

Caracterização do potencial de inovação dos recursos genéticos endógenos naturais: compostos com atividades antimicrobiana e anti-biofilme

Madalena Dias Soares

Relatório de estágio curricular realizado no Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Maria Inês Simões Brandão
Co-orientador: Prof. Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira

outubro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Madalena Dias Soares, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11836 de Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 9/10/2023

Madalena Dias Soares

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras Doutora Inês Brandão e Prof.^a Doutora Susana Ferreira por todo o apoio durante este ano, e pela disponibilidade e paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas. Foi graças aos seus ensinamentos que cheguei até aqui e que compreendo um pouco do que é o mundo da investigação.

Quero agradecer às Eng.^{as} Ana Riscado, Ana Silveira, Alexandra Camelo, Inês Barreto e Rita Ramos, pelo acompanhamento ao longo deste projeto. O vosso contributo foi essencial na minha evolução, tanto a nível académico como pessoal.

Agradeço também ao CATAA e ao Doutor Christophe Espírito Santo por me ter aceitado como estagiária e pela enorme oportunidade que foi trabalhar nas suas instalações. Agradeço também a todos os outros colaboradores não mencionados que tão bem me receberam durante este ano.

Obrigado aos meus amigos do Lótus Branco e do Meimão pelos pequenos grandes momentos que me ajudaram a distrair e desanuviar o stress.

Ao David e à Sofia por partilharem parte deste percurso comigo e me acompanharem nesta aventura.

À minha família, principalmente aos meus pais e à minha irmã por estarem sempre presentes para mim de toda e qualquer forma possível, quer para me suportarem, confortarem ou simplesmente arrancarem-me um sorriso quando menos esperava.

E por último um agradecimento muito especial à EncantaTuna por ser a minha segunda casa e a família que eu escolhi. Especialmente às minhas madrinha, irmã e afilhada, Inês Maio, Inês Fonseca e Margarida Soares, pela paciência em me ouvirem e por sempre acreditarem em mim. Foram uma força constante este ano que nunca me abandonou e sempre esteve lá para me apoiar quando nem tudo corria da melhor forma.

A todos, um muito obrigado!

Resumo

Ao longo da história da Humanidade, as plantas e seus extratos foram utilizados em diversos contextos, inclusive durante milhares de anos a medicina tradicional dependeu fortemente de medicamentos derivados de plantas para tratar vários problemas de saúde, em grande parte devido à presença de metabolitos biologicamente ativos. Estes compostos, incluindo antioxidantes e agentes antimicrobianos, têm sido utilizados devido aos seus potenciais benefícios à saúde. Quando se trata da indústria alimentar e das tendências de consumo associadas, observa-se uma preferência cada vez maior por produtos livres de conservantes sintéticos e minimamente processados. Assim, são necessárias alternativas naturais, quer para aplicação direta nos alimentos, quer para incorporação em embalagens.

De modo a valorizar e descobrir novas aplicações para diferentes recursos endógenos do centro de Portugal, estudaram-se as suas atividades antimicrobiana e anti-biofilme em três microrganismos patogênicos de origem alimentar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que extratos aquosos de folha de oliveira apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, que o extrato etanólico do mesmo recurso apenas apresentou em *P. aeruginosa* e o metanólico somente em *S. aureus*. Extratos aquosos de folha de sabugueiro, extratos aquosos e etanólicos de folha de medronheiro, extratos metanólicos de medronho e extratos aquosos e etanólicos de folha de castanheiro demonstraram atividade inibitória face aos três microrganismos testados, e extratos etanólicos da pele interior da castanha são eficazes em *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Relativamente à influência dos extratos na formação de biofilme, verificou-se interferência de extratos aquosos de folha de castanheiro em biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, de extratos aquosos de folha de oliveira em *S. aureus* e ainda de um extrato metanólico e etanólico deste recurso em apenas um destes microrganismos, respetivamente. Extratos aquosos de folha de medronheiro são eficazes na inibição de formação de biofilmes de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e um extrato aquoso de folha de sabugueiro demonstrou-se eficaz nos três microrganismos. Em biofilmes maduros, destacou-se a ação de um extrato aquoso e etanólico de folha de oliveira em biofilmes de *P. aeruginosa* e de um extrato aquoso de folha de medronheiro em biofilmes de *L. monocytogenes*. Concluiu-se que os extratos vegetais dos recursos testados têm potencial para apresentar uma nova alternativa natural aos conservantes sintéticos, e consequentemente vir no futuro a ser utilizados pela indústria alimentar.

Palavras-chave

Atividade antimicrobiana; atividade anti biofilme; *Arbutus unedo*; *Bryonia dioica*; *Castanea Sativa*; *Olea europaea*; *Sambucus nigra*; *Vigna unguiculata*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*

Abstract

Throughout mankind history, plants and their extracts were used in diverse contexts, for thousands of years traditional medicine heavily relied on plant-derived remedies to address various health concerns, in great part due to the presence of biologically active metabolites. These compounds, including antioxidants and antimicrobial agents, have been used for their potential health benefits. When it comes to the food industry and associated consumer trends, an increasing preference is observed for products free of synthetic preservatives and minimally processed. Instead, natural alternatives are needed, either for direct application to food or for incorporating into packaging.

In this project, antimicrobial and anti-biofilm activities of several endogenous resources from central Portugal were studied on three food borne pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. It was found that aqueous olive leaf extracts have antimicrobial activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus*, ethanolic extract only for *P. aeruginosa* and methanolic only for *S. aureus*. Aqueous extracts of elderberry leaf, aqueous and ethanolic extracts of *Arbutus unedo* leaf, methanolic extracts of *A. unedo* fruit and aqueous and ethanolic extracts of chestnut leaf demonstrated inhibitory activity against the three microorganisms tested, and ethanolic extracts from the inner skin of the chestnut are effective on *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Regarding the influence of extracts on biofilm formation, there was interference from aqueous chestnut leaf extracts on biofilms of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, aqueous olive leaf extract in *S. aureus* and from methanolic and ethanolic extracts of this resource in only one of these microorganisms, respectively. Aqueous extracts of *A. unedo* leaf are effective in inhibiting biofilm formation of *S. aureus* and *L. monocytogenes*, and an aqueous extract of elderberry leaf has been shown to be effective against all three microorganisms. Regarding mature biofilms, the dispersal effects of aqueous and ethanolic extracts of olive leaves on *P. aeruginosa* biofilms and of *A. unedo* leaves aqueous extract on *L. monocytogenes* biofilms were particularly noteworthy. It was concluded that plant extracts from the tested resources have the potential to present a new natural alternative to synthetic preservatives, and consequently be used in the future by the food industry.

Keywords

Antimicrobial activity; antibiofilm activity; *Arbutus unedo*; *Bryonia dioica*; *Castanea Sativa*; *Olea europaea*; *Sambucus nigra*; *Vigna unguiculata*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*

Índice

1 Introdução	1
2 Local de estágio e atividades desenvolvidas	2
2.1 Laboratórios	2
2.1.1 Laboratório de Microbiologia	2
2.1.2 Laboratório de Físico-Química	2
2.1.3 Unidades Piloto	2
2.2 Atividades	3
2.2.1 Preparação de Material de Laboratório	3
2.2.2 Preparação de Meios de Cultura	3
2.2.3 Análises Microbiológicas	3
2.2.3.1 Provas de confirmação biológica	4
2.2.4 Ensaio de Biologia Molecular	5
2.2.5 Ensaio da conservação da castanha	6
2.2.6 Construção de retas UFC vs Densidade Ótica	6
3 Enquadramento teórico	7
3.1 Uso tradicional de plantas e o seu potencial uso na indústria alimentar	7
3.2 Extratos de plantas e compostos bioativos	8
3.3 Métodos de extração vegetal	9
3.4 Microrganismos de deterioração alimentar	11
3.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
3.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
3.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.5 Investigação de potencial antimicrobiano e anti-biofilme	13
3.5.1 Potencial antimicrobiano	13
3.5.2 Potencial anti-biofilme	15
3.6 Recursos estudados	16
3.6.1 <i>Arbutus unedo</i>	16
3.6.2 <i>Bryonia dioica</i>	17
3.6.3 <i>Castanea sativa</i>	17
3.6.4 <i>Olea europaea</i>	18
3.6.5 <i>Sambucus nigra</i>	19
3.6.6 <i>Vigna unguiculata</i>	20

4 Objetivos	22
5 Material e métodos	23
5.1 Colheita e preparação das amostras	23
5.2 Preparação dos extratos	23
5.3 Preparação das estirpes bacterianas	29
5.4 Atividade antimicrobiana	30
5.4.1 Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida	30
5.4.2 Difusão em disco	31
5.5 Atividade anti biofilme	31
5.5.1 Inibição da formação de biofilme	31
5.5.2 Dispersão de biofilme	32
5.6 Análise estatística	33
6 Resultados e discussão	34
6.1 Atividade antimicrobiana	34
6.1.1 Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida	34
6.1.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
6.1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
6.1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	37
6.1.2 Difusão em disco	38
6.2 Atividade anti biofilme	41
7 Conclusões	50
8 Bibliografia	51
9 Anexos	66

Lista de Figuras

- Figura 3.5.1 - Representação esquemática do método de difusão em disco
Figura 3.5.2 - Representação esquemática do método de difusão em meio líquido
Figura 5.1 – Conjunto de amostras vegetais utilizadas na produção de extratos
Figura 5.2.1 – Preparação do extrato Omet1
Figura 5.2.2 – Elaboração do extrato Baq7
Figura 5.2.3 – Extratos em liofilização
Figura 5.2.4 – Elaboração dos extratos FRaq16, FVaq17, FCaq18
Figura 5.2.5 – Ebulição dos extratos Oaq19 e Maq20
Figura 5.2.6 – Elaboração dos extratos Oet21 e Met22
Figura 5.2.7 – Elaboração dos extratos Oaq23 a Cet32 e CPaq34
Figura 5.2.8 – Elaboração dos extratos Oaq19, Maq20, Caq32, CPaq33 e Mmet35
Figura 5.2.9 – Extrato Mmet35 em maceração
Figura 6.2.1 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *P. aeruginosa* na presença de extratos de folha de oliveira
Figura 6.2.2 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *P. aeruginosa* na presença de extratos de folha de sabugueiro
Figura 6.2.3 - Percentagem de biomassa de biofilme formada na presença de extratos de folha de castanheiro
Figura 6.2.4 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *S. aureus* na presença de extratos de folha de sabugueiro
Figura 6.2.5 – Percentagem de biomassa de biofilme formada por *S. aureus* na presença de extratos de folha de oliveira
Figura 6.2.6 – Percentagem de biomassa de biofilme formada na presença de extratos de folha de medronheiro
Figura 6.2.7 – Percentagem de biomassa de biofilme formada por *L. monocytogenes* em extratos de sabugueiro
Figura 6.2.8 - Percentagem de biomassa de biofilme de *P. aeruginosa* presente após ação de extratos de folha de oliveira em biofilmes maduros
Figura 6.2.9 - Percentagem de biomassa de biofilme de *P. aeruginosa* presente após ação de extratos de folha de sabugueiro em biofilmes maduros
Figura 6.2.10 - Percentagem de biomassa de biofilme presente após ação de extratos de folha de castanheiro em biofilmes maduros
Figura 6.2.11 - Percentagem de biomassa de biofilme de *S. aureus* presente após ação de extratos de oliveira em biofilmes maduros
Figura 6.2.12 - Percentagem de biomassa de biofilme de *S. aureus* presente após ação de extratos de sabugueiro em biofilmes maduros
Figura 6.2.11 - Percentagem de biomassa de biofilme de *L. monocytogenes* presente após ação de extratos de sabugueiro e medronheiro em biofilmes maduros

Lista de Tabelas

Tabela 5.1 – Grupos de amostra

Tabela 5.4 - Concentrações de cada extrato testadas no ensaio de determinação da CMI

Tabela 6.1.1 – Resultados CMI e CMB

Tabela 6.1.2 – Diâmetros de inibição (mm) relativos às três concentrações de extrato testadas

Lista de Acrónimos e Siglas

ADH	Hormona Antidiurética, do inglês <i>Antidiuretic hormone</i>
APT	Água Peptonada Tamponada
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
DO	Densidade Ótica
HEPA	Do inglês “ <i>High Efficiency Particulate Air</i> ”
ISO	Do inglês “ <i>International Standardization Organization</i> ”
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

Capítulo 1

Introdução

O Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), com localização em Castelo Branco, visa proporcionar apoio tecnológico ao setor alimentar através de investigação, prestação de serviços à população e ainda através do desenvolvimento de novos produtos alimentares. É constituído por três unidades laboratoriais (físico-química, microbiologia e análise sensorial) e quatro unidades piloto (lácteos, cárneos, azeites e hortofrutícolas).

O estágio final de Mestrado em Bioquímica foi inserido no Programa Integrado de IC&DT CULTIVAR – Rede de Competências para o Desenvolvimento Sustentável e Inovação no Setor Agroalimentar, um projeto que pretende valorizar os recursos genéticos endógenos da Região Centro e impulsionar o setor agroalimentar de forma sustentável. Assim, o trabalho de estágio focou-se na caracterização de atividades antimicrobiana e anti-biofilme de alguns destes recursos endógenos de modo a avaliar o seu potencial uso como conservantes naturais.

No início do estágio, elaborou-se uma pesquisa bibliográfica de modo a selecionar recursos de interesse disponíveis na época desejada, técnicas de extração vegetal e metodologias para o estudo das atividades antimicrobiana e anti-biofilme. Após esta fase, iniciou-se a produção dos extratos a partir dos recursos selecionados, e a sua testagem para as características pretendidas, no laboratório de microbiologia. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente.

Durante a realização do trabalho de investigação, a presença no CATAA serviu também como meio de contacto com um contexto laboratorial externo ao ensino, que permitiu o acompanhamento de várias técnicas, análises e ensaios que enriqueceram as competências adquiridas na universidade e as inserem num ambiente laboral.

Capítulo 2

Local de Estágio e Atividades Desenvolvidas

2.1 Laboratórios

2.1.1 Laboratório de Microbiologia

O Laboratório de Microbiologia é constituído por várias salas dispostas de modo a promover o sentido da “marcha em frente”, ou seja, cada fase do processo de análise microbiológica está atribuída a uma sala, e estas estão dispostas de modo que a amostra não retroceda no seu percurso, isto para evitar qualquer contaminação cruzada. Assim, existem salas definidas para a preparação de meios e esterilização de material, preparação de amostras, sementeiras, ensaios de biologia molecular, incubação, e ainda um espaço dedicado à limpeza e descontaminação do material.

Neste laboratório é possível encontrar uma variedade de equipamentos tais como balanças, agitadores peristálticos, autoclaves, banho termostaticado, câmaras de fluxo laminar de segurança biológica classe II, estufas, microscópios, centrífugas e todas as salas estão equipadas com filtros de ar HEPA (do inglês, *High Efficiency Particulate Air*).

No decorrer do estágio, o trabalho de investigação percorreu todas áreas do laboratório de microbiologia na preparação de meios, pesagens e diluições, inoculações, incubações, bem como esterilização e limpeza do material.

2.1.2 Laboratório de Físico-Química

O Laboratório de Físico-Química dispõe de uma sala ampla com algumas divisões dedicadas a equipamentos de grandes dimensões. Neste laboratório é possível encontrar equipamentos como hottes, evaporador rotativo, agitador orbital, cromatógrafos, liofilizadores, entre outros, bem como material de vidro corrente e diversos reagentes.

O espaço e equipamentos do Laboratório de Físico-Química foram utilizados durante o estágio para a finalização de alguns extratos.

2.1.2 Unidades Piloto

As Unidades Piloto consistem em áreas dedicadas à produção de novos produtos de vários géneros alimentares: hortofrutícolas, azeites, cárneos e lacticínios.

Nestes espaços encontram-se diversos equipamentos como desidratadores, robôs de cozinha, câmaras frigoríficas, extratores de óleo, moinhos, equipamentos para produção de azeite e queijo, entre muitos mais.

Durante o estágio, as Unidades Piloto foram utilizadas na preparação das amostras para a elaboração dos extratos, ou seja, lavagem, secagem e trituração do material vegetal.

2.2 Atividades

2.2.1 Preparação de material de laboratório

Tal como as amostras recebidas, também o material adota um percurso específico no Laboratório de Microbiologia. Após elaboração de um ensaio, todo o material utilizado é levado para uma sala destinada à sua descontaminação, sendo colocado numa autoclave designada para este efeito. Ao terminar um ciclo de 30 minutos a 121°C, o material reutilizável é lavado numa máquina de lavar com detergente e água purificada, e posteriormente colocado numa estufa para secagem. Aquando da necessidade de nova utilização, o material é levado para a sala de esterilização e preparação de meios, e após ser submetido a um novo ciclo de autoclave de 15 minutos a 121°C, regressa ao seu devido local no laboratório.

De modo a garantir a segurança e o bom funcionamento das autoclaves, utilizam-se indicadores químicos e biológicos. O indicador químico consiste numa fita com riscas brancas que se alteram para preto na presença de altas temperaturas. O indicador biológico é uma ampola com *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953) e um indicador colorimétrico (Sterikon® Plus Bioindicator, Merck, Darmstadt, Alemanha). Esta ampola é colocada na autoclave e após o ciclo é incubada a 60°C durante 48 horas. Se a cor da ampola não sofrer alteração, garante-se a inativação do microrganismo e consequentemente o bom funcionamento do equipamento.

2.2.2 Preparação de meios de cultura

A preparação de meios de cultura é realizada na sala destinada a este fim e à esterilização de material. Primeiramente, é necessário determinar as quantidades de meio de cultura necessárias a utilizar, e calcular as quantidades adequadas tanto de meio como de água. Antes de se iniciar a preparação do meio de cultura deve sempre desinfetar-se e limpar a bancada com álcool etílico 70% (v/v), presente em todas as salas, verificar a tara da balança (através de um peso padrão) e preparar todo o material necessário. Após pesagem, hidratação do meio e, em caso de

necessidade, ajuste do pH, o recipiente onde este foi preparado deve ser identificado com indicador químico, a sigla do meio de cultura em maiúsculas, seguido da data de preparação, e levado à autoclave para esterilização. Concluído o ciclo, o meio deve ser arrefecido em banho termostaticado a 45-50°C antes de ser utilizado e, em caso de sobrar quantidade após utilização, esta deve ser armazenada num frigorífico a 4°C.

2.2.3 Análises microbiológicas

No CATAA são realizadas análises de pesquisa e contagem de microrganismos de diferentes amostras alimentares. Durante o estágio decorreram análises a patê, carne moída e castanha.

As metodologias aplicadas para tal são as definidas pela *International Standardization Organization* (ISO) e todos os protocolos utilizados encontram-se reunidos num dossier para consulta em caso de necessidade. Na sala de preparação de amostras, a amostra é pesada e prepara-se a suspensão inicial, ou solução-mãe, com água peptonada tamponada. A solução é colocada num homogenizador (Stomacher®), um equipamento que simula os movimentos peristálticos, de modo a homogeneizar a amostra e só depois segue para a sala das sementeiras, onde é sucessivamente diluída e inoculada de acordo com o protocolo adequado. As placas seguem para a sala de incubação onde são colocadas em estufa à temperatura ótima de crescimento do microrganismo em questão.

Após o tempo de incubação, as placas são analisadas, por contagem das Unidades Formadoras de Colónias (UFC), e em caso de necessidade aplicam-se ensaios de confirmação, para garantir a presença ou ausência de microrganismos específicos.

Durante o período de estágio foram analisadas diversas amostras, como exemplo numa amostra de patê foi pesquisada a presença de *Listeria monocytogenes*. No caso da amostra de carne moída, realizaram-se ensaios de contagem para microrganismos a 30°C, *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva e *Staphylococcus* coagulase positivos, e ensaios de pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Relativamente à castanha, foi feito um ensaio de contagem de bolores, leveduras e microrganismos a 30°C.

Na sequência de algumas análises microbiológicas há a necessidade de aplicar testes de confirmação, que consistem na caracterização das colónias isoladas através de diferentes técnicas de modo a, como o nome indica, confirmar a presença de um microrganismo específico na amostra.

2.2.3.1 Provas de confirmação biológica

A coloração de Gram é uma técnica que permite fazer a distinção entre bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas, e observar a sua forma e disposição. Para realizar este teste é necessário fazer um esfregaço do microrganismo em questão, e de seguida adicionar

consecutivamente violeta de cristal, lugol, solução descorante (álcool-acetona) e safranina, lavando com água destilada entre a aplicação de cada reagente. As bactérias Gram positivas adotam uma coloração violeta/azul, pois devido à sua camada única e mais espessa de peptidoglicano, retêm o primeiro corante aplicado, enquanto as bactérias Gram negativas apresentam uma cor rosa/vermelho, retendo apenas a coloração da safranina.

O teste da oxidase identifica bactérias que apresentem a enzima citocromo C oxidase. Este teste é elaborado através de tiras comerciais, onde se coloca o inóculo. Se ocorrer alteração da cor a bactéria apresenta esta enzima e é, portanto, capaz de realizar respiração aeróbia.

Relativamente ao teste da catalase, este é utilizado para determinar a presença de uma enzima com o mesmo nome, responsável pela produção de radicais livres de oxigénio. Um resultado positivo apresenta-se como produção de gás (oxigénio) ao aplicar peróxido de hidrogénio ao inóculo, observável pela ocorrência de efervescência.

A hemólise é uma prova de confirmação comumente utilizada para verificar a lise de hemácias pelo microrganismo. O microrganismo isolado é inoculado em agar-sangue, e em caso de teste positivo devem observar-se halos circundantes à colónia, indicando degradação das hemácias.

Por fim, as galerias API® consistem num conjunto de testes bioquímicos que permitem identificar um perfil bacteriano característico, avaliando parâmetros como glucose, hormona antidiurética (ADH), ureia, entre outros. As galerias devem ser inoculadas e incubadas de acordo com as instruções de fabrico e os resultados avaliados como positivos ou negativos. Os valores positivos são somados de modo a obter um valor numérico que é comparável com uma base de dados para determinar o microrganismo presente.

2.2.4 Ensaios de biologia molecular

Durante o estágio realizaram-se ensaios de isolamento e sequenciação de ácidos nucleicos de microrganismos, bem como sequenciações genómicas. Estes ensaios requerem a utilização de reagentes tratados contra RNases e DNases de modo a não degradarem o material genético. Após a extração do material genético a sequenciação é realizada num sequenciador Nanopore (MinION® da Oxford Nanopore Technologies), um equipamento que permite a análise em tempo real de fragmentos longos de RNA ou DNA através da monitorização da corrente elétrica produzida pela passagem do ácido nucleico através de um poro.

Estes tipos de ensaio são realizados através de kits comerciais, que se fazem também acompanhar não só dos reagentes e enzimas necessários, mas também de protocolos estabelecidos pelo fabricante.

2.2.5 Ensaio da conservação da castanha

Ao longo do estágio, realizou-se no CATAA um ensaio onde se avaliou a influência de diferentes formas de conservação da castanha na sua qualidade e tempo de vida útil. Grupos de 20 castanhas foram, em triplicado, armazenadas em diferentes atmosferas (5% CO₂, 15% CO₂ e Ionizada) durante 150 dias. A cada 30 dias, as castanhas eram avaliadas quanto à massa, cor interior e exterior, textura, pH e era ainda feita uma análise sensorial.

Pretendia-se determinar qual a melhor forma de armazenar a castanha, para fornecer aos produtores uma forma de conservarem este fruto durante mais tempo, evitando desperdício.

2.2.6 Construção de retas UFC vs Densidade Ótica (DO)

De modo a avaliar o comportamento de microrganismos e estabelecer uma relação entre a DO das suas culturas e as unidades formadoras de colónias, realizou-se um ensaio para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Estas bactérias foram inoculadas em placas de Nutrient Agar (NA), Mueller Hinton Agar (MHA), Tryptic Soy Agar (TSA) e NA, respetivamente, a partir de culturas criopreservadas em 1:2 de glicerol 30%, para revivificação. Após 20-24 horas, eram retiradas algumas colónias, e colocadas em crescimento em Nutrient Broth (NB), Mueller Hinton Broth (MHB), Tryptic Soy Broth (TSB) e água peptonada tamponada (APT), respetivamente, a 30°C. Ao longo de 8-12h, retiravam-se pequenas alíquotas das culturas, para determinar as suas DO no espectrofotómetro. Paralelamente, quando o microrganismo atingia a fase exponencial de crescimento, eram plaqueadas diluições de 1:10 em PBS, em placas de NA, MHA, TSA e NA, respetivamente. Assim, pretendiam-se obter dois gráficos: um gráfico DO vs Tempo, resultante das medições espectrofotométricas ao longo do tempo, e um gráfico UFC vs DO obtido através da contagem das colónias obtidas em placa.

As retas DO vs Tempo, foram utilizadas para determinar o início da fase exponencial dos microrganismos utilizados no trabalho, encontrando-se os gráficos das suas curvas de crescimento no Anexo I.

Capítulo 3

Enquadramento Teórico

3.1 Uso tradicional de plantas e o seu potencial uso na indústria alimentar

Desde a Antiguidade que a Humanidade utiliza recursos naturais vegetais, quer para dar sabor a alimentos e bebidas, quer para fins medicinais de modo a tratar ou prevenir algumas doenças (Negi, 2012). Algumas destas plantas, consideradas medicamentos tradicionais, são ainda hoje utilizadas como parte de tratamentos habituais para determinadas doenças e como conservantes alimentares (Alviano & Alviano, 2009), sendo exemplos: o uso de folhas e de plantas aromáticas na preparação de infusões (Aleksic & Knezevic, 2014); o ácido acetilsalicílico, mais conhecido como aspirina, cujo predecessor ácido salicílico era originalmente extraído da casca do sabugueiro pelas civilizações egípcias e utilizado no alívio de dores musculares e articulares (Jones, 2010; Lichterman, 2004; Montirani et al., 2019); o ácido sórbico, primeiramente obtido do óleo da fruta da tramazeira, um composto com atividades antimicrobiana e fungistática atualmente implementado pela indústria alimentar nos alimentos e suas embalagens para a conservação de produtos (Naidu, 2000; Robach & Sofos, 1981; Sofos & Busta, 1981). A utilização de recursos naturais diminuiu com a evolução científica, com a descoberta da síntese orgânica, da química combinatória e do design computacional de medicamentos, que oferecem uma forma económica de obter estes compostos em elevadas quantidades sem esgotar os recursos naturais, e permite também obter compostos seguros provenientes de produtos naturais com capacidades benéficas desejadas pela indústria (Schmidt et al., 2008).

A medicina popular ocupa hoje uma posição respeitável, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços modernos de saúde é limitada, mas também nos países desenvolvidos onde cada vez mais os antibióticos deixam de ter efeito devido ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes (Alviano & Alviano, 2009).

A experiência histórica com produtos naturais como agentes terapêuticos evoluiu para o isolamento dos compostos químicos das plantas como a morfina, a quinina, a artemisinina ou o taxol, fazendo com que os produtos naturais sejam os potenciadores da descoberta de novos medicamentos (Hamilton & Baskett, 2000; Li & Vederas, 2009; Shibata et al., 2012).

O uso de plantas volta a tornar-se relevante não só na indústria farmacêutica, mas também na indústria alimentar (Ekiert & Szopa, 2020). A produção de alimentos estará sempre associada a microrganismos que podem trazer alterações desejáveis, mas também a microrganismos que sejam responsáveis pela degradação e deterioração dos alimentos e pela perda do seu valor

nutricional ou potencial presença de microrganismos patogénicos (Negi, 2012; Özaslan & Oguzkan, 2018). Como nem todos os alimentos podem ser processados a temperaturas que minimizem a presença de microrganismos, utilizam-se estratégias para a sua preservação como o armazenamento a frio, congelação, redução da atividade da água, restrição de nutrientes, acidificação, fermentação, pasteurização ou antimicrobianos sintéticos (compostos químicos ou substâncias que podem atrasar o crescimento microbiano ou reduzir a quantidade de microrganismos numa matriz alimentar) (Negi, 2012). A segurança e o tempo de prateleira dos alimentos também são fatores importantes e que podem ser melhorados pela aplicação de novas tecnologias que atrasem o crescimento microbiano, como o embalamento em atmosfera controlada ou modificada, tratamentos não térmicos, irradiação e embalagens ativas (Fadiji et al., 2023; Han et al., 2018; Negi, 2012).

Embora os antimicrobianos sintéticos estejam sujeitos a diversas regras de segurança e normas estritas relativas à sua produção e utilização, de modo a evitar efeitos adversos devido à sua contínua ingestão, a tendência recente da população tem sido a procura de produtos que utilizem conservantes naturais, devido a uma preocupação com potenciais efeitos negativos (Negi, 2012; Pateiro et al., 2021). Cada vez mais os consumidores começam a prestar mais atenção à sua alimentação, havendo uma preferência por alimentos "menos processados" e portadores de um "rótulo limpo", ou seja, um produto livre de substâncias quimicamente sintetizadas (Nascimento et al., 2018). Surge então a necessidade de explorar fontes alternativas de conservantes naturais podendo os extratos de plantas ser uma valiosa alternativa (Arruda et al., 2022; Negi, 2012; Zhang et al., 2021).

3.2 Extratos de plantas e compostos bioativos

Um extrato é uma solução concentrada, obtida a partir de matéria-prima da planta triturada, composta pelos seus princípios ativos e por um meio que atua como solvente (Miralrio & Vázquez, 2020; Rodrigues et al., 2016). O seu rendimento e composição depende da polaridade do solvente e da técnica de extração utilizada. Alguns extratos de plantas são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais ou antimicrobianas (Miralrio & Vázquez, 2020).

A maior parte dos compostos aromáticos das plantas são metabolitos secundários que atuam como mecanismos de defesa contra microrganismos, insetos ou herbívoros, e que possuem, portanto, atividade antimicrobiana. São eles os terpenos, responsáveis pelo odor, as quininas e os taninos, que dão a cor à planta, e os flavonoides responsáveis pela pigmentação não clorofílica (Awika & Duodu, 2017; Cowan, 1999). Fenóis e ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonóis, coumarina, alcaloides, fenilpropanoides, e monoterpénos são exemplos de mais alguns compostos com atividade antimicrobiana, cada um com o seu modo de ação, presentes nas plantas e possíveis de extrair (Cowan, 1999; Pateiro et al., 2021).

Os polifenóis são os compostos mais abundantes nas plantas variando em estabilidade, biodisponibilidade e função fisiológica e que inibem o crescimento de bactérias e fungos deteriorantes (Negi, 2012; Olszewska et al., 2020). Os polifenóis têm muitos efeitos benéficos na saúde humana, como a inibição da oxidação de proteínas de baixa densidade, o que leva à diminuição do risco de doenças cardíacas; propriedades anti-inflamatórias e anti-carcinogénicas (Ferreira-Santos, 2011; Zivkovic, 2010). A adsorção de polifenóis às membranas bacterianas provoca uma alteração na sua permeabilidade, que leva à rutura da membrana e subsequentemente à perda do conteúdo celular (Negi, 2012). No entanto, estes compostos também comprometem a sobrevivência das bactérias por se ligarem a enzimas e provocarem alteração das suas funções intracelulares (Olszewska et al., 2020). A atividade antimicrobiana dos extratos é mais pronunciada contra bactérias Gram positivas, o que pode ser atribuído à presença da sua única membrana fosfolipídica (Alviano & Alviano, 2009; Pateiro et al., 2021).

A aplicação das plantas como conservantes naturais torna-se assim relevante, uma vez que nas diferentes partes da planta estão presentes os compostos bioativos como os anteriormente mencionados (Miralrio & Vázquez, 2020; Olszewska et al., 2020): nas folhas podem encontrar-se antocianinas, flavonas, sinaptil ésteres, isoflavonoides, psoralenos; na flor está presente a coumarina; os frutos possuem ácido tricarbóxico, terpenos, taninos, flavonóis e ácidos aromáticos; os caules são portadores de flavonoides, saponinas, alcaloides; e as raízes contêm flavonoides, saponinas, alcaloides (Miralrio & Vázquez, 2020).

3.3 Métodos de extração vegetal

A extração baseia-se no aquecimento, arrefecimento e separação de compostos ativos na presença de um solvente, seguido da eliminação deste mesmo solvente, de modo a concentrar os compostos extraídos (Miralrio & Vázquez, 2020; Rodrigues et al., 2016), e esta pode ser feita a partir de material fresco ou seco (Azwanida, 2015). O processo de secagem pode ser efetuado de diferentes formas: secagem natural, que não degrada qualquer composto potencialmente termolábil, mas pode deixar a amostra sujeita a contaminações e a condições instáveis; secagem através de micro-ondas, um processo mais rápido mas que pode degradar os compostos bioativos e termossensíveis; secagem através de forno, o método mais fácil e rápido que consegue preservar os componentes; e liofilização onde temperaturas extremamente baixas são aplicadas para congelar o material enquanto ocorre uma desidratação sob vácuo, um processo que preserva os compostos bioativos mas pode tornar-se dispendioso (Azwanida, 2015; Jensen, W. A., 1954). A quantidade e os compostos bioativos presentes após a secagem do material depende de matriz para matriz, sendo para algumas mais vantajoso efetuar secagens à temperatura ambiente, e para outras a aplicação de calor (Azwanida, 2015; Belwal et al., 2022; ElGamal, et al., 2023;). Após secagem as amostras devem ser pulverizadas ou moídas, de modo a maximizar a superfície de contacto entre a amostra e o solvente durante a extração (Azwanida, 2015).

A extração pode ser feita através de vários métodos e com a utilização de vários solventes, sendo que estes afetam as propriedades físicas, químicas e antioxidantes do extrato, assim como as concentrações dos compostos bioativos. Os mais comuns são água, etanol, metanol, acetato de etilo, diclorometano e hexano. É importante escolher um solvente adequado para ter uma extração eficiente, e um extrato que preserve os compostos bioativos da planta, pelo que a água é o melhor solvente a utilizar uma vez que não é tóxica, inflamável, cara ou difícil de encontrar. No entanto pode não ser eficaz em todas as plantas e todos os compostos lipossolúveis (Miralrio & Vázquez, 2020).

Métodos de extração:

- **Maceração:** técnica de extração sólido-líquido, onde o material esmagado ou cortado é imerso em solvente durante um período mínimo de 3 dias à temperatura ambiente, com agitação periódica. A difusão do solvente pelo material vegetal enfraquece e quebra as paredes celulares da planta, permitindo a solubilização dos compostos ativos e a sua extração (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020). Extrações sólido-líquido com solventes orgânicos são amplamente utilizadas no isolamento de analitos para fins industriais, e o interesse no uso de diferentes métodos de extração sólido-líquido para extração de compostos intracelulares e líquidos de tecidos celulares vegetais para fins comerciais tem vindo a aumentar (Borjan et al., 2020);
- **Infusão:** consiste numa maceração por um período mais curto em que o solvente é exclusivamente água a ferver (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020);
- **Percolação:** é uma filtração à temperatura ambiente, onde o material é colocado num recetáculo cónico juntamente com o solvente, e o extrato é obtido gota a gota (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020);
- **Decocção:** consiste numa infusão com um tempo e volume de água especificamente definidos (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020);
- **Extração contínua a quente ou extração Soxhlet:** consiste numa destilação repetida do solvente através de uma amostra sólida, para obter um analito desejado (Borjan et al., 2020). A amostra é colocada num saco poroso dentro da câmara de extração. Um frasco de ebulição contendo o solvente é aquecido, fazendo o solvente evaporar e passar pelo braço sifão. O vapor é condensado pelo condensador, passando pela amostra, e acumulando no dedal (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020);
- **Extração assistida por ultrassons ou sonicação:** pode ser aplicada através de um banho de ultrassons ou de um sonicador. Ambos os sistemas se baseiam num transdutor piezoelétrico, ou seja, capaz de produzir ultrassons (Borjan et al., 2020). O efeito mecânico da cavitação acústica do ultrassom aumenta a superfície de contacto e a permeabilidade das paredes celulares, que acabam por romper e libertar os compostos bioativos (Azwanida, 2015; Miralrio & Vázquez, 2020);
- **Extração assistida por micro-ondas:** este método baseia-se no efeito direto das micro-ondas nas moléculas, por condução iónica e rotação de dipolos (Borjan et al., 2020). A

radiação do micro-ondas interage com os dipolos polares e polarizáveis dos materiais provocando calor, que se propaga por condução. A rotação destes dipolos rompe as ligações de hidrogénio e provoca migração de iões, o que promove a penetração de solvente na matriz (Azwanida, 2015).

Após a extração por qualquer um destes métodos, o líquido obtido deve ser clarificado por filtração ou decantação (Miralrio & Vázquez, 2020).

3.4 Microrganismos de deterioração alimentar

A segurança e a deterioração alimentar são frequentemente separadas, impactando a forma como a indústria alimentar percebe e gere a deterioração dos alimentos. Os controlos, as estratégias de conservação e os procedimentos de gestão para garantir a segurança alimentar são semelhantes e sobrepõem-se aos que controlam a deterioração dos alimentos. Deste modo é tanto importante estudar formas de diminuir microrganismos deteriorantes da alimentação, como patógenos alimentares (Adams & Motarjemi, 2006).

Uma grande parte dos alimentos deteriora-se ou estraga-se durante a sua cadeia de produção, especialmente antes e ao chegar aos consumidores finais (Odeyemi et al., 2020). O processo de deterioração por atividade microbiana envolve vários mecanismos que provocam decréscimo dos atributos sensoriais do alimento, levando os consumidores a rejeitar o produto, dando origem a problemáticas a nível industrial e económico, ambiental (devido ao desperdício) (Lorenzo et al., 2018; Odeyemi et al., 2020). A deterioração alimentar define-se então como uma alteração na qualidade do alimento que o torna indesejável e impróprio para consumo. Pode dever-se a danos físicos, alterações químicas, ou aparecimento de odores e sabores desagradáveis resultantes de crescimento microbiano (Gram et al., 2002.; Odeyemi et al., 2020). Este processo ocorre quer pelo crescimento microbiano no alimento, quer pela ação de enzimas microbianas nele presentes (Lorenzo et al., 2018). Temperatura de armazenamento, pH, atividade da água ou humidade, microbiota típica, operações de processamento e transporte são todos fatores que influenciam a taxa de deterioração (Odeyemi et al., 2020).

Para além disso, os alimentos podem ser contaminados com agentes patogénicos que representam um risco para a saúde, pois a ingestão destes microrganismos irá originar doenças de origem alimentar, como gastroenterites, diarreias, vómitos, ou até febre (Lorenzo et al., 2018; Odeyemi et al., 2020). A contaminação microbiana dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase da sua produção, causando alterações visíveis como mudança na cor, deposição de crescimento em pó, crescimento de lodos e colónias, fazendo o produto perder as suas características organolépticas e adquirir efervescências na sua superfície (Gram et al., 2002; Lorenzo et al., 2018).

Os microrganismos são, portanto, os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos. Alimentos com maiores quantidades de água, como carnes, leite e produtos do mar são mais

facilmente deteriorados por bactérias (Odeyemi et al., 2020). No entanto, o potencial de deterioração também está relacionado com a capacidade de produção de metabólitos degradantes de cada microrganismo (Gram et al., 2002).

Neste trabalho foram estudados três microrganismos patogênicos e deteriorantes de produtos alimentares não formadores de esporos, comumente encontrados em alimentos contaminados, e capazes de provocar doenças quando consumidos pelo ser humano: *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

3.4.1 *Listeria monocytogenes*

As bactérias do gênero *Listeria* são Gram positivas em forma de bacilo, catalase positivo, sendo que *Listeria monocytogenes* (Orsi & Wiedmann, 2016) é a espécie que mais se destaca no que concerne a sua patogenicidade para humanos. Ocorrem com mais frequência em alimentos com elevados teores em proteína como laticínios, peixe, frutas e vegetais (Bai et al., 2021).

L. monocytogenes tem capacidade de resistir a condições adversas, como temperaturas e pH variados, radiação ultravioleta, elevadas concentrações salinas, e é ainda uma bactéria formadora de biofilme. *L. monocytogenes* é responsável pela listeriose, uma infecção caracterizada pelo aparecimento de dores abdominais, diarreia, enxaquecas, náusea, vômitos, febre, mialgia, entre outros sintomas, considerada muito perigosa para idosos, grávidas e recém-nascidos, e associada a uma taxa de mortalidade de 20-30% globalmente. Devido à sua distribuição, dificuldade de eliminação e ao perigo que representa para a população, a presença deste microrganismo torna-se uma preocupação na indústria alimentar (Awofisayo-Okuyelu et al., 2016; Jacek et al., 2022).

3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. são bactérias aeróbias, Gram negativas, em forma de bacilos e que apresentam motilidade (Adams & Motarjemi, 2006). Estas bactérias são frequentemente encontradas em diversos tipos de alimentos, como água, leite, carne, vegetais e frutas (Li et al., 2023) e podem estar presentes em águas, solos e plantas (Bai et al., 2021). Estas foram ainda reportadas como sendo específicas para deterioração de carne e produtos do mar, conseguindo fazê-lo devido à sua rápida replicação em condições aeróbias e à produção de compostos de enxofre (Adams & Motarjemi, 2006).

Embora seja amplamente reconhecida como um patógeno oportunista significativo nos humanos, *P. aeruginosa* permanece subestimada no contexto da segurança alimentar. No entanto, devido à sua notável versatilidade metabólica, habilidade de multiplicação rápida, capacidade de adaptação aliada a crescimento mesmo em baixas temperaturas, esta bactéria está vastamente dispersa e, como resultado, é frequentemente responsável por infecções alimentares (Li et al.,

2023). Para além disto, forma biofilmes altamente resistentes, dificultando a sua eliminação (Adams & Motarjemi, 2006; Jurado-Martín et al., 2021).

3.4.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um microorganismo anaeróbio facultativo Gram positivo, que não possui motilidade e é catalase e coagulase positivo. A sua patogenicidade deve-se em parte à capacidade de produzir enterotoxinas, que provocam doenças no organismo humano (le Loir et al., 2003). A nível alimentar é comumente encontrada em laticínios, carne e comida preparada à mão (Bai et al., 2021).

Intoxicações alimentares por *S. aureus* apresentam sintomas como hiper salivação, náuseas, vômitos, dores abdominais e desidratação no caso de ocorrência de diarreia. Também neste caso, pode ter implicações severas em crianças, idosos e imunodeprimidos (Kadariya et al., 2014).

3.5 Investigação de potencial antimicrobiano e anti biofilme

3.5.1 Potencial antimicrobiano

A testagem da sensibilidade antimicrobiana pode ser utilizada na descoberta de novos fármacos e na predição de resultados terapêuticos. Vários métodos laboratoriais podem ser aplicados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de composto, dividindo-se em 3 grupos: métodos de difusão, métodos de diluição e bioautografia (Balouiri et al., 2016; Ramirez, & Castaño, 2009).

Os métodos de difusão são testes qualitativos, utilizados no estudo de compostos polares e baseiam-se na relação entre a concentração necessária de um composto para inibir uma estirpe bacteriana e o halo de inibição de crescimento que este origina na superfície do agar onde foi colocada a bactéria em estudo (Ramirez, & Castaño, 2009). Os métodos de difusão mais conhecidos e aplicados são:

- Difusão em disco: consiste na disposição de discos de papel filtro contendo o composto a testar sobre a superfície de agar inoculada com o microorganismo de teste. Após incubação, a difusão do agente antimicrobiano pelo agar irá originar diâmetros de inibição em redor dos discos. Este é comumente utilizado para testagem antimicrobiana devido à sua simplicidade, baixo custo e versatilidade. No entanto, não faz a distinção entre efeito bactericida e bacteriostático nem permite a determinação de concentrações mínimas inibitórias (Balouiri et al., 2016; Jorgensen & Ferraro, 2009).

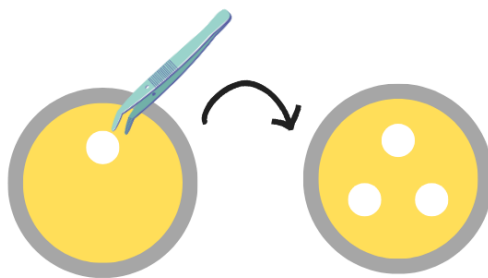


Figura 3.5.1 – Representação esquemática do método de difusão em disco

- Difusão em poços: semelhante ao método anteriormente descrito, as placas são inoculadas espalhando um determinado volume de suspensão bacteriana na sua superfície, mas em vez da colocação de um disco, o agar é perfurado formando um buraco onde é introduzido um volume do composto em estudo. Também neste método o composto difunde-se através do agar originando zonas de inibição (Balouiri et al., 2016; Magaldi et al., 2004).

Os métodos de diluição são utilizados em compostos tanto polares como apolares. São uma mais-valia na medida em que permitem a determinação de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida (Ramirez & Castaño, 2009):

- Método de diluição em meio líquido: macro- e microdiluição em meio líquido são os métodos mais antigos de testagem antimicrobiana conhecidos. O procedimento consiste na preparação de diluições duplas sucessivas do agente antimicrobiano em meio líquido que são posteriormente inoculadas com suspensão bacteriana. As preparações são incubadas e é possível comparar o crescimento microbiano nas diferentes concentrações do agente em estudo através da turbidez (Balouiri et al., 2016; Jorgensen & Ferraro, 2009).

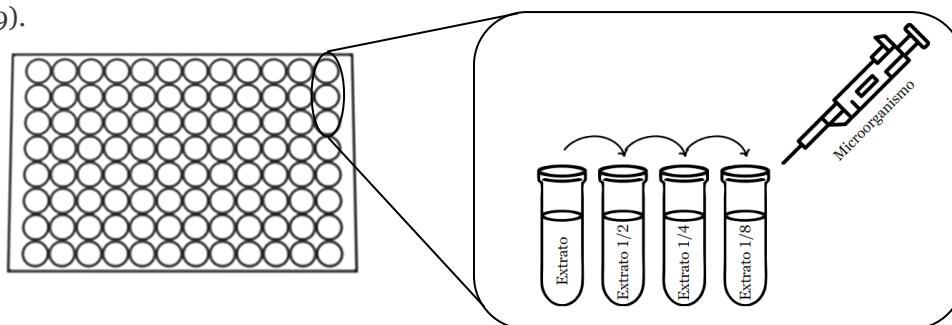


Figura 3.5.2 – Representação esquemática do método de diluição em meio líquido

- Método de diluição em agar: envolve a incorporação de várias concentrações do agente antimicrobiano em meio de cultura sólido. Deste modo, o microrganismo será inoculado em agar com a presença do agente a teste (Balouiri et al., 2016).

A bioautografia é uma variação dos métodos de difusão em agar onde o analito é absorvido dentro de uma placa de cromatografia de camada fina. Uma das formas de aplicar este método é colocar-

se as amostras na placa, selecionar-se a fase móvel mais adequada e incubar numa placa de Petri invertida previamente inoculada onde se irão formar halos de inibição (Ramírez & Castaño, 2009).

3.5.2 Potencial anti-biofilme

Em ambientes de processamento de alimentos, a formação de biofilmes ameaça a segurança alimentar uma vez que os patógenos podem ser diretamente transmitidos por contacto. Após transmissão, estes também podem formar biofilmes nas superfícies do alimento (Bai et al., 2021). Os biofilmes são comunidades estruturadas de bactérias, envolvidas numa matriz polimérica autoproduzida, que adere a superfícies bióticas ou abióticas, permitindo a sobrevivência de bactérias em ambientes prejudiciais ao seu crescimento, através da promoção da agregação das bactérias, o que lhes permite adquirir resistência a compostos que lhe são tóxicos, dissecação, radiação ultravioleta e impacto físico (Bai et al., 2021; Nickerson et al., 2017; Pumbwe et al., 2007). Os biofilmes são muito mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células planctónicas (Alviano & Alviano, 2009).

A quantificação de biofilmes pode ser feita através de uma variedade de métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos enumeram a quantidade de células, enquanto que os métodos indiretos determinam componentes associados à presença de biofilme, como massa seca, carbono orgânico total, ensaios em microplacas, bioluminescência de ATP, proteína total e microbalança de cristal de quartzo. Ambos envolvem a homogeneização do biofilme (Wilson et al., 2017).

Dentro dos métodos utilizados para estudo da quantificação de biofilme destacam-se:

- Formação de biofilme em microplaca: este ensaio permite a formação de biofilme nas paredes ou no fundo dos poços de uma microplaca, tornando-se útil para testes genéticos, testagem de formação de biofilme em diferentes condições e monitorização da adesão microbiana a uma superfície abiótica (Merritt et al., 2006; O'Toole, 2010). As células crescem nos poços durante um determinado tempo após o qual são lavadas de modo a remover as bactérias planctónicas. O biofilme permanente é corado com violeta de cristal e solubilizado de modo a ser quantificado (Merritt et al., 2006).
- Enumeração direta de bactérias em biofilme: o procedimento assemelha-se ao método anteriormente descrito, mas em vez da coloração procede-se com uma sonicação. Pretende-se que o biofilme resultante seja suspenso para permitir quantificar (através das UFC) as bactérias presentes no biofilme formado (Merritt et al., 2006).
- Interface ar-líquido: oferece um sistema simples para análise microscópica da formação do biofilme em tempo real. A placa a utilizar é colocada com um ângulo de 30-50°, e as culturas são aplicadas de modo que seja possível visualizar em microscópio invertido (Merritt et al., 2006).

- Colônia de biofilme: consiste em fazer crescer o biofilme numa membrana colocada na superfície de uma placa de Petri. Esta membrana é suspensa em meio estéril, que é inoculado para contagem das UFC (Merritt et al., 2006).

3.6 Recursos estudados

3.6.1 *Arbutus unedo*

O medronheiro é um arbusto perene que cresce selvagem em várias áreas mediterrânicas, com capacidade de proteção contra fatores tanto bióticos como abióticos, sendo que apresenta alta resistência a condições ambientais agrestes (como secas, temperaturas baixas e pobres condições de solo) e tem a capacidade de se regenerar após incêndios florestais (Haouari et al., 2021; Scarano et al., 2022). Apesar do fruto ser comestível fresco, o mais comum é o seu consumo sob outra forma, destacando-se produtos como licores, vinhos, mel, compotas, marmeladas, snacks e iogurtes (Malheiro et al., 2012; Miguel et al., 2014; Morgado et al., 2018; Scarano et al., 2022). Em algumas regiões, não é atribuída importância económica a esta espécie o que acaba por fazer com que as plantações por vezes sejam substituídas por outras espécies florestais com maior valor económico (Dib et al., 2013), pelo que se torna importante a procura de novas utilizações e propriedades do medronheiro, de forma a valorizar o recurso e impedir a sua erradicação.

As folhas, o fruto, as raízes e a madeira da planta são utilizados na medicina tradicional na preparação de extratos e infusões antissépticos, diuréticos, laxantes e depurativos (Dib et al., 2013; Ferreira et al., 2012; Morgado et al., 2018), e no tratamento de hipertensão e diabetes, doenças de coração e colesterol alto (Haouari et al., 2021; Scarano et al., 2022). Esta planta tem constituintes como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos que contribuem para a presença de capacidades adstringentes, depurativas, anti-inflamatórias, anti-tumorais, antioxidantes, antimicrobianas, espasmolíticas e neuroprotetoras (dos Santos et al., 2022; el Haouari et al., 2021).

As folhas de medronheiro são ricas em taninos, flavonóis e flavanóis (Miguel et al., 2014; Scarano et al., 2022) apresentando atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias Gram positivas (Ferreira et al., 2012; Malheiro et al., 2012; Miguel et al., 2014), como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Guendouze-Bouchefa et al., 2015; Miguel et al., 2014; Morgado et al., 2018), mas também contra bactérias Gram negativas, como *P. aeruginosa* (Bouyahya et al., 2016; Miguel et al., 2014; Morgado et al., 2018). As folhas têm ainda alguma atividade antifúngica (Miguel et al., 2014; Morgado et al., 2018). Extratos aquosos e etanólicos podem ser agentes antimicrobianos por demonstrarem um efeito sinérgico com baixas atividades de água em amostras alimentares (Asmae et al., 2012; dos Santos et al., 2022).

As raízes apresentam quinonas, antraquinonas, compostos redutores, antocianinas, flavonoides e taninos (Dib et al., 2013), concedendo-lhes atividade antimicrobiana moderada contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e ainda *Escherichia coli* (Dib et al., 2013; Miguel et al., 2014; Morgado et al., 2018). Por sua vez, as flores apresentaram alguma atividade antimicrobiana para *L. monocytogenes* (Morgado et al., 2018).

Os compostos fenólicos mais comuns em medronhos portugueses são flavan-3-ols, antocianinas e flavonóis (Miguel et al., 2014). Extratos do fruto geralmente apresentam melhores resultados que extratos da folha ou da raiz, com forte atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Salem et al., 2018), sendo ainda possível aplicar como conservante natural de paté de peixe onde provoca inibição de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli* (Pinheiro et al., 2020).

3.6.2 *Bryonia dioica*

A norça é uma erva trepadeira perene com raízes tuberosas que ocorre na Europa, norte de África e oeste da Ásia (Benarba et al., 2012). É conhecida na medicina tradicional como uma erva medicinal pela sua utilização como purgativo, emético, tónico, agente antidiabético e agente cicatrizante (Benarba et al., 2012). Algumas civilizações utilizavam esta planta com fins de tratar lepra, feridas gangrenosas, e como um remédio para a tosse (Chevallier, 1996; Launert, 1981). Apesar de ser uma planta tóxica, a sua utilização é segura em baixas quantidades sendo útil contra tosse, gripe, bronquite e pneumonia. A norça mostrou-se útil em distúrbios cardíacos causados por reumatismo e gota, doenças maláricas e zimóticas e é também recomendada internamente no tratamento de queixas brônquicas, asma, úlceras intestinais, hipertensão e artrite; e externamente como rubefaciente para dores musculares e nas articulações, devido às suas capacidades anti-inflamatórias (Benarba et al., 2012; Lust, 2014; Pieroni, 2000; Rafael et al., 2011).

A planta contém flavonoides, alcaloides, saponinas, terpenos e ácidos gordos (Barreira et al., 2013; Dhouioui et al., 2016), tudo exemplos de compostos bioativos que concedem aos frutos ação antioxidante (Benarba et al., 2012), às raízes ação anti-tumoral, diurética e anti-ciática (Benarba et al., 2012; Pieroni, 2000), e à planta na sua totalidade um efeito antiviral (Chevallier, 1996).

Poucos estudos existem sobre o potencial antimicrobiano desta planta, estando apenas descrita uma ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas por parte de lípidos extraídos da raiz e da planta inteira (Dhouioui et al., 2016).

3.6.3 *Castanea sativa*

Os castanheiros são um recurso popular devido a vários atributos como a produção de frutos nutricionais baixos em gordura, madeira de alta qualidade e à capacidade de as raízes brotarem

após a colheita do fruto (Hao et al., 2012). O fruto é conhecido pelo seu sabor, valor nutritivo e potencial uso como suplemento e fins medicinais. Apesar do fruto poder ser consumido diretamente (fresco ou cozinhado), uma parte das castanhas é dirigida para a indústria alimentar com o intuito de produzir farinhas, purés, marrom-glacé, entre outros (Hao et al., 2012; Silva et al., 2020; Zivkovic et al., 2010). Devido a ser uma excelente fonte de hidratos de carbono, fibra, amido, ácidos gordos, minerais e vitaminas, a castanha é um fruto tradicional da dieta mediterrânea (Pinto et al., 2021; Silva et al., 2020).

A colheita e processamento da castanha origina vários subprodutos e resíduos como as folhas, os ouriços, as cascas exteriores e a pele interior que são muitas vezes queimados, apresentando um risco ambiental (Esposito et al., 2019). Sendo este recurso tão abundante no nosso país, surge a necessidade de minimizar estes resíduos e valorizar o castanheiro na sua totalidade. Algumas das partes mencionadas podem potencialmente ser utilizadas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar devido à presença de compostos específicos, como taninos e flavonoides, capazes de inibir atividade bacteriana (Esposito et al., 2019; Hao et al., 2012; Silva et al., 2020).

O uso de diferentes partes da castanha na medicina tradicional está documentado para o tratamento de tosse, diarreia e infertilidade (Neves et al., 2009). O fruto é benéfico na redução do colesterol, e infusões feitas com as folhas e flores têm capacidades mucolíticas, antiespasmódicas e antidiarreicas (Pinto et al., 2021; Silva et al., 2020).

As folhas apresentam atividade antibacteriana *in vitro* contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, entre outros (Basile et al., 2000; Quave et al., 2008; Zivkovic et al., 2010), e ainda têm atividade contra a virulência de *S. aureus* resistente à metilina (Salam et al., 2021). A flor possui atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-tumoral, tendo já sido utilizada num estudo como um conservante natural de pastel de nata (Caleja et al., 2020). As suas decocções têm melhor atividade antibacteriana e as infusões melhor atividade antifúngica (Carocho et al., 2014). A flor é ainda capaz de inibir a formação de biofilme e tem atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (Quave et al., 2008). Os ouriços têm atividade antioxidante e atividade inibitória contra diversos patógenos vegetais (Esposito et al., 2019). A casca pode atuar como antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, anticancerígeno, neuroprotetor e hipoglicemiante (Pinto et al., 2021). A pele interior é capaz de produzir atividade inibitória em algumas bactérias e fungos (Hao et al., 2012).

3.6.4 *Olea europea*

A oliveira é uma planta característica da região mediterrânica, mais conhecida pelo uso das azeitonas no fabrico de azeite (Borjan et al., 2020). As folhas e os ramos desta planta constituem um resíduo agrícola resultante da poda das oliveiras, bem como das sobras do lagar (Roselló-Soto et al., 2015). A sua queima é uma das principais fontes de poluição na região mediterrânica, com consequente produção de gases com efeito de estufa, pelo que o seu uso por conversão em

produtos mais valiosos pode ser uma alternativa útil aos métodos de descarte atuais (Agatonovic-Kustrin et al., 2022).

As folhas de oliveira eram utilizadas pelas civilizações antigas no tratamento de várias doenças: como remédio para a febre e infeções e no tratamento para a hipertensão, mas também em outros procedimentos, como mumificações (Borjan et al., 2020; Liu et al., 2017; Sudjana et al., 2009). Sob forma de extratos, eram ainda utilizadas como suplementos alimentares devido às suas propriedades benéficas para a saúde como o aumento de energia, diminuição da pressão sanguínea e suporte dos sistemas cardiovascular e imunitário (Borjan et al., 2020). Por estes motivos, as aplicações de extratos de folha de oliveira no setor alimentar podem ser contadas tanto como ingrediente para fortificação de alimentos, como composto ativo para aplicações em embalagens (Cedola et al., 2020).

Estas características benéficas encontradas nas folhas devem-se à presença de triterpenos e flavonoides (Borjan et al., 2020), e principalmente de compostos fenólicos, como a oleuropeína (Agatonovic-Kustrin et al., 2022; Talhaoui et al., 2015). A presença destes compostos, permite à folha ter atividade antioxidante, antiviral, anti-inflamatória e antimicrobiana (Bouaziz et al., 2008; Talhaoui et al., 2015). Esta última, já comprovada em muitos estudos, direcionada a vários microrganismos, entre eles *S. aureus* (Borjan et al., 2020; de la Ossa et al., 2021; Liu et al., 2017; Rocha-Pimienta et al., 2020; Sudjana et al., 2009), *P. aeruginosa* (Borjan et al., 2020; Sudjana et al., 2009), e *L. monocytogenes* (Liu et al., 2017) *in vitro* e em matrizes alimentares com exemplo de vegetais e camarão (Ahmed et al., 2014; Moore et al., 2011; Techathuvanan et al., 2014), não sendo esta atividade significativamente afetada pela digestão gástrica ou intestinal (Rocha-Pimienta et al., 2020).

3.6.5 *Sambucus nigra*

O sabugueiro é um arbusto de folha caduca nativo da Europa (Motti et al., 2022), sendo que desde a Antiguidade que há relatos do uso de diversas partes desta planta no tratamento de várias doenças como tosse, gripes e constipações, alergias, problemas renais e urinários, e ainda no alívio de contusões, entorses, frieiras, feridas e infeções de pele (Chevallier, 1996; Lust, 2014; Grieve, 1971), sendo as flores ainda utilizadas tradicionalmente por diversos países no tratamento de doenças inflamatórias e no tratamento de feridas, conjuntivites e queimaduras (Motti et al., 2022). As folhas desta planta apresentam ação anti-inflamatória, diurética e repelente de insetos, as raízes são também diuréticas, eméticas e purgativas, enquanto as flores e o fruto são laxantes e diaforéticos (Chevallier, 1996; Lust, 2014; Grieve, 1971).

O sabugueiro apresenta alto valor comercial, principalmente devido ao seu teor em antocianinas, que são utilizadas na indústria alimentar como corantes em compotas, geleias, para a produção de tortas, sorvetes, iogurtes, sumos, xaropes, e bebidas alcoólicas. Devido ao seu odor e sabor, as flores de sabugueiro também são muito atraentes, podendo ser utilizadas no fabrico de alimentos

de pastelaria, consumidas fritas como um doce ou como tempero; os extratos de flores de sabugueiro são usados para produzir bebidas, como infusões e bebidas semelhantes ao vinho, sorvetes e iogurtes, e começam a despertar o interesse da indústria farmacêutica devido aos seus efeitos benéficos contra doenças degenerativas, cancro, diabetes, e capacidades antioxidantes, antimicrobianas, entre outras (Ferreira et al., 2020; Motti et al., 2022). Um grande número de estudos *in vitro* e *in vivo* incluindo em humanos demonstram que o sabugueiro possui muitos benefícios para a saúde, incluindo principalmente atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, anti influenza, antimicrobianas, antidiabéticas, cardioprotetoras e neuroprotetoras (Liu et al., 2022).

As flores têm uma composição em flavonoides, ácidos fenólicos, monoterpenos, sendo portadoras de atividades anti-proliferativa, antioxidante e antibacteriana contra bactérias Gram positivas, demonstrando potencial como aditivo alimentar pela inibição de crescimento microbiano em hambúrgueres de salmão (Ferreira-Santos et al., 2021; Jonušaite et al., 2021).

O fruto tem capacidades antimicrobianas contra bactérias Gram positivas (Krawitz et al., 2011; Przybylska-Balcerek et al., 2021) e atividade antiviral contra o vírus da bronquite infecciosa aviária (Chen et al., 2014), devido à sua composição em ácidos fenólicos e flavonoides (Przybylska-Balcerek et al., 2021).

3.6.6 *Vigna unguiculata*

O feijão frade é uma leguminosa amplamente cultivada em muitos países da África subsariana e da América Latina, sendo uma das sete mais cultivadas no mundo (Kapraelou et al., 2022; Kritzinger et al., 2005). É um produto nutritivo, rico em proteínas e com um bom equilíbrio de aminoácidos essenciais (Anggrianto et al., 2014), com inúmeros benefícios para a saúde devido à presença de compostos bioativos na sua constituição (Awika & Duodu, 2017; Kapraelou et al., 2022). A planta é não só utilizada como fonte nutritiva, mas também na forragem animal, e é uma importante fonte económica, destacando-se o comércio da semente (Kritzinger et al., 2005).

O feijão frade é um recurso deveras valioso devido à sua alta resistência a condições ambientais adversas. Este cresce em lugares que para outras plantas ou hortícolas seriam inadequados, devido à sua tolerância ao calor e à seca (Awika & Duodu, 2017). Para além disto, a planta do feijão frade é um bom fixador de nitrogénio, o que aumenta a matéria orgânica nos solos servindo como fertilizante natural dos terrenos (Sayeed et al., 2017).

Dentro dos benefícios conhecidos desta planta, destacam-se propriedades adstringentes, laxantes, anti-helmínticas, afrodisíacas e diuréticas (Sayeed et al., 2017; Ye et al., 2000); efeitos redutores do colesterol total e LDL (bem como o aumento do colesterol HDL), atividade anticancerígena, anti-inflamatória e antidiabética (Awika & Duodu, 2017); e ainda demonstra

uma indução de uma microbiota intestinal saudável, sendo benéfico no tratamento de obesidade (Awika & Duodu, 2017; Kapravelou et al., 2022), entre outros.

A parte mais comumente consumida do feijão frade é a sua semente. Esta pode ser cozida, assada ou transformada em farinha, com potencial para produção de snacks, cereais, produtos de pastelaria, entre outros (Awika & Duodu, 2017; Aziagba et al., 2017). No entanto, as folhas, a raiz e os caules também podem ser incluídos na dieta devido à ação terapêutica dos flavonoides nestas partes presentes (Aziagba et al., 2017). Apesar das sementes serem consumidas não só por humanos, mas também por animais, atualmente as folhas e as vagens são apenas utilizadas para forragem animal, mas são maioritariamente queimadas (Avanza et al., 2021). Assim, a *V. unguiculata* torna-se um importante recurso, não só no combate à fome nos países subdesenvolvidos, mas também como uma mais-valia para o progresso da agricultura e da medicina.

Toda a planta é rica em polifenóis e flavonoides, nomeadamente ácidos fenólicos, glicosídeos de flavonol, e algumas variedades ainda têm antocianinas e flavan-3-ols, no entanto estes estão mais presentes na semente (Avanza et al., 2021; Awika & Duodu, 2017). A semente de feijão frade é diurética, cardioprotetora, fortalece o estômago, e as suas infusões são utilizadas no tratamento de amenorreia, queimaduras, febre, dores menstruais e de parto (Ashraduzzaman et al., 2016; Kritzinger et al., 2005; Zaheer et al., 2020). Apresenta atividade antimicrobiana, quer sob forma de extrato ou óleo essencial, tendo efeito inclusivamente contra *S. aureus* (Ashraduzzaman et al., 2016; Chidebelu et al., 2019; Sayeed et al., 2017; Ye et al., 2000).

As raízes são utilizadas no alívio da dor menstrual, epilepsia e dores no peito (Ashraduzzaman et al., 2016; Ndamba et al., 1994). Estas exsudam compostos que afetam a microbiota dos solos, como lípidos e proteínas, que demonstraram atividade antifúngica (Nóbrega et al., 2005).

A folha é utilizada no tratamento de hiperatividade, náuseas, vômitos e síndrome de deficiência de Vitamina C (Zaheer et al., 2020). Tem potencial antimicrobiano, também já demonstrado para *S. aureus* (Kritzinger et al., 2005; Lenny & Rizky, 2020; Umar et al., 2020). Esta atividade pode ser justificada pela presença de vários metabolitos secundários, mencionados anteriormente, tais como flavonoides e compostos fenólicos, mas também alcaloides, terpenos e taninos (Begum et al., 2022).

Os caules têm atividade antimicrobiana contra vários microrganismos incluindo, ainda que fraca, atividade inibitória em *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Vats et al., 2012).

Um estudo elaborado em várias variedades de feijão frade demonstra que consoante a variedade, a quantidade de flavonoides varia em cada parte da planta. Algumas apresentam maior conteúdo na folha, outras maior conteúdo na pele do fruto, ou mesmo nos caules (Aziagba et al., 2017).

Capítulo 4

Objetivos

O Programa Integrado de IC&DT CULTIVAR – Rede de Competências para o Desenvolvimento Sustentável e Inovação no Setor Agroalimentar pretende caracterizar, conservar e valorizar os recursos genéticos endógenos regionais com o objetivo de contribuir para a dinamização de territórios de baixa densidade populacional, através de uma estratégia ancorada no desenvolvimento territorial.

De modo a valorizar e descobrir novas aplicações de diferentes recursos endógenos do centro de Portugal, o principal objetivo do trabalho desenvolvido no estágio final de Mestrado em Bioquímica consiste em caracterizar as suas atividades antimicrobiana e anti-biofilme.

Assim, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de extratos aquosos e/ou alcoólicos a partir de recursos endógenos;
- Análise das atividades antimicrobianas dos extratos elaborados;
- Análise das atividades anti-biofilme dos extratos elaborados.

Capítulo 5

Material e métodos

5.1 Colheita e preparação das amostras

Todas as amostras vegetais utilizadas foram colhidas entre outubro de 2022 e junho de 2023, na região centro de Portugal, distritos de Castelo Branco e Guarda. Salienta-se que, no caso do feijão-frade, utilizou-se o feijão “cara verde”, uma variedade Portuguesa (*landrace*) característica da região da Lardosa, Castelo Branco, e distinta pelo seu hilo verde em vez do habitual hilo preto (Castro et al., 2016). Em relação ao castanheiro, utilizou-se a variedade “martáinha”, uma das principais produzidas nos distritos de Viseu e Guarda (Gomes-Laranjo et al., 2007).

Fizeram parte do grupo de amostras as diversas partes dos recursos endógenos descritos na Tabela 5.1. Previamente à elaboração dos extratos, as amostras foram lavadas em água corrente e água esterilizada e secas. Após a secagem, as amostras foram trituradas durante um minuto e meio à velocidade máxima no processador de alimentos Vorwerk, Bimby TM5, ou num moinho Fritsch Pulverisette 19 em partículas de 0,2mm, e armazenadas a 2°C.

Tabela 5.1 – Grupos de amostras

Recurso	Parte utilizada	Método de secagem
<i>Olea europaea</i> (Oliveira)	Folha	Micro-ondas
		Desidratador 35°C (10 dias)
<i>Bryonia dioica</i> (Norça)	Folha	Desidratador 35°C (21h)
<i>Sambucus nigra</i> (Sabugueiro)	Folha	Temperatura ambiente e abrigo da luz (6 dias)
	Folha	Temperatura ambiente e abrigo da luz (6 dias)
<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão-frade variedade “cara-verde”)		Desidratador 35°C (24h)
		Micro-ondas
	Raiz	Temperatura ambiente e abrigo da luz (10 dias)
	Vagem	Temperatura ambiente e abrigo da luz (18 dias)
	Caule	Temperatura ambiente e abrigo da luz (18 dias)
<i>Arbutus unedo</i> (Medronheiro)	Folha	Desidratador 35°C (6 dias)
	Fruto	Desidratador 50°C (6 dias)

<i>Castanea sativa</i>	Folha	Desidratador 35°C (76h)
(Castanheiro variedade “martáinha”)	Pele interior do fruto	-

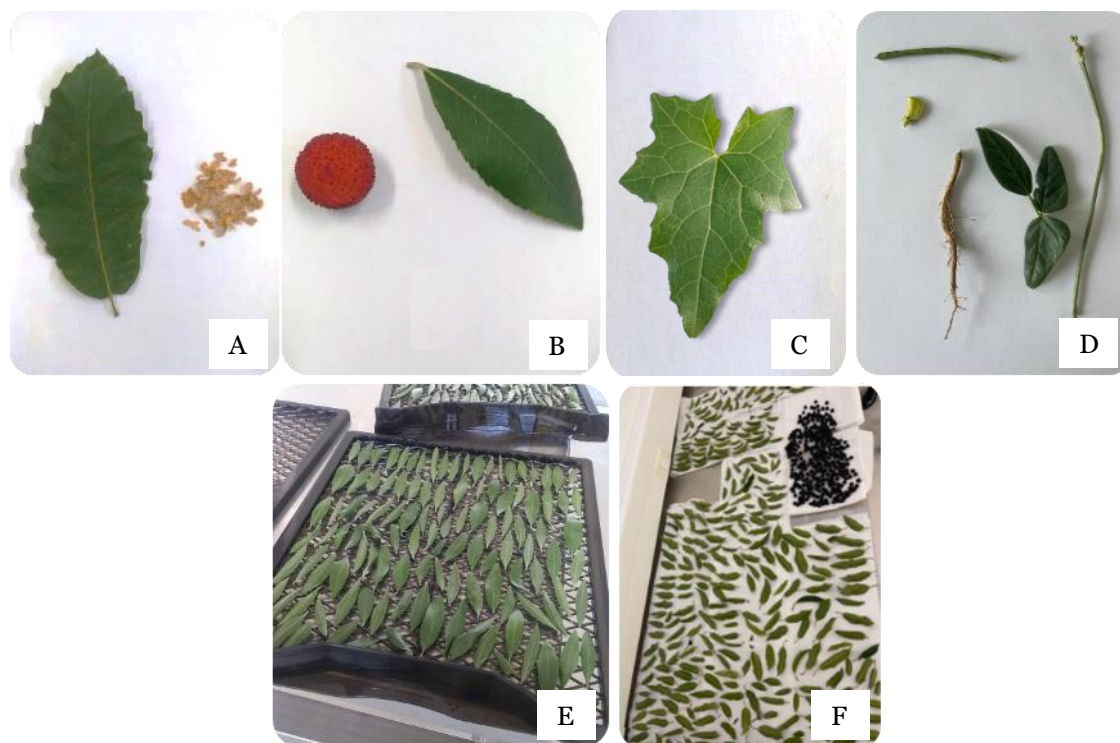


Figura 5.1 – Conjunto de amostras vegetais utilizadas na produção de extratos. (A) castanheiro “martáinha”, (B) medronheiro, (C) norça, (D) feijão frade “cara-verde”, (E) oliveira e (F) sabugueiro.

O último grupo de amostra, constituído pela pele interior da castanha, não sofreu lavagem, secagem ou trituração, e foi diretamente utilizado como recolhido da castanha.

5.2 Preparação dos extratos

Os protocolos utilizados para a preparação dos extratos foram baseados de acordo com a bibliografia referenciada, contando com as adaptações seguidamente descritas. No final de cada método, todos os extratos foram filtrados com uma compressa estéril e, em alguns casos, ainda com um filtro de seringa de nylon estéril de 0,22 μm . Por fim, os extratos foram armazenados a uma temperatura de -80°C . A cada extrato elaborado foi atribuída uma nomenclatura que consiste nas iniciais do recurso utilizado, uma abreviatura do solvente e um número indicativo da ordem de elaboração do extrato:

Extrato metanólico de folha de oliveira (Omet1)

As folhas utilizadas na preparação deste extrato foram secas no micro-ondas e trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita adicionando uma mistura de 2 mL de metanol e 8 mL de água estéril a 0,5 g de amostra. A solução foi levada ao vortéx durante 3 minutos e seguidamente centrifugada a 4000 RPM durante 30 minutos. Este processo foi feito em triplicado e os sobrenadantes recuperados para um balão de vidro, levados ao evaporador rotativo a 40°C (Heidolph Rotary Evaporator HEI-VAP Precision) para evaporação do solvente, e liofilizados. Por fim, o extrato obtido foi dissolvido para obter uma concentração final de 40 mg/mL em DMSO 1% (Baysal et al., 2021).

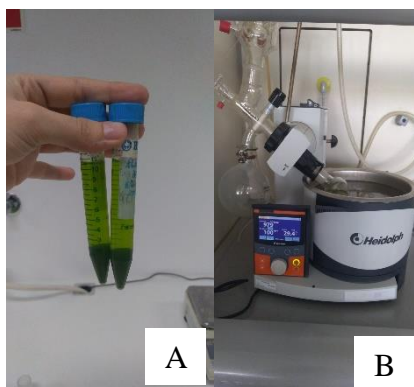


Figura 5.2.1 – Preparação do extrato Omet1. (A) Extrato após centrifugação; (B) Evaporação do solvente.

Extrato aquoso de folha de norça (Baq7)

As folhas utilizadas na preparação deste extrato foram trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita através de uma decocção, onde se ferveram 1g de material triturado em 200mL de água, durante 5 minutos. Após filtração, os extratos foram liofilizados (LABCONCO FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System) e no final diluídos em água estéril para uma concentração de 100 mg/mL (Gomes et al., 2020).

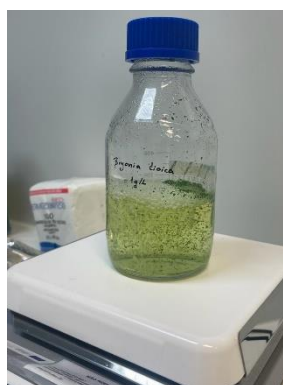


Figura 5.2.2 – Elaboração do extrato Baq7

Extrato aquoso de folha de oliveira (Oaq8)

As folhas utilizadas na preparação deste extrato foram secas em micro-ondas e trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita através de uma decocção, onde se ferveram 4 g de material triturado em 200 mL de água, durante 5 minutos. Após filtração, o extrato foi liofilizado e no final diluído em água estéril para uma concentração de 100 mg/mL (Pereira et al., 2007).

Extrato aquoso de folha de feijão frade (Faq9)

As folhas utilizadas na preparação deste extrato foram secas em micro-ondas e trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita através de uma decocção, onde se ferveram 2 g de material triturado em 200 mL de água, durante 5 minutos. Após filtração, o extrato foi liofilizado e no final diluído em água estéril para uma concentração de 100 mg/mL (Gomes et al., 2020).

Extratos aquosos de folha de norça, feijão frade, oliveira, medronheiro e sabugueiro (Baq10, Faq11, Oaq12, Oaq13, Maq14 e Saq15)

A elaboração destes extratos foi feita através de decocções onde se ferveram 20, 10 e 5 g de material triturado em 200 mL de água durante 5 minutos, dando origem a três extratos com o mesmo código (ex: Baq10.1, Baq10.2, Baq10.3, respetivamente). Após filtração, os extratos foram liofilizados e no final diluídos em água estéril para uma concentração de 100 mg/mL (Gomes et al., 2020). Os extratos Saq15 foram ainda filtrados com um filtro de seringa de nylon estéril de 0,22 µm.

As folhas utilizadas na preparação de Oaq12 foram secas no micro-ondas, enquanto as utilizadas na preparação de Oaq13 foram secas no desidratador.



Figura 5.2.3 – Extratos em liofilização

Extratos aquosos de raiz, vagem e caule de feijão frade (FRaq16, FVaq17, FCAq18)

As raízes e os caules utilizados para a elaboração deste extrato foram trituradas em partículas de 0,2 µm no moinho e as vagens no processador de alimentos. A extração foi feita colocando 5 g de amostra em 100 mL de água estéril em agitação (150 RPM) durante 24 horas. Ao fim deste tempo, o extrato foi filtrado com uma compressa estéril e levado ao evaporador rotativo para evaporação do solvente. No fim, o extrato foi diluído em água estéril para 800 mg/mL (Degu et al., 2021). Após dissolução em água, o extrato foi filtrado com um filtro de seringa de nylon estéril de 0,22 µm.

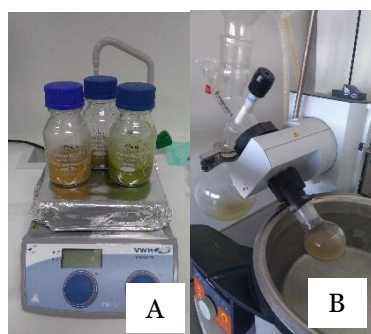


Figura 5.2.3 – Elaboração dos extratos FRaq16, FVaq17 e FCAq18.
(A) Extratos em agitação; (B) Evaporação do solvente de FVaq17.

Extratos aquosos de folha de oliveira e medronheiro (Oaq19 e Maq20)

As folhas utilizadas para realizar este extrato foram secas no desidratador e trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita fervendo 2 g de amostra em 100 mL de água durante 30 minutos. O extrato foi filtrado com uma compressa estéril, seco em evaporador rotativo e liofilizado. Por fim, o produto final foi dissolvido em água de modo a obter uma concentração de 20 mg/mL (Quave et al., 2008).



Figura 5.2.4 – Ebulição dos extratos Oaq19 e Maq20.

Extratos etanólicos de folha de oliveira e medronheiro (Oet21 e Met22)

As folhas utilizadas para realizar este extrato foram secas no desidratador, trituradas no processador de alimentos e a extração foi feita colocando 10 g de amostra em 100 mL de etanol 95%. A solução ficou em repouso durante 72 horas, com agitação diária.

O extrato foi filtrado com uma compressa estéril e levado ao evaporador rotativo para evaporação do solvente, e liofilizado. Por fim o produto final foi dissolvido em DMSO 1% de modo a obter uma concentração de 20 mg/mL (Quave et al., 2008). Após dissolução, o extrato foi filtrado com um filtro de seringa de nylon estéril de 0,22µm.

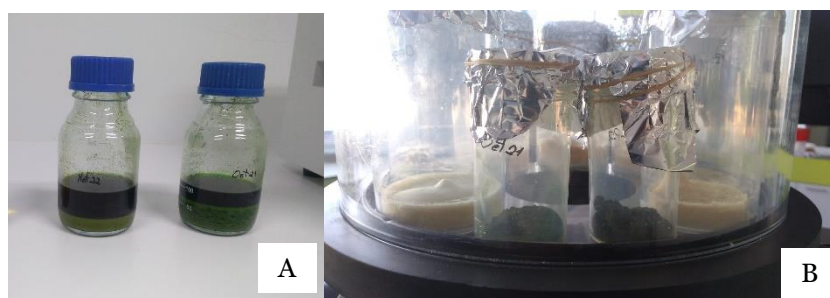


Figura 5.2.5 – Elaboração dos extratos Oet21 e Met22. (A) Extratos em maceração; (B) Extratos em liofilização.

Extratos aquosos de folha de oliveira e medronheiro (Oaq23 e Maq24)

As folhas utilizadas para realizar este extrato secaram no desidratador, foram trituradas no processador de alimentos e a extração foi feita colocando uma solução de 5 g de amostra e 90 mL de água estéril em banho de ultrassons (Elmasonic S 300 (H)) durante 45 minutos. O extrato foi colocado em agitação 250 RPM “overnight”. Por fim, foi filtrado com uma compressa estéril, seco no evaporador rotativo e dissolvido em água estéril para uma concentração final de 400 mg/mL (Gonelimali et al., 2018).

Extratos etanólicos de folha de oliveira, medronheiro, vagem e folha de feijão frade e folha de castanheiro (Oet25, Met26, FVet28, Fet30, Cet31)

A extração foi feita colocando 5 g de material triturado e 90 mL de uma mistura 9:1 etanol/água estéril em banho de ultrassons durante 45 minutos. O extrato foi colocado em agitação 250 RPM “overnight”. Por fim, o extrato foi filtrado com uma compressa estéril, seco no evaporador rotativo e dissolvido em DMSO 1% para uma concentração final de 400 mg/mL (Gonelimali et al., 2018).

As folhas utilizadas na preparação de Oet25 foram secas no desidratador, e as utilizadas em Fet30 à temperatura ambiente e abrigo da luz.

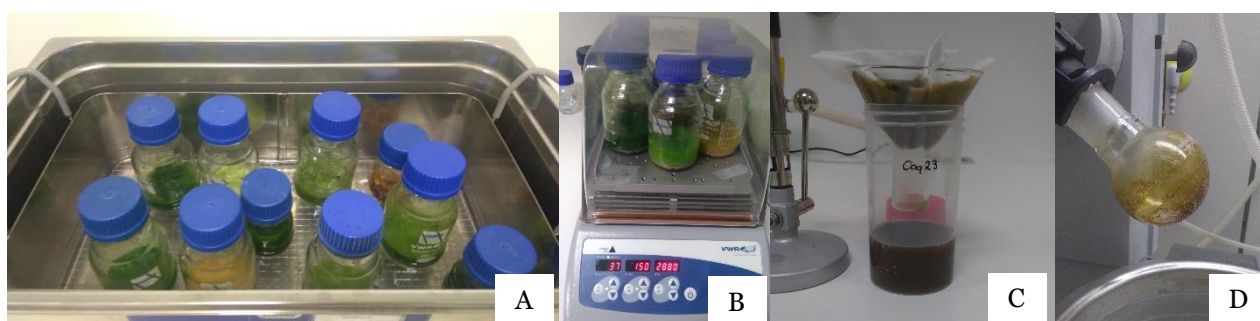


Figura 5.2.6 – Elaboração dos extratos Oaq23 a Cet31 e CPet34. (A) Extratos em banho de ultrassons; (B) Extratos em agitação; (C) Filtração do extrato Oaq23; (D) Evaporação do extrato Met26.

Extratos aquosos de folha de castanheiro e pele interior da castanha (Caq32 e CPaq33)

As folhas ou a pele interior da castanha utilizadas para realizar este extrato foram trituradas no processador de alimentos. A extração foi feita fervendo 2 g de amostra em 100 mL de água estéril durante 30 minutos. O extrato foi filtrado com uma compressa estéril, seco em evaporador rotativo e liofilizado. Por fim o produto final é dissolvido em água de modo a obter uma concentração de 20 mg/mL (Quave et al., 2008).

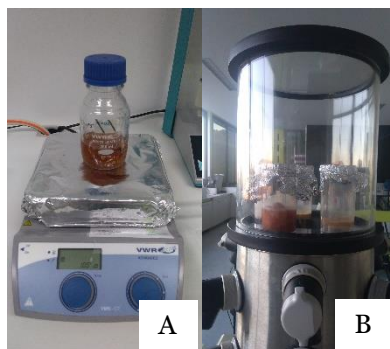


Figura 5.2.7 – Elaboração dos extratos Oaq19, Maq20, Caq32, CPaq33 e Mmet35. (A) Extrato CPaq33 em ebulição; (B) Extratos Oaq19, Maq20, Caq32, CPaq33 e Mmet35 em liofilização.

Extrato etanólico de pele interior de castanha (CPet34)

A extração foi feita colocando 5 g de material e 90 mL de uma mistura 9:1 etanol/água estéril em banho de ultrassons durante 45 minutos. O extrato foi colocado em agitação 250 RPM “overnight”. Por fim, foi filtrado com uma compressa estéril, seco no evaporador rotativo e dissolvido em DMSO 1% para uma concentração final de 400 mg/mL (Gonelimali et al., 2018).

Extrato metanólico de medronho (Mmet35)

Os medronhos utilizados para a elaboração deste extrato foram secos em desidratador, congelados a -80°C e triturados no processador de alimentos. A amostra obtida foi liofilizada. A extração foi feita colocando 2 g deste liofilizado em 100 mL de metanol à temperatura ambiente durante 72 horas. Após este tempo, filtrou-se o extrato com uma compressa estéril, evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e foi feita uma liofilização. Por fim, o produto final foi dissolvido em DMSO 1% para uma concentração de 2000 mg/mL (Mwambete, 2009). Após dissolução, o extrato foi filtrado com um filtro de seringa de nylon estéril de 0,22 µm.

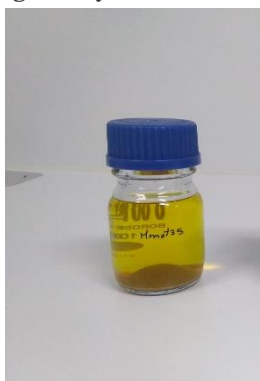


Figura 5.2.8 – Extrato Mmet35 em maceração

5.3 Preparação das estirpes bacterianas

Para a testagem da atividade antimicrobiana e anti-biofilme foram utilizadas as estirpes *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (ATCC 6538) obtidas de uma BIOBALL® Standardized Strains (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Estes microrganismos foram inoculados em TSB (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália) (para *L. monocytogenes*), MHB (VWR International, Pensilvânia, EUA) (para *S. aureus*) e NB (VWR International, Pensilvânia, EUA) (para *P. aeruginosa*), “overnight” a 30°C, e as culturas foram criopreservadas (-80°C) em glicerol 30% numa proporção de 1:2.

Aquando da sua utilização, as culturas eram revivificadas em placas de TSA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (para *L. monocytogenes*), MHA (Biokar Diagnostics, Allonne, França) (para *S. aureus*) e NA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (para *P. aeruginosa*) durante 24 horas a 37°C e 25°C, no caso da *P. aeruginosa*. Após este tempo, eram retiradas algumas colônias para os meios líquidos já mencionados para elaboração de uma pré-cultura, a 30°C, que atingisse a fase exponencial de crescimento. Nesta altura, as culturas eram acertadas a 0,5 McFarland com

uma solução salina 0,45% NaCl (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), e utilizadas de acordo como descrito seguidamente.

5.4 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antibacteriana foi feita através do método de difusão em disco, e por diluição em meio líquido, com base em de Oliveira et al., 2019 e Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021, respetivamente.

5.4.1 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

Em microplacas de 96 poços foram colocados, em triplicado, 100 µL de meio de cultura estéril em cada poço e 100 µL de extrato no primeiro poço de cada coluna e homogeneizados fazendo “up and down” 6-8 vezes. De seguida, retiraram-se 100 µL deste poço inicial que foram colocados no poço seguinte e repetiu-se o procedimento de modo a obter diluições sucessivas 1:2 do extrato, obtendo as concentrações indicadas na Tabela 5.5. Por fim, adicionaram-se 100 µL de cultura diluída em solução salina (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) numa proporção de 1:100 e as placas foram incubadas a 37°C e 380 RPM durante 24 horas. Para controlo positivo colocaram-se 100 µL do antibiótico cloranfenicol (25 µg/mL) (VWR International, Pensilvânia, EUA), e para controlo negativo 100 µL do solvente do extrato na mesma concentração utilizada nos extratos. Foi ainda efetuado um controlo de esterilidade constituído por 200 µL de meio estéril. Consideraram-se concentrações mínimas inibitórias onde foi possível identificar uma ausência de crescimento bacteriano, ou seja, ausência de turvação. Alguns extratos, quando imediatamente em contacto com o meio de cultura, adquiriam um aspeto coloidal que impedia a análise dos CMI, de modo que foi necessário adicionar uma incubação de 2-3 horas, nas condições já referidas, com 40 µL de resazurina 0,01% (ThermoFisher Scientific, Massachussets, EUA), colocada tanto nos poços experimentais como nos poços de controlo. Efetuaram-se 5 ensaios independentes sendo o resultado apresentado a moda dos mesmos.

Para determinar a CMB, 100 µL dos poços 2×CMI, CMI e ½×CMI, foram espalhados em NA, MHA e TSA, para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respetivamente, com ajuda de um espalhador estéril. Estas placas foram incubadas durante 24 horas a 25°C no caso de *P. aeruginosa*, e 37°C para as restantes bactérias. Considerou-se CMB, a concentração mais baixa onde não cresceram colónias na placa, efetuaram-se também 5 ensaios independentes sendo o resultado apresentado a moda dos mesmos.

Tabela 5.4 – Concentrações de cada extrato testadas no ensaio de determinação da CMI

Extrato	Intervalo de concentrações testadas (mg/mL)
Omet1	0,08-10,00

Baq7 a Saq15.3	0,20-25,00
FRaq16 a FCaq18	1,56-200,00
Oaq19 a Met22	0,04-5,00
Oaq23 a Fet30	0,78-100,00
Cet31	0,05-100,00
Caq32 e CPaq33	0,04-5,00
CPet34	0,78-100,00
Mmet35	3,91-500,00

5.4.2 Difusão em disco

Placas de TSA, NA e MHA foram inoculadas com 200 µL de cultura por espalhamento com uma zaragatoa estéril, e com uma pinça esterilizada colocaram-se discos de papel de 9 mm (Whatman, Maidstone, Reino Unido) impregnados com 50 µL de extrato. Cada placa continha um disco de controlo negativo, contendo o solvente correspondente, na mesma concentração utilizada no extrato; um disco de controlo positivo, cloranfenicol (100 µg/mL); e três discos com diferentes concentrações do mesmo extrato denominadas de E1 (diluição 1:2 da concentração inicial), E2 (diluição 1:4 da concentração inicial), E3 (diluição 1:8 da concentração inicial).

As placas foram incubadas 24 horas a 37°C (exceto *P. aeruginosa*, que foi colocada a 25°C), e ao final deste tempo foram quantificados os halos de inibição, de acordo com Tendencia, 2004, e feito um registo fotográfico das placas.

Este ensaio foi apenas realizado para os extratos que apresentaram atividade inibitória em CMI.

5.5 Atividade anti biofilme

5.5.1 Inibição da formação de biofilme

A taxa de inibição de formação de biofilme foi determinada através do método de coloração com violeta de cristal em microplaca, segundo O'Toole, 2010 com algumas modificações. Para cada extrato foram testadas as concentrações de 8×CMI, 4×CMI e 2×CMI.

Em microplacas de 96 poços foram colocados 50 µL de uma diluição 1:100 da cultura, em meio estéril suplementado com 2% de glucose (NB, MHB, ou TSB, para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respetivamente) e 50 µL de extrato, diluído no solvente correspondente de modo a perfazer a concentração desejada. Como controlo de solvente reservaram-se poços onde foram colocados 50 µL de cultura e 50 µL do solvente dos extratos, na mesma concentração utilizada nos extratos. Foi ainda efetuado um controlo de extrato com 50 µL de meio estéril e 50 µL a cada concentração testada, e um controlo de esterilidade constituído por 100 µL de meio estéril.

As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após este tempo, retiraram-se as células planctónicas virando a placa ao contrário, e os poços foram lavados com PBS. Fez-se uma fixação com 125 µL de metanol, durante 20 minutos. Após remoção do metanol, adicionaram-se 125 µL de uma solução de violeta de cristal (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) 0,1% em água, e as placas foram incubadas 10-15 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas como descrito, secas com papel e deixadas a secar, invertidas, de um dia para o outro. Por fim, para quantificar o biofilme foram adicionados 125 µL de ácido acético 30% preparado com água, e as placas foram novamente incubadas 10-15 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 600 nm através de um leitor de microplacas Varioskan™ LUX multimode microplate reader.

A percentagem biomassa de biofilme foi calculada, utilizando as Abs_{600nm} do ensaio e do controlo de solvente com a seguinte fórmula utilizada por Tea et al., 2022:

$$\% \text{Biomassa de Biofilme} = (\text{Ensaio/Controlo}) \times 100$$

5.5.2 Dispersão de biofilme

A taxa de dispersão de biofilme foi determinada segundo o protocolo de Famuyide, 2019 com algumas alterações. Para cada extrato foram testadas as concentrações de 8×CMI, 4×CMI e 2×CMI.

Em microplacas de 96 poços foram colocados 100 µL de uma diluição 1:100 de cultura em meio estéril (NA, MHA, ou TSA, para *P.aeruginosa*, *S.aureus* e *L. monocytogenes*, respetivamente) suplementado com 2% de glucose, em todos os poços e a placa foi incubada 48 horas a 37°C. Ao final deste tempo, as células planctónicas foram removidas virando a placa ao contrário, e os poços foram lavados com PBS. A cada poço foram adicionados 100 µL de extrato diluído no solvente correspondente para as concentrações pretendidas, e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições durante 24 horas. Como controlo negativo utilizou-se o solvente do extrato, à mesma concentração utilizada nestes. Fizeram-se ainda um controlo de extrato onde foram colocados apenas 100 µL de extrato, sem cultura bacteriana adicionada, diluído no solvente correspondente para as mesmas concentrações testadas, e um controlo de esterilidade constituído por 100 µL de meio de cultura.

Após a segunda incubação, o extrato foi removido como descrito para remover as células planctónicas e foi feita uma nova lavagem com PBS. Adicionalmente elaborou-se uma fixação química do biofilme com 125 µL de metanol, durante 20 minutos. Por fim, de modo a quantificar o biofilme final, procedeu-se à coloração de violeta cristal como anteriormente descrito.

A percentagem biomassa de biofilme foi calculada, utilizando as Abs_{600nm} do ensaio e do controlo negativo, com a seguinte fórmula utilizada com a seguinte fórmula utilizada por Tea et al., 2022:

$$\% \text{Biomassa de Biofilme} = (\text{Ensaio/Controlo}) \times 100$$

5.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média±desvio padrão, no caso dos ensaios de difusão em disco e dos ensaios relativos à atividade anti-biofilme, enquanto que para os ensaios de CMI e CMB foram expressos como a moda de cinco ensaios independentes. A análise estatística foi elaborada através do software GraphPad Prism8, onde foi aplicado o teste t de Student para a análise dos ensaios de quantificação dos biofilmes, e o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os valores **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ indicam o grau de evidência estatístico.

Capítulo 6

Resultados e discussão

6.1 Atividade antimicrobiana

6.1.1 Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida

A atividade antimicrobiana dos extratos produzidos foi primeiramente avaliada através da determinação das CMI, onde se verificou-se que *S. aureus* demonstrou ser o microrganismo mais suscetível a extratos vegetais e *L. monocytogenes* o menos suscetível.

Aquando da realização deste teste, alguns extratos ao entrarem imediatamente em contacto com o meio de cultura adquiriam um aspeto coloidal que impedia a análise dos CMI. De modo a poder verificar resultados, procedeu-se à adição de resazurina aos seguintes extratos: Maq14.1, Maq14.2, Maq14.3, Saq15.1, Maq20, Met22, Maq24, Met26, Cet31, CPaq33 e CPet34.

A determinação da CMB permite distinguir um efeito bacteriostático de um efeito bactericida, e deste modo determinar a que concentração o extrato irá não só inibir o crescimento dos microrganismos presentes, como também eliminar os mesmos. Assim, verificou-se que a CMB coincide com a CMI para os extratos Oaq13.2, Saq15.3 e Caq32 em *P. aeruginosa*, Oaq12.3 e Oaq19 em *S. aureus*, e Maq14.1, Maq14.2, Cet31, Caq32 e CPaq33 em *L. monocytogenes*.

Na tabela 6.1.1 encontram-se os resultados descritos para CMI e CMB de cada extrato no respetivo microrganismo.

Tabela 6.1.1 – Resultados CMI e CMB. Os resultados representam a moda de 5 ensaios independentes expressos em mg/mL.

Extrato	Espécies bacterianas					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Omet1	>10,00	>10,00	>10,00	>10,00	2,50	5,00
Baq7	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Oaq8	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	3,13	6,25
Faq9	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Baq10.1(*)	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Baq10.2	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Baq10.3	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	25,00	>25,00
Faq11.1	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00

Faq11.2	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Faq11.3	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00
Oaq12.1	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	3,13	>25,00
Oaq12.2	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	3,13	6,25
Oaq12.3	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00	3,13	3,13
Oaq13.1	>25,00	>25,00	6,25	>25,00	6,25	12,50
Oaq13.2	>25,00	>25,00	6,25	6,25	6,25	12,50
Oaq13.3	>25,00	>25,00	6,25	>25,00	6,25	12,50
Maq14.1	6,25	6,25	6,25	>25,00	3,13	6,25
Maq14.2	3,13	3,13	12,50	n.d.	1,56	3,13
Maq14.3	1,56	3,13	12,50	25,00	1,56	3,13
Saq15.1	12,50	25,00	12,50	>25,00	12,50	25,00
Saq15.2	25,00	>25,00	25,00	>25,00	25,00	>25,00
Saq15.3	25,00	>25,00	25,00	25,00	12,50	>25,00
Fraq16(*)	n.d	n.d	50,00	n.d	200,00	n.d
FVaq17	>200,00	>200,00	>200,00	>200,00	>200,00	>200,00
FCaq18(*)	200,00	n.d	200,00	n.d	200,00	n.d
Oaq19	>5,00	>5,00	2,50	>5,00	2,50	2,50
Maq20	2,50	5,00	n.d.	n.d.	1,25	2,50
Oet21	>5,00	>5,00	5,00	>5,00	>5,00	>5,00
Met22	1,25	2,50	2,50	>5,00	1,25	2,50
Oaq23	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00
Maq24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,13	n.d.
Oet25	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00
Met26	3,13	6,25	n.d.	n.d.	3,13	3,13
FVet28(*)	n.d	n.d	>100,00	n.d	100,00	n.d
Fet30	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00	>100,00
Cet31	6,25	6,25	0,39	n.d.	1,56	1,56
Caq32	2,50	2,50	0,63	0,63	0,63	1,25
CPaq33	1,25	1,25	1,25	2,50	0,63	1,25
CPet34	6,25	n.d.	n.d.	n.d.	3,13	n.d.
Mmet35	31,25	125,00	7,81	15,63	62,50	125,00

n.d. significa não determinado; os extratos marcados com (*) correspondem a um único ensaio independente

6.1.1.1 *Listeria monocytogenes*

Em *L. monocytogenes* os extratos com maior atividade antimicrobiana, ou seja, com CMIs mais baixos, foram o extrato aquoso de pele interior da castanha CPaq33 e o extrato etanólico de folha de medronheiro Met22, com CMIs de 1,25 mg/mL, seguidamente do extrato aquoso de folha de medronheiro Maq14.3, apresentando CMI de 1,56 mg/mL. Já os extratos menos eficazes foram o extrato metanólico de medronho com CMI de 31,25 mg/mL, e os extratos aquosos de folha de

sabugueiro Saq15.1, Saq15.2 e Saq15.3, sendo as suas CMI's 12,5, 25 e 25 mg/mL, respetivamente (Tabela 6.1.1).

Relativamente a este microrganismo encontram-se descritas CMI's de 62,6 mg/mL em extratos etanólicos (Liu et al., 2017) e 0,625 mg/mL em extratos metanólicos de folha de oliveira, bem como CMB >5 mg/mL (Nostro, A. et al., 2016), não tendo sido identificada nenhuma atividade de extratos de oliveira para este microrganismo neste trabalho. Para o medronheiro apenas existem CMI's determinados em extratos etanólicos da folha com valores de 1 mg/mL, indo ao encontro do obtido para o extrato etanólico Met22 (Bouyaha et al., 2016).

Os restantes resultados demonstram que possivelmente a relação solvente/matriz utilizada na elaboração dos extratos aquoso de folha de medronheiro pode interferir na sua atividade antimicrobiana, uma vez que os extratos Maq14.1, Maq14.2 e Maq14.3 apresentam CMI's decrescentes. Já em extrações etanólicas verifica-se uma maior eficácia da extração por maceração comparativamente à extração assistida por ultrassons. No castanheiro, observaram-se melhores resultados com extrações aquosas, quer relativo à folha quer à pele interior da castanha, sugerindo uma melhor solubilidade dos compostos antimicrobianos desta planta em água.

6.1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Relativamente a *P. aeruginosa*, os extratos mais eficazes foram o extrato etanólico de folha de castanheiro Cet31, que apresenta uma CMI de 0,39 mg/mL, o extrato aquoso da folha de castanheiro Caq32, com um valor de 0,63 mg/mL, o extrato aquoso de pele interior da castanha CPaq33, com uma CMI de 1,25 mg/mL, e os extratos aquoso de folha de oliveira Oaq19 e metanólico de folha de medronheiro Met22 onde se verificaram CMI's de 2,5 mg/mL (Tabela 6.1.1).

Encontram-se relatados CMI's de 0,064-0,128 mg/mL e 5 mg/mL, juntamente com CMB >5 mg/mL em extratos metanólicos da folha de oliveira (Edziri, H. et al., 2019; Nostro, A. et al., 2016). As CMI's estão de acordo com o obtido para Oet21 apesar de o solvente utilizado não ser o mesmo, não tendo sido possível encontrar resultados descritos para extratos aquosos neste microrganismo. Nos extratos de medronheiro, os resultados obtidos estão algo de acordo com a literatura, que descreve CMI's de 5 mg/mL em extratos aquosos da folha (Ferreira et al., 2012; Malheiro et al., 2012), uma vez que se obtiveram CMI's ligeiramente superiores (Tabela 6.1.1). Já no fruto, encontram-se descritas CMI de 0,2 mg/mL em extratos metanólicos, o que não corresponde ao obtido (Salem et al., 2018).

Neste caso já se verifica uma consistência de resultados entre extratos da mesma concentração, mas com proporções solvente/matriz diferentes, como se pode verificar na tabela 6.1.1 nos casos dos extratos Oaq13 e Saq15. Não se verificou CMI nos extratos Oaq12 às concentrações testadas, podendo esta diferença estar relacionada com o método de secagem das folhas utilizadas, uma

vez que estes extratos utilizaram folhas secas em micro-ondas. Este tipo de secagem pode degradar alguns componentes presentes que talvez fossem responsáveis pela inibição que os extratos Oaq13 demonstram em *P. aeruginosa*. Em medronheiro e castanheiro demonstrou-se mais eficaz a extração etanólica, evidente nos baixos valores obtidos em relação Met22 e Cet31, comparativamente aos extratos aquosos do mesmo recurso.

6.1.1.3 *Staphylococcus aureus*

Os extratos que obtiveram maior atividade antimicrobiana para *S. aureus* foram os extratos aquosos de castanheiro Caq32 e CPaq33, com CMI de 0,63 mg/mL, os extratos de medronheiro Maq20 e Met22, com CMI de 1,25 mg/mL, e os extratos de medronheiro e castanheiro Maq14.2, Maq14.3 e Cet31, apresentando CMI de 1,56 mg/mL (Tabela 6.1.1).

A literatura descreve CMI de 100 mg/mL em extratos aquosos de folha de oliveira (De la Ossa, J. et al., 2021), 0,032-0,128 mg/mL e 0,625 mg/mL e CMB de em extratos metanólicos 0,25 mg/mL para *S. aureus* (Edziri, H. et al., 2019; Nostro, A. et al., 2016), no entanto não foi possível observar nenhum destes valores com os extratos produzidos, sendo as CMI obtidas inferiores no caso dos extratos aquosos e superiores no extrato metanólico (Tabela 6.1.1). Referente ao medronheiro, encontram-se descritas CMI de 2,5 mg/mL em extratos aquosos da folha para *S. aureus* (Ferreira et al., 2012; Malheiro et al., 2012), tendo sido os valores obtidos mais baixos. Quanto ao fruto, encontram-se descritos CMI de 0,2 mg/mL em extratos metanólicos relativamente a *S. aureus* o que não corresponde ao obtido (Salem et al., 2018). O sabugueiro não apresenta muitos estudos relativos às suas capacidades antimicrobianas, tendo sido apenas encontrada uma evidência de um extrato etanólico em *S. aureus* metilicina resistente (Quave et al., 2008). Já no castanheiro, extratos etanólicos da folha e da pele interior da castanha têm atividade comprovada em *S. aureus* e *S. aureus* metilicina resistente (Quave et al., 2008; Zivkovic et al., 2010), não tendo sido encontrados dados relativos a extratos aquosos. Relativamente à norça, não foram encontradas evidências na literatura de atividade antimicrobiana na folha. Apenas foi encontrado um artigo que descreve uma CMI e uma CMB de 1 mg/mL por parte de lípidos extraídos das partes aéreas da planta (Dhouioui et al., 2016), pelo que os compostos responsáveis pela atividade podem existir em maior abundância noutra local da planta que não a folha.

Verifica-se que os extratos Oaq8, Oaq12.1, Oaq12.2 e Oaq12.3 apresentam maior atividade antimicrobiana que os extratos Oaq13.1, Oaq13.2 e Oaq13.3, podendo novamente esta diferença estar associada ao método de secagem da folha. O extrato aquoso de norça Baq10.3 foi o único proveniente deste recurso a demonstrar atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, e unicamente em *S. aureus*. Apesar deste extrato possuir a mesma concentração final que os restantes extratos de norça, apenas este produziu inibição pelo que talvez a relação solvente/matriz utilizada tenham também alguma influência na extração deste recurso. Também

neste microrganismo se verifica que os extratos de folha de castanheiro apresentaram melhores resultados com a extrações aquosas.

No que toca à extração vegetal, há diversos fatores que determinam a suscetibilidade antimicrobiana de um extrato. Para além dos motivos já referidos, entre eles a escolha do método de secagem ou a possível influência da relação solvente/matriz utilizada na extração, a extração vegetal pode ser influenciada por outros fatores relacionados com a origem da planta: espécie, época da colheita e idade, procedimentos e região de cultivo, condições de armazenamento após colheita, entre outros (Izah, 2018, Vaou et al., 2021). A região e o clima onde a planta é cultivada são dos principais fatores responsáveis pelas diferenças encontradas entre artigos no que toca a atividade antimicrobiana, uma vez que as espécies vegetais podem ter diferentes produção de compostos de acordo com a precipitação, humidade, tipo de solo, exposição solar a que estão expostas, condições que variam consoante a localização geográfica e que irão consequentemente alterar a composição dos extratos (Vaou et al., 2021). Também as condições de extração podem afetar o tipo de resultado obtido, por exemplo, a escolha do solvente altera a concentração de fitoquímicos extraída consoante a sua polaridade, assim como o tempo da extração e a concentração do extrato (Izah, 2018).

Para além dos resultados mencionados, não foi possível determinar as CMI dos extratos Maq20, Maq24, Met26 e CPet34 em *P. aeruginosa*, e Met26 em *L. monocytogenes*, nem determinar as CMB de Maq14.2, Maq24, Met26, Cet31, CPet34 em *P. aeruginosa*, Maq24 e CPet34 em *S. aureus* e *L. monocytogenes*, devido a inconsistências de resultados entre os ensaios elaborados.

6.1.2 Difusão em disco

Os resultados dos ensaios de difusão em disco não estão de acordo com o observado para as CMIs, uma vez que não foi possível observar halos de inibição em todos os extratos que apresentaram resultado para CMI. Embora estes extratos tenham demonstrado este tipo de atividade nos ensaios de determinação de CMI e CMB, o mesmo não se verificou nos ensaios de difusão em agar. O aparecimento de um halo inibitório pode ser influenciado por fatores como a solubilidade da substância testada, o seu alcance de difusão no agar, o seu tamanho molecular e até mesmo a própria evaporação da substância (Bubonja-Sonje et al, 2020). Os compostos antimicrobianos presentes nas plantas são maioritariamente apolares e, dada a natureza aquosa do agar, têm mais dificuldade de difusão que compostos polares, pelo que o não aparecimento de halos de inibição não significa que o extrato não tem atividade antimicrobiana (Bubonja-Sonje et al, 2020; Eloff 2019). Por este mesmo motivo, alguns autores não consideram este teste adequado para testagem de compostos fenólicos, sendo a determinação das CMI o método standard.

Deste modo, não foi possível verificar aparecimento de halos de inibição para os extratos Omet1, Oaq12.1, Oaq12.2, Oaq12.3, Oaq13.1 (em *S. aureus*), Oaq13.2 (em *S. aureus*), Oaq13.3 (em *S. aureus*), Saq15.1, Saq15.2, Saq15.3, FRaq16, Oaq19 (em *S. aureus*), Oet21, Maq20, Met22, Caq32, CPAq33 (em *L. monocytogenes* e *S. aureus*) e CPet34 (em *L. monocytogenes*). Estes resultados não vão ao encontro dos resultados obtidos por Baysal et al., 2021 e Malheiro et al., 2012 que descrevem halos inibitórios de extratos metanólicos de folha de oliveira em *S. aureus* e de extratos de folha de medronheiro, quer etanólicos quer aquosos, nas mesmas concentrações testadas de Maq20 e Met22, que podem no entanto estar associados à quantidade de extrato colocada nos discos.

Os extratos FCAq18 e FVet28 não foram testados pelas razões já anteriormente mencionadas.

Os extratos com maior capacidade de inibição foram os extratos de medronheiro e os extratos etanólicos de castanheiro, sendo que os extratos de oliveira demonstram fraca capacidade de difusão no agar, inclusivamente não formando halos de inibição em *S. aureus*, como se pode verificar na Tabela 6.1.2.

Os extratos aquosos e etanólicos de folha de medronheiro Maq14.1, Maq14.2, Maq14.3, Maq24, Met26 têm maior capacidade de inibição em *L. monocytogenes*, com diâmetros de inibição entre 13,00±0,00 mm e 20,67±0,58 mm, e menor em *P. aeruginosa*, com diâmetros de inibição entre 9,00±0,00 mm e 13,68±0,58 mm (superando os diâmetros descritos por Malheiro et al., 2012, onde se verificam valores entre 9 mm e 10mm para concentrações 5-10 mg/disco), enquanto que a eficácia do extrato metanólico de medronho Mmet35 é exatamente o oposto, verificando-se diâmetros para *P. aeruginosa* entre os 13,33±2,08 mm e os 20,00±1,00 mm e entre 10,33±0,58 mm e 15,00±1,00 mm em *L. monocytogenes*. Nos extratos etanólicos de castanheiro Cet31 e CPet34, o microrganismo mais suscetível é *L. monocytogenes* com halos entre 16,00±1,00 mm e os 20,67±0,58 mm relativamente à folha e entre 12,00±0,00 mm e 14,33±1,53 mm relativamente à pele interior da castanha. O mais resistente em extratos da folha foi *S. aureus* apresentando halos entre 10,33±0,58 e 14,67±0,58 mm, e em extratos da pele interior da castanha *P. aeruginosa* 9,67±0,58 mm. Resultados já reportados para concentrações ligeiramente abaixo das testadas em extratos etanólicos da folha demonstram diâmetros de inibição de 14-16 mm e de 9,67 mm acerca de extratos da pele interior da castanha, relativo a *S. aureus* (Zivkovic et al, 2010), indo ao encontro do obtido no trabalho. Os diâmetros de inibição obtidos para cada extrato estão representados na Tabela 6.1.2.

Tabela 6.1.2 – Diâmetros de inibição (mm) relativos às três concentrações de extrato testadas. Média±SD, n=3.

Extrato	Espécies bacterianas								
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
Oaq13.1	-	-	-	11,33±0,58	10,00±1,00	9,67±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00
Oaq13.2	-	-	-	11,33±0,58	10,00±1,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00
Oaq13.3	-	-	-	12,67±0,58	10,67±0,58	9,33±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00
Maq14.1	18,00±1,73	15,33±0,58	13,33±0,58	12,33±0,58	10,67±0,58	9,00±0,00	13,33±0,58	10,67±0,58	9,00±0,00
Maq14.2	16,33±0,58	15,00±1,00	13,00±0,00	11,33±0,58	10,50±0,71	9,00±0,00	12,67±0,58	10,33±0,58	9,00±0,00
Maq14.3	15,00±2,00	14,00±2,65	13,33±0,58	11,67±0,58	9,67±0,58	9,00±0,00	12,67±0,58	10,33±0,58	9,00±0,00
Oaq19	-	-	-	9,67±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00
Maq24	20,67±0,58	17,67±0,58	14,67±0,58	13,68±0,58	11,33±0,58	9,00±0,00	14,67±0,58	12,33±0,58	10,33±0,58
Met26	19,67±1,16	16,33±0,58	13,67±1,16	11,67±0,58	10,67±0,58	9,00±0,00	13,33±1,16	12,00±1,00	10,00±0,00
Cet31	20,67±0,58	17,00±0,00	16,00±1,00	15,67±3,06	11,67±0,58	10,00±1,73	14,67±0,58	12,67±0,58	10,33±0,58
CPaq33	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,67±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00
CPet34	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,67±0,58	9,00±0,00	9,00±0,00	14,33±1,53	13,00±0,00	12,00±0,00
Mmet35	15,00±1,00	10,33±0,58	9,00±0,00	20,00±1,00	16,00±2,65	13,33±2,08	15,33±1,16	12,00±1,00	9,00±0,00
Cloranfenicol		37,29±1,23			38,60±3,05			36,10±1,45	

Os diâmetros de inibição apresentados incluem o diâmetro do disco utilizado, 9mm. (-) significa extrato não testado

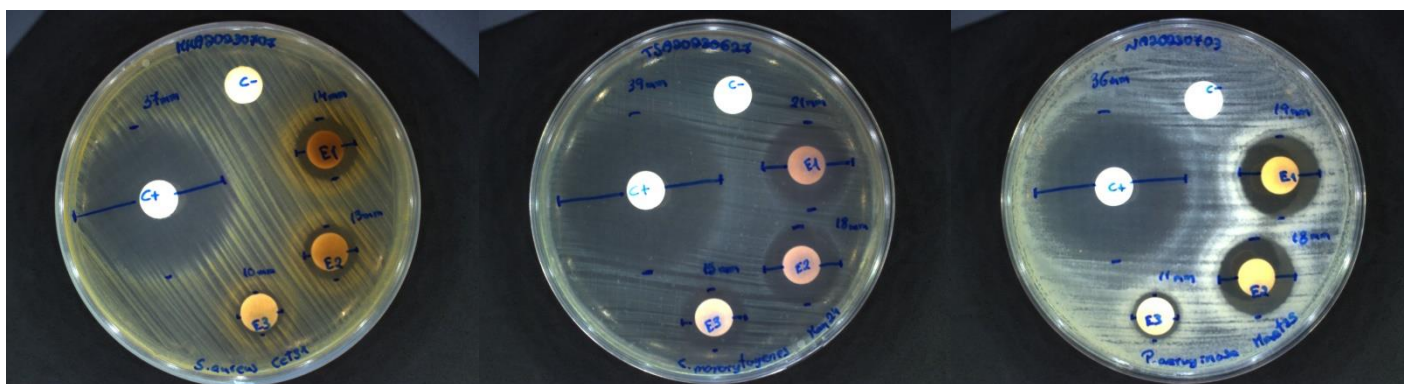


Figura 6.1.2 – Halos de inibição. (A) Cet31 em *S.aureus*. (B) Maq24 em *L. monocytogenes*. (C) Mmet35 em *P.aeruginosa*

6.2 Atividade anti biofilme

Determinada a atividade antimicrobiana, procedeu-se à determinação da atividade anti-biofilme, através de dois protocolos: inibição da formação de biofilme e dispersão de biofilme. Para cada extrato foram testadas as concentrações correspondentes a 2×CMI, 4×CMI e 8×CMI. Devido ao esgotamento das amostras recolhidas, a atividade anti-biofilme apenas foi possível determinar para os extratos Omet1, Oaq8, Oaq12.1, Oaq12.2, Oaq12.3, Oaq13.1, Oaq13.2, Oaq13.3, Maq14.2 (apenas *S. aureus*), Saq15.1 (apenas *S. aureus* e *L. monocytogenes*), Saq15.2, Saq15.3, Oaq19, Maq20 (apenas *L. monocytogenes*), Oet21 e Caq32 (apenas *S. aureus* e *P. aeruginosa*) relativo à capacidade de inibição de formação e para Omet1, Oaq8, Oaq12.1, Oaq12.2, Oaq12.3, Oaq13.1, Oaq13.2, Oaq13.3, Saq15.1 (apenas *S. aureus* e *L. monocytogenes*), Saq15.2 (apenas *S. aureus*), Saq15.3 (apenas *S. aureus* e *P. aeruginosa*), Oaq19, Oet21 e Caq32 (apenas *S. aureus* e *P. aeruginosa*) quanto à capacidade de dispersão.

Os resultados obtidos apresentaram por vezes percentagens de biomassa de biofilme superiores a 100% ou inferiores a 0%. As superiores a 100% indicam que o extrato em questão não tem um efeito redutor no biofilme, mas sim promotor da formação de biofilme. As percentagens inferiores a 0% ocorriam quando o valor da absorvância obtida para o controlo de extrato era superior ao valor experimental. Este facto pode dever-se a alguma aderência do extrato ao poço, responsável pelo aumento do valor da absorvância aquando da leitura. Outra questão que pode estar na causa destes resultados foi a fraca formação de biofilme demonstrada pelas estirpes durante os ensaios. Sabemos que os biofilmes formados pelas bactérias podem ser classificados em fracamente, moderadamente e fortemente aderentes, através da comparação entre DO de poços experimentais e de controlo estéril (Stepanovic et al., 2000), e durante os ensaios realizados, várias vezes os valores obtidos correspondiam a fracamente aderente, e por vezes mesmo não aderente, levando à exclusão de alguns resultados. No entanto, apesar de expressos nos gráficos seguidamente apresentados, estes valores negativos, assim como os valores de significância associados, não devem ser tomados em conta. Considera-se que estes valores correspondem a 0% de formação de biomassa de biofilme.

Alguns resultados também apresentam desvios padrão elevados, o que indica uma diferença muito acentuada entre os valores de ensaio para ensaio. Esta disparidade pode dever-se a várias razões: alterações no ambiente da sala, alterações na composição do extrato devidas ao congelamento e descongelamento das alíquotas preparadas, a concentração de glucose e os meios de crescimento escolhidos, erros do operador, entre outros. Dado que este tipo de ensaio é muito propício à ocorrência de variabilidade, recomenda-se a realização de várias repetições e replicados, sendo que os ensaios foram apenas efetuados três vezes em triplicado para cada concentração, seria necessário repetir os mesmos e aplicar alterações melhorativas do método para perceber quais os valores corretos e eliminar possíveis valores atípicos.

Nos ensaios de formação de biofilme relativos a *P. aeruginosa* podemos verificar percentagens de biomassa de biofilme inferiores ao controlo em todos os extratos. Neste microrganismo apenas

foi possível obter um n=3 para o extrato etanólico Oet21 (devido às questões mencionadas acima) apresentando percentagens de redução de biomassa de biofilme de 72,38(±7,95)%, 90,44(±11,64)% e 90,01(±29,14)% para 8×CMI, 4×CMI e 2×CMI, respectivamente; e para o extrato aquoso Caq32 onde se verificou uma percentagem de 62,29(±34,82)% relativamente a 8×CMI. Estes e os restantes resultados de *P. aeruginosa* encontram-se descritos nas Figuras 6.2.1, 6.2.2 e 6.2.3.

Na literatura, não foram encontradas evidências de atividade anti-biofilme relativas a extratos aquosos quer de folha de oliveira, quer de sabugueiro referentes a *P. aeruginosa*. Encontraram-se, no entanto, percentagens de inibição de formação de biofilme de 80,6-82,2% em extratos etanólicos de folha de oliveira de concentração 6,25 mg/mL, e também de extratos metanólicos de folha de oliveira de concentrações 0,416-2,5 mg/mL, 0,064-0,128 mg/mL, 0,128-0,256 mg/mL e 0,256-0,512 mg/mL, respetivamente, percentagens de 10-40%, 30-65%, 55-80% e 75-90%. A folha de sabugueiro, literariamente, tem atividade tanto na inibição da formação de biofilmes, mas também na sua dispersão quando em extrato etanólico. Em *P. aeruginosa* são necessárias concentrações de 0,064 mg/mL e 0,890 mg/mL para inibir a formação do biofilme dispersa-lo, em 50%, respetivamente (Křížková et al., 2023).

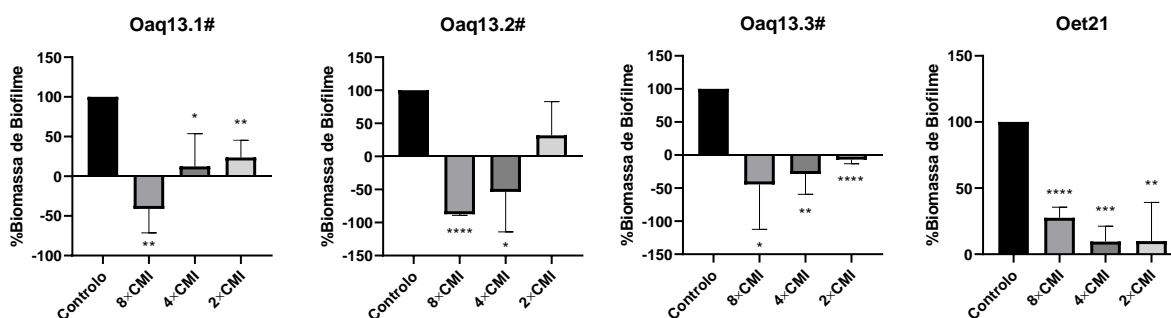


Figura 6.2.1 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *P. aeruginosa* na presença de extratos de folha de oliveira. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água para os extratos aquosos e DMSO 1% para o extrato etanólico. Significância estatística relativamente ao controlo ****p<0,0001; ***p<0,0002; **p<0,005; *p<0,05. Para os extratos marcados (#) apenas foi obtido um n=2.

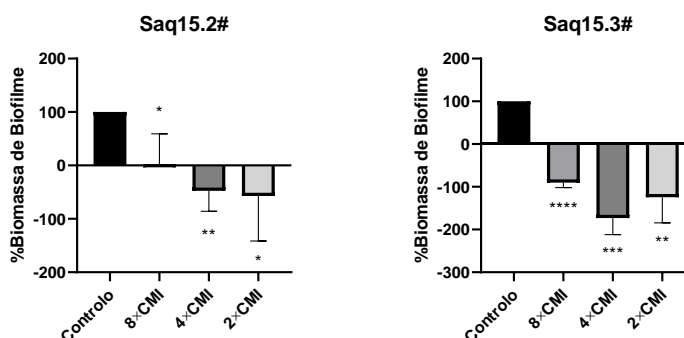


Figura 6.2.2 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *P. aeruginosa* na presença de extratos de folha de sabugueiro. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo ****p<0,0001; ***p<0,0002; **p<0,005; *p<0,05. Para os extratos marcados (#) apenas foi obtido um n=2.

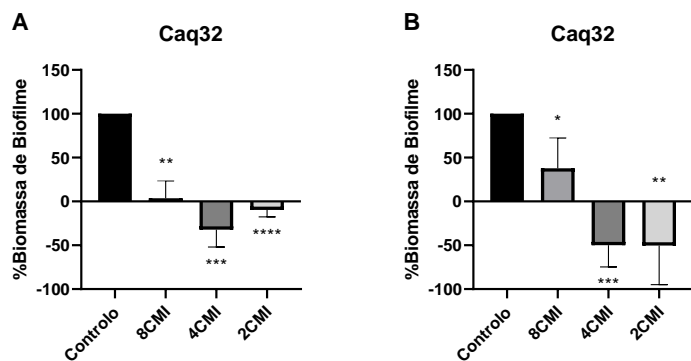


Figura 6.2.3 - Percentagem de biomassa de biofilme formada na presença de extratos de folha de castanheiro (A) em *S.aureus*, (B) em *P. aeruginosa*. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

Em *S. aureus*, podemos também verificar percentagens de biomassa de biofilme inferiores ao controlo em todos os extratos. Apenas três extratos aquosos apresentam percentagens superiores a 0% de biomassa formada nas três concentrações testadas: o extrato de folha de oliveira Oaq8, com taxas de redução de biofilme de $90,42(\pm 7,88)\%$, $94,49(\pm 7,754)\%$ e $88,74(\pm 16,92)\%$ para as concentrações correspondentes a $8\times$ CMI, $4\times$ CMI e $2\times$ CMI, respetivamente; o extrato aquoso de medronheiro Maq14.2, que apresenta percentagens de $64,22(\pm 23,14)\%$, $30,24(\pm 18,52)\%$ e $59,85(\pm 13,68)\%$ para $8\times$ CMI, $4\times$ CMI e $2\times$ CMI, respetivamente; e o extrato aquoso de oliveira Oaq19, onde se verificaram reduções da biomassa de biofilme de $98,74(\pm 31,14)\%$, $96,28(\pm 11,99)\%$ e $87,28(\pm 8,81)\%$ respetivamente $8\times$ CMI, $4\times$ CMI e $2\times$ CMI. Nos restantes extratos surgem ainda percentagens de redução diferentes de zero em todos os extratos em pelo menos uma das concentrações testadas, como demonstrado nas Figura 6.2.3, 6.2.4, 6.2.5 e 6.2.6.

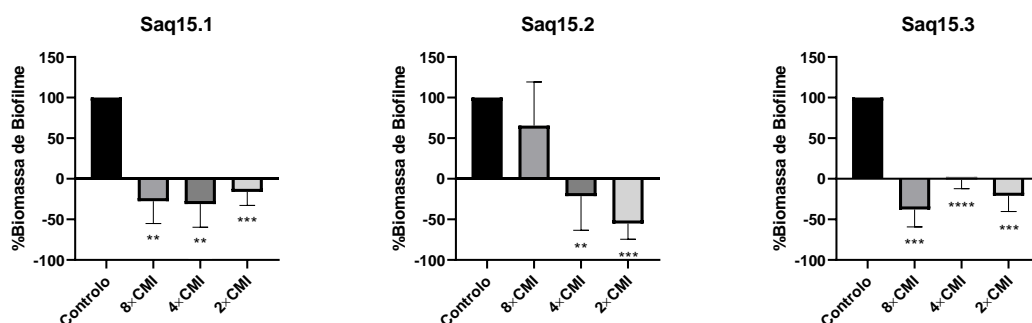


Figura 6.2.4 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *S. aureus* na presença de extratos de folha de sabugueiro. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

Em *S. aureus* encontraram apenas se encontram descritas percentagens de 50-25%, 35-70%, 65-80% e 85-95% para concentrações de 0,052-0,3125 mg/mL, 0,032-0,128 mg/mL, 0,064-0,256 mg/mL e 0,128-0,512 mg/mL, respetivamente, de extratos metanólicos de folha de oliveira (El-Sayed et al., 2020; Edziri et al., 2019; Nostro et al., 2016). A folha de sabugueiro, literariamente, tem atividade não só inibitória da formação de biofilmes, mas também atividade de dispersão quando em extrato etanólico. Em *S. aureus* há inibição da formação de 50% do biofilme a concentrações de 0,051 mg/mL e dispersão nesta mesma percentagem a 0,0688 mg/mL. Relativamente à folha de castanheiro, extratos aquosos de concentrações 5 mg/mL e 15 mg/mL

inibem a formação de biofilme em *S. aureus* em percentagens de 78% e 96%, respetivamente, mais uma vez não correspondendo ao obtido (Cadau et al., 2022).

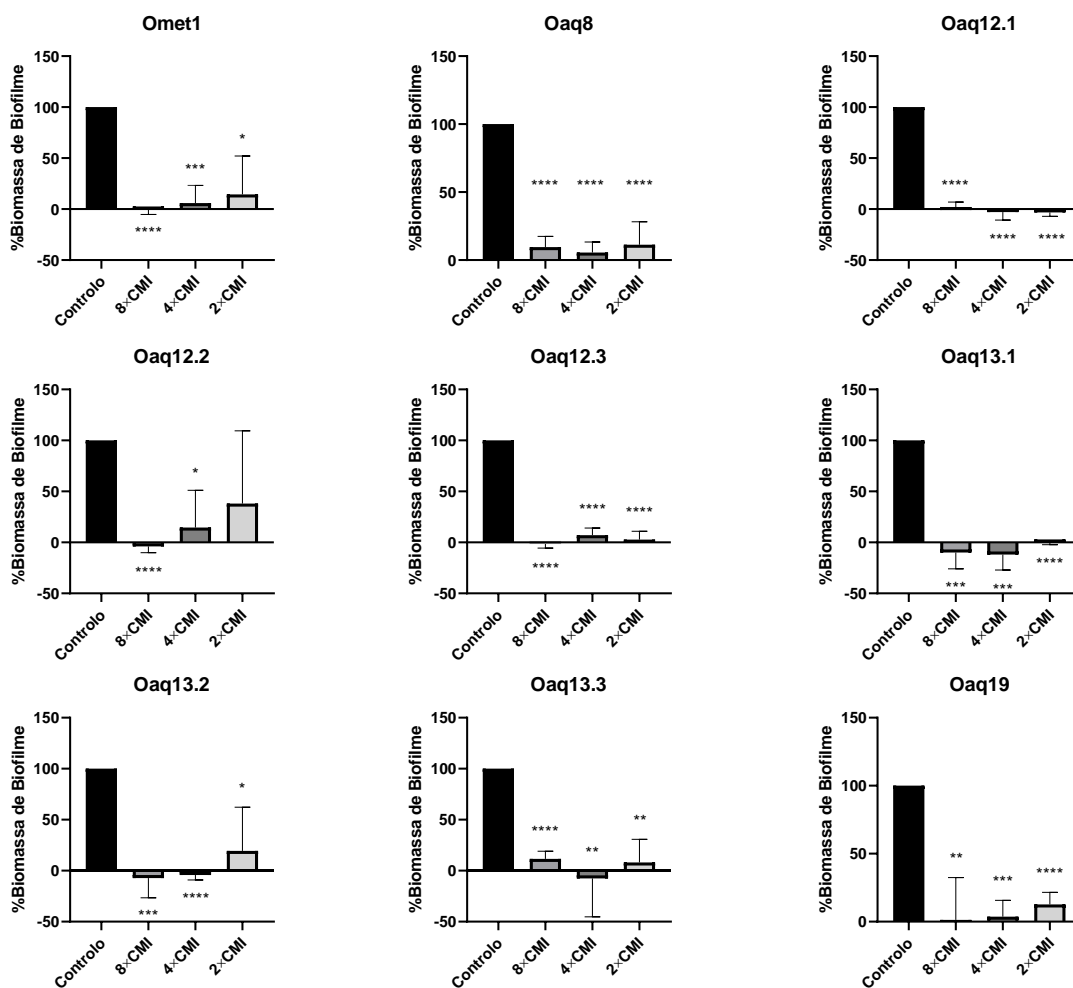


Figura 6.2.5 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *S. aureus* na presença de extratos de folha de oliveira. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água para os extratos aquosos e DMSO 1% para o extrato metanólico. Significância estatística relativamente ao controlo **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

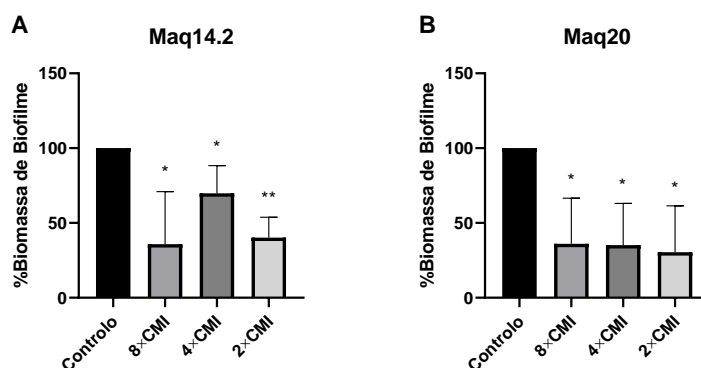


Figura 6.2.6 - Percentagem de biomassa de biofilme formada em extratos de folha de medronheiro. (A) Em *S. aureus* (B) Em *L. monocytogenes*. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

Ainda referente ao mesmo ensaio, *L. monocytogenes* obteve percentagens de redução de biofilme nos valores de 63,97(\pm 30,53)%, 64,86(\pm 27,98)% e 69,57(\pm 31,01)% para 8x CMI, 4x CMI e 2x CMI de Maq20 e 92,68(\pm 15,13)% para 8x CMI de Saq15.3 (Figuras 6.2.6 e 6.2.7).

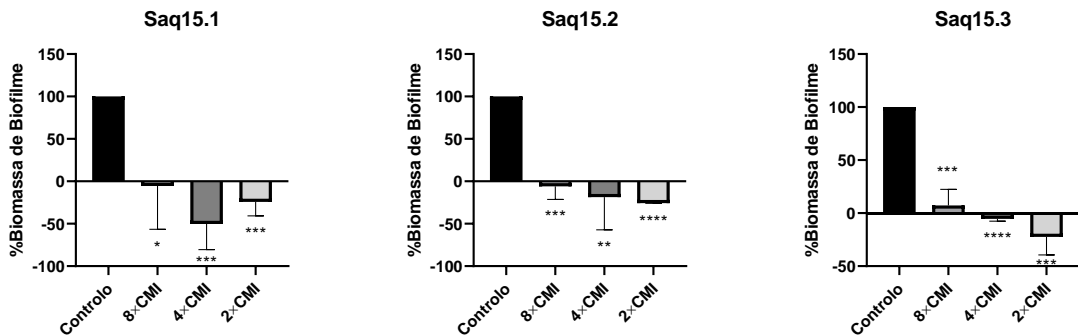


Figura 6.2.7 - Percentagem de biomassa de biofilme formada por *L. monocytogenes* na presença de extratos de folha de sabugueiro. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo ****p<0,0001; ***p<0,0002; **p<0,005; *p<0,05

No ensaio de dispersão de biofilme observou-se uma tendência quase total dos extratos em promover a formação de mais biofilme. Em *P. aeruginosa* verificam-se percentagens reductoras e significativas nos extratos de folha de oliveira Oaq13.1 4x CMI de 36,10(\pm 10,27)%; Oaq19 8x CMI, 4x CMI e 2x CMI de 25,25(\pm 14,84)%, 37,66(\pm 22,74)% e 31,53(\pm 14,69)%; e Oet21 4x CMI e 2x CMI de 46,15(\pm 14,62)% e 28,75(\pm 15,02)% (Figura 6.2.8). Os restantes resultados referentes a este microrganismo encontram-se nas Figuras 6.2.9 e 6.2.10.

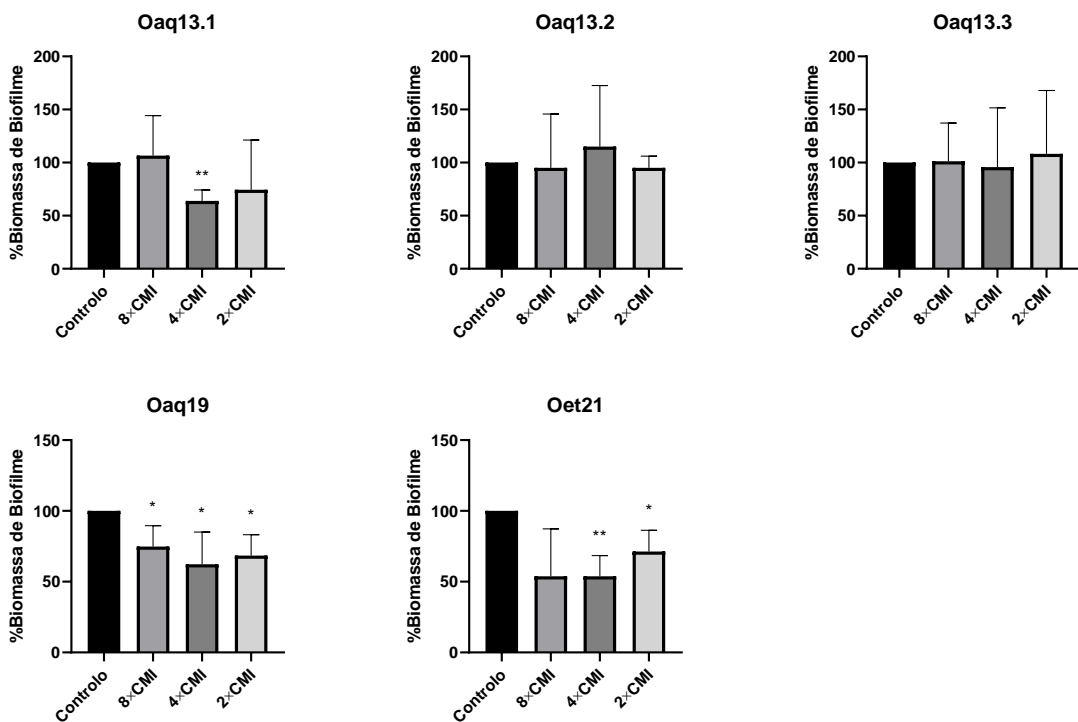


Figura 6.2.8 - Percentagem de biomassa de biofilme de *P. aeruginosa* presente após ação de extratos de folha de oliveira em biofilmes maduros. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente

água nos extratos aquoso e DMSO 1% no extrato etanólico. Significância estatística relativamente ao controlo ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

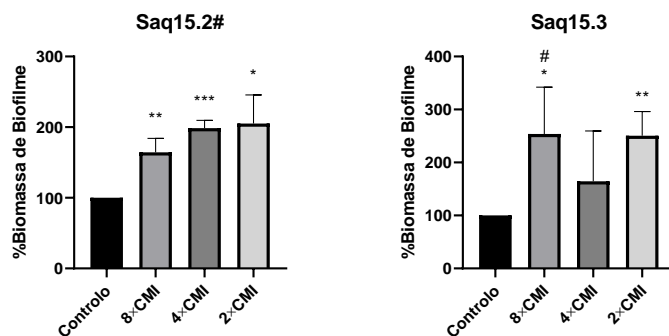


Figura 6.2.9 - Percentagem de biomassa de biofilme de *P. aeruginosa* presente após ação de extratos de folha de sabugueiro em biofilmes maduros. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo *** $p < 0,0002$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$. Para os extratos/concentrações marcados (#) apenas foi obtido um $n=2$.

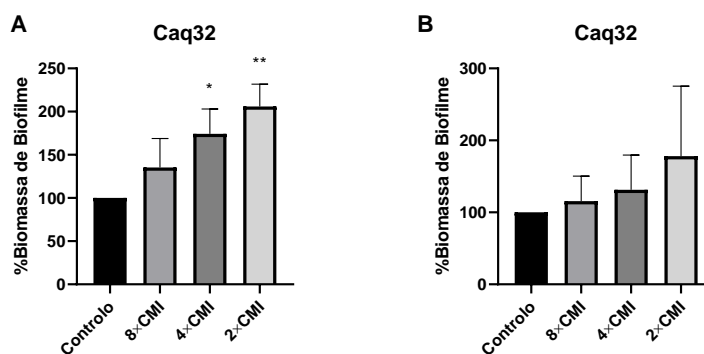


Figura 6.2.10 - Percentagem de biomassa de biofilme presente após ação de extratos de folha de castanheiro em biofilmes maduros de (A) *S. aureus* e (B) *P. aeruginosa*. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

No entanto, em *S. aureus* apenas a concentração correspondente a 2x CMI em Oaq12.1 foi capaz de dispersar algum biofilme formado, apresentando uma percentagem de redução de biomassa de biofilme de $14,65(\pm 9,38)\%$ ($p > 0,05$). Os resultados dos extratos de castanheiro, oliveira e sabugueiro em *S. aureus* encontram-se nas Figuras 6.2.10, 6.2.11 e 6.2.12, respetivamente.

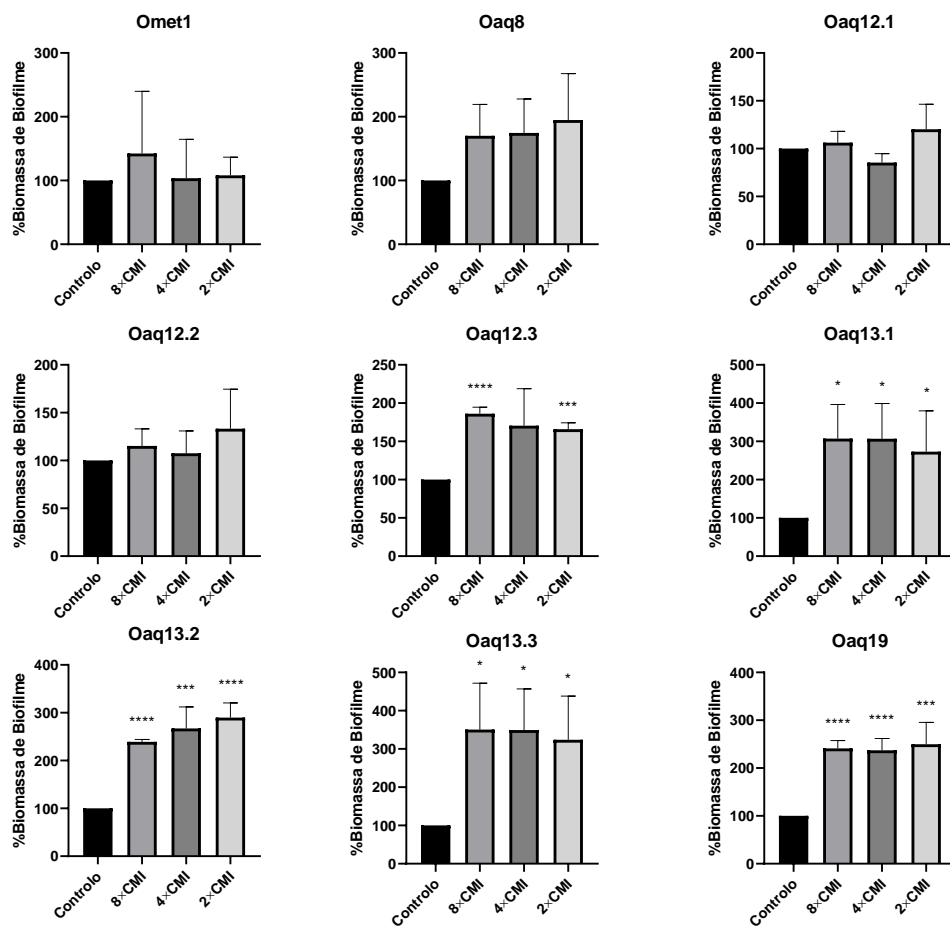


Figura 6.2.11 - Percentagem de biomassa de biofilme de *S. aureus* presente após ação de extratos de folha de oliveira em biofilmes maduros. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água nos extratos aquosos e DMSO 1% no extrato metanólico. Significância estatística relativamente ao controle **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0002$; * $p < 0,05$.

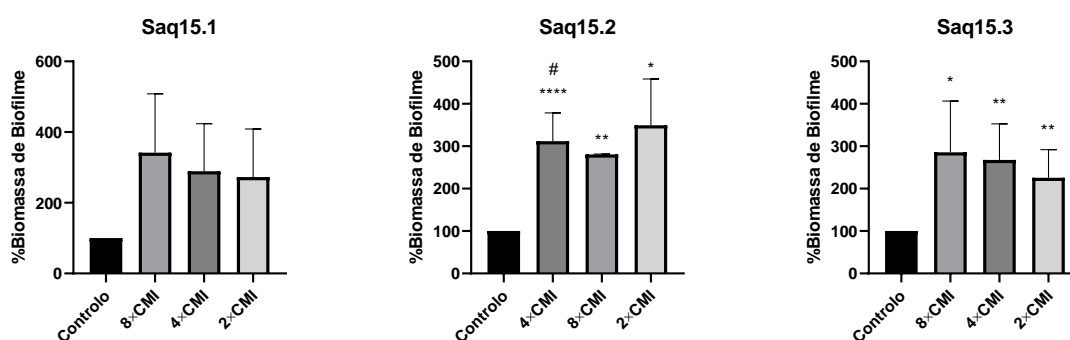


Figura 6.2.12 - Percentagem de biomassa de biofilme de *S. aureus* presente após ação de extratos de folha de sabugueiro em biofilmes maduros. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controle **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$. Para as concentrações marcadas (#) apenas foi obtido um $n=2$.

Já em *L. monocytogenes*, verificaram-se percentagens de biomassa de biofilme menores que 100% apenas com o extrato Maq20, nas três concentrações testadas, traduzindo-se em taxas de redução de biofilme de 34,67(±17,69)%, 29,28(±23,92)% ($p > 0,05$) e 9,12(±37,10)% ($p > 0,05$), respetivamente 8×CMI, 4×CMI e 2×CMI (Figura 6.2.13).

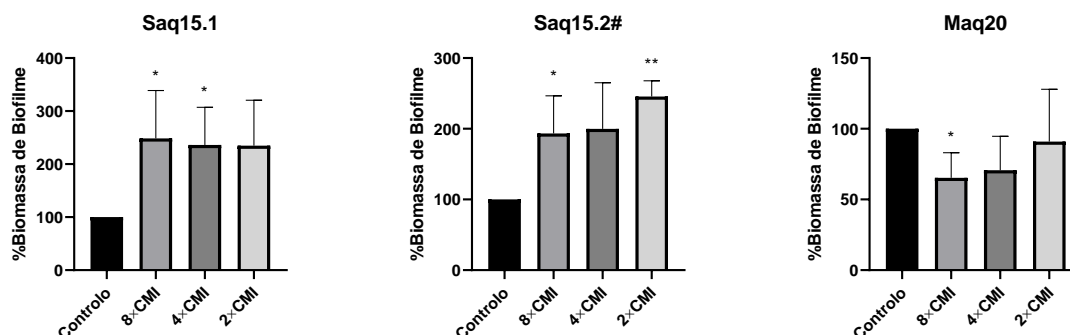


Figura 6.2.12 - Percentagem de biomassa de biofilme de *L. monocytogenes* presente após ação de extratos de folha de sabugueiro e medronheiro em biofilmes maduros. Foram elaborados três ensaios independentes, cada um em triplicado, utilizando como solvente água. Significância estatística relativamente ao controlo ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$. Para os extratos marcados (#) apenas foi obtido um $n=2$.

Nem todos os resultados obtidos estão de acordo com a bibliografia existente. Tal pode dever-se a uma multitude de razões, algumas já anteriormente referidas, como a origem das plantas, a época da sua colheita, o seu manuseamento até à elaboração do extrato, como também aos métodos e materiais empregues nos ensaios. A utilização de diferentes meios de cultura tem efeito no crescimento dos microrganismos, pelo que a sua escolha, a escolha de suplementação do mesmo, ou até mesmo do material e temperaturas utilizadas para efetuar os crescimentos microbianos podem afetar o resultado da experiência. Nos ensaios de inibição de formação e dispersão de biofilme foram utilizadas microplacas de fundo raso, em vez das placas de fundo redondo normalmente utilizadas, podendo haver perdas ou a formação do biofilme não ser tão eficaz deste modo, levando aos vários problemas apresentados nos resultados deste ensaio. Também o facto de a temperatura de crescimento das pré culturas dos três microrganismos ter sido 30°C para todos pode ser um fator de influência no seu crescimento, e conseqüentemente nos resultados, uma vez que diferentes microrganismos reagem de diferente forma à temperatura, tendo cada um a sua temperatura ótima de crescimento. A repetição dos extratos após o seu termino também pode ser um fator influenciador dos resultados uma vez que, apesar do procedimento ser executado da mesma forma, podem ocorrer variações que alterem a extração.

Alguns dos recursos estudados neste trabalho ainda não têm atividade antimicrobiana e anti biofilme descrita, o que também dificulta a comparação de resultados.

Capítulo 7

Conclusão

O interesse da população consumidora por produtos livres de conservantes, aditivos sintéticos e produtos com pouco impacto ambiental tem vindo cada vez mais a aumentar ao longo dos anos (Batiha et al., 2021; Burt, 2004; Serra et al., 2008). Deste modo, a investigação de alternativas naturais a estes compostos tornou-se uma área de grande importância, demonstrado pelo crescente número de publicações relacionadas com antimicrobianos naturais (Serra et al., 2008). As plantas são, desde os tempos antigos, utilizadas com propósitos medicinais e culinários e na sociedade atual vemos já a sua utilização na indústria alimentar (Alirezalu et al., 2020).

O objetivo deste trabalho passou por estudar possíveis atividades antimicrobiana e anti biofilme em algumas plantas originárias do centro de Portugal, de modo a valorizá-las e conceder um novo propósito ao desperdício associado ao seu cultivo na forma de um produto natural capaz de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes de produtos alimentares.

Foi possível identificar atividade antimicrobiana de extratos aquosos de folha de oliveira em *P. aeruginosa* e *S. aureus*, extrato etanólico apenas em *P. aeruginosa* e metanólico somente em *S. aureus*. Tanto os extratos aquosos de folha de sabugueiro, como todos os extratos produzidos a partir de medronheiro e castanheiro, demonstraram atividade inibitória face aos três microrganismos testados.

Verifica-se que tanto a escolha do solvente, como a relação matriz/solvente utilizada na elaboração do extrato, e o método extração e de secagem do material vegetal influenciam a atividade antimicrobiana.

Na determinação da atividade anti biofilme, foram empregues dois métodos: avaliação da inibição de formação de biofilme e dispersão de biofilme. Com os resultados obtidos podemos concluir que a formação de biofilme de *S. aureus* é afetada por extratos aquosos e metanólicos da folha de oliveira, um extrato aquoso de folha de medronheiro e um extrato aquoso de folha de castanheiro. Em *P. aeruginosa* são eficazes extratos aquosos e etanólicos de folha de oliveira, um extrato aquoso de folha de sabugueiro e um extrato aquosos de folha de castanheiro. Por fim, em *L. monocytogenes* um extrato aquoso de folha de sabugueiro e um extrato aquoso de folha de medronheiro foram capazes de reduzir a formação do seu biofilme. Relativamente à capacidade de dispersão de biofilme, verifica-se a atividade de extratos aquosos e etanólicos de folha de oliveira em *P. aeruginosa* e apenas de um extrato aquosos de folha de medronheiro em *L. monocytogenes*.

Seria relevante repetir estes ensaios e verificar todos os detalhes dos métodos aplicados, para retificar valores elevados de desvio padrão, chegar a resultados mais coesos, e compreender os valores negativos obtidos nos ensaios de formação de biofilme. Determinadas as atividades antimicrobiana e anti biofilme, o próximo passo desta investigação seria determinar os compostos presentes nestes extratos, para determinar os agentes antimicrobianos neles presentes. Daí poderiam seguir-se mais testes antimicrobianos aos compostos individuais, e futuramente prosseguir para testes toxicológicos a fim de avaliar a possibilidade de utilizar estes recursos como conservante natural, a incluir nos próprios alimentos ou nas suas embalagens de modo a oferecer uma alternativa aos conservantes sintéticos.

Capítulo 8

Bibliografía

Adams, M., & Motarjemi, Y. (2006). *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-966-6.

Agatonovic-Kustrin, S., Gegechkori, V., Morton, D. W., Tucci, J., Mohammed, E. U. R., & Ku, H. (2022). The bioprofiling of antibacterials in olive leaf extracts via thin layer chromatography-effect directed analysis (TLC-EDA). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 219, 114916. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114916>

Ahmed, A. M., Rabii, N. S., Garbaj A. M. & Abolghait, S. K. (2014) Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2, 53-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2014.04.002>

Aleksic, V & Knezevic, P. (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L.. *Microbiological Research*, 169(4), 240-254. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.003>.

Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambaroust, S. H., & Lorenzo, J. M. (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 292-306. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.010>

Alviano, D. S., & Alviano, C. S. (2009). Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 106–121. <https://doi.org/10.2174/138920109787048607>

Anggrianto, K., Salea, R., Veriansyah, B., & Tjandrawinata, R. R. (2014). Application of Supercritical Fluid Extraction on Food Processing: Black-eyed Pea (*Vigna Unguiculata*) and Peanut (*Arachis Hypogaea*). *Procedia Chemistry*, 9, 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.032>

Arruda, T. R., Bernardes, P. C., Moraes, A. R. F., & Soares, N. F. F. (2022). Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. *Food Research International*, 156, 111160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111160>.

Ashraduzzaman, M., Alam, M. A., Khatun, S., & Absar, N. (2016). Antimicrobial Activity of *Vigna unguiculata* L. Walp Seed Oil. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 5, 70-75. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2016.05.03.1>

Avanza, M. V., Álvarez-Rivera, G., Cifuentes, A., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2021). Phytochemical and Functional Characterization of Phenolic Compounds from Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Obtained by Green Extraction Technologies. *Agronomy*, 11(1), 162. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010162>

Awika, J. M., & Duodu, K.G. (2017). Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *Journal of Functional Foods*, 38 Part B, 686-697. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.002>

Awofisayo-Okuyelu, A., Verlander, N. Q., Amar, C., Elson, R., Grant, K., & Harris, J. (2016). Factors influencing the time between onset of illness and specimen collection in the diagnosis of non-pregnancy associated listeriosis in England and Wales. *BMC infectious diseases*, 16, 311. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1638-4>

Aziagba, B. O., Okeke, C. U., Ezeabara, A. C., Ilodibia, C.V., Ufele, A. N., & Egboka, T. P. (2017). Determination of the Flavonoid Composition of Seven Varieties of *Vigna unguiculata* (L.) Walp as Food and Therapeutic Values. *Universal Journal of Applied Science*, 5(1), 1-4. <https://doi.org/10.13189/ujas.2017.050101>.

Azwanida, N.N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4, 3. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

Bai, X., Nakatsu, C. H., & Bhunia, A. K. (2021). Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(9), 2117. <https://doi.org/10.3390/foods10092117>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Batiha, G. E., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E., Tiwari, A., Pagnossa, J. P., Lima, C. M., Thorat, N. D., Zahoor, M., El-Esawi, M., Dey, A., Alghamdi S., Hetta, H. F., & Cruz-Martins, N. (2021). Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control*, 126, 108066. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108066>.

Baysal, G., Kasapbaşı, E. E., Yavuz, N., Hür, Z., Genç, K., & Genç, M. (2021). Determination of theoretical calculations by DFT method and investigation of antioxidant, antimicrobial properties

of olive leaf extracts from different regions. *Journal of food science and technology*, 58(5), 1909–1917. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04702-0>

Begum, S., Mwalusamba, H., Moyo, A., Qwarse, M., Marealle, A., & Ndesendo, A. M. K. (2022). Cytotoxicity and In vitro Antimycobacterial Activity of *Vigna unguiculata* Grown in Dodoma, Tanzania. *Journal of Research Innovation and Implications in Education*, 6(2), 246-254.

Belwal, T., Cravotto, C., Prieto, M. A., Venskutonis, P. R., Daglia, M., Devkota, H. P., Baldi, A., Ezzat, S. M., Gómez-Gómez, L., Salama, M. M., Campone, L., Rastrelli, L., Echave, J., Jafari, S. M., & Cravotto, G. (2022). Effects of different drying techniques on the quality and bioactive compounds of plant-based products: a critical review on current trends. *Drying Technology*, 40(8), 1539-1561. <https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2068028>

Benarba, B., Meddah, B., & Aoues, A. (2012). *Bryonia dioica* aqueous extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.052>

Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobianchi, R., Vuotto, M. L., & Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, 71 Suppl 1, S110–S116. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00185-4](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00185-4)

Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5946. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>

Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., & Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108(1), 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.074>

Bouyakya, A., Moussaoui, N., Abrini, J., & Bakri, Y., & Dakka, N. (2016). Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *British Biotechnology Journal*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/26488>

Bubonja-Šonje, M., Knežević, S., & Abram, M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 71(4), 300–311. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-- a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Cadau, S., Gault, M., Berthelemy, N., Hsu, C. Y., Danoux, L., Pelletier, N., Goudounèche, D., Pons, C., Leprince, C., André-Frei, V., Simon, M., & Pain, S. (2022). An Inflamed and Infected Reconstructed Human Epidermis to Study Atopic Dermatitis and Skin Care Ingredients. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 12880. <https://doi.org/10.3390/ijms232112880>

Caleja, C., Barros, L., Barreira, J. C. M., Soković, M., Calhella, R. C., Bento, A., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Castanea sativa* male flower extracts as an alternative additive in the Portuguese pastry delicacy "pastel de nata". *Food and Function*, 11(3). <https://doi.org/10.1039/C9FO03050F>

Carocho, M., Calhella, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Bento, A., Morales, P., Soković, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. *Industrial Crops and Products*, 62, 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.016>

Carvalho, M., Castro, I., Matos, M., Lino-Neto, T., Silva, V., Rosa, E. & Carnide V. (2016). Caracterização agro-morfológica de acessos de feijão-frade (*Vigna unguiculata*): bases para o melhoramento, *Revista de Ciências Agrárias*, 39(4), 506-517. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA16091>

Cedola, A., Palermo, C., Centonze, D., Del Nobile, M. A., & Conte, A. (2020). Characterization and Bio-Accessibility Evaluation of Olive Leaf Extract-Enriched "Taralli". *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1268. <https://doi.org/10.3390/foods9091268>

Chen, C., Zuckerman, D. M., Brantley, S., Sharpe, M., Childress, K., Hoiczky, E., & Pendleton, A. R. (2014). *Sambucus nigra* extracts inhibit infectious bronchitis virus at an early point during replication. *BMC veterinary research*, 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-24>

Chevallier, A. (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley. ISBN-10.0751303143

Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

Chidebelu, P., Onovo, I., & Nweze, E. I. (2019). Antimicrobial activities of *Cajanus cajan* L., *Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. against some bacterial and fungal isolates. *Journal of Basic Pharmacology and Toxicology*, 3(1), 29-33. Retrieved from <https://scigreen.com/index.php/JBPT/article/view/58>

Degu, S., Abebe, A., Gameda, N., & Bitew, A. (2021). Evaluation of antibacterial and acute oral toxicity of *Impatiens tinctoria* A. Rich root extracts. *PloS one*, 16(8), e0255932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255932>

- De la Ossa, J. G., El Kadri, H., Gutierrez-Merino, J., Wantock, T., Harle, T., Seggiani, M., Danti, S., Di Stefano, R., & Velliou, E. (2021). Combined Antimicrobial Effect of Bio-Waste Olive Leaf Extract and Remote Cold Atmospheric Plasma Effluent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(7), 1890. <https://doi.org/10.3390/molecules26071890>
- Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabti, B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, *17*(4), 381-385. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.05.001>.
- Dhouioui, M., Boulila, A., Jemli, M., Schiets, F., Casabianca, H., & Zina, M. S. (2016). Fatty Acids Composition and Antibacterial Activity of *Aristolochia longa* L. and *Bryonia dioica* Jacq. Growing Wild in Tunisia. *Journal of oleo science*, *65*(8), 655–661. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16001>
- Dos Santos, L. R., Alía, A., Martin, I., Gottardo, F. M., Rodrigues, L. B., Borges, K. A., Furian, T. Q., & Córdoba, J. J. (2022). Antimicrobial activity of essential oils and natural plant extracts against *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham-based model. *Journal of the science of food and agriculture*, *102*(4), 1729–1735. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11475>
- Edziri, H., Jaziri, R., Chehab, H., Verschaeve, L., Flamini, G., Boujnah, D., Hammami, M., Aouni, M., & Mastouri, M. (2019). A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon*, *5*(5), e01604. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01604>
- Ekiert, H. M., & Szopa, A. (2020). Biological Activities of Natural Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(23), 5769. <https://doi.org/10.3390/molecules25235769>
- Eloff, J.N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*, 106. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
- Esposito, T., Celano, R., Pane, C., Piccinelli, A. L., Sansone, F., Picerno, P., Zaccardelli, M., Aquino, R. P., & Mencherini, T. (2019). Chestnut (*Castanea sativa* Miller.) Burs Extracts and Functional Compounds: UHPLC-UV-HRMS Profiling, Antioxidant Activity, and Inhibitory Effects on Phytopathogenic Fungi. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(2), 302. <https://doi.org/10.3390/molecules24020302>
- ElGamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S., & ElMasry, G. (2023). Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, *13*(6), 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- El-Sayed, N. R., Samir, R., Jamil M Abdel-Hafez, L., & Ramadan, M. A. (2020). Olive Leaf Extract Modulates Quorum Sensing Genes and Biofilm Formation in Multi-Drug Resistant *Pseudomonas*

aeruginosa. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(9), 526.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9090526>

Fadiji, T., Rashvand, M., Daramola, M. O., & Iwarere, S. A. (2023). A Review on Antimicrobial Packaging for Extending the Shelf Life of Food. *Processes*, 11(2), 590.
<https://doi.org/10.3390/pr11020590>

Famuyide, I. M., Aro, A. O., Fasina, F. O., Eloff, J. N., & McGaw, L. J. (2019). Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (*Myrtaceae*) species and their selectivity indices. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>

Ferreira, S., Silva, A., & Nunes, F. M. (2020). *Sambucus nigra* L. Fruits and Flowers: Chemical Composition and Related Bioactivities. *Food Reviews International*, 38, 1-29.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1788578>

Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558–1560. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.569504>

Ferreira-Santos, P., Badim, H., Salvador, Â. C., Silvestre, A. J. D., Santos, S. A. O., Rocha, S. M., Sousa, A. M., Pereira, M. O., Wilson, C. P., Rocha, C. M. R., Teixeira, J. A., & Botelho, C. M. (2021). Chemical Characterization of *Sambucus nigra* L. Flowers Aqueous Extract and Its Biological Implications. *Biomolecules*, 11(8), 1222. <https://doi.org/10.3390/biom11081222>

Gomes, F., Dias, M. I., Lima, Â., Barros, L., Rodrigues, M. E., Ferreira, I. C. F. R., & Henriques, M. (2020). *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. Decoctions: Antimicrobial Activity, Mode of Action and Phenolic Characterization. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(6), 294.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9060294>

Gomes-Laranjo, J., Ferreira-Cardoso, J., Portela E. & Abreu, C. G. (2007). Castanheiros. Programa Agro. ISBN: 978-972-669-844-9

Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1639.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7)

Grieve, M. (1931). *A modern herbal – The medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folklore of herbs, grasses, fungi shrubs & trees with all their modern scientific uses*. Tiger Books. ISBN-10.1855012499

Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., Stévigny, C., Okusa, P. N., & Duez, P. (2015). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three *Ericaceae* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 70, 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.053>.

Hamilton, G. R., & Baskett, T. F. (2000). In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie*, 47(4), 367–374. <https://doi.org/10.1007/BF03020955>

Han, J. W., Ruiz-Garcia, L., Qian, J. P., & Yang, X. T. (2018). Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(4), 860–877. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12343>

Hao, J. J., Liu, H., Donis-Gonzalez, I. R., Lu, X. H., Jones, A. D., & Fulbright, D. W. (2012). Antimicrobial Activity of Chestnut Extracts for Potential Use in Managing Soilborne Plant Pathogens. *Plant disease*, 96(3), 354–360. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0169>

Haouari, M., Assem, N., Changan, S., Kumar, M., Daştan, S. D., Rajkovic, J., Taheri, Y., & Sharifi-Rad, J. (2021). An Insight into Phytochemical, Pharmacological, and Nutritional Properties of *Arbutus unedo* L. from Morocco. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2021, 1794621. <https://doi.org/10.1155/2021/1794621>

Izah, S. C. (2018). Some determinant factors of antimicrobial susceptibility pattern of plant extracts. *Res Rev Insights 2*: DOI: 10.15761/RRI.1000139

Jacek, O., Beata, L. & Kinga, W. (2022). *Listeria monocytogenes – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments?* *Frontiers in Microbiology*, 13, 866462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>

Jensen, W. A. (1954). The Application of Freeze-Dry Methods to Plant Material. *Stain Technology*, 29(3), 143-150. <https://doi.org/10.3109/10520295409115459>

Jones, A. W. (2014). Perspectives in Drug Discovery: A Collection of Essays on the History and Development of Pharmaceutical Substances (pp. 7–16). Retrieved from Rättsmedicinalverket website: <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-116708>

Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>

- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international*, 2014, 827965. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>
- Kapravelou, G., Fernández-Fígares, I., Ruiz, R., Peinado, M. J., Martín-Pedrosa, M., Porres, J. M., & Rubio, L. A. (2022). Carbohydrates digestibility and faecal microbiota composition in rats fed diets based on raw or fermented *Vigna unguiculata* seed meal as the only protein source. *Food Chemistry Advances*, 1, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100022>.
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Krawitz, C., Mraheil, M. A., Stein, M., Imirzalioglu, C., Domann, E., Pleschka, S., & Hain, T. (2011). Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-16>
- Kritzinger, Q., Lall, N., Aveling, T. A. S., & van Wyk, B. -E.. (2005). Antimicrobial activity of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 71(1), 45-48. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30147-2](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30147-2).
- Křížkovská, B., Hoang, L., Brdová, D., Klementová, K., Szemerédi, N., Loučková, A., Kronusová, O., Spengler, G., Kaštánek, P., Hajšlová, J., Viktorová, J., & Lipov, J. (2023). Modulation of the bacterial virulence and resistance by well-known European medicinal herbs. *Journal of ethnopharmacology*, 312, 116484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116484>
- Launert, E. (1981). *Guide to Edible and Medicinal Plants of Britain and Northern Europe*. Littlehampton Book Services Ltd. ISBN-10.0600372162
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and molecular research: GMR*, 2(1), 63–76.
- Lenny, S. & Rizky, D. W. (2020). Potential Antibacterial and Antioxidant Activiy of Methanolic Extract of *Vigna unguiculata* (L.) Walp Leaves. *Proceedings of the 1st International Conference on Chemical Science and Technology Innovation*, 1, 215-217. <https://doi.org/10.5220/0008878602150217>

Li, J. W., & Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science* (New York, N.Y.), 325(5937), 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>

Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in microbiology*, 13, 1114199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>

Lichterman B. L. (2004). Aspirin: The Story of a Wonder Drug. *BMJ: British Medical Journal*, 329(7479), 1408.

Liu, Y., McKeever, L. C., & Malik, N. S. (2017). Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113>

Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description. *Innovative Technologies for Food Preservation*, 3, 53-107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>.

Lust, J. (2014). *The Herb Book: The Most Complete Catalog of Herbs Ever Published*. Dover Publications. ISBN-10.0486781445

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>

Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.023>

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology, Chapter 1, Unit-1B.1*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mco1b01s00>

Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D. (2014). *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(10), 15799–15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>

Miralrio, A., & Espinoza Vázquez, A. (2020). Plant Extracts as Green Corrosion Inhibitors for Different Metal Surfaces and Corrosive Media: A Review. *Processes*, 8(8), 942. <https://doi.org/10.3390/pr8080942>

Montinari, M. R., Minelli, S., & De Caterina, R. (2019). The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascular pharmacology*, *113*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.10.008>

Moore, K. L., Patel, J., Jaroni, D., Friedman, M., & Ravishankar, S. (2011). Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of food protection*, *74*(10), 1676–1683. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-174>

Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F., & Duarte, A. P. (2018). *Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *Journal of ethnopharmacology*, *225*, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.004>

Motti, R., Paura, B., Cozzolino, A., & Falco, B. (2022). Edible Flowers Used in Some Countries of the Mediterranean Basin: An Ethnobotanical Overview. *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(23), 3272. <https://doi.org/10.3390/plants11233272>

Mwambete, K. D. (2009). The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a Tanzania medicinal plant. *African health sciences*, *9*(1), 34–39.

Naidu, A.S. (2000). Natural Food Antimicrobial Systems. *Catechins*. <https://doi.org/10.1201/9781420039368>.

Nascimento, K. D. O. D., Paes, S. D. N. D., & Augusta, I. M. (2018). A Review 'Clean Labeling': Applications of Natural Ingredients in Bakery Products. *Journal of Food and Nutrition Research*, *6*(5), 285-294. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-5-2>

Ndamba, J., Nyazema, N., Makaza, N., Anderson, C., & Kaondera, K. C. (1994). Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. *Journal of ethnopharmacology*, *42*(2), 125–132. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90106-6)

Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, *156*(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>

Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of ethnopharmacology*, *124*(2), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.041>

Nickerson, K. P., Chanin, R. B., Sistrunk, J. R., Rasko, D. A., Fink, P. J., Barry, E. M., Nataro, J. P., & Faherty, C. S. (2017). Analysis of *Shigella flexneri* Resistance, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile in Response to Bile Salts. *Infection and immunity*, *85*(6), e01067-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01067-16>

- Nóbrega, F. M., Santos, I. S., Cunha, M. D., Carvalho, A. O., & Gomes, V. M. (2005). Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. *Plant Soil*, 272, 223–232. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-4954-1>
- Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., & Saraçoğlu, H. T. (2016). In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International journal of food microbiology*, 238, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Olszewska, M. A., Gędas, A., & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 134, 109214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109214>
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- O'Toole G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Ouarti, A., Haouat, A. C., Sqalli, H., Haggoud, A., Ennabili, A., Ibensouda, S., Lachkar, M., & Iraqui, M. (2012). Extra and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. *African journal of microbiology research*, 6, 1283-1290. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1540>
- Ozaslan, M., & Oguzkan, S. B. (2018). Use of Plant Extracts in Alternative Medicine. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2018.1.7>
- Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Sant'Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., & Lorenzo, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International journal of food microbiology*, 337, 108966. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(5), 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>

- Pieron A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), 235–273. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00207-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00207-x)
- Pinheiro, J., Rodrigues, S., Mendes, S., Maranhão, P., & Ganhão, R. (2020). Impact of Aqueous Extract of *Arbutus unedo* Fruits on Limpets (*Patella* spp.) Pâté during Storage: Proximate Composition, Physicochemical Quality, Oxidative Stability, and Microbial Development. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(6), 807. <https://doi.org/10.3390/foods9060807>
- Pinto, D., Cádiz-Gurrea, M. L., Vallverdú-Queralt, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Castanea sativa shells: A review on phytochemical composition, bioactivity and waste management approaches for industrial valorization. *Food Research International*, 144, 110364. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110364>
- Przybylska-Balcerek, A., Szablewski, T., Sz wajkowska-Michalek, L., Świerk, D., Cegielska-Radziejewska, R., Krejpcio, Z., Suchowilska, E., Tomczyk, Ł., & Stuper-Szablewska, K. (2021). *Sambucus Nigra* Extracts-Natural Antioxidants and Antimicrobial Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(10), 2910. <https://doi.org/10.3390/molecules26102910>
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M., & Wexler, H. M. (2007). Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial pathogenesis*, 43(2-3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.04.002>
- Quave, C. L., Plano, L. R., Pantuso, T., & Bennett, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.005>
- Rafael, M., Barros, L., Carvalho, A., & Ferreira, I. (2011). Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera peryclimenum* fruits. *Industrial Crops and Products - IND CROPS PRODUCTS*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.021>.
- Ramirez, S., & Castaño, M. (2009). Metodologias para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*. 15(42), 263-268. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Robach, M. C., & Sofos, J. N. (1982). Use of Sorbates in Meat Products, Fresh Poultry and Poultry Products: A Review. *Journal of food protection*, 45(4), 374–383. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.4.374>

- Rocha-Pimienta, J., & Ramírez, J. (2020). Pro-/antioxidant and antibacterial activity of olive leaf extracts according to bioavailability of phenolic compounds. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32(6), 479-487. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i6.2119>.
- Rodrigues, F., Pimenta, V., Braga, K., & Araújo, E. (2016). OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO. *Enciclopédia Biosfera*, 13, 870-887. https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2016_075
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta N., Grimi, N., & Barba, F. J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 296-310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.003>
- Salam, A. M., Porras, G., Cho, Y. K., Brown, M. M., Risener, C. J., Marquez, L., Lyles, J. T., Bacsa, J., Horswill, A. R., & Quave, C. L. (2021). Castaneroxy A From the Leaves of *Castanea sativa* Inhibits Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in pharmacology*, 12, 640179. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.640179>
- Salem, I. B., Ouesleti, S., Mabrouk, Y., Landolsi, A., Saidi, M., & Boulilla, A. (2018). Exploring the nutraceutical potential and biological activities of *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) fruits. *Industrial Crops and Products*, 122, 726-731. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.024>.
- Sayeed, S. (2017). Pharmacological Activities of *Vigna Unguiculata* (L) Walp: A Review. *International Journal of Pharma And Chemical Research*, 3, 44-49.
- Scarano, P., Guida, R., Zuzolo, D., Tartaglia, M., Prigioniero, A., Postiglione, A., Pinto, G., Illiano, A., Amoresano, A., Schicchi, R., Geraci, A., Sciarrillo, R., & Guarino, C. (2022). An Endemic Plant of the Mediterranean Area: Phytochemical Characterization of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Fruits Extracts at Different Ripening Stages. *Frontiers in nutrition*, 9, 915994. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.915994>
- Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: clinical and experimental*, 57(7 Suppl 1), S3-S9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, a. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M. T., San Romão, M. V., & Duarte C. M. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.011>.
- Shibata, M., Khan, I., Iinuma, M., & Shirai, T. (2012). Natural Products for Medicine. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 147120. <https://doi.org/10.1155/2012/147120>.

- Silva, V., Falco, V., Dias, M. I., Barros, L., Silva, A., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Amaral, J. S., Igrejas, G., C F R Ferreira, I., & Poeta, P. (2020). Evaluation of the Phenolic Profile of *Castanea sativa* Mill. By-Products and Their Antioxidant and Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 87. <https://doi.org/10.3390/antiox9010087>
- Sofos, J. N., & Busta, F. F. (1981). Antimicrobial Activity of Sorbate. *Journal of food protection*, 44(8), 614–622. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.8.614>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461–463. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77 Part 2, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Tea, G., Stefana, V., Biljana, N., Magdalena, S., Maja, K., Dušan, K., Saša, D., Stefana, C., & Dragana, M. (2022). Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 989667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.989667>
- Techathuvanan, C., Reyes, F., David, J. R., & Davidson, P. M. (2014). Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of food protection*, 77(2), 269–275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-288>
- Tendencia, E. (2004). Disk diffusion method [Book chapter]. In *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment*. *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center*. <http://hdl.handle.net/10862/1635>
- Terezinha de Oliveira, C., Lameiro de Noronha Sales Maia, B. H., Portes Ferriani, A., Aparecida Queiroz Santos, V., Antônio Alves da Cunha, M., & Dias Teixeira, S. (2019). Chemical Characterization, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Potential of Essential Oil from the Leaves of *Baccharis oreophila* Malme. *Chemistry & biodiversity*, 16(2), e1800372. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800372>

Umar, J., Ahmad, I., & Shehu, A. (2020). Antibacterial activity of *Jatropha curcas* and *Vigna unguiculata* leaf extracts against *Staphylococcus aureus* isolated from children with otitis media attending Murtala Muhammad Specialist Hospital. *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, 5, 98-109. <https://doi.org/10.33564/IJEAST.2020.v05i01.014>.

Vats, S., Tiwari, R., Alam, A., Pareek, R., Vats, & Behera, K. K. (2012). Evaluation of Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of in vitro culture of *Vigna unguiculata* L. Walp. *Researcher*. 4, 70-74

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>

Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T. D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C. D., & Holmes, A. E. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & reviews. Journal of engineering and technology*, 6(4), <http://www.rroij.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview.pdf>.

Ye, X. Y., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2000). Structurally dissimilar proteins with antiviral and antifungal potency from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Life sciences*, 67(26), 3199–3207. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00905-X)

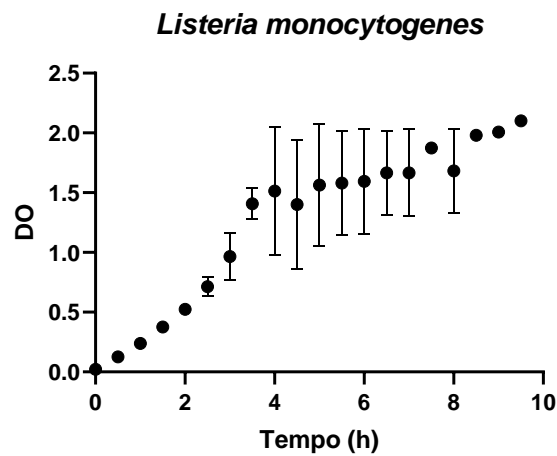
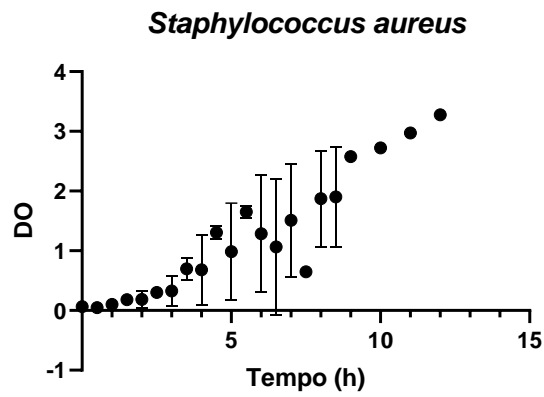
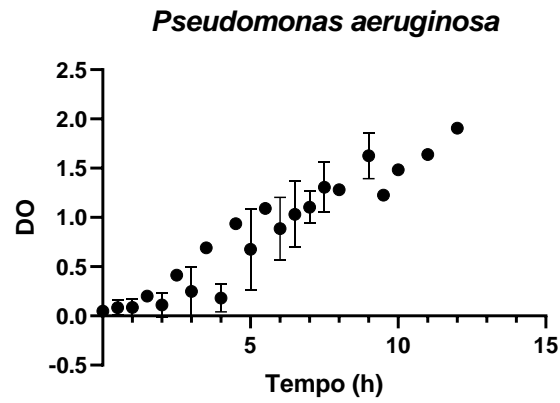
Zaheer, M., Ahmed, S., & Hasan, M. (2020). *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Papilionaceae): A review of medicinal uses, Phytochemistry and pharmacology. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9, 1349-1352.

Zhang, Y., Wang, B., Lu, F., Wang, L., Ding, Y., & Kang, X. (2021) Plant-derived antioxidants incorporated into active packaging intended for vegetables and fatty animal products: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(7), 1237-1248, <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1885745>

Zivkovic, J., Zekovic, Z., Mujic, I., Vidovic, S., Cvetković, D., Lepojević, Ž., Nikolicacute, G., & Trutic, N. (2010). Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of *Castanea sativa* Mill. extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 61-68. <https://doi.org/10.17221/155/2009-CJFS>.

Anexo I

Curvas de Crescimento



Curvas de crescimento de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L.monocytogenes*. Os valores estão expressos como média±desvio padrão, e foram obtidos a partir de três ensaios independentes

