



Student: Albina Cristina Ribeiro Franco

Supervisor/Co-Supervisor: Prof. Dr. Paula M.L. Castro/Dr. Rui S. Oliveira

Title: Biodegradation of Fluorinated Organic Compounds by Ectomycorrhizal Fungi

Summary

Ectomycorrhizal fungi (ECMF) establish mutualistic associations with plant roots, providing exchanges of resources between the partners. Their ecological role is well recognised as promoters of soil restoration, helping successful plant establishment on disturbed areas, such as those contaminated with persistent organic pollutants (POP), such as pharmaceuticals, agrochemicals or fire retardants compounds. POP degradation is facilitated by promoting plant rhizosphere activities. Studies on the tolerance and degradation of POP by ECMF are scarce. The aims of this study are to unveil the role ECMF play on the degradation of POP, as a new rhizosphere remediation technology.

In order to select stress resistant ECMF the persistence of selected ECMF was monitored in a 5 yr old *Pinus pinaster* plantation established on a repeated fire-burned forest area. The successful introduction of seedlings inoculated with ECMF was achieved, reinforcing ECMF ability to mitigate stress factors. Among those, *Pisolithus tinctorius* was found to be resilient in field condition and chosen for further studies.

The capacity of *Pisol. tinctorius* and other ECMF to tolerate and/or degrade organic fluorinated compounds was further assessed. Two organic fluorinated compounds were selected due to their highly recalcitrant nature and persistence in different ecosystems: mono-fluorophenols (MFP) and trifluoroacetate (TFA). Degradation studies of MFP with *Pisol. tinctorius* showed that the fungus was able to metabolise up to 60 % of the target compound. Intermediates products were identified as catechol and 3-fluorocatechol, and their ability use them as an additional carbon source tested. Results show that catechol and hydroquinone were consumed but not 3-fluorocatechol, having no effect on fungus growth. A proteomic approach is being followed to identify the enzymatic expression profile in the presence of MFP. The growth of ECMF species on TFA was also evaluated. They were able to grow on TFA with up to 1000 ppm, suggesting that this is not an inhibitory compound to ECMF growth. TFA degradation was achieved, but no fluoride release or acetate was detected, suggesting that other fluorinated compounds are produced. Further work is on-going to determine these compounds.

So far, the results show that ECMF can degrade or tolerate organic fluorinated compounds demonstrating their versatility to use fluorinated organic compounds. Thus, it can be inferred that they may play an important role on rhizoremediation of contaminated soils. However, questions arise of ECMF degradation abilities and behavior when in plant symbiosis. This will be further studied in microcosm's fungi-plant systems using a fluorinated organic compound. Their potential use on rhizoremediation technology as new biotechnology tools will be further investigated. The outcomes of this investigation will be of great importance to assess the contribution of ECMF as promoter's players on plant establishment in polluted sites.



Aluno: Ana Isabel Rodrigues Pereira de Castro

Orientador/Co-Orientador: Paula Teixeira/Joana Silva

Tema da Tese: Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos isolados de várias origens

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

Este programa de doutoramento tem como objetivo caracterizar e comparar a presença de vários fatores de virulência de vários isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos e de ambiente hospitalar ou ambiente comunitário assim como avaliar a incidência e a distribuição destes fatores incluindo a resistência antimicrobiana e a presença de determinantes genéticos de resistência. A comparação por técnicas de tipagem molecular (ex. PFGE) permitir-nos-á saber se há relação genética entre as estirpes isoladas de várias origens

O trabalho efetuado no âmbito do trabalho de doutoramento que vai ser apresentado consistiu na caracterização de *S. aureus* obtidos da mucosa nasal de crianças saudáveis na região do Porto. Os principais objetivos deste trabalho foram a avaliação da ocorrência de *S. aureus* na cavidade nasal de crianças de 4 infantários, a investigação da suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* a 10 antibióticos incluindo a oxacilina e a pesquisa de isolados multirresistentes, e a investigação da ocorrência de portadores *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) entre as crianças e a pesquisa de genes de enterotoxinas estafilocócicas. Neste estudo pesquisou-se *S. aureus* na mucosa nasal de crianças entre os 3 e os 6 anos em 4 infantários situados na região do Porto tendo-se isolado *S. aureus* em BPA com gema de ovo e telurito e efetuado testes preliminares de confirmação tais como coloração de Gram, pesquisa de coagulase, catalase, e de DNase e fermentação de manitol. A caracterização dos isolados *S. aureus* baseou-se na sensibilidade aos antibióticos tais como penicilina G, ampicilina, cloranfenicol, rifampicina, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, oxacilina, vancomicina, eritromicina e na presença dos genes das enterotoxinas estafilocócicas, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*. Para todos os isolados foi realizada a pesquisa dos genes 16SrRNA, *mecA* e *nuc* (nuclease termoestável) por PCR multiplex tanto para confirmação genética da identificação preliminar por características fenotípicas como para a determinação da presença do gene *mecA* determinante da proteína PBP 2a que confere resistência à meticilina e que está relacionado com a resistência à oxacilina. Desta forma, a nível genético como fenotípico foi pesquisada a presença de MRSA's. *Staphylococcus aureus* é habitualmente produtor de enterotoxinas termoestáveis que lhe confere virulência. A pesquisa de 9 genes responsável pela expressão de enterotoxinas termoestáveis permitiu-nos determinar as estirpes de *S. aureus* mais virulentas.

Pudemos observar que 46% das crianças eram portadoras de *S. aureus* na mucosa nasal. 19,7% dos isolados foram classificados como MRSA. A prevalência de MRSA's na população estudada foi de 9,1%.

Quanto à presença de *S. aureus* enterotoxigénicos verificou-se que 42,5% dos isolados confirmados como *S. aureus* possuíam genes de enterotoxinas. Os genes mais prevalentes foram *seh* (10,2%), *sea* (9,4%), *sec* bovino (7,9%) e a combinação dos genes *seg*, *sei* (24,4%).



Student: Ana Lúcia da Silva Oliveira

Supervisor/Co-Supervisor: Prof. Doutor Domingos Almeida / Prof. Doutora Maria Manuela Pintado

Title: Preservation of nutritional and functional properties of fresh and processed fruit with emphasis on phytochemicals

Summary

Fruit are an essential part of a healthy diet and vehicle of a number of unique health promoting phytochemicals. Being very perishable, fruit require preservation, both as fresh or processed foods. From nutritional and functional point of view is important to understand the consequences of processing in food composition in order to select the best technological conditions required for the preservation of fruit health benefits. Processing of fruits may entail different phases that naturally affect the nutritional and functional quality of the final product.

The general objective of this Ph.D. programme is understand the effect of factors related to storage of fruit and with fruit processing on the nutritive and functional properties of fruits — strawberry and peach. This information will be integrated to optimize processing conditions that maximize the content of beneficial antioxidants compounds aiming the development of functional food with specific properties. It is expected through this project to establish the impact that specific processing conditions, namely postharvest storage, pasteurization, freezing, additives adding and incorporation in food matrix have upon antioxidants compounds naturally present in the fruits.

The first results obtained reveals that processes like pasteurization of fresh fruit and subsequent storage duration as a significant impact in phytochemicals namely anthocyanins in strawberry and carotenoids in peach. The pH variation was not significant while storage temperature was important since lower temperature preserves better than room temperature.

When an industrial process was analysed it reveals that ingredientation induces an increase compounds extraction and the pasteurization add significant impact only for strawberry. In both fruits storage duration promotes decreases, but most significantly in anthocyanins.

Experiments in development involve the study of modified atmosphere during strawberry and peach storage and the study about food matrix interaction, namely lactic matrix like yogurts.



JORNADAS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS DE DOUTORAMENTO

Ano letivo 2011-2012

5 e 6 de Julho

Aluno: Ana Rita Boura Varela

Orientador/Co-Orientador: Célia Manaia / Olga Cristina Pastor Nunes

Tema da Tese: Influência de descargas hospitalares na diversidade bacteriana e resistência a antibióticos na ETAR receptora

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

A resistência a antibióticos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Inicialmente considerada apenas um problema de âmbito clínico, hoje em dia é vista como uma ameaça ambiental e para a saúde humana.

Apesar de os hospitais serem presumíveis reservatórios para a disseminação de resistência a antibióticos, ainda não existem muitos estudos sobre a influência dos efluentes hospitalares na propagação de bactérias ou genes capazes de propagar a resistência. Não existe obrigatoriedade legal para o tratamento de efluentes hospitalares que, assim, são muitas vezes descarregados nos colectores municipais.

Este estudo procura compreender a influência dos efluentes hospitalares na propagação de resistência a antibióticos nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) municipais, avaliando assim impactos ambientais e clínicos. A caracterização das comunidades bacterianas, isolados bacterianos e seus genes de resistência, permitem rastrear a resistência desde o efluente hospitalar até às ETAR municipais e meio envolvente.

Espera-se assim conseguir uma nova compreensão dos mecanismos de disseminação e aquisição de resistência a antibióticos e, ao mesmo tempo, criar uma base científica para o desenvolvimento de novas recomendações para práticas de tratamento e disposição de efluentes hospitalares.



Student: Ana Rita Lado Teixeira Ribeiro

Supervisor: Prof.^a Doutora Paula Maria Lima

Co-Supervisors: Prof.^a Doutora Maria Elizabeth Tiritan and Prof. Doutor Carlos Magalhães Afonso

Title: Chiral pharmaceuticals in the environment: enantiomeric ratio and biodegradation studies

Summary

Biodegradation of enantiomers of Chiral Pharmaceuticals in the Environment (CPE) is largely unknown. Studies concerning the degradation of racemic mixtures and the individual enantiomers of CPE require more investigation. Detailed insight into the fate, transformation and effects of environmental pollutants is required and so, the development of new analytical methods to measure enantiomers of CPE is imperative. In this context, enantioselective chromatographic methods that allow discriminating between biotic and abiotic transformation of chiral pollutants as well as between enantioselective toxic effects are of particular interest. There are very few analytical methods reporting the enantioselective quantification of CPE. The aim of this work is to develop an enantioselective HPLC method for quantification of different pharmaceuticals, including propranolol, atenolol and fluoxetine enantiomers and to assess their biodegradation both in microcosms mimicking environmental scenarios and in the environment (e.g., WWTP and river water).

A chiral stationary phase (CSP) able to resolve the racemic mixture of the chiral pharmaceuticals proposed was established, using a mobile phase compatible with on-line sample preparation and tandem mass spectrometry (MS). The first approach was carried out with HPLC with Fluorescence Detector (FD) equipment using polysaccharide derivatives CSP and a vancomycin-based CSP (Chirobiotic V). The Chirobiotic V CSP was chosen due to its versatility and other pharmaceuticals were included: alprenolol, bisoprolol, metoprolol, salbutamol, fluoxetine and its active metabolite nor-fluoxetine. HPLC-FD methods to measure the enantiomeric ratio of the chiral compounds during the biodegradation studies, using activated sludge from aerated tanks of wastewater treatment plants (WWTP), were validated. To evaluate enantioselective biodegradation of the target compounds in laboratory-scale experiments, minimal salts medium (MM) was supplied with the racemic mixtures of the compounds as the sole source of carbon and in the presence of acetate. Activated sludge from WWTP and specialized microbial cultures available in our laboratories served as inocula. The enantioselective biodegradation was observed in the case of alprenolol, metoprolol and fluoxetine.

An enantioselective LC-MS/MS method to measure the enantiomeric ratio of the chiral compounds in environmental samples, including surface and estuarine water and effluent from WWTP, from different sources and locations, is under development.



Student: Catarina Raquel Leite Amorim

Supervisor: Paula Maria Lima e Castro, CBQF/Escola Superior de Biotecnologia-UCP.

Co-Supervisors: Carlos Manuel Magalhães Afonso, Faculdade de Farmácia - UP e Maria de Fátima Magalhães Carvalho, CBQF/Escola Superior de Biotecnologia-UCP

Title: Microbial degradation of fluorinated compounds – studies on biodegradation mechanisms and biotreatment systems

Summary

During recent years, the use of synthetic fluoroaromatic compounds in pharmaceutical, agricultural and other industrial applications has significantly increased due to their useful properties. Fluoro-substitution provides significant biological activity and stability to the molecule. However, the stability that makes them interesting for commercial use, makes them environmental contaminants due to their recalcitrance. Therefore, the search for microorganisms for the removal of these micropollutants from wastewaters is of great importance.

The work developed intends to gain knowledge on the biodegradation of fluorinated compounds by screening and characterising microorganisms capable to degrade them, investigating the catabolic reactions involved and studying the feasibility of their degradation in high biomass biotreatment systems. A range of previously isolated bacterial strains were tested for their capacity to degrade fluorinated compounds. Target compounds include 4-fluorocinnamic acid (4-FCA), fluoroanilines (FA) and fluoroquinolones (FQ).

Complete mineralization of 4-FCA was achieved in the absence/presence of a conventional carbon source by *Rhodococcus qingshengii* strain S2, isolated from a bioreactor degrading other fluorinated compound. The presence of a conventional C source enhanced the biodegradation rate and a metabolic intermediate, 4-fluorobenzoate (4-FBA) was detected during 4-FCA degradation. The performance of a Rotating biological contactor (RBC) towards shock loadings of 4-FCA was evaluated. After bioaugmentation with S2 strain, degradation of 4-FCA was achieved. Along its operation, other bacterial strains able to degrade 4-FCA were recovered from the established biofilm.

A fluorobenzene degrading bacterium, *Labrys portucalensis* strain F11, was tested under different culture conditions for the degradation potential towards 2-, 3- and 4-FA. The strain was capable to completely degrade 2-FA and partially degrade 3-FA and 4-FA. Total dehalogenation of the substrate was only achieved for 2-FA. The degradation of 3-FA and 4-FA was characterized by incomplete defluorination, suggesting accumulation of fluorinated intermediates.

Strain F11 was also able to degrade FQs. The strain was able to degrade ofloxacin (OFL), while partial degradation was achieved for norfloxacin (NOR) and ciprofloxacin (CPF). Stoichiometric fluoride release was not observed. Metabolic intermediates were detected but were not yet identified. A granular sequencing batch reactor (SBR) was established for the treatment of FQs. Activated sludge obtained from a Municipal Wastewater Treatment was used as inoculum for the start up. The effect of FQs shock loadings on the diversity of the microbial population present in aerobic granules before and after inoculation with a FQ-degrading strain (Strain F11) is being investigated.



JORNADAS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS DE DOUTORAMENTO

Ano letivo 2011-2012

5 e 6 de Julho

Aluno: Dália Rosa Alves Carvalho

Orientador/Co-Orientadores: Professor Domingos Almeida / Doutora Susana Carvalho; Doutor Ep Heuvelink

Tema da Tese: “Compreender e melhorar a duração da vida em jarra em *Rosa hybrida*: das condições de cultivo à longevidade pós-colheita”

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

Devido ao aumento da competição registada no setor da horticultura ornamental e considerando que a duração da vida em jarra é um fator preponderante para a satisfação do consumidor, a produção de plantas de elevada qualidade tem vindo a adquirir uma importância crescente. O desequilíbrio hídrico é um dos problemas mais comuns durante a vida na jarra conduzindo à redução da longevidade em flores de corte. Durante o cultivo protegido de flores e na tentativa de conservar energia por razões económicas e ambientais, tem-se verificado um aumento da HR no interior da estufa (> 85%) com implicações negativas na longevidade em jarra. Contudo, conhecem-se diferenças de suscetibilidade entre cultivares de rosas a este problema. Este estudo tem como objetivo compreender os processos fisiológicos e genéticos envolvidos na redução da longevidade devido a uma perda de água excessiva (perda de água > absorção de água) e minimizar essa ocorrência através da implementação de estratégias de cultivo. Numa primeira fase testou-se a hipótese de que um estímulo mecânico (tigmomorfogénese) durante a expansão foliar seria capaz de provocar um aumento da quantidade de ácido abscísico o que levaria ao funcionamento normal dos estomas na fase de pós-colheita reduzindo a perda excessiva de água. No entanto, esta estratégia não se mostrou muito eficaz na medida em que os efeitos da ventilação no melhoramento da resposta estomática foram reduzidos. De futuro outras estratégias de cultivo irão ser analisadas, nomeadamente: salinidade elevada, stresse hídrico, enxertia. Estudos serão ainda desenvolvidos numa população tetraploide de rosas no sentido de se desenvolverem métodos de seleção para um melhor controlo da perda de água bem como de se identificarem fatores genéticos (QTL's) relacionados com esta característica. Esta população revelou-se segregante para a hidro-sensibilidade dos estomas (i.e. resposta dos estomas após 4 h de desidratação da folha).



JORNADAS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS DE DOUTORAMENTO

Ano letivo 2011-2012

5 e 6 de Julho

Aluno: Daniela de Vasconcelos Teixeira Aguiar da Costa

Orientador/Co-Orientador: Professor Domingos de Almeida / Professora Manuela Pintado

Tema da Tese: Alterações pós-colheita de fitoquímicos funcionais em mirtilo.

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

Desde os anos 90 a produção de mirtilos tem vindo a aumentar em Portugal. O mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) é um fruto caracterizado por uma elevada actividade antioxidante. Esta actividade é devida à presença de vários compostos neste fruto, como por exemplo antocianinas derivadas de malvidina, delphinidina, cianidina, petunidina e a peonidina, em flavonóides (catequina, epicatequina, mircetina, quercetina e kempferol), ácidos fenólicos (ácido clorogénico e ácido ascórbico (Burbudis *et al.*, 2009) e ácido hidroxicinâmico (Riihinen *et al.*, 2008)). Estudos recentes têm mostrado o efeito benéfico do consumo destes compostos para a saúde. No entanto a concentração destes compostos pode variar com: a cultivar, diferentes condições edafoclimáticas de produção (temperatura, luz, humidade, tipo de solo e fertilizações), colheita bem como com as condições de armazenamento. Deste modo com este trabalho pretendemos numa fase inicial caracterizar a evolução da qualidade comercial e fitoquímica ao longo do período de armazenamento (50 dias), de três cultivares de mirtilo *Vaccinium corymbosum* (Bluecrop, Goldtraube e Ozarkblue). Posteriormente com o intuito de manter ou aumentar a qualidade funcional dos mirtilos, avaliamos o efeito do etileno aplicado após a colheita, e a utilização de diferentes atmosferas de armazenamento (ar, 2% O₂ + 2% CO₂, 2% O₂ + 15% CO₂, e 21% O₂ + 15% CO₂) na qualidade comercial e fitoquímica nas mesmas cultivares.

A taxa de perda de água foi um dos factores limitativos do armazenamento dos mirtilos. A 'Ozarkblue' foi a que apresentou a menor taxa de perda de água /dia. A 'Bluecrop' foi a que apresentou um maior teor de sólidos solúveis. A 'Goldtraube' foi a que apresentou uma maior acidez. O teor de fenólicos totais diminuiu para a 'Goldtraube' e para a 'Ozarkblue' até aos 10 dias e estabilizou ou reduziu suavemente até ao final do armazenamento. Enquanto que na 'Bluecrop' não apresentou diferenças significativas no teor de fenólicos ao longo do armazenamento. O conteúdo em antocianinas diminuiu 62, 39 e 42% respectivamente para Goldtraube, Bluecrop e Ozarkblue nos primeiros 15 dias de armazenamento e depois manteve-se constante. O perfil de compostos fenólicos varia (aumenta ou diminui) durante o armazenamento de acordo com cultivares seleccionadas.

Relativamente ao efeito do etileno parece ser dependente da cultivar, deste modo influenciou o conteúdo de antocianinas e a capacidade antioxidante na 'Bluecrop' e na Goldtraube, mas não influenciou na 'Ozarkblue'. No entanto este tratamento não afectou parâmetros da qualidade comercial como a firmeza e a cor. A composição da atmosfera não influenciou de forma consistente a qualidade fitoquímica nem parâmetros como a acidez titulável e a cor.



Student: Helena Maria Gomes Moreira

Supervisor/Co-Supervisor: Paula Maria Lima Castro / António Osmaro S. S. Rangel, Ana Paula G. C. Marques

Title: Investigations into the role of soil microorganisms in the re-vegetation of environmentally disturbed sites as a tool for land use restoration and biomass production

Summary

Industrial and mining activity left a legacy of environmentally disturbed sites. The re-establishment of a vegetation cover, reducing contamination, namely by metals, mobility and/or bioavailability for entry into the food chain is a potential economically feasible and environmental friendly alternative. The use of plant species with high biomass yields allows not only to revert degraded soil, but also the use of the biomass produced for other activities from which economical gains can be achieved, such as energy production, avoiding the destruction of natural habitats by conversion into farmland. Plant development in toxic environments can be influenced by soil microorganisms.

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) communities can play a major role in the establishment of plants in polluted soils; these organisms have been used to reduce plant stress associated with phytoremediation of contaminated soils. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are also a major component of the rhizosphere and form mutualistic associations with most plant species, promoting plant growth and greatly influencing their survival. The objectives drawn in this working programme are: to evaluate the contribution of AMF, PGPR and amendments in the establishment of selected plant species in disturbed soils; to assess, with classical and molecular biology tools, the establishment and activity of inoculated AMF and PGPR in the soil/rhizosphere; to understand the mechanisms of stabilisation of heavy metals (namely Cd and Zn) by inoculated plants.

The experimental work began with a survey of the colonising species proliferating in an industrialised heavy metal contaminated site – Estarreja - and their prospective for use in phytoremediation of Zn contaminated soils was assessed. In a 1-year screening, 27 species were found; amongst them, there were species with higher Zn shoot accumulation and bioconcentration as well as high metal translocation, presenting as suitable for phytoextraction; others excluded metal from aboveground tissues, behaving as stabilizers.

From this work, *Zea mays* was the chosen plant to proceed the investigation, due to its energetic valorization potential. In greenhouse experiments, plants were grown in Cd and Zn contaminated soils, inoculated with two PGPB - *Ralstonia eutropha* and *Chryseobacterium humi*. At the end of the experiment plants were harvested and levels of Zn and Cd in their roots and shoots were determined. Biomass and metal accumulation were assessed. The bacterial dynamics are being evaluated using molecular tools. Bacterial inoculation was significant in *Z. mays* growth and metal accumulation. This study will allow obtaining information on the use of remediation combined with valuable crop production on under-exploited sites.



CATÓLICA PORTO
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

JORNADAS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS DE DOUTORAMENTO

Ano letivo 2011-2012

5 e 6 de Julho

Aluno: Maria José Gonçalves Alves

Orientador/Co-Orientador: Professora Manuela Pintado / Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Tema da Tese: Espécies bacterianas multi – resistentes do CHTMAD E.P.E – Unidade de Chaves: Perfil de sensibilidade e actividade antimicrobiana de cogumelos silvestres do Nordeste de Portugal.

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

Nas últimas décadas a presença de Microrganismos multirresistentes em infecções hospitalares tornou-se um grave problema de saúde pública. Uma vez que o consumo de antibióticos exerce pressão selectiva na emergência de resistência bacteriana, torna-se pertinente sensibilizar no sentido de monitorizar o seu uso. Por outro lado é amplamente reconhecida a necessidade de desenvolver novos agentes antimicrobianos para minimizar a ameaça de resistência aos diferentes antimicrobianos existentes no mercado. Assim, é nosso propósito avaliar a evolução das multirresistências ao longo de 3 anos em diferentes microrganismos utilizados a nível hospitalar, com o intuito de mostrar o aumento progressivo das resistências e assim sensibilizar a comunidade médica para o combate ao uso indiscriminado de antibióticos, bem como para a implementação de uma política de utilização de antimicrobianos adequados à epidemiologia local. Tendo em consideração a problemática anteriormente referida pretendemos ainda avaliar *in vitro* a actividade antimicrobiana de extractos de cogumelos silvestres da região do Nordeste Transmontano sobre diferentes espécies bacterianas multirresistentes pela determinação da Concentração Mínima Inibitória/Bactericida (CMI/CMB). Pela análise dos resultados estatísticos da evolução das multirresistências detectamos um perfil de resistência em que é evidente o agrupamento de microrganismos tendo em conta esse mesmo perfil. É evidente o aumento das resistências aos β - lactâmicos e às quinolonas por parte dos microrganismos Gram negativos. Verificamos que microrganismos pertencentes à flora normal como o *Staphylococcus epidermidis* se aproximam do perfil de resistência de microrganismos multirresistentes como MRSA. Quanto à avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos de cogumelos, os resultados das CMIs mostraram que os extractos de *Russula delica* e *Fistulina hepatica* inibem o crescimento das bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Morganella morganni* e *Pasteurella multocida*) e das Gram positivas (*S. aureus*, MRSA, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Str. pyogenes*). Um efeito bactericida de ambos os extratos foi observado para a *P. multocida*, *Str. agalactiae* e *Str. pyogenes* com CMB de 20, 10 e 5 mg/mL, respectivamente. *Lepista nuda* demonstrou efeito bactericida sobre a *P. multocida* com (CMB - 5 mg/ml) e um efeito inibitório para o *Proteus mirabilis* (CMI – 20mg/ml). *Ramaria botrytis* apresentou actividade contra *E. faecalis* e *L. monocytogenes* apresentando efeito bactericida para a *P. multocida* (CMB 20 mg/ml), *Str. agalactiae* (CMB 20 mg/ml) e *Str. pyogenes* (CMB 10 mg/ml). O extracto de *Leucopaxillus giganteus* inibiu o crescimento da *E. coli* e *P. mirabilis* sendo bactericida para a *P. multocida*, *Str. pyogenes* e *Str. agalactiae*. Relativamente à acção dos compostos puros mais representativos dos extractos, a maior actividade foi observada novamente em bactérias Gram positivas, tal como se verificou nos extractos



Aluno: Sandra Maria Dias dos Santos

Orientador/Co-Orientador: Professora Doutora Manuela Pintado / Aida Silva

Tema da Tese: Nanoencapsulamento de extractos de plantas aromáticas

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

As plantas aromáticas, directamente ou sob a forma de extractos, apresentam uma longa história de utilização nos produtos alimentares, os quais, para além da função de aromatizante, também têm sido aplicados com objectivo de controlar o crescimento de microrganismos indesejáveis, bem como incrementar propriedades antioxidantes e valor nutricional. Com este trabalho pretende-se nanoencapsular extractos aquosos (fervura e infusão) e óleos essenciais de plantas aromáticas em ciclodextrinas com objectivo de melhorar a sua estabilidade, com manutenção da sua actividade funcional (antioxidante, antimicrobiana, aromatizante) para posterior aplicação em produtos alimentares. Neste sumário, apenas são apresentados os estudos referentes aos óleos essenciais.

As flores de carqueja, folhas de coentro, salsa e manjerico foram submetidas a hidrodestilação num aparelho de clewenger utilizando duas metodologias de extracção – a clássica, em manta de aquecimento e em microondas. Cada óleo essencial foi avaliado em termos de composição química, actividade antioxidante, actividade antimicrobiana e potencial genotóxico (mutagénico) *in vitro* com e sem metabolização hepática.

O rendimento em óleo essencial foi de 0,08% (m/m) para o manjerico, 0,05% (m/m) para o coentro e salsa e 0,01% (m/m) para a carqueja. Para o óleo essencial de flores de carqueja os componentes presentes em maior quantidade foram o n-heptanal, 1-octeno-3-ol e n-nonanal, constituindo c. 19,6; 25,2 e 8,2%, respectivamente, para o óleo essencial de coentro o dec-9-en-1-ol e o decanol (30,3 e 23,3 %, respectivamente), para o óleo essencial de salsa o apiol e felandreno (32,7 e 12,2%, respectivamente) e para o óleo essencial de manjerico o linanol e limoneno (30,3 e 20,8%, respectivamente). Todos os óleos essenciais mostraram actividade antioxidante em particular o óleo de manjerico ($0,105 \pm 0,002$ g/L eq. ác. ascórbico) seguido do óleo de coentro ($0,078 \pm 0,005$ g/L eq. ác. ascórbico) do óleo de carqueja ($0,063 \pm 0,021$ g/L eq. ác. ascórbico) e do óleo de salsa ($0,054 \pm 0,002$ g/L eq. áÁc. ascórbico) No que se refere à actividade antimicrobiana, os óleos essenciais de coentro, salsa e manjerico mostraram elevada actividade antimicrobiana para as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria innocua* e ligeira actividade para a *Salmonella spp* e *Escherichia coli*. No que diz respeito à avaliação do potencial genotóxico, os óleos essenciais não mostraram qualquer toxicidade.

Os óleos essenciais caracterizados foram encapsulados em ciclodextrinas. Os diferentes encapsulados (diferentes concentrações de ciclodextrina e diferentes volumes de óleo essencial adicionado) foram analisados pela técnica de espectroscopia de aniquilamento do tempo de vida do positrão – PALS (Positron Annihilation lifetime Spectroscopy) por forma a comprovar o processo de encapsulamento, especificando o nível de ocupação das cavidades da ciclodextrina por parte do óleo essencial. Ao serem medidos os tempos de vida e intensidade do positrão, verificou-se que para todos os óleos se verificou uma diminuição do volume das cavidades de ciclodextrina. As melhores condições de encapsulação foram seleccionadas, correspondendo a 2 grama de ciclodextrina em 50 mL de água com a adição de 0,9 mL de óleo essencial. Actualmente encontra-se em curso a aplicação dos encapsulados em produtos alimentares, nomeadamente, produtos lácteos e produtos cárneos.



Student: Rui Miguel Barros de Sousa Magalhães

Supervisor/Co-Supervisor: Paula Teixeira / Gonçalo Almeida

Title: Characteristics of specific strains of *Listeria monocytogenes* potentiating persistence in food and food processing environments and relevance to food safety.

Summary

Listeriosis is a severe illness with a high mortality rate caused by *Listeria monocytogenes*. The ubiquitous nature and ability to grow in harsh conditions, makes this pathogen of special concern for the food industry, which is a known problem in Portugal. The most important source of contamination is cross-contamination by the equipment and general Food Processing Environment, some strains cause persistent contamination over several months, while others are recovered only sporadically.

From an already phenotypic/genotypic/epidemiologically characterized strains recovered from foods and FPE, specific features that may contribute to the persistence of strains in food and FPE will be determined. Methodologies like protein expression patterns, lysogeny, phage and bacteriocins resistance and strain dependent specific virulence markers will be used.

Resistance to bacteriocins of persistent and non-persistent *L.monocytogenes* strains was investigated. 37 lactic acid bacteria cultures, previously identify as anti-listerial bactericin producers were tested against forty-nine strains representing persistent and non-persistent pulsotypes. Results indicate that although sensitivity to bacteriocins was strain dependent no evidence was found that persistent strains were more resistance than non-persistent ones and no correlation was found between sensitivity to bacteriocins and serotype or source of isolation.

The innovation of this work is the investigation of a broader range of strains, in number and in diversity and grown under diverse conditions representing those found in FPE.



JORNADAS DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS DE DOUTORAMENTO

Ano letivo 2011-2012

5 e 6 de Julho

Aluno: Teresa Maria Martins Deuchande

Orientadores/Co-Orientador: Prof. Domingos Almeida / Prof^ª. Fernanda Fidalgo; Dr. Christian Larrigaudière

Tema da Tese: Acastanhamentos internos em pera 'Rocha' durante o armazenamento prolongado

Sumário (máx. 3000 caracteres, incluindo espaços)

O objetivo do trabalho é estudar o desenvolvimento e a base e bioquímica dos acastanhamentos internos em pera 'Rocha' durante o armazenamento prolongado, com ênfase no sistema antioxidante e metabolismo fermentativo. O esclarecimento da base científica associada ao desenvolvimento desta desordem poderá contribuir para desenvolver recomendações de manipulação pós-colheita, capazes de minorar a incidência do acastanhamento interno.

No primeiro ano estudou-se o desenvolvimento do acastanhamento interno em pera 'Rocha' relativamente às condições de armazenamento e estágio de maturação dos frutos à colheita. Avaliaram-se ainda as atividades das enzimas do sistema antioxidante de defesa e concentrações de alguns metabolitos fermentativos. As peras foram colhidas em 3 estágios de maturação (precoce, ótimo, e tardio) e armazenadas durante 6 meses a 0 ° C + O₂ 3% + 0.5% de CO₂ (armazenamento em atmosfera controlada normal) e 2 meses a 0 ° C + 1% O₂ + 10% CO₂ (atmosfera controlada indutora de acastanhamento). Os sintomas do acastanhamento interno foram classificados em duas categorias: decomposição necrótica húmida e cavidades secas. Após 4 meses de armazenamento em atmosfera controlada normal, os frutos das colheitas precoce e ótima não desenvolveram acastanhamento, enquanto 25% dos frutos colhidos tardiamente sofreram alteração sendo afetados com um índice de ca. 0.1. Após 2 meses de armazenamento em AC com CO₂ elevado, a desordem afetou, em média, 90% dos frutos. Os frutos colhidos tardiamente apresentaram a maior incidência (98%) e índice (0.72) de acastanhamento, enquanto os frutos colhidos precocemente e no estágio de maturação ótimo tiveram 90 e 92% de incidência e índices de 0.46 e 0.67, respetivamente. A incidência dos acastanhamentos internos foi positivamente correlacionada com o aumento dos níveis de acetaldeído e etanol nos frutos da colheita tardia, tanto à colheita como após 2 meses de armazenamento, mas não com a alteração do potencial de eliminação do H₂O₂ (atividades da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POX)). Assim, propôs-se utilizar os marcadores fermentativos para prever a sensibilidade da pera 'Rocha' ao desenvolvimento dos acastanhamentos internos.

Em trabalhos futuros pretende-se definir um modelo preditivo de desenvolvimento dos acastanhamentos internos tendo em conta a acumulação dos metabolitos fermentativos, e compreender qual o fator determinante da sensibilidade dos frutos colhidos em diferentes estágios de maturação ao desenvolvimento dos acastanhamentos.