



Investigação Aplicada no Politécnico de Coimbra: Coletânea de Estudos

Coordenação

Marta Henriques
Carlos Dias Pereira



**Investigação Aplicada no
Politécnico de Coimbra:
Coletânea de Estudos**

Investigação Aplicada no Politécnico de Coimbra:

Coletânea de Estudos

Coordenação: Marta Henriques e Carlos Dias Pereira

Coleção Ciências Aplicadas

Coordenação da coleção: Susana Gonçalves

ISBN: 978-989-54520-4-0 (impresso)

ISBN: 978-989-54520-5-7 (ebook)

©2020, 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: Catarina Parente

Imagem de capa: Susana Gonçalves

Impressão:

Depósito Legal:



cinep

CENTRO DE INOVAÇÃO E ESTUDO DA
PEDAGOGIA NO ENSINO SUPERIOR

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

Investigação Aplicada no Politécnico de Coimbra: Coletânea de Estudos

Coordenação:

Marta Henriques
Carlos Dias Pereira

Índice

Prefácio	7
1. O projeto Lab2factory como motor da transferência de tecnologia do IPC para a sociedade	9
António Luís Amaral, Carlos Pereira, Filipe Melo, Filomena Gomes, Jorge Moreira, Luís Castro, Marta Henriques, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Sandrine Ressurreição	
2. Economia circular no setor de laticínios: valorização do soro através da produção de bebidas lácteas fermentadas e molhos para saladas	37
Carlos Pereira, Marta Henriques, David Gomes, Ana Pleno, Andreia Nunes, Mariana Marques, Pedro Clemente, Soraia Pais, Verónica Pedroso, Aleksandra Piskorz, Arona Pires, Natalí Marnotes	
3. O projeto SoSValor - soluções sustentáveis para a valorização de produtos naturais e resíduos industriais de origem vegetal	55
Marta Henriques, Ana Raquel Borges, Aida Moreira da Silva, Ana Veloso, Cristina Galhano, Cristina Pintado, Fernanda Delgado, Fernanda Ferreira, Inês Seabra, Ivo Rodrigues, João Noronha, Luís Castro, Luísa Paulo, Manuela Goulão, Maria João Barroca, Maria João Moreira, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Susana Dias	
4. Propriedades antioxidante e anticancerígena da planta halófito <i>Salicornia ramosissima</i> J. Woods	79
Joana Romano Dias, Aida Moreira da Silva, Maria João Barroca	

5. Prospecção de ação antimicrobiana de óleos essenciais, extratos e hidrolatos de plantas no controlo de microrganismos associados a produtos agroalimentares	99
Fernanda Delgado, Cristina Santos Pintado, Manuela Goulão, Joana Domingues, Maria Helena Silva	
6. Produção de revestimentos para queijos com óleos essenciais de plantas aromáticas e validação da sua eficácia: estudo em oficina tecnológica	117
Susana Dias, Margarida Coelho, Soraia Ramos, Rita Mata, Ana Raquel Borges, David Gomes, Marta Henriques	
7. O projeto 2Bio4Cartilage - programa de intervenção integrado para prevenção e tratamento de lesões da cartilagem	135
Cândida Malça, Marta Henriques, Pedro Morouço	
8. Extração de fibras de celulose a partir de resíduos agroindustriais e a sua caracterização para aplicações na área da saúde	151
Rachel Cordeiro, Mariana Vallejo, Marta Henriques, Filipe Antunes, Carla Moura, Cândida Malça, Pedro Morouço, Ana Veloso, Cristina Galhano, Inês Seabra	
9. A importância do capital humano no turismo em Portugal	171
Andreia Moura, Vânia Costa, Maria do Rosário Mira, António Cerdeiras, Inês Pinto da Cruz	
Coordenadores	193

Prefácio

O presente volume, *Investigação Aplicada no Politécnico de Coimbra: Coleção de Estudos*, visa divulgar as atividades de quatro projetos de investigação aplicada e transferência de conhecimento desenvolvidos pelo Instituto Politécnico de Coimbra (IPC), nomeadamente na Escola Superior Agrária, no Instituto Superior de Engenharia e na Escola Superior de Educação, em colaboração com entidades do Sistema Científico Nacional, polos tecnológicos, tecido empresarial, instituições de saúde, entre outras.

Os projetos aqui apresentados são o Lab2factory “Reforço da transferência de conhecimento científico e tecnológico das fileiras agroalimentar e florestal para o setor empresarial”; o SoSValor “Soluções sustentáveis para a valorização de produtos naturais e resíduos industriais de origem vegetal”; o 2Bio4Cartilage “Programa de intervenção integrado para prevenção e tratamento de lesões da cartilagem” e por fim o HCTourism “Perfil e tendências do capital humano no setor do turismo”.

Como se pode constatar todos eles pretendem contribuir e dar resposta a problemas concretos da sociedade nas mais diversas temáticas e áreas de atuação. A sua grande particularidade é que, não obstante serem projetos de investigação, todos contaram com a colaboração e o envolvimento de estudantes do ensino superior durante o seu percurso académico. Os estudantes, dos vários ciclos de estudo (CTeSP, Licenciaturas e Mestrados) e das mais diversas áreas de formação (agricultura, engenharia, saúde, desporto, turismo, etc.) sob a supervisão dos seus docentes, também eles investigadores do projeto, contribuíram nalgumas tarefas específicas de acordo como o seu grau de complexidade. Os problemas a resolver foram apresentados aos alunos no âmbito de várias unidades curriculares, cujas competências a adquirir se alinhavam com as competências que se pretendiam desenvolver e com as respetivas áreas do saber, tendo os mesmos contribuído diretamente de forma individual ou em grupo, na procura dessas soluções.

Neste contexto, este volume pretende dar a conhecer exemplos concretos de algumas atividades desenvolvidas no âmbito dos projetos elencados e que contaram com a colaboração dos estudantes. Assim, divide-se em quatro secções correspondentes aos quatro projetos que são objeto de divulgação, sendo os capítulos organizados em função da sua integração em cada um. A primeira secção apresenta um capítulo com a descrição genérica do projeto Lab2factory como motor da transferência de tecnologia do IPC para a sociedade. Aqui é incluído um capítulo resultante do trabalho desenvolvido no âmbito de uma das atividades do projeto que se enquadra na temática da economia circular no setor de laticínios. O trabalho descreve um caso concreto da valorização de subprodutos industriais, como é o caso do sorelho, através da produção de bebidas lácteas fermentadas e molhos para saladas.

A segunda secção apresenta genericamente o projeto SoSValor, nomeadamente a abordagem que faz à valorização dos recursos endógenos e resíduos de origem vegetal, assim como dos compostos de valor acrescentado que pretende identificar, recuperar e aplicar de forma eficiente nas mais diversas áreas de atividade. No âmbito deste projeto são apresentados 3 capítulos, nomeadamente, a avaliação das propriedades antioxidante e anticancerígena de plantas halófitas; a prospeção da ação antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos de plantas em produtos alimentares; e a produção, aplicação e validação de eficácia de revestimentos para queijos com óleos essenciais de plantas aromáticas.

A terceira secção centra-se nas atividades do projeto 2Bio4Cartilage, sendo feita uma descrição genérica das atividades desenvolvidas no âmbito da prevenção e tratamento de lesões da cartilagem e dos resultados alcançados. Esta abordagem é complementada com o capítulo relativo à extração de celulose a partir de resíduos agroindustriais e a sua caracterização para aplicações em implantes (*scaffolds*).

Por último, no âmbito das atividades do projeto HCTourism é apresentada uma reflexão sobre a importância do capital humano no turismo em Portugal. Neste caso é evidenciado o papel fundamental das instituições de ensino superior na identificação e desenvolvimento dos conhecimentos necessários, e na moldagem do comportamento dos futuros profissionais.





1. O projeto Lab2factory como motor da transferência de tecnologia do IPC para a sociedade

António Luís Amaral, Carlos Pereira, Filipe Melo, Filomena Gomes, Jorge Moreira, Luís Castro, Marta Henriques, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Sandrine Ressurreição

O PROJETO LAB2FACTORY COMO MOTOR DA TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA DO IPC PARA A SOCIEDADE

António Luís Amaral, Carlos Pereira, Filipe Melo, Filomena Gomes, Jorge Moreira, Luís Castro, Marta Henriques, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Sandrine Ressurreição

Introdução

A reduzida eficácia da transferência de conhecimento e tecnologia das entidades do Sistema Científico e Tecnológico (SCT) para o tecido empresarial motivou o desenvolvimento de medidas de financiamento que visaram inverter essa realidade. Nesse sentido foram privilegiadas as propostas de projetos em parceria entre entidades do SCT e empresas cuja visão passasse pelo desenvolvimento de novos processos ou novos produtos e serviços com capacidade de serem introduzidos no mercado. Foram também apoiadas iniciativas que permitissem um incremento da interação entre os atores associados à inovação e desenvolvimento tecnológico e os responsáveis pela produção de bens e serviços.

Assim, o projeto Lab2factory teve como objetivo central estabelecer a ponte e transferir o conhecimento científico e tecnológico desenvolvido ao nível do Instituto Politécnico de Coimbra para as fileiras agroalimentar e florestal, no âmbito do domínio de especialização inteligente da Região Centro (RIS3). O projeto visou reforçar o potencial das fileiras referidas, quer no desenvolvimento de novos produtos, quer de projetos de transferência e utilização do conhecimento e das tecnologias. As tecnologias desenvolvidas procuram responder a questões concretas relacionadas com soluções industriais sustentáveis e com a valorização dos recursos naturais e endógenos.

Os beneficiários deste projeto são, para além dos atores das fileiras agroalimentar e florestal, toda a população em geral que beneficiará de forma direta ou indireta da aplicação de tecnologias mais sustentáveis e amigas do ambiente. O projeto incidiu particularmente no setor agroalimentar, com ênfase nas empresas da transformação de produtos vegetais, dos laticínios e das carnes;



e no setor florestal em que foram abrangidas as indústrias do papel e da cortiça. Outros atores que poderão também beneficiar dos resultados do projeto incluem-se nos setores agrícola, químico, farmacêutico, de tratamento de águas residuais, dos têxteis e do calçado, sempre numa ótica mais sustentável em termos ambientais e energéticos.

1. Plano de ação do projeto

O projeto estruturou-se em três linhas de ação sequenciais, mas cujos fluxos de informação e resultados se devem transferir nas várias dimensões. Assim, a identificação e o levantamento da oferta tecnológica por parte do IPC, e da procura por parte do tecido empresarial, em termos de tecnologias sustentáveis e produtos inovadores com potencial económico para o mercado, constituiu o arranque do plano de ação do projeto. Como consequência da sistematização da informação recolhida, resultaram um conjunto de soluções sustentáveis passíveis de transferência do sistema científico, nomeadamente do IPC, para as empresas, indo de encontro às suas necessidades específicas. Pretendeu-se também, aproveitando a capacidade já instalada, a criação de metodologias de transferência do conhecimento inovadoras na Região Centro, como sejam o desenvolvimento de unidades piloto e um campo experimental de demonstração. Por último, delineou-se uma ampla divulgação e promoção dos resultados alcançados, em termos da aplicação das tecnologias e pilotos desenvolvidos, em ações de disseminação abertas a toda a comunidade, ou em revistas nacionais especializadas de grande circulação.

1.1. Levantamento da oferta e da procura

Como já referido, o projeto iniciou-se pelo levantamento e promoção da oferta de tecnologia e conhecimento, no âmbito das fileiras agroalimentar e florestal, disponível no IPC, com potencial de transferência e de valorização económica no mercado regional e nacional (OFERTA), e no levantamento de necessidades tecnológicas e de conhecimento por parte das empresas (PROCURA). A Figura 1 resume em linhas gerais o que foi identificado.

A primeira ação constituiu o trabalho inicial de base territorial descentralizada para sensibilizar e informar as empresas da Região Centro sobre a importância da transferência e apropriação de ID&I nos seus sistemas produtivos. Neste momento encontra-se disponível online o catálogo que resultou do levanta-

mento interno sobre a oferta de tecnologia/conhecimento existente no IPC (IIA, 2019) e que integra todas as atividades de I&D e conhecimento que se encontram disponíveis para o setor empresarial e para a sociedade em geral. Neste projeto apenas nos iremos focar nas soluções e tecnologias com potencial para as indústrias do setor agroalimentar e agroflorestal.

Relativamente ao levantamento das necessidades das empresas, foram contactadas cerca de 600, tendo sido obtida informação relativamente às necessidades de cerca de 120. Após tratamento dos resultados, as empresas foram contactadas com vista à definição de estratégias para a solução dos problemas colocados.

Destas atividades, e do recurso a inquéritos e entrevistas diretas, foi produzido um relatório com o levantamento das necessidades de tecnologia e conhecimento no setor empresarial das referidas fileiras. Como é possível verificar na Figura 1, as maiores carências sentidas pelas indústrias ao nível do conhecimento dizem respeito à sua sustentabilidade em geral. Destacam-se a necessidade de tecnologias de valorização dos seus resíduos ou subprodutos; a redução dos consumos energéticos quer ao nível dos processos produtivos quer no tratamento de efluentes; e a necessidade de substituição dos compostos químicos convencionais por alternativas naturais.

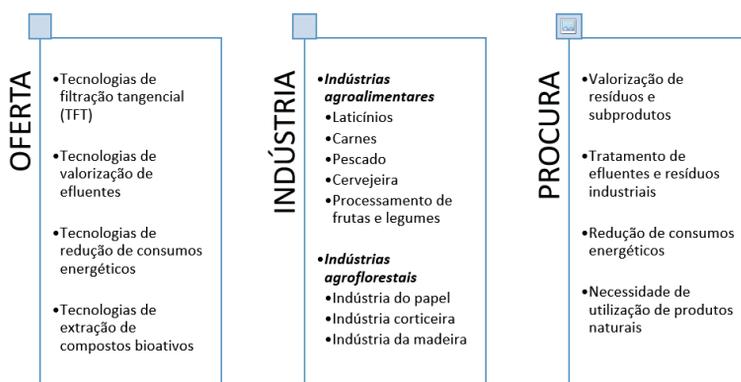


Figura 1. Levantamento da oferta tecnológica por parte do IPC, e da procura por parte do tecido empresarial dos setores agroalimentar e florestal.



Os resultados desta primeira linha de ação alavancaram a sistematização de um conjunto de soluções industriais sustentáveis para estas indústrias e, nalguns casos mais concretos, culminaram no desenvolvimento de soluções adaptadas especificamente a cada empresa.

1.2. Soluções industriais sustentáveis

O Laboratório de Soluções Industriais Sustentáveis (SISUS) é uma estrutura do Politécnico de Coimbra (IPC) que corporiza a intersecção de linhas de investigação distintas, mas complementares, desenvolvidas no Instituto Superior de Engenharia (ISEC) e na Escola Superior Agrária (ESAC), ao nível da I&D na área das engenharias química e biológica e da engenharia alimentar, respetivamente.

A investigação aplicada desenvolvida no SISUS centra-se, assim, na procura de novas soluções, baseadas na bioengenharia, na biotecnologia, na ecoeficiência e na gestão ambiental, a adotar pela indústria transformadora, por forma a promover uma utilização racional de *inputs*, adicionar valor aos produtos e a reduzir a produção de desperdícios e consumos energéticos, promovendo o aumento da produtividade e competitividade das empresas da região.

Este laboratório desenvolve e disponibiliza uma diversidade de serviços e tecnologias já testados e prontos a serem incorporados pelas empresas. Assim, no âmbito do projeto foram construídos diversos pilotos/protótipos que têm sido utilizados em ações de demonstração e transferência de tecnologia.

1.2.1. Valorização de resíduos da indústria alimentar por tecnologias de filtração tangencial (TFT)

A - Utilização das TFT no setor dos laticínios

Mais de 90% das empresas do setor dos laticínios em Portugal enquadram-se nas micro, pequenas e médias empresas. Estas por sua vez são caracterizadas por várias particularidades:

- Baixa diversificação de produtos, quase sempre limitada ao fabrico de queijo e requeijão, que reduz a flexibilidade e adaptação das empresas às necessidades e constrangimentos do mercado;

- Baixo nível de inovação e de incorporação de tecnologia, que condiciona grandemente o aumento da sua ecoeficiência;
- Grande dispersão pelo território nacional, que não permite a implementação de ações conjuntas de tratamento de resíduos e de proteção ambiental;
- Escassez de ações de melhoria da eficiência energética dos processos produtivos.

As pequenas e médias empresas (PME) do setor carecem ainda de um incremento da eficiência dos seus processos produtivos e do nível de inovação dos seus produtos. Por outro lado, as que se dedicam à produção de queijo e requeijão defrontam-se constantemente com o problema do impacto ambiental dos seus subprodutos (soro e sorelho).

A diversificação de produtos que permitam recuperar os componentes do soro e do sorelho representam uma oportunidade de acesso a novos mercados, ao mesmo tempo que garantem a redução dos problemas ambientais que estes subprodutos acarretam.

A introdução da tecnologia de produção de concentrados líquidos de proteínas do soro (CLPS) nas empresas do setor (Figura 2) contribui de forma significativa para a redução da importação de proteínas de soro desidratadas, vulgarmente usadas em alguns processos de fabrico. A inovação em produtos lácteos centra-se na utilização destes CLPS na produção de queijos e manteiga com baixo teor de gordura, iogurtes e/ou de bebidas lácteas fermentadas.

As tecnologias desenvolvidas/aplicadas podem ainda fazer uso dos permeados obtidos da ultrafiltração (UF), permitindo a recuperação da totalidade do soro produzido, reduzindo-se assim o impacte ambiental associado a este subproduto.

No que se refere ao fabrico de requeijão, o sorelho (subproduto resultante do seu processo de fabrico) pode ser utilizado para alimentação animal. Contudo, essa solução acarreta custos de transporte e depende da existência de explorações agropecuárias recetoras. Salienta-se que a eliminação direta deste subproduto tem ainda um impacte ambiental significativo. Assim, serão necessárias soluções alternativas que permitam a sua reutilização e valorização.





Figura 2. Unidade piloto de microfiltração/ultrafiltração/nanofiltração/ osmose inversa (MF/UF/NF/OI) instalada no IPC/ESAC.

Até ao momento, não foi ensaiada em Portugal nenhuma solução que permita a valorização interna deste subproduto (com um teor de lactose de cerca de 4% e, que poderá conter até 1 % de proteína). Deste modo, urge encontrar soluções para sua valorização, que poderão passar pela sua utilização como substrato para a produção de bebidas lácteas fermentadas, ou para a produção de outros produtos com maior valor acrescentado. A aplicação de TFT ao sorelho permite a sua utilização na produção de novos produtos alimentares, como sejam molhos para saladas e bebidas lácteas fermentadas com microrganismos probióticos. A tecnologia foi já objeto de um pedido provisório de patente (PPP 115385 G, 2019).

B - Utilização das TFT noutras indústrias do setor agroalimentar

As unidades piloto de filtração tangencial instaladas na ESAC e integradas no laboratório SISUS, com capacidade de processar elevados volumes de produto, são normalmente colocadas à disposição de outras entidades do Sistema Científico e Tecnológico (SCT) ou da indústria, na perspetiva de realização de ensaios piloto e de *scale-up* industrial (Figura 3). A capacidade instalada tem sido utilizada em atividades e projetos ao nível da indústria de carnes, pescado

e cervejeira, nomeadamente para a produção e separação de hidrolisados de proteínas com atividade biológica a partir dos resíduos e subprodutos destas indústrias.



Figura 3. Unidade piloto de microfiltração/ultrafiltração (MF/UF) utilizada em ensaios de valorização de resíduos das indústrias cárnea, cervejeira e do pescado.

1.2.2. Redução de consumos energéticos na indústria de laticínios

No que se refere à eficiência energética da indústria dos laticínios, tendo em atenção os dados da produção anual de requeijão, pode concluir-se que uma parte significativa do soro de queijo de ovelha não é processada. O elevado consumo energético na produção de requeijão, associado ao curto período de vida útil do produto, são fatores negativos que afetam o circuito de produção e comercialização.

A atratividade do fabrico de requeijão é também afetada pelo baixo rendimento de produção, que se situa em cerca de 6%. Assim, os elevados consumos energéticos no aquecimento de grandes volumes de soro e a inexistência de equipamentos que permitam a recuperação dessa energia, afetam de forma decisiva os custos de produção.



Em suma, esta atividade visou o desenvolvimento de um protótipo destinado ao fabrico de requeijão (Figura 4) que permite uma redução drástica no consumo energético do processo. Esta solução terá um impacto muito significativo nos custos operacionais das unidades que a possam incluir nas suas atividades. Paralelamente, e sobre a temática do fabrico de requeijão, pretende-se também transferir, para o meio empresarial, possíveis soluções para a valorização do sorelho pela aplicação de TFT, como já referido anteriormente.

1.2.3. Valorização de efluentes da indústria papelreira

Os polihidroxicanoatos (PHA) são sintetizados por organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) e organismos acumuladores de glicogénio (GAO), como forma de armazenamento de energia e de carbono. Os PHA podem ser utilizados comercialmente como (bio)plásticos biodegradáveis e possuem uma diversificada gama de potenciais aplicações.

No âmbito de investigação anterior tinham sido já desenvolvidas metodologias de monitorização e caracterização quantitativa de PHA, usando técnicas de coloração, aquisição de imagens ao microscópio de epifluorescência e técnicas de análise e processamento de imagem (Figura 5). Estas técnicas permi-



Figura 4. Piloto de produção de requeijão com recuperação de energia construído no âmbito do projeto.

tem ainda acompanhar o estado de agregação e composição da biomassa nos reatores aeróbios de tratamento de efluentes em tempo quase real.

A tecnologia desenvolvida possui uma significativa vantagem em relação às técnicas convencionais de monitorização, devido à rapidez de obtenção de informação quantitativa.

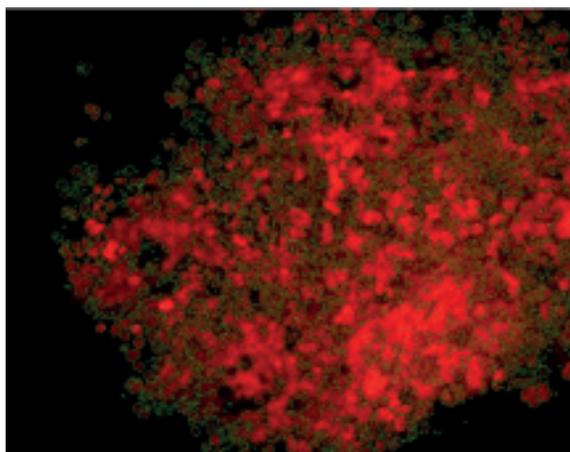


Figura 5. Imagem ao microscópio de biomassa de reator com identificação das inclusões de PHA evidenciada a verde, obtidas através do procedimento de coloração de fluorescência Nile Blue com a ampliação de 400x.

As atividades atualmente em curso, consistem no desenvolvimento de dois reatores descontínuos sequenciais (SBR) integrados numa unidade piloto, para o tratamento de águas residuais provenientes da indústria de reciclagem de papel, com culturas mistas, em ciclos de alimentação/esgotamento de nutrientes e/ou anaerobiose/aerobiose para a produção de PHA. A monitorização destes reatores incide na determinação de parâmetros físico-químicos da eficiência de tratamento e caracterização da biomassa presente, por metodologias de análise de imagem e determinação do rendimento em PHA. A integração de todos os dados obtidos, para uma melhor compreensão dos fenómenos envolvidos, é efetuada através da utilização de técnicas de estatística clássica e multivariável. A descrição da unidade piloto que integra os SBR será feita na secção 1.3.2.



1.2.4. Sistema de análise microbiológica de lamas ativadas como forma de controlar o funcionamento de ETAR biológicas

O estudo das características morfológicas da biomassa agregada e filamentososa, bem como dos principais protozoários, metazoários e bactérias filamentosas, presentes nos tanques de arejamento das estações de tratamento de águas residuais (ETAR) que operam por sistemas de lamas ativadas, permite inferir acerca do adequado funcionamento destas unidades. Para este efeito, pode-se recorrer a técnicas de visualização microscópica, com ou sem prévia coloração, e análise e processamento de imagem (Figura 6), interrelacionando os dados obtidos por técnicas de estatística multivariável.

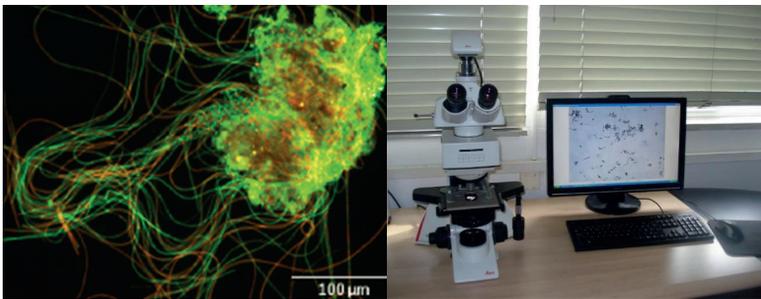


Figura 6. Imagem ao microscópio de bactérias filamentosas cuja identificação permite minimizar ou eliminar os fenómenos de bulking filamentososo (à esquerda). Equipamento laboratorial de análise microscópica de lamas ativadas (à direita).

Esta metodologia constitui uma ferramenta muito expedita na prevenção do funcionamento deficiente dos sistemas de tratamento, uma vez que permite identificar qual o principal problema (ou condição de operação) causador dessas deficiências, através do modo como a comunidade microbiana presente é afetada.

A tecnologia foi anteriormente desenvolvida em parceria com entidades gestoras de redes de saneamento e pode ser aplicada em unidades industriais com estação de tratamento de águas residuais industriais (ETARI), com sistemas de lamas ativadas, bem como nas ETAR dos sistemas de tratamento de efluentes domésticos. Deste modo, foi possível a prestação de serviços de monitorização da comunidade microbiológica dos sistemas, assim como a disponibiliza-

ção de cursos livres documentais e de prática laboratorial neste domínio para estas entidades. Atualmente, a oferta de prestação de serviços de cursos livres (MonitETAR, 2019) já está disponível para todas as entidades interessadas (Figura 7).

1.2.5. Sistema automático de seleção e tratamento de efluentes da indústria corticeira

Atualmente, a lavação das rolhas de cortiça é efetuada usando diversas etapas de enxaguamento (Figura 8, esquerda), o que leva a que, nas últimas etapas, uma grande percentagem de água residual do processo possa ser enviada diretamente para a rede de saneamento antes de ser sujeita ao tratamento físico-químico tradicionalmente utilizado.



Figura 7. Folheto usado na divulgação do curso livre documental em Aferição do Funcionamento de ETARs pela Monitorização da Componente Microbiológica (à direita); e do curso livre prático-laboratorial em Identificação de Bactérias Filamentosas e Protozoários em ETARs (à esquerda).

A possibilidade de evitar esses tratamentos potencia ganhos relevantes em termos ambientais, na medida em que:

- reduz o consumo e descarga na rede de saneamento de produtos químicos de tratamento do efluente;
- reduz a quantidade das lamas geradas no tratamento físico-químico e que

são enviadas para aterro;

- reduz o consumo de energia associado ao tratamento físico-químico do efluente.

Neste contexto, pretendeu-se desenvolver um protótipo que, online e baseado em propriedades mensuráveis do efluente de lavagem da indústria corticeira, permitisse segregar entre o efluente industrial que carece de tratamento do que pode ser enviado diretamente para a rede de saneamento em conformidade com os Valores Limites de Descarga (VLD).

O sistema potencia, também, ganhos económicos, pois reduz os custos de aquisição de produtos químicos para o tratamento de efluente; as despesas com energia elétrica; os custos de deposição de resíduos em aterro; e aumenta a capacidade de tratamento da ETARI, já que este equipamento passaria a tratar unicamente o efluente com necessidade efetiva de tratamento, que se prevê constituir uma pequena fração do volume total de efluente enviado atualmente para a EPTARI. Foi já submetido o pedido provisório de patente do Sistema Automático de Seleção e Tratamento de Efluentes da Indústria Corticeira (Castro et al., 2019). A descrição da unidade piloto para seleção e tratamento de efluentes da indústria corticeira será feita na secção 1.3.3.



Figura 8. Unidade industrial de lavagem de rolhas de cortiça (à esquerda). Unidade à escala laboratorial de tratamento do efluente da lavagem da indústria corticeira (à direita).

1.2.6. Sistema de eliminação do verde da cortiça por aquecimento solar

O verde constitui um defeito característico da cortiça, que se traduz por teores de humidade muito elevados e que dotam a cortiça de um aspeto translúcido. Desta forma, a existência de verde deprecia a qualidade da cortiça, tanto mais, quanto maior e mais irregular for a superfície afetada (Figura 9). O principal inconveniente do verde é a retração excessiva que a cortiça sofre na região afetada, após a sua secagem, o que condiciona a sua capacidade vedante. Não é, por isso, aconselhável a utilização da cortiça com este defeito no seu uso mais nobre, como a produção de rolhas naturais.

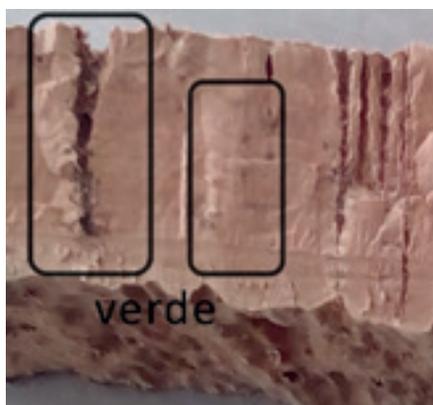


Figura 9. Prancha de cortiça com verde.

Uma das formas de minorar a redução da qualidade induzida por este defeito na cortiça consiste na sua secagem artificial, em condições muito distintas das que normalmente se praticam durante o processo de estabilização da cortiça.

No âmbito deste projeto foi construído um piloto com apoio solar, que permite efetuar esta operação sem recurso ao consumo de combustíveis fósseis, por forma a responder à estratégia de sustentabilidade ambiental das empresas e que, simultaneamente, otimiza o processo de secagem das pranchas de cortiça com verde. A implementação industrial deste processo permite otimizar a produtividade das empresas do setor e contribuir para a sua sustentabilidade energética. A descrição da unidade piloto para secagem da cortiça com verde com apoio solar será feita na secção 1.3.4.

A vasta experiência da equipa de investigação na secagem de produtos naturais e, em particular, de cortiça (na forma de pranchas, pó e granulado) é, também, um fator chave na cooperação com as empresas do setor corticeiro, para implementação desta nova tecnologia.

1.2.7. Valorização de recursos vegetais

A valorização dos recursos vegetais, endógenos ou não, pode ser dinamizada desde a produção para o mercado, ou desde o mercado para a produção. Assim, a primeira abordagem passa pela seleção, melhoramento e multiplicação de plantas com as características pretendidas pelos atores de toda a fileira comercial (produtores, indústria e consumidor final). Já, na ótica da segunda abordagem, a identificação de compostos naturais de valor acrescentado nos recursos vegetais e o desenvolvimento de técnicas de extração sustentáveis e sistemas onde possam ser aplicados, conduzem ao cultivo e conseqüente valorização desses recursos vegetais.

A - Seleção e multiplicação de plantas

A investigação e desenvolvimento de plantas melhoradas tem despertado muito interesse por parte do setor industrial, nomeadamente por parte das empresas:

- que visam incorporar a tecnologia para a produção de material vegetal de melhor qualidade (produção de plantas);
- interessadas na plantação de indivíduos que demonstrem características superiores;
- transformadoras dos frutos ou do próprio material vegetal.

A Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC/IPC) tem desenvolvido trabalho de investigação aplicada na área da micropropagação, estabelecendo protocolos com empresas para a propagação de plantas melhoradas de medronheiro e híbridos de castanheiro. Os melhores clones de medronheiro têm sido propagados pela empresa GREENCLON para comercialização. A procura por esta espécie autóctone no mercado é importante devido ao seu potencial produtivo, associado também à criação de biodiversidade e à redução do risco de propagação de incêndios. Os híbridos de castanheiro, resistentes à doença da tinta, foram obtidos no âmbito de trabalhos de I&DT em colaboração

com outras entidades do SCN, propagados no âmbito de projetos de I&D, com a transferência de tecnologia para empresas através do apoio do programa ProDeR.

A par da propagação de plantas superiores, têm sido propagadas plantas selecionadas pela elevada produção de fruto e micorrizadas com *Lactarius deliciosus* e *Tuber borchii*, com o objetivo de aumentar a tolerância a condições de stresse biótico (doenças) a abiótico (stresse hídrico), e ainda criar outra fonte de riqueza para os produtores florestais.

Existe por isso capacidade instalada para o desenvolvimento de novos produtos e serviços com interesse para a inovação do setor empresarial agrícola e florestal, nomeadamente:

- No desenvolvimento de material vegetal melhorado capaz de resistir a stresses abiótico e biótico;
- Aplicação do conhecimento à propagação de vários tipos de plantas: florestais, silvestres, ervas aromáticas e medicinais, entre outras espécies;
- Aplicação do conhecimento à propagação de vários tipos de plantas micorrizadas, para produção de cogumelos comestíveis;
- Capacidade de isolamento de órgãos específicos das plantas, que demonstrem maior capacidade de produção de compostos com interesse, a isolar posteriormente em diferentes formas, recorrendo a métodos de extração distintos.

B - Valorização de compostos bioativos de plantas autóctones

Algumas das soluções desenvolvidas ao nível da valorização dos compostos bioativos de origem vegetal que poderão ter aplicação transversal nas empresas dos setores agroalimentar, do ambiente, têxtil, tintas e calçado, dizem respeito à produção, extração e desenvolvimento de sistemas de conservação e transporte (*delivery*) de compostos bioativos a partir de plantas aromáticas, medicinais ou outras, com atividade antimicrobiana, antioxidante, aromática, corante, etc.



A primeira fase destas soluções passa pela obtenção do material vegetal, que pode ser através do cultivo específico das plantas com potencial tecnológico e/ou a realização de saídas de campo para recolha do material. As fases seguintes consistem na seleção dos métodos mais adequados para a extração dos compostos de interesse e na aplicação das técnicas de separação seletiva e isolamento desses compostos. Segue-se uma etapa de identificação e caracterização dos extratos obtidos com o objetivo de os selecionar de acordo com o seu potencial biológico (antioxidante, antifúngico, antibacteriano), ou outros que possam apresentar.

Para além da extração e isolamento dos compostos bioativos, é fundamental desenvolver sistemas, e formas de conservação e aplicação, que evitem a perda da sua eficácia por períodos relativamente longos. Neste âmbito é necessário:

- face ao(s) composto(s) em causa, e o seu fim, identificar a forma de conservação e/ou aplicação mais adequada;
- desenvolver os sistemas de encapsulamento e de libertação controlada dos compostos bioativos;
- selecionar matrizes com interesse nas mais diversas áreas (alimentar, agrícola, têxtil, calçado, tintas e diluentes, etc.);
- avaliar a performance dos sistemas desenvolvidos, a sua estabilidade, bem como efetuar o seu *scale-up*.

As potenciais tecnologias implementadas podem englobar o desenvolvimento de sistemas de micro e nanoencapsulação, de produção de filmes ou revestimentos com propriedades bioativas, ou outros com interesse industrial. Atualmente, já se encontram desenvolvidas algumas soluções que poderão ter aplicação imediata para algumas empresas, das quais se destaca a utilização de produtos naturais com atividade antimicrobiana à base de tomilho bela-luz (*Thymus mastichina* L.) para utilização em queijos curados.

1.2.8. Valorização de resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais de origem vegetal

O processamento agrícola gera quantidades significativas de resíduos que representam, muito frequentemente, um problema ambiental e económico para as empresas envolvidas. Introduzindo alguns passos adicionais na linha

de processamento, poderá ser possível transformar estes resíduos agroindustriais em produtos de alto valor acrescentado com aplicações na área alimentar, agrícola, cosmética, farmacêutica, entre outras. O trabalho desenvolvido pelo IPC tem-se centrado nos seguintes resíduos:

- o bagaço de sabugueiro (*Sambucus nigra* L.), um resíduo do processamento da baga para obtenção do sumo, rico em antocianinas e outros compostos fenólicos;
- a casca de pinheiro (*Pinus pinaster*), um resíduo das indústrias de processamento de madeira, rico em taninos condensados;
- as sementes de cardo (*Cynara cardunculus* L.), um resíduo do processo de extração de cardosina a partir da flor (usada na produção de queijo), rico em compostos fenólicos com atividade antioxidante;
- a vagem da fava (*Vicia faba*), um resíduo das indústrias de processamento de (semente) de fava que contém quantidades consideráveis de proteínas com atividade bacteriana e fungicida.

Assim, pretendeu-se divulgar as soluções já exploradas e que apresentam potencial industrial, promover a sua incorporação pelo setor empresarial, e ao mesmo tempo desenvolver novas soluções com base noutros resíduos, em função das necessidades específicas das empresas.

O grande desafio do desenvolvimento de tecnologia nesta temática é a utilização de processos de extração limpos e amigos do ambiente, mas que sejam simultaneamente eficientes na recuperação dos compostos de interesse e rentáveis economicamente.

Foi âmbito de desenvolvimento neste projeto um piloto para extração de compostos com atividade biológica, ou outras, a partir de produtos de origem vegetal, nomeadamente, resíduos agroflorestais, agroindustriais e recursos endógenos naturais como é o caso das plantas aromáticas e medicinais.

1.3. Desenvolvimento de pilotos e do campo experimental para demonstração

Com base nas soluções industriais sustentáveis elencadas e que careciam ainda de protótipos, modelos ou pilotos para servirem como ferramentas de demonstração dos conhecimentos e tecnologias desenvolvidas, foram criadas



e implementas cinco unidades piloto e um campo experimental de produção de plantas. Pretende-se que estas estruturas funcionem como núcleos de demonstração dos processos, das tecnologias associadas, dos produtos obtidos e das boas práticas de produção e transformação.

1.3.1. Piloto para fabrico de requeijão

O protótipo desenvolvido para o fabrico de requeijão consiste num tanque de parede dupla para aquecimento de soro, dotado de agitação e de um sistema para recuperação da massa de requeijão. O tanque tem também uma coluna de pré-aquecimento do soro. Associado à cuba está instalado um permutador de calor de placas e bombas de circulação de soro e sorelho, no sentido de permitir a recuperação de calor por transferência entre a corrente quente (sorelho) e a corrente fria (soro). O aquecimento inicial poderá ser feito por gás, por injeção de vapor, ou por água quente disponível na unidade industrial. O desenho do equipamento visa garantir a máxima recuperação de energia e as melhores condições de higienização. Os testes de validação e demonstração foram efetuados na Oficina Tecnológica de Laticínios (OTL) da ESAC.

1.3.2. Piloto para valorização de efluentes da indústria papelreira

Trata-se de uma unidade piloto constituída por dois reatores descontínuos sequenciais (*Sequential Batch Reactor*) desenvolvidos à escala laboratorial com sistemas de agitação e arejamento (Figura 10). Funciona em ciclos de alimentação/esgotamento de nutrientes e em regime de anaerobiose/aerobiose para a produção de PHA, dispõe de sensores de medição de oxigénio dissolvido, pH e potencial redox e encontra-se equipada com bombas que permitem o doseamento de reagentes químicos e da alimentação. Toda a instalação é comandada por uma unidade de controlo automático que permite o registo dos dados monitorizados e o controlo do funcionamento de todo o sistema.



Figura 10. Aspeto geral do piloto para valorização de efluentes da indústria papelreira (à esquerda). Esquema da unidade piloto (à direita).

1.3.4. Piloto para tratamento do efluente de lavação da cortiça

A unidade piloto para tratamento do efluente de lavação (Figura 11) é constituída por um tanque de alimentação do efluente, um sistema de monitorização e tomada de decisão quanto à necessidade de efetuar o seu tratamento e, ainda, por um conjunto de 3 tanques de reação aos quais estão associados outros tantos tanques de reagentes químicos, que possibilitam o sucessivo tratamento físico-químico por coagulação, neutralização e floculação, seguido de um sedimentador lamelar para separação das lamas formadas. A instalação é dotada de uma unidade de controlo automático que permite a análise dos parâmetros caracterizadores do efluente bruto e a tomada de decisão acerca da possibilidade deste ser descartado ou de ser tratado, bem como o controlo de todo o sistema de tratamento físico-químico.



Figura 11. Aspeto geral do piloto para tratamento do efluente de lavagem da cortiça (à esquerda e ao centro). Esquema da unidade piloto (à direita).

1.3.5. Piloto para secagem de cortiça com apoio solar

Trata-se de uma unidade piloto desenvolvida à escala laboratorial que compreende uma estufa de aquecimento com apoio solar que permite, em condições otimizadas, efetuar a eliminação do defeito crítico da cortiça designado por verde. A unidade (Figura 12) compreende um conjunto de painéis fotovoltaicos que fornecem energia necessária aos sistemas de ventilação e controlo da estufa, um sistema de ventilação e de regulação de temperatura que permite otimizar o processo de secagem e um sistema de monitorização das condições ambientais e da cortiça.



Figura 12. Aspeto geral do piloto para secagem de cortiça com apoio solar (à esquerda). Esquema da unidade piloto (à direita).

1.3.6. Piloto para extração de compostos bioativos

O piloto a utilizar na extração dos compostos bioativos a partir de material vegetal está intrinsecamente ligado às características das matérias-primas. Neste caso tornou-se necessária a implementação de vários sistemas que podem estar acoplados ou não. O protótipo contempla: um sistema de trituração e prensagem do material vegetal a utilizar, um sistema de extração sólido-líquido e um sistema de destilação com condensador acoplado. Aquando da utilização de solventes, que não a água, uma coluna de destilação é utilizada para os recuperar de forma “limpa” e permitir a sua reutilização.

1.3.7. Campo experimental

O campo experimental foi instalado em terrenos da ESAC, junto à casa da canforeira. Foram recuperadas infraestruturas existentes, nomeadamente os sistemas de captação de água e de rega, bem como 3 estufas destinadas à propagação de plantas aromáticas e medicinais (PAM). Foi alargada a coleção de PAM já existente e foram também selecionadas algumas culturas de plantas autóctones para instalação de áreas de produção que permitam garantir matéria-prima para ensaios de *scale-up* industrial de extração de óleos essenciais.

Foram também instalados um campo de *Aloe vera* e outro de figueira da Índia (*Opuntia ficus indica*) com vista à avaliação das melhores condições culturais destas espécies a nível local/regional.

2. Ações de divulgação

Além de criar uma estrutura de aproximação entre instituições do Sistema Científico e Tecnológico (SCT) e o tecido empresarial, procura-se com as ações de divulgação gerar e construir novos projetos em torno das atividades das fileiras agroalimentar e florestal, numa ótica de competitividade e inovação regional.

Têm sido realizadas diversas iniciativas de interação com o ambiente empresarial para a sensibilização, partilha e mapeamento de oportunidades de desenvolvimento de novas aplicações de tecnologias e conhecimentos nas fileiras agroalimentar e florestal. Foram também realizadas atividades de disseminação e difusão (Tabela 1) das novas tecnologias e conhecimentos gerados no âmbito da I&D, assim como através da execução de projetos piloto demons-



tradores com a realização de atividades de experimentação. Todas estas ações poderão ser consultadas em <http://lab2factory.eu/>.

Tabela 1. Disseminação e difusão de resultados no âmbito do projeto Lab2factory.

Tipologia	Referência
Artigos Científicos	Henriques, Gomes & Pereira (2017)
	Cassoni et al. (2018)
Capítulos de Livro	Henriques et al. (2017a)
	Carvalho et al. (2017)
	Carvalho et al. (2018)
Comunicações	Henriques et al. (2017b)
	Henriques et al. (2018)
	Gomes et al. (2018)
	Castro, Amaral & Coelho Pinheiro (2018)
	Amaral, Castro & Coelho Pinheiro (2018a,b,c)
	Amaral, Castro & Coelho Pinheiro (2019a,b)
	Castro, Amaral & Coelho Pinheiro (2019)
Patentes	Gomes et al. (2019)
	Fonseca, Madeira, Gama & Lopes (2018) PPP nº 115008 E
	Pleno et al. (2019) PPP nº 115385 G
	Castro et al. (2019) PPP em fase de definição de reivindicações.
Teses	Castro, Beirão, Roseiro, Santos & Oliveira (2019). PPP em fase de definição de reivindicações.
	Fonseca (2017)
	Melo (2017)

Conclusões

De um modo geral, poderemos concluir que os principais objetivos do projeto foram, em grande medida, alcançados. Todos os principais indicadores foram atingidos e, apesar de não ter sido possível dispor de meios para dinamizar plenamente as diversas comunidades de inovação previstas, espera-se que, com a autorização da extensão do período de execução do projeto venham a ser reforçados os elos de ligação entre investigadores e empresas que, entretanto, foram criados.

Agradecimentos

O projeto Lab2factory - Reforço da transferência de conhecimento científico e tecnológico das fileiras agroalimentar e florestal para o setor empresarial, é uma operação financiada pelo Sistema de Apoio a Ações Coletivas (SIAC), enquadrada no Aviso de Abertura de Concurso CENTRO – 46-2016-01 do Programa Operacional Regional do Centro 2014-2020 (PO Centro 2020), mais especificamente na tipologia “Transferência de Conhecimento Científico e Tecnológico.”

Referências

Amaral, A., Castro, L. & Coelho Pinheiro, M. N. (2018a). Valorização de efluentes da indústria papelreira para a produção de bioplásticos. *Workshop da ANIPC – Associação Nacional dos Industriais de Papel e Cartão*, Santa Maria da Feira - Portugal, 10 de Abril.

Amaral, A., Castro, L. & Coelho Pinheiro, M. N. (2018b). Valorização de efluentes da indústria papelreira. *Workshop Lab2factory*. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra – Portugal, 20 de Abril.

Amaral, A., Castro, L. & Coelho Pinheiro, M. N. (2018c). Sistema de análise microbiológica de lamas ativadas como forma de controlar o funcionamento de ETAR biológicas. *Workshop Lab2factory*. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra – Portugal, 20 de Abril.

Amaral, A., Castro, L. & Coelho Pinheiro, M. N. (2019a). Valorização de efluentes da indústria papelreira. *Workshop IPC2SOCIETY*. Instituto Superior



de Contabilidade e Administração – Instituto Politécnico de Coimbra, 11 de Abril.

Amaral, A., Castro, L. & Coelho Pinheiro, M. N. (2019b). Monitorização microbiológica de estações de tratamento de águas residuais. *Workshop IPC2SOCIETY*. Instituto Superior de Contabilidade e Administração – Instituto Politécnico de Coimbra, 11 de Abril.

Carvalho, F., Rodrigues, A., Gomes, D., Ferreira, F. M., Dias, S., Pereira, C. & Henriques, M. (2018). Improvement of ripened cheese quality and safety with *Thymus mastichina* L. bioactive extracts. In A Holban & A Grumezescu (Eds), *Advances in Biotechnology for Food Industry*. (Vol. 14, Chap.7 , pp. 197). London: Academic Press.

Carvalho, F., Rodrigues, A., Gomes, D., Henriques, M., Ferreira, F. M. & Pereira, C. D. (2017). Desenvolvimento de novos produtos naturais à base de tomilho bela-luz: um projeto com reconhecido interesse para a indústria alimentar e para o consumidor. In CINEP/IPC (Ed), *Ciências Aplicadas: Coleção de Estudos*. (Parte 2, pp. 83-109). Coimbra. ISBN: 978-989-99463-0-9.

Cassoni, A. C., Freixo, R., Pintado, A. I. E., Amorim, M., Pereira, C. D., Madureira, A. R. & Pintado M. M. E. (2018). Novel eco-friendly method to extract keratin from hair. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6 (9), 12268-12274.

Castro, L., Amaral, A. & Coelho Pinheiro, M. N. (2018). Projeto Lab2Factory - Valorização de Efluentes da Indústria Papeleira. *Workshop da ANIPC – Associação Nacional dos Industriais de Papel e Cartão*, Santa Maria da Feira - Portugal, 10 de Abril.

Castro, L., Amaral, A. & Coelho Pinheiro, M. N. (2019). Valorização de resíduos do setor corticeiro na indústria têxtil. *Workshop IPC2SOCIETY*. Instituto Superior de Contabilidade e Administração – Instituto Politécnico de Coimbra, 11 de Abril.

Castro, L., Beirão, P., Pinheiro, N., Amaral, A., Roseiro, L., Quitério, R. & Almeida, C. (2019). Pedido Provisório de Patente (em fase de definição de reivindicações): Sistema Automático de Seleção e Tratamento de Efluentes da Indústria Corticeira.

Castro, L., Beirão, P., Roseiro, L., Santos, F. & Oliveira, A. (2019). Pedido

Provisório de Patente (em fase de definição de reivindicações): Sistema Automatizado de Avaliação da Colagem em Rolhas de Cortiça Capsuladas.

Fonseca, C. A. L. (2018). *Implementação de sistema de segurança alimentar num refeitório e avaliação da propriedade gelificante de diferentes tipos de fécula de batata*. (Relatório de estágio profissionalizante do Mestrado em Engenharia Alimentar). Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra, Portugal.

Fonseca, C. A. L., Madeira, T. A. S., Gama, A. C. B. & Lopes, A. P. B. (2018). Pedido Provisório de Patente No. 115008 E: Bolacha de feijão e respetivo método de produção. 2018000057693. Data 03.09.2018.

Gomes, F., Figueiredo, P., Gama, J., Castro, F., Simões, M., Maia, J., Pato, R. L., Botelho, G., Franco, J., Melo, F., Santos, S., Nazaré, N., Guilherme, R., Curado, F., Casau, F., Plácito, F., Rodrigues, I., Henriques, M., Machado, H., Caldeira, I., Sousa, R., Galego, L., Antunes, D., Santos, C. & Costa, R. (2019) A propagação de plantas selecionadas e micorrizadas de *Arbutus unedo* L. e híbridos de Castanheiro. *IPC2Society, ISCAC/IPC*, Coimbra-Portugal, 11 de Abril.

Gomes, F., Figueiredo, P., Santos, R., Gama, J., Maia, J., Pato, R. L., Botelho, G., Franco, J., Melo, F., Santos, S., Nazaré, N., Guilherme, R., Curado, F., Casau, F., Plácito, F., Rodrigues, I., Henriques, M., Gomes, D., Viegas, J., Machado, H., Caldeira, I., Sousa, R., Galego, L., Antunes, D., Santos, C. & Costa, R. (2018). Casos de estudo no âmbito da valorização de recursos naturais e endógenos: Melhoramento do medronheiro e castanheiro. *Workshop Lab2factory*. Coimbra – Portugal, 20 Abril.

Henriques, M., Gomes, D. & Pereira, C. (2017). Liquid whey protein concentrates produced by ultrafiltration as primary raw materials for thermal dairy gels. *Food Technology and Biotechnology*, 55 (4), 454-463.

Henriques, M., Gomes, D., Brennan, K., Skryplonek, K., Fonseca, C. & Pereira, C. (2017a). The use of whey proteins as fat replacers for the production of reduced fat cheeses. In M. Henriques & C. Pereira (Eds). *Cheese: Production, Consumption and Health Benefits*. (Chap. 6, pp. 139). New York: Nova Science Publishers Inc.

Henriques, M., Gomes, D., Brennan, K., Skryplonek, K., Fonseca, C. & Pereira, C. (2017b). Use of whey proteins as fat replacers for the production



of light cheeses. In *Proceedings 10th NIZO Dairy Conference: Innovations in Dairy Ingredients*, Papendal – The Netherlands, 1-3 October.

Henriques, M., Gomes, D., Dias, S., Fonseca, C. & Pereira C. (2018). Frozen yogurt microbial indicators. In *Proceedings of the 3rd World Summit & Expo on Food Technology and Probiotics (Food Tech-2018)*, Prague - Czech Republic, 25-26 October.

IIA – Instituto de Investigação Aplicada (2019). Disponível em: <http://iia.pt/catalogo/>

Melo, J. A. M. C. (2017). *Estudo de propriedades químicas de *Satureja montana* L. e aplicação em chouriço caseiro*. (Relatório de estágio profissionalizante da Licenciatura em Biotecnologia). Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra, Portugal.

MonitETAR: monitorização microbiológica de estações de tratamento de águas residuais (2019). Instituto de Investigação Aplicada - IIA. Disponível em:

<http://iia.pt/catalogo/monitetar-monitorizacao-microbiologica-de-estacoes-de-tratamento-de-aguas-residuais/>.

Pleno, A. C. S., Nunes, A. C. D., Pereira, C., Gomes, D., Santos, J. M. P., Marques, M. M., Henriques, M., Pedroso, V. E. C., Pais, S. B. & Clemente, P. M. P. (2019). Pedido Provisório de Patente No. 115385 G: Processo de produção de sorelho concentrado e sua utilização como ingrediente funcional na preparação de molhos e bebidas fermentadas. 20191000016775. Data 21.03.2019.





2. Economia Circular no Setor de Laticínios: Valorização do Sorelho Através da Produção de Bebidas Lácteas Fermentadas e Molhos para Saladas

Carlos Pereira, Marta Henriques, David Gomes,
Ana Pleno, Andreia Nunes, Mariana Marques,
Pedro Clemente, Soraia Pais, Verónica Pedroso,
Aleksandra Piskorz, Arona Pires, Natalí Marnotes

ECONOMIA CIRCULAR NO SETOR DE LATICÍNIOS: VALORIZAÇÃO DO SORELHO ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS E MOLHOS PARA SALADAS

Carlos Pereira, Marta Henriques, David Gomes, Ana Pleno, Andreia Nunes, Mariana Marques, Pedro Clemente, Soraia Pais, Verónica Pedroso, Aleksandra Piskorz, Arona Pires, Natalí Marnotes

O projeto Lab2factory tem como objetivo central a transferência do conhecimento científico e tecnológico desenvolvido ao nível do Instituto Politécnico de Coimbra para as fileiras agroalimentar e florestal. Este projeto enquadra-se no âmbito do domínio de especialização inteligente da Região Centro, articulando o potencial agrícola regional das referidas fileiras com vista ao desenvolvimento de novos produtos e processos. As tecnologias desenvolvidas procuram responder a questões concretas relacionadas com a aplicação de soluções industriais sustentáveis, e com a valorização dos recursos naturais e endógenos da região, com potencial extensão ao contexto nacional ou até internacional.

No caso particular do setor agroalimentar, o projeto desenvolveu diversas atividades relacionadas com a eficiência energética e com a valorização de subprodutos e resíduos gerados pelo setor dos laticínios. Nesse sentido, com o apoio de uma equipa de alunos da licenciatura em Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), foi possível desenvolver atividades de investigação aplicada que culminaram na submissão de um pedido provisório de patente. O presente capítulo pretende enquadrar o tema e apresentar os aspetos mais significativos do trabalho desenvolvido.

Contextualização do problema

A grande dificuldade na valorização do soro em Portugal resulta da pequena dimensão das indústrias produtoras de queijo, que representam cerca de 30% do tecido empresarial do setor e que processam entre 10.000 e 100.000 L



leite/dia. Estas empresas não dispõem dos sofisticados equipamentos necessários para a concentração e desidratação do soro. Apenas os dois maiores produtores de queijo portugueses secam o soro, estimando-se que processem cerca de 250.000 toneladas por ano, ou seja, menos de metade do soro produzido no país.

No caso do soro de queijaria, a recuperação da maioria das proteínas solúveis presentes, pode ser efetuada, de forma simples, pela produção de agregados proteicos. Em Portugal, a produção de requeijão é um processo que, desde há muitos anos, se utiliza com esse objetivo. Embora aplicado de forma empírica, o processo de obtenção de requeijão baseia-se essencialmente no efeito que o aquecimento produz sobre as proteínas de soro originando a sua gelificação e a formação de agregados proteicos que retêm outros componentes presentes no soro, nomeadamente gordura. Havea et al., (1998) referem que as proteínas do soro quando aquecidas em condições apropriadas ($> 75\text{ }^{\circ}\text{C}$, com valores de pH entre 6 e 8 e com concentrações superiores a $6\text{ g}/100\text{g}$) formam um gel. Assim, para a produção de requeijão, o soro de queijaria (normalmente adicionado com 5 a 10% de leite de ovelha ou cabra) é aquecido a $90\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após floculação da proteína, os agregados são retirados e inseridos nos moldes antes de serem arrefecidos a menos de $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o armazenamento. Normalmente, apenas os soros de queijos de ovelha, de cabra, ou de mistura são usados para a produção de requeijão, uma vez que o baixo rendimento obtido na produção de requeijão a partir de soro de queijos fabricados com leite de vaca não compensa os elevados custos energéticos do processo. Neste caso, existe a possibilidade da integração de uma etapa adicional de concentração do soro por ultrafiltração, constituindo uma alternativa economicamente atrativa, e permitindo a obtenção de concentrados líquidos de proteínas de soro (CLPS) que podem ser imediatamente incorporados no fabrico de outros produtos lácteos, nomeadamente queijos e iogurtes (Hinrichs, 2001; Henriques et al., 2011, 2012), ou até serem usados no fabrico de requeijão.

Em 2017 a produção nacional de queijos de ovelha e cabra, ou de queijos de mistura, situou-se em cerca de 21.000 toneladas, distribuídas da seguinte forma: 11.800 toneladas de queijo de ovelha; 2.900 toneladas de queijo de cabra; e 6.000 toneladas de queijo de mistura (INE, 2018).

Estima-se que, da produção deste tipo de queijos, resultem anualmente cerca de 150.000 toneladas de soro, sendo uma parte significativa utilizada para o

fabrico de requeijão. Do fabrico de requeijão resulta o sorelho que ainda tem cerca de 50 - 60% do extrato seco do soro, ou seja, cerca de 3,5 - 4,5% de lactose, 0,5 - 1,3% de matéria azotada, 0,5 - 2,0% de minerais e 0,05 - 0,5% de gordura.

Este subproduto é normalmente utilizado para alimentação animal não sendo conhecidas aplicações na alimentação humana. Apesar do sorelho ser já o resultado de um processamento subsequente do soro, possui ainda uma elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO_5), não podendo ser eliminado sem tratamento adequado. A sua elevada CBO_5 impede a sua decomposição em estações de tratamento de águas residuais (ETAR), a não ser que seja muito diluído. Porém, a diluição irá aumentar drasticamente o volume de efluente a tratar o que acarreta problemas adicionais, nomeadamente no dimensionamento da ETAR e no elevado consumo de água. Assim, as empresas que têm este subproduto optam por cedê-lo para alimentação animal. Contudo, nem sempre é fácil dispor de explorações pecuárias próximas e dispostas a receber o sorelho, o que pode criar sérios problemas às empresas produtoras no que diz respeito ao fim que podem dar aos seus subprodutos e efluentes. Impõe-se assim o desenvolvimento de soluções economicamente sustentáveis que permitam a valorização interna do sorelho com a conseqüente redução do impacto ambiental associado à sua produção.

Refira-se ainda que, na maioria dos processos produtivos de queijo de ovelha portugueses é utilizado o cardo (*Cynara cardunculus* L.) como agente coagulante. Diversos trabalhos divulgaram que a ação das enzimas proteolíticas desta planta sobre as proteínas do soro (nomeadamente sobre a α -Lactalbumina) origina a produção de péptidos hidrofóbicos de baixo peso molecular (< 3 kDa) com atividade anti-hipertensiva e anti-ulcerativa comprovadas (Tavares et al., 2011 a,b,c,d; Pintado et al., 2010, 2011; Tavares & Malcata, 2012). Apesar das condições de coagulação do leite pela ação do cardo não serem as ótimas para a hidrólise da α -Lactalbumina, e conseqüente produção de péptidos, será espetável que a sua atividade proteolítica possa ter algum efeito no incremento da concentração de péptidos com atividade biológica presentes no sorelho resultante. Deste modo, a valorização do sorelho permitiria originar produtos com uma fração azotada enriquecida e, potencialmente, ricos em péptidos com atividade biológica.

Que seja do nosso conhecimento, não existe qualquer processo que reivin-



dique a possibilidade da valorização dos componentes do sorelho, nomeadamente que preconize a sua concentração seletiva por tecnologias de membrana e que proponha aplicações concretas para os concentrados de proteínas de sorelho (CLS) resultantes do processo de concentração.

Invenção

A solução tecnológica aqui proposta teve como diretrizes de desenvolvimento, ser um processo simples, possuir características inovadoras devido à utilização de processos de separação seletiva, ser pouco dispendiosa, quer em custos de capital quer em custos de funcionamento, quando comparada aos tradicionais processos de concentração seguidos de desidratação, e poder ser aplicada em pequena-média escala de produção.

O processo diz respeito à obtenção de concentrado líquido de sorelho (CLS) e de concentrado líquido de sorelho deslactosado e dessalinizado (CLSdd) utilizando tecnologias de filtração tangencial com recurso a membrana com limiar de corte correspondente à ultrafiltração (UF). Globalmente, o processo visa separar o sorelho em duas frações: uma fração que corresponde a um concentrado rico em proteínas e péptidos (também aqui denominados de compostos azotados), e gordura (caso o sorelho não tenha sido desnatado); e outra fração correspondente ao permeado, cujos sólidos são quase exclusivamente representados por lactose e sais minerais.

A tecnologia consiste em duas etapas essenciais (Figura 1). Assim, numa primeira fase do processo de obtenção do concentrado de sorelho recorre-se a uma etapa de UF, usando membranas orgânicas com um *cutoff* de 10 kDa, cujo objetivo é a concentração da fração azotada do sorelho, constituída sobretudo por agregados proteicos, proteínas solúveis, péptidos e aminoácidos livres. O produto resultante desta primeira etapa (CLS), pode ser usado na sua totalidade enquanto ingrediente funcional na produção de molhos para saladas.

Em muitos casos, a etapa de produção de queijo envolve a adição de sal ao leite, pelo que o soro e o sorelho resultantes poderão ter níveis significativos de sal (5 a 20 g/L). Caso se pretenda a redução do teor de sal no CLS obtido, é aplicada uma segunda fase no processo. Esta fase corresponde à produção de um concentrado líquido de sorelho dessalinizado e deslactosado (CLSdd), a partir do concentrado líquido de sorelho (CLS) através da aplicação de uma

técnica de diafiltração (DF), para remoção de lactose e sais. O produto daqui resultante contém um teor de lactose e de sais cerca de 10 vezes inferior ao do CLS obtido após a primeira etapa. Neste caso já poderá ser utilizado enquanto ingrediente funcional na produção de bebidas lácteas fermentadas.

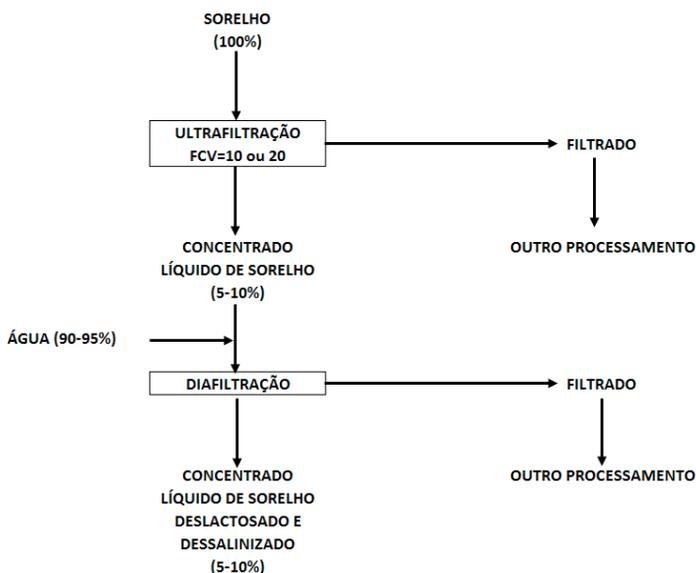


Figura 1. Representação esquemática do processo de obtenção de concentrado líquido de soro de leite (CLS) e de concentrado líquido de soro de leite deslactosado e dessalinizado (CLSdd).

Importa detalhar que o soro original, resultante da produção do queijo, é concentrado por UF com redução do seu volume inicial em cerca de 10 - 20 vezes. O fator de concentração volumétrica (FCV) aplicado é a razão entre o volume da alimentação e o volume de retido ($FCV = VA/VR$). Aplicando-se um FCV de 10 ou de 20 durante a etapa de UF, é possível a obtenção de um concentrado líquido de soro de leite (CLS) com um teor de sólidos entre 7,1 - 40,1%. A obtenção do CLS com esta gama de sólidos totais, implica que o soro original apresente um teor de sólidos entre 4,0 - 8,5%, e entre 0,3 - 1,2% de matéria azotada. Na etapa de DF, o concentrado líquido de soro de leite (CLS) é diluído com um volume de água igual a 9 vezes o seu volume, e de seguida é sujeito a nova concentração por UF, reduzindo-se de novo para o seu volume de partida. Este processo permite a redução do teor de lactose



e de sais em cerca de 10 vezes relativamente à sua concentração no sorelho inicialmente selecionado. Obtém-se assim um concentrado líquido de sorelho dessalinizado e deslactosado (CLSdd) com teor de lactose entre 0,3 e 0,4% e de sais minerais entre 0,07 e 0,25%.

Os concentrados (CLS e CLSdd) enquanto ingredientes funcionais na preparação de molhos para saladas e bebidas fermentadas, pressupõem um tratamento prévio de aquecimento a 65 °C, homogeneização a uma pressão de 5-10 MPa e pasteurização a 75 °C por pelo menos 30 s, com o objetivo de garantir a sua segurança e conservação. A aplicação do processo de pasteurização poderá ser efetuada apenas após a adição de outros ingredientes, que poderão variar tendo em consideração os produtos a desenvolver. Segue-se um processo de arrefecimento até à temperatura adequada quando se trata da sua integração imediata nos processos de fabrico; ou caso se pretenda a sua distribuição numa nova cadeia de mercado, a sua refrigeração e manutenção a 4 °C para utilização no prazo de 3 dias, ou congelação a -18 °C para utilização num prazo máximo de 3 meses.

Sumariamente, a tecnologia objeto da invenção contribui para o estado da técnica com as seguintes vantagens: (i) reaproveitamento da totalidade dos componentes azotados do sorelho; (ii) utilização ou reincorporação direta dos concentrados de sorelho (CLS ou de CLSdd) em produtos alimentares, permitindo a sua valorização imediata; (iii) utilização de uma tecnologia simplificada e com baixo consumo energético; (iv) redução da carga poluente dos efluentes a eliminar pela indústria.

Detalhes técnicos da invenção

Apesar das configurações mais gerais e vantajosas da presente invenção terem já sido apresentadas de forma sumária, serão detalhadas de seguida algumas opções tecnológicas, de acordo com outros modos vantajosos e/ou preferenciais de implementação.

Aspetos operacionais

A membrana de ultrafiltração com um limiar de corte de 10 kDa permite a retenção de quase a totalidade dos compostos azotados, possibilitando a passagem do permeado de ultrafiltração (PUF) composto essencialmente por

lactose e sais. Este tipo de membrana garante em simultâneo a obtenção de fluxos de filtração rentáveis e eficientes, uma vez que retém as moléculas com um peso molecular superior a 10 kDa mantendo um elevado fluxo de permeado, o que tem impacto na rapidez da operação e na eficiência energética do processo. Caso a concentração do soro por ultrafiltração seja feita à temperatura de 45-55 °C, o processo proporciona um fluxo de filtração ideal ao mesmo tempo que limita o crescimento microbiano que possa ocorrer durante a concentração, que é potenciado com temperaturas abaixo destes valores. Por outro lado, a diluição em 10 vezes do volume do concentrado líquido de soro obtido (CLS) e posterior concentração por ultrafiltração com a membrana de 10 kDa permite uma redução dos teores de sal e de lactose na ordem de 10 vezes.

Preferencialmente a ultrafiltração é realizada num modo de funcionamento descontínuo ou contínuo, com recirculação parcial de concentrado. O fator de concentração volumétrica aplicado poderá variar entre 10 e 20. Este é definido em função do nível de concentração de sólidos pretendidos no concentrado líquido de soro (CLS), os quais dependem também, quer da concentração inicial no soro, quer do volume final do concentrado a obter. No caso do FCV utilizado ser 20, o volume do retido representa 5% do original, se for de 10, o volume do retido representa 10% do original, e assim sucessivamente para outro qualquer FCV aplicado.

Frações e produtos obtidos

Num modo de realização preferencial da invenção, o soro resultante do fabrico do queijo é de origem ovina, caprina ou da mistura de ambos. Não obstante, poderá também ser de proveniência bovina dependendo do processo de fabrico a montante. O soro, por sua vez, poderá ou não ser desnatado.

A primeira etapa do processo, a ultrafiltração (UF) visa separar o soro numa fração a valorizar, o concentrado líquido de soro (CLS), de uma fração secundária, denominada de permeado (PUF).

O CLS obtido é rico em agregados proteicos, proteínas e péptidos, denominados de compostos azotados e/ou gordura, e apresenta reduzido teor de lactose e de sais, uma vez que estes não são retidos pela membrana. Caso se utilize um soro que tenha sido previamente desnatado, o CLS apresentar-se-á quase isento de gordura. A sua natureza rica em compostos azotados possibilita a sua



transformação para obtenção de um preparado para molhos, representando desta forma uma solução eficaz e sustentável para o aproveitamento desse resíduo industrial.

A fração secundária, o permeado (PUF) é composta essencialmente por lactose e sais e poderá ser concentrada, nomeadamente por nanofiltração (NF) ou por osmose inversa (OI), e valorizada através de processos convencionalmente utilizados com vista à produção de compostos com interesse comercial, como por exemplo o etanol, ou outros produtos resultantes da atuação de microrganismos ou enzimas específicas.

Provas de conceito com os produtos resultantes da invenção

A título de exemplo apresentam-se alguns resultados experimentais obtidos durante a fase de testes, dos processos e dos produtos.

Selecionou-se sorelho de origem caprina para a execução das provas de conceito. A um lote de 1000 L foi aplicada a técnica de ultrafiltração com recurso a uma membrana de 10 kDa, à temperatura de 45 °C, em modo descontínuo e com um FCV de 10. Obtiveram-se 100 L de concentrado que se denominou de CLS_UF10 e que foi usado na produção de molhos para saladas (Figura 2). A outro lote, com a mesma dimensão (1000 L), repetiu-se o mesmo procedimento alterando apenas o FCV para 20. Os 50 L deste concentrado (CLS_UF20) foram posteriormente submetidos à técnica da diafiltração. Foi aplicada uma diluição de 10 vezes com água (9 volumes de água e 1 volume de concentrado) e voltou-se a concentrar nas mesmas condições da ultrafiltração com um FCV de 10. Neste caso, o produto obtido, concentrado dessalinizado e deslactosado (CLSdd), foi aplicado na produção de bebidas lácteas fermentadas (Figura 4).

Produção de molhos para saladas com base em CLS

O CLS foi aquecido até aos 65 °C e misturado com os ingredientes da formulação do molho. Após a preparação da mistura, o pH foi ajustado a valores entre os 3,5 e os 4,0 com recurso a reguladores de acidez e a mistura foi homogeneizada a 50-100 bar, embalada em frasco de vidro, capsulada e submetida a tratamento térmico a 100 °C por 5 minutos, com vista à sua esterilização (Figura 2).

Apesar de, ao CLS, poderem ser adicionados diversos ingredientes, em diferentes proporções, com vista à obtenção de formulações distintas de molhos para saladas, nesta prova de conceito utilizaram-se: polpa de tomate (15% do total), cebola picada (até 10% do total), pimenta preta (0,25%, m/m), alho em pó (0,50%, m/m), reguladores da acidez e espessantes (p. ex. goma xantana, goma de alfarroba ou inulina, entre 0,5 a 5% do total). As características do CLS utilizado na formulação, e do molho preparado são apresentadas na Figura 3.

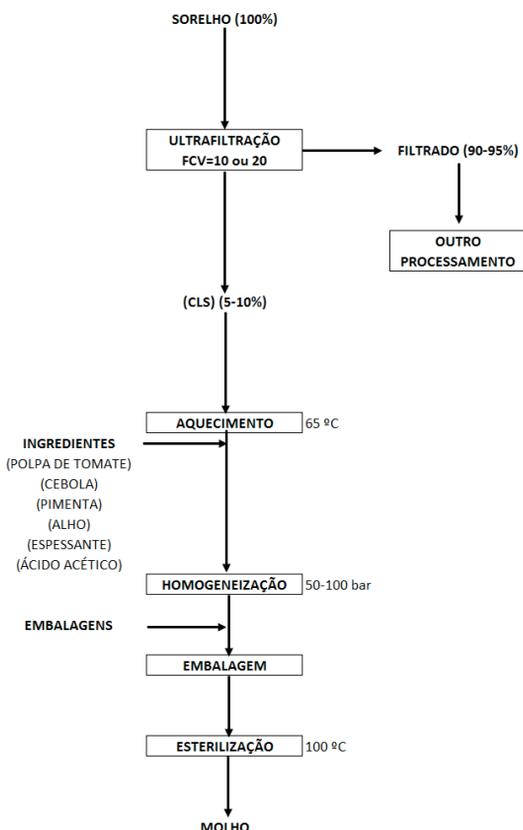


Figura 2. Representação esquemática do processo de produção de molho para saladas produzido com base em concentrado líquido de sorelho (CLS).



Obteve-se um produto com as características desejáveis quer a nível nutricional, quer a nível organolético classificado pelo painel de análise sensorial com um valor médio de 7 pontos, numa escala de 1 a 9.

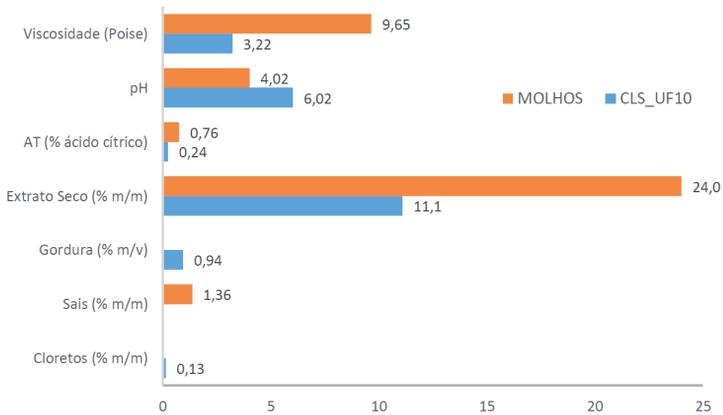


Figura 3. Análises físico-químicas efetuadas ao sorelho de cabra concentrado (CLS_UF10) e ao molho desenvolvido.

Produção de bebidas simbióticas com base em CLSdd

O concentrado líquido de sorelho dessalinizado e deslactosado (CLSdd) foi utilizado como ingrediente funcional para a preparação de bebidas fermentadas com características simbióticas (Figura 4). O termo simbiótico refere-se ao duplo potencial do produto: probiótico, por conter microrganismos probióticos em níveis adequados; e prebiótico por conter péptidos com atividade biológica e inulina.

Para utilização do CLSdd enquanto ingrediente funcional, poderão ser-lhe adicionados sacarose, frutose ou outros edulcorantes, frutooligosacarídeos, inulina, aromas ou preparados de frutas, obtendo-se uma mistura, que é de seguida aquecida a 60-70 °C e homogeneizada à pressão de 50-100 bar. Efetua-se um tratamento térmico a 75 °C durante pelo menos 30 segundos seguido de arrefecimento até 40-45 °C. Após o arrefecimento, a mistura é inoculada com bactérias lácticas probióticas selecionadas, de um grupo que pode compreender culturas específicas de microrganismos probióticos, tais como: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*,

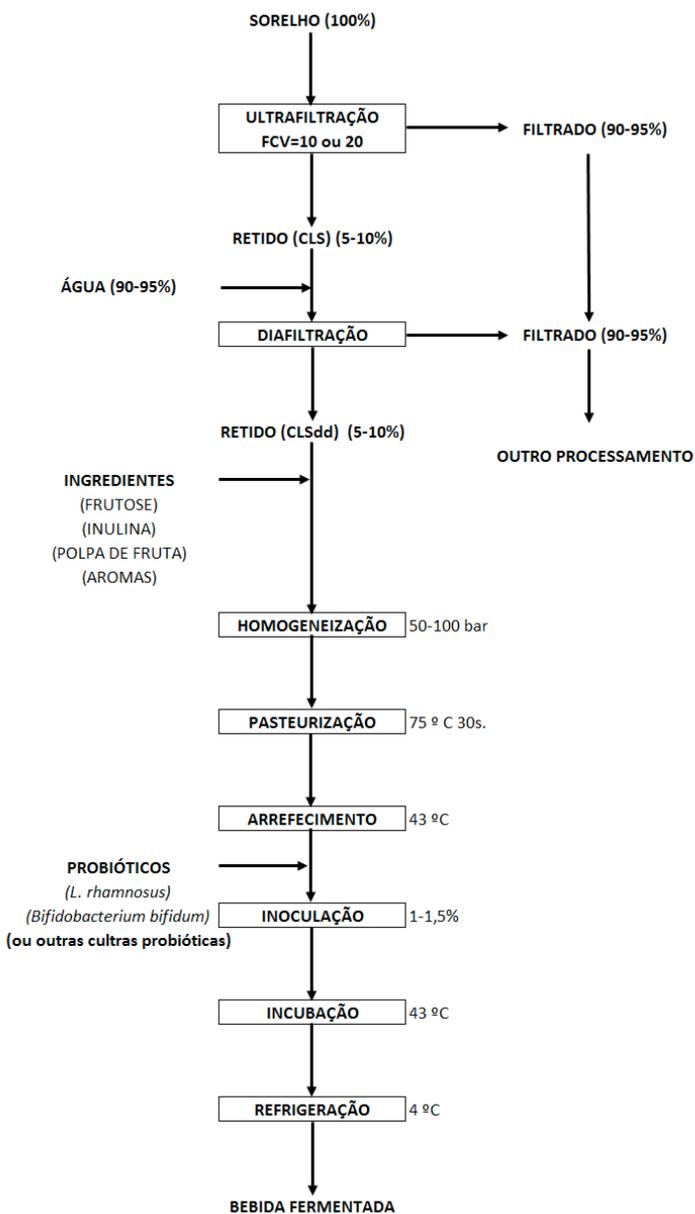


Figura 4. Representação esquemática do processo de fabrico de bebidas lácteas fermentadas à base de concentrado líquido de sorelho deslactosado e dessalinizado (CLSdd).



ou até misturas destas estirpes. Por fim a mistura é embalada e mantida em câmara de incubação à temperatura mais adequada para o desenvolvimento das estirpes selecionadas para fermentação, até atingir pH 4,5. Segue-se um arrefecimento rápido em túnel e conservação em câmaras de refrigeração a temperatura não superior a 4 °C.

Opcionalmente, após inoculação dos microrganismos, a mistura é fermentada em tanque até ser atingido o pH de 4,5, procedendo-se de seguida à refrigeração e enchimento nas embalagens destinadas ao consumo.

Idealmente o produto final deverá ter uma concentração de microrganismos probióticos no intervalo 10^7 - 10^8 UFC/mL, ou pelo menos superior a 10^6 UFC/mL. A validade do produto fermentado deverá ser de, pelo menos, 21 dias em condições de refrigeração. O produto deverá conter uma matriz proteica que compreende 90-100% de proteínas/péptidos do sorelho de leite.

A prova de conceito com o CLSdd consistiu na preparação de três formulações com agentes edulcorantes distintos, tais como a frutose (6%, m/v), xilitol (6%, m/v) e stevia (0,04%, m/v). Às três formulações foram adicionados os ingredientes goma xantana (0,5%, m/v) e inulina (0,5%, m/v). Adicionalmente, usaram-se dois tipos de culturas probióticas disponíveis no mercado: Lyofast ACR™ (Sacco) e Bifidobacterium BB12™ (CHR. Hansen). As culturas foram previamente inoculadas em leite esterilizado, de acordo com as doses e instruções do fabricante, e incubadas a 35 °C por 24 h. No dia seguinte as culturas foram inoculadas nas formulações de CLSdd na proporção de 1% (v/v). O processo de fermentação ocorreu a 35 °C durante 6 horas.

Analisaram-se as características físico-químicas dos produtos obtidos (Tabelas 1 e 2) de acordo com as culturas *starter* utilizadas e os carboidratos testados. Estas foram analisadas relativamente ao pH e ao teor de acidez titulável (AT), sólidos totais, proteína, matéria gorda e cinzas. Os parâmetros da cor foram expressos no sistema CIELAB onde L* representa a luminosidade (0 – preto e 100 – branco), a* (eixo vermelho/verde), b* (eixo amarelo/azul), e por fim a viscosidade.

Tabela 1. Análises físico-químicas às bebidas simbióticas inoculadas com *LyofastACR™* (Sacco). Valores médios ao longo do armazenamento (n=3).

Parâmetros	Frutose	Xilitol	Stevia
pH	4,29±0,37	4,72±0,35	4,18±0,07
AT (% ácido láctico)	0,91±0,24	0,76±0,20	1,09±0,13
Sólidos totais (% m/m)	15,57±1,14	17,39±2,47	12,65±2,17
Proteína (% m/v)	5,34±0,38	5,84±0,90	6,03±1,16
Matéria gorda (% m/v)	0,65±0,10	0,80±0,10	0,67±0,08
Cinzas (% m/m)	0,25±0,22	0,40±0,10	0,45±0,25
Cor			
L*	64,54±0,90	66,89±1,43	67,24±2,54
a*	1,96±0,19	2,06±0,39	1,89±0,33
b*	5,83±0,53	6,10±0,28	6,45±0,64
Viscosidade (cPoise)	4528±790	3440±249	4233±1143

Tabela 2. Análises físico-químicas às bebidas simbióticas inoculadas com *Bifidobacterium BB12™* (CHR. Hansen) (n=3).

Parâmetros	Frutose	Xilitol	Stevia
pH	4,33±0,11	4,36±0,11	4,56±0,33
AT (% ácido láctico)	0,99±0,22	0,92±0,15	0,85±0,22
Sólidos totais (% m/m)	15,69±0,67	15,81±0,90	12,60±1,44
Proteína (% m/v)	4,94±0,33	5,41±0,34	6,45±0,13
Matéria gorda (% m/v)	0,68±0,06	0,64±0,06	0,8±0,01
Cinzas (% m/m)	0,53±0,08	0,53±0,28	0,3±0,00
Cor			
L*	66,22±1,80	67,56±1,92	67,11±2,08
a*	2,04±0,41	1,95±0,33	2,08±0,20
b*	5,97±0,12	6,33±0,05	6,33±0,12



Relativamente aos valores de pH podemos observar que estes se situaram entre 4,18 e 4,72. Já a acidez titulável, expressa em ácido láctico, variou entre 0,85% e 1,09%. As bebidas onde se utilizou LyofastACR™ (Sacco) foram as que apresentaram maior amplitude nos valores de acidez e pH face àquelas em que se utilizou Bifidobacterium BB12™.

Verificou-se também uma evolução do pH e da acidez titulável ao longo do armazenamento em refrigeração dos produtos (28 dias). Foi notório o decréscimo do pH e o incremento da acidez titulável ao longo do tempo, o que indica que, apesar dos produtos serem mantidos em refrigeração, não cessou a atividade metabólica dos microrganismos.

É evidente o menor teor de sólidos totais dos produtos contendo stevia, uma vez que esta foi adicionada em proporções bastante inferiores, quando comparadas com o nível de adição dos outros açúcares. Relativamente aos teores de proteína e gordura dos produtos, todas as formulações têm um valor médio igual ou superior a 5% no primeiro caso, e inferior a 0,6% no segundo caso.

As bebidas simbióticas produzidas apresentaram cor clara e homogénea. Não obstante, a sua cor está intrinsecamente relacionada com os ingredientes utilizados e como tal poderá ser alterada através da introdução de outros ingredientes, nomeadamente polpas de frutos e ou corantes específicos.

No que diz respeito às contagens de bactérias do ácido láctico nos produtos finais (Figura 5), os valores médios registados são praticamente semelhantes nas várias formulações, não evidenciando que o tipo de carboidratos utilizados e o tipo de cultura *starter* tenham influenciado este parâmetro. Apesar de, idealmente, os produtos probióticos deverem apresentar valores superiores a 7 Log_{10} UFC/mL, foram obtidos neste trabalho contagens médias na ordem dos 6,5 Log_{10} UFC/mL, que lhes permitem ser denominados como probióticos.

As diferentes formulações produzidas foram ainda sujeitas a avaliação sensorial ao 7º dia de validade. Embora os consumidores tenham referido como fator negativo o sabor intenso a leite de cabra, será de esperar que a adição de polpas de frutos e/ou de aromas selecionados possa melhorar significativamente as características organolépticas dos produtos.

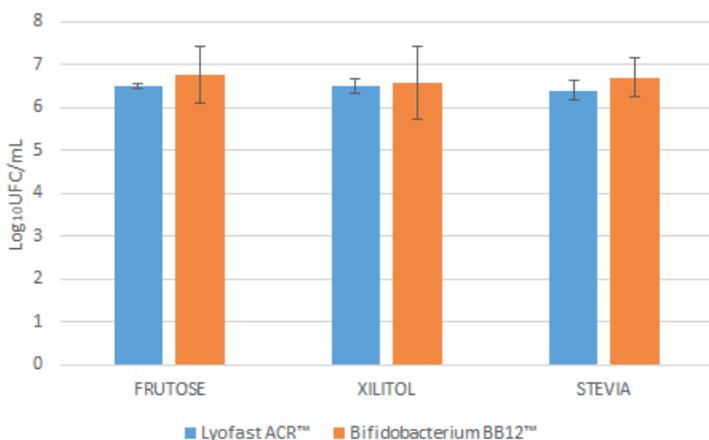


Figura 5. Análises microbiológicas às bebidas simbióticas à base de CLSdd fermentadas com culturas microbianas comerciais. Contagens de bactérias ácido lácticas. Incubação em anaerobiose a 35 °C em meio de cultura MRS.

Considerações finais

Face a um problema concreto das empresas do setor de laticínios, foi possível delinear uma estratégia integrada que permitisse a sua resolução.

Para além disso, foi possível envolver os estudantes da Licenciatura em Tecnologia Alimentar da ESAC em todas as fases do processo: desde a análise do problema, definição da abordagem a usar, desenvolvimento e otimização dos processos e produtos e validação dos produtos em provas de conceito, que culminaram na elaboração do pedido provisório de patente.

Acresce que, durante a fase de ensaios em oficina tecnológica, os estudantes desenvolveram uma formulação para uma bebida láctea com base em sorelho, incorporando ainda *Aloe vera*, romã e uva. Com esta formulação, os alunos concorreram ao prémio Ecotrophelia Portugal 2018, tendo sido selecionados como finalistas e participado nas sessões associadas. Tal facto permitiu-lhes também desenvolver diversas competências, nomeadamente de trabalho em grupo e de comunicação.



Agradecimentos

Este trabalho foi cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), no âmbito do projeto Lab2Factory: Reforço da transferência de conhecimento científico e tecnológico das fileiras agroalimentar e florestal para o setor empresarial; Código Universal: CENTRO-01-0246-FEDER-000020-Candidatura 6644.

Agradecemos também à empresa TêTê II-Produtos lácteos pela disponibilização e transporte do sorelho utilizado nos ensaios e às empresas Clerici-Sacco Portugal e Promolac Unipessoal Lda., pela cedência de culturas de arranque.

Referências

- Havea, P., Singh, H., Creamer, L. K. & Campanella, O. H. (1998). Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65, 79-91.
- Henriques, M., Gomes, D., Rodrigues, D., Pereira, C. & Gil, M. (2011). Performance of bovine and ovine liquid whey protein concentrate on functional properties of set yoghurts. *Procedia Food Science*, 1, 2007-2014.
- Henriques, M., Gomes, D., Pereira, C. & Gil, M. (2012). Effects of liquid whey protein concentrate on functional and sensorial properties of set yoghurts and fresh cheese. *Food and Bioprocess Technology* 6 (4): 952-963.
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495-503.
- INE (2018). Dados da produção de queijo por tipo de queijo. (acedido em 16.10.2018): Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000920&contexto=bd&selTab=tab2
- Tavares, T. G., Contreras, M. M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P. J., Pintado, M. E., Recio, I. & Malcata, F. X. (2011). Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis, antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolyzates obtained with cardoon extract.

International Dairy Journal, 21(12): 926-933.

Tavares, T. G., Amorim, M., Gomes, D., Pintado, M. E., Pereira, C. D. & Malcata, F. X. (2011). Bioactive peptide-rich concentrates from whey: pilot process characterization. *Journal of Food Engineering*, 110, (4): 547–552.

Tavares, T. G., Contreras, M. M., Amorim, M., Pintado, M. E., Recio, I. & Malcata, F. X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme: in vitro activity and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32, 1013-1019.

Tavares, T. G., Monteiro, K. M., Possenti, A., Pintado, M. E., Carvalho, J. E. & Malcata, F. X. (2011). Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins brought about by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 21, 934-939.

Tavares, T. G. & Malcata, F. X. (2012). The Portuguese Paradox: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? *Food Chemistry*, 131, 727–729.

Pintado, M. E., Tavares, T. G., Amorim, M., Malcata, F. X., Barros, R. M., Carvalho, J. E., Dias Pereira, C., Henriques, M., Recio, I., & Ramos, M. (2010). Processo de obtenção de extractos peptídicos bioactivos através da hidrólise de proteínas de soro de leite com enzimas da *Cynara cardunculus*, referidos extractos e respectivas utilizações. Patente Nacional N.º 105073 (N/REF: 39924/09) 26-04-2010.

Pintado, M. E., Tavares, T. G., Amorim, M., Malcata, F. X., Barros, R. M., Carvalho, J. E., Dias Pereira, C., Henriques, M., Recio, I., & Ramos, M. (2011) International Patent PCT/IB2011/051811 (N/REF: 43745/11) 26-04-2011.

<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2011135513>





3. O projeto SoSValor - soluções sustentáveis para a valorização de produtos naturais e resíduos industriais de origem vegetal

Marta Henriques, Ana Raquel Borges, Aida Moreira da Silva, Ana Veloso, Cristina Galhano, Cristina Pintado, Fernanda Delgado, Fernanda Ferreira, Inês Seabra, Ivo Rodrigues, João Noronha, Luís Castro, Luísa Paulo, Manuela Goulão, Maria João Barroca, Maria João Moreira, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Susana Dias

SOSVALOR - SOLUÇÕES SUSTENTÁVEIS PARA A VALORIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E RESÍDUOS INDUSTRIAIS DE ORIGEM VEGETAL

Marta Henriques, Ana Raquel Borges, Aida Moreira da Silva, Ana Veloso, Cristina Galhano, Cristina Pintado, Fernanda Delgado, Fernanda Ferreira, Inês Seabra, Ivo Rodrigues, João Noronha, Luís Castro, Luísa Paulo, Manuela Goulão, Maria João Barroca, Maria João Moreira, Nazaré Pinheiro, Sandra Santos, Susana Dias

Introdução

As normas ambientais relativas à deposição de resíduos, cada vez mais restritivas, e a procura por produtos naturais e compostos bioativos como substitutos dos produtos químicos convencionais de origem sintética, têm promovido uma filosofia de sustentabilidade aplicada às práticas agrícolas e industriais, numa tentativa de melhorar a sua eficiência económica e ir ao encontro das exigências dos consumidores.

A capacidade de se transformar um subproduto de uma determinada atividade numa matéria prima de outra atividade é considerada pela Comissão Europeia e pelas Nações Unidas como o motor mais significativo para promover a economia circular (EC, 2016; UN, 2016). Assim, a valorização dos resíduos que resultam da produção agrícola e florestal, dos resíduos agroindustriais, incluindo os que advêm da atividade agroalimentar e da indústria da madeira, bem como a valorização dos subprodutos dessas atividades, e o uso de novos e eficientes compostos derivados dos recursos naturais, são imperativos.

Devido à sua diversificada (bio)atividade, baixa toxicidade e sustentabilidade ambiental, os produtos naturais podem ser usados tanto para aplicações biológicas como não biológicas numa vasta gama de setores, incluindo o alimentar, cosmético, farmacêutico, agrícola, têxtil, entre outros. Cerca de 40% da literatura científica reporta a utilização destes produtos como antioxidantes, focan-



do-se essencialmente no grupo dos polifenóis (Kroon & Williamson, 2005; Santana-Méridas, González-Coloma & Sánchez-Vioque, 2012). Adicionalmente, há uma crescente procura por antioxidantes de origem natural, mais seguros para aplicação na indústria alimentar, como substitutos dos de origem química com potencial efeito negativo para a saúde humana. Os produtos naturais têm também sido investigados como fontes de compostos antimicrobianos, antivirais e biocidas, e utilizados em estratégias de controlo de alguns microrganismos patogénicos (Carvalho et al., 2018). Evitar a contaminação e o desenvolvimento de microrganismos de alteração e/ou promover o desenvolvimento de bactérias e leveduras benéficas continua a ser um grande desafio para a indústria alimentar, especialmente no caso dos queijos (Pereira-Dias et al., 2002; Pintado et al., 2009; Pintado, Ferreira & Sousa, 2009, 2010), da carne e seus derivados (Dias & Bernardo, 1999) e do pescado (Dias, 2013).

O projeto SoSValor visou responder a dois desafios transversais das indústrias dos setores agroindustrial, florestal, têxtil e alimentar, que procuram:

- Alternativas naturais e economicamente viáveis aos produtos químicos que atualmente utilizam;
- Soluções sustentáveis para os resíduos e subprodutos gerados pela sua atividade.

O principal objetivo foi investigar e produzir soluções para problemas concretos e relevantes destas indústrias, utilizando uma abordagem holística da temática da valorização de resíduos industriais e dos recursos naturais de origem vegetal, procurando promover uma economia circular. Este objetivo foi atingido através da avaliação da disponibilidade de compostos naturais de valor acrescentado nas plantas e recursos endógenos (plantas halófitas, tintureiras, invasoras, aromáticas e medicinais) e da valorização dos resíduos ou subprodutos resultantes das atividades agrícola, florestal e alimentar.

1. Organização das atividades do projeto

Os compostos naturais que têm despertado maior interesse são: os agentes biocidas (bactericidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas), os compostos bioativos (antioxidantes, anticancerígenos), os corantes, os conservantes e os aromas e fragrâncias. Enquanto algumas das categorias elencadas têm uma aplicação mais específica, como é o caso dos biocidas, com aplicação na agricultura e

agroindústria, outras, por sua vez, têm uma aplicação transversal a várias áreas industriais. É o caso dos aromas, fragrâncias e corantes para incorporação em alimentos, têxteis e cosméticos, ou a utilização de compostos bioativos na produção de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Face às necessidades dos setores envolvidos, às sinergias já existentes entre algumas empresas e os membros da equipa de investigação e à experiência anterior, o projeto foi organizado em duas linhas de ação, que se complementam e concorrem para a sistematização da abordagem ao problema. Assim, procedeu-se à obtenção e recuperação dos compostos naturais para aplicação industrial a partir da valorização de plantas e recursos endógenos bem como de resíduos agroalimentares, agrícolas e florestais (Figura 1).

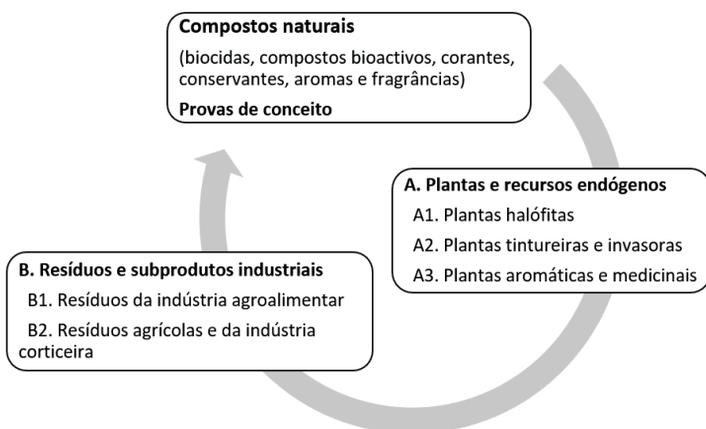


Figura 1. Organização das atividades do projeto SoSValor.

Na primeira linha de ação foram explorados vários grupos de plantas, de acordo com as suas propriedades intrínsecas (plantas halófitas, plantas tintureiras e invasoras, e plantas aromáticas e medicinais) e testados os seus compostos mais promissores em provas de conceito com matrizes alimentares, têxteis e pragas agrícolas. Na segunda linha de ação, os resíduos a valorizar foram os de origem vegetal resultantes das indústrias agroalimentares, agroflorestais da cortiça.

Alguns dos produtos estudados para valorização foram fornecidos por empresas nacionais, com as quais a equipa de investigação tem colaborado. A



empresa VERDES VERDADES forneceu as plantas halófitas, a PLANALTO DOURADO forneceu alguns óleos essenciais de ervas aromáticas, a SORTE-GEL forneceu os subprodutos da produção de castanha congelada, a POM PORTUGAL as sementes e cascas de romã, a COOPERATIVA AGRÍCOLA DE MONTEMOR-O-VELHO a sêmea e a trinca de arroz, a FRIP forneceu os resíduos do processamento de favas, a LENDA DA BEIRA forneceu o bagaço de medronho, a SERCOR forneceu o pó de cortiça.

2. Equipa de investigação

Este projeto ancorou-se em três parceiros institucionais. Dois deles do Sistema Científico e Tecnológico (SCT), o Instituto Politécnico de Coimbra - IPC (líder do consórcio), com investigadores de duas das suas Unidades Orgânicas (Escola Superior Agrária - ESAC e Instituto Superior de Engenharia - ISEC), e o Instituto Politécnico de Castelo Branco - IPCB, através da Escola Superior Agrária - ESACB. Por último, a associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco - CATAA, que permitiu fazer a ponte entre a investigação e as empresas do setor alimentar.

As sinergias e dinâmicas criadas pela multidisciplinidade de uma ampla equipa com 18 investigadores, que possuem domínios próprios de especialização nas mais diversas áreas do saber, nomeadamente em Agricultura, Química, Bioquímica, Microbiologia, Engenharia Química e Engenharia Alimentar, permitem alavancar a produção de conhecimento científico e técnico de excelência. A vasta experiência de alguns dos membros da equipa, na recuperação de compostos de valor acrescentado de diversas matrizes vegetais e resíduos, pela aplicação de tecnologias convencionais e não convencionais (Alexandre et al., 2012; Guiné, Henriques & Barroca, 2012; Rodrigues, Coelho & Carvalho, 2012; Seabra et al., 2012; Braga et al., 2013; Rodrigues, Carvalho & Rocha, 2014, 2017) constitui uma mais valia para o projeto. Por outro lado, o domínio por parte da equipa de investigação, de técnicas de análise e caracterização avançadas, nomeadamente na avaliação da composição química (Fernandes et al. 2011; Peres et al., 2013) e da bioatividade (Pintado, Ferreira & Sousa 2009; Sousa et al., 2011; Henriques et al., 2013; Guiné et al., 2015) das soluções desenvolvidas (capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, fungicida, nematocida, toxicológica, entre outras) permitiu investigar e garantir as melhores soluções tecnológicas para os problemas con-

cretos estudados.

Convém também destacar a mais valia da partilha, entre as entidades do consórcio, os seus investigadores e até os seus estudantes, de um conjunto de infraestruturas (laboratórios, oficinas tecnológicas, equipamentos e técnicas) que permitiram diversificar e complementar as várias vertentes de investigação preconizada nas várias atividades desenvolvidas. Outro aspeto de robustez do projeto foi a estreita ligação entre os investigadores do consórcio e as empresas, algumas delas já elencadas anteriormente, que garantiu o alinhamento dos resultados obtidos com as necessidades do mercado.

3. Implementação do plano de ação

Em cada temática particular foi aplicada uma metodologia transversal constituída por três passos (Figura 2).

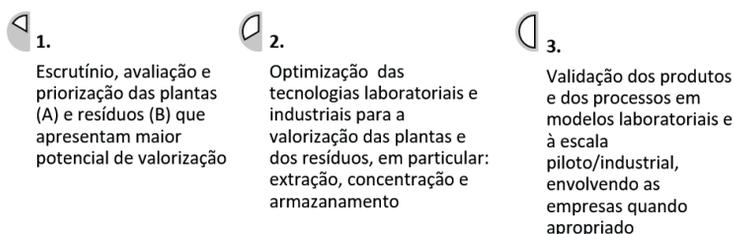


Figura 2. Metodologia de investigação aplicada às várias atividades do projeto SoSValor.

Numa primeira fase procedeu-se ao escrutínio, avaliação e priorização do material vegetal cuja valorização apresentou maior potencial de transferência para o mercado. Seguiu-se a etapa de seleção e otimização dos processos de extração, concentração, conservação e aplicação; e, por último, a validação dos produtos/tecnologias em modelos laboratoriais e nas indústrias dos vários setores.

Os estudantes foram incluídos na dinâmica das atividades do projeto, de acordo com a sua formação específica (agricultura, engenharia química e biológica, biotecnologia, bioengenharia, tecnologia alimentar, qualidade alimentar) e níveis de formação (cursos Técnicos Superiores Profissionais (TeSP),



cursos de Licenciatura e cursos de Mestrado) (Figura 3). Colaboraram e desenvolveram algumas tarefas específicas, tais como, a recolha de informação sobre as temáticas, a recolha de amostras de plantas no campo ou de resíduos e subprodutos nas empresas que colaboraram com o projeto, na realização de análises qualitativas e quantitativas às matérias primas e aos produtos obtidos, na avaliação e apresentação dos resultados nos mais diversos formatos (oralmente, painel, relatórios, vídeos, etc), bem como na organização dos workshops do projeto e na elaboração de conteúdos para o website do projeto (sosvalor.com).



Líder da atividade	<ul style="list-style-type: none">• Especialista na área• Responsável pela coordenação das tarefas da atividade
Investigadores Professores	<ul style="list-style-type: none">• Equipa multidisciplinar (2 Politécnicos, 1 Associação)• Coordenação dos grupos de estudantes
Estudantes	<ul style="list-style-type: none">• Formação em: agricultura, engenharia química e biológica, bioengenharia, biotecnologia, tecnologia e qualidade alimentar• Níveis ensino: TeSP (N^{el.} 5); Licenciatura (N^{el.} 6); Mestrado (N^{el.} 7)

Figura 3. Organização e dinâmica dos grupos de trabalho nas várias atividades do projeto SoSValor.

As tarefas desenvolvidas pelos estudantes foram efetuadas durante as atividades letivas de algumas unidades curriculares, cujas temáticas se enquadravam nos objetivos de aprendizagem e competências a adquirir. Exemplos dessas unidades curriculares são: Laboratório de Tecnologia Química (Licenciatura em Engenharia Biológica); Laboratório Integrado II (Licenciatura em Bioengenharia); Tecnologia dos Processos Alimentares II (Licenciatura em Tecnologia Alimentar); Operações Unitárias em Biotecnologia (Licenciatura em Biotecnologia); Projeto (Licenciatura em Tecnologia Alimentar e do curso TeSP em Qualidade Alimentar) e no Estágio de diversas licenciaturas e mestrados.

A coordenação das atividades dos estudantes foi da responsabilidade dos investigadores do projeto alocados a cada atividade específica, e de acordo com a sua área de especialidade (Figura 3). Foi estimulado o trabalho em grupo, especialmente entre diferentes níveis de ensino, com o objetivo de promover

e melhorar as suas competências sociais, tais como a capacidade de comunicação e relacionamento com os outros, sentido de responsabilidade e capacidade de gestão de conflitos. O envolvimento dos estudantes de diferentes níveis académicos em atividades conjuntas de investigação pode ser uma poderosa ferramenta de aprendizagem, capaz de promover competências e capacidades individuais e coletivas de ajuda e motivação. A experiência dos estudantes nas atividades de investigação aplicada, que lhes proporcionou o contacto e a exposição aos problemas complexos reais, permitiu-lhes ter uma visão mais abrangente da realidade e contribuiu para a formação de futuros profissionais mais competentes ao nível dos conhecimentos e ao nível pessoal.

De seguida apresentam-se as várias atividades desenvolvidas, o material vegetal usado em cada uma delas, a abordagem adotada em cada caso e os principais resultados alcançados. Alguns estudos mais concretos e mais detalhados serão também apresentados em alguns dos capítulos seguintes deste volume.

3.1. Plantas halófitas

As plantas halófitas, flora típica dos ambientes salinos, podem ser consideradas um recurso promissor como ingrediente funcional, devido ao elevado valor nutricional em termos de minerais, fibras e vários compostos bioativos (Rodrigues et al., 2014). Quer as espécies de salicornia quer as de sacórnica apresentam-se como recursos promissores para o desenvolvimento de *novel foods* enriquecidos com antioxidantes ou usados como substitutos do sal. As plantas halófitas podem desempenhar um papel significativo na melhoria das dietas, satisfazendo as necessidades dos consumidores em termos de benefícios para a saúde e aceitação sensorial (Moreira da Silva, 2011).

Nesta atividade estudaram-se diferentes processos e condições de secagem da espécie *Salicornia ramosíssima* (Tabela 1), de modo a manter o seu perfil nutricional e biológico. A planta, desidratada e moída, foi posteriormente utilizada como “sal verde” (substituto do sal) na produção de *novel foods*, biscoitos e bolachas, em ensaios laboratoriais e industriais. Foi também preconizada a avaliação citotóxica e biológica dos produtos desenvolvidos.



Tabela 1. Planta halófitas estudada e aplicações desenvolvidas.

Material vegetal	Estudos / Aplicações
Salicornia	Otimização de processos de secagem
(<i>Salicornia ramosíssima</i>)	Avaliação da atividade citotóxica e biológica Produção de bolachas com menor teor de sal

3.2. Plantas tintureiras e invasoras

A acácia é considerada a espécie invasora mais agressiva em Portugal (Marchante, Marchante & Freitas, 2005) tendo um efeito extremamente negativo nos ecossistemas. Considerando o elevado conteúdo em compostos fenólicos e alcalóides nas partes aéreas desta planta (Luís et al., 2012) algumas aplicações com interesse podem ser equacionadas. Por outro lado, apesar do baixo interesse comercial da árvore do incenso, esta pode ser explorada para a produção de extratos já reconhecidos como antimicrobianos, antioxidantes e repelentes de insetos (Dias et al., 2007) devido à composição dos óleos essenciais (OE) das suas bagas. Quer a giesta quer o sabugueiro podem ser explorados como fontes de corantes e compostos bioativos de elevada qualidade. A giesta é caracterizada pela presença de favonóides e isoflavonas (Luczkiewicz et al., 2004), apresentando uma vasta gama propriedades medicinais (Rigano et al., 2009). O potencial medicinal do sabugueiro (bagas e flores) advém da sua atividade antioxidante superior e compostos fenólicos (Nakajima et al., 2004). O sumo das bagas do sabugueiro, rico em antocianinas (Seabra et al., 2010), é também um corante natural para substituir os corantes alimentares artificiais.

Nesta atividade, que usou as plantas invasoras e tintureiras como matrizes vegetais, seguiram-se duas abordagens distintas. Por um lado, a extração de corantes naturais a partir do material vegetal elencado na Tabela 2 e o seu uso no tingimento de tecidos de vários tipos e com diferentes tratamentos. Por outro, os extratos resultantes da casca, folhas e sementes da mimosa foram avaliados quanto ao seu potencial contra o nemátode-da-madeira-do-pinheiro.

Tabela 2. Plantas tintureiras e invasores estudadas e aplicações desenvolvidas.

Material vegetal	Estudos / Aplicações
Erva-tintureira (<i>Phytolacca americana</i>)	Produção de corantes
Bagas (secas)	Eficácia do tingimento de tecidos (lã, algodão e algodão ionizado)
Árvore-do-incenso (<i>Pittosporum undulatum</i>)	Extração de corantes
Folhas (verdes e secas)	Eficácia do tingimento de tecidos (lã, algodão e algodão ionizado)
Ramos (secos)	
Bagas (verdes e maduras)	
Acácia-negra (<i>Acacia melanoxylon</i>)	Extração de corantes
Casca (fresca)	Eficácia do tingimento de tecidos (lã, algodão e algodão ionizado)
Mimosa (<i>Acacia dealbata</i>)	Extração de corantes
Casca (fresca e seca)	Produção de extratos
Folhas (frescas e secas)	Avaliação do potencial nematicida no nemátode-da-madeira-do-pinheiro
Sementes	(<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>)

3.3. Plantas aromáticas e medicinais

O uso de plantas aromáticas e medicinais (PAM) em diversos alimentos e em aplicações agrícolas é uma prática ancestral baseada em conhecimentos empíricos (Barata et al., 2011). Diversos trabalhos visaram correlacionar os efeitos bioativos e as propriedades dos extratos das PAM (atividade antioxidante e antimicrobianas (Carvalho et al., 2016), nematicida (Galhano et al., 1997; Galhano, 2005; Galhano, Ryan & Santos, 2005), toxicológica (Ferreira et al., 2011, 2012) e os potenciais benefícios para a saúde (Ferreira et al., 2010), com a sua composição química e têm merecido grande destaque. No entanto, a utilização das PAM ainda tem pouca expressão comercial e carece de trabalhos de investigação continuados que demonstrem o seu potencial como substitutos naturais dos compostos químicos de origem sintética.

Neste projeto, as plantas aromáticas e medicinais utilizadas como material vegetal foram as que se encontram identificadas na Tabela 3. Foram produ-



zidos, caracterizados quimicamente e avaliados quanto à sua eficácia como agentes antioxidantes e antimicrobianos, vários extratos e óleos essenciais de entre estas plantas aromáticas. Os que apresentaram melhor *performance*, foram incorporados em filmes e revestimentos edíveis com aplicações à escala laboratorial e piloto em queijos, e, à escala industrial, em alheiras e painhos.

Tabela 3. Plantas aromáticas e medicinais estudadas e aplicações desenvolvidas.

Material vegetal	Estudos / Aplicações
Tomilho (<i>Thymus mastichina</i> , <i>Thymus vulgaris</i>)	Produção de extratos e óleos essenciais <i>Screening</i> da sua ação antibacteriana
Oregão (<i>Origanum virens</i>)	Avaliação da atividade biológica
Erva-príncipe (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Filmes edíveis de cobertura à base de quitosano, para controlo de bacterioses em queijos
Escovilhão (<i>Melaleuca armillaris</i>)	Utilização na fumigação em câmaras de cura
Perpétua-das-areias (<i>Helichrysum italicum</i>)	Revestimentos edíveis à base de proteínas de soro para aplicação em produtos cárneos (alheiras e painhos)

3.4. Resíduos da indústria agroalimentar

Tipicamente, uma parte substancial dos resíduos agroalimentares produzidos durante o manuseamento e processamento de cereais, frutos e vegetais, ainda incluem quantidades significativas de material vegetal e dos seus principais constituintes. Os mais diversos compostos de valor acrescentado podem ser encontrados na maioria destes resíduos. É o caso dos subprodutos da produção de arroz branqueado (casca de arroz (Karimi et al., 2014), sêmea, e trinca), das cascas das vagens de fava, do bagaço resultante da extração da polpa de medronho (Fortalezas et al., 2010) ou do bagaço resultante da produção de vinho, entre outros (Tabela 4).

Tabela 4. Subprodutos e resíduos da indústria agroalimentar estudados e aplicações desenvolvidas.

Material vegetal	Estudos / Aplicações
Medronheiro (<i>Arbutus unedo</i>)	Produção de sumos de fruta
Bagaço da extração da polpa de medronho	Extração de corantes Extração de celulose
Cebola-roxa (<i>Allium cepa</i>)	Extração de corantes
Casca (seca)	
Fava (<i>Vicia faba</i>)	Extração de celulose
Casca da vagem fresca, casca da vagem oxidada	Potencial nematocida
Romã (<i>Punica granatum</i>)	Produção de corantes
Casca, grainhas	Óleo essencial da grainha Produção de extratos com capacidade antioxidante
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Produção de bebidas à base de arroz
Sêmea, trinca	Preparados fermentados para sobremesas
Castanha (<i>Castanea sativa</i>)	Produção de farinha de castanha
Fruto congelado (mal pelado, queimado, partido)	
Videira (<i>Vitis vinifera</i>)	Extração de celulose
Bagaço	Extração de corantes

Por vezes, com apenas algumas etapas de processamento adicionais, esses materiais sem valor comercial ou de valor residual, podem ser facilmente transformados noutros com valor acrescentado muito interessante.

A investigação preconizada nesta atividade consistiu essencialmente no desenvolvimento de metodologias de extração e otimização das condições operatórias com vista a maximização de rendimentos e ao aumento da concentração e pureza dos compostos com interesse. Estes extratos/compostos foram por sua vez utilizados em aplicações alimentares como é o caso da produção de



sumos, bebidas, sobremesas e farinhas; em aplicações têxteis como corantes; como ingredientes em misturas para aplicações biomédicas (celulose); e como agentes nematicidas.

3.5. Resíduos agrícolas e da indústria corticeira

Os agrosresíduos, produzidos durante as atividades agrícolas e florestais, devem também ser encarados numa perspetiva de valorização, pois as quantidades geradas durante essas operações são avultadas. É o caso, por exemplo, da palha e do carolo de milho, do engaço das uvas, das cascas, flores, folhas ou ramos de poda das mais diversas culturas (Tabela 5). A caracterização química e a atividade biológica (efeito nematicida e capacidade de combater doenças neurológicas) foram o foco da avaliação do potencial dos extratos produzidos destas fontes.

Portugal é o país com maior área ocupada por sobreiro, bem como o maior produtor, transformador e exportador de cortiça (Castro & Coelho Pinheiro, 2016). A preocupação no aumento da produtividade e competitividade deste setor industrial é permanente, assumindo, neste contexto, um papel extremamente importante, a recuperação de resíduos e subprodutos desta atividade (Santos et al., 2013). O principal resíduo do setor corticeiro é o pó de cortiça, resultante das operações mecânicas a que a cortiça está sujeita no fabrico de rolhas, e que, atualmente, apenas é valorizado como combustível. Relativamente aos ensaios com o pó de cortiça, foram otimizados os processos de secagem e de extração (Tabela 5). A composição química e a *performance* dos produtos obtidos no que diz respeito à sua bioatividade e à sua aplicação como corante foi avaliada em vários têxteis.

Tabela 5. Resíduos agrícolas e da indústria corticeira estudados e aplicações desenvolvidas.

Material vegetal	Estudos / Aplicações
Medronheiro (<i>Arbutus unedo</i>)	Caracterização de extratos
Folhas (várias proveniências)	Composição em fenólicos e flavonoides
Flores (várias proveniências)	Atividade antioxidante
	Atividade de inibição da acetilcolinesterase
	Capacidade de combater doenças neurológicas
	Efeito nematocida
Nóz-pecã (<i>Carya illinoensis</i>)	Efeito nematocida <i>in vitro</i> dos extratos
Pericarpo, casca, ramos de poda	
Milho (<i>Zea mays</i>)	Extração de celulose
Carolo, palha da espiga	
Videira (<i>Vitis vinifera</i>)	Extração de celulose
Engaço da uva	
Pó de cortiça	Otimização da extração de compostos bioativos
	Atividade antimicrobiana
	Caracterização química
	Aplicação como corante

4. Indicadores de resultado e de realização do projeto

As atividades desenvolvidas durante este projeto produziram aplicações inovadoras (Tabela 6) testadas com sucesso em ambiente industrial, em empresas de vários setores e, em ambiente à escala piloto e laboratorial, nas instalações das instituições do consórcio. A maioria destas aplicações (processos e produtos) centraram-se na utilização dos compostos naturais extraídos de várias matrizes vegetais em produtos alimentares, com o objetivo de melhorar as suas características nutricionais e de segurança alimentar. Aplicações noutras setores foram também desenvolvidas, como é o caso do tingimento de têxteis e no controlo de pragas na agricultura.



Tabela 6. Indicadores de resultado do projeto SoSValor.

Tipologia	Descrição
Aplicações inovadoras testadas com sucesso	<ol style="list-style-type: none">1. Tecnologia de extração de sumo de bagaço de medronho. Oficinas Tecnológicas de Hortofrutícolas, ESAC, Coimbra.2. Bolachas com salicórnia. DanCake Portugal SA, Coimbra.3. Aplicação de extratos antimicrobianos de <i>Thymus mastichina</i> em queijos curados. Oficinas Tecnológicas de Lacticínios, ESAC, Coimbra.4. Aplicação de revestimentos com <i>Origanum virens</i> em alheiras e painhos. Irmãos Monteiro SA, Ílhavo.5. Aplicação de revestimentos edíveis com plantas aromáticas e medicinais ao queijo DOP de Castelo Branco. CATAA, Castelo Branco.6. Efeito nematocida dos extratos de casca de fava. Laboratório VALOREN, ESAC, Coimbra.7. Tecnologia de extração de compostos bioativos a partir de resíduos da cortiça. ISEC, Coimbra.8. Aplicação de corantes naturais no tingimento de vários tipos de têxteis. Tintex Textiles SA e ISEC, Coimbra.

Os resultados alcançados, para além de criarem uma estrutura de aproximação entre instituições do SCT e o tecido empresarial, permitiram a colaboração dos estudantes neste processo de interação, despertando-os para problemas concretos da sociedade, para os quais também eles foram chamados a contribuir com vista ao seu estudo e resolução. Paralelamente à investigação preconizada, foram também realizadas atividades de disseminação e difusão das novas tecnologias desenvolvidas e dos conhecimentos gerados no âmbito da I&D (Tabela 7). Nuns casos, com um cariz mais científico, a publicação de artigos em revistas e de capítulos em livros da especialidade, para além da comunicação dos resultados em conferências e encontros científicos.

Noutros casos, numa vertente mais pedagógica, através da formação avançada com a produção de teses de licenciatura, de mestrado e de relatórios de trabalhos desenvolvidos no âmbito de várias unidades curriculares. Por fim, a divulgação para a sociedade em geral numa ótica mais prática, através da produção de *newsletters*, da realização e participação em *workshops* e feiras temáticas. Todas estas ações poderão ser consultadas no *website* do projeto.

Tabela 7. Disseminação e difusão de resultados no âmbito do projeto SoSValor.

Tipologia	Descrição / Referência
<i>Publicações científicas</i>	
3 Artigos científicos	Henriques et al. (2019); Borges et al. (2019); Madaleno, Castro, & Coelho Pinheiro (2017)
3 Capítulos de livro	Moreira da Silva (2018); Alves-Silva et al. (2018); Carvalho et al. (2018)
24 Comunicações orais ou em poster, em eventos científicos e técnicos nacionais e internacionais	Figueiredo et al. (2018); Osório, Moreira da Silva, & Barroca (2018); Dias & Henriques (2018); Barroca et al. (2017); Leocádio & Galhano (2017); Ozcariz et al. (2017); Santos et al. (2017); Borges et al. (2017); Coelho Pinheiro et al. (2019); Barbosa et al. (2019); Domingues et al. (2019); Coelho Pinheiro et al. (2019) Moreira da Silva et al. (2018); Rocha, Seabra, & Rodrigues (2018); Figueiredo, Henriques, & Rodrigues (2018); Galhano, Santos, & Castro (2018); Costa et al. (2018); Maia da Silva et al. (2018); Dias, Barroca, & Moreira da Silva (2018); Dias et al. (2018); Abreu et al. (2018); Pereira-Dias et al. (2018); Catarino et al. (2017); Barroca et al. (2017)
<i>Formação avançada</i>	
8 Teses de licenciatura	Mendes (2019), Pratas (2018), Serrano (2018), Barbosa (2018), Rocha (2018), Tir (2018), Santos (2017), Melo (2017)

(Continua na página seguinte)



Tabela 7. (Continuação) Disseminação e difusão de resultados no âmbito do projeto SoSValor.

7 Teses de mestrado	Abreu (2018), Clemente (2018), Simões (2018), Dias (2018), Maia da Silva (2018), Borges (2017), Figueiredo (2017)
Outras publicações	Relatórios no âmbito de unidades curriculares.
<hr/>	
<i>Ações de promoção e divulgação</i>	
<hr/>	
1 Website	sosvalor.com
6 Newsletters	1# Newsletter SoSValor – Project Kick-off. Setembro 2017 2# Newsletter SoSValor – Project Presentation. Abril 2018 3# Newsletter SoSValor – Project News. Junho 2018 4# Newsletter SoSValor – Project Promotion. Novembro 2018 5# Newsletter SoSValor – Project Workshop. Dezembro 2018 6# Newsletter SoSValor – 2nd Project Workshop. Abril 2019
2 Organização de Workshops	1# Workshop SoSValor (2018) ESAC, Coimbra. 7 Dezembro 2# 2º Workshop SoSValor (2019) ISEC, Coimbra. 15 Março
6 Participação em Workshops	Henriques (2019a); Moreira da Silva (2018 a,b,c), Henriques (2018a); Delgado (2018)
2 Participação em feiras	Henriques (2019b); Henriques (2018b)
2 Prémios	Dias, Barroca & Moreira da Silva (2018) Prémio de melhor poster. Dias et al (2018) Prémio de melhor comunicação oral.
<hr/>	

NOTA: Todas as referências apresentadas nesta tabela poderão ser consultadas na página web do projeto (sosvalor.com)

Conclusão

Este projeto reuniu as designadas quatro principais fontes de inovação na economia do conhecimento:

- Inovação científica. Contribuiu para a criação de novos ou promissores produtos naturais e/ou processos (tecnologias de extração). Forneceu uma base sistemática e eficaz de inovação e permitiu um melhor controlo da qualidade, impacto e regulamentação de novos produtos e processos.
- Colaboração entre *stakeholders*. O envolvimento da comunidade científica (investigadores, técnicos e estudantes) e das empresas com necessidades e problemas específicos impulsionou a construção de produtos inovadores para seu uso próprio e para outros. Novos atores foram introduzidos no processo de inovação, desenvolvendo-se modos colaborativos de geração de conhecimento, criando novas oportunidades.
- Estrutura modular. O funcionamento modular do projeto foi essencial para permitir espaço e flexibilidade suficientes à inovação dentro de cada atividade específica. A posterior integração dos resultados individuais alcançados permitiu resolver problemas e sistemas tecnológicos mais complexos, numa perspetiva mais abrangente.
- Informação e comunicação. O conhecimento produzido foi amplamente disseminado pela comunidade científica (em conferências nacionais e internacionais, artigos em revistas de especialidade e comunicações), bem como à comunidade em geral e restantes *stakeholders*, através da página *web* do projeto (sosvalor.com), de comunicações orais em feiras e eventos, das *newsletters* e *workshops* do projeto.

O projeto integrou efetivamente o conceito de transferência de conhecimento e tecnologia, uma vez que o potencial de valorização dos recursos vegetais da região foi significativamente reforçado e os resíduos agroindustriais, valorizados. O SoSValor fortaleceu e aumentou a competitividade empresarial da região, identificando fontes promissoras de compostos (bio)ativos, desenvolvendo metodologias apropriadas de extração, diversificando as atividades das empresas e trazendo alternativas naturais ao mercado para aplicação numa vasta gama de setores.



Agradecimentos

O projeto SoSValor - Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal é uma operação financiada pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), com o código CENTRO-01-0145-FEDER-023631.

Referências

Alexandre, A.M.R.C., Dias, A.M.A., Seabra, I.J., Portugal, A.A.T.G., de Sousa, H.C. & Braga M.E.M. (2012). Biodiesel obtained from supercritical carbon dioxide oil of *Cynara cardunculus* L. *Journal Supercritical Fluids*, 68, 52-63. doi: 10.1016/j.supflu.2012.03.012

Barata, A.M., Rocha, F.A., Lopes, V.M., Morgado, J., Maia, J., Bettencourt, E., Dias, S., Delgado, F., Costa, M., Farinha, N., Póvoa, O., Salgueiro, L. & Figueiredo, A.C. (2011). Networking on conservation and use of Medicinal, Aromatic and Culinary Plants Genetic Resources in Portugal. *Acta Horticulturae*, 925, 21-35. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.925.2

Braga, M.E.M., Seabra, I.J., Dias, A.M.A., & de Sousa, H.C. (2013). Recent trends and perspectives for the extraction of natural products. In: Rostagno, M., Prado, J. (Eds), *Natural Products Extraction: Principles and Applications* (pp. 231-284). Royal Society of Chemistry (RSC Publishing). ISBN: 978-1-84973-606-0

Carvalho, F., Rodrigues, A., Gomes, D., Ferreira, F. M., Dias, S., Pereira, C. & Henriques, M. (2018). Improvement of ripened cheese quality and safety with *Thymus mastichina* L. bioactive extracts. In A Holban & A Grumezescu (Eds), *Advances in Biotechnology for Food Industry*. (Vol. 14, Chap. 7, pp. 197-208). London: Academic Press.

Castro, L.M.M.N. & Coelho Pinheiro, M.N. (2016). A simple data processing approach for drying kinetics experiments. *Chemical Engineering Communications*, 203, 258-269. <http://dx.doi.org/10.1080/00986445.2014.993468>

Dias, E., Araújo, C., Mendes, J., Elias, R., Melo, C., & Mendes, C. (2007). Espécies florestais das ilhas - Açores. In: *Açores e Madeira: a floresta das ilhas*

(Vol. 6, pp. 199-254). Coleção Árvores e Florestas de Portugal. Público/Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento/Liga para a Protecção da Natureza.

Dias, S., & Bernardo, F. (1999). Biotic interaction of potentially yeast starter cultures and *Listeria monocytogenes* in traditional Portuguese sausage. In *Proceedings of the International Congress: Improved traditional foods for the next century*, Toldrá, F., Ramón, D., Navarro J.L. (Eds.), Valencia - Spain, 28-29 October 1999

Dias, S. P. D. (2013). Yellow Codfish Curing Process: Dynamics of Microbial Population, Sensory Descriptors and Chemical Indicators. PhD Thesis in Food Engineering. Institute of Agronomy, Lisbon University, Lisbon, Portugal. Disponível em: www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6448

EC - European Commission (2016) Circular Economy Strategy. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/circular-economy/index_en.htm (accessed in September, 2016)

Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M. & de Freitas, V. (2011). Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS. *Food Chemistry*, 125(4), 1398-1405. doi: 0.1016/j.talanta.2013.09.039

Ferreira, F.M., Dinis, L.T., Azedo, P., Galhano, C.I.C., Simões, A., Cardoso, S.M., Domingues, M.R.M., Pereira, O.R., Palmeira, C.M. & Peixoto F.P. (2012). Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts. *CyTA – Journal of Food*, 10(2), 92-102. doi:10.1080/19476337.2011.590233

Ferreira, F.M., Palmeira, C.M., Oliveira, M.M., Santos, D., Simões, A.M., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. & Francisco Peixoto, F. (2011). Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 189-196. doi:10.1016/j.tiv.2011.11.009

Ferreira, F.M., Peixoto, F., Nunes, E., Sena, C., Seiça, R. & Santos, M.S. (2010). “MitoTea”: *Geranium robertianum* L. decoctions decrease blood glucose levels and improve liver mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Biochimica Polonica*, 57(4), 399-402.

Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves. P.M.,



McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B. & Santos, C.N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214-229. doi: 10.3390/nu2020214

Galhano, C.I.C. (2005). Efeitos de plantas aráceas (*Colocasia esculenta* e *Xanthosoma sagittifolium*) sobre nemátodes das galhas radiculares (*Meloidogyne javanica* e *M. megadora*). Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Galhano, C.I.C., Ryan, M.F. & Santos, M. S. N. de A. (2005). Efeitos de plantas Araceae na eclosão de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne* spp. In: *A produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar, Actas do VII Encontro Nacional de Protecção Integrada* (Vol. I, p. 434). ISBN: 972-98593-8-8

Galhano, C.I.C., Ryan, M.F., Santos, M.S.N. de A. & Staritsky, G. (1997). Interactions between tannia, *Xanthosoma sagittifolium*, and the root knot nematodes, *Meloidogyne megadora* and *M. javanica*. *Nematropica*, 27, 7-17.

Guiné, R.P.F., Barroca, M.J., Gonçalves, F.J., Alves, M., Oliveira, S. & Mendes, M. (2015). Artificial neural network modelling of the antioxidant activity and phenolic compounds of bananas submitted to different drying treatments. *Food Chemistry*. 168, 454-459. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.094

Guiné, R.P.F., Henriques, F. & Barroca, M.J. (2012). Mass transfer coefficients for the drying of pumpkin (*Cucurbita moschata*) and dried product quality. *Food Bioprocess Technology*, 5(1), 176-183. doi: 10.1007/s11947-009-0275-y

Henriques, M.H.F., Santos, G., Rodrigues, A., Gomes, D.M.G.S., Pereira, C.J.D. & Gil M.H.M. (2013). Replacement of conventional cheese coating by natural whey protein edible coatings with antimicrobial activity. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 3, 34-47. Disponível em: <http://www.jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol%203/03.%20FPP/Full%20paper%20-%20Marta%20Henriques.pdf>

Karimi, E., Mehrabanjoubani, P., Keshavarzian, M., Oskoueian, E., Jaafar, H.Z.E. & Abdolzadeh, A. (2014). Identification and quantification of phenolic and flavonoid components in straw and seed husk of some rice varieties (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (11), 2324-2330. doi: 10.1002/jsfa.6567

Kroon, P. & Williamson, G. (2005). Perspective polyphenols: dietary components with established benefits to health? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1239-1240. doi: 10.1002/jsfa.2204

Luczkiewicz, M., Glod, D., Baczek, T. & Bucinski, A. (2004). LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctorial* L. *Chromatographia*, 60, 179-185. doi: 10.1365/s10337-004-0357-y

Lúis, A., Gil, N., Amaral, M.E. & Duarte, A.P. (2012). Antioxidant activities of extracts from *Acacia melanoxylon*, *Acacia dealbata* and *Olea europaea* and alkaloids estimation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 225-231.

Marchante, H., Marchante, E., Freitas, H. (Eds) (2005). Plantas invasoras em Portugal - fichas para identificação e controlo, Coimbra. Disponível em: http://files.gera.webnode.com.pt/200000095-ba858bb7f9/Plantas_invasoras_em_Portugal_-_fichas_para_identificacao_e_controlo.pdf

Moreira da Silva, A. (2011). Food products that help to promote human health. In: Guiné, R.P.F. (Ed) *Food, Diet and Health. Past, Present and Future Tendencies* (Chap. 4, pp. 137-193). Nova Science Publishers Inc., USA. ISBN: 978-1-60876-012-1

Nakajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Journal Biomedicine Biotechnology*, 5, 241-247. <http://dx.doi.org/10.1155/S1110724304404045>

Pereira-Dias, S., Potes, M.E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2002). Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 55-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014522>

Peres, A.M., Freitas, P., Dias, L.G., Sousa, M.E.B.C., Castro, L.M. & Veloso, A.C.A (2013). Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process. *Talanta*, 117, 438-444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.039>

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S. & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria*



- monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891-1896.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S. & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21:240-246. doi:10.1016/j.foodcont.2009.05.017
- Pintado, C.M.B.S., Grant, K.A., Halford-Maw, R., Hampton, M.D., Ferreira, M.A.S.S. & McLauchlin, J. (2009). Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5): 569-575. doi: 10.1089=fpd.2008.0246
- Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldini, M.T., Piacente, S., Bevilacqua, J. & Russo, A. (2009). *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxideinduced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 180(2), 211-219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.010>
- Rodrigues, I.M., Carvalho, M.G.V.S. & Rocha, J.M.F. (2014). Increasing the protein content of rapeseed meal by enzymatic hydrolysis of carbohydrates. *BioResources*, 9(2), 2010-2025.
- Rodrigues, I.M., Carvalho, M.G.V.S., Rocha, J.M.F. (2017). Increase of protein extraction yield from rapeseed meal through a pretreatment with phytase. *Journal Science Food Agriculture*, 97(8), 2641-2646. doi: 10.1002/jsfa.8087
- Rodrigues, I.M., Coelho, J. F. J. & Carvalho, M. G. V. S. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal Food Engineering*, 109(3), 337-346. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.027
- Rodrigues, M.J., Gangadhar, K.N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S.G., Nyberg, N.T., Barreira, L. & Custódio, L. (2014). Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Marine Drugs*, 12(4), 2228-2244. doi: 10.3390/md12042228
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A. & Sánchez-Vioque, R. (2012). Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*, 11, 447-466.
- Santos, S.A.O., Villaverde, J.J., Sousa, A.F., Coelho, J.F.J., Neto, C.P. &

Silvestre, A.J.D. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. *Industrial Crops Production*, 47, 262-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.015>

Seabra, I.J., Braga, M.E.M., Batista, M.T.P. & de Sousa, H.C. (2010). Effect of solvent (CO₂/EtOH/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *Journal Supercritical Fluids*, 54, 145-152. doi: 10.1016/j.supflu.2010.05.001

Seabra, I.J., Dias, A.M.A., Braga, M.E.M., de Sousa, H.C. (2012) High pressure solvent extraction of maritime pine bark: Study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition. *Journal Supercritical Fluids*, 62, 135-148. doi: 10.1016/j.supflu.2011.10.016

Sousa, I., Pereira, M., Pintado, C., Ferreira, M.A.S.S., Cordeiro, C., Fernandes, A.I., & Alves, V. (2011). Food packaging by bioactive biopolymer films: the rheology of the solutions and the mechanical behaviour of films based on WPI, fish gelatine and chitosan. In: M.T. Cidade; I. Sousa & J.M. Franco (Eds) *Rheology Trends: from nano to macro systems. Proceedings of the IBEREO 2011* (pp. 171-174), ISAPress & SPR Lisboa. ISBN: 978-972-8669-50-8

UN - United Nations (2016). Sustainable Development Goals. Disponível em: <http://www.un.org/sustainabledevelopment/development-agenda/> (accessed in September, 2016).





4. Propriedades antioxidante e anticancerígena da planta halófito *Salicornia ramosissima* J. Woods

Joana Romano Dias, Aida Moreira da Silva, Maria João Barroca

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTICANCERÍGENA DA PLANTA HALÓFITA *SALICORNIA RAMOSISSIMA* J. WOODS

Joana Romano Dias, Aida Moreira da Silva, Maria João Barroca

A *Salicornia ramosissima* J. Woods é uma planta halófito, suculenta, da família das *Chenopodiaceae*, que cresce naturalmente ao longo das salinas costeiras do oceano. Os extratos de *Salicornia ramosissima* liofilizada foram analisados relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, à atividade antioxidante, e à atividade anticancerígena na linha celular do adenocarcinoma colorretal humano HT-29. Os níveis de capacidade antioxidante e de compostos fenólicos e o potencial anticancerígeno do extrato desta halófito endémica, definem a planta como uma fonte promissora de antioxidantes naturais e de nutracêuticos.

Até 2020, Portugal deverá consolidar a exploração sustentável dos recursos endógenos, nomeadamente os recursos marítimos, e amplificar a sua utilização através da valorização destes recursos. Portugal apresenta condições edafoclimáticas apropriadas para a especialização em produtos de qualidade, que têm por base a designada dieta mediterrânica - património cultural imaterial da humanidade da UNESCO (ENEI, 2014).

Neste contexto, a valorização e a exploração sustentável dos ecossistemas marítimos, nomeadamente das marinhas de sal, permite por um lado valorizar este património natural e cultural de Portugal e por outro promover a utilização de plantas halófitas na dieta humana e na produção de novos alimentos com a incorporação destes recursos naturais. A exploração e valorização, de plantas tolerantes a elevadas condições de salinidade da água, representam um desafio global, uma vez que os recursos de água doce do planeta têm diminuído e a salinidade do solo, e das águas subterrâneas, têm aumentado ao longo dos



anos (FAO, 2011).

As plantas do género *Salicornia* crescem espontaneamente em zonas intertidais, como sapais, marinhas de sal e zonas costeiras, sujeitas à entrada periódica de água salgada. A aparência destas plantas é, de forma geral, pequena, normalmente com menos de 30 cm de altura. O caule principal e os seus ramos opostos são compostos por nós intermédios curtos, cilíndricos e com uma cobertura fotossintética suculenta, conferindo assim uma aparência articulada. A halófita *Salicornia ramosissima* J. Woods é uma das espécies pertencente ao género *Salicornia* L. com um ciclo anual. Como muitas das espécies dentro deste género, a *S. ramosissima* é verde, mas a sua folhagem torna-se vermelha no outono (Isca, Seca, Pinto, & Silva, 2014). É também conhecida por sal-verde ou espargo-do-mar devido ao seu sabor salgado e ao seu aspeto semelhante aos espargos verdes.

A *S. ramosissima* encontra-se, preferencialmente, em locais não ocupados por outras halófitas e o seu crescimento é influenciado pela salinidade do meio. A planta apresenta um crescimento ótimo para valores de salinidade inferiores a 200 mmol/L (Silva, Caldeira, & Freitas, 2006). Normalmente, encontra-se no limite superior da maré, diferenciando-se assim das outras espécies halófitas. Esta ocorrência faz com que permaneça longos períodos do seu desenvolvimento fora de água, sofrendo uma elevada exposição aos raios UV. Assim, esta planta halófita exibe uma resposta foto-protetora aos raios UV, relacionada com o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (Hupel, Lecointre, Meudec, Poupert, & Gall, 2011).

O cultivo desta planta acarreta várias vantagens. Em primeiro lugar, não requer água doce, pois cresce em águas do mar salgadas (Lopes, Cavaleiro, & Ramos, 2017). Uma outra vantagem é a capacidade em se adaptar a solos afetados pelo sal, permitindo assim que terras inadequadas para a agricultura convencional sejam transformadas em áreas produtivas (Muscolo, Panuccio, & Piernik, 2014). Deste modo, o seu cultivo permite economizar água doce e transformar terras áridas em terras cultiváveis. Por outro lado, o seu cultivo em zonas marinhas e a rega com água do mar torna esta planta resistente a doenças agrícolas típicas (Lopes, Cavaleiro, & Ramos, 2017).

Devido essencialmente ao seu elevado valor nutricional em minerais, incluindo sódio, cálcio, magnésio, ferro e potássio, fibra dietética e compos-

tos bioativos, como os fitoquímicos, que conferem propriedades biológicas importantes à salicórnia (Essaidi et al., 2013). Esta planta halófito tem grande potencial como alimento funcional e o seu consumo está associado a diversos benefícios para a saúde humana. Extratos de *Salicornia herbacea* exibiram atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, que suportam a sua utilização em diversos usos tradicionais (Rhee & Park, 2009). Outros efeitos benéficos prendem-se com a capacidade anti-proliferativa em células cancerígenas A549 (Zhao, Wang, Wang, Liu, & Xin, 2014) e HT-29 (Kang et al., 2011).

A *S. ramosissima* encontra-se menos estudada, mas Ferreira et al. (2018) identificaram um efeito protetor, desta espécie, contra a toxicidade aguda testicular em ratinhos. Por outro lado, Barreira et al. (2017) verificaram que esta espécie apresenta atividade antioxidante e, Isca, Seca, Pinto, Silva, & Silva (2014) identificaram vários fitoquímicos, nomeadamente esteróis, ácidos dicarboxílicos e álcoois. Estes compostos contribuem para a valorização da *S. ramosissima* como um ingrediente funcional, na medida em que apresentam efeitos benéficos associados à redução do colesterol (Rudkowska, AbuMweis, Jones, & Nicolle, 2008).

A realização do trabalho experimental que a seguir se descreve teve dois objectivos distintos e fundamentais. O primeiro objectivo consistiu em treinar uma estudante, do mestrado em engenharia alimentar, em diferentes técnicas laboratoriais, usando como matriz a planta halófito salicórnia. Através desse treino atingiu-se o segundo objectivo, ou seja, a obtenção de informações sobre o potencial da planta, com a determinação do teor em compostos fenólicos, da capacidade antioxidante e da capacidade citotóxica dos extratos desta espécie endémica existente na Península Ibérica, a *Salicornia ramosissima*.

Materiais e Métodos

Colheita e preparação da planta

A planta *S. ramosissima* foi colhida dos Armazéns de Lavos, Figueira da Foz (40° 6'42.5627"N, 8° 49'59.7034"W), em julho de 2017. Após a colheita, a salicórnia foi armazenada ultracongelada a $-75 \pm 0,5$ °C e posteriormente liofilizada a -98 °C (temperatura do condensador) e pressão 9,2 Pa (Coolsafe, Scanvac). Após este processo foi triturada e reduzida a pó, tendo sido armaze-



nada numa embalagem de plástico, selada e ao abrigo da luz e da humidade, à temperatura ambiente.

Produção de extratos

Os extratos foram preparados a partir da salicórnica em pó e de solvente numa proporção de 1:10 (m/m). Prepararam-se quatro extratos diferentes com os seguintes solventes: metanol (SM) (Sigma-Aldrich, 99.5%), etanol (SE) (Chem-Lab, 96%), água ultrapura (SA) e uma solução de etanol e água (SEA, 50% v/v). Os extratos foram agitados durante 3 horas, à temperatura ambiente e, após este tempo, foram centrifugados (MPW-350R) a 3913 g durante 10 minutos, e filtrados com um filtro 0,2 µm. Os frascos com os extratos foram revestidos com folha de alumínio e armazenados em refrigeração a 4 °C. Para a realização dos ensaios de caracterização dos extratos foram efetuadas diversas diluições, a partir do extrato inicial de cada solvente.

Determinação do teor em compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos presente nos diferentes extratos de *S. ramosissima* foi determinado pelo método de Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações (Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano, & Lattanzio, 2009). Os compostos fenólicos são conhecidos como bons sequestradores de radicais livres e, por isso, desempenham um papel importante na saúde humana, uma vez que são capazes de minimizar os efeitos nocivos do stresse oxidativo (Barreira et al., 2017). Esta determinação foi feita através da utilização do reagente Folin-Ciocalteu, usando o ácido gálico como composto fenólico padrão.

De cada uma das concentrações de extrato (1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL) retiraram-se 100 µL para um tubo de ensaio. De seguida, adicionou-se, a cada tubo de ensaio 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* (PanReac) e usou-se o *vortex* para facilitar a mistura. Os tubos foram colocados em banho termostático (Clifton NE 1B-14) a 40 °C, durante 4 minutos. Após este tempo foram adicionados a cada tubo, mantido no banho, 800 µL de uma solução de carbonato de sódio, a 5% (m/v) (Sigma-Aldrich). A reação decorreu no escuro, durante 20 minutos. Após este tempo, os tubos foram rapidamente arrefecidos em água fria e medida a absorvência a 750 nm ($\lambda = 750$ nm), num leitor de microplacas (BioTek µQuant MQX200).

O teor em compostos fenólicos nos extratos foi determinado através da curva de calibração do composto fenólico padrão e expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EGA) por grama de extrato seco (mg EAG/g extrato seco).

Determinação da atividade antioxidante pelo método colorimétrico DPPH

O método de captura de radicais livres do DPPH[•] foi o utilizado para a determinação da atividade antioxidante dos extratos de *S. ramosissima*. O DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre amplamente utilizado para testar a capacidade antioxidante dos mais variados compostos (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995), devido à sua simples e rápida realização (Pisoschi & Negulescu, 2012). A capacidade de captação de radicais livres foi determinada medindo a diminuição da absorvência do DPPH[•] a 515 nm ($\lambda = 515 \text{ nm}$).

Foi preparada uma solução com 250 μM de DPPH[•] (Sigma-Aldrich, 95%) em metanol. Posteriormente, foi agitada com um agitador magnético, durante 15 minutos, mantendo-se protegida da luz, com folha de alumínio. Para cada um dos extratos SM, SE e SEA foram utilizadas as concentrações de 500, 250, 100 e 25 $\mu\text{g/mL}$. No caso do extrato SA foram utilizadas as concentrações 5000, 2500 e 500 $\mu\text{g/mL}$.

Para a realização desta análise, foram preparados os controlos negativos (tubos de ensaio com 100 μL do solvente usado para a preparação dos extratos), as amostras (tubos de ensaio com 100 μL de cada extrato). De seguida, adicionaram-se 100 μL da solução de DPPH[•] a cada tubo, agitou-se em *vortex* e a mistura foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Para cada extrato foi, ainda, preparado um branco com 100 μL do extrato e 100 μL de metanol. A absorvência foi medida após 30 minutos de reação num leitor de microplacas.

A atividade antioxidante (% AA) de cada concentração de extrato foi calculada usando a equação 1:

$$\% \text{ AA} = \frac{A_{CN} - (A_{\text{extrato}} - A_{\text{branco}})}{A_{CN}} \times 100 \quad (1)$$



em que A_{CN} é a absorvência do controlo negativo, A_{branco} é a absorvência do branco e $A_{extrato}$ é a absorvência da solução de extrato. A atividade antioxidante de cada extrato foi descrita através do IC_{50} , ou seja, da concentração do extrato capaz de inibir 50% da atividade do DPPH \cdot .

Determinação do efeito citotóxico na linha celular HT-29

O efeito citotóxico da salicórnia, foi determinado utilizando o extrato aquoso de *S. ramosissima* e a linha celular do adenocarcinoma colorretal humano HT-29. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e para a avaliação da proliferação celular utilizou-se o método colorimétrico da sulforrodamina B (SRB).

Dado que a salicórnia é uma planta salgada, a análise da atividade citotóxica do extrato foi acompanhada de um controlo com o mesmo teor de sal (NaCl) presente no extrato, de modo a esclarecer até que ponto o efeito observado era da própria planta ou do NaCl. Para verificar a possível relação entre o efeito sobre as células cancerígenas e a dose aplicada de extrato, foram testadas diferentes concentrações.

O extrato SA (de concentração inicial 66,7 mg/mL) foi diluído em PBS (Sigma-Aldrich) para 50,0 mg/mL. Foi ainda, preparada uma solução de controlo de NaCl com uma concentração de 38,0 mg/mL, que é a correspondente em NaCl para a solução de extracto de 50,0 mg/mL. Ambas as soluções foram filtradas em condições estéreis, com um filtro de seringa de 0,20 μ m.

As concentrações testadas do extrato foram: 5,00; 2,50; 1,25; 0,63 e 0,31 mg/mL e de NaCl foram: 3,80; 1,90; 0,95; 0,48 e 0,24 mg/mL. As concentrações do extrato SA usadas, foram escolhidas com base em concentrações já testadas nesta linha celular (Kim & Lee, 2009). Foram ainda testadas, numa fase inicial, concentrações mais baixas, tanto de extrato como de NaCl (10% das concentrações anteriores) mas apenas utilizando o método de MTT, dado ser um método de quantificação mais rápido que o SRB permitindo um *screening* inicial de concentrações.

As culturas celulares foram mantidas numa incubadora (Sanyo) a 37 °C, em atmosfera com HR entre 72-90% e 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado foi o *McCoy's 5A* (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS, Gibco) e 2,20 g/L de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), a pH 7,4.

Em ambos os ensaios de avaliação de citotoxicidade, a linha celular HT-29 foi plaqueada com uma densidade de 3,0 x 10⁴ cél/cm², em placas de 24 poços com 1,9 cm². Após 24 h, foi adicionado a cada poço 10 % (v/v) de composto a testar e as culturas foram levadas para a incubadora. Após 24, 48 e 72 horas de exposição, a viabilidade e a densidade celular foram determinadas pelo teste do MTT e pelo método colorimétrico da SRB, respetivamente (Figura 1).

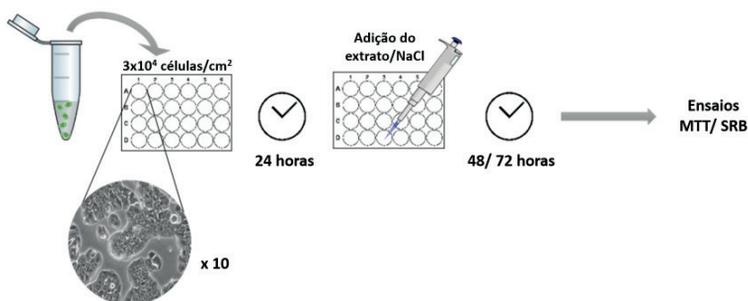


Figura 1. Esquema do ensaio de MTT e SRB.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos comparados com culturas controlo (*i.e.*, não expostas ao extrato, nem ao NaCl), sujeitas às mesmas condições e tratamentos.

Ensaio do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio colorimétrico do MTT baseia-se na redução do sal tetrazólico, MTT, em cristais de *formazan*, por ação das mitocôndrias das células viáveis. Quando as células já não estão viáveis perdem a capacidade de converter o MTT em *formazan*, sendo assim possível medir o efeito citotóxico, *in vitro*, do extrato de salicórnia em células cancerígenas.

Quando os cristais de *formazan* são dissolvidos em DMSO (Sigma-Aldrich), obtém-se uma solução de cor púrpura que absorve significativamente no comprimento de onda de 570 nm. Isto permite a quantificação dos cristais formados, uma vez que a este comprimento de onda, o MTT que não foi metabolizado (solução de cor amarela) não apresenta absorvência significativa.

A análise consistiu na remoção do meio das respetivas culturas e na adição, a cada um dos poços, de uma solução de MTT 0,50 mg/mL em PBS. De seguida, as placas foram envolvidas em papel de alumínio e incubadas a 37 °C, durante 3 horas. Decorrido este tempo, aspirou-se a solução de MTT e adicionou-se DMSO a cada poço, para dissolver os cristais de *formazan* formados.

Os valores de absorvência ($\lambda = 570 \text{ nm}$), foram medidos num espectrofotómetro com leitor de placas multi-poços e a viabilidade celular foi determinada de acordo com a equação 2:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (2)$$

onde, A_{amostra} é a absorvência da amostra, à qual foi subtraída a absorvência do branco (DMSO); A_{controlo} é a absorvência dos controlos à qual foi subtraída a absorvência do branco.

Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)

O ensaio colorimétrico de proteínas com sulforrodamina B (SRB), baseia-se na medição do conteúdo em proteínas celulares (Voigt, n.d.). A molécula SRB é um corante de aminoxantina, com uma cor rosa brilhante, com dois grupos sulfónicos capazes de se ligarem a resíduos básicos de aminoácidos, sob condições levemente ácidas. A molécula SRB liga-se aos componentes proteicos das células que sejam fixadas em placas de cultura, com 1% de ácido acético (Pronalab) em metanol. Como a ligação da molécula SRB aos aminoácidos é estequiométrica, a quantidade de corante extraída das células coradas é diretamente proporcional à massa celular (Vichai & Kirtikara, 2006; Voigt, n.d.).

Na determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico SRB, fixaram-se as células com 1% de ácido acético em metanol, após lavagem com PBS e água ultrapura, condicionadas durante a noite, a -4°C . Posteriormente, a solução de 1% ácido acético em metanol foi removida e as placas foram deixadas a secar, à temperatura ambiente. Adicionou-se 500 μL de SRB 0,5% (m/v), incubou-se a 37°C por uma hora. As placas foram cuidadosamente lavadas com 1% ácido acético até a coloração desaparecer (de modo a remover a molécula SRB, não ligada a proteínas) e foram deixadas a secar, à temperatura ambiente. Por fim, dissolveu-se a molécula SRB, ligada às proteínas básicas, em 500 μL de tampão 10 mM Tris (Pational Diagnostic, pH 10) e procedeu-se à leitura da placa num espectrofotómetro a uma absorvência de 540 nm (Papazisis, Geromichalos, Dimitriadis, & Kortsaris, 1997).

O crescimento celular, traduzido pela percentagem (%) de retenção de SRB foi calculado pela equação 3:

$$\% \text{ de crescimento celular} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{dia 0}}}{A_{\text{controlo negativo}} - A_{\text{dia 0}}} \times 100 \quad (3)$$

em que, A_{amostra} é a absorvência da amostra, à qual foi subtraída a absorvência do branco (Tris 10 mM); $A_{\text{dia 0}}$ é a absorvência do controlo ($t = 0$ horas, corresponde à densidade celular na ausência dos compostos) à qual foi subtraída a absorvência do branco e $A_{\text{controlo negativo}}$ é a absorvência dos controlos à qual foi subtraída a absorvência do branco.

A percentagem de inibição do crescimento celular foi calculada pela equação 4:

$$\% \text{ de inibição do crescimento celular} = 100 - \% \text{ de crescimento celular} \quad (4)$$



Análise estatística

O teor de compostos fenólicos totais foi efetuado em duplicado, e a capacidade antioxidante, em triplicado.

Os resultados das análises ao efeito citotóxico foram analisados, com base em três ensaios independentes, no programa *GraphPad Prism 6.01* para o *Windows (GraphPad Software)*. Os resultados são apresentados como médias e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando *One-Way (ANOVA)*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Tukey's*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $^*p < 0,05$ ou $^{\#}p < 0,0001$.

Resultados e discussão

Teor em compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos presentes nas plantas constituem um dos principais grupos de compostos que atuam como antioxidantes primários e sequestradores de radicais livres.

O teor em compostos fenólicos nos extratos, expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g extrato seco) apresenta-se na Figura 2.

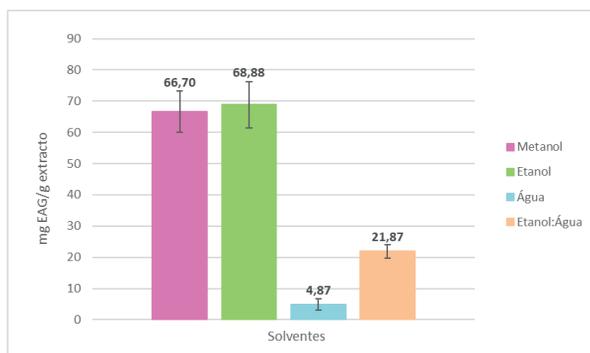


Figura 2. Teor em compostos fenólicos nos diversos extratos de *S. ramosissima*.

Independentemente do tipo de solvente utilizado, verificou-se que a *S. ramosissima* possui compostos fenólicos. O extrato em etanol (SE) foi o que apre-

sentou o valor mais elevado (68,88 mg EAG/g extrato seco), seguindo-se do extrato em metanol (66,70 mg EAG/g extrato seco), com uma diferença pouco significativa. Os extratos em água (4,87 mg EAG/g extrato seco) e em etanol:água (21,87 mg EAG/g extrato seco) apresentaram os valores mais baixos. Estes resultados podem dever-se às diferentes solubilidades dos compostos presentes na salicórnia, nos vários solventes utilizados. Para esta planta verificou-se que o tipo de solvente utilizado tem efeito sobre a extração dos compostos fenólicos, e que o etanol e o metanol são os mais eficientes na extração.

Os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais foram superiores aos referidos por Barreira et al. (2017), para o extrato etanólico de *S. ramosissima* (33 mg EAG/g extrato seco). Estas diferenças podem estar relacionadas com a diferente localização geográfica e com o ano de colheita da salicórnia, bem como, com as condições de extração utilizadas, em cada ensaio.

Atividade antioxidante

A Figura 3 apresenta os valores do IC_{50} para os extratos dos diferentes solventes.

Os resultados sugerem que a *S. ramosissima* apresenta capacidade em sequestrar radicais livres de DPPH, *i.e.*, exibem características antioxidantes, particularmente os extratos etanólicos (SE) e metanólicos (SM) já que têm valores de IC_{50} mais baixos. Os compostos fenólicos têm sido descritos como poderosos antioxidantes, e por conseguinte a capacidade em sequestrar radicais livres poderá estar ligada ao alto teor de compostos fenólicos encontrados na *S. ramosissima* (Barreira et al., 2017).

Relativamente ao extrato aquoso, foi necessário testar concentrações mais elevadas, obtendo-se o valor de IC_{50} de 4247,1 $\mu\text{g/mL}$. Este elevado valor de IC_{50} , que corresponde a uma baixa capacidade antioxidante, está de acordo com o baixo teor de compostos fenólicos presente neste extrato.

Segundo Barreira et al. (2017), o extrato etanólico da *S. ramosissima* elimina moderadamente o radical DPPH \cdot , apresentando um valor de IC_{50} de 5690 $\mu\text{g/mL}$, expresso em função do padrão antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT).



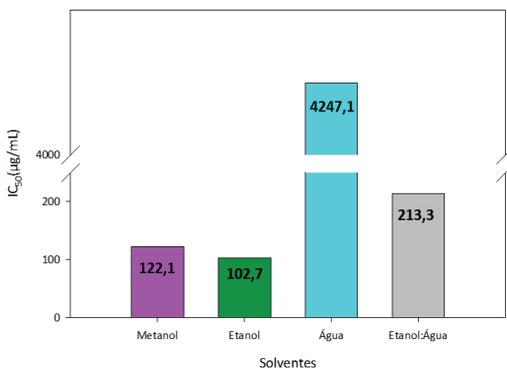


Figura 3. Concentração do extrato SM, SE e SEA para o IC₅₀ (µg/mL).

Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos aquosos de *S. ramosissima* foi avaliada em células do cancro do cólon humano (HT-29), em termos da viabilidade celular e proliferação celular, conduzidas através dos ensaios de MTT (Figura 4) e SRB (Figura 5), respetivamente.

Na Figura 4 observa-se que o efeito citotóxico do extrato aquoso de salicórnica e da solução de NaCl, depende da dose administrada e do tempo de incubação (24, 48 e 72 horas).

No extrato de salicórnica apenas se verificou um efeito citotóxico para a concentração mais elevada (5,00 mg/mL). No entanto, pode verificar-se que 24 horas após administração, há uma diminuição na viabilidade celular, entre 30 e 40 %, para todas as concentrações administradas. Porém, as células mostram sinais de recuperação, após 48 horas de incubação e após 72 horas, verifica-se uma recuperação total da viabilidade celular para todas as concentrações, excetuando para a concentração mais elevada.

No caso da solução de NaCl, os resultados são semelhantes. Às 24 horas, para todas as concentrações testadas, verifica-se uma redução significativa da viabilidade celular (entre os 20-40 %). Após 48 horas, nota-se uma recuperação ligeira, e às 72 horas há uma recuperação significativa da viabilidade celular, para as concentrações mais elevadas de NaCl, com exceção da mais elevada, de 3,80 mg/mL.

Comparando os resultados obtidos pela administração de extrato de salicórnia e pela administração da solução de NaCl às células da linha celular HT-29, pode-se considerar que ao fim de 72 horas, e para as concentrações mais elevadas, começa a ser o efeito do extrato que prevalece na morte celular.

O efeito do extrato aquoso de salicórnia e da solução de NaCl na densidade celular apresenta-se na Figura 5.

Face ao controlo, a densidade celular do ensaio com o extrato de salicórnia, após as 24 horas, apresentou uma ligeira diminuição, para as concentrações 0,31, 2,50 e 5,00 mg/mL. Após 48 horas de incubação, apenas a concentração

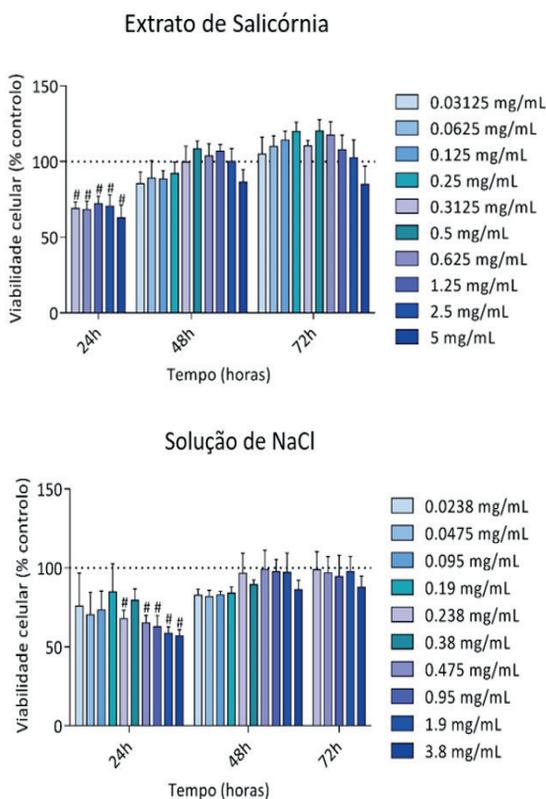


Figura 4. Efeito citotóxico do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29, às 24, 48 e 72 horas, determinado pelo método do MTT. Os resultados são apresentados em percentagem em relação a culturas controlo (células tratadas com DMSO), consideradas 100% (linha tracejada horizontal). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,0001$.

mais elevada (5,00 mg/mL), apresentou algum efeito anti-proliferativo. Às 72 horas só no caso das duas concentrações mais elevadas (2,50 e 5,00 mg/mL), foi observada uma diminuição da densidade celular. Estas observações corroboram os resultados obtidos pelo método MTT, para estas concentrações.

No caso da solução de NaCl, verificou-se um aumento na densidade celular para todos os períodos de incubação. No entanto, comparando estes resultados com os do MTT (Figura 4), para as 24 horas, as células já não estão viáveis apesar da sua membrana se encontrar intacta, o que significa que o NaCl tem efeito na redução da viabilidade celular de células cancerígenas

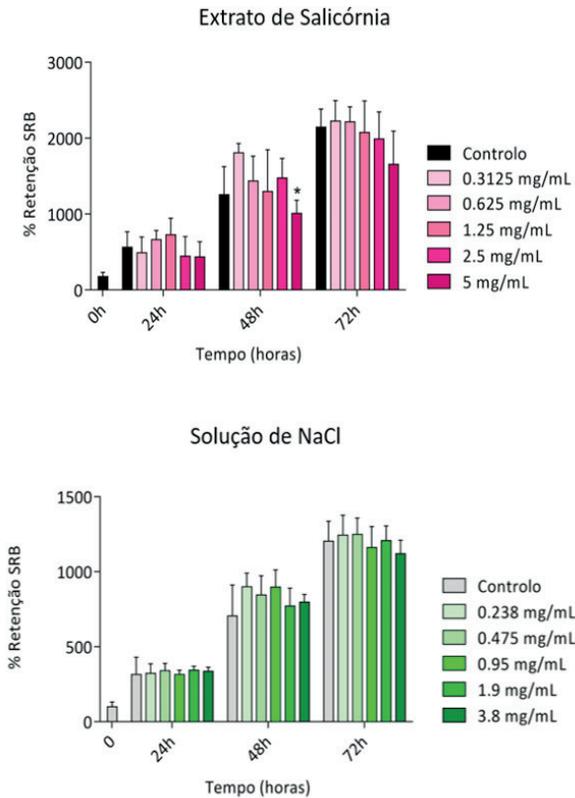


Figura 5. Efeito anti-proliferativo do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29. Os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico SRB, após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados foram expressos em percentagem de retenção da SRB em relação às culturas de células de controlo e apresentados sobre a forma de retenção da SRB em função das concentrações de extrato/NaCl, nos vários tempos de incubação. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com * $p < 0,05$.

HT-29. Após as 48 horas, apesar de também não se verificar uma diminuição da densidade celular, pelo método do MTT observa-se uma diminuição da viabilidade celular o que significa que as células já não estão funcionais apesar de apresentarem a membrana intacta. Após 72 horas de incubação, verifica-se um ligeiro efeito anti-proliferativo, para a concentração mais elevada de NaCl (3,80 mg/mL), embora este não seja significativo, o que corrobora os resultados obtidos pelo método do MTT.

Observando os resultados obtidos, pelos dois métodos e para os dois compostos administrados, pode verificar-se que ambos apresentam um efeito citotóxico mais acentuado para a concentração mais elevada. Contudo, comparando o efeito do extrato com o efeito do NaCl verifica-se que, após as 72 horas de administração, mesmo para a concentração mais elevada, deixa de ser relevante o efeito citotóxico do NaCl. Deste modo, pode-se afirmar que, para este período de incubação, o efeito na citotoxicidade das células HT-29, deve-se sobretudo ao extrato de *S. ramosissima*.

Pode ainda concluir-se que a combinação do efeito dos compostos fitoquímicos e do sal presente no extrato promovem um efeito citotóxico sobre as células cancerígenas HT-29, para as concentrações mais elevadas.

Kang et al. (2011) e Kim & Lee (2009) testaram o efeito citotóxico dos extratos de *S. herbacea*, na mesma linha celular (HT-29), e constataram que a salicórnia inibiu a proliferação e até estimulou a apoptose das células cancerígenas.

Os resultados obtidos demonstram que os extratos da *S. ramosissima* podem ter aplicações terapêuticas, com efeitos benéficos para a saúde humana.

Conclusão

Os extratos da planta halófita endémica - *Salicornia ramosissima*, revelaram ter capacidade antioxidante e um elevado teor de compostos fenólicos. Dos extratos analisados, constatou-se que os solventes etanol e metanol são os mais eficazes na extração de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante.

A espécie *S. ramosissima* apresentou também um efeito citotóxico na linha celular adenocarcinoma colorretal humano HT-29, havendo uma diminuição da proliferação celular e viabilidade celular, verificada pelos ensaios de SRB e MTT, respetivamente.



Os resultados obtidos são indicadores de que a *S. ramosissima* é uma potencial fonte de compostos fitoquímicos com diferentes aplicações na produção de novos nutracêuticos.

Trabalhos futuros

No futuro seria interessante realizar mais ensaios de citotoxicidade da *S. ramosissima* noutras linhas celulares de forma a comprovar os resultados obtidos neste trabalho.

Também a combinação do extrato desta planta com fármacos, normalmente usados no tratamento de cancro, poderá ser abordada para verificar o potencial da planta como tratamento complementar para esta doença.

As competências adquiridas, durante os seis meses em que a estudante realizou as atividades de investigação aplicada, conducentes a elaboração do seu relatório final do curso de mestrado, capacitam-na a candidatar-se a uma bolsa de investigação, no projeto PTDC/BAA-AGR/29305/2017, de modo a prosseguir os estudos de avaliação do potencial valor nutracêutico de outras plantas marítimas endógenas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o contributo de Ana Batista de Carvalho nos estudos de citotoxicidade dos extratos em células cancerígenas.

Ao Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), no âmbito do projeto Centro-01-0145-FEDER-023631 SoSValor: Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal e do projeto Centro-01-0145-FEDER-000007 ReNATURE - Valorização dos Recursos Naturais. Endógenos da Região Centro e do projeto POCL-01-0145-FEDER-029305 IDEAS4life - Novos IngreDiEntes Alimentares de Plantas Marítimas.

Referências

Barreira, L., Resek, E., Rodrigues, M. J., Rocha, M. I., Pereira, H., Bandarra, N., da Silva, M. M, Varela, J. & Custódio, L. (2017). Halophytes: gourmet food with nutritional health benefits? *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.003>

Brand-Williams, Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>

ENEI. (2014). Estratégia Nacional de Investigação e Inovação para uma Especialização Inteligente 2014-2020. Disponível em www.portugal2020.pt/Portal2020/Media/Default/Docs/EstrategiasEInteligente/ENEI_Versão%20final.pdf

Essaidi, I., Brahmi, Z., Snoussi, A., Ben Haj Koubaier, H., Casabianca, H., Abe, N., El Omri, A. Chaabouni, M., M. & Bouzouita, N. (2013). Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract. *Food Control*, 32(1), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.006>

FAO. (2011). Climate change, water and food security (FAO Water Reports 36). Disponível em <http://www.fao.org/3/i2096e/i2096e.pdf>

Ferreira, D., Isca, V. M. S., Leal, P., Seca, A. M. L., Silva, H., de Lourdes Pereira, M., Silva, A. M. S. & Pinto, D. C. G. A. (2018). *Salicornia ramosissima*: secondary metabolites and protective effect against acute testicular toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(1), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.012>

Hupel, M., Lecointre, C., Meudec, A., Poupart, N., & Gall, E. A. (2011). Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 401(1–2), 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.12.003>



doi.org/10.1016/j.jembe.2011.03.004

Isca, V. M. S., Seca, A. M. L., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2014). An overview of *Salicornia* genus: the phytochemical and pharmacological profile. *Natural Products: Research Reviews Vol. 2, 2*, 145–176.

Isca, V. M. S., Seca, A. M. L., Pinto, D. C. G. A., Silva, H., & Silva, A. M. S. (2014). Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*, *165*, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.117>

Kang, S., Kim, D., Lee, B. H., Kim, M. R., Hong, J., & Chiang, M. (2011). Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seed extracts on human intestinal cells. *Food Science and Biotechnology*, *20*(1), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0016-7>

Kim, S., & Lee, D. (2009). Anti-proliferative effect of polysaccharides from *Salicornia herbacea* on induction of G2 / M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(July), 1482–1489. <https://doi.org/10.4014/jmb.0902.0063>

Lopes, M., Cavaleiro, C., & Ramos, F. (2017). Sodium reduction in bread: a role for glasswort (*Salicornia ramosissima* J. Woods). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 1056–1071. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12277>

Muscolo, A., Panuccio, M. R., & Piernik, A. (2014). Ecology, distribution and ecophysiology of *Salicornia Europaea* L., *47*(May 2016). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7411-7>

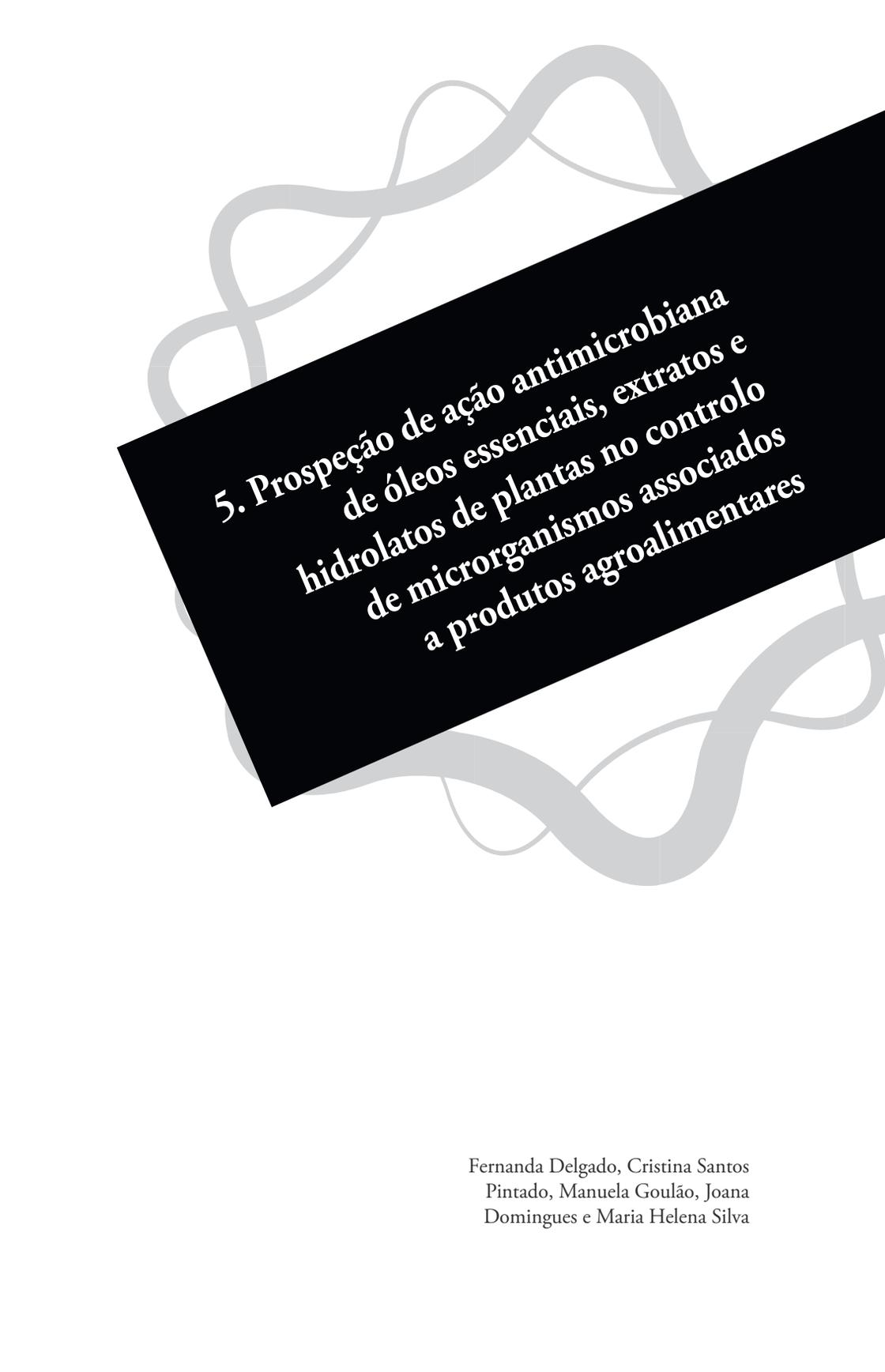
Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., & Kortsaris, A. H. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, *208*(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00137-3)

Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *01*(01), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Rhee, M., & Park, H. (2009). *Salicornia herbacea*: botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *Journal of Medicinal Plants*, *3*(8), 548–555.

- Rudkowska, I., AbuMweis, S. S., Jones, P. J. H., & Nicolle, C. (2008). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(5), 588–595. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719742>
- Silva, H., Caldeira, G., & Freitas, H. (2006). *Salicornia ramosissima* population dynamics and tolerance of salinity. <https://doi.org/10.1007/s11284-006-0008-x>
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Voigt, W. (n.d.). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Chemosensitivity*, 110, 039–048. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:039>
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, H., Liu, T., & Xin, Z. (2014). Two new noroleanane-type triterpene saponins from the methanol extract of *Salicornia herbacea*. *Food Chemistry*, 151, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.030>





**5. Prospeção de ação antimicrobiana
de óleos essenciais, extratos e
hidrolatos de plantas no controlo
de microrganismos associados
a produtos agroalimentares**

Fernanda Delgado, Cristina Santos
Pintado, Manuela Goulão, Joana
Domingues e Maria Helena Silva

PROSPEÇÃO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATOS E HIDROLATOS DE PLANTAS NO CONTROLO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A PRODUTOS AGROALIMENTARES

Fernanda Delgado, Cristina Santos Pintado, Manuela Goulão,
Joana Domingues e Maria Helena Silva

O aumento da preferência dos consumidores por produtos naturais e minimamente processados faz com que um dos maiores desafios da indústria alimentar seja reduzir os aditivos químicos sintéticos na produção e conservação de alimentos. Nesse sentido, o uso alternativo de produtos vegetais naturais tem vindo a receber cada vez mais atenção, principalmente porque muitos desses produtos possuem propriedades funcionais adicionais.

Os óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis do metabolismo secundário das plantas ditas aromáticas, normalmente formados em células ou órgãos especializados. Quimicamente, são misturas complexas de compostos orgânicos em diferentes concentrações e com diversas funções, nomeadamente terpenos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos, entre outros. Geralmente são produzidos pelas plantas como defesa contra predadores ou como sinalizadores para serem visitadas por insetos, contribuindo dessa forma para a sua reprodução.

Os óleos essenciais são agentes antimicrobianos de ocorrência natural encontrados em muitas plantas que se mostraram eficazes em diversas aplicações, inibindo a multiplicação e reduzindo a sobrevivência de diferentes microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Muitos destes óleos essenciais são bem conhecidos pelos seus efeitos antimicrobianos e podem ser utilizados para controlar os microrganismos patogénicos transmitidos por alimentos (Bajpai & Baek, 2016). Alguns têm mostrado um potencial superior em comparação com os agentes antibacterianos químicos normalmente



usados contra bactérias patogénicas (Bajpai & Baek, 2016).

A aplicação de vários óleos essenciais na indústria alimentar tem-se mostrado eficaz na inibição do desenvolvimento de agentes patogénicos e de alteração. Um exemplo é a aplicação de revestimentos ou filmes edíveis antimicrobianos com a incorporação de extratos de plantas e/ou os seus óleos essenciais. Estes constituem uma solução atual para prolongar a vida útil dos produtos sem afetar negativamente a perceção sensorial dos alimentos onde são aplicados (Song et al., 2018). Em algumas situações, contribuem também para um aumento do valor nutricional do produto alimentar, como frutas, derivados de carne e queijos, entre outros.

As bactérias Gram-negativas são um dos grupos de microrganismos mais difíceis de inibir, devido à constituição da sua parede celular. São também um grupo que inclui agentes de deterioração de alimentos, reduzindo a sua qualidade e valor comercial. É o que sucede com os queijos que apresentam defeitos de cor na casca provocados por diferentes tipos de microrganismos, incluindo bactérias do género *Pseudomonas* (Ferreira, 2017).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída a diferentes mecanismos, avaliados com recurso a diferentes técnicas *in vitro* e microscopia eletrónica (Bakkali et al., 2008). O mecanismo de ação mais estudado é atribuído à natureza hidrofóbica dos óleos essenciais, que através da despolarização da parede e membrana celular, induzem alterações na permeabilidade e lise celular. Em alguns casos, esta atividade pode ser potenciada devido a efeitos da interação de diferentes constituintes químicos, sejam eles antagónicos, aditivos ou sinérgicos dos óleos e extratos vegetais. De acordo com diversos autores, o elevado poder antimicrobiano dos óleos essenciais tem sido revisto e compilado, verificando-se que grande parte da ação positiva provém de óleos essenciais extraídos de plantas da família *Lamiaceae*.

Neste contexto, o Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária (ESACB) do Instituto Politécnico de Castelo Branco (IPCB) tem vindo, desde 2011, a efetuar estudos sobre a ação antimicrobiana de óleos essenciais e de extratos de espécies vegetais autóctones ou com potencial biotecnológico para a região da Beira Interior (Delgado et al., 2015). Este trabalho tem vindo a ser desenvolvido em colaboração com o Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) e, mais recentemente, com o Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI).

Torna-se importante para a comunidade escolar garantir que, para além da aprendizagem de temáticas científicas e de investigação, estes conhecimentos se tornem úteis no dia-a-dia, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos de forma sustentável. A temática dos óleos essenciais permite diversas abordagens por parte do estudante, tanto a nível social, como tecnológico e científico.

Com o intuito de valorização das espécies vegetais autóctones e de prospeção de compostos bioativos em plantas aromáticas, tem sido efetuada a produção de óleos essenciais, extratos e hidrolatos e a determinação da sua composição, com o objetivo de investigar a sua atividade antimicrobiana. Estes trabalhos têm sido alvo de atividades desenvolvidas com estudantes de diferentes níveis de ensino, desde o ensino secundário, passando pelo ensino tecnológico, licenciaturas, mestrados e doutoramentos, bem como práticas de métodos no âmbito de estágios de estudantes internacionais com acordo de cooperação com o IPCB.

Contribuição dos estudantes na investigação preconizada

Os trabalhos desenvolvidos na Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB) e nos seus laboratórios têm por objetivo estudar a atividade antimicrobiana e as características químicas de diferentes óleos essenciais e extratos aquosos provenientes de plantas da região, a fim de valorizar estes recursos naturais, em particular no que toca à sua utilização na formulação de novos produtos edíveis (entre eles os revestimentos e embalagens) com propriedades antimicrobianas.

Para além dos trabalhos específicos de investigação durante a realização de estágios e teses de estudantes ao nível dos cursos técnicos superiores profissionais (CTeSP), licenciatura, mestrado e doutoramento, estas metodologias são abordadas em unidades curriculares (UCs) de diversos cursos que decorrem na ESACB. Nomeadamente no CTeSP de Análises Químicas e Biológicas, nas UCs de Análise Físico Química dos Alimentos e de Análise Microbiológica de Alimentos, na Licenciatura de Biotecnologia Alimentar, nas UC de Fisiologia Microbiana e de Microbiologia Alimentar, no Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, na UC de Microbiologia Avançada (Tabelas 1 e 2).



Tabela 1. Trabalhos desenvolvidos em teses de licenciatura, mestrado ou doutoramento. OE - óleos essenciais; E - extratos; H - hidrolatos.

OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Possível aplicação	Curso	Ref.
<i>Lavandula luisieri</i> (OE)	Rosmani- nho-menor	<i>Rhizopus</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Antifúngico para aplicar em morangos	LNHQ	Graça (2012), Graça et al. (2014), Delgado et al. (2007), Delgado (2010), Gonzalez- Coloma et al. (2011)
<i>Melaleuca armillaris</i> (OE)	Melaleuca	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	—	LBA	Pires (2013), Pires et al. (2013)
<i>Acacia dealbata</i> (OE e H)	Mimosa	<i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	—	LNHQ	Lourenço (2014)
<i>Pterospar- tum triden- tatum</i> (E)	Carqueja	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Monilinia fructigena</i> , <i>Monilinia laxa</i>	Antimicro- biano em cereja	DEA	Coelho (2015)

Continuação da Tabela 1.

OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Possível aplicação	Curso	Ref.
<i>Cistus ladanifer</i> (OE e H)	Esteva	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P. commune</i>	—	LEBA	Santos (2016), Santos et al. (2016)
<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>L. luisieri</i> , <i>M. armillaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Thymus mastichina</i> , <i>Thymus vulgaris</i> (OE e E)	Erva-prín- cipe, rosma- ninho-me- nor, orégão, alecrim, tomilho	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Achromobacter xylooxidans</i>	Inibição de agentes de defeitos de cor na casca de queijo	MIQPA	Abreu (2018), Abreu et al. (2018)
<i>C. ladanifer</i> , <i>Lavandula pedunculata</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>mastichina</i> , <i>Helichrysum stoechas</i> , <i>Arbutus unedo</i> , (OE e E)	Esteva, rosmani- nho-maior, alecrim, tomilho, perpétua- -das-areias, medro- nheiro	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>A. faecalis</i> , <i>A. xylooxidans</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Inibição de agentes de defeitos de cor na casca de queijo	LB	Pratas (2018)



Continuação da Tabela 1.

OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Possível aplicação	Curso	Ref.
<i>L. luisieri</i> (OE, E e H)	Rosmani- nho-menor	<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994, <i>L. monocytogenes</i> CP6/04, <i>B. cereus</i> ATCC 11778, <i>B.</i> <i>cereus</i> 5BC, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva Z5-5d-191, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>E. coli</i> Q2.2012.AQ, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> LIP2-69, <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525, <i>P. fluorescens</i> Z8-117, <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> , <i>Penicillium commune</i>	—	DB	Domin- gues et al. (2017)
<i>L. luisieri</i> (OE)	Rosmani- nho-menor	<i>Aspergillus</i> <i>carbonarius</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i> , <i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i> , <i>Sacothecium rubi</i>	—	DB	Domin- gues et al. (2019c)
<i>L. luisieri</i> (OE e E)	Rosmani- nho-menor	<i>A. carbonarius</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>P.</i> <i>brevicompactum</i> , <i>A.</i> <i>pullulans</i> , <i>S. rubi</i>	Antifúngico em revesti- mentos para frutos	DB	Domin- gues et al. (2019a)



OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Possível aplicação	Curso	Ref.
<i>L. pedunculata</i> e <i>C. ladanifer</i> (OE, E e H)	Rosmani- nho-maior e esteva	<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>E. coli</i> Q2.2012.AQ, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> L1P2-69, <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525, <i>P. fluorescens</i> Z8-117, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva Z5-5d-191, <i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994, <i>L. monocytogenes</i> CP6/04, <i>B. cereus</i> ATCC 11778, <i>B.</i> <i>cereus</i> 5BC	—	DB	Fração et al. (2019) Domingues et al. (2019b)

LNHQA- Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar (ESACB); LBA- Licenciatura em Biologia Aplicada (ESACB); DEA-Doutoramento em Engenharia Alimentar (UTL/ESACB); LEBA-Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar (ESACB); MIQPA- Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar (ESACB); LB-Licenciatura em Biotecnologia (ESAC/ESACB); DB-Doutoramento de Bioquímica (UBI/ESACB)



Tabela 2. Trabalhos de colaboração com escolas secundárias e programas de mobilidade internacional. OE - óleos essenciais; E - extratos; H - hidrolatos.

OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Instituição / Projeto	Ref.
<i>R. officinalis</i> , <i>Pinus</i> <i>sylvestris</i> , <i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i> (OE)	Alecrim, pinheiro, eucalipto	<i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>P.</i> <i>chrysogenum</i>	Instituto Federal de Brasília- Mobilidade internacional. (2013)	Silva et al. (2016)
<i>Chamaeme- lum fuscatum</i> , <i>Matricaria</i> <i>camomila</i> , <i>Matricaria</i> <i>recudita</i> (OE)	Margaça, camomila	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i>	Escola Secundária do Entroncamento (alunos 11º ano) / 11ª Ed. Prémio Fundação Ilídio Pinho / Projeto “Um bloom de camomilas na Secundária - uma estratégia para a valorização de um recurso silvestre, uma planta aromática e medicinal (PAM)” (2014).	Menção honrosa Prémio Fundação Ilídio Pinho, “Ciência na Escola”
<i>Juniperus</i> <i>communis</i>	Zimbros	<i>S. aureus</i> , <i>E.</i> <i>coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i>	Escola Profissional do Fundão/ 13ª Ed. Projeto Ciência na Escola, Fundação Ilídio Pinho/ Projeto “O zimbros ao serviço da saúde” (2016)	



OE, E, H	Recurso vegetal valorizado	Microrganismos testados	Instituição / Projeto	Ref.
<i>C. ladanifer</i>	Esteva	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P.</i> <i>chrysogenum</i>	Escola Secundária Nuno Álvares, Castelo Branco (alunos 12º ano)/ Projeto desenvolvido na disciplina de Biologia “Atividade antimicrobiana do óleo essencial de esteva da Beira Baixa” (2017)	
<i>Allium sativum</i> , <i>L.</i> <i>pedunculata</i>	Alho e rosmani- nho-maior	<i>P. fluorescens</i> , <i>P.</i> <i>putida</i> , <i>A. faecalis</i> , <i>A. xylooxidans</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	Instituto Federal de Brasília- Mobilidade internacional – estágio tecnológico (2018)	

Metodologias utilizadas

Vários óleos essenciais, extratos aquosos e hidrolatos de diferentes origens geográficas, têm sido obtidos por hidrodestilação em aparelho modificado de *Clevenger* (Figura 1) ou por arrastamento de vapor no caso dos ensaios com óleos provenientes de produtores de óleos essenciais. Os extratos de plantas testados têm tido diversas formas de obtenção, desde extratos aquosos, etanólicos, metanólicos e hidroalcoólicos.





Figura 1. Preparação de material vegetal e hidrodestilação em aparelho Clevenger.

Para a determinação da sua atividade antimicrobiana, os óleos essenciais são testados em ensaios preliminares usando o método de disco - difusão em agar. A concentração mínima inibitória (CMI) é determinada usando o método da microdiluição em caldo para as bactérias e os fungos filamentosos e o método da macrodiluição em caldo para as leveduras. A concentração mínima microbicida (CMM) é igualmente determinada. Na Figura 2 está apresentada uma microplaca usada para a determinação da CMI de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (OO) e *Cymbopogon citratus* (OEP) sobre *Pseudomonas fluorescens* ESACB 153, usando o indicador resazurina. Os poços a roxo indicam inibição da multiplicação dos microrganismos e poços a rosa indicam ausência de inibição.

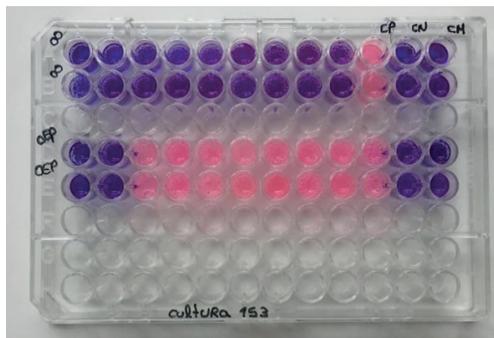


Figura 2. Determinação da concentração mínima inibitória pelo método da microdiluição em microplaca com óleos essenciais de *Origanum vulgare* (OO) e *Cymbopogon citratus* (OEP) (Abreu, 2018). CP-Poço com meio de cultura Mueller Hinton Broth (MHB) e inóculo; CN-Poço com MHB e o óleo essencial; CM-Poço apenas com MHB.



A análise química dos componentes dos óleos essenciais tem sido efetuada por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS). Na Tabela 3 referem-se alguns dos microrganismos isolados de produtos agroalimentares, manipuladores e utensílios alimentares, perante os quais se testa a ação antimicrobiana dos óleos essenciais relativamente à sua eficácia na conservação e preservação dos alimentos onde possam ocorrer.

Tabela 3. Microrganismos isolados maioritariamente de produtos agroalimentares.

Microorganismos	Origem
<i>Listeria monocytogenes</i> ESACB_CP6/04	Casca de queijo de ovelha (Pintado et al., 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESACB_P6/06	Leite cru de ovelha (Pintado et al., 2010)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ISA 1708	Casca de queijo de ovelha (Carreira et al., 1998)
<i>Rhizopus</i> sp. ESACB	Morango (Graça, 2011)
<i>Rhizopus stolonifer</i> ESA.M.44	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Botrytis cinerea</i> ISA	Tomate (Graça, 2011)
<i>Penicillium chrysogenum</i> ESACB_Pen7/06	Casca de queijo de ovelha (Pintado et al., 2010)
<i>Penicillium commune</i> ESACB_Pen8/06	Casca de queijo de ovelha (Pintado et al., 2010)
<i>Penicillium brevicompactum</i> ESA.M.60	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Aspergillus carbonarius</i> ESA.M.51	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Aureobasidium</i> sp. ESA.M.34	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Aureobasidium</i> sp. ESA.M.65	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Sacrothecium rubi</i> ESA.M.89	Medronho (Domingues, 2018. Dados ainda não publicados)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ESACB_P2	Leite de ovelha (Ferreira, 2018)



Continuação da Tabela 3.

Microrganismos	Origem
<i>Alcaligenes faecalis</i> ESACB_A7	Leite de vaca (Ferreira, 2018)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ESACB_Ac9	Zaragatoa ao ambiente de uma queijaria (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas putida</i> ESACB_P27	Zaragatoa a manipulador de alimento (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas putida</i> ESACB_P29	Água não tratada (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ESACB_P67	Leite de cabra (Ferreira, 2018)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ESACB_Ac137	Zaragatoa de Francela (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ESACB_P153	Zaragatoa do carrinho de inox (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas putida</i> ESACB_P184	Zaragatoa de escova de lavar queijo (Ferreira, 2018)
<i>Pseudomonas putida</i> ESACB_P191	Zaragatoa do carrinho de inox 1 (Ferreira, 2018)

Os óleos essenciais, extratos e hidrolatos têm sido extraídos de diversos tipos de plantas recolhidas pelos alunos e bolsеiros, ou por produtores de óleos essenciais da região que pretendem testar a qualidade dos seus produtos. Na Tabela 4 são indicados alguns dos óleos essenciais e extratos mais testados.

Atualmente, a base destes trabalhos foca-se na aplicação em formulações para revestimentos edíveis que possam ser aplicadas no controlo de microrganismos de alteração na superfície de queijos, frutos e outros alimentos (Figura 3). Assim, os óleos essenciais e/ou extratos aquosos que revelarem um melhor desempenho nos ensaios preliminares de atividade antimicrobiana têm sido selecionados para a incorporação nas formulações.

Tabela 4. Espécies de plantas aromáticas mais estudadas.

Espécie (Nome Científico)	Óleo essencial	Extratos	Hidrolatos
<i>Acacia dealbata</i>	X		
<i>Chamaemelum fuscatum</i>	X		
<i>Cistus ladanifer</i>	X	X	X
<i>Cymbogopon citratus</i>	X		
<i>Eucalyptus globulus</i>	X		
<i>Helicrysum stoechas</i>	X		
<i>Lavandula stoechas subsp. luisieri</i>	X	X	X
<i>Lavandula pedunculata</i>	X	X	X
<i>Matricaria recudita</i>	X		
<i>Melaleuca armillaris</i>	X	X	
<i>Origanum vulgare subsp. virens</i>	X	X	X
<i>Pinus pinaster</i>	X		
<i>Pterospartum tridentatum</i>		X	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	X	X	X
<i>Thymus mastichina</i>	X		X
<i>Thymus vulgaris</i>	X		





Figura 3. Ensaio de revestimentos bioativos em frutos.

Considerações finais

Os resultados obtidos dos trabalhos apresentados na Tabela 1 permitem afirmar que os óleos essenciais, extratos e hidrolatos poderão ser utilizados na preservação dos alimentos seja em pós-colheita, seja na indústria transformadora, pela utilização de métodos mais naturais. Uma das possibilidades é a sua incorporação em matrizes filmogénicas edíveis para revestimento de alimentos.

A integração dos estudantes neste tipo de estudos tem originado interesses diversos por parte dos mesmos ao nível da qualidade dos produtos alimentares, bem como na prossecução da sua vida académica e profissional nestas áreas de trabalho.

Agradecimentos

O presente trabalho foi apoiado pelos projetos SoSValor-Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal (Centro-01-0145-Feder-023631), Lab2factory-Reforço da transferência do conhecimento científico e tecnológico para as fileiras agroalimentar e florestal (Centro-01-0246-Feder-000020-Candidatura 6644) e Centro 2020, PROVERE - Operação Centro-04-3928-FEDER-000009, Plataforma de Inovação da Fileira do Medronho, Portugal 2020.

Referências

- Abreu, R. (2018). *Aplicação de óleos essenciais e extratos aquosos de plantas no controlo de bactérias Gram-negativas produtoras de pigmentos em queijo*. (Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Castelo Branco). Disponível em <https://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/6401>
- Abreu, R., Delgado, F., Goulão, M., Silva, H., & Pintado, C. (2018, Agosto). *Aplicação de óleos essenciais no controlo de microrganismos patogénicos e de alteração, isolados de alimentos e superfícies*. Trabalho apresentado em VIII Semana da Produção Científica, Brasília, Brasil.
- Bajpai, V. K., & Baek, K. (2016). Biological efficacy and application of essential oils in foods - a review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(1), 1-19. doi: 10.1080/0972060X.2014.935033
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446 - 475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Coelho, T. (2015). *Estudos de propagação in vitro, caracterização e valorização de carqueja (Pterospartum tridentatum (L.) Willk)*. (Tese de doutoramento, Instituto Superior de Agronomia). Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.5/9271>
- Delgado, F.M.G., Oliveira, M.R., González-Coloma, A., Mohamed, N., Soria, A.C., Sanz, J., Burillo, J., Rodilla, J., Silva, L., & Reina, M. (2007, Setembro). *Adaptação ao cultivo e valorização de Lavandula luisieri*. Poster apresentado em II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Vila das Caldas do Gerês.
- Delgado, F. (2010). *Conservação e valorização de Asphodelus bento-rainhae P. Silva e Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas-Martínez da Beira Interior*. (Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia). Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.5/2858>
- Delgado F., Antunes, P., Silva, M.H., & Pintado, C. (2015, Dezembro). *Óleos essenciais e controlo de microrganismos isolados de produtos agro-alimentares*. Trabalho apresentado em I Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias, Bragança, Portugal.
- Domingues, J.L., Frazão, D.F., Raimundo, J.R., Delgado, F., Goulão, M.M., Martins, M.H., Pintado, C.M.B.S. (2017, Novembro). *Atividade antimicrobiana de produtos de hidroddestilação de Lavandula stoechas subsp. luisieri (Rozeira) Rozeira*. Poster apresentado em II Congresso das Escolas Superiores



Agrárias, Elvas, Portugal.

Domingues, J.L., Coutinho, D., Delgado, F., Gonçalves, J.C. & Pintado, C.M.B.S. (2019a, Julho). *Products of autochthonous plants as bioactive ingredients in chitosan-based coatings for preservation of Arbutus unedo L. fruits*. Poster apresentado em XII edição do CIBIA – Congresso Iberoamericano de Engenharia Alimentar, Faro, Portugal.

Domingues, J.L., Frazão, D.F., Raimundo, J., Pintado, C.M.B.S., Goulão, M., Seabra, I.J. & Delgado, F. (2019b, Setembro). *Essential oil of Lavandula pedunculata (Miller) Cav. from Portugal: chemical profile and biological activities*. Poster apresentado em 50th International Symposium on Essential Oils, Viena, Áustria.

Domingues, J.L., Delgado, F., Pintado, C.M.B.S. & Gonçalves, J.C. (2019c, Setembro). *Antimicrobial activity of Lavandula stoechas subsp. luisieri essential oils against strains of fungi isolated from strawberry tree*. Poster apresentado em 50th International Symposium on Essential Oils, Viena, Áustria.

González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J., Silva, L., Sanz, J., & Burillo, J. (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 1-8. doi: 10.1016/j.bse.2010.08.010

Graça, S. (2011). *Actividade antimicrobiana de óleos essenciais de Lavandula luisieri sobre Botrytis cinerea e Rhizopus sp. isolado de morango*. (Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Castelo Branco).

Graça, S.F.N., Martins, M.H., Delgado, F.M.G., Silva, L.A., Ferreira, M.A.S.S. & Pintado C.M.B.S. (2014, Outubro). *Antifungal activity of essential oils from Lavandula luisieri and cineole against Rhizopus sp. isolated from strawberry*. Poster apresentado em III International Conference on Antimicrobial Research, Madrid, Spain.

Ferreira (2017). Diversidade genética de isolados bacterianos de *Pseudomonas* e géneros afins relacionados com defeitos de cor em queijo. Trabalho Final de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Frazão, D.F., Domingues, J.L., Delgado, F., Coutinho, D., Gonçalves, J.C. & Pintado, C.M.B.S. (2019, Setembro). *Biological activities of commercial C. ladanifer essential oil from Portugal*. Poster apresentado em 50th International

Symposium on Essential Oils, Viena, Áustria.

Lourenço, M. (2014). Óleos essenciais de *Acacia dealbata* - Valorização, caracterização e atividade antimicrobiana. (Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Castelo Branco).

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21, 240-246.

Pires, P. (2013). Óleos essenciais de *Melaleuca armillaris* caracterização e atividade antimicrobiana. (Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Castelo Branco).

Pires, P., Delgado, F., Antunes, P., Martins, M.H., Goulão, M.M., & Pintado, C.M.B.S. (2013, Dezembro). *Antimicrobial activity of essential oils from Melaleuca armillaris*. Poster apresentado em Portuguese Congress of Microbiology and Biotechnology, Aveiro, Portugal.

Pratas, T. (2018). *Valorização de produtos naturais com atividade antimicrobiana*. (Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Coimbra).

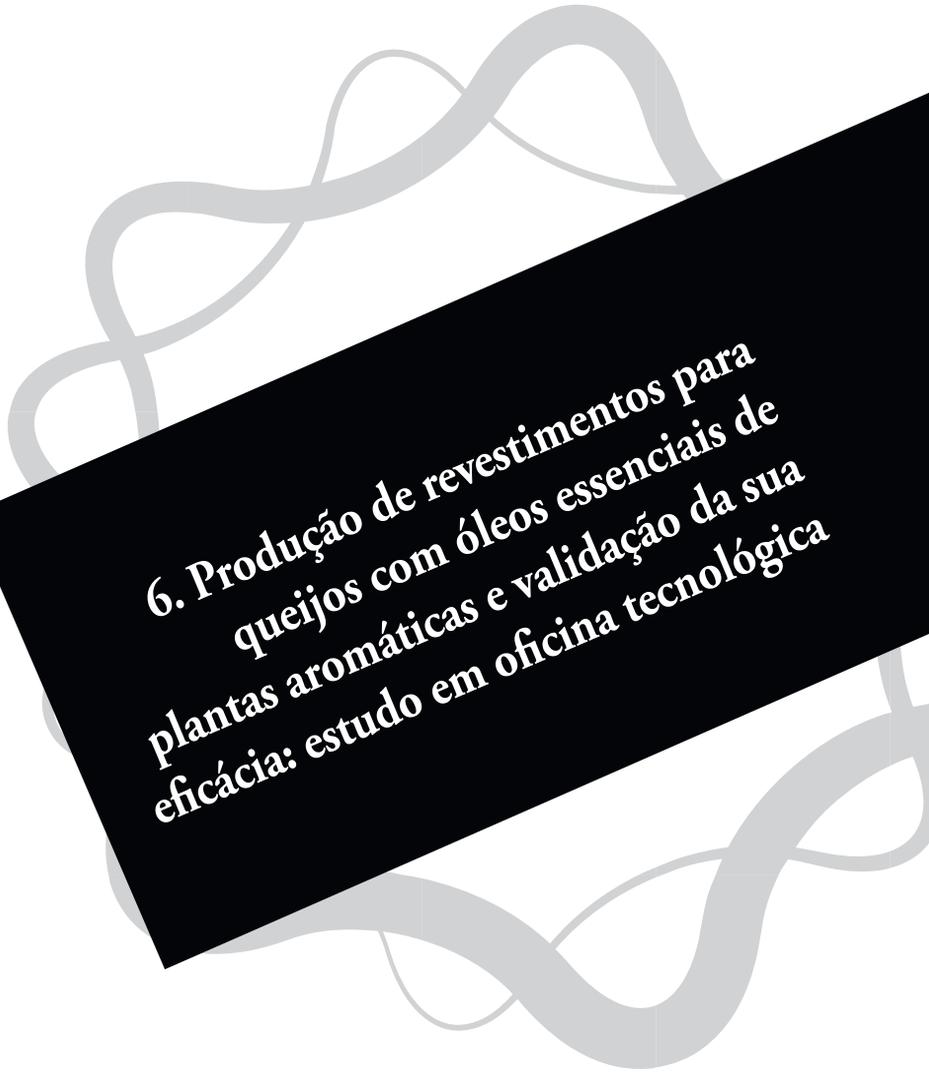
Santos, S. (2016). *Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e de hidrolatos de Cistus ladanifer*. (Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Castelo Branco).

Santos, S., Delgado, F., Antunes, P., Silva, M.H., & Pintado, C.M.B.S. (2016). *Cistus ladanifer essential oils and in vitro antimicrobial activity against food isolates*. Poster apresentado em AM 2016 - 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra, Portugal (Comunicações em poster).

Silva, M.G., Pintado, C., Antunes, P., Martins, M.H.D.S., & Delgado, F. (2016, Maio). *Antimicrobial activity of volatile oils obtained from Rosmarinus officinalis, Pinus sylvestris and Eucalyptus globolus*. Poster apresentado em 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra, Portugal.

Song, X., Zuoa, G., & Chen, F. (2018). Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1302-1309. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.114





**6. Produção de revestimentos para
queijos com óleos essenciais de
plantas aromáticas e validação da sua
eficácia: estudo em oficina tecnológica**

Susana Dias, Margarida Coelho, Soraia
Ramos, Rita Mata, Ana Raquel Borges,
David Gomes, Marta Henriques

PRODUÇÃO DE REVESTIMENTOS PARA QUEIJOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS AROMÁTICAS E VALIDAÇÃO DA SUA EFICÁCIA: ESTUDO EM OFICINA TECNOLÓGICA

Susana Dias, Margarida Coelho, Soraia Ramos, Rita Mata,
Ana Raquel Borges, David Gomes, Marta Henriques

A produção de queijo em Portugal é uma atividade económica muito relevante, tanto no contexto da economia local como nacional, tendo ultrapassado as 80 mil toneladas em 2017 (INE, 2018). Nos queijos regionais, produzidos com leite cru e muito apreciados pelas suas características organoléticas, é comum ocorrer o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras de alteração à sua superfície durante a fase de cura. A forma de obviar esta situação, que não representa na maioria dos casos um risco para a saúde do consumidor, mas desvaloriza comercialmente o produto, passa por lavagens frequentes e/ou pela aplicação de antibióticos, como a natamicina. Tais práticas aumentam consideravelmente os custos de produção e podem implicar alguns riscos para a saúde pública quando as dosagens dos produtos utilizados não são rigorosamente aplicadas e os prazos de segurança cumpridos. Na legislação brasileira, por exemplo, é permitido o uso de natamicina como um aditivo intencional no fabrico de queijo, desde que usada no limite máximo de 1 mg/dm² ou então 5 mg/kg na superfície, não devendo ser detetada a 2 mm de profundidade em queijos cortados ou fatiados e estar ausente na massa (Laurindo, 2017).

Procurar resolver este problema foi o repto lançado aos estudantes do 3º ano da Licenciatura em Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), no âmbito da Unidade Curricular (UC) de Projeto. Esta UC terminal tem como principal objetivo o desenvolvimento de soluções práticas e conceitos demonstrativos de atuação na indústria alimentar por parte dos estudantes, bem como a integração das aprendizagens adquiridas nas restantes UCs lecionadas durante o ciclo de estudos. Os temas de trabalho são



geralmente propostos pelos docentes ou pelos estudantes e visam responder a problemas concretos e reais da indústria e da sociedade. Esta UC funciona também como um estímulo à sua criatividade, capacidade de ultrapassar problemas, ao saber fazer e ao desenvolvimento das chamadas *soft skills*, pois os estudantes têm de funcionar como equipa, gerindo o seu tempo e as tarefas a realizar, disciplinando-se. No final, é solicitado a cada equipa a entrega de um relatório do projeto, com as soluções desenvolvidas e devidamente fundamentadas, e a sua apresentação e defesa oral.

Neste contexto, o tema deste projeto teve como principal motivação o desenvolvimento de um revestimento antimicrobiano edível e natural, que evitasse o crescimento de bolores e leveduras à superfície do queijo, aumentando o seu período de conservação. Este constituiria uma alternativa à aplicação de uma solução de natamicina que é prática comum a nível industrial.

O tomilho bela-Luz (*Thymus mastichina* L.) é uma planta mediterrânica usada tradicionalmente como substituto do sal nas regiões mais interiores do país. Os seus compostos bioativos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas reconhecidas (Fernandes, 2010; Ballester-Costa et al., 2013). Estas propriedades contribuem para melhorar as características organoléticas dos alimentos, bem como, aumentar o seu período de conservação. Os resultados prévios e promissores obtidos com os extratos aquosos e etanólicos de *Thymus mastichina* L. no controlo do desenvolvimento microbiano em queijos (Carvalho et al., 2017), levaram a que se elegesse o seu óleo essencial (OE) como substância ativa a usar na formulação do revestimento natural. O desafio envolveu os estudantes na realização de provas de conceito, em ambiente semi-industrial, com o desenvolvimento e aplicação de revestimentos com OE em queijos, de forma a perceber quais as repercussões ao nível microbiológico, físico-químico e sensorial durante o processo de cura e no produto final.

Metodologias utilizadas

Produção dos queijos

A Oficina Tecnológica de Lacticínios (OTL) da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) proporciona as condições necessárias para que os estudantes possam realizar a produção de queijo à escala piloto. Desta forma, os queijos

curados produzidos serviram de modelo alimentar para avaliar a eficácia do revestimento desenvolvido, comparando-o com o processo convencional de aplicação de natamicina, e com os queijos sem qualquer revestimento.

Na elaboração dos queijos seguiu-se a metodologia aplicada na OTL para o “Queijo ESAC”. Foram recebidos 240 L de leite de vaca e sujeitos a pasteurização a 74 °C durante 50 s. Após arrefecimento do leite foram-lhe adicionados cloreto de cálcio (0,4 mL/L) previamente diluído em água, sais antibutíricos (0,2 g/L de nitrato de potássio e o fermento (Cultivo Mesofilo Plus - Abiasa). A homogeneização da mistura foi realizada a 32 °C durante aproximadamente 15 minutos. No processo de coagulação foi adicionado coalho animal (Carlina 1600 - Danisco) na proporção de 20 ppm (m/v), e a mistura foi agitada durante 2 a 3 minutos. Passados cerca de 40 minutos de repouso, procedeu-se ao corte da coalhada, com o objetivo de aumentar a sua superfície, acelerar a eliminação do soro e facilitar a contração dos grânulos. Após o primeiro dessoramento, lavou-se a massa com água à mesma temperatura de coagulação. A coalhada, previamente escorrida, foi pré-prensada numa tina apropriada com o auxílio de placas de inox. De seguida, a massa foi colocada em moldes para definir o formato e tamanho dos queijos a produzir e estes foram sujeitos a prensagem mecânica para finalizar o dessoramento e obter a forma final. Antes da maturação os queijos foram colocados em salmoura a 20° Baumé durante uma hora, tendo seguido depois para as câmaras de cura onde permaneceram à temperatura, humidade e ventilação adequadas, durante 4 semanas.

Supervisionados pelos técnicos da OTL, os estudantes procederam à elaboração dum total de 40 queijos. Estes por sua vez foram divididos em quatro grupos de 10 queijos cada e sujeitos aos seguintes tratamentos: aplicação de revestimento com natamicina (fungicida aplicado durante a maturação, até uma semana antes da expedição para o mercado) e codificados como QN; aplicação do revestimento natural à base de proteínas de soro com OE de tomilho nas concentrações 1,25 mL/L (QOE1.25) e 2,5 mL/L (QOE2.5); e sem aplicação de qualquer revestimento (Q).

Preparação e aplicação dos revestimentos

A preparação dos revestimentos realizou-se no dia da sua aplicação, que aconteceu 1 semana após o fabrico dos queijos.



No caso dos revestimentos naturais à base de proteínas de soro, foi elaborada em primeiro lugar a formulação com a concentração mais elevada de OE de tomilho bela-luz (2,5 mL/L). Parte desta solução foi posteriormente diluída para se obter um revestimento com metade da concentração de OE (1,25 mL/L). Mediram-se 990 mL de concentrado líquido de proteínas de soro (CLPS), previamente preparado por ultrafiltração e devidamente caracterizado e adicionaram-se 10 mL de glicerol. Esta mistura foi homogeneizada e aquecida até aos 80 °C em banho termostatizado, durante 15-20 minutos. Depois de arrefecida até aos 30 °C, foram retirados 490 mL da mistura aos quais se juntaram 3,5 g de goma guar e uma solução previamente preparada com 1,25 mL de OE de *Thymus mastichina* - tomilho bela-luz (Planalto Dourado) e 5,25 mL de Tween 80, utilizado para aumentar a homogeneização e dispersão do OE na solução de revestimento. Desta forma obtiveram-se 500 mL da solução de revestimento com 2,5 mL de OE/L, que foi sujeita a homogeneização no Ultra-Turrax a 10.000-13.000 rpm durante 2 minutos. A solução de revestimento com menor concentração (1,25 mL de OE/L) foi preparada adicionando 250 mL da solução inicial de CPLS com glicerol, a 250 mL da solução de revestimento mais concentrada. As concentrações de OE testadas foram baseadas no estudo desensolvido por Carvalho et al. (2015) que avaliou o efeito do OE de *Thymus vulgaris* em *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e culturas *starter* ácido lácticas utilizadas no fabrico de queijo coalho.

A preparação da solução de natamicina com a concentração final de 2 g/L foi feita com água potável segundo as recomendações do fornecedor. A aplicação dos revestimentos seguiu o processo convencional por imersão dos queijos nas soluções de revestimento. Depois de submersos os queijos foram retirados, escorridos e acondicionadas em caixas perfuradas e encaminhados para as câmaras onde permaneceram durante o tempo de cura.

Análises aos queijos

O tempo de maturação dos queijos foi de quatro semanas. Após a sua confeção e ao longo da cura (1ª, 3ª e 4ª semana) os queijos foram analisados em termos microbiológicos e físico-químicos. Em cada amostragem foram retirados dois queijos por variante, codificados de acordo com o seu revestimento e tempo de maturação (t0, t1, t3 e t4), e analisados.



No que concerne às análises microbiológicas (Figura 1), os alunos realizaram a quantificação de bolores e leveduras de acordo com a ISO 21527-1 (2008a), a determinação do teor de aeróbios totais com base na ISO 4833-1 (2013) e a quantificação das enterobactérias e bactérias lácticas, de acordo com as ISO 21528-2 (2017) e ISO 15214 (1998), respetivamente.

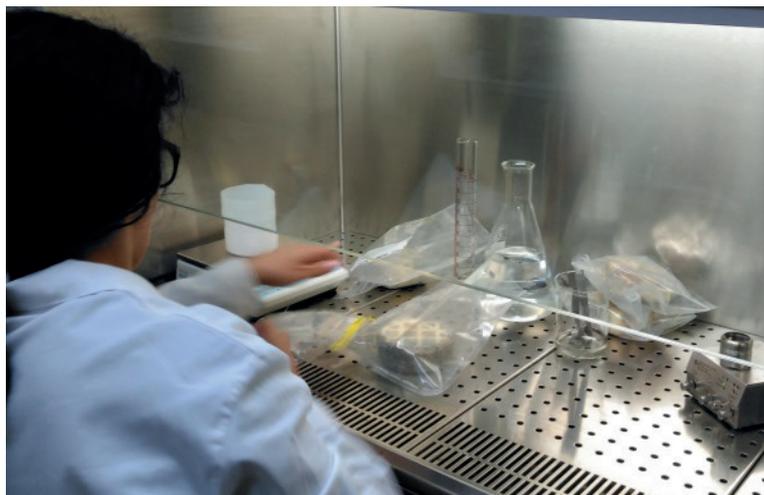


Figura 1 Execução prática de análises microbiológicas em câmara de fluxo laminar.

Relativamente à avaliação físico-química, os queijos foram caracterizados em relação ao seu teor de humidade (AOAC 948.12, 1997), gordura (ISO 3433, 2008b), proteína (AOAC 920.123, 1997) e cinzas (AOAC 935.42, 1997). Foi também feito um acompanhamento da acidez titulável, de acordo com o método 920.124 da AOAC (1997), e do pH através de leitura direta no potenciómetro utilizando a sonda FC200 (Hanna Instruments, Portugal). A análise do perfil de textura dos queijos foi feita recorrendo ao texturómetro TA. XT Express Enhanced (Stable Micro Systems LTD, UK) com o software Specific Expression PC Software, versão 1.1. Em cada queijo, com casca, foram feitas perfurações em local aleatório com a sonda TA-24 (acrílico, 1/4" de diâmetro, 35 mm de altura) à velocidade de 1,0 mm/s no pré-teste e de 2,0 mm/s no teste. Foi também avaliada a cor interna dos queijos de acordo com o sistema CIEL*a*b* utilizando o colorímetro CR-200B da Chroma Minolta (Japão).



Com a exceção das análises microbiológicas, acidez titulável e do pH, todas as restantes análises foram realizadas apenas na semana de produção dos queijos (t_0) e no final do tempo de maturação (t_4).

A prova sensorial ao produto final foi executada no final do estudo, tendo como objetivo investigar a preferência dos provadores em relação aos queijos com diferentes tipos de revestimentos, no que diz respeito ao aroma e sabor. A prova foi realizada na sala de análise sensorial da ESAC dotada de sete cabines de prova devidamente equipadas. Nesta avaliação, foram fornecidas amostras das quatro variantes dos queijos e foi solicitado aos 22 provadores não treinados, que as ordenassem por ordem crescente de acordo com a sua preferência.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos relativamente à análise microbiológica dos queijos ao longo do tempo de maturação. Estas análises foram realizadas, em primeiro lugar, para evitar a contaminação posterior das amostras devida à manipulação dos queijos.

Pelos resultados obtidos podemos verificar que ao longo do tempo existe um aumento considerável do número de contagens em todos os grupos microbianos avaliados, com exceção das bactérias lácticas à 4ª semana, que diminuem ligeiramente face à anterior. As contagens das enterobactérias e das bactérias lácticas nos queijos, logo após fabrico, foram as mais elevadas, e superiores em 2-3 ordens de grandeza relativamente ao teor de aeróbios totais e aos bolores e leveduras. Enquanto que no caso das bactérias lácticas este resultado é positivo, pois estas são as responsáveis pelo desenvolvimento das características físico-químicas e organolépticas mais interessantes dos queijos, no caso das enterobactérias os valores elevados traduzem uma elevada contaminação ligada a higienização deficiente.

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas por tipo de queijo durante as 4 semanas de cura. Queijo sem revestimento (Q), queijo com revestimento de natamicina (QN) e queijos com revestimento de OE de tomilho com 1,25 mL/L (QOE1.25) e 2,5 mL/L (QOE2.5).

	Queijos	t0	t1	t3	t4
Aeróbios totais (ufc/g)	Q		$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^8$.*
	QN	$2,3 \times 10^3$	$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^8$	-
	QOE1.25		$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^8$	-
	QOE2.5		$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^8$	-
Bolors e leveduras (ufc/g)	Q		$9,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^8$	-
	QN	$6,0 \times 10^2$	$>3,0 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	-
	QOE1.25		$>3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	-
	QOE2.5		$>3,0 \times 10^5$	$4,2 \times 10^8$	-
Enterobactérias (ufc/g)	Q		$>3,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	QN	$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
	QOE1.25		$>3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^9$	$6,9 \times 10^8$
	QOE2.5		$>3,0 \times 10^5$	$8,6 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$
Bactérias Láticas (ufc/g)	Q		$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^8$	$9,5 \times 10^6$
	QN	$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^5$	$>3,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$
	QOE1.25		$>3,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$
	QOE2.5		$>3,0 \times 10^5$	$9,2 \times 10^7$	$9,7 \times 10^7$

* não determinado por se identificar visualmente uma grande contaminação

Podemos também verificar que a contagem de bolors e leveduras nos queijos revestidos com natamicina na terceira semana é de 3 ordens de grandeza inferior à dos restantes queijos. O resultado é de certa forma esperado pois este fármaco inibe seletivamente o crescimento deste grupo microbiano.

Os queijos controlo sem revestimento e os com revestimento de OE de tomilho apresentaram-se, nas últimas semanas, com a superfície quase totalmente revestida com bolors (Figura 2). Uma vez que durante toda a fase de cura não foram sujeitos a qualquer lavagem, que normalmente acontece nas condições de produção convencionais, foi decidido não quantificar este grupo microbiano (bolors e leveduras) e o dos aeróbios totais na última fase, t4 (Tabela 1).

Independente do tipo de revestimento usado, o resultado obtido para as contagens dos vários grupos microbianos de alteração verificou-se relativamente



elevado. Os estudantes apontaram como principal causa a contaminação cruzada na câmara de cura, uma vez que para além dos queijos do ensaio estarem relativamente próximos uns dos outros, existiam também outros tipos de queijos na mesma câmara, como é possível observar na Figura 2. Neste sentido, foi sugerido o uso de uma câmara específica para o efeito em futuros ensaios, ao invés de uma câmara de cura comum.



Figura 2. Queijos com os diferentes revestimentos estudados, na câmara de cura.

Importa salientar que, relativamente aos resultados apresentados para a avaliação microbiológica, nomeadamente no que diz respeito à forma quantitativa de expressar o teor dos grupos microbianos estudados (Tabela 1), podemos constatar a dificuldade do grupo de trabalho em estabelecer as diluições mais apropriadas para a contagem das colónias. O facto de as diluições das amostras ficarem aquém do necessário, tornava o número de colónias incontáveis nas caixas de Petri, não permitindo expressar o resultado exato da contagem. Esta situação explica a maioria dos valores patentes na Tabela 1, onde foi apenas possível estabelecer o limite inferior de microrganismos viáveis presentes. É também bastante evidente que, quando os estudantes terminaram as contagens de uma das fases definidas para as análises, não lhes foi fácil estabelecer de forma autónoma as diluições mais adequadas para a fase seguinte no sentido de obter resultados mais viáveis.

Em face dos resultados microbiológicos obtidos, que de uma forma geral

não evidenciaram a eficiente diminuição, quer de microrganismos aeróbios totais, quer dos bolores e leveduras, através da aplicação do OE de tomilho nas concentrações testadas, notou-se algum desalento por parte dos estudantes face ao elevado volume de trabalho realizado. Foi necessário motivá-los e inculcá-los um espírito mais proactivo, dando ênfase aos resultados obtidos para o grupo das enterobactérias, que não só poderiam dar pistas para novos trabalhos, como permitiriam adequar melhor as condições experimentais em ensaios futuros. Estes novos estudos poderiam envolver outros extratos e averiguar a sua eficácia na diminuição deste grupo microbiano em particular, ou monitorizar todo o processo de preparação dos queijos, fazendo a avaliação microbiana do ar, dos locais de processamento, do equipamento e dos manipuladores, para compreender qual a maior fonte de contaminação, por forma a atuar preventivamente.

Em trabalhos futuros, deverá ser avaliado o efeito da aplicação de mais tratamentos ao longo do processo de cura sobre o desenvolvimento dos microrganismos.

Os resultados das análises físico-químicas aos queijos encontram-se compilados nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 3. Ao longo do tempo de cura constatou-se que a acidez titulável (Tabela 2) aumentou, o que poderá estar relacionado com a acumulação do ácido láctico resultado de uma maior atividade das bactérias lácticas ao longo da maturação.

Relativamente à composição dos queijos (Figura 3) podemos verificar que, tal como previsto, o teor de humidade diminuiu ao longo do tempo de cura, uma vez que os queijos vão desidratando e perdendo água, passando de 52,0% para 29,1 – 31,8%. Apesar das diferenças entre as várias formulações serem pequenas, os queijos mais secos foram os que tiveram a aplicação dos novos revestimentos à base de proteínas de soro e OE de tomilho. Estes resultados indicam que este tipo de revestimento não limita a permeabilidade ao vapor de água, que migra desde o interior dos queijos até ao meio ambiente. Uma potencial justificação é a constituição destes revestimentos ter essencialmente componentes com características hidrofílicas (proteínas, glicerol e carboidratos) e por isso não oferecem grande resistência ao transporte do vapor de água.



Tabela 2. Acidez titulável (% ácido láctico) por tipo de queijo e fase de cura. Queijo sem revestimento (Q), queijo com revestimento de natamicina (QN) e queijos com revestimento de OE de tomilho com 1,25 mL/L (QOE1.25) e 2,5 mL/L (QOE2.5).

	Queijos	t0	t3	t4
Acidez	Q		0,500±0,072	0,685±0,008
Titulável (% ácido láctico)	QN		0,553±0,019	0,577±0,011
	QOE1.25	0,388±0,002	0,378±0,005	0,737±0,026
	QOE2.5		0,525±0,023	0,547±0,015

Podemos verificar que o teor de gordura nos queijos varia entre 25,5% e 27,5%. São classificados como queijos meio-gordos por apresentarem um teor de gordura no extrato seco entre 36,0 e 39,5%, que se insere no intervalo de classificação (25,0 - 44,9%). Quanto à consistência, são considerados queijos de pasta dura por terem teores de humidade no extrato seco desengordurado inferiores a 50% (39,2 – 42,9%).

Relativamente ao teor de proteína verificamos que os queijos QOE1.25 e QOE2.5 apresentam percentagens ligeiramente superiores (30,2% e 31,7%), comparativamente ao controlo e ao QN. A composição do revestimento, à base de proteínas de soro, provavelmente contribuiu para este ligeiro aumento.

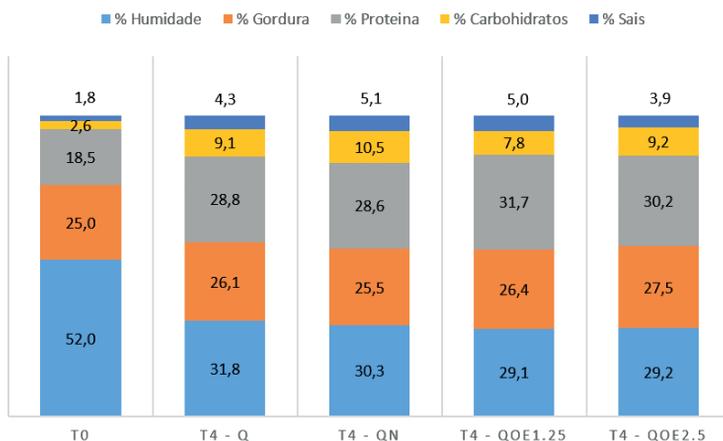


Figura 3. Composição dos queijos com os diferentes revestimentos: após fabrico (T0) e no final da cura (T4). Queijo sem revestimento (Q), queijo com revestimento de natamicina (QN) e queijos com revestimento de OE de tomilho com 1,25 mL/L (QOE1.25) e 2,5 mL/L (QOE2.5).

No que concerne aos atributos da cor da pasta dos queijos (Tabela 3) é evidente uma diminuição da luminosidade (L^*) entre o início e o final da cura para todos os casos. No entanto, os queijos que mais escureceram foram os sujeitos à aplicação do revestimento bioativo com OE de tomilho, seguidos dos de controlo e por fim, os mais claros, com natamicina. Observamos também um aumento no parâmetro b^* no sentido do amarelo. A cor do queijo é um parâmetro muito importante para a sua apreciação. No caso dos queijos curados a sua cor tende para uma maior intensidade.

Relativamente à textura, observamos que o queijo QOE2.5 é o mais duro e tem a maior adesividade, mas apresenta a menor coesividade. Consta-se também que a dureza do queijo QOE1.25 é da mesma ordem de grandeza que a do controlo e que o queijo com natamicina apresenta-se como o menos duro. Neste último caso é evidente a formação de uma casca menos espessa e resistente, que está na origem deste resultado.

No que diz respeito à análise sensorial dos queijos, foram verificadas diferenças entre amostras, por parte dos provadores. A amostra preferida foi a de queijo cujo revestimento continha natamicina, seguida da amostra de queijo com revestimento de OE na concentração mais elevada (2,5 mL/L). Uma possível justificação pode estar ligada ao maior desenvolvimento de bolores nos outros queijos, o que se refletiu num sabor mais intenso e algum aroma menos agradável, a mofo.



Tabela 3. Cor da pasta dos queijos com os diferentes revestimentos após fabrico (t0) e no final da cura (t4); e textura final dos queijos (t4). Queijo sem revestimento (Q), queijo com revestimento de natamicina (QN) e queijos com revestimento de OE de tomilho com 1,25 mL/L (QOE1.25) e 2,5 mL/L (QOE2.5).

Queijos	Cor	t0	t4
Q	L*	91,30 ± 0,91	75,90 ± 1,33
	a*	-3,53 ± 0,09	-3,50 ± 0,07
	b*	13,20 ± 0,33	17,50 ± 0,78
QN	L*	91,30 ± 0,91	80,98 ± 1,90
	a*	-3,53 ± 0,09	-4,05 ± 0,23
	b*	13,20 ± 0,33	19,65 ± 1,51
QOE1.25	L*	91,30 ± 0,91	71,23 ± 6,79
	a*	-3,53 ± 0,09	-2,08 ± 1,24
	b*	13,20 ± 0,33	16,03 ± 0,82
QOE2.5	L*	91,30 ± 0,91	73,83 ± 5,65
	a*	-3,53 ± 0,09	-3,15 ± 0,44
	b*	13,20 ± 0,33	17,30 ± 1,63
Textura	Queijos		
Dureza (N)	Q		2,99 ± 0,37
	QN		2,62 ± 0,10
	QOE1.25		2,98 ± 0,42
	QOE2.5		3,19 ± 0,58
Adesividade (g.s)	Q		-436,70 ± 96,69
	QN		-463,30 ± 54,68
	QOE1.25		-418,75 ± 11,95
	QOE2.5		-570,45 ± 56,55
Coesividade	Q		0,54 ± 0,16
	QN		0,50 ± 0,04
	QOE1.25		0,51 ± 0,01
	QOE2.5		0,48 ± 0,09

Apreciação crítica do desempenho dos estudantes

A elaboração dos queijos à escala piloto na OTL da ESAC foi, para os alunos, uma excelente oportunidade para aplicar competências que lhes foram inculcadas nas mais diversas UCs, como por exemplo, Oficinas Tecnológicas e Higiene e Segurança Alimentar.

O trabalho em equipa revelou-se também importante, sendo este uma forma de partilha de conhecimento e experiências individuais.

Importa referir que em algumas situações, como por exemplo na aquisição e receção do leite e na execução de análises ao produto, os alunos foram obrigados a gerir o seu tempo de acordo com o restante horário de aulas e com a disponibilidade dos espaços, equipamentos e instrumentos, uma vez que nem sempre foi possível efetuar as tarefas dentro do horário previsto para a UC de Projeto. O facto de os estudantes terem aceiteado esta situação, permitiu confirmar o interesse que este tipo de desafio lhes despertou.

A componente de carácter estritamente laboratorial, constituída pela execução das análises aos queijos, foi fundamental para os estudantes poderem aplicar conhecimentos adquiridos nas UCs, de Análise Físico-Química de Alimentos, Microbiologia Alimentar e Análise Sensorial. O elevado volume de amostras constituiu um grande desafio, obrigando-os a uma grande disciplina, rigor e responsabilidade, e ainda à perceção dos problemas que advêm de uma análise realizada com pouco cuidado, uma codificação ou identificação mal feita, um período de incubação não respeitado. A autonomia dos alunos em laboratório, desenvolvida ao longo desta experiência, criou neles o respeito por regras e hábitos de trabalho visando a segurança, nomeadamente o uso de equipamento de proteção individual (luvas e bata de laboratório) e procedimentos apropriados (por exemplo o cabelo apanhado).

Na prossecução da análise sensorial dos queijos, os estudantes demonstraram-se extremamente proactivos, reservando a sala atempadamente, estabelecendo os contactos para o recrutamento de provadores e gerindo todo o espaço e preparação das amostras para a prova.



Considerações Finais

A envolvimento direta dos estudantes num estudo com este caráter prático e aplicado, revelou-se crucial para o desenvolvimento de competências que só o contexto real permite. Inicialmente os estudantes encararam este trabalho como sendo uma tarefa simples, contudo a dificuldade aumentou e agudizou-se no término do trabalho com a acumulação de testes de avaliação e trabalhos de outras UCs. Para além de enfrentarem esta dificuldade, ligada à diminuição da disponibilidade, houve também uma nítida dificuldade em procurar informação adicional através de uma boa pesquisa bibliográfica.

Chegados ao final deste trabalho e após a apresentação oral realizada, os estudantes fizeram um balanço positivo desta atividade, pois consideraram que contribuiu para uma formação mais completa e aplicada. A partir desta experiência conseguiram ter uma maior perceção das dificuldades inerentes a um processo de investigação, bem como a exigência de rigor, organização e disciplina para obter um resultado final fiável e útil.

Esta experiência representou um verdadeiro tubo de ensaio para a vida profissional e, aliando-se à investigação, constituiu o compromisso ideal entre as duas realidades, a da academia e a empresarial.

Agradecimentos

O presente trabalho foi apoiado pelos projetos SoSValor - Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal (Centro-01-0145-Feder-023631) e Lab2factory - Reforço da transferência do conhecimento científico e tecnológico para as fileiras agroalimentar e florestal (Centro-01-0246-Feder-000020-Candidatura 6644).

Referências

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997a). Official Method 948.12. In *Official methods of analysis of AOAC International*, 16^a ed. Washington DC, USA: AOAC International.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997b). Official Method 920.123. In *Official methods of analysis of AOAC International*, 16^a ed. Washington DC, USA: AOAC International.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997c). Official Method 935.42. In *Official methods of analysis of AOAC International*, 16^a ed. Washington DC, USA: AOAC International.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997d). Official Method 920.124. In *Official methods of analysis of AOAC International*, 16^a ed. Washington DC, USA: AOAC International. AOAC 920.123 (1997) Official methods of analysis of AOAC International – Method 920.123. 16th ed. Washington DC.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. & Viuda-Martos M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth, *Industrial Crops and Products*, 50, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.052>
- Carvalho, F., Rodrigues A., Gomes, D., Ferreira, F. M. L., Dias S. P., Pereira C. J. D., Henriques, M. H. F. (2018) Improvement of ripened cheese quality and safety with *Thymus mastichina* L. bioactive extracts. In A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds), *Handbook of Food Bioengineering, Advances in Biotechnology for Food Industry* (Chap. 7, pp 197-211). Academic Press. ISBN 9780128114438. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00007-4>.
- de Carvalho, R. J., de Souza, G. T., Honório V. G., de Sousa, J., da Conceição M. L., Maganani, M. & de Souza E. L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models, *Food Microbiology*, 52, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.003>.
- 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. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/2593>.

INE – Instituto Nacional de Estatística (2018). Base de Dados Estatísticas da Produção Animal. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P., 2018. [Consult. Janeiro 2019]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000920&contexto=bd&selTab=tab2

ISO - International Organization for Standardization. (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees °C (ISO Standard No. 15214).

ISO - International Organization for Standardization. (2008a). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95 (ISO Standard No. 21527-1)

ISO - International Organization for Standardization. (2008b) Cheese – Determination of fat content – Van Gulik method. (ISO Standard No. 3433:2008)

ISO - International Organization for Standardization. (2013). Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique (ISO Standard No. 4833-1)

ISO - International Organization for Standardization. (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique (ISO Standard No. 21528-2).

Laurindo, J. (2017) Teor de natamicina, caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e índice de qualidade lipídica em queijo azul e tipo gorgonzola. (tese de mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2255/1/LD_PPGTAL_M_Laurindo%2C%20Jaqueline_2017.pdf





**7.2Bio4Cartilage - Programa de
intervenção integrado para prevenção
e tratamento de lesões da cartilagem**

Cândida Malça, Marta Henriques, Pedro Morouço

2BIO4CARTILAGE - PROGRAMA DE INTERVENÇÃO INTEGRADO PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE LESÕES DA CARTILAGEM

Cândida Malça, Marta Henriques, Pedro Morouço

Pretende-se com este capítulo fazer um enquadramento conceptual do projeto 2Bio4Cartilage, abordando a problemática associada à osteoartrose e contextualizando as perspectivas de prevenção e tratamento como instrumento potencial de promoção da saúde, com impacto nos serviços prestados à comunidade. Será assim o ponto de partida de contextualização para o capítulo seguinte, de índole mais aplicada e direcionada a temáticas específicas.

Introdução

As doenças relacionadas com a cartilagem estão no topo da lista de preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o tratamento da degeneração da cartilagem articular um tema relevante de saúde para o qual existem poucas soluções eficazes. Além disso, o envelhecimento, a obesidade, as deficiências nutricionais e a (in)atividade física são problemas marcantes na sociedade atual que estão diretamente associados a um grande número de transtornos reumáticos. Com uma tendência demográfica para uma população envelhecida, é comumente aceite que hoje em dia a sociedade se associou a um ciclo vicioso devido à relação comprovada entre osteoartrose (OA) e obesidade e o aumento da prevalência de ambos. As investigações que se têm debruçado sobre esta temática, com o objetivo de amenizar os seus efeitos são, até agora, insuficientes, mas essenciais. Como consequência, há um número significativo de estratégias para tratar lesões da cartilagem articular; algumas já disponíveis no mercado, e outras ainda em fase de pesquisa, investigação e desenvolvimento (Bhosale & Richardson, 2008; Cancedda et al., 2003, Sargeant et al., 2012; Söntjens et al., 2006; Toh et al., 2011; Williams & Brophy, 2007; Williams & Niederauer, 2007).



Factos relevantes

- A incapacidade devido a distúrbios musculoesqueléticos aumentou 45% de 1990 a 2010 (Vos et al., 2012);
- A osteoartrose (OA) apresenta o mais rápido aumento da condição de doença, afetando atualmente mais de 250 milhões pessoas no Mundo (Hunter, Schofield, & Callander, 2014);
- Não é uma doença que só ocorre nos idosos: mais de 50% dos adultos com OA de joelho têm menos de 65 anos (Deshpande et al., 2016);
- 2 em cada 3 pessoas com obesidade estão em risco de desenvolvimento de OA do joelho ao longo da sua vida (Murphy et al., 2008);
- A OA do joelho é a 11ª causa principal de incapacidade, e mostra uma tendência de crescimento (Lohmander, 2013);
- Pessoas com OA têm 16% de risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares em comparação com aqueles sem OA (Williams et al., 2018).

A substituição de tecidos, como a cartilagem ou articulações através de enxertos alogénicos, acarreta riscos de infeções por vírus (como o HIV ou hepatite C), incompatibilidade dador-recetor (Pörtner et al., 2005) ou mesmo a morte de condrócitos durante o processo (Chiang & Jiang, 2009). Além disso, o uso de enxertos só parece ter sucesso quando as áreas danificadas são pequenas, menores que 2 cm² (Cancedda et al., 2003).

A cartilagem tem um importante papel na criação de superfícies articulares que combinam um baixo atrito com uma elevada lubrificação (Jeffrey & Watt, 2003). Estas propriedades remetem para a importância dum conhecimento mais profundo sobre a sua caracterização, fazendo a ponte entre a anatomia e a fisiologia, e levam ao desenvolvimento de implantes propícios à reparação e regeneração da própria cartilagem (Mouser et al., 2017). A necessidade deste conhecimento é reforçada em virtude da cartilagem ser um tecido avascular e, por conseguinte, com uma muito baixa capacidade para regeneração tecidual.

Independentemente da baixa atividade metabólica e relativamente pobre capacidade de regeneração de condrócitos, a cartilagem hialina é um tecido dinâmico e ágil onde as componentes da matriz extracelular desempenham um papel vital (Baker et al., 2012). Está bem documentado na literatura que a cartilagem hialina tem propriedades mecânicas notáveis (módulo de elasticidade de aproximadamente 123 MPa, resistência mecânica à tração de 17 MPa, módulo de compressão entre os 0,53-1,82 MPa, e uma tensão de compressão entre os 14-59 MPa) (Sargeant et al., 2012; Shin et al., 2012) e, apesar da sua pequena espessura (alguns milímetros), uma elevada durabilidade. Todavia, a sua complexidade estrutural e propriedades singulares constituem desafios constantes aos grupos de investigação que têm como objetivo restaurar a funcionalidade da cartilagem. Geralmente, os pacientes submetidos a cirurgia são os classificados, de acordo com a classificação da *International Cartilage Repair Society*, com grau 4, *i.e.*, os que apresentam fissura com extensão até ao osso subcondral. Assim, não apenas deve ser dada consideração à regeneração da cartilagem, mas também ao osso subcondral e à sua interface. Em comparação, o osso subcondral é um tecido complexo constituído por água, colagénio do tipo I e cristais de hidroxiapatite. Estes dois componentes proporcionam, respetivamente, a rigidez e a resistência à compressão que caracteriza o tecido (Arvidson et al., 2011; Yang & Temenoff, 2009). O módulo de compressão do osso subcondral é de 5,7 GPa, significativamente maior do que o de cartilagem, enquanto que o módulo de elasticidade é de aproximadamente 2 GPa (Kelly & Prendergast 2006, Mind & Lewis, 1994; Mouser et al., 2017).

Com a ambição de contribuir para uma regeneração osteoarticular de sucesso, vários grupos de investigação têm trabalhado intensamente no desenvolvimento de implantes customizados que possam promover a regeneração osteocondral, *e.g.*, reforçando hidrogéis usando microfibras tridimensionalmente impressas (Visser et al., 2015) ou, mais recentemente, com uma abordagem *in situ* usando uma biopen para reparar um defeito condral de espessura total (Di Bella et al., 2018), ou ainda através de tecnologia de bioimpressão 4D que fabrica estruturas dinâmicas capazes de responder a estímulos (Gao et al., 2016; Li et al., 2016). Sem dúvida que, embora estejam a ser desenvolvidos esforços significativos a nível mundial nos campos da engenharia de tecidos e medicina regenerativa (TERM), a restauração completa do tecido osteocondral continua a ser encarada como um desafio primordial; e não deve ser esquecido que é muito mais do que um defeito exclusivo da cartilagem.



Entendemos que a quantificação geral dos defeitos osteocondrais deve considerar: i) a anatomia - estrutura e composição que se assemelhem ao tecido nativo; ii) a biomecânica - capacidade de produzir comportamentos mecânicos similares; e iii) a fisiologia - restaurar completamente a funcionalidade (Kock et al., 2012). A diferente composição e propriedades mecânicas do osso, da cartilagem e da sua interface, demonstram a sua complexidade tornando-se um desafio para a conceção e fabrico de implantes biodegradáveis que mimetizem os tecidos nativos (Stoop, 2008).

A engenharia de tecidos e medicina regenerativa (TERM) constituem um campo científico multidisciplinar no qual se aplica uma ampla variedade de metodologias. Como tal, equipas de investigação multidisciplinares podem proporcionar contributos adequados para o seu desenvolvimento (Hutmacher, 2006), sendo um dos principais objetivos a produção de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido, utilizando, para tal, estruturas de apoio biocompatíveis e biodegradáveis, *i.e.*, *scaffolds* em conjugação com células humanas (Malda et al., 2013). Alinhados, os investigadores têm estado interessados no desenvolvimento de abordagens otimizadas para restaurar a funcionalidade articular e em aplicar estas abordagens à prática clínica. Neste contexto, uma das abordagens mais promissoras é usar os princípios da fabricação aditiva (FA). As tecnologias de FA permitem a produção de estruturas 3D complexas e replicáveis com elevado nível de controlo na geometria predefinida e no tamanho dos poros interconectados. Esta organização controlada melhora a vascularização e, conseqüentemente, o transporte de oxigénio e nutrientes ao longo de toda a estrutura, proporcionando um ambiente biomecânico adequado para a regeneração de tecido (Zadpoor & Malda, 2017). Avanços recentes na FA permitiram a conceção e a fabricação de implantes customizados que possuem características estruturais e funcionais comparáveis ao tecido nativo. Este fabrico recorre a imagens de tecido capturadas usando técnicas da imagem médica, *e.g.*, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (MRI) que estão largamente disponíveis em ambientes hospitalares. As propriedades mecânicas das *scaffolds* produzidas estão diretamente relacionadas com a sua topologia e microarquitectura. Como tal, a permeabilidade de uma estrutura porosa poderia ser manipulada para imitar o tecido nativo, facilitar o movimento de células e nutrientes e permitir uma melhor integração no tecido hospedeiro facilitando a osteointegração (Liu et al., 2011). Além disso, estas estruturas

devem fornecer o microambiente apropriado para os mecanismos celulares, bem como a interação célula-estrutura. Como tal, o tamanho, a porosidade, a rigidez e a orientação do substrato são de grande importância para o sucesso do implante. Malda et al. (2005) compararam uma *scaffold*, com estrutura organizada, impressa tridimensionalmente com uma esponja tridimensional de organização aleatória. Os resultados demonstraram a superioridade na condrogênese *in vivo* da *scaffold* impressa. Neste caso, devido à sua superior organização das fibras, a difusão celular acabou por ser desencadeada ao longo da estrutura. Mais recentemente, Hedayati et al. (2018) investigaram os efeitos da conceção topológica e o tipo de material sobre as propriedades mecânicas na FA de biomateriais porosos. Estes autores concluíram que, através do design topológico, poderia provocar-se uma diferença dez vezes superior nas propriedades mecânicas dos biomateriais, enquanto que o tipo de material só resultava numa diferença de até duas vezes. Facto comprovado que veio reforçar a importância da topologia da *scaffold* nas propriedades mecânicas desejadas. No entanto, adaptar a tecnologia adequada com biomateriais avançados de forma a desenvolver implantes personalizados que reproduzam o tecido nativo continua a ser um enorme desafio. É neste enquadramento que surge o projeto 2Bio4Cartilage.

Objetivos e metodologia do projeto 2Bio4Cartilage

A contribuição para a resolução dos problemas supraenunciados passa obrigatoriamente por uma perspectiva e abordagem de intervenção integrada e multidisciplinar. Como tal, não é por acaso que o consórcio do projeto 2Bio4Cartilage é constituído por Instituições do Sistema Científico (ISC) e por um Centro Hospitalar, conferindo-lhe uma dimensão ao nível da investigação e da sua aplicação prática. Este projeto assenta nos objetivos principais seguintes:

- promover, em conjunto com os estudantes de licenciatura e mestrado, uma abordagem de aprendizagem baseada em problemas reais e concretos para um processo de ensino-ação reforçado;
- desenvolver um novo sistema de micro-co-extrusão com a capacidade de extrudir filamentos interiores e exteriores, com elevada fiabilidade (para criação de propriedade intelectual);
- otimizar a engenharia de biomateriais e bioprocessos para a construção de



scaffolds híbridas e funcionais (produzir as primeiras *scaffolds* de arquitetura controlada com as propriedades mecânicas de elastômeros);

- conceber um programa de exercício físico baseado no indivíduo para a redução da dor, aumento da independência funcional e redução dos custos associados ao diagnóstico de OA;
- sensibilizar a sociedade para o problema da OA, dotando-a de conhecimentos elementares sobre a doença, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos cidadãos.

O projeto tem duas grandes áreas de intervenção que, embora sejam de áreas científicas diferentes, se complementam: i) uma centrada na prevenção da doença e ii) a outra no desenvolvimento de uma solução de tratamento. Para alcançar estes objetivos é necessário ter uma metodologia clara e bem definida, assim como uma equipa de investigação altamente motivada. O 2Bio4Cartilage foi dividido em 7 atividades complementares (Figura 1) desenvolvidas em estreita colaboração inter e intra atividade, e compreende a participação de três ISC e do Centro Hospitalar de Leiria. Sendo esta uma equipa multidisciplinar, os resultados foram bastante profícuos, na medida que se promove um debate permanente e conjunto entre os diferentes atores que têm um papel importante na luta contra a OA.

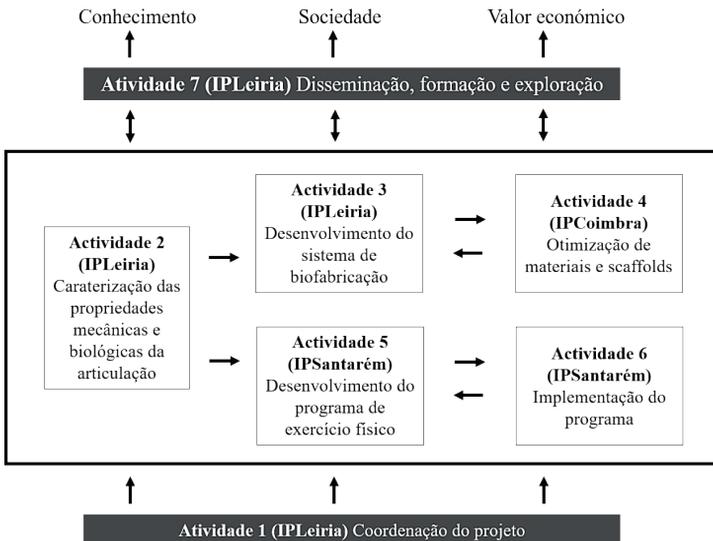


Figura 1. Diagrama ilustrativo das atividades do projeto 2Bio4Cartilage e sua inter-relação.

A ampla disseminação dos resultados do projeto, para além do conhecimento gerado, terá como meta o aumento da consciência da sociedade para este problema, assim como a formação e transmissão do conhecimento para estudantes das diferentes áreas do saber para um problema atual e concreto do Sistema Nacional de Saúde.

Desenvolvimento dos trabalhos

Relativamente à atividade 2, por dificuldades de encontrar dados imagiológicos dentro do consórcio, foram encetados esforços no sentido de encontrar parceiros disponíveis para cedência desses dados. Esse passo, revelou-se essencial, tendo atrasado um pouco o avançar dos trabalhos nesta tarefa. De qualquer forma, os trabalhos avançaram junto de alunos da licenciatura em Desporto e Bem-Estar do Politécnico de Leiria, e de alunos de Desporto do Politécnico de Santarém, que foram desafiados a mensurar e caracterizar as forças mecânicas envolvidas nas articulações humanas. Do trabalho conjunto de alunos e docentes, resultou uma base de dados tendo em consideração as cargas mecânicas e anatómicas (Figura 2), estando presentemente a decorrer os ensaios de simulação.

ANÁLISE DAS CARGAS MECÂNICAS E COMPRIMENTOS DE SEGMENTOS			
DADOS INICIAIS			
SEXO	IDADE	MASSA	ALTURA
Masculino	19-30	91,0 Kg	190,0 cm
25			
COMPRIMENTO E MASSA DOS SEGMENTOS APENAS PARA SEXO MASCULINO			
	Comprimento		
Coxa	45,6 cm	Coxa	Massa Muscular
Perna	47,6 cm	Perna	6,9 Kg
Pé	26,0 cm	Pé	1,3 Kg
			1,2 Kg
			0,6 Kg
	Dempster & Gaughran (1967)		Dempster & Gaughran (1967)
CARGAS MECÂNICAS			
	Cargas Mecânicas		
Anca	567,764 N	Joelho	396,720 N
Joelho x 2	793,441 N	Tornozelo	434,571 N
Tornozelo x 2	869,142 N		
	Durkin & Downing (2003)		Durkin & Downing (2003)

Figura 2. Print screen da base de dados para análise e caracterização das cargas mecânicas.

A atividade 3 visa a conceção, o desenvolvimento e a construção de um sistema de micro-co-extrusão com dois reservatórios independentes e dois



fusos coaxiais. Este sistema permite uma maior flexibilidade na combinação de materiais e uma maior precisão em relação ao diâmetro dos filamentos, interno e externo produzidos (dado tratar-se de um sistema de co-extrusão). Esta tarefa foi iniciada com o envolvimento dos estudantes da licenciatura e de mestrado em Engenharia Mecânica do Politécnico de Coimbra para o design do sistema. Estes estudantes foram coadjuvados por estudantes da licenciatura em Biomecânica do Politécnico de Leiria na obtenção dos modelos numéricos representativos dos sistemas de co-extrusão com o propósito de simular/avaliar o seu comportamento mecânico em serviço. Selecionou-se o modelo que apresentou um comportamento mecânico superior, assim como uma razoável exequibilidade financeira, e avançou-se para a sua execução. Dada a dimensão e complexidade geométrica que caracteriza os diversos componentes do sistema de micro co-extrusão (Figura 3) verificaram-se diversos atrasos, quer na maquinação, quer na FA dos componentes.



Figura 3. Desenvolvimento dos componentes para a montagem da micro-co-extrusora.

Quanto à atividade 4, integrou a colaboração de estudantes da licenciatura em Bioengenharia do Politécnico de Coimbra, do mestrado em Química da Universidade de Coimbra, bolsiros do Centro de Desenvolvimento Rápido e Sustentado de Produto (CDRSP) e bolsiros do Politécnico de Coimbra. Têm trabalhado arduamente na otimização de biomateriais e bioprocessos.

Vários têm sido os biomateriais utilizados e bastante promissores os resultados obtidos na produção de *scaffolds* (e.g. PEO). É de destacar o trabalho que tem vindo a ser desenvolvido com a celulose recuperada a partir de fontes renováveis (como se apresentará no capítulo seguinte), por ter demonstrado ótimas propriedades biológicas e mecânicas. Foi considerado de elevado interesse explorar e caraterizar a celulose oriunda de diferentes fontes vegetais, e.g. carolo e casca de espiga de milho, casca de vagem da fava, cascas de romã, engaço de uvas, e ainda celulose bacteriana. Com a utilização da celulose pretende-se melhorar as propriedades biológicas, bem como induzir um comportamento de resposta a estímulos em *scaffolds* produzidas por extrusão. Adicionalmente, com a inclusão de diferentes concentrações de poli(glicerol-sebacato) (PGS), conseguiu-se induzir um comportamento elástico às *scaffolds* tridimensionais de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 4).

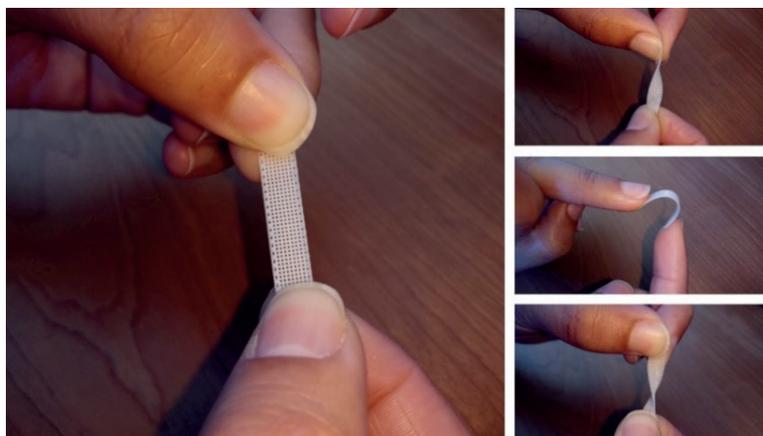


Figura 4. Produção de *scaffolds* tridimensionais com poli(glicerol-sebacato) (PGS) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL).

Para a atividade 5 foi criado um programa de exercícios baseado nas condições induzidas pela osteoartrose. Começou-se por se identificar as estratégias de atuação por parte dos profissionais de saúde na avaliação e prescrição do exercício físico, na avaliação dos efeitos do exercício físico na população idosa e no desenvolvimento de uma nova abordagem para atingir a população idosa em relação aos seus hábitos de atividade física. Estudantes de Desporto do Politécnico de Santarém, com o apoio da equipa de investigação, elaboraram 2 programas de exercício físico: i) um para meio terrestre e ii) um para

meio aquático. Esses programas foram discutidos com clínicos e especialistas em populações especiais, estando a decorrer o delineamento das condições necessárias para a sua aplicação em amostras representativas de pacientes com osteoartrose (atividade 6). Diferentes tipos de exercício serão testados para avaliar os resultados individuais e tornar uma solução personalizada adequada. Adicionalmente, já foram iniciados os trabalhos de desenvolvimento da aplicação móvel - ARTROMOVE- (Figura 5).



Figura 5. Ilustração da aplicação móvel <ARTROMOVE>.

Conclusão

O 2Bio4Cartilage pretendeu, com base em necessidades reais e concretas da sociedade contemporânea, promover uma estreita relação entre a investigação e o processo ensino-aprendizagem nos estudantes que integraram e contribuíram para o desenvolvimento e materialização deste projeto. Estes estudantes experienciaram a forma como os diferentes conteúdos abordados nas diversas unidades curriculares que compõe o plano de estudos dos seus cursos podem ser extrapolados para uma aplicação prática. Adicionalmente, os estudantes foram estimulados a partilhar o conhecimento adquirido e desenvolvido consubstanciado em trabalhos académicos sob a forma de dissertações e publicações. A título de exemplo, foi produzida a tese de mestrado intitulada “Desenvolvimento de um Sistema de Co-extrusão de Precisão”, no âmbito do mestrado em Engenharia Mecânica, e o relatório de estágio curricular para obtenção do grau de licenciado em Engenharia Biomédica intitulado “Desen-

volvimento de Implantes Temporários Biodegradáveis para Regeneração da Cartilagem”. No que concerne à publicação e divulgação de trabalhos científicos que integraram estudantes listam-se infra alguns exemplos:

- Morouço P, Amado S, Santos-Rocha R, Branco M, Pina C, Malça C, Seabra I (2018) 2Bio4Cartilage: prevenção e tratamento aliados contra a osteoartrite, In: *Proceedings* do 3º Congresso de Envelhecimento Ativo: Exercício Físico e Saúde, 8-9 de março, Viseu, Portugal;
- Reis D, Biscaia S, Malça C, Veloso A, Morouço P (2018) Poly (glycerol sebacate)/ Poly (ϵ -caprolactone) controlled architecture scaffolds for cartilage repair, In: *Proceedings of the 14th World Congress of the International Cartilage Repair Society (ICRS2018)*, 9-12 April, Macau, DOI:10.13140/RG.2.2.34841.31840;
- Tomás E, Moura C, Morouço P, Malça C (2018) Desenvolvimento de implantes temporários biodegradáveis para regeneração da cartilagem, In: *Proceedings* das Jornadas de Biomédica, 2 de maio, Coimbra, Portugal;
- Dias P, Mesquita C, Henriques M, Galhano C, Veloso A, Malça C, Morouço P, Seabra I.J. (2018) Extraction of cellulose microfibrils from corncob waste for innovative biomedical applications, In: *Proceedings of the 5th International ISEKI_Food Conference*, 3-5 July, Stuttgart, Germany;
- Biscaia S, Branco M, Viana T, Franco M, Moura C, Malça C, Morouço P (2018) Reinforcing extruded-based poly(ϵ -caprolactone) scaffolds with cellulose nanofibers, In: *Proceedings of the 8th World Congress of Biomechanics*, P4319, 8-12 July, Dublin, Ireland.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do projeto 2Bio4Cartilage suportado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE2020, sob o programa Portugal2020, com o código de apoio (POCI-01-0145-FEDER-023423).



Referências

- Arvidson, K., Abdallah, B. M., Applegate, L. A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., ... Finne-Wistrand, A. (2011). Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x>
- Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(5), 1451–1457.
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 87, 77–95. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025>
- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., & Quarto, R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 22(1), 81–91.
- Chiang, H., & Jiang, C.-C. (2009). Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108(2), 87–101.
- Deshpande, B. R., Katz, J. N., Solomon, D. H., Yelin, E. H., Hunter, D. J., Messier, S. P., ... Losina, E. (2016). Number of persons with symptomatic knee osteoarthritis in the US: impact of race and ethnicity, age, sex, and obesity. *Arthritis Care & Research*, 68(12), 1743–1750.
- Di Bella, C., Duchi, S., O'Connell, C. D., Blanchard, R., Augustine, C., Yue, Z., ... Onofrillo, C. (2018). In situ handheld three-dimensional bioprinting for cartilage regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(3), 611–621.
- Gao, B., Yang, Q., Zhao, X., Jin, G., Ma, Y., & Xu, F. (2016). 4D bioprinting for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 34(9), 746–756. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.004>
- Hedayati, R., Ahmadi, S. M., Lietaert, K., Pouran, B., Li, Y., Weinans, H., ... Zadpoor, A. A. (2018). Isolated and modulated effects of topology and material type on the mechanical properties of additively manufactured porous biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.

Hunter, D. J., Schofield, D., & Callander, E. (2014). The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(7), 437–441.

Hutmacher, D. W. (2006). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* (pp. 175–189). Elsevier.

Jeffrey, D. R., & Watt, I. (2003). Imaging hyaline cartilage. *The British Journal of Radiology*, 76(911), 777–787. <https://doi.org/10.1259/bjr/51504520>

Kelly, D. J., & Prendergast, P. J. (2006). Prediction of the optimal mechanical properties for a scaffold used in osteochondral defect repair. *Tissue Engineering*, 12(9), 2509–2519. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.ft-202>

Kock, L., van Donkelaar, C. C., & Ito, K. (2012). Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 613–627.

Li, Y.-C., Zhang, Y. S., Akpek, A., Shin, S. R., & Khademhosseini, A. (2016). 4D bioprinting: the next-generation technology for biofabrication enabled by stimuli-responsive materials. *Biofabrication*, 9(1), 12001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/9/1/012001>

Liu, X., Wu, S., Yeung, K. W. K., Chan, Y. L., Hu, T., Xu, Z., Chu, P. K. (2011). Relationship between osseointegration and superelastic biomechanics in porous NiTi scaffolds. *Biomaterials*, 32(2), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.102>

Lohmander, L. S. (2013). Knee replacement for osteoarthritis: facts, hopes, and fears. *Medicographia*, 35, 181–188.

Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, 25(36), 5011–5028.

Malda, J., Woodfield, T. B. F., Van Der Vloodt, F., Wilson, C., Martens, D. E., Tramper, J., Riesle, J. (2005). The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials*, 26(1), 63–72.

Mind, P. L., & Lewis, J. L. (1994). Elastic modulus of calcified cartilage is an order of magnitude less than that of subchondral bone. *Journal of Orthopaedic*

Research. <https://doi.org/10.1002/jor.1100120506>

Mouser, V. H. M., Levato, R., Bonassar, L. J., D'Lima, D. D., Grande, D. A., Klein, T. J., ... Malda, J. (2017). Three-Dimensional Bioprinting and Its Potential in the Field of Articular Cartilage Regeneration. *Cartilage*. <https://doi.org/10.1177/1947603516665445>

Murphy, L., Schwartz, T. A., Helmick, C. G., Renner, J. B., Tudor, G., Koch, G., ... Jordan, J. M. (2008). Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Care & Research*, 59(9), 1207–1213.

Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P., & Meenen, N. M. (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 235–245.

Sargeant, T. D., Desai, A. P., Banerjee, S., Agawu, A., & Stopek, J. B. (2012). An in situ forming collagen–PEG hydrogel for tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8(1), 124–132.

Shin, H., Olsen, B. D., & Khademhosseini, A. (2012). The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials*, 33(11), 3143–3152.

Söntjens, S. H. M., Nettles, D. L., Carnahan, M. A., Setton, L. A., & Grinstaff, M. W. (2006). Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules*, 7(1), 310–316.

Stoop, R. (2008). Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury*, 39(1 SUPPL.), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.08.035>

Toh, W. S., Spector, M., Lee, E. H., & Cao, T. (2011). Biomaterial-mediated delivery of microenvironmental cues for repair and regeneration of articular cartilage. *Molecular Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1021/mp100437a>

Visser, J., Melchels, F. P. W., Jeon, J. E., Van Bussel, E. M., Kimpton, L. S., Byrne, H. M., ... Malda, J. (2015). Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils. *Nature Communications*, 6, 6933.

Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., ... Aboyans, V. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2163–2196.

Williams, A., Kamper, S. J., Wiggers, J. H., O'Brien, K. M., Lee, H., Wolfenden, L., ... Hartvigsen, J. (2018). Musculoskeletal conditions may increase the risk of chronic disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *BMC Medicine*, 16(1), 167.

Williams, R. J., & Brophy, R. H. (2007). Decision making in cartilage repair procedures. In *Cartilage Repair Strategies* (pp. 37–53). Springer.

Williams, R. J., & Niederauer, G. G. (2007). Articular cartilage resurfacing using synthetic resorbable scaffolds. In *Cartilage repair strategies* (pp. 115–135). Springer.

Yang, P. J., & Temenoff, J. S. (2009). Engineering Orthopedic Tissue Interfaces. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(2), 127–141. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0371>

Zadpoor, A. A., & Malda, J. (2017). Additive Manufacturing of Biomaterials, Tissues, and Organs. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1719-y>



8. Extração de fibras de celulose a partir de resíduos agroindustriais e sua caracterização para aplicações na área da saúde

Rachel Cordeiro, Mariana Vallejo, Marta Henriques, Filipe Antunes, Carla Moura, Cândida Malça, Pedro Morouço, Ana Veloso, Cristina Galhano, Inês Seabra

EXTRAÇÃO DE FIBRAS DE CELULOSE A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SUA CARACTERIZAÇÃO PARA APLICAÇÕES NA ÁREA DA SAÚDE

Rachel Cordeiro, Mariana Vallejo, Marta Henriques, Filipe Antunes, Carla Moura, Cândida Malça, Pedro Morouço, Ana Veloso, Cristina Galhano, Inês Seabra

O uso de polímeros naturais biodegradáveis tem sido considerado, nos últimos anos, uma alternativa muito promissora ao uso de polímeros não renováveis. Os biopolímeros permitem reduzir significativamente a pegada de carbono e a poluição causada pelos polímeros sintéticos (comumente designados de plásticos) e, conseqüentemente, conduzir a um aumento na sustentabilidade ambiental e ecológica do planeta. Outra grande vantagem associada aos polímeros de origem natural é a sua biocompatibilidade, uma vez que não causam danos ou rejeição no sistema em que irão ser introduzidos. Esta característica reduz o risco de surgirem efeitos adversos após a sua aplicação, já que na sua composição têm, geralmente, carboidratos monoméricos interligados por ligações glicosídicas e que são facilmente aceites e processados pelo corpo humano. Além de fazerem parte da nossa dieta, muitos polímeros naturais são aplicados em várias indústrias, como é o caso da farmacêutica e da biomédica. Estes polímeros podem incluir polissacarídeos, proteínas e poliésteres que variam consoante a sua origem animal, vegetal ou microbiana.

A celulose, considerada o biopolímero natural mais abundante no nosso planeta, tem sido usada ao longo dos anos na indústria alimentar, do papel, têxtil e farmacêutica, entre outras, em virtude de ter reconhecidas várias características químico-físicas atraentes para estas aplicações, como por exemplo ser um excelente adsorvente de metais, corantes e pesticidas. Há vários anos que o uso de fibras de celulose, como reforço de matrizes poliméricas, está estabelecido como uma forma de incrementar as propriedades mecânicas destes materiais (Ramamoorthy, Skrifvars, & Persson, 2015; Gupta, Carrott, Singh, Chaudhary & Kushwaha, 2016). No entanto, as suas propriedades químicas



e físicas, assim como a sua natureza biocompatível e biodegradável, fazem com que a celulose tenha sido, mais recentemente, utilizada em matrizes, com o objetivo de potenciar a regeneração de tecidos. Este polímero encontra-se maioritariamente na madeira, sendo dos mais explorados pela indústria da pasta de papel. Contudo, o aumento da procura pela celulose tem causado efeitos devastadores nos ecossistemas, uma vez que a sua obtenção passa pela desflorestação massiva. Dados do Instituto Nacional de Estatística revelam que, em Portugal, a área de matas e florestas diminuiu de 1.008.374ha para 837.067 ha entre 1999 e 2016 (INE, 2018). Apesar da inércia por parte das comunidades científica e industrial relativamente à preocupação com a conservação dos ecossistemas, têm vindo a ser dados alguns passos no sentido de incentivar a procura de fontes renováveis de celulose, nomeadamente numa perspectiva de economia circular e de valorização de resíduos e subprodutos de outras atividades. Neste contexto, outros materiais lignocelulósicos, para além da madeira, têm sido considerados como potenciais fontes de substâncias com aplicações diversas. Tais materiais são compostos por celulose, hemicelulose e lenhina, constituindo uma opção viável para a obtenção de fibras de celulose. A quantidade destes componentes varia com a espécie, a idade e a parte da planta, sendo as propriedades físicas das fibras também afetadas por estas variáveis.

Existem elevadas quantidades de resíduos orgânicos provenientes das indústrias agroalimentares que têm tido uma baixa valorização, sendo a maior parte das vezes utilizados como fontes de energia de baixo valor (Ramamoorthy et al., 2015; Väisänen, Haapala, Lappalainen, & Tomppo, 2016). Estes resíduos, para além de serem uma alternativa viável devido à sua abundância, são também uma opção sustentável. Outra particularidade é o facto de apresentarem baixas percentagens de lenhina, o que resulta em processos de deslignificação mais fáceis, rápidos e menos agressivos para o meio ambiente, quando comparados com os processos de remoção de lenhina convencionais aplicados à madeira. Além disso, representam adicionalmente um menor consumo de energia.

Os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos sobre extração de celulose a partir de resíduos agroalimentares focam-se essencialmente na preparação e caracterização da nanocelulose (García et al., 2016). A investigação científica nesta área tem vindo a debruçar-se, maioritariamente, na aplicação desta celulose para reforço de materiais compósitos em especial para aplicações bio-

médicas, incluindo a produção de *scaffolds*, fármacos, hidrogéis, entre outros, o que representa uma mudança bastante benéfica na contribuição da celulose para a indústria em geral (Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005).

Este capítulo pretende descrever a investigação desenvolvida no âmbito: i) da extração de fibras de celulose a partir de casca da vagem de fava, bagaço de medronho, casca de romã, engaço de uva, carolo e folha da espiga de milho, ii) da sua caracterização e iii) das suas potenciais aplicações biomédicas. O trabalho fez parte de uma tese de Mestrado em Química da Universidade de Coimbra (UC), que se enquadra num dos objetivos do projeto “2Bio4Cartilage”, com o suporte da equipa de investigação do Instituto Politécnico de Leiria (IPLeiria) e da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra (ESAC). Adicionalmente, é propósito deste capítulo demonstrar que a investigação realizada por estudantes no decorrer do seu percurso académico é, sem dúvida, uma mais-valia pessoal para a aquisição de competências técnicas, científicas e profissionais, mas também uma contribuição muito efetiva para o avanço da ciência aplicada às necessidades da sociedade atual.

Seleção dos resíduos industriais lignocelulósicos

A seleção dos resíduos industriais usados neste trabalho, assim como a definição e aplicação de todas as etapas de extração por solventes aos vários materiais vegetais, constituíram a primeira parte do trabalho experimental desenvolvido. Estas tarefas foram realizadas nas instalações da ESAC.

Foram seis os resíduos agroindustriais selecionados. Os critérios determinantes na sua seleção foram, essencialmente, a sua disponibilidade no território nacional, os volumes gerados e a sua composição em celulose.

O resíduo proveniente da produção de fava congelada foi o primeiro a ser avaliado. Esta leguminosa de grão é utilizada mundialmente por ser uma fonte bastante económica de proteínas. A cultura desta espécie em Portugal é significativa, atingindo, em 2016, uma produção de cerca de 3000 toneladas e cujo processo de descasque gerou aproximadamente 434 toneladas de casca (INE, 2018). Atualmente, este subproduto é classificado como resíduo, e tem sido aplicado na alimentação animal ou como fertilizante por pequenos agricultores. Vários estudos reportam a extração e a caracterização de compostos bioativos a partir deste resíduo com resultados muito promissores em relação à atividade nematicida (Cordeiro, 2016; Rocha, 2018). Adicionalmente, cons-



titui também uma fonte alternativa de fibras de celulose.

O medronheiro é uma espécie nativa da região do mediterrâneo e pode ser encontrado em Portugal um pouco por todo o território. Várias partes do medronheiro, particularmente os frutos e as folhas, têm tradicionalmente sido utilizadas para fins medicinais. Além disso, o medronho é largamente usado em fermentações alcoólicas na produção de bebidas, como é o caso da aguardente e dos licores, mas também para produção de produtos alimentares, como compotas e geleias. Existe um crescente interesse em otimizar a variedade e a qualidade das aplicações do medronho na indústria de alimentos e bebidas. Por essa razão, tem havido um aumento da disponibilidade de subprodutos que poderão ser potencialmente valiosos para a purificação de celulose, em particular o bagaço que resulta do fruto após a etapa de maceração, extração da polpa ou da fermentação e destilação.

A romã é um fruto fundamentalmente produzido nas regiões mais quentes do planeta, *e.g.* a Índia, Espanha, Israel e Estados Unidos (Califórnia). No entanto, as condições edafoclimáticas em Portugal, nomeadamente na região do Alentejo apresentam grande potencialidade para esta cultura. O interesse na exploração deste fruto tem vindo a aumentar em Portugal, facto que se materializou na importação de mais de 9000 árvores em 2016. De entre os resíduos que resultam da produção de sumo de romã, as membranas internas que separam os gomos do fruto são consideradas subprodutos valiosos, devido à presença de compostos antioxidantes e antimicrobianos (Hasnaoui, Wathelet, & Jiménez-Araujo, 2014; Mujtaba, Kaya, Bulut, & Akyüz, 2016). Porém, a casca do fruto, que foi recentemente sugerida como possível fonte de celulose (Mujtaba et al., 2016), não tem recebido tanta atenção.

A indústria vitivinícola foi igualmente considerada como uma possível fonte de resíduos, dado tratar-se de um setor económico com notória expressão nacional e com uma produção anual de aproximadamente seis milhões de hectolitros de vinho (IVV, 2019). O engaço da uva é um dos subprodutos resultantes da produção de vinho, alcançando a nível nacional um volume anual estimado em 23,4 mil toneladas (Prozil et al., 2012). Atualmente, este resíduo é apenas usado como fertilizante, constituindo, todavia, uma fonte de celulose alternativa altamente viável e com imenso potencial.

Por último, o carolo de milho e a folha da espiga de milho foram dois dos resíduos estudados, por serem considerados fontes interessantes de fibras de

celulose. A produção de milho em Portugal atingiu, em 2016, 710,6 mil toneladas gerando 127,9 mil toneladas de carolo de milho e 119,4 mil toneladas de folhas de espiga de milho (INE, 2018). Das aplicações conhecidas para o carolo de milho destacam-se a produção de ração animal e a produção de fertilizantes, enquanto a folha de espiga de milho é, maioritariamente, descartada, queimada ou aplicada na produção de ração animal (Kampeerappun, 2015).

Após a escolha e preparação dos resíduos, nomeadamente por processos de secagem e trituração, foi necessário definir e otimizar um processo comum de purificação de celulose que fosse aplicado a todos eles. Uma vez que os resíduos não são apenas compostos por celulose, o processo aplicado baseou-se numa sequência de extrações por solvente, de forma a remover seletivamente os diferentes constituintes adicionais, tais como ceras, gorduras, lenhina e hemicelulose.

Purificação da celulose

Às várias amostras foram aplicados processos de secagem, em estufa ou em secador com convecção forçada de ar, seguidos de redução de tamanho num moinho com diferentes crivos.

O processo otimizado de purificação de fibras de celulose apresentado na Figura 1 resultou da consulta de vários protocolos desenvolvidos e aplicados por diferentes autores a matérias lignocelulósicas semelhantes às usadas neste trabalho (Morán, Alvarez, Cyras, & Vázquez, 2008; Maheswari, Reddy, Muzenda, Guduri & Rajulu, 2012). Com o objetivo de obter fibras de celulose na sua forma mais pura foi efetuada uma extração sequencial usando solventes distintos de modo a remover os diferentes componentes das matérias-primas.

O primeiro passo da extração (etapa I) envolveu a remoção de ceras, resinas e outros compostos lipofílicos existentes nos resíduos usando um extrator Soxhlet e tolueno ou etanol como solventes. Este passo revelou ser o mais acessível e fácil de executar de todo o processo de extração, pois não necessitou de monitorização nem de vigilância muito apertadas. De seguida, foi necessário remover a lenhina aplicando um tratamento denominado por branqueamento (etapa II). Neste caso, foi utilizada uma mistura tampão de ácido acético com clorito de sódio que permitiu obter um produto final rico em



celulose e hemiceluloses. O branqueamento é um processo bastante delicado e trabalhoso, uma vez que é necessária uma vigilância contínua durante as 4 horas em que decorre. É fundamental a monitorização permanente no que diz respeito à temperatura, para evitar que as espumas que resultam da presença dos cloritos subam repentinamente pela coluna de refrigeração causando problemas processuais.

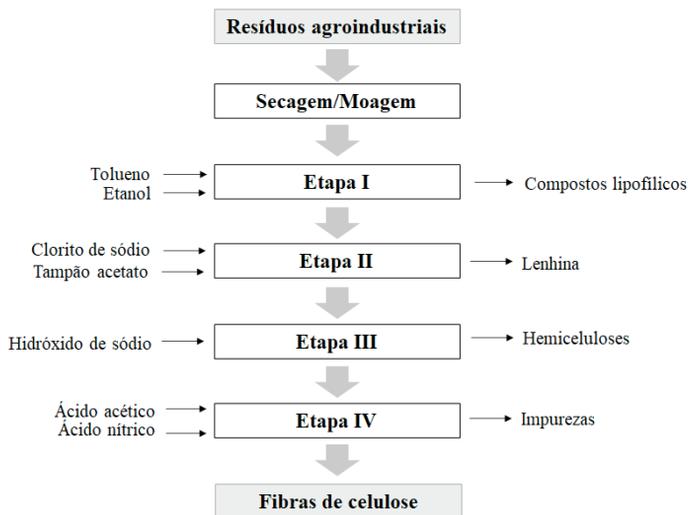


Figura 1. Representação esquemática da sequência das etapas de extração aplicadas a diversos resíduos agroindustriais com o objetivo de obter fibras de celulose purificada.

Posteriormente, foi necessário fazer a remoção das hemiceluloses das amostras, através da aplicação de um tratamento alcalino (etapa III), utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio altamente concentrada. Apesar da sua fácil execução, esta etapa necessitou de otimização com a lavagem da amostra utilizando água. Por último, as fibras de celulose obtidas foram purificadas por tratamento ácido (etapa IV), usando uma solução de ácido acético e ácido nítrico. Apesar deste passo não ter revelado qualquer complexidade, a fase final de filtração para a separação das fibras de celulose foi difícil, devido à consistência pastosa da amostra o que dificultou a sua remoção e separação do papel de filtro.

Após a conclusão da purificação das fibras de celulose, procedeu-se à quantificação do rendimento do processo para os vários resíduos estudados. Estes

resultados estão sumariados na Tabela 1. É importante salientar que o rendimento global do processo é influenciado pela eficiência das diversas etapas de extração que, por sua vez, depende de vários fatores, nomeadamente: (i) a remoção completa da lenhina na etapa de branqueamento, que é difícil de obter; (ii) em cada etapa de extração pode acontecer a remoção de componentes não previstos; (iii) as filtrações efetuadas entre as diversas etapas de extração constituíram uma fonte significativa de perdas de material que representaram entre 2-4% da massa total.

Da análise da Tabela 1 pode verificar-se que o carolo de milho foi o resíduo que apresentou um maior rendimento em celulose (25,5%), seguido pelo engaço da uva (14,4%) e pela folha de espiga de milho (13,8%). Logo, por análise destes resultados e numa perspetiva de maximização dos rendimentos e da valorização dos recursos, pode concluir-se que o resíduo mais promissor será o carolo de milho. Este resíduo apresenta, efetivamente, um potencial acrescido o que o converte num resíduo de eleição para estudos futuros relacionados com a extração e aplicação da celulose obtida.

Tabela 1. Rendimento de extração/purificação da celulose de diferentes resíduos agroindustriais (n=3, réplicas independentes).

Resíduo agroindustrial	Rendimento (%)
Vagem de fava	12,80 ± 2,44
Bagaço de medronho	11,39 ± 1,60
Casca de romã	4,85 ± 0,82
Engaço de uva	14,43 ± 0,42
Folha de espiga de milho	13,75 ± 1,46
Carolo de milho	25,47 ± 1,24

Caracterização da celulose

Como referido anteriormente, o objetivo final da purificação da celulose é o uso deste biopolímero na área biomédica, sendo por isso necessário perceber se a celulose extraída, a partir das várias fontes, apresenta as propriedades desejáveis para o efeito. Após a purificação da celulose foi feita a sua caracterização química e física para aferir o seu grau de pureza e propriedades



térmicas. Assim, a celulose das várias proveniências foi estudada por análise termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis* - TGA) e por calorimetria diferencial de varrimento (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC), de modo a perceber a resposta das amostras ao aumento controlado da temperatura. A Tabela 2 resume os resultados obtidos por TGA/DSC. Pode concluir-se que todas as amostras perderam cerca de 5% do seu peso inicial até aos 100 °C, sendo tais perdas atribuídas à evaporação da humidade residual das amostras. Os termogramas revelaram picos de degradação entre os 330 °C e os 340 °C, aproximadamente, como seria expectável para amostras compostas maioritariamente por celulose. Não é no entanto evidente que a leninha ou hemi-celuloses não estejam presentes em quantidades residuais. A vagem de fava e a folha de espiga de milho foram os resíduos que apresentaram uma temperatura de degradação mais elevada e muito semelhante entre si (Yang, Yan, Chen, Lee, & Zheng, 2007; Maheswari, Reddy, Muzenda, Guduri, & Rajulu, 2012; Mendes, Adnet, Leite, Furtado, & Sousa, 2015). O pico de degradação da celulose do bagaço de medronho é o mais baixo de todas as celuloses analisadas, 329,62 °C, o que pode indicar uma estrutura menos coesa, um menor número de ligações químicas e/ou ligações de natureza mais fraca.

Tabela 2. Resultados obtidos do *Thermogravimetric Analysis/ Differential Scanning Calorimetry* - (TGA/DSC) para a celulose extraída de diferentes resíduos agroindustriais (n=3).

Resíduo agroindustrial	Perda H ₂ O (%)	Temperatura de degradação (°C)	ΔEntalpia de degradação (J/g)
Vagem de fava	4,95 ± 0,11	339,65 ± 0,73	306,04 ± 8,38
Bagaço de medronho	4,69 ± 0,17	329,62 ± 0,09	254,60 ± 9,13
Casca de romã	4,11 ± 0,24	333,65 ± 0,32	89,75 ± 2,45
Engaço de uva	5,29 ± 0,37	330,79 ± 0,74	125,47 ± 5,94
Folha de espiga de milho	4,98 ± 0,19	339,40 ± 0,43	259,66 ± 8,88
Carolo de milho	5,19 ± 0,29	330,31 ± 0,19	166,55 ± 4,36

A celulose que necessitou de menor energia para a sua degradação foi a da casca de romã (89,75 J/g), o que provavelmente poderá estar relacionado com a existência de polímeros com cadeias mais curtas e, por conseguinte, ser necessária menor entalpia de degradação. Contrariamente, a casca de fava foi a matéria-prima cuja celulose necessitou de maior energia de degradação, cerca de 306,04 J/g, o que complementa a observação da temperatura de degradação ser das mais elevadas. O carolo de milho e o engaço de uva apresentaram valores de entalpia muito próximos, assim como a folha de espiga de milho e o bagaço de medronho. Estas semelhanças podem indicar uma estrutura análoga da celulose proveniente destes resíduos agroindustriais, devendo, como tal, ser exploradas com mais detalhe, futuramente, através de outras técnicas de análise.

As amostras foram igualmente analisadas por espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) o que permitiu confirmar a existência de celulose, através da deteção de bandas típicas deste polímero para o intervalo de comprimentos de onda dos 500 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} , conforme pode ser observado na Figura 2. Em todos os espectros foram detetadas bandas que indicam a presença de lenhina, que são visíveis a 1610 - 1595 cm^{-1} e a 1510 cm^{-1} (Colom, Carrillo, Nogués, & Garriga, 2003). Além disso, é visível uma banda a 1730 cm^{-1} (A) em todas as amostras, com exceção do carolo de milho, o que é indicativo, nestes casos, da presença de hemicelulose. As bandas (B) observadas a 1426 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} , 1158-1162 cm^{-1} e 898 cm^{-1} são características da celulose e estão presentes em todas as amostras analisadas.

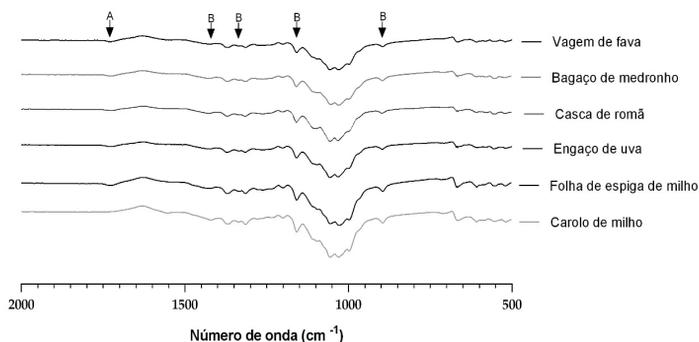


Figura 2. Espectro da celulose de várias proveniências obtido por espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR): A - Banda característica da hemicelulose; B - Bandas características da celulose.



Em suma, a análise térmica e a caracterização por espectroscopia indicam que a extração foi executada com sucesso e que os processos físico-químicos aplicados aos resíduos agroindustriais foram corretamente otimizados. No entanto, para algumas matérias-primas, a etapa II e III, relativa à deslignificação e tratamento alcalino, necessitam de um reforço para a total remoção da lenhina e hemicelulose. À exceção do carolo de milho, as matérias-primas utilizadas devem apresentar em termos de estrutura molecular um difícil acesso à lenhina e à hemicelulose o que dificulta a sua remoção.

Procedeu-se também à observação microscópica da celulose extraída, por técnicas de análise de imagem num microscópio eletrônico Zeiss Stemi 2000-C, com uma ampliação de 20x. A Figura 3 mostra as imagens obtidas para a celulose dos diferentes resíduos tratados. É possível verificar uma diferença significativa na cor, forma e distribuição de tamanhos das partículas /agregados que constituem as diferentes amostras. Pode por isso inferir-se que, em função do tipo da matriz do resíduo industrial de partida, a forma e o grau de pureza da celulose variam.

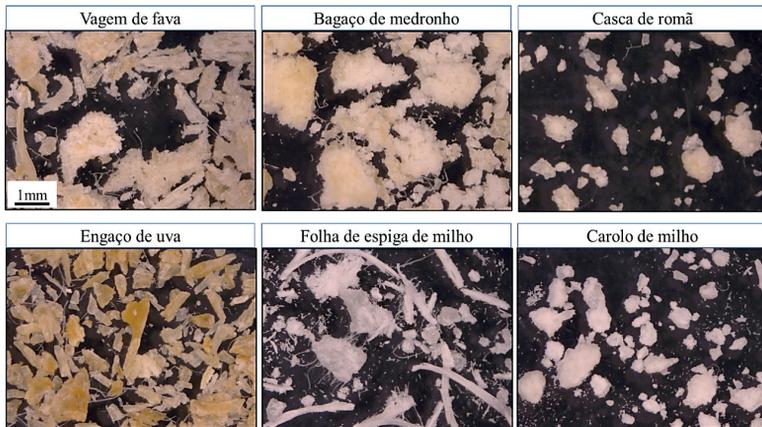


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia ótica para a celulose de várias proveniências (ampliação 20x).

Relativamente à forma, foi possível verificar uma maior diversidade na celulose da folha de espiga de milho, pois apresentou duas morfologias completamente diferentes: i) uma mais alongada e fina e ii) outra mais arredondada, em forma de agregados, muito semelhante às restantes celuloses. Quando comparada com a celulose de carolo de milho, é possível concluir que o tipo

de celulose varia consoante a sua localização na planta, sendo que na folha da espiga apresenta-se mais fibrosa do que no carolo. Outra diferença detetada durante a observação das várias celuloses, está associada à celulose extraída do engaço de uva que exhibe uma textura mais compacta e um aspeto mais vítreo. A celulose do carolo de milho, contrariamente, aos restantes materiais obtidos apresenta um tom mais esbranquiçado e uma textura mais leve e porosa, muito semelhante à celulose industrial extraída da madeira (Figura 4) (Hualian Chemical, 2019). Adicionalmente, a celulose de engaço de uva apresenta um tom amarelado mais acentuado, enquanto que as restantes celuloses apresentam um tom mais claro e esbranquiçado. Alguns autores referem que esta cor é devida à presença de lenhina, que no caso de engaço de uva é difícil de remover. Estas diferenças requerem, no entanto, uma análise mais aprofundada com o propósito de perceber o que efetivamente diferencia a celulose de engaço de uva dos restantes tipos de celulose aqui estudados.



Figura 4. Imagem obtida de celulose extraída industrialmente da madeira (Hualian Chemical, 2019).

Aplicações da celulose

Após a obtenção e caracterização da celulose, foi necessário averiguar se as variações no grau de pureza, bem como as diferenças morfológicas encontradas entre as amostras, resultam em limitações ou mais-valias para a sua aplicação na área da saúde, nomeadamente na obtenção de um substituto da



cartilagem. Neste sentido, a fase seguinte deste trabalho consistiu na utilização da celulose, extraída das várias fontes, na formulação e produção de materiais com propriedades mecânicas e de biocompatibilidade elevadas. O objetivo assentou na produção de *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais (3D) obtidas por fabricação aditiva, do inglês *addictive manufacturing*, AM. Estas estruturas foram produzidas no Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRSP, IPLeiria).

Várias são as técnicas comercialmente disponíveis para a produção de *scaffolds*. Uma dessas técnicas é o *Electrospinning*, amplamente utilizada para produzir materiais fibrosos, onde um polímero disperso numa solução é forçado a passar num capilar através de energia elétrica, formando um jato, que vai ser recolhido em forma de fibras. São muitos os parâmetros envolvidos neste processo, tais como a viscosidade da solução, a condutividade, a humidade, a pressão e o campo elétrico. A grande vantagem desta técnica é a capacidade de produzir uma matriz com uma grande área superficial. Todavia, a elevada flexibilidade das estruturas produzidas configura a sua desvantagem, em particular neste caso cujo propósito é a produção de cartilagem (Ahmed, Lalia, & Hashaikh, 2015; Khorshidi et al., 2016; Soundarya, Menon, Chandran, & Selvamurugan, 2018). Outras formas de produzir *scaffolds* é por recurso a técnicas de fabrico aditivo, *e.g.*, Estereolitografia (*stereolithography*, SLA), Sinterização seletiva a laser (*selective laser sintering*, SLS), Impressão tridimensional (*three-dimensional printing*, 3DP) e Modelação por deposição fundida (*fused deposition modelling*, FDM) (Mota et al., 2015).

A SLA é uma técnica baseada num processo de fotopolimerização. Nesta técnica o objetivo final é a cura de uma resina através da incidência de luz UV ou IV, que só ocorre devido à presença de um foto-iniciador (Manapat, Chen, Ye, & Advincula, 2017; Moura, 2016). A vantagem associada é a possibilidade de encapsular células na matriz (Mota, Puppi, Chiellini, & Chiellini, 2015), contudo, está limitada ao uso de foto-polímeros, a curas excessivas e ainda aos elevados custos dos materiais (Gao et al., 2015).

No caso da SLS, um pó de baixa granulometria é aquecido por um raio laser de forma a fundir os grãos e uni-los. Este processo realiza-se camada a camada, ou seja, após a fusão dos grãos que constituem a base do *scaffold*, é aplicado mais pó para que se formem as camadas seguintes. Neste processo é possível recolher o material que não foi sinterizado e reciclá-lo. No entanto, revela-se

uma técnica bastante morosa (Bikas, Stavropoulos, & Chryssolouris 2016).

A 3DP é uma técnica muito similar ao SLS, assente na deposição de camadas de material em pó. Nesta técnica, a união das partículas é feita através de um agente aglutinante, que vai passando sob estas conferindo-lhe a arquitetura desejada. Após esta etapa é ainda realizada uma cura deste agente aglutinador (Ji et al., 2018). A vantagem desta técnica em relação à SLS é que não necessita de laser podendo ser adicionados materiais bioativos, porém em scaffolds com estruturas complexas a arquitetura não se apresenta bem definida (Brunello et al. 2016).

Por último, a FDM é baseada na extrusão, na qual um termoplástico é aquecido até ao seu ponto de fusão e depositado em forma de filamento (Zhang & Jung, 2018). A construção das matrizes tri-dimensionais também é realizada camada a camada (Richter, Schmülling, Ehrmann, & Finsterbusch, 2016). As estruturas produzidas apresentam propriedades mecânicas elevadas, no entanto o equipamento necessita de otimização, nomeadamente nas temperaturas das resistências, de modo a combinar i) a temperatura de fusão do termoplástico, ii) a temperatura ideal de manipulação e iii) a temperatura de degradação de modo a não ocorrer (Mota et al., 2015). Esta técnica foi a que se revelou mais vantajosa, tendo em conta os polímeros a utilizar e a arquitetura do scaffold que se pretendia produzir.

Discussão e análise do trabalho desenvolvido na óptica da investigação e da formação académica

Uma parte da investigação preconizada no projeto 2Bio4Cartilage, e aqui apresentada, contou com a colaboração de uma estudante do Mestrado em Química, do ramo de Controlo da Qualidade e Ambiente, que desenvolveu a sua dissertação para obtenção do grau de Mestre sobre o tema “Biopolímeros para otimização de *scaffolds* em aplicações biomédicas: extração e caracterização”.

O biopolímero escolhido para o trabalho foi a celulose, uma vez que demonstrou ser o mais promissor para aplicação em *scaffolds*, segundo a literatura consultada. Assim, as atividades laboratoriais iniciaram-se com a purificação e caracterização da celulose de diferentes fontes usando um processo sequencial de extração/purificação com utilização de diferentes solventes.



Antes de se iniciarem as atividades práticas propriamente ditas, decorreu uma fase de trabalho de pesquisa bibliográfica com recurso aos diversos suportes disponíveis (*websites*, livros, artigos científicos e outros), sobre o processo de extração da celulose convencionalmente utilizado na indústria da pasta de papel. Após esta fase, foi feita uma pesquisa sobre os resíduos agroindustriais disponíveis e com potencialidade para se extrair celulose. Apesar de algumas das matérias-primas usadas não estarem referenciadas e descritas convenientemente na literatura como potenciais para extração de celulose, avançou-se com o trabalho de modo a contribuir com novos dados e conhecimento para a comunidade científica sobre esta temática.

Os resultados obtidos para os rendimentos de purificação das diferentes amostras ficaram muito aquém do expectável (nunca ultrapassaram os 30%), uma vez que há referência de rendimentos muito superiores para algumas das fontes utilizadas. Esta foi uma limitação do procedimento adotado. Uma possível explicação para estes resultados será a ocorrência de perdas de material durante a lavagem. Neste sentido, o processo de extração deverá ser otimizado de forma a maximizar a retenção da celulose existente no resíduo. Outra explicação para as diferenças de resultados poderá residir na natureza do resíduo agroindustrial utilizado (espécie vegetal, parte utilizada, a idade, localização geográfica). Contudo, com base na caracterização preliminar do material obtido, foi possível concluir que as extrações/purificações foram bem-sucedidas e que existiam condições para avançar com o trabalho planeado para o projeto.

Seguidamente, toda a fase de caracterização do material obtido foi executada pela estudante, desde a preparação das amostras, até à recolha de resultados, ao seu tratamento e interpretação. Antes de iniciar esta etapa procedeu-se à pesquisa de informação sobre a estrutura química da celulose e sobre as propriedades associadas a este polímero que pudessem contribuir para uma melhor utilização das técnicas de caracterização. Nomeadamente, foi feita uma pesquisa relativamente à temperatura de degradação, parâmetros típicos para identificação da presença de celulose (p. ex. comprimentos de onda que a caracterizam), solventes de dispersão mais apropriados, etc. Com este estudo prévio foi possível interpretar de forma mais expedita os resultados recolhidos das análises térmicas e químicas, tais como as bandas características da celulose, hemiceluloses e lenhina, observáveis no espetro FTIR. A estudante teve a possibilidade de pôr em prática as suas aptidões em laboratório e de aprender

novas técnicas relativamente à obtenção de polímeros naturais através de processos de extração sólido-líquido. Esta experiência permitiu ainda desenvolver autonomia no uso dos equipamentos necessários para as análises a realizar. O maior desafio prendeu-se na discussão dos dados obtidos, pois foi necessária uma pesquisa bibliográfica bastante aprofundada para uma interpretação robusta dos resultados e validação da metodologia aplicada.

Para o projeto 2Bio4Cartilage, a participação da estudante revelou-se uma mais-valia para os seus indicadores e resultados. Por outro lado, a equipa de investigação pôde contar com maior apoio na realização do trabalho prático experimental, obtenção de resultados, compilação e tratamento de informação, o que permitiu um avanço mais significativo da investigação desenvolvida. Apesar das restrições temporais impostas em termos de execução do projeto, assim como no cumprimento dos prazos académicos (entrega e defesa da dissertação), os resultados conseguidos são fundamentais para alavancar o trabalho futuro ainda a desenvolver. Ou seja, a fabricação e aplicação das estruturas tridimensionais (*scaffolds*) reforçadas com celulose na área da saúde não poderia ser atingida sem antes se ter feito a purificação e caracterização deste material.

Há a salientar que, apesar das dificuldades sentidas durante o trabalho, o esforço e dedicação investidos pela estudante culminaram no desenvolvimento de competências científicas e pessoais como a autonomia, a responsabilidade, a criatividade, a autoconfiança, o espírito de iniciativa e o saber trabalhar em equipa com pessoas de diferentes formações académicas.

Considerações finais

Durante o desenvolvimento deste projeto, a estudante pôde abordar vários aspetos práticos relativos ao trabalho de investigação. Não só teve a oportunidade de desenvolver trabalho laboratorial, como também de aperfeiçoar técnicas de pesquisa e de elaboração de documentos científicos. Estas competências são consideradas uma mais-valia para a estudante, uma vez que podem ser aplicadas futuramente em meio académico e em ambiente profissional. O trabalho desenvolvido permitiu a obtenção de resultados com mérito científico e aptos para publicação, o que contribuirá também para o enriquecimento do seu currículo.

Por outro lado, a equipa e as instituições envolvidas no projeto 2Bio4Carti-



lage tiveram a oportunidade de contar com a participação e colaboração da estudante no desenvolvimento de uma vertente de investigação, proporcionando um avanço mais significativo no desenvolvimento das tarefas inerentes ao próprio projeto e na obtenção de resultados com potencial. Adicionalmente, a elaboração e desenvolvimento de documentação científica poderia ter demorado mais sem a sua participação.

Pode concluir-se que esta colaboração correu como planeada, e foi positiva para ambas as partes, resultando em sucesso relativamente à futura publicação de um artigo científico, um capítulo de livro e uma dissertação de mestrado. Tendo isto em conta, o grupo de investigação acredita que colaborações futuras desta natureza podem ser vantajosas quer para as instituições quer para os estudantes.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do projeto 2Bio4Cartilage suportado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE2020, sob o programa Portugal2020, com o código de apoio (POCI-01-0145-FEDER-023423). Agradecemos também ao projeto Lab2factory financiado pelo Sistema de Apoio a Ações Coletivas (SIAC), enquadrado no Aviso de Abertura CENTRO – 46-2016-01 do Programa Operacional Regional do Centro 2014-2020.

Referências

- Ahmed, F. E., Lalia, B. S., & Hashaikeh, R. (2015). A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, 356, 15–30.
- Bikas, H., Stavropoulos, P., & Chryssolouris, G. (2016). Additive manufacturing methods and modelling approaches: a critical review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 83(1–4), 389–405.
- Brunello, G., Sivoilella, S., Meneghello, R., Ferroni, L., Gardin, C., Piattelli, A., ... Bressan, E. (2016). Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 34(5), 740–753.

Colom, X., Carrillo, F., Nogués, F., & Garriga, P. (2003). Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 543–549.

Cordeiro, R. (2016). *Valorização de resíduos de vagem de fava (Vicia faba) e de flor de cardo (Cynara Cardunculus): obtenção de extractos hidroalcoólicos e sua caracterização*. Tese de Licenciatura em Biotecnologia, Escola Superior Agrária de Coimbra - Instituto Politécnico de Coimbra (ESAC-IPC), Portugal.

García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., & Bras, J. (2016). Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 93, 26–38.

Gupta, V. K., Carrott, P. J. M., Singh, R., Chaudhary, M., & Kushwaha, S. (2016). Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresource Technology*, 216, 1066–1076.

Hasnaoui, N., Wathelet, B., & Jiménez-Araujo, A. (2014). Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry*, 1;160:196-203. <http://doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.089>.

Hualian Chemical Co., L. (2019). Wood cellulose fiber - Redispersible polymer powder (RDP)-Products Baoding. Retrieved February 27, 2019, retrieved from <http://www.hualianhg.com/en/product/prosid13.html>

IVV - Instituto da vinha e do Vinho (2019) Evolução da Produção Nacional de Vinho por Região Vitivinícola. Série 2008/2009 a 2018/2019. Consultado em: <https://www.ivv.gov.pt/np4/36/>

INE - Instituto Nacional de Estatística (2018). Estatísticas Agrícolas 2017. Instituto Nacional de Estatística (Ed.). ISBN | 978-989-25-0445-2. Consultado em: <https://www.ine.pt>

Ji, K., Wang, Y., Wei, Q., Zhang, K., Jiang, A., Rao, Y., & Cai, X. (2018). Application of 3D printing technology in bone tissue engineering. *Bio-Design and Manufacturing*, 1(3), 203–210.

Kampeerpappun, P. (2015). Extraction and Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid Hydrolysis from Corn Husk. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 25, 19–26.



- Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J. M., Sharifi, S., & Ramakrishna, S. (2016). A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(9), 715–738.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393.
- Maheswari, C. U., Reddy, K. O., Muzenda, E., Guduri, B. R., & Rajulu, A. V. (2012). Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural residue - Cocos nucifera L. *Biomass and Bioenergy*, 46, 555–563.
- Manapat, J. Z., Chen, Q., Ye, P., & Advincula, R. C. (2017). 3D Parintintim of Polymer Nanocomposites via Stereolithography. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(9), 1600553.
- Mendes, C. A. de C., Adnet, F. A. de O., Leite, M. C. A. M., Furtado, C. R. G., & Sousa, A. M. F. de. (2015). Chemical, physical, mechanical, thermal and morphological characterization of corn husk residue. *Cellulose Chemistry and Technology*, 49(9–10), 727–735.
- Morán, J. I., Alvarez, V. A., Cyras, V. P., & Vázquez, A. (2008). Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose*, 15(1), 149–159.
- Mota, C., Puppi, D., Chiellini, F., & Chiellini, E. (2015). Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(3), 174–190. <https://doi.org/10.1002/term.1635>
- Moura, C. (2016). *Design and fabrication of zonal cartilage constructs*. Tese de Doutorado em Bioengenharia, Instituto Superior Técnico Universidade de Lisboa (IST-UL), Portugal
- Mujtaba, M., Kaya, M., Bulut, E., & Akyüz, B. (2016). Recycling and physicochemical characterization of pomegranate waste peels into a green material (cellulose). In *International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16)* (pp. 448–456). Kilis.
- Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial*

Crops and Products, 35(1), 178–184.

Ramamoorthy, S. K., Skrifvars, M., & Persson, A. (2015). A review of natural fibers used in biocomposites: Plant, animal and regenerated cellulose fibers. *Polymer Reviews*, 55(1), 107–162.

Richter, C., Schmülling, S., Ehrmann, A., & Finsterbusch, K. (2016). FDM printing of 3D forms with embedded fibrous materials. *Design, Manufacturing and Mechatronics: Proceedings of the 2015 International Conference on Design, Manufacturing and Mechatronics (ICDMM2015)*, 961–969.

Rocha, I. (2018). *Extração a partir da parte aérea de cannabis (Cannabis sativa L.), e de folhas e flores de medronheiro (Arbutus unedo L.)*. Tese de Licenciatura em Biotecnologia, Escola Superior Agrária de Coimbra - Instituto Politécnico de Coimbra (ESAC-IPC), Portugal.

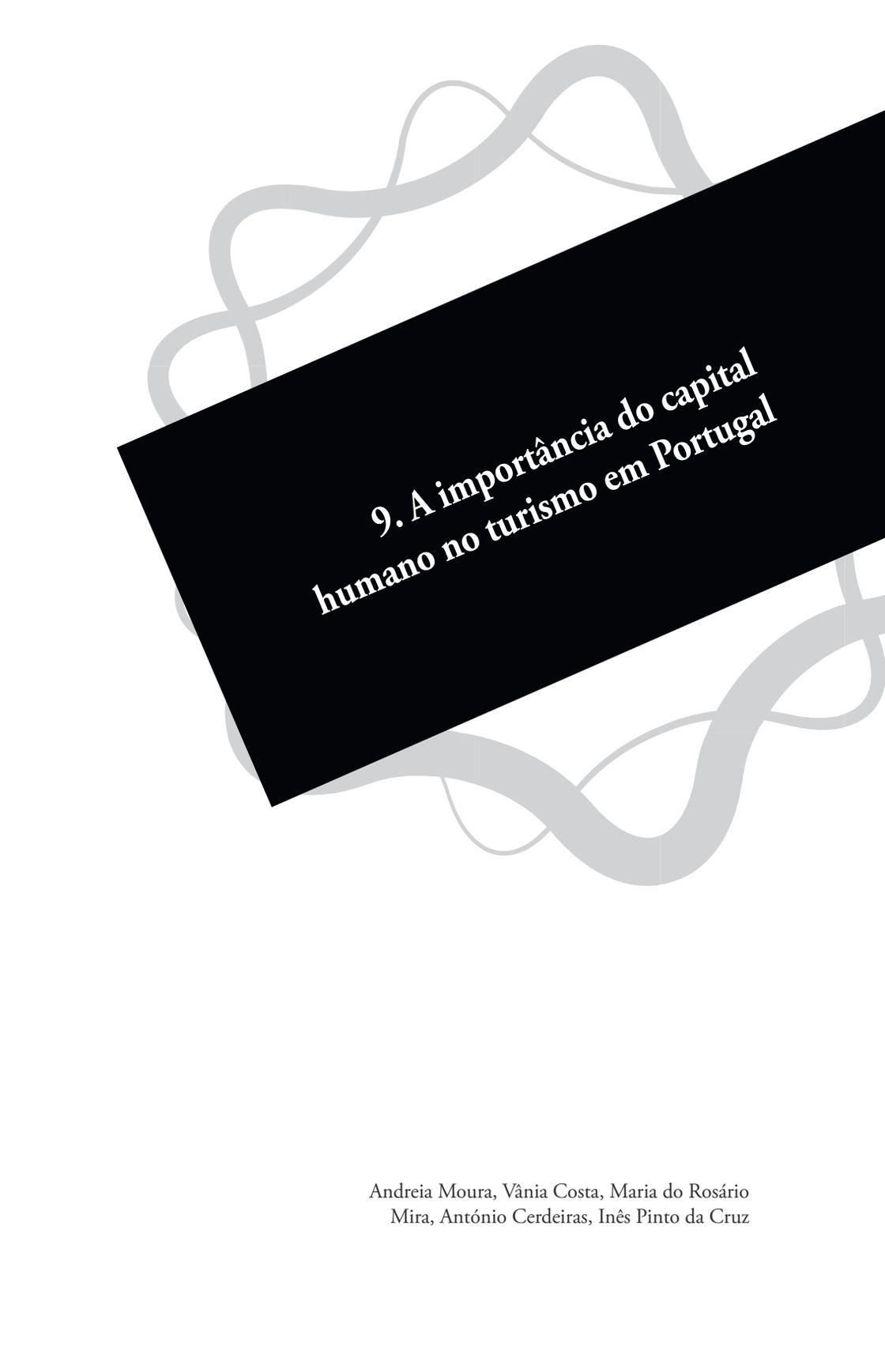
Soundarya, S. P., Menon, A. H., Chandran, S. V., & Selvamurugan, N. (2018). Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1228–1239.

Väisänen, T., Haapala, A., Lappalainen, R., & Tomppo, L. (2016). Utilization of agricultural and forest industry waste and residues in natural fiber-polymer composites: A review. *Waste Management*, 54, 62–73.

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12–13), 1781–1788.

Zhang, J., & Jung, Y.-G. (2018). *Additive Manufacturing: Materials, Processes, Quantifications and Applications*. Butterworth-Heinemann.





9. A importância do capital humano no turismo em Portugal

Andreia Moura, Vânia Costa, Maria do Rosário
Mira, António Cerdeiras, Inês Pinto da Cruz

A IMPORTÂNCIA DO CAPITAL HUMANO NO TURISMO EM PORTUGAL

Andreia Moura, Vânia Costa, Maria do Rosário Mira, António Cerdeiras, Inês Pinto da Cruz

Introdução

O desenvolvimento do turismo tornou imperativa a variedade e multidisciplinaridade na qualificação do capital humano envolvido na comercialização de produtos e na prestação de serviços turísticos. Atualmente vivem-se tempos de mudança, que solicitam a formulação de estratégias inovadoras e qualificadoras em turismo. Torna-se, portanto, imperativo investir e orientar as políticas de formação e qualificação de recursos humanos, para que a indústria turística venha a responder com qualidade às necessidades do mercado, reagindo positivamente às oportunidades e desafios que vão surgindo.

No setor do turismo, há notoriamente um *déficit* ao nível da escolaridade dos recursos humanos, observando-se, essencialmente, um trabalho não qualificado, ainda considerado muito sazonal, o que desvaloriza a atividade, lhe retira profissionalismo e a empobrece. Assim, as instituições de ensino e formação, especialmente aquelas de ensino superior, têm um papel fundamental na identificação e desenvolvimento dos conhecimentos necessários, bem como na moldagem do comportamento dos futuros profissionais de turismo, de modo a que as competências se coadunem com as reivindicações do mercado de trabalho.

Pode dizer-se que, em Portugal, se assistiu, nas últimas décadas, a uma afirmação do turismo enquanto área científica e educativa autónoma. Contudo, o presente sistema educativo carece ainda de oferta curricular adequada às constantes evoluções do mercado e das necessidades da indústria, de modo a garantir mão de obra qualificada que permita dar resposta às suas exigências.

É, portanto, neste âmbito, que surge o projeto de investigação “HCTourism – Perfil e tendências do capital humano no setor do turismo”, com o propósito de interrelacionar mercado empregador e instituições formadoras de futuros profissionais de turismo, em Portugal. No contexto deste projeto, realizou-se



o trabalho aqui apresentado, com base numa aprofundada revisão de literatura e observação participante, através do qual foi possível estudar a importância do capital humano no turismo em Portugal. Deste modo, foi possível compreender o envolvimento do capital humano no setor, perceber o ponto de situação atual do ensino superior de turismo em Portugal, identificar as principais oportunidades e desafios que se colocam aos recursos humanos em turismo, especificamente no contexto da investigação realizada, e ainda, retirar conclusões e importantes linhas estratégicas de orientação para o futuro.

O envolvimento do capital humano no sector do turismo

O turismo é um sistema aberto influenciado por fenómenos internos e externos (Soteriou & Coccossis, 2010) que devem ser tidos em consideração na definição do perfil de qualificação dos recursos humanos que aí trabalham. Os fenómenos internos intimamente relacionados com o território, tais como recursos, atrações e serviços turísticos, infraestruturas, acessibilidades e imagem do destino, implicam articulação com os fenómenos externos de índole global, como flutuações económicas, politico-legais, sócio-culturais ou ambientais, e outros de carácter mais específico, como a procura turística, a concorrência, e a própria população local.

Esta perspetiva sistémica do turismo torna-se mais evidente quando abordamos a problemática dos destinos turísticos. Gretzel, Hwang & Fesenmaier (2012) afirmam que o conceito de destino turístico resulta da interação entre pessoas, e entre pessoas e organizações, sendo que a forma como este processo é gerido se traduz em decisões estratégicas com um impacte muito significativo no desenvolvimento das competências do capital humano.

Deste modo, para que os destinos sejam competitivos é fundamental promover o envolvimento do capital humano. Barbosa, Oliveira & Rezende (2010) por meio de um estudo realizado pelo Fórum Económico Mundial, em 2007, definiram treze fatores-chave de competitividade dos destinos turísticos, identificando o desenvolvimento dos recursos humanos como um dos mais importantes. Por sua vez, Dupeyras & MacCallum (2013) em resposta ao repto da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), identificaram nove fatores-chave de avaliação da competitividade em turismo, reconhecendo novamente a qualificação de recursos humanos como pedra basilar na competição com a concorrência.

No mesmo sentido, a Organização Mundial de Turismo (UNWTO, 2010) considera que a implementação de uma política de coesão, acontece quando os destinos se organizam de acordo com modelos de governança que sustentem a: (i) conceção e implementação de projetos regionais sustentáveis; (ii) definição e construção de infraestruturas básicas; (iii) definição da estratégia de marketing e dos mercados alvo; (iv) participação na reformulação da legislação e orientações regulamentares do setor; (v) construção ou adequação da imagem de marca do destino, apoiada na sua identidade; (vi) atualização e formação dos recursos humanos nas áreas-chave.

Constata-se, portanto, que o fator integrador de qualquer destino turístico é o capital humano. São estes que negociam os conflitos entre os atores locais, que procuram decisões mais eficazes, que inovam, que procuram oportunidades de desenvolvimento, em suma, que contribuem para a evolução positiva e um desenvolvimento sustentado e sustentável dos territórios. O caminho seguido e a trajetória de evolução dos destinos dependem, em grande parte, das competências dos recursos humanos e da capacidade das organizações atraírem e reterem as pessoas mais qualificadas.

Acresce a importância de ressaltar que a prestação de serviços em turismo requer uma interação face-a-face, que obriga a um elevado nível de envolvimento humano (Baum, 2007). Desta forma, o recrutamento, a formação, a gestão e a valorização dos recursos humanos influenciam diretamente a qualidade e originalidade dos serviços e produtos turísticos, sendo determinantes para o posicionamento dos destinos turísticos (Mira, Mónico & Moura, 2017; Sitompul, Kustono, Suhartadi & Setyaningsih, 2017; Valkonen, Huijala & Koikkalainen, 2013). Neste contexto, é possível afirmar que o desenvolvimento da atividade turística só é possível através da adequada integração entre o capital territorial com o capital humano. “É aqui que surge o papel da educação e formação, não só enquanto elemento potenciador da aptidão para o exercício de uma tarefa, mas como mecanismo transformador dessa competência numa mais-valia para a organização e para o desempenho global dos destinos turísticos” (Mira, Mónico & Moura, 2017, p. 261).

O ensino superior de turismo em Portugal

Num mundo cada vez mais globalizado e em volátil mutação, tem-se assistido a transformações sociais, económicas, políticas, tecnológicas e ambientais



de grande profundidade, que afetam inevitavelmente os sistemas educativos (Aleandri & Refrigeri, 2014). Desta maneira, torna-se premente ajustar e adequar as novas tendências do conhecimento das sociedades contemporâneas às ofertas educativas e formativas da atualidade (Sogayar & Rejowski, 2011).

No caso do turismo, para além de tendências, há também que considerar a sua multidisciplinaridade, efeitos multiplicadores, variedade de sistemas produtivos e complexidade de relações, que devem refletir-se no seu estudo e lecionação de forma integradora e holística (Salgado, 2011; Salgado, Lemos, Costa & Silva, 2017; Tribe & Liburd, 2016).

Neste sentido, o turismo enquanto disciplina tem evoluído bastante nas últimas décadas e tem vindo a afirmar-se como uma área de conhecimento interdisciplinar com base nos métodos de investigação usados por outras ciências sociais mais maduras, permitindo o desenvolvimento teórico e científico do seu objeto e contribuindo para a fundação, construção e afirmação dos seus alicerces enquanto área científica e educativa autónoma, dando origem à criação de cursos de turismo no âmbito do ensino profissional e superior (Bencckendorff & Zehrer, 2013; Pirnar, 2014; Salgado & Costa, 2009; Sogayar & Rejowski, 2011).

Ora, a educação e formação na área de turismo, pelas suas características, devem incluir conhecimentos múltiplos e transversais, que permitam a sua transferência e aplicabilidade a todo o tipo de profissões associadas ao setor (Daniel, Costa, Pita & Costa, 2017; Inui, Wheeler & Lankford, 2006). Esta perspetiva assume uma pertinência mais significativa ao nível do ensino superior, porque, em princípio, é a este nível que se formam muitos dos futuros líderes do turismo.

Em Portugal, ao longo dos últimos 30 anos, o sistema educativo tem investido na diversificação da oferta educativa e curricular em turismo, o que é demonstrativo da sua importância, maturidade e notoriedade enquanto área científica no contexto académico português (Salgado, Lemos, Costa & Silva, 2017). No ano letivo 2016-2017, no primeiro ciclo de estudos do ensino superior, contabilizavam-se um total de 68 licenciaturas ministradas em Portugal e consequentes 2806 vagas para entrada neste ciclo de estudos, das quais, cerca de 66% são de origem pública (1642 vagas) e cerca de 44% de origem privada (1164 vagas) (IEFP, 2017). Corroborando Salgado, Lemos, Costa & Silva (2017), no mesmo ano letivo, em Portugal continental, as regiões Norte e

Centro, detinham, cerca de 60% do total de cursos ministrados, seguidos pela região de Lisboa com 27,1% e as regiões do Alentejo e Algarve com cerca de 4,3%. Nas ilhas, o arquipélago da Madeira detinha cerca de 2,9% e o arquipélago dos Açores cerca de 1,4% do total de cursos ministrados em Portugal. Ainda de acordo com os mesmos autores, relativamente ao segundo ciclo de estudos do ensino superior nacional, registou-se um total de 38 mestrados cujas principais localizações se encontravam na região Centro e na região de Lisboa, com cerca de 32% e 26%, respetivamente. No que concerne ao terceiro ciclo de estudos do ensino superior nacional registaram-se, no mesmo período, apenas 4 cursos de doutoramento.

Através da observação da Tabela 1, destaca-se o facto da maioria dos cursos da área do turismo serem: (i) ministrados por instituições de ensino superior politécnico (76,5% no 1º ciclo e 64% no 2º ciclo); (ii) de oferta pública (66% no caso de licenciaturas, 87% no caso de mestrados e 75% no caso de doutoramentos); e (iii) da área CNAEF – Classificação Nacional de Áreas de Educação e Formação - “Turismo e Lazer” (70,6% no 1º ciclo, 79% no 2º ciclo e 100% no 3º ciclo) (IEFP, 2017).

Tabela 1. Cursos de turismo ministrados em Portugal no ano letivo 2016/2017

		Ciclo de estudos		
		Licenciatura	Mestrado	Doutoramento
Cursos ministrados (%)	Universidades	23,5%	36%	100%
	Politécnicos	76,5%	64%	0%
Origem dos cursos (%)	Pública	66%	87%	75%
	Privada	44%	13%	25%
Áreas CNAEF dos cursos (%)	Turismo e Lazer	70,6%	79%	100%
	Hotelaria e Restauração	17,7%	16%	0%
	Gestão e Administração	10,3%	3%	0%
	Marketing e Publicidade	1,4%	3%	0%

Fonte: Elaboração própria com base nos dados do IEFP (2017)

Tal como se consegue perceber através dos dados apresentados, as estratégias



nacionais de educação e turismo passam pela valorização e reconhecimento do capital humano. Contudo, o presente sistema educativo carece ainda de oferta de estruturas curriculares adequadas às constantes evoluções das necessidades do mercado turístico garantindo, dessa forma, mão-de-obra qualificada e de qualidade que permita responder aos desafios do mercado. Tal só será possível se existir um estreitamento de relações entre os estabelecimentos de ensino e as empresas que permitam aos estudantes uma maior aprendizagem prática e técnica acerca das realidades do setor (Teixeira, 2001; Huang, Lalopa & Adler, 2016). É neste enquadramento que surge o projeto de investigação “HCTourism – Perfil e tendências do capital humano no setor do turismo”, com o intuito de fazer a “ponte” entre mercado empregador e instituições formadoras de futuros profissionais de turismo em Portugal.

Oportunidades e desafios da investigação realizada (com estudantes)

A investigação desenvolvida permitiu identificar oportunidades e desafios que se colocam ao capital humano no turismo, num sentido lato e genérico tendo em consideração as tendências globais da atualidade, e ainda, num sentido mais restrito, especificamente associado à experiência de trabalho realizado de forma interativa e integrada com alunos de mestrado em turismo, do Instituto Politécnico do Cávado e Ave (IPCA) e do Instituto Politécnico de Coimbra (IPC).

No sentido lato, apuraram-se grandes **oportunidades** de aposta e investimento em recursos humanos no turismo:

1. O crescimento contínuo e exponencial da atividade turística em Portugal

Para além dos galardões de “melhor destino do mundo em 2017 e 2018” (Turismo de Portugal, 2018), a atividade turística em Portugal tem reforçado a sua importância em termos sociais e económicos, afirmando-se como uma das principais atividades exportadoras, tendo representado em 2017, cerca de 18% das exportações globais (Turismo de Portugal, 2017). Ao mesmo tempo, em termos internacionais, Portugal foi considerado o 14º destino mais competitivo do mundo (FEM, 2017), e, de acordo com a UNWTO (2018), em 2017, ocupou a 21ª posição no *ranking* do total mundial de receitas turísticas

e o 17º lugar no que diz respeito a chegadas internacionais, representando uma quota do total mundial de cerca de 3%;

2. A intangibilidade e inseparabilidade do produto turístico

O produto turístico intrinsecamente intangível, ou seja, imaterial e do foro das sensações, depende inevitavelmente do prestador ou fornecedor de serviços. Isto é, a experiência turística depende dos recursos humanos e da forma como estes desempenham os seus múltiplos papéis desde o planeamento da viagem até ao retorno a casa. Deste modo, a qualificação somente técnica é insuficiente e inadequada, pelo que, a sua complementaridade com competências pessoais e interpessoais é fulcral para a qualidade do serviço prestado ou produto vendido dado serem parte integrante da mesma experiência turística (Baum, 2002; Christou, 2002; Jeou-Shyan, Hsuan, Chih-Hsing, Lin & Chang-Yen, 2011; Mitchell, Pritchett & Skinner, 2013; Tsitskari, Goudas, Tsalouchou & Michalopoulou, 2017).

3. A sustentabilidade

Hoje em dia, a sustentabilidade é uma tendência mundial e serve de referência para o enquadramento e desenvolvimento de negócios, empresas e mercados. O conceito assenta sobre três pilares fundamentais que, para grande parte dos autores, assumem o mesmo grau de relevância: económico, ambiental e social (Choi & Sirakaya, 2006; Liu, 2003; Lu & Nepal, 2009; Guedes, Moura & Carvalho, 2017). Desta forma, as empresas e os trabalhadores devem evoluir no sentido de procurarem obter melhores resultados e, conseqüentemente, pessoas mais qualificadas (Athey & Orth, 1999; Johanson, Ghiselli, Shea & Roberts, 2010). De facto, a integração da sustentabilidade nas práticas empresariais e na educação do capital humano garante vantagens competitivas que conduzem ao sucesso das organizações e dos indivíduos (Chung-Herra, Enz & Lankau, 2003; Kay & Moncarz, 2004).

4. A globalização, o ritmo de mudança e as transformações do mercado de trabalho do século XXI

As economias mundiais são cada vez mais competitivas e globais, tornando-se evidente e necessária a retenção e aposta em mão-de-obra altamente qualificada, uma vez que os novos empregos que emergem exigem, por sua



vez, novas aptidões e competências (López-Bonilla & López-Bonilla, 2014; Ramlall & Ramlall, 2014). Neste âmbito, têm-se vindo a legitimar as denominadas “*soft skills*”, que extrapolam o conhecimento técnico tradicional e se relacionam com habilidades pessoais e interpessoais, muitas vezes relacionadas com a inteligência emocional, tais como, pensamento crítico, capacidade de resolução de problemas ou trabalho em equipa e centrado em objetivos (Baum & Devine, 2005; Junrat, Jenphop, Suravee & Kanokorn, 2014). Desta forma, é possível responder com maior facilidade às mudanças e transformações do mercado de trabalho, promovendo-se a flexibilidade e adaptabilidade dos trabalhadores às situações, contribuindo para o aumento da empregabilidade e, potencialmente, um aumento na produtividade (Vafai, 2016).

5. O reconhecimento da importância da formação contínua e ao longo da vida

O contínuo desenvolvimento e adaptação das competências ao mundo em rápida mudança, conetado e multicultural torna-se essencial para a melhoria das condições de vida dos cidadãos, tornando-os mais competitivos na busca de oportunidades de emprego e na capacidade de análise e compreensão das questões globais e interculturais, permitindo-lhes a evolução enquanto indivíduos e profissionais (OCDE, 2005a, 2018). Particularmente no caso do turismo, a formação contínua dos seus profissionais é essencial para o desenvolvimento dos destinos turísticos, porque estes vão sofrendo transformações tecnológicas e/ou sociais ao longo dos tempos, sendo de ressaltar que, na sua grande maioria, esta formação não exige grandes investimentos, quando comparada com outras áreas de atividade (Mira, Mónico & Moura, 2017).

Simultaneamente, foi também possível destrinçar alguns **desafios** para os recursos humanos do setor:

A. As qualificações pouco elevadas dos trabalhadores do turismo

Segundo a Confederação Empresarial de Portugal (CIP, 2017), um dos principais problemas estruturais do país passa pelas baixas qualificações dos trabalhadores portugueses. Comparativamente com a União Europeia, Portugal tem ainda um longo caminho a percorrer no que diz respeito à qualificação

de recursos humanos, principalmente na área do turismo, dado que a maior parte da população empregada neste setor detém habilitações ao nível do ensino básico (Turismo de Portugal, 2017).

B. A cultura organizacional e as condições de trabalho e remuneração dos trabalhadores do turismo

O setor dos serviços emprega cerca de 70% do total de emprego nas economias mais desenvolvidas (OCDE, 2005b), sendo que, no caso do turismo o trabalho caracteriza-se, de uma forma geral, por baixos salários, elevadas horas de trabalho, desigualdades de género, tanto nas oportunidades de trabalho como nos salários, carreiras profissionais pobres ou inexistentes, práticas informais de recrutamento, falta de boas práticas no desenvolvimento e gestão de recursos humanos, diminuta participação sindical, elevados níveis de rotatividade de empregos e dificuldades de recrutamento e retenção de pessoal (Baum, 2002; Lu, Chen, Huang & Chien, 2015). De uma forma geral, o turismo ainda é visto como um trabalho temporário ou ocasional, de subsistência ou de complementaridade. E, por isso, mal remunerado e instável ou precário, o que não favorece a estabilidade e carreiras atrativas, fomentadoras do *commitment* e do *empowerment* (Mira, Mónico & Moura, 2017).

C. As novas tecnologias: o *on-line* em turismo

A globalização das economias influenciadas por avanços tecnológicos altera a natureza dos postos de trabalho tradicionais, dada a rapidez de comunicação e facilidade de acesso à informação em sociedades cada vez mais “online” (Gretzel, Fesenmaier, Formica & O’Leary, 2006; Gekara & Snell, 2018). Neste contexto, o nível de qualificação da mão-de-obra nacional é dos mais baixos da União Europeia, designadamente no que concerne a competências digitais, sendo que em Portugal, cerca de 18% dos trabalhadores não tem quaisquer competências digitais (Comissão Europeia, 2018a, 2018b; Conselho da União Europeia, 2018).

D. As *soft skills*

Os empregadores entrevistam os candidatos com melhores conhecimentos técnicos, mas selecionam os detentores de melhores “*soft skills*”, dado que estes acrescentam valor às organizações (Mitchell, Skinner & White, 2010;



Spowart, 2011). A competitividade das empresas reside no investimento em pessoal qualificado com “*hard skills*” (competências técnicas), mas, cada vez mais, com “*soft skills*” (competências pessoais e emocionais) que permitam aos indivíduos a capacidade de resposta necessária às novas exigências dos negócios e dos mercados (Pérez, Alonso & López, 2016; Zehrer & Mössenlechner, 2009), tornando-se uma ferramenta vital para o sucesso das organizações e, consequentemente, para os destinos turísticos (Frantz & Misal, 2016; Lashley, 2009; Mira, Mónico & Moura, 2017; Nyanjom & Wilkins, 2016).

Desta forma, foi possível apurar que há uma necessidade premente de investir e orientar as políticas de formação e qualificação de recursos humanos, designadamente no âmbito do turismo. É nesta linha de pensamento que surge o projeto HCTourism impulsionado pelas oportunidades e desafios descritos. A identificação das principais competências a deter pelos trabalhadores do turismo e a sua priorização são aspetos de extrema relevância no contexto atual, permitindo às organizações obter vantagens competitivas num mercado globalizado e altamente competitivo. Deste modo, será possível contribuir para o ajuste e adequação dos modelos de ensino em turismo, com repercussões no perfil técnico e comportamental dos futuros profissionais, de acordo com os objetivos e necessidades das organizações contemporâneas (Jeou-Shyan, Hsuan, Chih-Hsing, Lin & Chang-Yen, 2011; Lu, Chen, Huang & Chien, 2015). O que, por sua vez, tenderá a promover a motivação e satisfação no trabalho, contribuindo para a obtenção de melhores performances e resultados operacionais (Weinland, Gregory & Petrick, 2016).

Neste contexto, pretendeu-se que a própria implementação do projeto HCTourism fosse também uma experiência preliminar de identificação de competências dos estudantes envolvidos e formados em turismo.

Assim, no que concerne ao **âmbito restrito** do contexto de trabalho do projeto HCTourism, foi possível identificar as seguintes **oportunidades**:

- constituição de um laboratório em contexto real, permitindo a aplicação de competências transversais adquiridas ao longo dos seus percursos académicos (fora de sala de aula);
- compatibilização de interesses e fomento de competências de comunicação;

- partilha de informação e conhecimento;
- aprendizagem e utilização e de novas tecnologias, designadamente de *software* de tratamento de dados;
- sensibilização e consciencialização da importância da investigação científica.

Por outro lado, reconhecem-se os **desafios** subsequentes:

- melhoria da formação em termos de *soft skills*, nomeadamente de competências comportamentais (tais como responsabilidade, proatividade e autonomia) e de gestão (como gestão do tempo ou capacidade de resolução de problemas);
- aposta em competências transversais, especialmente no que concerne a conhecimentos de língua materna escrita;
- domínio escrito e oral de línguas estrangeiras;
- necessidade de formação mais aprofundada no âmbito da investigação científica.

Estes resultados servem apenas de reflexão exploratória, mas poderão, desde já, apoiar diagnósticos de necessidades de educação e formação em turismo para o futuro.

Principais conclusões e orientações estratégicas para o futuro

Com a evolução das denominadas sociedades do conhecimento, devem surgir novos modelos educacionais baseados em competências que derivam das evoluções sociais e produtivas vividas. A identificação do conjunto de competências relevantes para cada profissão ajuda as organizações a contratar e a reter os melhores recursos humanos e, ao mesmo tempo, a oferecer oportunidades de carreira aos seus trabalhadores, gerando bem-estar organizacional e, simultaneamente, qualidade de vida societal.

Neste sentido, torna-se imperativo que os trabalhadores estejam cada vez mais bem preparados para as novas exigências do mercado de trabalho dado que as necessidades variam, diversificam-se e evoluem ao longo dos tempos (Jeou-Shyan, Hsuan, Chih-Hsing, Lin & Chang-Yen, 2011; Lashley, 2009).



Assim, as instituições de ensino e formação têm um papel fundamental na identificação e compreensão das competências e conhecimentos exigidos e necessários ao mercado de trabalho, fazendo corresponder as expectativas dos recrutadores, às qualidades dos proponentes.

No turismo especialmente, já que se trata de um setor de atividade em constante mudança, reestruturação e evolução, adequando-se às tendências do mercado, reformulando serviços de acordo com os comportamentos dos consumidores, necessitando, por isso, da atualização permanente das competências dos seus trabalhadores. Este setor de atividade tem vivido períodos de aumento crescente de competitividade ao longo das últimas décadas e, apesar do paralelo aumento da oferta educativa e formativa especializada, esta não é suficiente para dar resposta às novas exigências do mercado, particularmente no âmbito das competências pessoais e interpessoais, também denominadas de “*soft skills*”, tais como consciência comercial, trabalho em equipa, resolução de problemas e pensamento analítico; e da consciencialização da necessidade da formação contínua, ao longo da vida. Desta forma, dadas as significativas alterações no ambiente educacional e empresarial devido a mudanças micro e macro ambientais, torna-se necessária a constante reformulação da oferta educativa e formativa para que o setor possa responder de forma efetiva às necessidades do mercado (Johanson, Ghiselli, Shea & Roberts, 2010).

Hoje em dia, vivem-se, portanto, tempos de mudança que colocam oportunidades e desafios no âmbito do capital humano que já foram apresentados e discutidos, mas que devem ainda ser cruzados e tidos em consideração para a formulação de novas e inovadoras estratégias qualificadoras em turismo. Deste modo, sugerem-se algumas linhas de orientação para o futuro:

- a revisão contínua da oferta educativa e formativa, capacidades e competências, por forma a refletir as mudanças vividas no mercado (Lin, 2002);
- o investimento na formação dos trabalhadores de forma responsável e partilhada entre a tutela, as instituições de ensino e o mercado empregador (Mira, Mónico & Moura, 2017);
- a introdução de novas competências nos planos curriculares, mais complexas e de maior abrangência, especialmente ligadas às tecnologias de informação e comunicação (Hsu, 2018);
- a aposta na maior flexibilidade dos colaboradores, capacidade de trans-

ferência do conhecimento e rapidez de atuação para responder às novas e crescentes necessidades e expectativas dos clientes (Athey & Orth, 1999);

- o aumento do foco na qualificação individual e especializada e na definição do seu contributo na prossecução dos objetivos das organizações, agregando valor e capacidade de resposta, de forma planeada e devidamente ajustada à sua envolvente (Pérez, Alonso & López, 2016; Zehrer & Mösenlechner, 2009);
- o estímulo ao empreendedorismo, à inovação e à transferência de conhecimento com o incremento de projetos de investigação aplicada (I&D).

Em suma, crê-se comprovada a importância do capital humano no turismo em Portugal, quando se partilha uma visão inovadora, competitiva e de qualidade para o turismo neste país. Os problemas e competências dos recursos humanos são diferentes em espécie e em extensão consoante a natureza e a tipologia dos destinos turísticos.

A diferenciação da experiência turística far-se-á, principalmente, pela capacidade de atrair e reter profissionais qualificados. Mas esta capacidade também se relaciona com as condições de trabalho e com a remuneração, que devem ser devidamente atrativas (ou devidamente regulamentadas), de forma a fixarem os seus trabalhadores. Importa ainda salientar neste contexto, que as questões da sazonalidade podem levar (e frequentemente são usadas como argumento justificativo de uma deficiente política laboral) a uma organização da gestão de recursos humanos direcionada para pessoas com menores qualificações, residentes na comunidade de localização das empresas, que visualizam o turismo como um trabalho temporário ou ocasional, de subsistência ou de complementaridade. E, por isso, mal remunerado e instável ou precário. Nestas condições é difícil ser competitivo e inovador. É difícil criar e partilhar conhecimento. É difícil ter serviços e produtos competitivos.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do projeto HCTourism – Perfil e tendências do capital humano no setor do turismo, suportado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE2020, sob o programa Portugal2020, com o código de apoio POCI-01-0145-FEDER-023622.



Referências

- Aleandri, G., & Refrigeri, L. (2014). Lifelong education and training of teacher and development of human capital. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 136(9), 542-548. doi: org/10.1016/j.sbspro.2014.05.372
- Athey, T. R., & Orth, M. S. (1999). Emerging competency methods for the future. *Human resource management*, 38(3), 215-226. doi: org/10.1002/(SICI)1099-050X(199923)38:3<215::AID-HRM4>3.0.CO;2-W
- Barbosa, L., Oliveira, C., & Rezende, C. (2010). Competitiveness of tourist destinations: The study of 65 key destinations for the development of regional tourism. *Revista de Administração Pública*, 44(5), 1067-1095. doi: org/10.1590/S0034-76122010000500004
- Baum, T. (2002). Skills and training for the hospitality sector: A review of issues. *Journal of Vocational Education and Training*, 54(3), 343-364. doi: org/10.1080/13636820200200204
- Baum, T. (2007). Human resources in tourism: Still waiting for change. *Tourism Management*, 28(6), 1383-1399. doi: org/10.1016/j.tourman.2007.04.005
- Baum, T., & Devine, F. (2005). Skills and training in the hotel sector: The case of front office employment in Northern Ireland. *Tourism and Hospitality Research*, 7(3-4), 269-280. doi: org/10.1057/palgrave.thr.6050046
- Benckendorff, P., & Zehrer, A. (2013). A network analysis of tourism research. *Annals of Tourism Research*, 43, 121-149. doi: org/10.1016/j.annals.2013.04.005
- Choi, H., & Sirakaya, E. (2006). Sustainability indicators for managing community tourism. *Tourism Management*, 27(6), 1274-1289. doi: org/10.1016/j.tourman.2005.05.018
- Christou, E. (2002). Revisiting competencies for hospitality management: Contemporary views of the stakeholders. *Journal of Hospitality & Tourism Education*, 14(1), 25-32. doi: org/10.1080/10963758.2002.10696721
- Chung-Herra, B. G., Enz, C. A., & Lankau, M. J. (2003). Grooming Future Hospitality Leaders: A Competencies Model. *Cornell Hotel and Restaurant Administration Quarterly*, 44(3), 17-25. doi: org/10.1016/S0010-8804(03)90266-7

CIP - Confederação Empresarial de Portugal (2017). *Propostas OE 2018: Investir & Qualificar*. Retrieved from <http://cip.org.pt/wp-content/uploads/2017/09/PropostasOE2018.pdf>

Comissão Europeia (2018a). *Relatório relativo a Portugal 2017 que inclui uma apreciação aprofundada sobre a prevenção e a correção de desequilíbrios macroeconómicos*. Retrieved from <https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/2018-european-semester-country-report-portugal-pt.pdf>

Comissão Europeia (2018ba). *Digital economy and society index (DESI) 2018: - Country report Portugal*. Retrieved from http://ec.europa.eu/information_society/newsroom/image/document/2018-20/pt-desi_2018-country_profile_eng_B440E073-A50F-CF68-82F6A8FB53D31DE5_52232.pdf

Conselho da União Europeia (2018). *Recomendação do Conselho relativa ao programa nacional de reformas de Portugal para 2018 e que formula um parecer do conselho sobre o programa de estabilidade de Portugal para 2018*. Retrieved from https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/file_import/2018-european-semester-country-specific-recommendation-commission-recommendation-portugal-pt_0.pdf

Daniel, A. D., Costa, R. A., Pita, M., & Costa, C. (2017). Tourism education: What about entrepreneurial skills? - *Journal of Hospitality and Tourism Management*, 30, 65-72. doi: [org/10.1016/j.jhtm.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jhtm.2017.01.002)

Dupeyras, A., & MacCallum, N. (2013). Indicators for measuring competitiveness in tourism: A guidance document (2013/02). OCDE Tourism Papers. Paris: OCDE Publishing. doi: [org/10.1787/23071672](https://doi.org/10.1787/23071672)

FEM - Fórum Económico Mundial (2017). *The Travel & Tourism Competitiveness Report 2017 -: Paving the way for a more sustainable and inclusive future*. Retrieved from http://www3.weforum.org/docs/WEF_TTCR_2017_web_0401.pdf

Frantz, M. A., & Misal, A. (2016). Identification of generic skills for human resources in hospitality: A literature review. *Journal for Contemporary Research in Management*, 3, 36-41. Retrieved from <http://dawn-svims.in/wp-content/uploads/2016/07/6.-Identification-of-Generic-Skills-for-Human-Resources-in-Hospitality-A-Literature-Review-Anita-Frantz.pdf>

Gekara, V., & Snell, D. (2018). Designing and delivering skills transferability



and employment mobility: The challenges of a market-driven vocational education and training system. *Journal of Vocational Education & Training*, 70 (1), 107-129. doi: [org/10.1080/13636820.2017.1392996](https://doi.org/10.1080/13636820.2017.1392996)

Gretzel, U., Fesenmaier, D., Formica, S., & O'Leary, J. (2006). Searching for the future: Challenges faced by destination marketing organizations. *Journal of Travel Research*, 45(11), 116-126. doi: [org/10.1177/0047287506291598](https://doi.org/10.1177/0047287506291598)

Gretzel, U., Hwang, Y. H., & Fesenmaier, D. R. (2012). Informing destination recommender systems design and evaluation through quantitative research. *International Journal of Culture, Tourism and Hospitality Research*, 6(4), 297-315. doi: [org/10.1108/17506181211265040](https://doi.org/10.1108/17506181211265040)

Guedes, L.; Moura, A., & Carvalho, M. (2017). Abordagens ao turismo sustentável na revista National Geographic Traveler. *EXEDRA – Revista Científica*. 1(1), 29-48. Retrieved from <http://www.exedrajournal.com/wp-content/uploads/2018/01/02-Vol1-turismo.pdf>

Hsu, C. H. (2018). Tourism education on and beyond the horizon. *Tourism management perspectives*, 25, 181-183. doi: [org/10.1016/J.TMP.2017.11.022](https://doi.org/10.1016/J.TMP.2017.11.022)

Huang, Y., Lalopa, J., & Adler, H. (2016). An analysis of entry level management requirements: Are there differences in perceptions of hospitality recruiters versus hospitality students?. *Journal of Human Resources in Hospitality & Tourism*, 15(3), 346-364. doi: [org/10.1080/15332845.2016.1147980](https://doi.org/10.1080/15332845.2016.1147980)

IEFP - Instituto do Emprego e Formação Profissional (2017). *Relatório de Atividades de 2016 do Instituto do Emprego e Formação Profissional, I.P.* Lisboa: Instituto do Emprego e Formação Profissional.

Inui, Y., Wheeler, D., & Lankford, S. (2006). Rethinking tourism education: What should schools teach. *Journal of Hospitality, Leisure, Sport and Tourism Education*, 5(2), 25-35. doi: [org/10.3794/johlste.52.122](https://doi.org/10.3794/johlste.52.122)

Jeou-Shyan, H., Hsuan, H., Chih-Hsing, L., Lin, L., & Chang-Yen, T. (2011). Competency analysis of top managers in the Taiwanese hotel industry. *International Journal of Hospitality Management*, 30, 1044-1054. doi: [org/10.1016/j.ijhm.2011.03.012](https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2011.03.012)

Johanson, M., Ghiselli, R., Shea, L. J., & Roberts, C. (2010). *Revealing key competencies of hospitality graduates demanded by industry: A 25-year review*. Retrieved from http://scholarworks.umass.edu/refereed/CHRIE_2010/

Saturday/5.

Junrat, S., Jenphop, C., Suravee, R., & Kanokorn, S. (2014). Soft sSkills for University Library sStaff in Thailand. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 112, 1027-1032. doi: org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1265

Kay, C., & Moncarz, E. (2004). Knowledge, skills, and abilities for lodging management. *Cornell Hotel and Restaurant Administration Quarterly*, 45(3), 285-298. doi: org/10.1177/0010880404265351

Lashley, C. (2009). The right answers to the wrong questions? Observations on skill development and training in the United Kingdom's hospitality sector. *Tourism and Hospitality Research*, 9(4), 340-352. doi: org/10.1057/thr.2009.21

Lin, S. C. (2002). Exploring the relationships between hotel management courses and industry required competencies. *Journal of teaching in travel & tourism*, 2(3-4), 81-101. doi: org/10.1300/J172v02n03_05

Liu, Z. (2003) Sustainable tourism development : a critique. *Journal of Sustainable Tourism*, 11(6). 459-475. doi.org/10.1080/09669580308667216

López-Bonilla, J. M., & López-Bonilla, L. M. (2014). Holistic competence approach in tourism higher education: An exploratory study in Spain. *Current Issues in Tourism*, 17(4), 312-326. doi: org/10.1080/13683500.2012.720248

Lu, J., & Nepal, S. (2009). Sustainable tourism research: an analysis of papers published in the Journal of Sustainable Tourism. *Journal of Sustainable Tourism*, 17(1), 5-16. doi: org/10.1080/09669580802582480

Lu, C. M., Chen, S. J., Huang, P. C., & Chien, J. C. (2015). Effect of diversity on human resource management and organizational performance. *Journal of Business Research*, 68(4), 857-861. doi: org/10.1016/j.jbusres.2014.11.041

Mira, M.R.C., Mónico, L.S., Moura, A.F.A. (2017). Uma proposta de medida da qualidade dos recursos humanos em turismo. *Revista Psicologia: Organizações e Trabalho*, 7(4), 260-268. doi: org/10.17652/rpot/2017.4.13746

Mitchell, G. W., Pritchett, C. C., & Skinner, L. B. (2013). The importance of the integration of soft skills into the curriculum as identified by MBA students. *Academy of Business Research Journal*, 2, 87-103.

Mitchell, G. W., Skinner, L. B., & White, B. J. (2010). Essential soft skills for



success in the twenty-first century workforce as perceived by business educators. *The Journal of Research in Business Education*, 52, 43-53.

Nyanjom, J., & Wilkins, H. (2016). The development of emotional labor skill in food and beverage practical training. *Journal of Hospitality & Tourism Education*, 28(4), 178-188. doi: [org/10.1080/10963758.2016.1226847](https://doi.org/10.1080/10963758.2016.1226847)

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (2005a). The definition and selection of key competencies - executive summary. Retrieved from <https://www.oecd.org/pisa/35070367.pdf>

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (2005b). Enhancing the performance of the services sector. Retrieved from <http://www.value-chains.org/dyn/bds/docs/497/Wolf/OECDEnhancingPerformanceServicesSector.pdf>

OCDE - Organização para a cooperação e desenvolvimento económico (2018). *OECD Tourism Trends and Policies 2018*. Retrieved from <https://www.oecd.org/cfe/tourism/2018-Tourism-Trends-Policies-Highlights-ENG.pdf>

Pérez, M. A. H., Alonso, J. M. O., López, J.R. (2016). Labor demand and ICT adoption in Spain. *Telecommunications Policy*, 40(5), 450-470. doi: [org/10.1016/j.telpol.2015.07.004](https://doi.org/10.1016/j.telpol.2015.07.004)

Pirnar, I. (2014). Tourism education universities in Turkey: Comparison of different structures and related effects on education quality. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 116, 5070-5074. doi: [org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1075](https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1075)

Ramlall, S., & Ramlall, D. (2014). The value of soft-skills in the accounting profession: Perspectives of current accounting students. *Advances in Research*, 2(11), 645-654. Retrieved from http://www.journalrepository.org/media/journals/AIR_31/2014/Jun/Ramlall2112014AIR11000_1.pdf

Salgado, M. (2011). Estatuto científico do turismo no ensino superior português. *Journal of Tourism Studies*, 4, 97-114. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/48576384.pdf>

Salgado, M., & Costa, C. (2009). Ensino superior na área do turismo em Portugal. *Revista Brasileira de Docência, Ensino e Pesquisa em Turismo*, 1(2), 2-16. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Manuel_Salgado8/

publication/280567695_Ensino_Superior_na_Area_do_Turismo_em_Portugal/links/55ba452d08aed621de0acb7b.pdf

Salgado, M., Lemos, F., Costa, C., & Silva, J. (2017). Epistemologia e educação em turismo: Ensino superior português. *Revista Turismo & Desenvolvimento*, 1(27-28), 1853-1863. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Manuel_Salgado8/publication/325203562_Epistemologia_e_educacao_em_turismo_Ensino_superior_portugues/links/5afda857a6fdcc3a5a968afb/Epistemologia-e-educacao-em-turismo-Ensino-superior-portugues.pdf

Sitompul, S. S., Kustono, D., Suhartadi, S., & Setyaningsih, R. M. (2017). The Relationship of the Learning of Tourism marketing, hard skills, soft skills and working quality of the graduates of tourism academy in Medan. *International Journal of Social Sciences & Educational Studies*, 3(4), 124-133. doi: [org/10.23918/ijsses.v3i4p124](https://doi.org/10.23918/ijsses.v3i4p124)

Sogayar, R. L., & Rejowski, M. (2011). Ensino superior em turismo em busca de novos paradigmas educacionais: Problemas, desafios e forças de pressão. *Turismo-Visão e Ação*, 13(3), 282-298. doi: [org/10.14210/rtva.v13n3.p282-298](https://doi.org/10.14210/rtva.v13n3.p282-298)

Soteriou, E., & Coccossis, H. (2010). Integrating sustainability into the strategic planning of national tourism organizations. *Journal of Travel Research*, 49(2), 191-205. doi: [org/10.1177/0047287509336472](https://doi.org/10.1177/0047287509336472)

Spowart, J. (2011). Hospitality students' competencies: Are they work ready?. *Journal of Human Resources in Hospitality & Tourism*, 10(12), 169-181. doi: [org/10.1080/15332845.2011.536940](https://doi.org/10.1080/15332845.2011.536940)

Teixeira, R. M. (2001). Ensino superior em turismo e hotelaria no Brasil - Um estudo exploratório. *Revista Turismo em Análise*, 12(2), 7-31. Retrieved from [file:///C:/Users/Andreia%20Moura/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/63539-Texto%20do%20artigo-83284-1-10-20131016%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Andreia%20Moura/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/63539-Texto%20do%20artigo-83284-1-10-20131016%20(1).pdf)

Tribe, J., & Liburd, J. J. (2016). The tourism knowledge system. *Annals of Tourism Research*, 57, 44-61. doi: [org/10.1016/j.annals.2015.11.011](https://doi.org/10.1016/j.annals.2015.11.011)

Tsitskari, E., Goudas, M., Tsalouchou, E., & Michalopoulou, M. (2017). Employers' expectations of the employability skills needed in the sport and



recreation environment. *Journal of hospitality, leisure, sport & tourism education*, 20, 1-9. doi: org/10.1016/j.jhlste.2016.11.002

Turismo de Portugal (2017). Turismo em Portugal 2017. Retrieved from <http://travelbi.turismodeportugal.pt/pt/pt/Documents/Turismo%20em%20Portugal/turismo-em-portugal-2017.pdf>

Turismo de Portugal (2018). World Travel Awards 2018: Portugal é o melhor destino turístico do mundo. Retrieved from <http://www.turismodeportugal.pt/pt/Noticias/Paginas/world-travel-awards-2018-portugal-melhor-destino-turistico-do-mundo.aspx>

UNWTO – United Nations World Tourism Organization (2018). *UNWTO Tourism Highlights - 2018 Edition*. Retrieved from <https://www.e-unwto.org/doi/pdf/10.18111/9789284419876>

UNWTO – United Nations World Tourism Organization (2010). *Survey on destination governance: Evaluation report*. Madrid: World Tourism Organization. Retrieved from <http://media.unwto.org/sites/all/files/pdf/finalannualreportpdf.pdf>

Vafai, M.M. (2016). Transitions to mMiddle-sSkill jJobs: Pathways iInto the nNew racio-economic structure of the 21st cCentury. *Educational studies*, 52(2), 139–154. doi: org/10.1080/00131946.2016.1142995

Valkonen, J., Huilaja, H., & Koikkalainen, S. (2013). Looking for the right kind of person: recruitment in nature tourism guiding. *Scandinavian Journal of Hospitality and Tourism*, 13(3), 228-241. doi: org/10.1080/15022250.2013.837602

Weinland, J. T., Gregory, A. M., & Petrick, J. A. (2016). Cultivating the aptitudes of vacation ownership management: A competency domain cluster analysis. *International Journal of Hospitality Management*, 55, 88-95. doi: org/10.1016/j.ijhm.2016.02.006

Zehrer, A., & Mössenlechner, C. (2009). Key competencies of tourism graduates: The employers' point of view. *Journal of Teaching in Travel & Tourism*, 9(3-4), 266-287. doi: org/10.1080/15313220903445215



Coordenação

Marta Henriques
Carlos Dias Pereira

Marta Henriques

Doutorada em Engenharia Química, especialidade Processos Químicos pela Universidade de Coimbra. É Subdiretora do Instituto de Investigação Aplicada (i2A) do Instituto Politécnico de Coimbra (IPC). É Professora Adjunta no Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária e leciona na área científica de Bioprocessos. É coordenadora do Mestrado em Biotecnologia. É investigadora integrada no centro de investigação 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.

Participou em 17 projetos I&D nacionais e internacionais, é detentora (como co-inventor) de 2 patentes nacionais na área da ciência dos alimentos, é autora de 1 livro, e de vários manuais de boas práticas de tecnologia alimentar, de 16 artigos científicos em revistas indexadas, 11 capítulos de livros e mais de 60 comunicações em conferências nacionais e internacionais. Recebeu 13 prémios e distinções no domínio da inovação e desenvolvimento de novos produtos alimentares.



Carlos Dias Pereira

Licenciado em Medicina veterinária pela Universidade Técnica de Lisboa - Portugal, Mestre em Ciências dos Alimentos pela Universidade de Reading - UK e Doutor em Ciência e Engenharia de Alimentos pela Universidade de Santiago de Compostela - Espanha. É Professor Coordenador no Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária. É investigador integrado no centro de investigação 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. As suas áreas de especialização são a ciência e tecnologia de produtos lácteos e a aplicação de processos de filtração tangencial à valorização de subprodutos e resíduos industriais.

Coordenou 13 projetos I&D nacionais com financiamento externo e participou como investigador em outros 10 projetos. É coautor de 4 capítulos de livros com edição internacional, de 7 com edição nacional, de 5 manuais técnicos, de 22 artigos científicos em revistas internacionais indexadas na base de dados Scopus, e de mais de 50 comunicações em conferências nacionais e internacionais.



cinep

CENTRO DE INOVAÇÃO E ESTUDO DA
PEDAGOGIA NO ENSINO SUPERIOR

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



As coletaneas de estudos publicadas pelo CINEP têm como objetivo contribuir para a difusão do conhecimento científico e para o avanço das ciências aplicadas.