2013; Campo *et al.*, 2011; Morton *et al.*, 2006; Ng, 2007; Persky & Miller, 2009). No momento do diagnóstico, cerca de 25% a 50% dos doentes com LDGCB encontra-se nos estádios I ou II (Campo *et al.*, 2011; Ng, 2007; Persky & Miller, 2009; Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, 2008).

A radioterapia (RT), à semelhança de outros linfomas constituiu o único tratamento de base para doença localizada, e permite atingir elevadas taxas de resposta completa e sobrevivência livre de doença, a longo prazo, em 40% a 45% dos doentes (Hudson, Hudson, Maclennan, Anderson, & Linch, 1994; Kaminski, Coleman, Colby, Cox, & Rosenberg, 1986; Monfardini *et al.*, 1980; Nissen *et al.*, 1983).

Os LDGCB não especificados foram subdivididos, segundo perfis de expressão génica, em subtipo do centro germinativo de célula B, em subtipo de células

B ativadas, e em subtipo sem classificação. Este subtipo representa 15%, e parece dever-se a diferentes estádios de diferenciação linfóide (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002). A distinção molecular tem implicações no prognóstico, uma vez que o LDGCB, subtipo de células B ativadas apresenta, por norma, um pior resultado do que o LDGCB, do subtipo centro germinativo de célula B (Mendes, Domingues, *et al.*, 2015).

A RT continua a ser a primeira opção de tratamento, de acordo com o *Nacional Comprehensive Cancer Network*, para os doentes não elegíveis para quimioterapia (QT), devido à existência concomitante de patologias impeditivas ou para o caso de linfomas refratários (Horning *et al.*, 2004; Persky *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2010). Atualmente cerca de 80% a 90% dos doentes em estágio precoce de LDGCB, estádios I e II, permanecem livres da doença após o tratamento com R-CHOP e com RT de consolidação (Persky *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2010). A RT de consolidação após a QT contribui para a diminuição do risco de recidiva nos locais tratados. Várias evidências têm demonstrado que a RT de consolidação apresenta melhores resultados nos doentes em estágio inicial da doença (Ballonoff *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2007; Horning *et al.*, 2004; Martinelli *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 1998). No entanto, é particularmente eficaz na maior parte dos casos de patologia não amplamente disseminada (Mendes, Domingues, *et al.*, 2015). Contudo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação anticancerígena da RT, assim como as repercussões no sistema imune, não se encontram totalmente clarificados. Perante esta constatação constituiu objetivo deste trabalho a caracterização, do ponto de vista celular e molecular, dos efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante (RI) numa linha celular de LDGCB.

Materiais e Métodos

Cultura celular

A linha celular Farage é uma linha celular de LDGCB, estabelecida em 1990,



a partir de uma biópsia ganglionar de uma doente caucasiana. Estas células crescem em suspensão em meio de cultura RPMI complementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS do inglês, *fetal bovine serum*), 400 mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico (Ben-Bassat *et al.*, 1992).

Radiação ionizante

A irradiação das culturas celulares foi realizada no acelerador linear de raios X, descrito abaixo. Para a irradiação prepararam-se suspensões celulares das células Farage na densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL, no volume necessário para realizar todas as experiências pretendidas. As doses de radiação usadas foram de 0,5 Gy a 60 Gy. De forma a garantir uma irradiação reprodutível, fiável e com deposição homogênea de dose em todo o volume, recorreu-se a uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com dimensões e referências para o posicionamento gravadas em relevo e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear e para as quais se encontra certificada. Assim, foi possível garantir condições de posicionamento e de acondicionamento reprodutíveis, bem como a homogeneidade da dose depositada. A caixa de irradiação foi concebida e construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e foi realizado o estudo dosimétrico, através de imagens de tomografia computadorizada da mesma, equivalente ao efetuado aos doentes submetidos a tratamento por RT.

O acelerador linear utilizado para a irradiação foi um acelerador *Varian Clinac 600C* (Varian), com raios-X de energia de 4 MeV, utilizado na rotina clínica de tratamento de RT externa. O procedimento de irradiação foi realizado com o apoio de um engenheiro físico-médico e de um técnico de RT. Cada sessão de irradiação iniciou-se pela colocação da caixa de irradiação vazia sobre o tampo da mesa de tratamento e distribuição dos tubos *falcon* com as culturas celulares, preparados previamente, identificados para as diferentes doses de irradiação. Os tubos controlo foram mantidos fora da sala. As doses administradas

estão descritas na Tabela 1 Para cada sessão de irradiação o acelerador foi disponibilizado por cerca de 20 a 30 minutos, com período efetivo de feixe de 20 minutos.

Tabela 1. *Doses administradas às amostras, na caixa de irradiação. Unidades de motor (MU, do inglês monitor units; 1MU=0,022 Gy).*

Dose	0,5 Gy	5 Gy (2+3)	8 Gy (5+3)	12 Gy (8+4)	15 Gy (12+3)	30 Gy (15+15)
Lado direito	23 MU	133 MU	133 MU	178 MU	133 MU	669 MU
Lado esquerdo	23 MU	134 MU	134 MU	179 MU	134 MU	669 MU

Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico é um teste capaz de avaliar a capacidade de uma célula dar origem a uma colónia de células, pelo que permite determinar a sobrevivência celular e inferir acerca da viabilidade celular. Este ensaio permite-nos avaliar o resultado final da agressão celular induzida pela radiação e é considerado o *gold standard* dos testes de sensibilidade a citostáticos e de avaliação dos efeitos da radiação (Buch *et al.*, 2012; Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & van Bree, 2006; Rafahi *et al.*, 2011).

As células Farage controlo (não sujeitas a radiação) e após radiação foram mantidas em cultura conforme descrito anteriormente. Adicionou-se um número conhecido de células tratadas com cada dose de radiação (número de células semeadas) conforme descrito na Tabela 2 e perfez-se com meio de cultura enriquecido com metilcelulose (M7027, *Sigma-Aldrich*®) na concentração de 1%, até perfazer o volume de 3 mL. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante sete dias, momento em que se realizou a coloração com uma solução de violeta de cristal (C3886, *Sigma-Aldrich*®) na concentração de 0,5% em solução de metanol (32213, *Sigma-Aldrich*®) e posterior contagem das colónias formadas.

Com este procedimento foi possível calcular a eficiência da placa (PE, do inglês *plate efficiency*) e o fator de sobrevivência (SF, do inglês *surviving factor*) de

acordo com a Equação 1 e com a Equação 2, respetivamente (Balça-Silva *et al.*, 2012; Franken *et al.*, 2006)

$$\text{Eficiência da placa (\%)} = \frac{\text{Número de colónias contadas}}{\text{Número de células semeadas}} \times 100$$

Equação 1

$$\text{Fator de Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{PE das amostras tratadas}}{\text{PE das amostras controlo}} \times 100$$

Equação 2

Tabela 2. *Número de células plaqueadas após irradiação, por dose e por linha celular.*

	Controlo	0,5 Gy	2 Gy	5Gy	8Gy	12Gy	15 Gy	30 Gy	60Gy
Farage	4x10 ⁵	4x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	8x10 ⁵	1x10 ⁵

Através dos resultados obtidos foi possível estabelecer curvas de dose-resposta, que relacionam a dose de radiação com o fator de sobrevivência celular para cada linha celular. Os resultados experimentais obtidos com os ensaios clonogénicos foram ajustados a um modelo linear-quadrático (Franken *et al.*, 2006; Mamede *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014).

Em algumas situações, o ajuste aos dados experimentais pôde ser otimizado quando $\beta=0$, sendo a resposta determinada apenas pela componente linear da equação, assim o modelo de ajuste correspondeu ao modelo de um só alvo e um só toque, onde D representa a dose de radiação e D_0 , a dose letal média. Neste modelo, $D_0=1/\alpha$ com $\beta=0$.

Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade das células das diferentes linhas celulares determinou-se com recurso ao método de exclusão do azul de tripano (GIBCO®) (Weisenthal, Marsden, Dill, Macaluso, & Cindy, 1983). Este método baseia-se no princípio de que as células viáveis, uma vez que possuem a membrana celular intata, são

impermeáveis ao azul de tripano, pelo que se mantêm claras e/ou brilhantes. Quando as células não são viáveis, as propriedades de barreira da sua membrana estão alteradas, pelo que se torna permeável ao azul de tripano, corando-as de azul (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, Alves, Silva, & Sarmento-Ribeiro, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).

Para a realização deste ensaio homogeneizaram-se volumes iguais de cada suspensão celular e de solução de azul de tripano numa concentração de 0,02% e contaram-se as células brancas e as azuis observadas na esquadria da câmara de *neubauer*. A contagem das células realizou-se num microscópio ótico invertido *Motic AE31* com ampliação 100x (*Motic*®) e com recurso a um hemocitómetro (BOECO and Co). Os estudos foram realizados 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. A viabilidade celular foi calculada como a percentagem de células viáveis e a proliferação celular foi determinada pelo número de células viáveis.

Viabilidade e Morte Celular

A avaliação do tipo de morte celular foi analisada pelas características morfológicas com recurso à microscopia ótica após coloração das células com meio May-Grünwald Giemsa. Para a realização da coloração *May-Grünwald Giemsa*, de modo a avaliar as citomorfológicas de morte celular, foram realizados esfregaços com as diferentes suspensões celulares previamente irradiadas. Aos esfregaços, depois de secos ao ar, adicionaram-se 1,5 mL de solução de *May-Grünwald* durante 3 minutos e, posteriormente, pipetou-se igual volume de água destilada que ficou a atuar durante 1 minuto. Por fim, decantou-se e acrescentaram-se 3 a 4 gotas da solução de Giemsa, que se deixaram atuar durante 15 minutos. Terminado este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e observadas ao microscópio ótico *Axioskop 2* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).

As fotografias foram obtidas a partir da câmara *AxioCam 1Cc3* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) acoplada ao microscópio e, posteriormente, as imagens foram analisadas com recurso ao software *AxioVision* (*Zeiss, Munich, Alemanha*) para



Windows da Microsoft. Os estudos foram realizados 48 horas após a irradiação.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) permite contar, examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica permite analisar de forma rápida, várias características físicas e químicas de células em suspensão através de um equipamento de deteção ótico-eletrónico.

Quarenta e oito horas após a irradiação $0,5 \times 10^6$ células/mL Todas as suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS (do inglês, *phosphate buffer saline*) e transferiu-se para tubos de citometria (BD Falcon™ 352054). Centrifugou-se novamente a suspensão celular a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Os sedimentos ficaram prontos para ser submetidos às marcações de interesse, descritas de seguida. Para todos os estudos de citometria de fluxo o número de eventos considerado foi igual a 10.000, obtidos através do programa *CellQuest™* (Spectroncorp). Para a análise e a quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *Paint-a-Gate 3.02*, *Machintosh Software* (BD Biosciences) que corre em computador dedicado.

Para caracterizar o tipo de morte celular recorreu-se à dupla marcação com anexina V (AV) e iodeto de propídeo (IP) (*FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I*, BD Pharmingen). Após suspensão do sedimento celular obtido, tal como descrito, em 100 µL de tampão de ligação, constituído por Hepes (Sigma H7523) na concentração de 0,01 M, NaCl (Sigma S7653) na concentração 0,14 M, CaCl_2 (Sigma C4901) na concentração de 0,25 mM, adicionaram-se 5 µL de AV marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês fluorescein isothiocyanate) e 2 µL de iodeto de propídeo e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise no citómetro *FACSCalibur* (BD Biosciences) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a AV-FITC e os comprimentos de onda de excitação

de 351 nm e de emissão de 617 nm para o IP. Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células em cada grupo (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014).

Expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas

Para a avaliação da relação entre a expressão de BAX (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e de BCL-2 (do inglês, *B cell lymphoma 2*), as células foram preparadas como descrito anteriormente. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100 µL de solução de fixação (*Immunostep, Intracell Kit*) e incubou-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Posteriormente adicionaram-se 2 mL de PBS, centrifugou-se novamente a 500xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 100 µL de solução de permeabilização (*Immunostep, Intracell Kit*), 1 µg de anticorpo contra a BAX, marcado com ficoeritrina (BAX-PE; Santa Cruz, sc-20067PE) e a mesma quantidade de anticorpo contra a BCL-2, marcado com isotiocianato de fluoresceína (BCL-2-FITC; Santa Cruz, sc-509FITC). Agitou-se cada tubo em vortéx, seguindo-se de incubação no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período de incubação com os anticorpos, lavou-se com 2 mL de PBS e centrifugou-se a 500xG durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 400 µL de PBS. Após homogeneização em vortéx, analisou-se no citómetro utilizando os comprimentos de onda de excitação de 494 nm e de emissão de 519 nm para a fluorescência do FITC e os comprimentos de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm para a fluorescência do PE (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013; Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013).



Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com recurso à sonda fluorescente *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide* (JC1). O JC1 é um catião lipofílico que se pode apresentar sob duas formas, em monómeros (M) ou em agregados (A), consoante o estado de polarização ou de despolarização da membrana mitocondrial, o que determina a emissão de fluorescência com comprimentos de onda diferentes.

Desta forma, a razão entre a fluorescência verde e vermelha, ou seja a razão entre monómeros e agregados (razão M/A) permite inferir acerca do potencial de membrana mitocondrial (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013).

Para a realização destes estudos, uma solução de cerca de 10^6 células em PBS foram centrifugadas durante 5 minutos a 500xG e, posteriormente, suspensas num 1 mL do mesmo tampão. As suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com 1 µL de JC1 (Sigma T4069), preparado na concentração de 5 mg/mL em dimetilsulfóxido. De seguida, realizou-se nova lavagem com PBS com recurso a centrifugação e suspenderam-se as células em 400 µL do mesmo tampão. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

Os resultados obtidos correspondem à média da intensidade de fluorescência (MIF) para os agregados e para os monómeros e são apresentados sob a forma de razão M/A para cada condição experimental.

Stresse oxidativo - peróxidos, anião superóxido e glutatona reduzida

O stresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de espécies reativas de oxigénio e da defesa antioxidante GSH. A sonda *2',7'-dichlorofluorescein-diacetate* (DCFH2-DA) permite a deteção de peróxidos intracelulares, uma vez que a sua concentração é diretamente proporcional à intensidade da fluorescência emitida pela sonda.



As suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos, recuperado o sedimento, ao qual se adicionou 1 mL de PBS. A esta suspensão foi adicionado 1 μ L da sonda DCFH₂-DA (Molecular Probes, Invitrogen), na concentração de 5 mM diluída em dimetilformamida. A incubação foi realizada durante 45 minutos, na ausência de luz e à temperatura de 37°C (Laranjo, 2010). Após o período de incubação, realizou-se uma lavagem com PBS com recurso a centrifugação a 500xG durante 5 minutos após o que o sedimento foi suspenso em 400 μ L de PBS. Após agitação em vórtex, analisou-se no citómetro utilizando os comprimentos de onda de excitação 494 nm e de emissão de 519 nm. Os resultados são apresentados em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013).

O dihidroetídio (DHE) é uma sonda utilizada para a deteção de espécies reativas de oxigénio, visto que, após oxidação pelo radical superóxido e da sua intercalação no DNA, emite uma fluorescência na zona do vermelho.

Para esta avaliação as suspensões celulares foram centrifugadas a 500xG durante 5 minutos e o sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS. Posteriormente, a suspensão foi incubada com a sonda DHE (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 μ M em dimetilsulfóxido, a 37°C, na ausência de luz, durante 15 minutos. De seguida a suspensão foi lavada com centrifugação a 500xG durante 5 minutos. A análise foi realizada no citómetro com um comprimento de onda de excitação de 496 nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves, Alves, *et al.*, 2013; Laranjo *et al.*, 2013). Os resultados apresentam-se expressos em média de intensidade de fluorescência normalizados relativamente ao controlo.

A glutatona reduzida (GSH) é um nucleófilo forte que confere proteção das células contra lesão induzida por radicais livres, oxidantes e eletrófilos.

Para a deteção, as suspensões celulares com aproximadamente 3×10^6 células foram centrifugadas a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS. Adicionou-se o alaranjado de mercúrio (Sigma) de modo a obter uma concentração de 40 μ M e incubou-se à temperatura de 37°C,

na ausência de luz, durante 15 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com centrifugação a 500xG, durante 5 minutos e suspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. A deteção foi efetuada com o comprimento de onda de excitação de 496nm e de emissão de 578 nm (Gonçalves, Barbosa-Ribeiro, *et al.*, 2013). Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência e posteriormente normalizados relativamente ao controlo.

Avaliação do Ciclo celular

Para este procedimento, as células ($1,0 \times 10^6$ células/ml) foram centrifugadas a 200xG durante 5 minutos, após o que se descartou o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µL de etanol a 70%, agitaram-se as células em vórtex e incubaram-se durante 30 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugaram-se a 500xg durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 500 µL de uma solução de *PI/RNase* ficando a incubar durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 351 nm e de emissão de 617 nm (Balça-Silva *et al.*, 2015). Para este estudo foram obtidos 50.000 eventos através do programa *CellQuestTM* (*Spectroncorp*). Para a análise e a quantificação da informação, utilizou-se o programa específico *MOD FIT* (*BD Biosciences*).

Genotoxicidade

A eletroforese em microgel de agarose ou ensaio cometa, como é mais comumente designado, permite avaliar a lesão induzida nas cadeias do ADN.

As células Farage foram transferidas para *falcons* devidamente identificados e suspensas de modo a obter uma concentração de 50.000 células/mL.

O controlo positivo foi preparado a partir da cultura celular controlo (0 Gy). As células foram expostas a peróxido de hidrogénio numa concentração de 20 nM, durante 15 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram

centrifugadas a 500xG por 5 minutos e suspensas em PBS, de forma a manter a concentração celular de 50.000 células/mL.

Utilizaram-se lâminas de vidro *StarFrost*[®] (26x76mm) previamente revestidas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal, na concentração de 1% (A-2790, Sigma Aldrich[®]). Preparou-se uma solução de agarose+ de baixo ponto de fusão na concentração de 1% (A-9414, Sigma Aldrich[®]) e adicionaram-se iguais quantidades da suspensão celular previamente preparada e da agarose de baixo ponto de fusão. Esta suspensão foi homogeneizada e espalhou-se 1 mL sobre as lâminas pré-revestidas com agarose. Seguidamente cobriu-se a suspensão celular com uma lamela, o que proporcionou a formação de uma camada homogênea. Após cerca de 30 minutos a 4°C as lamelas foram removidas delicadamente.

As lâminas foram incubadas durante a noite, a 4°C, em solução de lise alcalina, constituída por NaCl na concentração de 2,5 M, por EDTA na concentração de 100 mM, por Tris na concentração de 10 mM, por DMSO na concentração de 10% e por *Triton* X-100 na concentração de 1%. As lâminas foram equilibradas durante 1 hora em tampão de eletroforese, preparado de fresco, constituído por NaOH na concentração de 300 mM e por EDTA na concentração de 1 mM com pH>13.

A eletroforese foi realizada durante 15 minutos com uma diferença de potencial de 25 V e com corrente de 1 A. Terminada a eletroforese, as lâminas foram submersas em solução de neutralização constituída por Tris na concentração de 0,4 M durante 5 minutos, processo que foi repetido duas vezes.

Com o auxílio de uma pipeta, dispensaram-se algumas gotas de brometo de etídio (Bio-Rad) na concentração de 25 µg/mL sobre as lâminas e manteve-se ao abrigo da luz, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água ultrapura, com o objetivo de remover o excesso de brometo de etídio e deixadas secar.

A análise e aquisição de imagens foram efetuadas num microscópio de



fluorescência *Motic AE31 (Motic®)*, equipado com um filtro de excitação de 546 nm e com uma lâmpada de mercúrio de 100W. A emissão de fluorescência foi monitorizada no comprimento de onda de 580 nm no refletor com um filtro de 590 nm (Olive & Banáth, 2006). A observação foi realizada com uma ampliação de 250X e a aquisição de imagem foi realizada no *software Motic Images versão 2.0 (Microscope World, EUA)*. A análise dos cometas foi feita com recurso ao *software Tritex CometScore™ Freeware v.1.5 (Tritexcorp)*.

Expressão da P53 e de P53 fosforilada

A avaliação da expressão e da ativação da P53, uma proteína importante na resposta à RT, foi realizada por *western blot*.

Para esta avaliação foi necessário a preparação de extratos de proteína total, cultivadas durante 48 horas após irradiação com 0,5 Gy, com 15 Gy ou com 30 Gy.

Neste sentido findo o tempo de incubação, as células foram transferidas centrifugadas a 1000xG durante 5 minutos. Após centrifugação, descartou-se o meio e adicionou-se 350 µL de tampão de lise para radioimunoprecipitação (RIPA, do inglês *radio-immunoprecipitation assay buffer*), constituído por NaCl na concentração de 150 mM, Tris na concentração de 50 mM, ácido tetracético etileno glicol (EGTA, do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*) na concentração de 5 mM, Triton na concentração de 1%, desoxicolato de sódio na concentração de 0,5% e SDS na concentração de 1%, suplementado no momento de uso com uma mistura de inibidores de proteases, *cOmplete Mini* na concentração recomendada (Roche 11836153001) e com ditioneitol (DTT, do inglês *dithiothreitol*) na concentração de 1 µM. Para a preparação dos extratos para a quantificação da proteína P53 fosforilada à solução previamente mencionada adicionou-se *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail* na concentração recomendada (Roche 04906837001). Com o auxílio de raspadores, foi possível soltar as células da superfície do frasco e facilitar a lise.

Os lisados foram transferidos para microtubos previamente identificados que

foram mantidos em gelo. Após agitação em vórtex as amostras foram sonicadas três vezes durante cerca de 10 segundos, utilizando uma amplitude de 30% de um sonificador *Vibra Cell* (*Sonic and Materials inc. EUA*, modelo: VC50 de 240 V, 50 W e 20 KHz). De seguida, centrifugaram-se as amostras a 14000g, durante 15 minutos mantendo a temperatura a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e as amostras foram guardadas numa arca congeladora a uma temperatura de -80°C, para posterior processamento.

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método do ácido bicinonínico [BCA, do inglês *bicinchoninic acid* (BCA™ *Protein Assay kit*, *Pierce*)].

Posteriormente, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 5 minutos após solubilização em solução desnaturante constituída por Tris-HCl na concentração de 250 mM, pH 7,4, glicerol na concentração de 30%, SDS na concentração de 10%, β-mercaptoetanol na concentração de 10 mM e azul de bromofenol na concentração de 0,05%.

Para a realização da separação de proteínas em gel de eletroforese de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulphate – poly-acrilamide gel electrophoresis*) foram preparados géis de acrilamida na concentração de 10%. Os géis foram colocados na tina de eletroforese com tampão constituído por Tris na concentração de 25 mM, glicina na concentração de 192 mM e SDS na concentração de 0,1%, com pH acertado a 8,3 (Bio-Rad, EUA) e, seguidamente, procedeu-se à colocação das amostras e do padrão de pesos moleculares (*Precision Plus Standards, Dual Color, Bio-rad, EUA*). O protocolo de eletroforese consistiu na aplicação de uma diferença de potencial de 80 V durante cerca de 30 minutos que passou depois a 150 V durante 95 minutos.

Terminado o período de eletroforese, os géis foram colocados em contacto direto com as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*; Bio-Rad, EUA), previamente ativadas com metanol. A eletrotransferência realizou-se em tampão de ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanossulfónico (CAPS, do inglês *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic*



acid, Sigma) na concentração de 100 mM, com pH=11, e de metanol na concentração de 10%, com uma diferença de potencial de 100 V, durante uma hora.

As membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de albumina sérica bovina na concentração de 4% preparada em TBS-T (do inglês, *Tris buffer saline Tween-20*).

Posteriormente, as membranas foram incubadas, respetivamente, com os anticorpos primários, anti-P53 (DO-7; SC-47698, Santa Cruz Biotech, California, EUA) e anti-fosfo-P53 (P53-18; SC-13580, Santa Cruz Biotech, California, EUA), ambos preparados em ratinho, durante a noite e a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-ratinho (anti-mouse: RPN5781 GE Healthcare), durante uma hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante. No final da incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas e, posteriormente, incubadas com substrato enzimático, ECF (*ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente cinco minutos e reveladas utilizando um leitor de fluorescência (*Typhoon FLA 9000*, Suécia).

Todas as membranas foram posteriormente ativadas e submetidas à imunodeteção com o anticorpo anti-actina (clone AC-15, A5441 – Sigma) conforme o procedimento descrito para o anticorpo anterior.

Após a aquisição das imagens, o processamento das bandas foi realizado, recorrendo ao *software ImageQuant 5.0* (*Molecular Dynamics*, EUA), através do desenho de regiões de interesse sobre as bandas com peso molecular correspondente às proteínas de interesse, P53 e P53 fosforilada (~53kDa). Para além destas bandas, foram ainda desenhadas regiões de interesse nas bandas de actina (~42kDa). Posteriormente, foi realizado o cálculo da razão entre a intensidade da banda da proteína de interesse, P53 e P53 fosforilada, e a intensidade da banda da actina, respetivamente (Santos *et al.*, 2014). Para cada linha celular a condição de controlo (0 Gy) foi considerada como padrão.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM SPSS® v.22 e os gráficos foram construídos através de *GraphPad Prism* versão 5.0. Na análise descritiva foram determinadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e amplitude interquartil) para as variáveis quantitativas.

Para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis recorreu-se ao teste *Shapiro-Wilk*. Para variáveis com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos; caso contrário os testes utilizados foram não paramétricos.

A comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada com recurso ao teste de *U Mann-Whitney* (não paramétrico). A comparação de variáveis quantitativas entre mais de dois grupos foi obtida com recurso ao teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) ou com recurso ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico). As comparações múltiplas foram realizadas considerando a correção de *Bonferroni*.

A comparação dos resultados dos ensaios clonogénicos com o respetivo controlo foi feita pela determinação do intervalo de confiança a 95% (IConf 95%) do valor da condição, considerando-se significativamente diferente do controlo caso o IConf 95% não englobasse o valor 1.

As curvas de dose-resposta para os estudos de citotoxicidade foram obtidas através do ajuste dos dados experimentais a uma curva sigmoideal, com recurso ao software OriginPro utilizando o modelo “DoseResp”. As curvas referentes aos ensaios clonogénicos foram obtidas considerando os seguintes modelos: linear quadrático ($SF=e^{-(\alpha D-\beta D^2)}$) e o modelo linear de agressão celular ($SF=e^{-(D/D^0)}$), com recurso ao mesmo software. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

Avaliação da viabilidade, proliferação e sobrevivência



As células Farage expostas à RI sofreram uma diminuição da sua viabilidade e proliferação, de forma dependente da dose e do tempo após exposição, tal como representado na Figura 1.

A viabilidade celular, após exposição, diminui significativamente após exposição a todas as doses em estudo ($p<0,05$ para 0,5 Gy e $p<0,001$ para 15, 30 e 60 Gy). Verificou-se que a dose que induz a diminuição da viabilidade em 50% foi de cerca de 30 Gy, como pode ser visto na Figura 1A.

Por outro lado, no que diz respeito à proliferação celular ao longo do tempo, verificaram-se comportamentos diferentes dependendo das doses. Assim, com exposição à dose de 0,5 Gy foi observado um crescimento modesto das células Farage durante as primeiras 24 horas, que é mantida para todos os tempos considerados. Para as restantes doses de radiação estudadas (15, 30 e 60 Gy) foi observada uma diminuição contínua e significativa para todos os tempos ($p<0,001$), comparando com os controlos (Figura 1B).

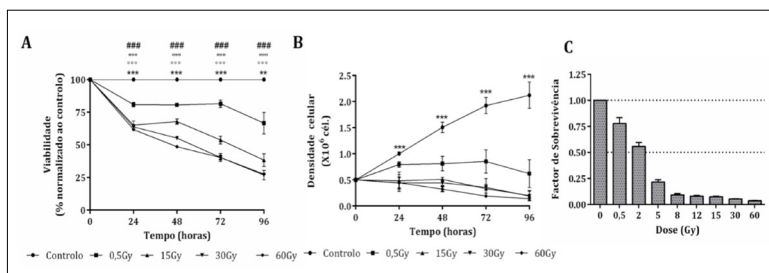


Figura 1. Viabilidade celular (A), proliferação (B) e sobrevivência celular (C) após a exposição a RI. (A) Curvas de dose-resposta das células Farage após exposição a RI, por ensaio de exclusão com Trypan Blue, avaliada 24h, 48h, 72h e 96h após exposição. Os resultados são expressos como percentagem de viabilidade, normalizada ao controlo. A significância estatística é representada para cada dose em relação ao controlo: 0,5 Gy * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,001$; 15 Gy ^{ooo} $p<0,001$; 30 Gy ^{ooo} $p<0,001$; 60 Gy ^{###} $p<0,001$). (B) A proliferação celular das células Farage após exposição a RI, por ensaio de exclusão com Trypan Blue, avaliada 24h, 48h, 72h e 96h após exposição. Os resultados são expressos como densidade celular (número de células). A significância estatística é representada para cada dose em relação ao controlo: 0,5 Gy * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,001$. (C) Representação do fator de sobrevivência, avaliado pelo ensaio clonogénico, 7 dias após a exposição à radiação ionizante. Os resultados RI são expressos como fator de sobrevivência, normalizado ao controlo, como a média $\pm$ SEM de, pelo menos, seis experiências independentes.

No que diz respeito à sobrevivência celular, verificou-se uma diminuição significativa do SF, após a exposição a todas as doses de radiação estudadas, de forma dependente da dose. A dose letal média (DL_{50}) foi de $1,73 \pm 0,27$ Gy, calculada aplicando o modelo de agressão celular linear-quadrático.

Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada recorrendo a duas metodologias distintas, a fim de compreender quais os mecanismos envolvidos, 48 horas após a exposição à radiação (Figura 2).

As características morfológicas das células Farage foram determinadas pela coloração May-Grunwald-Giemsa, tal como representado na Figura 2A. Os estudos de morfologia demonstraram que a exposição a doses de RI mais baixas induziu um aumento no número de células que sofrem características morfológicas de morte celular por apoptose, tais como formação de *blebs*, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Figura 2A-B e A-C). Além disso, a exposição a doses mais elevadas apresentou um aumento no número de células em morte celular por necrose, tal como observado na Figura 2A-D e 2A-E.

De facto, tal como podemos observar na Figura 2B, comparativamente ao controlo ($85,80 \pm 0,92\%$), verificou-se uma diminuição do número de células viáveis após exposição às doses de 0,5 Gy ($66,50 \pm 1,73\%$, $p < 0,001$), 15 Gy ($55,40 \pm 2,14\%$, $p < 0,001$), 30 Gy ($49,20 \pm 3,09\%$, $p < 0,001$) e 60 Gy ($41,60 \pm 2,16\%$, $p < 0,001$). Para além disso, a diminuição da viabilidade celular induzida pela RI é devida a um aumento significativo das células em morte celular por apoptose em comparação com o controlo ($6,60 \pm 0,51\%$), após exposição a 0,5 Gy ($22,17 \pm 1,14\%$, $p < 0,001$), 15 Gy ($31,80 \pm 1,66\%$, $p < 0,001$), 30 Gy ($38,00 \pm 2,65\%$, $p < 0,001$) e 60 Gy ($33,80 \pm 0,58\%$, $p < 0,001$).

Verificou-se igualmente um aumento significativo da população celular em morte celular por apoptose tardia/necrose comparativamente ao controlo



($1,20 \pm 0,20\%$) após exposição às doses de 0,5 Gy ($7,83 \pm 1,19\%$, $p=0,038$), 15 Gy ($9,60 \pm 1,44\%$, $p=0,009$), 30 Gy ($9,00 \pm 1,70\%$, $p=0,029$) e 60 Gy ($9,20 \pm 0,66\%$, $p=0,0013$).

Paralelamente, foram avaliados mecanismos de modulação da morte celular por apoptose após exposição à RI, através do estudo da razão BAX/BCL-2, por citometria de fluxo. Tal como observado na Figura 2C, verificou-se que um aumento da dose de RI induziu um aumento significativo da razão BAX/BCL-2 em comparação com o controlo, após exposição às doses de 0,5 Gy ($1,24 \pm 0,06$, $p=0,014$), 15 Gy ($1,57 \pm 0,07$, $p=0,001$), 30 Gy ($1,75 \pm 0,05$, $p=0,001$) e 60 Gy ($1,90 \pm 0,12$, $p=0,005$).

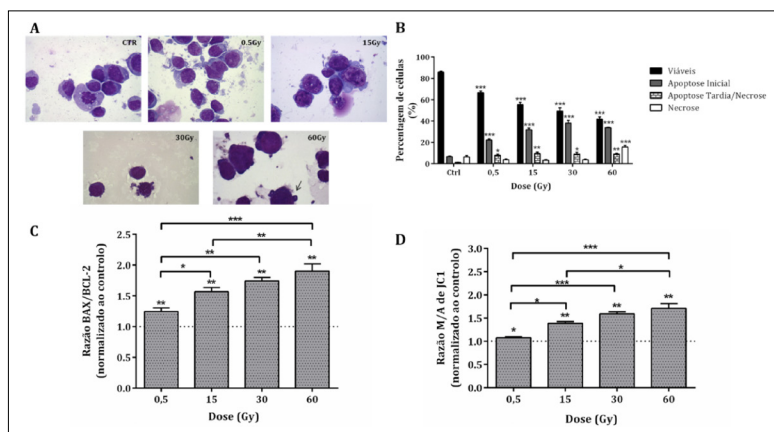


Figura 2. Avaliação da morte celular e os mecanismos de morte celular. (A) Avaliação das características morfológicas das células Farage por coloração May-Grunwald Giemsa, após a exposição RI. Imagens representativas de células controlo, e células expostas às doses de 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy e 60 Gy. As setas representam a formação de blebbings. Amplificação de 400X. (B) A viabilidade e tipos de morte celular das células Farage, 48h após a exposição a RI, avaliada por citometria de fluxo por dupla marcação de Anexina V/iodeto de propídio. Os resultados são expressos como a média±SEM da percentagem de células viáveis e células que sofrem morte celular por apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose, de pelo menos quatro experiências independentes. (C) Avaliação da razão de BAX/BCL-2 em células Farage, 48h após a exposição RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade média de fluorescência, normalizada ao controlo de, pelo menos, quatro experiências independentes. (D) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por avaliação da razão Monómeros/Agregados (M/A) de JC-1, por citometria de fluxo, nas células Farage, 48h após a exposição a RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade média de fluorescência da razão M/A, normalizada ao controlo, de pelo menos quatro experiências independentes. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: $p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$.

Para além disso, de forma a confirmar o envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pela RI, o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por FC usando a sonda JC1. Em células apoptóticas, o potencial de membrana mitocondrial colapsa e a sonda JC1 não se acumula na mitocôndria, permanecendo na sua forma monomérica no citoplasma. Os nossos resultados demonstraram um aumento da razão M/A de JC1, proporcional ao aumento das doses de RI, refletindo um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial. Assim, tal como na Figura 2D, a razão M/A aumenta com exposição às doses de 0,5 Gy ($1,07 \pm 0,002$, $p=0,045$), 15 Gy ($1,39 \pm 0,04$, $p=0,002$), 30 Gy ($1,59 \pm 0,04$, $p=0,001$) e 60 Gy ($1,71 \pm 0,10$, $p=0,006$).

Avaliação do ciclo celular e stresse oxidativo

Foram avaliados os efeitos da exposição à RI no que toca ao ciclo celular nas células da linha celular Farage, sendo que os resultados estão representados na Figura 3A.

Observou-se que, 48h após exposição à RI, se verificou um aumento significativo do pico pré-apoptótico pré- G_0 comparativamente ao controlo ($2,60 \pm 0,51\%$), após exposição às doses de 15 Gy ($12,50 \pm 1,57\%$, $p<0,001$), 30 Gy ($19,33 \pm 0,99\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($12,25 \pm 1,60\%$, $p<0,001$). Observou-se igualmente uma diminuição significativa da população celular na fase G_0/G_1 comparativamente ao controlo ($64,20 \pm 1,6\%$), após exposição às doses de 15 Gy ($31,00 \pm 1,93\%$; $p<0,001$), 30 Gy ($32,33 \pm 2,39\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($41,50 \pm 0,96\%$, $p<0,001$). Verificou-se também um aumento significativo do bloqueio do ciclo celular na fase G_2/M , comparativamente ao controlo ($10,40 \pm 1,72\%$) após exposição às doses de 15 Gy ($29,00 \pm 3,54\%$, $p<0,001$), 30 Gy ($25,33 \pm 3,54\%$, $p<0,001$) e 60 Gy ($42,25 \pm 2,75\%$, $p<0,001$).

Além disso, os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigénio (peróxidos e anião superóxido), foram determinados por citometria de fluxo recorrendo às sondas DCFH-DA e DHE, bem como a defesa antioxidante GSH. Geralmente, e tal como demonstrado na Figura 3B-D, a produção de ROS aumenta significativamente após exposição à RI. De facto, verificou-se um aumento significativo dos níveis intracelulares de peróxidos comparativamente



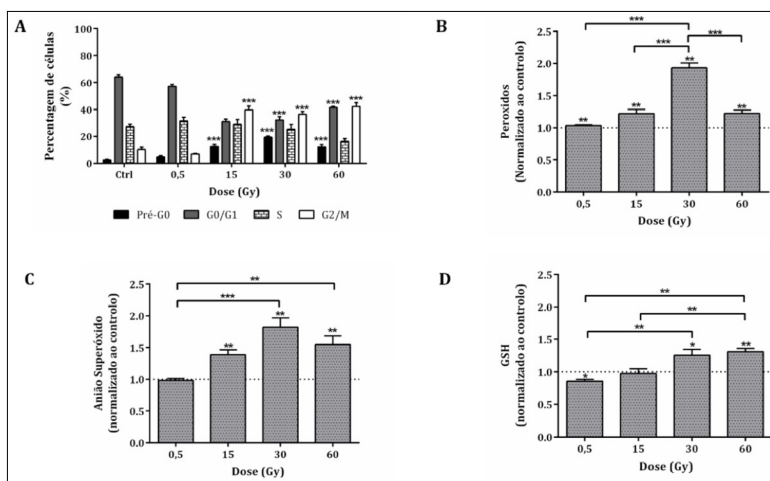


Figura 3. Avaliação das alterações no ciclo celular e stresse oxidativo após a exposição à radiação ionizante. (A) avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo e representação gráfica das fases do ciclo celular nas células Farage, 48h após exposição à RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da percentagem de células identificadas para cada fase do ciclo celular de, pelo menos, quatro experiências independentes. Avaliação do stresse oxidativo por citometria de fluxo por meio da avaliação dos níveis intracelulares de peróxidos (B), anião superóxido (C) e de GSH (D) nas células Farage 48h após exposição à RI. Os resultados são expressos como a média±SEM da intensidade de fluorescência de, pelo menos, quatro experiências independentes. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

ao controlo, após exposição às doses de 15 Gy ($1,22\pm0,07$, $p=0,043$), 30 Gy ($1,93\pm0,08$, $p<0,001$) e 60 Gy ($1,22\pm0,05$, $p=0,024$) (Figura 3B). Resultados similares foram observados nos níveis intracelulares de anião superóxido, com um aumento significativo comparativamente ao controlo, com exposição às doses de 15 Gy ($1,39\pm0,08$, $p=0,016$), 30 Gy ($1,82\pm0,15$, $p=0,011$) e 60 Gy ($1,55\pm0,13$, $p=0,024$), como demonstrado na Figura 3C. Foi também observado um aumento significativo nos níveis intracelulares da defesa antioxidante GSH após exposição às doses de 30 Gy ($1,26\pm0,09$, $p=0,046$) e 60 Gy ($1,31\pm0,05$, $p=0,004$), como mostrado na Figura 3D..

Avaliação de lesões no DNA

A RI está, geralmente, relacionada com mono e/ou bi-alquilação de DNA e, consequentemente, a morte celular. Tal como descrito na Figura 4A, observou-se um aumento do número de cometas mais pronunciados após exposição à dose de 30 Gy. Observou-se um aumento significativo do momento da cauda em relação ao controlo após exposição às doses de 15 Gy ($p<0,001$), 30 Gy ($p<0,001$) e 60 Gy ($p<0,001$), conforme mostrado na Figura 4B.

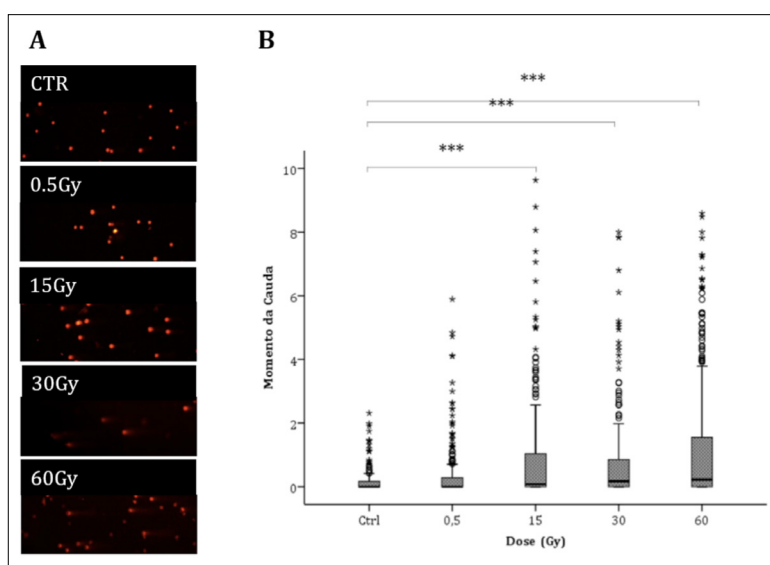


Figura 4. Genotoxicidade induzida nas células Farage, após exposição à RI. (A) Fotografias ilustrativas da eletroforese em gel de célula única (comumente ensaio cometa) na linha celular de linfoma difuso de grandes células B Farage, 48h após a exposição à RI, com as doses de 0,5 Gy, 15 Gy, 30 Gy, 60 Gy, controlo (CTR) e controlo positivo (CTR+). (B) Representação do momento da cauda, determinado pelo ensaio cometa, 48h após a exposição à RI. Os resultados são expressos como média±SEM de seis experiências independentes (n = 6), com um mínimo de 100 cometas para cada condição. A significância estatística é expressa em relação ao controlo: *** $p<0,001$

Avaliação da expressão de P53

A proteína P53 desempenha um papel crucial na regulação de vários mecanismos celulares. Alterações nesta proteína podem levar a perturbações na regulação de células normais. Tal como pode ser observado na Figura 5A, a RI induz um aumento significativo nos níveis de expressão de P53 total em comparação com o controlo, após exposição às doses de 15 Gy ($1,90\pm0,11$, $p=0,001$) e 30 Gy ($2,74\pm0,26$, $p=0,001$). Do mesmo modo, verificaram-se níveis aumentados da proteína P53 fosforilada nas células Farage em comparação com o controlo, quando as células foram expostas às doses de 0,5 Gy ($1,22\pm0,07$, $p=0,044$), 15 Gy ($1,64\pm0,16$, $p=0,007$) e 30 Gy ($2,66\pm0,24$, $p=0,006$), como descrito na Figura 5B.

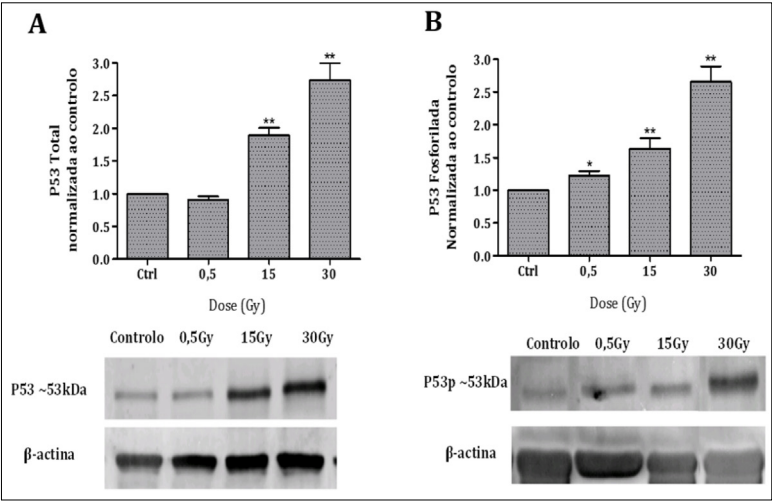


Figura 5. Expressão da proteína P53 total (A) e P53 fosforilada (B) nas células da linha celular Farage, 48h após a exposição à RI. Os resultados são expressos como a média da intensidade de fluorescência da razão P53 total/actina (A) e da razão P53p/actina (B), normalizada ao controlo, após a exposição às doses de 0,5 Gy, de 15 Gy e 30 Gy. Gráficos representam a média±SEM, de quatro experiências independentes. As figuras consistem em imagens representativas da imunotransferência da expressão de P53 total, pP53 e β-actina para cada condição experimental. Significância estatística é representada em relação ao controlo * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Discussão

A radiorresistência permanece como uma barreira fundamental que limita a eficácia da RT no tratamento do cancro. Evidências recentes sugerem que a radiorresistência é devido ao repovoamento do tumor e envolve várias vias de sinalização. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares induzidos pela RI pode contribuir, no futuro próximo, para reduzir o número de casos de radiorresistência (Mendes *et al.*, 2015). Embora a RT esteja a ser substituída progressivamente por outras estratégias de tratamento, tais como QT, é ainda um tratamento bastante importante. O estabelecimento de RT, como uma possível estratégia de tratamento em LDGCB, poderia proporcionar vantagens no que concerne ao prognóstico, na fase inicial ou no caso de doença localizada (Mendes *et al.*, 2015).

Até à data, a realização do tratamento de RT com recurso a elevadas doses individuais, não tem sido extensivamente estudado, muito devido às recentes inovações em termos de novos dispositivos de irradiação e ao uso de imagem funcional tridimensional, que começam a ser usados em determinados regimes de tratamento (Mendes *et al.*, 2015). Assim, torna-se essencial estudar os efeitos da RT, nomeadamente na proliferação e viabilidade celular, o tipo de morte celular induzida, lesão no ADN de células expostas a diferentes doses únicas de RI.

Os nossos resultados mostraram que a RI induz efeitos citotóxicos e antiproliferativos nas células Farage, de uma forma dependente da dose e do tempo de exposição (até 96 horas). No entanto, estes resultados fornecem uma avaliação a curto tempo dos efeitos da RI, pelo que recorremos ao ensaio clonogénico, que é o *gold standard* para a avaliação do fator de sobrevivência ao longo tempo. Desta forma, verificámos uma DL_{50} para células Farage de $1,73 \pm 0,61$ Gy, sendo uma DL_{50} relativamente baixa, em comparação com outras linhas celulares, nomeadamente em tumores sólidos, tais como as determinadas nas linhas celulares A549 e H460, recorrendo a um Shepherd Mark 1 68 Irradiator, (137Cs Irradiator) (JL Shepherd, San Fernando, CA,



USA, numa taxa de dose de 70,6 rad/min, à temperatura ambiente (Gomez-Casal *et al.*, 2013), e em comparação com os resultados obtidos por nós num estudo realizado em três linhas celulares de cancro de pulmão (Mendes, Sales, *et al.*, 2015). De facto, a RI induz a ativação de vários mecanismos intracelulares, tais como lesões no ADN, interrupção do ciclo celular e a produção de ROS (Mendes *et al.*, 2015). No nosso estudo, observou-se que a RI induziu morte celular nas células da linha celular Farage de forma dependente da dose, sendo que a morte celular ocorre principalmente por apoptose, como observado pelo aumento das populações de células em morte celular por apoptose e pelo aumento das razões BAX/BCL-2 e M/A. Estes resultados também foram observados pela nossa equipa nas células da linha celular A549, cujas células apresentam uma expressão P53^{Wild} (Mendes *et al.*, 2015).

Estes resultados poderão estar relacionados com um aumento significativo da produção de ROS, nomeadamente pelo aumento do anião superóxido e de peróxidos, que foram também avaliados por outros autores (Lee, Kim, Kil, & Park, 2007; Yamaguchi & Kashiwakura, 2013; Yamamori *et al.*, 2012). Por outro lado, após a exposição à RI, as células Farage tentam recuperar do desequilíbrio existente no ambiente oxidativo através de um aumento significativo dos níveis de GSH. Outros autores evidenciaram a existência de duas fases distintas da produção de ROS após exposição à RI, sendo que um está associado com um decréscimo tardio dos níveis de ROS por sua vez associado a GSH reduzida e potencial de membrana mitocondrial reduzido, e um segundo relacionado com a produção exógena de ROS que induz a libertação de citocromo c diretamente em mitocôndrias isoladas que indicam que a produção tardia de ROS está correlacionada com funções mitocondriais críticas. Estas funções estão provavelmente estritamente ligadas à libertação de citocromo c e ativação da via das caspases (Q. Chen *et al.*, 2003). Para além disso, no nosso estudo observou-se que a participação das vias mitocondriais é altamente regulado por um equilíbrio entre a proteína pro-apoptótica BAX e a proteína anti-apoptótica BCL-2 que é crucial nos mecanismos induzidos pela RI (Loriot *et al.*, 2014; Mendes, Sales, *et al.*, 2015).

A exposição à RI também induziu um bloqueio do ciclo celular das células Farage na fase G_2/M , que poderá estar relacionado com o aumento significativo na produção de ROS e lesões no ADN, seguidos por uma grande e concomitante aumento dos níveis de proteína P53 total e fosforilada, que desempenha um papel crucial na regulação da apoptose e no bloqueio do ciclo celular, tal como observado na linha celular de cancro do pulmão A549 (Mendes, Sales, *et al.*, 2015). De facto, a ativação da P53 é conhecida como sendo reguladora da morte celular apoptótica após exposição a insultos celulares, incluindo lesões no ADN, ativação de oncogenes ou hipoxia (Montero, Dutta, van Bodegom, Weinstock, & Letai, 2013; She, Bode, & Ma, 2001; Wu, 2004).

Após lesões no ADN, a P53^{wild} é ativada, promovendo bloqueio do ciclo celular, transativação de enzimas reparadoras e, se a lesão não puder ser reparado, apoptose (Montero *et al.*, 2013; She *et al.*, 2001; Wu, 2004). Devido a estas alterações, tais como mutações e expressões alteradas, a P53 promove o crescimento de vantagens e assegura a sobrevivência em células tumorais pela inibição da resposta apoptótica necessária para a supressão tumoral (X. Chen *et al.*, 2014; Lien *et al.*, 2015; Yamamori *et al.*, 2012). Montero *et al.*, (2013) demonstraram que a P53 pode também controlar morte celular não apoptótica e que pode ser selecionada por células tumorais que promovem não só a sua resistência à apoptose mas também a necrose, e este mecanismo pode explicar a resistência a quimio e RT mesmo quando conduz a mecanismos não apoptóticos.

Em resumo, os nossos resultados demonstraram que a RI induz morte celular de forma dependente da dose e do tempo após exposição. O estudo do tipo de morte celular e os mecanismos subjacentes nesta linha celular revelaram que a RI, nas células Farage, induz lesões que levam a morte celular pela via intrínseca da apoptose. Desta forma, a morte celular pode ocorrer preferencialmente por apoptose ou apoptose tardia/necrose com um significativo aumento da produção de ROS, lesões no ADN conduzindo à expressão elevada e consequente expressão de P53, resultando em bloqueio celular na fase G_2/M .

Os nossos resultados demonstraram que os efeitos da RI pode alterar um

número significativo de alvos moleculares e celulares e que a sua compreensão é essencial de forma a enaltecer a importância da RI no tratamento de LDGCB..

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro (Projeto Estratégico Pest-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEUE/04539/2013, COMPETIR-FEDER) e ao Serviço de RT do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Referências

- Alizadeh, a a, Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, a, ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(February), 503–511. doi:10.1038/35000501
- Ba, C. (2013). The Role of Radiation Therapy in the Treatment of Stage I-II Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*, 8 (3), 236–242. doi:10.1007/s11899-013-0170-5
- Balça-Silva, J., Matias, D., do Carmo, A., Girão, H., Moura-Neto, V., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Lopes, M. C. (2015). Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(4), 722–732. doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.022
- Balça-Silva, J., Neves, S. S., Gonçalves, A. C., Abrantes, A. M., Casalta-Lopes, J., Botelho, M. F., ... Silva, H. C. (2012). Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Research*, 32(5), 1603–1610. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593438> \n<http://ar.iiarjournals.org/content/32/5/1603.long>
- Ballonoff, A., Rusthoven, K. E., Schwer, A., McCammon, R., Kavanagh, B., Bassetti, M., ... Rabinovitch, R. (2008). Outcomes and Effect of Radiotherapy in Patients With Stage I or II Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Analysis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 72(5), 1465–1471. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.02.068
- Ben-Bassat, H., Polliack, A., Shlomain, Z., Kohn, G., Hadar, R., Rabinowitz, R., ... Schlesinger, M. (1992). Farage, a Novel Early B Cell Lymphoma Cell Line with Trisomy 11. *Leukemia and Lymphoma*, 6(6), 513–521. doi:10.3109/10428199209053591



- Bonnet, C., Fillet, G., Mounier, N., Ganem, G., Molina, T. J., Thiéblemont, C., ... Reyes, F. (2007). CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: A study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, 25(7), 787–792. doi:10.1200/JCO.2006.07.0722
- Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sängner, M., Schmidberger, H., & Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiation Oncology*, 7, 1. doi:10.1186/1748-717X-7-1
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019–5032. doi:10.1182/blood-2011-01-293050
- Chen, Q., Chai, Y.-C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R. M., Chisolm, G. M., & Almasan, A. (2003). The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Differentiation*, 10(3), 323–334. doi:10.1038/sj.cdd.4401148
- Chen, X., Liao, C., Chu, Q., Zhou, G., Lin, X., Li, X., ... Yue, Z. (2014). Dissecting the molecular mechanism of ionizing radiation-induced tissue damage in the feather follicle. *PloS One*, 9(2), e89234. doi:10.1371/journal.pone.0089234
- Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Gonçalves, A. C., Alves, V., Silva, T., Carvalho, C., Oliveira, C. R. De, & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1542–1549. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009

- Gonçalves, A. C., Barbosa-Ribeiro, A., Alves, V., Silva, T., & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Selenium Compounds Induced ROS-Dependent Apoptosis in Myelodysplasia Cells. *Biological Trace Element Research*, 154(3), 440–447. doi:10.1007/s12011-013-9749-x
- Horning, S. J., Weller, E., Kim, K., Earle, J. D., O'Connell, M. J., Habermann, T. M., & Glick, J. H. (2004). Chemotherapy with or without radiotherapy in limited-stage diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1484. *Journal of Clinical Oncology*, 22(15), 3032–3038. doi:10.1200/JCO.2004.06.088
- Hudson, B., Hudson, G., MacLennan, K., Anderson, L., & Linch, D. (1994). Clinical Stage-1 Non-Hodgkins-Lymphoma - Long-Term Follow-Up of Patients Treated By the British National Lymphoma Investigation With Radiotherapy Alone As Initial Therapy. *British Journal of Cancer*, (69), 1088–1093. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/42259/>
- Kaminski, M. S., Coleman, C. N., Colby, T. V., Cox, R. S., & Rosenberg, S. a. (1986). Factors predicting survival in adults with stage I and II large-cell lymphoma treated with primary radiation therapy. *Annals of Internal Medicine*, 104(6), 747–756. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3518561>
- Laranjo, M., Serra, A. C., Abrantes, M., Piñeiro, M., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J., ... Botelho, F. (2013). 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(1), 51–61. doi:10.1016/j.pdpdt.2012.05.003
- Lee, J. H., Kim, S. Y., Kil, I. S., & Park, J.-W. (2007). Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13385–94. doi:10.1074/jbc.M700303200



Lien, J.-C., Huang, C.-C., Lu, T.-J., Tseng, C.-H., Sung, P.-J., Lee, H.-Z., ... Lu, T.-L. (2015). Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 453679. doi:10.1155/2015/453679

Loriot, Y., Mordant, P., Dugue, D., Geneste, O., Gombos, A., Opolon, P., ... Deutsch, E. (2014). Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, 5, e1423. doi:10.1038/cddis.2014.365

Mamede, A. C., Pires, A. S., Abrantes, A. M., Tavares, S. D., Gonçalves, A. C., Casalta-Lopes, J. E., ... Botelho, M. F. (2012). Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1049–1057. doi:10.1080/01635581.2012.713539

Martinelli, G., Gigli, F., Calabrese, L., Ferrucci, P. F., Zucca, E., Crosta, C., ... Moreno Gomez, H. (2009). Early stage gastric diffuse large B-cell lymphomas: results of a randomized trial comparing chemotherapy alone versus chemotherapy + involved field radiotherapy. (IELSG 4). [corrected]. *Leukemia & Lymphoma*, 50(6), 925–931. doi:10.1080/10428190902912478

Mendes, F., Domingues, C., Teixo, R., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Nobre-Gois, I., ... Rosa, M. S. (2015). The importance of radiotherapy on diffuse large B cell lymphoma treatment: a current review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(3), 511–525. doi:10.1007/s10555-015-9581-1

Mendes, F., Sales, T., Domingues, C., Schugk, S., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., ... Rosa, M. S. (2015). Effects of X-radiation on lung cancer cells: the interplay between oxidative stress and P53 levels. *Medical Oncology*, 32(12), 1–9. doi:10.1007/s12032-015-0712-x

Miller, T. P., Dahlborg, S., Cassady, J. R., Adelstein, D. J., Spier, C. M., Grogan, T. M., ... Fisher, R. I. (1998). Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 339(1), 21–26. doi:10.1056/NEJM199807023390104

- Monfardini, S., Banfi, a., Bonadonna, G., Rilke, F., Milani, F., Valagussa, P., & Lattuada, a. (1980). Improved five year survival after combined radiotherapy-chemotherapy for stage I-II non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 6(2), 125–134. doi:10.1016/0360-3016(80)90189-3
- Montero, J., Dutta, C., van Bodegom, D., Weinstock, D., & Letai, A. (2013). p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death and Differentiation*, 20(11), 1465–74. doi:10.1038/cdd.2013.52
- Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartge, P., Weisenburger, D. D., & Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, 107(1), 265–276. doi:10.1182/blood-2005-06-2508
- Ng, A. K. (2007). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 17(3), 169–175. doi:10.1016/j.semradonc.2007.02.002
- Nissen, N. I., Ersbøll, J., Hansen, H. S., Walbom-Jørgensen, S., Pedersen-Bjergaard, J., Hansen, M. M., & Rygård, J. (1983). A randomized study of radiotherapy versus radiotherapy plus chemotherapy in stage I-II non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer*, 52(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406037>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5
- Persky, D. O., & Miller, T. P. (2009). Localized large cell lymphoma: is there any need for radiation therapy? *Current Opinion in Oncology*, 21(5), 401–406. doi:10.1097/CCO.0b013e32832f3c8b
- Persky, D. O., Unger, J. M., Spier, C. M., Stea, B., LeBlanc, M., McCarty, M. J., ... Miller, T. P. (2008). Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group Study 0014. *Journal of Clinical Oncology*, 26(14), 2258–2263. doi:10.1200/JCO.2007.13.6929

- Phan, J., Mazloom, A., Medeiros, L. J., Zreik, T. G., Wogan, C., Shihadeh, E., ... Dabaja, B. S. (2010). Benefit of consolidative radiation therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4170–4176. doi:10.1200/JCO.2009.27.3441
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 49, 15–17. doi:10.3791/2573
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., ... Staudt, L. M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937–1947. doi:10.1056/NEJMoa012914
- Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Gonçalves, C., Sarmiento Ribeiro, A. B., ... Abrantes, M. (2014). Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 273–81. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.008
- She, Q., Bode, A. M., & Ma, W. (2001). Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular- Signal-regulated Protein Kinases and p38 Kinase Resveratrol-induced Activation of p53 and Apoptosis Is Mediated by Extracellular-, 1604–1610.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, E. Al. (2008). *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. (I. A. for R. on C. Cancer, Ed.). Lyon.
- Weisenthal, L. M., Marsden, J. A., Dill, P. L., Macaluso, C. K., & Cindy, K. M. (1983). A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of Human Tumors A Novel Dye Exclusion Method for Testing in Vitro Chemosensitivity of. *Cancer Research*, 43, 749–757.

- Wu, G. S. (2004). The Functional Interactions Between the p53 and MAPK Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 3(2), 156–161.
- Yamaguchi, M., & Kashiwakura, I. (2013). Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PloS One*, 8(7), e70503. doi:10.1371/journal.pone.0070503
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 260–270. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033

Irradiação da linha celular de linfoma... | F. Mendes, C. Domingues, S. Schugk, A. Abrantes, A. Gonçalves, T. Sales, R. Teixo, R. Silva, J. Estrela, M. Laranjo, J. Casalta-Lopes, C. Rocha, P. Simões, A. Sarmento, M. Botelho & M. Rosa



Parte 4

Domínio das Engenharias

Iluminação do Centro Histórico da Aldeia de Casteição: Proposta de Intervenção

Patrícia Santos e Abreu, Cristina Faustino Agreira
& Manuel Travassos Valdez

Artigo integrado na
Parte 4 "Domínio das Engenharias"
da publicação.

Páginas do artigo
235-255

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Patrícia Santos e **Abreu**

Licenciada em Engenharia Electrotécnica e Mestre em Automação e Comunicações em Sistemas de Energia pelo Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, tendo concluído estes graus em 2008 e 2011, respetivamente. Desde 2012 que frequenta o Doutoramento em Engenharia Electrotécnica e de Computadores na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, na área de especialização de Energia. A nível profissional é assistente convidado, a tempo parcial, desde 2010, no IPC/Instituto Superior de Engenharia de Coimbra e exerce o cargo de formadora noutras entidades. Os seus interesses de pesquisa prendem-se com os sistemas elétricos de energia, as smartgrids, os sistemas de proteção elétrica das redes e a luminotecnia. Publicou alguns artigos de pesquisa em conferências internacionais, bem como artigos em revistas internacionais.

Cristina Faustino **Agreira**

Licenciada em Engenharia Electrotécnica e Mestre em Automação e Comunicações em Sistemas de Energia pelo Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, tendo concluído estes graus em 2008 e 2011, respetivamente. Desde 2012 que frequenta o Doutoramento em Engenharia Electrotécnica e de Computadores na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, na área de especialização de Energia. A nível profissional é assistente convidado, a tempo parcial, desde 2010, no IPC/Instituto Superior de Engenharia de Coimbra e exerce o cargo de formadora noutras entidades. Os seus interesses de pesquisa prendem-se com os sistemas elétricos de energia, as smartgrids, os sistemas de proteção elétrica das redes e a luminotecnia. Publicou alguns artigos de pesquisa em conferências internacionais, bem como artigos em revistas internacionais.



Manuel Travassos **Valdez**

Recebeu o seu diploma e grau de Mestre em Engenharia Eletrotécnica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), Portugal, em 1980 e em 1995, respetivamente. Recebeu o seu diploma de Doutoramento em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Portugal, em 2013. Em 1981, entrou para o Instituto Politécnico de Coimbra (ISEC) e atualmente ocupa o cargo de Professor Adjunto. Atualmente é docente responsável por unidades curriculares de análise de circuitos elétricos e projetos de sistemas de energia elétrica da licenciatura. O seu interesse principal de pesquisa inclui TIC no ensino, e-learning, realidade virtual, laboratórios virtuais. Publicou vários artigos de pesquisa em congressos nacionais e internacionais, assim como capítulos de livro e artigos em revistas internacionais.

Iluminação do Centro Histórico da Aldeia de Casteição: Proposta de Intervenção

Patrícia Santos e Abreu, Cristina Faustino Agreira &
Manuel Travassos Valdez

A luz condiciona a maneira de ver e sentir o mundo, é fonte de iluminação, inspiração e sentido (Olliveira, 2015). É o parâmetro mais importante a ter em atenção quando é necessário realizar projetos de iluminação. Com o aumento da popularidade da sustentabilidade e eficiência energéticas torna-se vital adaptar os espaços exteriores, respeitando a sua componente histórica, para que possam ser admirados, não apenas de dia. A preocupação com o conforto, segurança e estética são aspetos importantes.

A iluminação pública decorativa é sem dúvida, uma área que deve ser explorada e alvo de alguma exigência tanto pelo projetista, como pelo dono da obra e evidentemente por quem dela usufrui. Durante anos esta exigência não se verificou e observam-se, agora, zonas históricas, parques, jardins e monumentos, que apresentam uma carência de iluminação que provoca o afastamento das pessoas desses mesmos locais.

Um projeto de iluminação de uma fachada ou monumento é uma atividade também artística, exigindo um estudo detalhado desses locais. Uma das tarefas do projetista de iluminação é a de decidir que características do prédio são mais atraentes e assim desenvolver o projeto tentando realçar essas mesmas características. A técnica correta de se iluminar uma fachada não se encontra, somente, baseada em princípios de engenharia de iluminação, é também necessária uma compreensão a respeito dos valores estéticos da arquitetura do local.

Com o avanço da tecnologia podem-se obter diversas formas eficientes e eficazes de se elaborar um projeto luminotécnico, visando a eficiência energética e a sustentabilidade dos sistemas de iluminação (Cabrita, C., Tavares, B., Bento, V., 2008).

A iluminação do centro histórico da aldeia de Casteição, do concelho de Mêda, distrito da Guarda, foi um trabalho de investigação desenvolvido no âmbito de um protocolo assinado em 2008 entre o Instituto Superior de Engenharia de Coimbra/DEE, a Câmara Municipal de Mêda e a Junta de Freguesia de Casteição, com vista à recuperação da iluminação do centro histórico. Este trabalho, inserido na unidade curricular de Projeto de Sistemas de Energia Elétrica, do 3º ano da Licenciatura em Engenharia Eletrotécnica, teve como principal objetivo a iluminação direcionada para os monumentos e fachadas mais importantes da aldeia de Casteição, integrando os alunos na utilização da aprendizagem baseada em problema (PBL- *Problem Based Learning*).

Atualmente, as Instituições de Ensino Superior devem saber preparar o aluno para enfrentar um mercado altamente competitivo, no qual as soluções para problemas devem assentar sobre conceitos científicos perfeitamente formados. A aprendizagem cooperativa envolvendo os alunos a trabalhar em equipa, proporciona o desenvolvimento de novas competências, tais como a interdependência positiva, a responsabilidade individual, a promoção da interação face-a-face, o uso apropriado de capacidades de colaboração assim como o “*self-assessment*” da própria equipa.

O presente trabalho de investigação foi realizado através do recurso ao *software* DIALux 4.3, um dos principais softwares de simulação luminotécnica, bastante utilizado por arquitetos, engenheiros, decoradores e estudantes. Este *software* permite criar uma visualização tridimensional realística dos ambientes, selecionar luminárias e simular o ambiente, com a presença de luz natural e artificial e com a possibilidade de produzir filmes para apresentação.

Estratégia de Ensino e Aprendizagem

Na unidade curricular de Projeto de Sistemas de Energia Elétrica, foi incluída uma nova forma de ensino e aprendizagem, o PBL. Nesta metodologia os alunos desempenharam um papel importante, no cenário apresentado, através de um ambiente virtual muito semelhante ao mundo real. Os objetivos de

aprendizagem da simulação foram pré-definidos e disponíveis para estudantes, que foram obrigados a criar estratégias para atingir esses objetivos. O cenário que eles receberam levantou um número de questões e problemas. O desafio foi identificar e abordar as questões e problemas e a sua própria perspectiva e ver como poderiam lidar com eles de forma criativa. Isto é considerado tão importante quanto explorar criativamente outros problemas que o acham que podem estar relacionados com as questões levantadas.

Os alunos foram agrupados em equipas de quatro a fim de maximizar o potencial de aprendizagem desta simulação, mantendo a dinâmica de grupo, particularmente a comunicação e habilidades interpessoais necessárias. Eles também eram obrigados a tomar em consideração todas as obrigações legais e industriais usadas em contextos de vida real (Bodemer, 2004). No final do semestre, todos os alunos participaram de um fórum presencial para discutir quaisquer questões relevantes levantadas durante o processo. O fórum foi usado para a reunião de estudantes, professores e profissionais interessados no campo do *design* de iluminação. As discussões envolveram os benefícios deste modo ensino em particular e a estratégia de aprendizagem para ambas as partes envolvidas, professores e alunos.

Foi possível adaptar o conteúdo das matérias da unidade curricular e as atividades de aprendizagem em resposta ao desenvolvimento durante a simulação. A avaliação consistiu em rever e refletir sobre o conhecimento conceitual e compreensão do trabalho como engenheiro de *lighting design*, bem como as aptidões, em participar o trabalho em equipa, usando recursos de simulação.

Envolvimento dos alunos

Neste trabalho de investigação um grupo de alunos mostrou-se interessado no tema proposto. Com base no objetivo proposto integraram uma equipa, focaram-se no problema, planearam e determinaram a metodologia mais apropriada para o alcançar. Foi necessário avaliar e discutir o problema em

grupo e analisar os aspetos mais significativos. Os alunos foram orientados por dois docentes e todos eles tiveram acesso a recursos experimentais, de teste assim como recursos de computação, tendo sido integrados num Laboratório.

Neste projeto, os alunos participaram como agentes ativos no processo de aquisição de conhecimento, aprendendo a comandar as diferentes ferramentas e recursos disponíveis. Assim, estavam ativamente envolvidos nos seus papéis. Foi utilizado um instrumento de avaliação anónimo no final do curso, a fim de obter um feedback objetivo dos alunos participantes (J. Zhang, Chen, & Reid, 2000).

A simulação forneceu uma variedade de oportunidades para os alunos interagirem uns com os outros. Com a simulação os alunos foram capazes de “*practice skills*” e explorar áreas sensíveis. A maioria dos alunos classificaram a eficácia da simulação como sendo alta ou muito alta. Estas conclusões deram um feedback muito positivo para o uso de simulações de ambiente virtual para promover a compreensão sobre os conteúdos, competências e valores relevantes para o projeto proposto.

O projeto exigiu que os alunos adquirissem uma reflexão crítica e ampliassem os seus conhecimentos e compreensão das principais questões. O projeto substituiu os tutoriais/seminários presenciais convencionais e promoveu um contato frequente entre os alunos e os professores. Isto exigiu que os alunos examinassem os seus próprios comportamentos e tivessem em consideração os dos outros. O projeto de simulação permitiu um aumento na comunicação e reforçou o senso de comunidade entre os alunos.

Foi considerado muito positivo o facto de que os alunos não tiveram dificuldades em aceitar as opiniões dos colegas, em colaborar/trabalhar com os outros, em ajudar os outros, em ser um amigo e terem conseguido manifestar as suas opiniões e ideias.

Estas estratégias resumem as atitudes fundamentais, para o trabalho cooperativo. Os alunos reconheceram os benefícios destas estratégias, apesar de



terem alguma dificuldade em trabalhar com alguns dos seus companheiros de grupo. O trabalho cooperativo fomentou o trabalho em equipa. O entusiasmo e a capacidade de trabalhar com os outros são aptidões que eles tiveram que desenvolver na escola. De um modo geral, pode concluir-se que a experiência teve um impacto positivo na forma como os alunos aprenderam.

A aprendizagem cooperativa é um processo dinâmico em que os alunos trabalham em equipa, tendo um objetivo comum a alcançar com a realização do trabalho de investigação (Faust & Paulson, 1998).

O método de aprendizagem cooperativo difere substancialmente dos métodos clássicos. Representa um novo paradigma de ensino com muitas vantagens que podem proporcionar uma grande melhoria na aprendizagem ao longo da vida (Felder & Brent, 2001).

O PBL é, pois, uma metodologia que ajuda os alunos a explorar e a utilizar os seus próprios recursos, e pode ser aplicada a um largo espectro de matérias. Os problemas são usados para motivar o interesse dos alunos e iniciar a aprendizagem, trabalhando cooperativamente em grupos na procura de soluções para os problemas (J. W. Zhang, Chen, Sun, & Reid, 2004). A estratégia educativa PBL, sendo uma metodologia de aprendizagem ativa, foi usada e adaptada neste trabalho de investigação. Esta metodologia é considerada uma forma de fomentar a aprendizagem dos alunos, de modo a aumentar a sua aprendizagem e motivação, assim como melhorar o ambiente na sala de aula. É um modo eficaz de aumentar o nível de realização e de atitude dos alunos.

Muitos alunos estavam motivados para aprender e tentaram realizar todas as atividades, esclarecer as suas dúvidas e resolverem todos os problemas que ocorreram. A grande maioria assumiu que adquiriram uma grande quantidade de informações, compreensão e competências sobre o assunto, e que foi muito útil. Alguns alunos pediram aos seus colegas ajuda para resolver alguns problemas, promovendo uma aprendizagem *peer-to-peer* (Mazur, E. 1997). Alguns alunos sentiram que as estratégias de cooperação nem sempre foram muito eficazes.

Trabalho de Investigação: a Aldeia de Casteição

Na conceção de uma instalação de iluminação é exigido ao projetista o cumprimento integral dos níveis de iluminação adequados a cada situação, evitando assim o efeito “poluição luminosa”.

Este efeito é hoje bastante visível nos grandes centros urbanos, e vai no sentido contrário às exigências europeias e mundiais quanto à racionalização energética. É nesta área que a utilização de equipamentos mais eficazes se traduzirá em reduções significativas de consumos energéticos. Hoje em dia, o principal objetivo é instalar equipamentos que proporcionem níveis de iluminação necessários ao desempenho das atividades, reduzindo quer o consumo de energia elétrica quer os custos de manutenção dos sistemas.

As diversas iluminações, hoje presentes nas nossas ruas, podem ser divididas em diretas e indiretas. Diretas são aquelas que estão implementadas no espaço público e que podemos classificar em iluminação pública, iluminação patrimonial, iluminação comercial, iluminação operativa, iluminação artística, e iluminação efémera. Já a iluminação indireta fornece um ambiente agradável que permite enquadrar as formas arquitetónicas, podendo reforçar as construções resistentes e pesadas que podem ser atenuadas graças ao efeito indireto, para que todos os elementos sejam evidenciados. A criação de cadeias de iluminação indireta longas e sem sombras fornece uma sensação extra de espaço.

Uma iluminação pública que tem como função primordial garantir um nível de luz das ruas, praças, vias, jardins e que torne viável e confortável utilizar estes locais durante a noite. É um tipo de iluminação com relevo urbanístico e arquitetónico pois, quando devidamente trabalhada e articulada com as outras formas de iluminação tem capacidade para, além de garantir níveis de iluminação suficientes para a utilização do espaço público, fomentar percursos, assinalar pontos relevantes, distinguir locais e gerar interesse. No caso da iluminação pública, esta deve assentar nos seguintes pontos:



- Desencorajar assaltos, roubos e agressões;
- Proporcionar a sensação de segurança;
- Ser economizadora de energia;
- Ter índices mínimos de falha e de manutenção;
- Ser o embelezamento das cidades e conforto dos cidadãos.

Quanto à iluminação patrimonial, presente neste trabalho, é a que incide sobre monumentos e edifícios relevantes (pela sua história, arquitetura, ou pelas suas funções) de forma a enfatizar essa relevância e as suas qualidades arquitetônicas e/ou esculturais. É uma iluminação com grande potencial artístico e de atração. É sobre este tipo de iluminação que se debruçam a maioria dos trabalhos de *design* de iluminação de exteriores (Neto, 2009).

Um projeto de iluminação deve referenciar a promoção do brilho, os elementos entendidos como mais importantes da composição. Esta relação de valor de um elemento perante o todo e, consequentemente, o destaque pela luz define o direcionamento do olhar dentro do campo visual no período noturno, já que somos atraídos pelo seu brilho. Assim, o projeto de iluminação deve estabelecer um critério hierárquico para garantir que o observador seja atraído por algo que justifique a sua atenção, caso contrário a solução perde valor e a cena torna-se frustrante (Cabrita, C., Tavares, B., Bento, 2008).

Além do uso de luz branca na iluminação de edifícios, o uso da luz colorida é cada vez mais frequente, seja com a aplicação de filtros ou usando fontes que emitem luz num único comprimento de onda, como o LED (*Lighting Emitting Diode*). Estas soluções produzem transformações controversas no objeto e com um significado gráfico intenso que deve ser fundamentado com a tipologia da arquitetura. Muitos profissionais questionam a aplicação da luz colorida na iluminação de edifícios, pois o efeito final pode facilmente tornar-se excessivamente apelativo e desorientar o observador, já que distorce a compreensão natural dos materiais. Na maior parte dos casos, este uso da luz fica restrito a situações específicas, como demonstrações temporárias e iluminação para eventos (Varandas et al, 2007).



Trabalho desenvolvido

Este projeto de investigação foi alvo de um estudo tendo em consideração o local a iluminar, o tipo de iluminação e a escolha das luminárias, tendo em atenção as vantagens e desvantagens no sentido de evitar o desconforto aos seus utilizadores. Estando a aldeia de Casteição inserida numa zona histórica foi necessário fazer o levantamento histórico do local.

Em primeiro lugar, foi necessário identificar todos os edifícios e espaços que merecessem relevância devido ao seu elevado valor histórico.

Elaborado o registo dos edifícios com maior importância, os alunos procederam a um levantamento da iluminância existente nas zonas escolhidas, através de registo fotográfico e registo luminotécnico com a ajuda de um luxímetro. Verificaram existir uma iluminação deficitária e sombria, que potencializava o êxodo de visitantes e/ou turistas e criava condições favoráveis ao vandalismo e à insegurança.

Sendo a aldeia de Casteição um local de encontro e lazer entre os habitantes e dado o seu elevado valor histórico optou-se por uma iluminação que desse destaque aos principais valores edificados e que, em simultâneo, fosse criado um efeito visual inovador, juntando a harmonia à sobriedade.

Neste projeto foram tidos sempre em conta fatores económicos, nomeadamente, o custo das luminárias e o custo de manutenção. Com tal intuito foram definidas zonas de estudo pormenorizado, onde se localizavam os pontos mais importantes.

Após a realização do levantamento das zonas importantes os alunos procederam ao desenvolvimento e construção das zonas a iluminar na aldeia, com o *software* DIALux, conforme ilustrado nas Figuras 1 a 6. Todas as texturas apresentadas foram desenhadas pelos alunos.



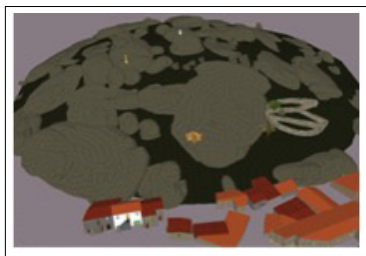


Figura 1. Simulação do Morro do Castelo (DIALux, 2008).



Figura 2. Campanário (DIALux, 2008)



Figura 3. Pelourinho (DIALux, 2008).



Figura 3. Igreja Matriz (DIALux, 2008).



Figura 5. Torre do Relógio (DIALux, 2008).



Figura 6. Fontanário e Capela de Santo André (DIALux, 2008).

Tendo em conta toda a sua componente histórica, este projeto deu prevalência aos edifícios/monumentos, nunca esquecendo a vertente lúdica. O presente trabalho foi elaborado segundo os seguintes princípios orientadores:

- Os edifícios considerados de maior relevância tiveram uma iluminação mais incisiva, com o objetivo de dar realce aos seus valores arquitetônicos e históricos;
- Aplicou-se uma distribuição o mais uniforme possível das luminárias ao longo da Praça, de modo a obter um nível constante de luminância;
- O valor médio da luminância situou-se acima de 50 lux, com o intuito de dar uma maior luminosidade à Praça;
- Criou-se um ambiente inovador, através da aplicação de luminárias usando LEDs no pavimento, de forma a criar um “pequeno nevoeiro multicolor”, transmissor de virtualidade.

Na implementação e seleção das luminárias foram tidos em conta o tipo de lâmpada, material da luminária, índice de proteção (IP), classe de isolamento (IK), resistência ao choque, custo das luminárias e de manutenção, no sentido de escolher o tipo de iluminação adequado, bem como garantir a eficiência energética na escolha da iluminação.

Na Igreja Matriz pretendeu-se que a fachada fosse destacada, tendo-se optado pela iluminação rasante. A Figura 7, do lado esquerdo, ilustra a representação tridimensional da distribuição da luz que incide na fachada, através das luminárias utilizadas, bem como a iluminação no largo da Igreja.

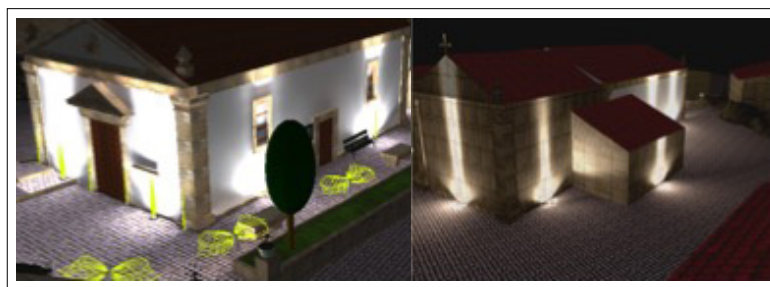


Figura 7. Simulação da iluminação na Igreja Matriz, na figura da esquerda a frente e lateral e na direita a parte de trás da Igreja, com iluminação rasante (DIALux, 2008)



Outros locais importantes, iluminados, foram o Campanário, Torre do Relógio e Pelourinho.



Figura 8. Simulação da iluminação do Campanário (DIALux, 2008).



Figura 9. Simulação da iluminação da Torre do Relógio (DIALux, 2008).



Figura 10. Simulação da iluminação do Pelourinho (DIALux, 2008).

Com a elaboração deste projeto de iluminação, toda a Aldeia de Casteição fica a ganhar com uma iluminação, que transmite mais vida, mais segurança e mais conforto não só aos seus habitantes como também aos turistas que a visitam, dado que nas zonas centrais já não existem locais sem iluminação e são destacadas, através da iluminação, as partes mais importantes da aldeia.

Resultados do trabalho de investigação

Os benefícios da aprendizagem ativa e cooperativa são, essencialmente, o melhorar a motivação para a aprendizagem e o aumento do amor-próprio e auto confiança dos alunos. A aprendizagem cooperativa mudou muito as práticas de aprendizagem dos alunos, passando estes mais tempo a estudar e a analisar cada uma das matérias do curso. Este estilo de aprendizagem torna os alunos mais confiantes no modo como apresentam as suas ideias científicas. Os alunos que trabalham nestes projetos são estimulados, compelidos a pesquisarem e promoverem capacidades de pensamento críticas. Neste ambiente cooperativo é esperado um aumento significativo na motivação para aprender e na aprendizagem ao longo da vida.

O ambiente de aprendizagem ativo e cooperativo incentiva alunos a comunicar uns com os outros. Os alunos sabem que os seus colegas dependem do seu desempenho individual. Cada um pode construir e interpretar a realidade, baseada nas suas próprias experiências e conhecimentos. Isto dá-lhes mais responsabilidade para decidir o que aprender, quando aprender e como aprender. Os alunos receberam tarefas idênticas que na prática podem fornecer soluções diferentes.

Com a aprendizagem ativa e cooperativa, os alunos aprendem como discutir, a saber escutar os colegas, a debater e a trabalhar em equipa. Os ambientes de aprendizagem cooperativos incentivam os alunos a expressarem-se aos professores, assim como aos seus colegas. A aprendizagem cooperativa é muito útil para um desempenho futuro da engenharia na indústria, porque enfatiza esforços de grupo e estilos de trabalho e de aprendizagem amigáveis (Agreira, Brandão, & Valdez, 2010).

Conclusão

Neste trabalho foi apresentada uma abordagem prática para a unidade curricular de Projeto de Sistemas de Energia Elétrica. Foi requerido aos alunos a conceção de um projeto de iluminação assistido por computador, utilizando o modelo de aprendizagem baseada em problemas, PBL. Foi possível analisar a vantagem de se usar uma iluminação correta e entender como ferramentas de *software*, como o programa de computador DIALux 4.3, podem ser úteis no estudo de projetos de engenharia de iluminação.

O projeto de simulação serviu para realçar a autenticidade e a aplicação da metodologia de aprendizagem; o projeto de iluminação foi usado para promover aptidões e entendimento para trabalhar colaborativamente. Neste projeto, foi fundamental que os alunos e professores compartilhassem a responsabilidade por manterem-se atualizados com os produtos de aprendizagem provenientes do projeto de simulação. Para além da simulação, a maioria dos contatos entre

os alunos ocorreu espontaneamente ou por acordo mútuo, de acordo com sua própria conveniência.

A integração de PBL gerou o entusiasmo dos alunos a trabalhar em grupos, em problemas do mundo real, beneficiando com esta abordagem a motivação em aprender e a auto estima dos alunos. Os próprios alunos reconheceram o potencial do método. O PBL apoia muitos dos interesses dos professores e das organizações de âmbito profissional. Sobretudo, incentiva os alunos a serem responsáveis pela sua própria instrução. Enfatiza as aptidões de pensamento crítico, compreensão, aprendendo como aprender, e trabalhando de modo cooperativo com outros.

Os benefícios de PBL são bem vistos no modo como os alunos melhoraram o estudo e a análise de projetos. Os alunos que usaram esta abordagem atingiram mais altas classificações do que alunos em cursos tradicionais, tendo mesmo a maioria encontrado emprego na área da iluminação. Sem dúvida que foi visível que a participação pessoal e a interação se manterem muito positivas, apresentando um elevado grau de responsabilidade, e desenvolvendo as aptidões necessárias para enfrentar o mundo real.

Este projeto, desenvolvido num semestre, provou ser agradável e desafiador para todos os envolvidos. Entretanto, deve ser reconhecido que requer uma quantidade muito grande de recursos, humanos e outros, quando comparados com a abordagem tradicional.

Foi no sentido de dar uma “nova luz” à Aldeia de Casteição, que este projeto se inseriu. Pretendeu-se que, no final, esta aldeia tenha implementado uma iluminação que esteja de acordo com o seu quadro arquitetónico sem ferir suscetibilidades, realçando os seus monumentos, criando o conforto a harmonia e a segurança a quem por lá se passeie. No entanto, por razões de natureza económica o projeto não pode ser implementado.

Com o presente trabalho de investigação, os alunos envolvidos adquiriram múltiplos conhecimentos sobre iluminação, especialmente na iluminação de

monumentos e fachadas, espírito crítico e de equipa, bem como respeitar os colegas e acima de tudo ganhar a noção de responsabilidade que um projeto pode exigir.

Agradecimentos

Este trabalho de investigação foi desenvolvido pelos alunos: Bruno Tavares, Carmen Cabrita, Daniela Santos, João Abreu, João Santos, Patrícia Santos, Vera Bento, Vera Lopes e Victor Varandas.

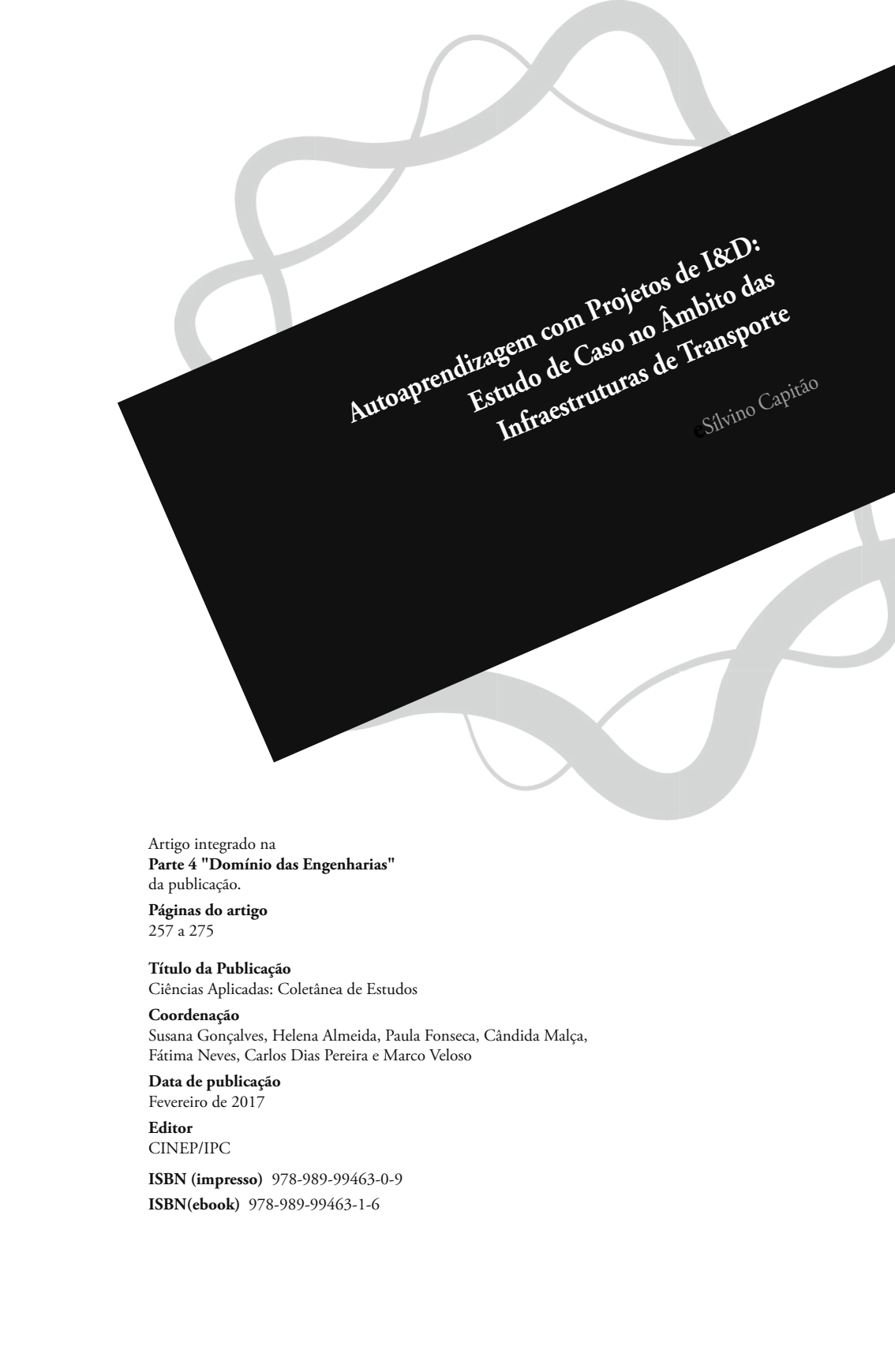


Referências

- Agreira, C. F., Brandão, R. M., & Valdez, M. M. T. (2010). O sucesso da aprendizagem activa e cooperativa nos cursos de especialização tecnológica. XI International Conference on Engineering and Technology Education, INTERTECH'2010.
- Bodemer, D. (2004). Enhancing Simulation-Based Learning through Active External Integration of Representations. In *Proc. 26th Annual Meeting of the Cognitive Science Society, CogSci*. Chicago.
- Cabrita, C., Tavares, B., Bento, V. (2008). *Projecto Luminotécnico da Aldeia Histórica de Casteição*. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.
- DIALux. (2008). Resultados da simulação do DIALux.
- Faust, J. L., & Paulson, D. R. (1998). Active learning in the college classroom. *Journal on Excellence in College Teaching*, 9(2), 3–24.
- Felder, R., & Brent, R. (2001). Effective strategies for cooperative learning. *Journal Cooperation & Collaboration in College Teaching*, 10(2), 69–75.
- Neto, A. J. N. (2009). *As Luzes da Cidade – Iluminação Arquitectónica e Urbanística Proposta para Caldas da Rainha*. Instituto Superior Técnico- Universidade Técnica de Lisboa.
- Oliveira, C. (2015). Web Site. Retrieved May 15, 2015, from <http://clebeirdesigner.blogspot.pt/2015/02/a-luz-condiciona-nossa-maneira-de-ver-e.html>
- Varandas, V.M., Marques dos Santos, D. A., Jesus Santos, J.P., Faustino Agreira, C.I., Travassos Valdez, M. M. (2007). An improvement of efficient illumination of the facades of historical monuments. In *2o Congresso Internacional de Engenharia Electrotécnica do ISEC*.

- Zhang, J., Chen, Q., & Reid, D. J. (2000). Simulation-based scientific discovery learning: a research on the effects of experimental support and learners' reasoning ability. In Proc. IFIP *World Computer Congress, ICEUT2000 Educational Uses of Communication and Information Technologies* (pp. 344–350). Beijing.
- Zhang, J. W., Chen, Q., Sun, Y. Q., & Reid, D. J. (2004). Triple scheme of learning support design for scientific discovery learning based on computer simulation: experimental research. *Journal of Computer Assisted Learning*, 20(4), 269–282. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2729.2004.00062.x>





Autoaprendizagem com Projetos de I&D: Estudo de Caso no Âmbito das Infraestruturas de Transporte

Silvino Capirão

Artigo integrado na
Parte 4 "Domínio das Engenharias"
da publicação.

Páginas do artigo
257 a 275

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Silvino **Capitão**

Engenheiro Civil, Especialista em Transportes e Vias de Comunicação pela Ordem dos Engenheiros, doutorado pela Universidade de Coimbra em Engenharia Civil (Urbanismo, Ordenamento do Território e Transportes) e pós-graduado em gestão (Executive MBA). É Professor Coordenador no ISEC, UO do Instituto Politécnico de Coimbra e membro investigador do CERIS/CESUR (Civil Engineering Research and Innovation for Sustainability) no IST (Universidade de Lisboa) desde 2011. Desenvolve a sua atividade na área das infraestruturas de transporte, sendo responsável pelo Laboratório de Pavimentos Rodoviários (LPR). Tem participado em tarefas de cooperação empresarial na área das infraestruturas de transporte, particularmente em trabalhos de consultoria relacionados com Pavimentação Rodoviária e Aeroportuária. Mais recentemente tem lecionado também na área da Logística, do Empreendedorismo e Inovação. É representante do ISEC na Centro Habitat - Plataforma para a Construção Sustentável desde 2007.



Autoaprendizagem com Projetos de I&D: Estudo de Caso no Âmbito das Infraestruturas de Transporte

Silvino Capitão

O curso de mestrado em Engenharia Civil – Especialização em Construção Urbana do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra (ISEC), unidade orgânica do Instituto Politécnico de Coimbra (IPC), iniciou-se em 2008, tendo decorrido até ao momento sete edições. O curso tem a duração de dois anos letivos, sendo constituído por quinze unidades curriculares, doze no primeiro ano e três no segundo, as quais correspondem a 75 ECTS (do Sistema Europeu de Transferência de Créditos). Além disso, no segundo ano, os alunos realizam uma dissertação, um projeto ou um estágio de natureza profissional (no que se segue designado por projeto), correspondente a 45 ECTS.

O projeto é uma componente diferenciadora do curso comparativamente à aprendizagem formal dos alunos de engenharia civil. Até esta fase da sua formação, o processo de ensino/aprendizagem baseia-se em aulas, estruturadas por um docente, que decorrem em regime presencial. Durante o projeto, apenas ocorrem contactos regulares entre o aluno e o orientador para troca de ideias e discussões sobre o trabalho em curso.

Este texto refere-se ao processo de aprendizagem dos estudantes do referido mestrado durante o projeto quando realizado na área das infraestruturas de transporte. Além disso, debruça-se sobre a metodologia seguida, apresentando algumas reflexões sobre os aspetos positivos e negativos do processo de aprendizagem dos alunos.

Aprendizagem em engenharia civil com base em projetos

Alguns autores, como Schon (1987), citado por Gavin (2011), sugerem que

os engenheiros quando atuam na sua profissão refletem durante a ação e, por isso, as competências necessárias à sua formação não podem ser ensinadas num ambiente de sala de aula ou de laboratório mas apenas num estúdio de projeto.

A indústria da engenharia tem uma natureza dinâmica e isso exige uma constante mudança no processo educativo (Toft, Howard, & Jorgensen, 2003, citados por Stewart, 2007). Os modernos programas de formação de engenheiros deveriam preparar os estudantes para cenários que imitam os ambientes que terão de enfrentar enquanto profissionais. A Aprendizagem Baseada em Projetos (ABP) tem ajudado os estudantes, em certa medida, a utilizarem os fundamentos conceituais da engenharia para desenvolver, de forma holística, soluções aceitáveis para problemas de engenharia (Ribeiro & Mizukami, 2005, citados por Stewart, 2007).

Através da ABP os estudantes procuram soluções para problemas não triviais, questionando e refinando perguntas, debatendo ideias, fazendo previsões, concebendo planos e/ou experiências, recolhendo e analisando dados, tirando conclusões, comunicando as suas ideias e resultados a outros (Blummenfeld *et al.*, 1991, referidos por Pomales-García & Barreto, 2014). A inovação conseguida em projetos de I&D não compreende apenas o desenvolvimento de produto mas também o autodesenvolvimento das pessoas envolvidas (Bary & Rees, 2006).

Esta forma de consideração do problema da aprendizagem tem levado a um crescente interesse pela aplicação de ABP. De Graaff & Ravesteijn (2001) referem que a ABP dá a oportunidade para desenvolver competências ao nível do trabalho de equipa, da resolução de problemas e da liderança numa estrutura, verificando-se que os alunos aceitam controlar o que deve ser aprendido e do modo como isso deve acontecer. O *Project Based Learning in Engineering* (PBLE, 2003) refere que a ABP apresenta os seguintes benefícios: melhoria na compreensão; melhoria do contexto e motivação dos alunos; a teoria é compreendida e aplicada numa situação que se assemelha a um cenário laboral; melhoria das competências de comunicação de matérias baseadas na



teoria; capacidade de aplicação da teoria para aplicações reais; melhoria na retenção.

Porém, a aprendizagem da engenharia tende a ser hierárquica, o que pode resultar em falhas quando determinados conceitos essenciais ficam em falta (Perrennet, Bouhutjs & Smits, 2000, referidos por Gavin, 2011). À medida que a aprendizagem de noções essenciais à formação de um engenheiro vai sendo consolidada, maior é o sucesso esperado para uma ABP.

Por exemplo, no programa de mestrado em engenharia civil da *University College Dublin*, com dois anos de duração após o primeiro ciclo de três anos, têm aplicado com sucesso um modelo híbrido no qual os alunos frequentam aulas presenciais convencionais e, em paralelo, participam em módulos que envolvem cerca de 30% da quantidade de trabalho, nos quais resolvem casos de estudo em projetos especialmente concebidos para o efeito (Gavin, 2011).

Outro exemplo, apresentado por Stewart (2007), relata os resultados obtidos num projeto de aplicação de ABP num curso de pós-graduação em engenharia e gestão industrial na Universidade de Griffith. Os resultados sugerem que os estudantes que têm uma maior capacidade de autogestão da sua aprendizagem retiram maior ganho de ambientes de ABP. Segundo aquele autor, esta conclusão não parece ser surpreendente porquanto a APB exige aos estudantes que explorem e reúnam conhecimento, e tomem decisões em tempo útil. Além disso, os estudantes que são proativos e sistemáticos no seu processo de aprendizagem são capazes de recolher dados mais cedo e de tomar decisões de forma mais informada nos diferentes estágios do projeto, produzindo resultados mais completos. Verificaram ainda que os estudantes ficam mais satisfeitos com a ABP porquanto podem explorar os problemas numa forma mais profunda, ganhando mais competências.

Noutro caso em que os projetos se destinavam a resolver problemas concretos da comunidade, Goggins (2012) verificou que os estudantes adquirem um sentido de orgulho e satisfação ligado ao facto do seu trabalho poder ajudar comunidades e que a aprendizagem não é apenas para obter resultados para

ter sucesso num exame. Aquele autor verificou também o sentido de posse do próprio conhecimento por parte dos estudantes que participaram nos projetos.

Os processos de implementação de ABP não estão isentos de obstáculos. Podem referir-se como exemplos a relutância do corpo docente, a falta de capacidade deste para que a ABP dê bons resultados ou a existência de alunos pouco adaptados a uma aprendizagem autodirigida, por terem tido no passado uma aprendizagem predominantemente centrada no professor (Stewart, 2007).

Conceção e desenvolvimento dos projetos de I&D em infraestruturas de transporte

Planeamento e objetivos

Os projetos desenvolvidos no âmbito das infraestruturas de transporte têm sido realizados de forma individual pelos alunos. Porém, alguns projetos foram planeados de forma a obter benefícios de um trabalho colaborativo entre dois ou três estudantes, o que lhes tem permitido um desenvolvimento mais completo dos projetos.

Num período inicial, por proposta do orientador ou do aluno, analisam-se vários problemas reais de engenharia civil com potencial para serem analisados e resolvidos no âmbito do trabalho que se pretende realizar. Esta análise é feita numa sessão de discussão entre o estudante e o orientador, de modo a antever as dificuldades e a delinear possíveis metodologias de trabalho. Tem-se verificado que a sessão de debate inicial é fundamental para cativar o aluno para as diferentes temáticas envolvidas, o que, por um lado, aumenta a sua motivação para a participação em determinado projeto e, por outro lado, o prepara para ultrapassar os obstáculos futuros.

A sessão inicial é o ponto de partida para o planeamento e definição dos objetivos do projeto. Nesta fase, o aluno decide o projeto que vai realizar e, a partir desse instante, passa a demonstrar um certo sentido de posse do projeto



que escolheu.

O orientador e o estudante elaboram um plano, por escrito, no qual identificam as áreas de conhecimento envolvidas, os intervenientes (em geral, o aluno, o orientador e entidades externas) e os pré-requisitos em termos de meios humanos e materiais previsivelmente necessários. É também no plano que se regista a motivação do trabalho e o seu enquadramento, e se estabelecem os principais objetivos a atingir. As várias etapas do projeto e a sua calendarização são também definidas no plano.

O planeamento das ações é um ato de reflexão que permite ao aluno identificar-se com as grandes linhas orientadoras do projeto que terá de realizar: organiza a sua forma de atuar, ajuda a antecipar as dificuldades, estabelece metas importantes, ajuda à programação temporal das atividades e identifica os objetivos a atingir. Este exercício formal, provavelmente nunca antes efetuado pelo aluno, contribui para o desenvolvimento de competências transversais (*soft skills*) imprescindíveis para a atividade profissional futura.

Implementação e *feedback*

A implementação do projeto exige o envolvimento contínuo do orientador e do estudante. Nos casos em que o projeto se baseia em atividades preferencialmente experimentais, é necessário colocar à disposição do aluno as condições materiais indispensáveis à prossecução do plano de ensaios. Além disso, o orientador contribui para estabelecer, quando necessário, pontes com as empresas que podem colaborar no fornecimento de matérias-primas ou informação, para o desenvolvimento do projeto. Noutros casos, os alunos desenvolvem projetos de forma embebida no ambiente profissional e o orientador estabelece a ligação com a entidade de acolhimento, para que o plano inicialmente traçado seja completado com sucesso.

A implementação do projeto inicia-se por um período de leitura orientada sobre as temáticas do mesmo. Trata-se de uma etapa importante porquanto

permite ao estudante adquirir a percepção da envolvente do problema que está a resolver. Além do conhecimento técnico adquirido nesta etapa do projeto, deve ser incentivada a capacidade de pesquisa, de análise e de síntese dos alunos. Ao contrário dos hábitos de aprendizagem passados, o estudante é confrontado com a necessidade de escolher fontes de informação fidedignas e textos relevantes que lhe permitam alcançar o conhecimento necessário para o projeto.

As etapas calendarizadas sofrem desvios por diversas razões: avaria de equipamentos, condições de trabalho de campo não reunidas nos prazos previstos, dados necessários indisponíveis, resultados experimentais inesperados, entre outras. Trata-se da fase habitualmente mais longa e, por isso, aquela que permite ao aluno desenvolver várias componentes das suas competências pessoais: tolerância à pressão, resiliência, manutenção dos níveis de motivação e procura de estratégias alternativas para ultrapassar os obstáculos.

Nesta etapa, continua a ser crucial o apoio consistente do orientador, de modo a contribuir para que as dificuldades se transformem em oportunidades de evolução das competências dos alunos. Há uma clara rutura dos hábitos de aprendizagem dos alunos em relação ao passado e isso leva os estudantes a sentirem-se perdidos e ansiosos, sem capacidade para decidir o que fazer (Bary & Rees, 2006). Por isso, o apoio deve procurar que os alunos expressem os seus receios que possam inibir o desenvolvimento de competências. É também fundamental que o orientador, no seu papel de facilitador, forneça ideias claras sobre o que pode ser feito.

A interação entre o orientador e o estudante deve ser intensa neste período. A realização de sessões de debate e reflexão, com uma periodicidade de cerca de uma semana, é indispensável para dar *feedback* ao aluno sobre o trabalho desenvolvido, quer do ponto de vista da quantidade de tarefas efetuadas, quer em termos da sua qualidade. A este propósito, Usher (1985) refere que a função de suporte aos alunos deve permitir-lhes tomar consciência do conhecimento e competências que adquiriram através das suas práticas de aprendizagem.



Nos casos que servem de base a este texto foram realizadas sessões de acompanhamento semanais, entre o orientador e o aluno, durante as quais o estudante apresentava, de forma informal, o trabalho realizado. Estes momentos de reflexão permitiram discutir ao longo do tempo em que se desenvolveram os projetos, por exemplo, as metas definidas, as ações implementadas e os recursos mobilizados. Os exercícios de reflexão que as sessões envolveram contribuíram bastante para reforçar e confrontar a direção de autoaprendizagem seguida pelo estudante com o ponto de vista de um “especialista” (Bary & Rees, 2006).

Segundo Bary & Rees (2006), o estudante é chamado a sair da representação escolástica clássica da aprendizagem para um ponto de vista mais autónomo e ativo, tomando à sua responsabilidade o processo da sua aprendizagem. Isso implica abandonar uma abordagem centrada no conhecimento para uma abordagem centrada nas competências. O objetivo não é o conhecimento propriamente dito mas a capacidade de o utilizar de forma apropriada.

Resultados

Desde 2010 o autor participou como orientador em cerca de 20 projetos de I&D na área de infraestruturas de transporte, tendo incluído projetos com várias tipologias: uns marcadamente laboratoriais com e sem trabalho de campo associado, outros realizados através da interação com organizações para a análise de informação fornecida por aquelas, e outros, ainda, desenvolvidos em ambiente profissional dentro das organizações parceiras.

Os resultados que se apresentam nesta secção dizem apenas respeito à perspetiva do orientador. A perceção dos alunos sobre as suas aprendizagens e competências adquiridas, assim como as dificuldades experimentadas, são apresentadas mais adiante.

O resultado material de um projeto realizado é um texto, apresentado na forma de dissertação ou relatório. O texto é submetido à apreciação de um júri, o qual inclui docentes de outras escolas de engenharia portuguesas, considerados

especialistas na área dos projetos. A prova pública de avaliação do trabalho compreende uma apresentação por parte do autor do projeto e uma discussão.

Das competências desenvolvidas pelos alunos no âmbito da preparação da prova final, devem destacar-se as relativas à produção de um documento extenso e estruturado. De facto, não obstante a ação de aconselhamento do orientador, os alunos têm de estruturar o documento de forma coerente, em termos da sequência de ideias, e formalmente adequada. Na maioria dos casos, nunca antes os alunos participaram numa tarefa do mesmo género. Por isso, a tarefa que realizam confere-lhes competências ao nível da organização de matérias, da escrita, da capacidade de síntese e de análise, e de edição eletrónica de textos.

Além disso, não raras vezes os alunos utilizam análises prévias aos resultados que obtiveram, recorrendo a aplicações informáticas específicas, como folhas de cálculo eletrónicas, programas de tratamento estatístico de dados, sistemas de informação geográfica, programas de modelação específicos, só para referir alguns. Trata-se, sem dúvida, de uma forma muito proveitosa de adquirir competências transversais necessárias à prática profissional de engenheiro.

Os alunos têm de estruturar a apresentação de forma a evidenciar os aspetos relevantes do projeto que se propuseram desenvolver, da metodologia utilizada, das dificuldades que foi necessário ultrapassar para a prossecução dos objetivos, dos resultados alcançados, e dos trabalhos que deverão ser prosseguidos no futuro para o desenvolvimento de aspetos que não foram cobertos pelo projeto. Em projetos que envolvem alguma complexidade, a clareza da exposição e a capacidade de síntese são competências cruciais para o sucesso da tarefa.

Nos projetos já concluídos, cada um dos alunos participou numa apresentação prévia, seguida de uma sessão de reflexão com o orientador. Este exercício permitiu a análise crítica conjunta da apresentação, ajudando os alunos, por um lado, a identificarem aspetos importantes do projeto, pouco evidenciados na apresentação e, por outro lado, a excluírem tópicos menos relevantes. Além disso, o orientador controlou o tempo de apresentação, o que lhe permitiu



dar indicações para o cumprimento do tempo. Note-se que alguns alunos evidenciaram dificuldades na clareza da apresentação o que foi melhorado com o exercício prévio de reflexão.

A prova pública oral pressupõe a avaliação técnica das matérias tratadas no projeto. Os alunos estão cientes disso e preparam-se habitualmente de forma adequada para um bom desempenho nessa área. Porém, em geral, estão menos preparados para um exercício de argumentação muito comum em provas orais. Ora, verificou-se que o percurso de autoaprendizagem e de sessões de reflexão, sobre as atividades realizadas e as decisões tomadas ao longo do projeto, contribuíram de forma relevante para as competências de argumentação dos alunos. Nalguns casos, verificou-se que os alunos, após cerca de nove meses de atividade no projeto, desenvolveram muito boas capacidades a este nível, o que avaliza o processo de autoaprendizagem seguido.

O ambiente de aprendizagem seguido nos projetos sobre infraestruturas de transportes tem-se mostrado particularmente benéfico para os alunos. Tem-se verificado que o seu desempenho na realização das etapas do projeto, na conceção e escrita do documento final e na prova pública têm superado largamente o desempenho médio dos mesmos alunos na parte do curso com aulas formais, não obstante uma parte significativa daquelas incluírem pequenos projetos e trabalhos práticos. O grau de motivação evidenciado pelos alunos ao longo do projeto é um fator fundamental para os resultados finais, quer no que se refere ao desenvolvimento da parte técnica do projeto, quer no que diz respeito à aquisição de competências transversais.

Dependendo dos níveis de motivação dos alunos e do grau de inovação dos projetos desenvolvidos, os alunos desenvolveram alguns sentimentos de pertença relativamente às técnicas e soluções que estudaram e desenvolveram durante os projetos.

Como corolário de cada um dos projetos desenvolvidos, têm sido apresentados em conferências nacionais e internacionais da especialidade artigos relativos aos projetos desenvolvidos. Trata-se de uma forma de aumentar o nível de

satisfação dos alunos em relação ao trabalho desenvolvido e de lhes permitir o contacto com uma realidade com a qual não tinham qualquer relação anterior.

Percepção dos estudantes em relação ao processo de autoaprendizagem

Recolheu-se informação para avaliar, de forma qualitativa, a percepção dos alunos em relação ao processo de autoaprendizagem que se descreveu, questionando os estudantes envolvidos no processo. De seguida, apresenta-se uma súmula das principais ideias referidas nas respostas a quatro questões.

Nível de competências dos alunos antes do projeto

Cerca de 85% dos alunos que responderam ao questionário referiram que as suas competências técnicas e científicas antes da realização do projeto na área do conhecimento do mesmo eram reduzidas ou mesmo nulas.

No que diz respeito às metodologias de pesquisa de informação, os alunos manifestaram, de forma claramente maioritária, que dispunham das habilidades necessárias adquiridas durante a parte letiva do mestrado.

No que se refere às competências para obtenção e análise de resultados, incluindo a utilização de *softwares* específicos para o efeito, as opiniões dos alunos não apresentam uma tendência clara. Nalguns casos utilizaram *softwares* e competências laboratoriais que já dominavam parcialmente, enquanto noutros casos não dispunham de quaisquer competências em relação a esses aspetos.

Competências dos alunos adquiridas durante o projeto

Os alunos respondentes destacam dentre as competências adquiridas durante o projeto as seguintes:

- Competências transversais: melhoria das rotinas de trabalho; melhoria da capacidade de planeamento e da gestão do tempo; maior foco no cumprimento de objetivos nos prazos estabelecidos; melhoria da capacidade para organizar um documento escrito; maior espírito e capacidade de análise; melhoria da capacidade para escolher a informação mais relevante; melhoria da escrita, utilizando linguagem adequada, clara e objetiva; maior poder de síntese; maior capacidade para explorar assuntos desconhecidos e para identificar lacunas na informação disponível; aprendizagem com os erros; maior capacidade para contornar a adversidade; melhoria da autoconfiança no trabalho; capacidade para analisar os problemas sob vários pontos de vista.
- Competências profissionais: aprofundamento dos conhecimentos sobre o tema o projeto; maior conhecimento das metodologias de recolha de dados e de análise de resultados; consolidação de conhecimentos; alargamento dos conhecimentos sobre temáticas complementares ao projeto; aquisição de experiência laboratorial; maior sensibilidade sobre as propriedades dos materiais decorrente da sua manipulação no laboratório; aquisição de conhecimentos do quadro normativo nacional e europeu aplicável; mais agilidade na utilização de *software* específico.

Dificuldades sentidas em relação ao processo de autoaprendizagem

A lista que se apresenta a seguir resume as dificuldades identificadas pelos alunos:

- gestão do tempo; incerteza sobre a relevância dos dados disponíveis; falta de competências de pesquisa bibliográfica em fontes fidedignas; insuficiente capacidade para a análise da relevância da informação; excesso de informação disponível; utilização da terminologia adequada em língua portuguesa a partir de documentos em inglês e francês; capacidade de escrita; assimilação de conceitos pouco conhecidos; relacionamento de

várias temáticas envolvidas no projeto; estabelecimento de procedimentos laboratoriais quando não normalizados; falta de tempo para a realização das tarefas do projeto e da atividade profissional; necessidade de aprender por um processo de tentativa e erro; dificuldade em cumprir prazos por incumprimentos de terceiros (por exemplo, empresas); insuficiente capacidade crítica e analítica.

Pontos fortes e pontos fracos da autoaprendizagem

Os alunos identificaram um conjunto de pontos fortes e fracos associados ao processo de autoaprendizagem seguido, e que se reproduzem a seguir.

- Pontos fortes: desenvolvimento de um sentimento de responsabilidade, maior nível de autonomia e empenho; melhoria das competências de trabalho em grupo (nos casos aplicáveis); mais segurança na tomada de decisão; identificação de qualidades pessoais desconhecidas, como a persistência em relação às dificuldades; autodisciplina; melhoria da autoconfiança e autonomia; reuniões de reflexão semanais; realização de ensaios laboratoriais e análise dos resultados, para comparação com outros casos de estudo; exploração de capacidades do *software* específico utilizado, de modo a resolver problemas complexos; reuniões de reflexão *online* e com flexibilidade de horário; acesso a muita informação bibliográfica sobre o tema do projeto; acesso a grande diversidade de dados; reflexão sobre diferentes visões de diferentes autores sobre o mesmo tema; realização de um trabalho por etapas, com metas parcelares; necessidade de estruturar muito bem cada etapa; necessidade de organizar os resultados laboratoriais alcançados para análise posterior; desenvolvimento de capacidades de pesquisa, organização de ideias e de escrita.
- Pontos fracos: dependência de terceiros para obtenção de dados; necessidade de uma orientação próxima no início do processo; incumprimento de prazos quando as entidades externas não cumprem as datas estabelecidas; o sucesso da metodologia depende muito da atitude



do orientador e do aluno envolvidos no projeto; alcance de objetivos muito dependente de recursos existentes; falta de qualidade de alguns dados obtidos externamente.

Contributos para a sociedade decorrentes dos projetos de I&D

Os projetos realizados permitiram estudar materiais ou técnicas inovadores ou pouco conhecidos, destinados a conservar, de forma mais sustentável (ou seja, com menos risco para as gerações futuras), estradas e caminhos de ferro, os quais contribuem de forma vital para a mobilidade de pessoas e mercadorias no território e, portanto, para a economia dos países.

Estudou-se a utilização de betão britado (um RCD - resíduo de construção e demolição) como material constituinte de misturas betuminosas para pavimentos rodoviários, em substituição de rocha natural britada. O material obtido tem características que podem ser consideradas adequadas para algumas camadas dos pavimentos, ao mesmo tempo que permite reciclar e valorizar um volume considerável de RCD.

Outro projeto focou-se no estudo de misturas betuminosas com incorporação de granulado de pneus em fim de vida. Dada a boa resistência das misturas com borracha à propagação de fendas, foi possível evidenciar que aquele tipo de misturas têm uma durabilidade superior à das convencionais quando utilizadas como camadas de reforço de pavimentos degradados.

Fez-se uma análise de uma mistura betuminosa temperada, ou seja, que consome menos energia que as convencionais no seu fabrico. Além disso, incorporou-se material reciclado de pavimentos degradados (MBR), e produziu-se uma mistura do tipo SMA, a qual resiste mais em climas quentes como o português. O estudo mostrou que pelo facto da mistura ser temperada e incorporar MBR não influenciou negativamente a sua resistência.

Um outro estudo centrou-se na obtenção de propriedades de misturas betuminosas de acordo com a Diretiva Europeia dos Produtos de Construção,

a qual permite a eliminação de barreiras técnicas ao comércio de produtos de construção no mercado europeu, através da marcação CE. As metodologias (de formulação) que permitem estabelecer as proporções dos diversos constituintes sofreram evoluções consideráveis. Por isso, procedeu-se à formulação volumétrica de uma mistura betuminosa, de modo a evidenciar as diferenças entre a composição que se chega em comparação com as metodologias mais convencionais.

Fez-se a avaliação de características superficiais de camadas de desgaste, como a resistência à derrapagem, quando se utilizam agregados de seixo britado (material abundante na região centro e pouco utilizado). Mostrou-se que a resistência à derrapagem esperada é adequada, garantindo condições de segurança à circulação.

Com base num inquérito realizado a 25 municípios portugueses, ficou a conhecer-se a situação existente sobre as técnicas de conservação utilizadas e o processo de decisão envolvido. Desenvolveu-se uma metodologia simples de apoio à decisão, permitindo maior objetividade no processo na aplicação das ações de conservação dos pavimentos rodoviários dos municípios.

Construiu-se também um modelo físico de um pavimento, para o estudo *in situ* das propriedades das suas várias camadas, formadas por diferentes materiais, durante e após a sua construção, recorrendo a diversos equipamentos ligeiros que têm a capacidade de utilizar métodos não destrutivos. Verificou-se que é possível relacionar parâmetros caracterizadores dos materiais obtidos por diferentes processos e de forma rápida.

Analisaram-se as metodologias de inspeção e de manutenção utilizadas em duas redes ferroviárias portuguesas distintas, a da REFER e a do Metro do Porto. As exigências dos utilizadores levam a que as entidades gestoras tenham de administrar da melhor forma possível os seus recursos, para tornarem as redes eficientes, modernas e atrativas para novos utilizadores. O projeto caracterizou a manutenção de vias-férreas realizada em Portugal, comparando o modo de atuação das duas entidades.



Analisaram-se dados recolhidos durante 16 anos na rede rodoviária americana, de modo a estudar a evolução do estado de conservação dos pavimentos, em função das técnicas de conservação aplicadas. Dada a inexistência de dados semelhantes em Portugal, o estudo procurou transpor as conclusões para o território português, tendo em consideração as condições climáticas e de solicitação do tráfego.

Estudaram-se três anos de registos de acidentes na cidade de Coimbra (2010 a 2012). Utilizou-se o parâmetro VHL – valor hierárquico do local como indicador de segurança das vias e das interseções (o VHL associa o volume de tráfego, o número de acidentes e a sua gravidade). A metodologia apresentada é útil para, de forma relativamente simples, apoiar as entidades gestoras na monitorização da segurança rodoviária nas redes rodoviárias urbanas, de forma a reduzir a sinistralidade, ao mesmo tempo que permite àquelas entidades comunicar os resultados à população de forma que a mesma possa entender.

Conclusões

A metodologia de autoaprendizagem que tem sido aplicada no âmbito dos projetos de mestrado em engenharia civil do ISEC, na área das infraestruturas de transporte, é percecionada pelos alunos como benéfica para o desenvolvimento de competências transversais e profissionais, verificando-se um elevado nível de satisfação.

Os resultados qualitativos obtidos estão em linha com as indicações da bibliografia, comprovando-se a utilidade da metodologia, quer para a formação de um engenheiro, quer como contributo para a sociedade decorrente dos projetos de I&D realizados.

Referências

- Bary, R. & Rees, M. (2006). Is (self-directed) learning the key skill for tomorrow's engineers? *European Journal of Engineering Education*, 31(1), 73-81.
- Blummenfeld, P., Soloway, E., Marx, R., Krajcik, J., Guzdial, M. & Palincsar, A. (1991). Motivating Project-Based Learning: Sustaining the Doing, Supporting the Learning. *Educational Psychologist*, 26 (3/4), 369–398.
- Graaff, E. & Ravesteijn, W. (2001). Training complete engineers: global enterprise and engineering education. *European Journal of Engineering Education*, 26 (4), 419–427.
- Gavin, K. (2011). Case study of a project-based learning course in civil engineering design. *European Journal of Engineering Education*, 36 (6), 547-558.
- Goggins, J. (2012). Engineering in communities: learning by doing. *Campus-Wide Information Systems*, 29(4), 238-250.
- PBLE (2003). *A Guide to Learning Engineering through Projects*. Fund for the Development of Teaching and Learning. Project Based Learning in engineering.
- Perrennet, J., Bouhutjs, P. & Smits, J. (2000). The suitability of problem-based learning for engineering education: theory and practices. *Teaching in Higher Education*, 5 (3), 2–16.
- Pomales-García, C. & Barreto, K. (2014). Comparative analysis of student self-reflections on course projects. *European Journal of Engineering Education*, 39 (6), 685-699.
- Ribeiro, L. & Mizukami, M. (2005). Problem-based learning: a student evaluation of an implementation in postgraduate engineering education. *Eur. J. Engng Educ.*, 30, 137–149.



- Schon, D. (1987). *Educating the reflective practitioner: Towards a new design for teaching professional*. New York: Basic Books.
- Stewart, R. (2007). Investigating the link between self directed learning readiness and project-based learning outcomes: the case of international Masters students in an engineering management course. *European Journal of Engineering Education*, 32 (4), 453-465.
- Toft, Y., Howard, P. & Jorgensen, D. (2003). Human-centred engineers – a model for holistic interdisciplinary communication and professional practice. *Int. J. Ind. Ergonom*, 31, 195–202.
- Usher, R. (1985). Beyond the anecdotal: adult learning and the use of experience. *Studies in the Education of Adults*, 1(17), 59–74.

**Projeto PhISEC – 8 anos de
Ensino de Engenharia Aplicada**

Pedro Ferreira & Carlos Alcobia

Artigo integrado na
Parte 4 "Domínio das Ciências das Engenharias"
da publicação.

Páginas do artigo
277 a 291

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Pedro **Ferreira**

Doutorado em Engenharia Mecânica pela Universidade de Aveiro no ano de 2015. É Professor Adjunto no Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, onde leciona unidades curriculares ligadas à tecnologia mecânica (área da maquinagem). Enquadra atualmente os seus principais interesses de investigação no domínio da biomecânica e da maquinagem. É investigador no centro de engenharia mecânica da universidade de Coimbra, membro da ordem dos engenheiros e membro da sociedade portuguesa de biomecânica.

Carlos **Alcobia**

Doutorado em Engenharia Mecânica pela Universidade de Coimbra no ano de 2007. É Professor Adjunto no Departamento de Engenharia Mecânica, do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra. Tem vasta experiência em projetos de IDI nacionais e internacionais em vários domínios do saber. Participou na organização de diversas conferências nacionais e internacionais, tendo publicado diversos artigos em revistas e congressos científicos nacionais e internacionais. É membro da Ordem dos Engenheiros (Colégio de Engenharia Mecânica) e da Society of Automotive Engineers.



Projeto PhISEC – 8 anos de Ensino de Engenharia Aplicada

Pedro Ferreira & Carlos Alcobia

O projeto Formula Student tem por base a constituição de uma empresa fictícia numa instituição de ensino superior, sendo obrigatoriamente constituída por estudantes na qual eles têm de desenvolver o protótipo de um carro de corridas em termos de design e fabrico, acompanhado dos procedimentos inerentes à criação de uma empresa real de fabrico de veículos automóveis, envolvendo diversos conhecimentos técnicos, de gestão financeira e de marketing.

Este projeto permite uma pedagogia dos alunos baseada na resolução de diversos tipos de problemas, desde questões financeiras, organizacionais, administrativas, entre outras. Em termos pedagógicos, este tipo de projeto permite que os alunos desenvolvam competências ao nível do trabalho em equipa com rigorosos prazos a cumprir, exigindo uma motivação, empenho e dedicação que conduz ao seu enriquecimento técnico e profissional durante o seu percurso académico.

No presente artigo serão abordadas diversas questões sobre o Projeto Formula Student, tais como: Quais as mais-valias de participar na Formula Student? Qual o impacto que terá um projeto deste tipo nos alunos? Será possível integrar este projeto no plano curricular das engenharias lecionadas pela escola? Qual a abertura que será dada aos alunos, visto esta ser uma competição a nível mundial? Abrirá portas no estrangeiro? E tendo em conta o conceito da prova, a variedade de áreas abrangidas, será possível trazer a vida empresarial para a formação académica? E interagir com o próprio tecido empresarial?

O que é a Formula Student e como começou?

A Formula Student teve origem em 1981, nos Estados Unidos da América, e no

ano de 1998 decorreu, na Inglaterra, a primeira competição intercontinental entre dois veículos dos EUA e outros dois provenientes da Grã-Bretanha. O sucesso desta iniciativa veio demonstrar que este tipo de evento proporciona o aparecimento de novas ideias no sector automóvel, fruto da natural imaginação de jovens estudantes de engenharia. Atualmente, no Reino Unido, a competição é organizada pelo Institution of Mechanical Engineers (IMechE) em parceria com a Society of Automotive Engineers (SAE) e o Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) (IMechE, 2015; SAE, 2015; IEEE, 2015). Trata-se de um projeto para estudantes que proporciona um exercício, em contexto real, de criação de uma empresa fictícia na qual os alunos têm de desenvolver o protótipo de um carro de corridas em termos de *design* e fabrico, acompanhado dos procedimentos inerentes à criação de uma empresa real de fabrico de veículos automóveis, envolvendo diversos conhecimentos técnicos, de gestão financeira e de marketing. De uma forma resumida, a filosofia da competição Formula Student é a de proporcionar uma competição semelhante a todas as grandes competições atualmente existentes no panorama automóvel mundial (Formula 1, Indy Car Racing, etc.), mas em escala reduzida.

Até à data já participaram na Formula Student cerca de 150 instituições de ensino superior (Figura 1), de 20 países e diferentes zonas do Mundo, desde a Europa, América do Norte, Ásia e Oceânia. Para as instituições de ensino superior, a Formula Student representa um valioso projeto que relaciona a atividade académica com a atividade empresarial, estimulando ainda a criação de ligações entre o ensino e as empresas. A indústria automóvel, quer seja na vertente de utilização quotidiana ou na sua vertente desportiva depende, tal como outras áreas de atividade, da constante necessidade de inovar conceitos, o que implica desde logo uma formação de engenheiros de elevada competência. Para os futuros engenheiros, o envolvimento neste tipo de projeto possibilita-lhes a realização de um exercício intelectual com um conteúdo bastante vasto ao nível das áreas de conhecimento versadas, o que permite valorizar o seu currículo académico.





Figura 1. Imagem de grupo, dos participantes num evento da Formula Student (IMechE, 2015)

A finalidade da competição baseia-se na criação de uma empresa fictícia, cujo principal objetivo consiste na produção de um veículo protótipo para avaliação. O veículo tem que apresentar um elevado desempenho em termos da sua aceleração, travagem, qualidade de construção, fácil manutenção, segurança e, além disso, deve ter um custo de fabrico reduzido. O aspeto da comercialização do veículo também é valorizado através de outros fatores, como é caso da estética e do conforto. A empresa fictícia tem como meta a produção de cerca de 1000 unidades por ano, a um custo unitário inferior a €21.000 (aproximadamente \$USD25.000). O desafio para a equipa é projetar e fabricar um carro protótipo que cumpra estes requisitos. A competição tem como júris especialistas de diversos sectores industriais, sendo de destacar a participação de diversos elementos das equipas de Fórmula 1, podendo apenas participar equipas formadas por elementos de Instituições Académicas reconhecidas. Os membros das equipas têm, obrigatoriamente, de ser estudantes ou recém-licenciados de cursos de engenharia, bem como ser sócios do IMechE, da SAE ou do IEEE. Atualmente, a competição realiza-se nos 4 continentes, tendo as seguintes designações:

- Formula SAE
- Formula Student (UK)
- FSAE Australasia (Australia)
- FSAE Japan

- FSAE Brazil
- FSAE Italy
- Formula Student Germany
- FSAE West (USA)
- Formula SAE at VIR
- Formula Student Austria
- Formula Hybrid

Fundamentos do Projeto

Como já foi referido anteriormente o objetivo da competição é que os estudantes concebam, projetem, fabriquem, e entrem numa competição com um estilo de veículo de reduzidas dimensões. As restrições na estrutura do carro e motor estão limitadas de forma que o conhecimento, criatividade e imaginação dos estudantes seja desafiado. O resultado final é uma grande experiência para os jovens engenheiros, permitindo o desenvolvimento da noção de trabalho em equipa num projeto dedicado. É importante compreender que os benefícios que os futuros profissionais adquirem com uma experiência desta natureza não são exclusivamente aplicáveis ao sector da engenharia automóvel, porquanto diversas áreas versadas são transversais a um vasto leque de ramos de atividade. A prova tem um extenso Regulamento que tem por base o princípio de criar "um desafio de engenharia" muito mais que uma mera "corrida de automóveis". Para se ter uma noção da dimensão da tarefa a realizar, convém lembrar que se trata da conceção, de raiz, de um veículo de competição. Quando uma determinada marca automóvel pretende desenvolver um novo modelo de veículo, isso representa um enorme esforço financeiro e de recursos humanos para a empresa. Devido à magnitude da tarefa proposta, e das dificuldades inerentes à sua realização em ambiente académico, a organização da prova divide as equipas participantes em várias classes de competição, de acordo com o estado de evolução do seu projeto. Até ao ano 2009 o evento dividia-se em quatro classes:



- Classe 1 - apresentação do carro construído
- Classe 1/200 - para veículos de anos anteriores melhorados
- Classe 2 - apresentação do protótipo em tamanho real
- Classe 3 - apresentação do projeto virtual (computador)

A partir de 2010, e com a procura pelas energias alternativas limpas, também a Formula Student evoluiu em termos de regras e, das 4 classes que existiam anteriormente, passaram apenas a existir 3 classes, que são:

- Classe 1 - apresentação dinâmica do veículo
- Classe 1A - apresentação de veículos movidos a energias alternativa
- Classe 2 - apresentação do projeto do protótipo quase construído

Os veículos são avaliados nos seguintes eventos (estáticos e dinâmicos): inspeções técnicas, custo global do projeto, apresentação, design de engenharia, trajetos de desempenho individuais, e performance de resistência em pista. Neste contexto, a participação dos estudantes é feita no pressuposto de que uma determinada empresa de veículos os contratou para produzir um carro protótipo para ser avaliado como um artigo de produção. O mercado de vendas pretendido é o das corridas não profissionais de Autocross. O carro deve ter um elevado desempenho em termos de aceleração, travagem e controlo, bem como deve ter baixo custo de comercialização, apresentar uma fácil manutenção e deverá apresentar bons níveis de segurança.

Estes protótipos são monolugares do tipo Fórmula, onde os propulsores utilizados são geralmente de motas, e que por regulamento não podem exceder os 615 cm³, mas estão limitados por um restritor de 20 mm de diâmetro na conduta de admissão. Estes motores têm performances muito interessantes, visto que os melhores aceleram dos 0 aos 100 km/h em menos de 4 segundos, atingindo facilmente velocidades superiores a 150 km/h. Os monolugares têm pesos entre os 170 kg e 300 kg, com piloto, consoante a opção das equipas em utilizar um ultraleve motor monocilíndrico ou um motor de elevada potência com quatro cilindros.



Tal como anteriormente foi referido, no aspeto da comercialização do veículo são tidos em análise outros aspetos, para além da parte técnica, tais como: a estética, o conforto e uso de partes comuns. A pontuação de cada prova ao qual o veículo será submetido é apresentada nas tabelas seguintes, sendo que uma equipa pode fazer no máximo um total de 1000 pontos.

Tabela 1. *Pontuação dos eventos estáticos*

Apresentação	75
Design do veículo	150
Análise de custos	100

Tabela 2. *Pontuação dos eventos dinâmicos*

Aceleração	75
Skid-Pad	50
Autocross	150
Economia de Combustível	50
Resistência	350

O desafio para os jovens engenheiros consiste em conseguir participar em todos os eventos indicados nas tabelas anteriores, procurando obter a melhor pontuação em cada um deles.

O Projeto Formula Student em Portugal e no ISEC

O Projeto Formula Student em Portugal surgiu inicialmente pelas mãos da Universidade Independente, decorria o ano de 2000, tendo o projeto recebido o nome de “Escuderia AAUni”. A primeira participação de qualquer equipa ibérica neste tipo de evento deve-se à Universidade Independente, que participou na prova que decorreu em Birmingham nos dias 5 a 7 de Julho de 2000 (AAUni, 2000). No ano de 2001, também o Instituto Superior Técnico



(*Projecto FST*) e o Instituto Politécnico de Setúbal (*Formula Student Racing*) iniciaram a sua participação nesta competição.

No ano de 2006, um grupo de alunos do Instituto Politécnico de Leiria iniciaram o Projeto Formula IPLeiria e sensivelmente ao mesmo tempo um grupo de sete alunos do curso de Engenharia Eletromecânica, do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, decidiram que pretendiam participar num desafio aliciante relacionado com a indústria automóvel. Após uma análise cuidada acerca dos diferentes tipos de eventos internacionais nesta área, elegeu-se o Projeto Formula Student, em virtude do elevado nível da concorrência e pelo facto de ser o que abrange um maior número de áreas de conhecimento e assim nasceu o phISEC Racing.

Com alguma divulgação que o projeto foi tendo em Portugal surgiu, no ano de 2007, um grupo de alunos do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro, ao qual se juntaram alunos do Departamento de Comunicação e Artes e do Departamento Eletrónica e Telecomunicações, que criaram o Projecto Engenius - UA Formula Student. Recentemente, entre 2012 e 2013, foi desenvolvido o projeto no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL). Relativamente às participações das Instituições de Ensino nacionais, o Instituto Superior Técnico é a equipa que apresenta mais participações internacionais, seguida do Instituto Politécnico de Leiria, Universidade de Aveiro e o Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, e por fim o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, o Instituto Superior de Engenharia do Porto e o Instituto Politécnico de Setúbal.

Relativamente ao Projeto Formula Student do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, este teve a sua primeira participação no ano de 2007 entre os dias 12 e 15 de Junho no circuito de Silverstone (U.K) (Figura 2). A participação nesse ano foi feita em classe 3 (apresentação do projeto em computador), tendo a equipa phISEC Racing obtido um honroso 6.º lugar num total de 13 equipas participantes.





Figura 2. Participação da equipa phISEC Racing na Formula Student de 2007, no circuito de Silverstone

Depois da primeira etapa ultrapassada, que se constitui na produção de um projeto com capacidade técnica e científica, com validação por parte do Júri, a equipa decidiu que no ano seguinte iria participar em classe 1, ou seja, com a apresentação do carro construído e que consistiu num monolugar com propulsão feita por meio de um motor de combustão interna.

Depois de superar os diversos desafios que foram surgindo, fruto da complexidade do projeto e da dificuldade em arranjar apoios externos à escola para suportar o desenvolvimento do projeto, a equipa conseguiu construir o Phi1 (Figura 3).



Figura 3. Participação da equipa phISEC Racing na Formula Student de 2008, no circuito de Silverstone com o Phi1.de Silverstone

Na participação no evento de 2008, a equipa não teve oportunidade de participar em todas as provas devido a problemas técnicos. No entanto, o

conhecimento adquirido, as mais-valias que vieram do intercâmbio com outras equipas fez com que a participação no evento não fosse considerada como um insucesso, mas sim como o ponto de partida para solucionar o que havia corrido menos bem e melhorar, com vista à participação no evento de 2009, de acordo com a filosofia inerente ao projeto de “*Designing, Building, Competing, Learning...*”

Em Julho de 2009, o ISEC participou, pelo terceiro ano consecutivo, no Formula Student 2009. A equipa foi composta por alunos e professores e, nesta última participação, foi concebido um protótipo com nova performance, tendo como objetivo melhorar a qualificação obtida em 2008. O Phi2, nome atribuído ao veículo Phi1 renovado, fruto da experiência adquirida nas anteriores participações, teve como principais inovações: a redução do peso, o incremento do desempenho dinâmico do veículo, a facilidade de construção e um menor custo de produção. Esta versão participou na Classe 1/200 - para veículos de anos anteriores melhorados, onde obteve mais uma vez um 6.º Lugar (Figura 4).



Figura 4. Participação da equipa phISEC Racing na Formula Student de 2009, no circuito de Silverstone com o Phi2.

Regressados de Inglaterra, e com vontade de fazer sempre melhor, a equipa definiu um novo objetivo: construir o primeiro Formula Student de Portugal movido a energias limpas. Esta aposta surgiu em primeiro lugar pelo facto de

que, a partir de 2010 a Formula Student quis incutir neste tipo de projeto a procura pelas energias alternativas limpas, criando uma classe específica para os protótipos que fossem surgindo a Classe 1A - apresentação de veículos movidos a energias alternativas. Por outro lado, e por condições de regras, qualquer monolugar só pode efetuar duas participações consecutivas neste tipo de evento. Sendo assim, a decisão estava tomada, criar um monolugar totalmente elétrico, o Phi3 (Figura 5).



Figura 5. Formula Student com propulsão elétrica
Phi3 (à esquerda na foto) e o Phi2 (à direita na foto).

Avaliação dos 8 anos do Projeto no ISEC

Apesar das várias participações nos eventos, a estrutura organizativa da equipa apresentou sempre a configuração se apresenta na figura seguinte:

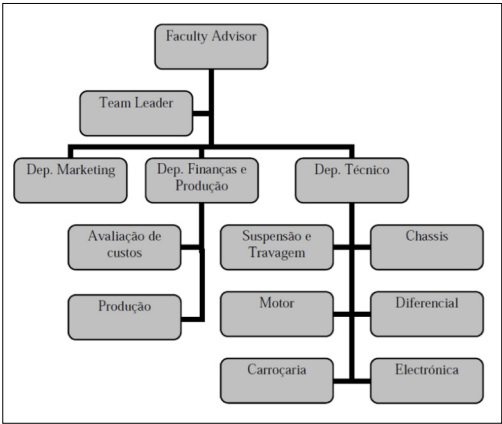


Figura 6. Organograma da equipa phISEC Racing

Esta configuração permite que os alunos tenham um conhecimento mais concreto do que é trabalhar em equipa e que obriga a que os tempos de trabalho e de desenvolvimento do projeto têm de ser planeados de acordo com as necessidades do próprio projeto. Ao longo destes 8 anos, já contou com a colaboração de cerca de 70 alunos, onde a componente prática é uma máxima absoluta do projeto. Este projeto de investigação e desenvolvimento, cujo financiamento convém realçar tem sido obtido, até à data, pelo apoio institucional do ISEC e do IPC em conjunto com o patrocínio de diversas empresas, tem permitido o desenvolvimento de diversos projetos de final de curso aos alunos da Licenciatura de Engenharia Mecânica, Eletromecânica, Informática e Eletrotécnica. De referir ainda, que no ano letivo 2008/2009, dois alunos ao abrigo do Programa Erasmus, provenientes da Universidade de Paris Nanterre e da Universidade do País Basco, concluíram os seus Mestrados em trabalhos integrados neste projeto.

Outra das mais-valias que o projeto tem revelado é a ligação com o tecido empresarial, permitindo inclusive o estabelecimento de diversas parcerias entre as empresas e o ISEC e, por este se tratar de um projeto bastante abrangente, permite também aos alunos ter um contacto com a vida empresarial enquadrada no seu percurso de formação académico. Aliás, esta ligação com o sector empresarial proveniente deste projeto, foi recentemente destacada pela A3ES no relatório preliminar elaborado pela Comissão de Avaliação Externa.

Claro está, que também em Portugal este tipo de projeto tem sido acarinhado por diversos eventos, uns por convite outros para demonstrar a capacidade dinâmica da escola e dos seus alunos. Sendo assim, o Phi2 tem marcado uma presença assídua em diversos eventos dos quais se destacam a Rampa histórica do Caramulo (2013 e 2014), a Race Wars 2013 (Montemor-o-Velho), a Futurália, a FENGE, a Rampa da Covilhã 2014 (campeonato europeu de rampas), e mais recentemente a Rampa histórica do Luso (2015). Este tipo de projeto é sem dúvida uma mais-valia para os alunos e para a escola, sendo um projeto bastante mediático que apresenta mais de 21000 de visualizações de vídeos no Youtube e cerca de 6000 visualizações diretas no Facebook, para

além das reportagens televisivas e dos artigos em jornais regionais e nacionais. Para promover a partilha de experiências e dificuldades deste tipo de projeto, a equipa phISEC Racing organizou, no ano de 2014, o primeiro encontro nacional de equipas Fomula Student (Figura 7), integrado na Feira de Engenharia (FENGE), tendo participado nesse encontro, para além da equipa phISEC Racing (ISEC), a FST Nova Base (IST), a ISEL Formula Student, a Engenious (UAveiro) e a ISEP Formula Student.



Figura 7. Organização do 1.º Encontro Nacional de Equipas Formula Student

Passados oito anos, desde que foi lançado este projeto na escola, e na qualidade de Faculty' Advisors do projeto, os autores entendem que este tipo de projeto promove uma atitude empreendedora dos alunos, permitindo a interação dos alunos com o tecido empresarial, fomentando “O SABER FAZER”.

Conclusão

No presente texto apresentou-se o conceito base inerente ao Projeto Formula Student, a sua evolução em termos da competição mundial, bem como o desenvolvimento deste projeto nas Instituições de ensino superior portuguesas. Neste domínio, foi feita uma retrospectiva histórica da participação da equipa do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, destacando a elevada componente pedagógica de nível aplicado que o mesmo tem para os alunos que nele têm participado.

Referências

AAUni, 2000. *Escuderia AAUni*. [Online]

Available at: <http://www.aliatron.com/fstudent.htm>

[Acedido em 15 Abril 2015].

IEEE, 2015. *Institute of Electrical and Electronics Engineers*. [Online]

Available at: <https://www.ieee.org/index.html>

[Acedido em 15 Abril 2015].

IMechE, 2015. *Institution of Mechanical Engineers*. [Online]

Available at: <http://www.imeche.org/>

[Acedido em 15 Abril 2015].

SAE, 2015. *Society of Automotive Engineers*. [Online]

Available at: <http://www.sae.org/>

[Acedido em 15 Abril 2015].





Coordenadores

Susana **Gonçalves**

Doutorada em Psicologia pela Universidade de Coimbra, é professora coordenadora no Politécnico de Coimbra, Diretora do Centro de Inovação e Estudo da Pedagogia no Ensino Superior (CINEP/IPC) e investigadora externa na Unidade de Investigação em Desenvolvimento e Formação (UIDEF) do Instituto de Educação da Universidade de Lisboa. Nas suas atividades de ensino cruza a psicologia e a educação, com particular ênfase na educação e comunicação intercultural, na psicologia educacional e na formação de professores e formadores. Desde 2007 é secretária geral da associação europeia CICEa (Children's Identity and Citizenship in Europe Association) e desde 2014 é membro da direção da CICE Jean Monnet Network. Participa em vários projetos internacionais e é autora de várias publicações nacionais e internacionais, incluindo a coordenação dos livros *Art and Intercultural Dialogue* (2016, Sense), *The challenges of diversity and intercultural encounters* (2013, Routledge) e *Intercultural Policies and Education* (2011, Peter Lang).

Helena **Almeida**

Licenciada em Matemática Pura e Mestre em Álgebra Linear e Aplicações pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Coimbra, onde exerceu funções docentes entre 1976 e 1986. Professora adjunta do Instituto Superior de Contabilidade e Administração (ISCAC) do Politécnico de Coimbra na Área Disciplinar de Matemáticas Empresariais do Setor de Métodos Quantitativos e Sistemas de Informação e Gestão. Vem lecionando unidades curriculares dos cursos do 1º ciclo de estudos e cursos dedicados aos estudantes com défice de conhecimentos de matemática para a frequência do ensino superior. Foi Presidente da Assembleia de Representantes do ISCAC entre 2004 e 2009. É Presidente do Conselho Pedagógico do ISCAC desde 2012, membro da Assembleia de Representantes desde 2014, Coordenadora do Gabinete de Avaliação de Desempenho do Pessoal Docente do ISCAC desde 2011 e Provedora do Estudante do Politécnico de Coimbra desde 2014.

Paula **Fonseca**

Doutorada em Ciências da Saúde|Ciências Biomédicas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo obtido o grau de mestre em Mestre em Métodos Instrumentais



e Controlo de Qualidade Analítica pela Faculdade de Química da Universidade de Aveiro, licenciada em Farmácia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, licenciada em Geologia pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e detentora do Título de Especialista em Farmácia. Atualmente é professora Adjunta no Departamento de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, coordenadora do Grupo de Investigação Aplicada em Farmácia, coordenadora do Mestrado em Farmácia|Especialização em Farmacoterapia Aplicada da ESTESC, investigadora na Unidade de I&D Química-Física Molecular | Universidade de Coimbra e Presidente do Conselho Pedagógico. Depois de adquirir competências na área da Farmácia e nos Métodos Instrumentais de Análise decorrente de toda a formação académica, os seus interesses atuais de investigação estão focados na área da Farmácia, nomeadamente na monitorização de fármacos, no meio ambiente, em estudos de efetividade de medicamentos e no estudo de sistemas biológicos e farmacologicamente relevantes. Autora de diversos artigos científicos em revistas internacionais indexadas, diversas participações em congressos nacionais e internacionais da área e diversas publicações em atas científicas, é também orientadora de alunos do 1º, 2º e 3º ciclo.

Cândida **Malça**

Doutorada em Engenharia Mecânica (Sistemas de Corpos Múltiplos) pelo Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, tendo obtido o grau de mestre em Engenharia Mecânica (Engenharia de Superfícies) e Licenciatura em Engenharia Mecânica (Ramo de Produção) pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra da Universidade de Coimbra. Leciona há vinte anos no Ensino Superior Politécnico, dezoito dos quais no Instituto Superior de Engenharia de Coimbra (ISEC) do Instituto Politécnico de Coimbra (IPC). Integra, como investigadora, o Centro de Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRSP) do Instituto Politécnico de Leiria (IPL). Obteve várias distinções em diversos concursos de Empreendedorismo e Inovação e outros. É co-autora de várias publicações e patentes nacionais e internacionais. Participou em diversos projetos de I&D. Foi diretora do curso de licenciatura em Engenharia Eletromecânica do ISEC, Presidente do Conselho Pedagógico do ISEC e Provedora do Estudante do IPC. Presentemente é Presidente do Departamento de Engenharia Mecânica do ISEC.



Fátima **Neves**

Doutorada em Ciências da Educação pela universidade de Aveiro é professora coordenadora da área de Ciências Sociais na Escola Superior de Educação (ESEC) do Politécnico de Coimbra, Presidente da Assembleia de Representantes e do Conselho Técnico-Científico e Presidente da Comissão Científica do Departamento da Educação da ESEC. É Diretora da Revista EXEDRA. A sua atividade letiva é desempenhada, essencialmente, no âmbito da formação de educadores de infância e professores do ensino básico. É responsável pela supervisão dos estágios em Escolas do 2.º CEB dos alunos de mestrado de formação de professores do 1.º e 2.º CEB e orienta teses de mestrado. Tem publicações cujas temáticas incidem, principalmente, na educação ao longo da vida e nos modelos de formação de professores à luz da legislação fundamental versus práticas efetivas.

Carlos Dias **Pereira**

Licenciado em Medicina Veterinária pela FMV/UTL (P), Mestre em ciências alimentares pela Universidade de Reading (UK) e Doutor em Ciência e Engenharia dos Alimentos pela Universidade de Santiago de Compostela (ES). Professor Coordenador na Escola Superior Agrária de Coimbra e director do Instituto de Investigação Aplicada do Politécnico de Coimbra. Membro efectivo do Centro de Estudos dos Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS). Desde 2003 coordenou diversos projectos de I&D desenvolvidos na ESAC, bem como projectos e parcerias no âmbito da educação/desenvolvimento a nível internacional, nomeadamente em países da CPLP. É autor/co-autor de 16 publicações em revistas internacionais, de 4 capítulos de livros e de 5 livros. É também autor/co-autor de cerca de 80 comunicações em congressos internacionais, sob a forma de comunicações orais ou poster.

Marco **Veloso**

Marco Veloso é professor Adjunto no Instituto Politécnico de Coimbra (ESTGOH) e investigador no Centro de Informática e Sistemas da Universidade de Coimbra. Lecciona nas áreas de Programação, Bases de Dados e Análise Inteligente de Dados, enquanto a sua investigação explora técnicas de extracção de conhecimento de dados no âmbito de sistemas inteligentes de transporte, mobilidade urbana e cidades inteligentes. É Doutorado em Ciências e Tecnologias da Informação pela Universidade de Coimbra em 2016. É Mestre em Informática e

investigação explora técnicas de extracção de conhecimento de dados no âmbito de sistemas inteligentes de transporte, mobilidade urbana e cidades inteligentes. É Doutorado em Ciências e Tecnologias da Informação pela Universidade de Coimbra em 2016. É Mestre em Informática e Sistemas; pós-graduações em Ciências e Tecnologias da Informação e em Informática e Sistemas; e licenciado em Engenharia Informática, pela Universidade de Coimbra.





Esta publicação do CINEP tem como propósito divulgar estudos em vários domínios, contribuindo para a difusão do conhecimento científico e para o avanço das ciências aplicadas.



POLITÉCNICO
DE COIMBRA