

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *ARBUTUS UNEDO* E DE *COREMA ALBUM* E
AVALIAÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS CONTRA MICRORGANISMOS
RELEVANTES NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

VANESSA ISABEL PIRES FÉLIX

ORIENTADORA:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *ARBUTUS UNEDO* E DE *COREMA ALBUM* E
AVALIAÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS CONTRA MICRORGANISMOS
RELEVANTES NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

VANESSA ISABEL PIRES FÉLIX

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADORA:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

VOGAIS

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo
Lemsaddek

2021

Declaração relativa às condições de reprodução da dissertação

Nome: Vanessa Isabel Pires Félix

Título da Dissertação: Isolamento de compostos bioativos de *Arbutus unedo* e de *Corema album* e avaliação das suas propriedades antimicrobianas contra microrganismos relevantes na indústria alimentar

Ano de conclusão: 2021

Designação do curso de Mestrado: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☒ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

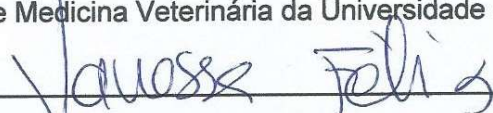
☒ 1. Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;

☐ 2. Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*; * Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 31 de Julho de 2021

Assinatura: _____





Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDB / 00276/2020, através do apoio do CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória com inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas indispensáveis para encontrar o melhor rumo.

À professora Teresa pela sua disponibilidade, paciência, palavras de incentivo e encorajamento nos momentos menos bons. A conclusão deste trabalho não teria sido possível sem a Sua ajuda, ensinamentos, explicações. Obrigada!

À minha família, que me ajudou tanto! Aos meus pais, irmã e avó que permitiram a concretização deste objetivo. Ao Emanuel, pelo apoio, amor, carinho, companheirismo, disponibilidade, paciência sempre que foi necessário, e foram tantas vezes.

Aos amigos que tomaram café, que ouviram os meus desabafos e me apoiaram e encorajaram, Obrigada!

Às Professoras Ana Cristina Figueiredo, Aida Moreira da Silva e Maria João Barrosa, que em momentos diferentes, impulsionaram o que parecia não querer avançar. Obrigada pelos esclarecimentos, ajuda e disponibilidade.

Toda a vontade de aprender e concretizar esta meta, têm na sua base a influência de duas pessoas muito importantes: Guadalupe Jácome e Margarida Agostinho. Se hoje chego aqui também é responsabilidade vossa. Mais uma vez obrigada!

Às minhas colegas de gabinete Andreia, Margarida, Francisca, Sandra e Valeryia. Obrigada!

A todos os que trabalham diariamente na Faculdade e que partilharam comigo esta aventura. A todos os professores, que me acompanharam no mestrado, e que não foram mencionados, obrigada também.

Resumo

Desde tempos imemoriais, as plantas têm sido utilizadas de inúmeras formas, desde a alimentação, à medicina e até nos rituais fúnebres. Os extratos vegetais e óleos essenciais contêm uma variedade de compostos bioativos que apresentam um conjunto de propriedades benéficas, entre elas a capacidade de inibir e eliminar microrganismos, tornando-se assim numa possibilidade para utilização na indústria alimentar, como desinfetantes ou aditivos alimentares. De facto, a presença de microrganismos patogénicos em alimentos, bem como a capacidade de estes formarem biofilmes, tem impulsionado a comunidade científica na busca de alternativas aos desinfetantes.

Neste contexto, no presente estudo foram extraídos compostos bioactivos de duas espécies vegetais, *Arbutus unedo* e *Corema album*, recorrendo a diferentes solventes orgânicos e água. Os extratos obtidos foram de seguida analisados quanto ao seu potencial antimicrobiano, sobre bactérias relevantes na indústria alimentar (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), tanto na sua forma planctónica como na forma de biofilme. Foi ainda avaliada a capacidade de erradicação de biofilmes já formados. Os ensaios foram realizados com 24, 48 e 72 h de incubação, utilizando duas temperaturas, 10 e 37 °C, de forma a simular condições associadas à indústria alimentar e ao Homem (enquanto consumidor de alimentos potencialmente contaminados com microrganismos patogénicos). Para os extratos que revelaram possuir maior capacidade antimicrobiana, recorreu-se ao método da microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB).

Os resultados obtidos revelaram diferentes padrões de formação de biofilme entre os isolados em estudo, com clara influência da temperatura e do período de incubação. Ficou ainda demonstrado que os extratos resultantes das folhas da camarinheira possuem atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* na forma planctónica, mas não sobre biofilmes pré-existentes.

Em conclusão, foi possível confirmar a potencialidade da utilização de extratos de origem vegetal como antimicrobianos. No entanto, é fundamental realizar estudos mais detalhados, nomeadamente recorrendo a modelos alimentares “*in food model*”, de modo a simular condições mais próximas da realidade.

Palavras-chave: *Arbutus unedo*, *Corema album*, propriedade antimicrobiana, biofilme, segurança dos alimentos.

Abstract

Since immemorial times, plants have been used in countless ways, from food to medicine, and even in funeral rites. Vegetable extracts and essential oils contain a variety of bioactive compounds with a wide range of beneficial properties, including the ability to inhibit and eliminate microorganisms, thus becoming a possibility for use in the food industry, as disinfectants or food additives. In fact, the presence of pathogenic microorganisms in food, as well as their ability to form biofilms, has driven the scientific community to search for effective alternatives.

In this context, bioactive compounds were extracted from two plant species, *Arbutus unedo* and *Corema album*, using different organic solvents and water. The extracts obtained were analyzed for their antimicrobial potential against relevant bacteria in the food industry (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), both in their planktonic form or in biofilm state. The ability to eradicate pre-existing biofilms was also analyzed. The tests were carried out at 24, 48 and 72 h of incubation, using two temperatures, 10 and 37 °C, in order to simulate conditions associated with the food industry and Human beings, (as a consumers of foods potentially contaminated with pathogenic microorganisms). For the extracts which showed higher antimicrobial ability, the microdilution method was used to determine minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum biofilm eradication concentration (CMEB).

Results obtained revealed different patterns of biofilm formation among the isolates under study, with a clear influence of temperature and incubation period. It was also demonstrated that the extracts resulting from camarinha leaves harbor antibacterial activity against *L. monocytogenes* in the planktonic form, but not on pre-existing biofilms.

In conclusion, it was possible to confirm the potential use of plant extracts as antimicrobials. However, it is essential to carry out more detailed studies, such as “*in food model*”, in order to simulate conditions closer to reality.

Keywords: *Arbutus unedo*, *Corema album*, antimicrobial properties, biofilm, food safety.

Índice geral

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice de tabelas	VIII
Índice de figuras	IX
Lista de abreviaturas e símbolos químicos	X
Introdução	1
1. Revisão bibliográfica	2
1.1 Plantas aromáticas e medicinais	2
1.1.1 <i>Arbutus unedo</i> (Medronheiro)	2
1.1.2 <i>Corema album</i> (Camarinha)	4
1.2 Compostos bioativos de origem vegetal	5
1.2.1 Definição de compostos bioativos, óleos essenciais e extratos vegetais	6
1.2.2 Fatores que afetam a produção de compostos bioativos	7
1.2.3 Métodos de extração	7
1.2.3.1 Extração com solvente orgânico	8
1.2.3.2 Extração com ultra-sons	8
1.2.4 Atividade antimicrobiana	8
1.3 Segurança dos alimentos e as doenças transmitidas por alimentos	10
1.3.1 Microrganismos presentes nos alimentos	11
1.3.2 Importância dos biofilmes na indústria alimentar	15
1.3.2.1 Definição de biofilme	16
1.3.2.2 Etapas de formação de biofilme	17
1.3.2.3 Problemas na indústria alimentar	18
2. Objetivos	19
3. Material e métodos	20
3.1 Recolha de plantas produtoras de compostos bioativos	20
3.1.1 <i>Arbutus unedo</i> (Medronheiro)	20
3.1.2 <i>Corema album</i> (Camarinheira)	20
3.2 Extração de compostos bioativos	20
3.3 Microrganismos em estudo e manutenção de culturas	21
3.3.1 Preparação de suspensões bacterianas	22
3.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme	23

3.4 Atividade antimicrobiana	24
3.4.1 Método de difusão em meio sólido: <i>screening</i> inicial	24
3.4.2 Método de microdiluição - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB)	25
3.4.3 Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB)	27
3.5 Análise de dados	28
4. Resultados e discussão	29
4.1 Extração de compostos bioativos	29
4.2 Método de difusão em meio sólido: <i>screening</i> inicial	32
4.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilme	39
4.4 Determinação das CMI e CMB – Método de microdiluição	47
4.5 Método de microdiluição - Determinação da CMEB.....	51
5. Conclusão	52
6. Referências bibliográficas	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos incluídos no estudo e temperaturas ótimas de multiplicação.....	22
Tabela 2	Diâmetro dos halos para os extratos obtidos a partir das folhas do medronheiro (em mm)	34
Tabela 3	Compilação de resultados obtidos por outros autores (halos em mm)	35
Tabela 4	Diâmetro dos halos para os extratos obtidos a partir das folhas da camarinheira (em mm)	37
Tabela 5	Classificação de acordo com o valor de BFI da capacidade de formação de biofilme das bactérias testadas.....	40
Tabela 6	Média e desvio-padrão do volume de extrato de folha de camarinheira (μ l) necessário para atingir a CMI e CMB sobre <i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Arbutus unedo</i> (Medronheiro)	2
Figura 2	Medronhos nos diferentes estádios de maturação	3
Figura 3	<i>Corema album</i> com os seus frutos	4
Figura 4	Pormenor das Camarinhas brancas e translúcidas.....	4
Figura 5	Localizações e mecanismos na célula bacteriana considerados locais de ação pelos compostos bioativos.....	9
Figura 6	Constituição da parede celular das bactérias Gram negativas e Gram positivas.....	10
Figura 7	As diversas fases de formação do biofilme	17
Figura 8	Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para a quantificação da formação de biofilmes.....	23
Figura 9	Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para a determinação das CMI e CMB	26
Figura 10	Esquema representativo da tampa em espigão. O biofilme formado está representado a verde.....	27
Figura 11	Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para determinação da CMEB	28
Figura 12	Clusters identificados em Portugal.....	30
Figura 13	Comparação dos halos de inibição formados antes e após liofilização, utilizando aparelhos distintos, na FMV e FCUL (exemplo).....	33
Figura 14	Comparação entre a formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> a 10 e a 37 °C.....	44
Figura 15	Gráfico de formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> e <i>B. cereus</i> a 10 °C.....	45
Figura 16	Gráfico de formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> e <i>B. cereus</i> a 37 °C.....	46
Figura 17	Microplaca para determinação de CMB e CMI, para o extrato de folha de camarinha água:etanol, a 10 °C (exemplo).....	48
Figura 18	Placa de BHI sólido, em que se determina a CMB, para o extrato de folha de camarinheira água:etanol, a 10 °C.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS QUÍMICOS

ABS – Absorvância
ATCC - American Type Culture Collection
aw – Atividade da água
BAL – Bactérias ácido lácticas
BFI – Biofilm formation index
BHI - Brain Heart Infusion
° C – Grau Celsius
CECT - Colección Española de Cultivos Tipo
CIP – Clean in place
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB – Concentração mínima bactericida
CMEB – Concentração mínima de erradicação de biofilme
CMI – Concentração mínima inibitória
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO – Densidade ótica
DTA – Doenças transmitidas por alimentos
EFSA - European Food Safety Authority
EPS – Extracellular Polymeric Substance
EUA - Estados Unidos da América
GRAS - Generally recognized as safe
HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)
ISO – International Organization for Standardization
LPS – Lipopolissacáridos
ml - mililitros
mm – milímetros
nm – nanómetro
NP – Norma portuguesa
OMS - Organização Mundial de Saúde
pH – Potencial hidrogeniónico
p/v – Peso por volume
RASFF – Food and Feed Safety Alerts
rpm – Rotações por minuto
TIAs – Toxinfecções alimentares
UA – Unidade de Absorvância
UFC – Unidades formadoras de colónias
UV – Radiação ultravioleta
v/v – Volume por volume
µl – microlitros

Introdução

Desde a antiguidade que o Homem utiliza as plantas, como alimento e/ou com o objetivo de prevenir e curar doenças. As propriedades medicinais das plantas e a forma como devem ser utilizadas, constituem um acumulado de conhecimento empírico, obtido por tentativa erro, que foi passando oralmente de geração em geração, construindo a “medicina tradicional”. A contribuição portuguesa para a fitoterapia acontece por Garcia de Orta, através da sua obra “Colóquios dos Simples e Drogas e Cousas Medicinais da Índia”, que descreve os detalhes das plantas, o seu modo de utilização e as suas propriedades medicinais, lançando as bases da fitoterapia e da farmacologia moderna (Ordem dos médicos, 2017). A medicina tradicional foi praticada durante muito tempo, em especial pelas populações do interior, devido à falta de meios para se deslocarem até aos centros urbanos e também pela precariedade económica em que viviam.

Com base nas diversas propriedades das plantas, o presente trabalho consistiu na recolha de *Arbutus unedo* e *Corema album* na região do Algarve, nos anos de 2017 e 2019, com o objetivo de extrair os seus compostos bioativos (utilizando diferentes solventes, na sua forma pura ou em misturas) e avaliar a sua ação antimicrobiana sobre bactérias associadas à indústria alimentar, com a finalidade de avaliar o seu potencial para aplicação futura na erradicação de biofilmes.

Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade microbiana caracterizada pela adesão a uma superfície. Esses microrganismos vão produzir uma matriz, que vai fornecer proteção a antibióticos, agentes biocidas, entre outros fatores desestabilizadores externos. Este aumento de resistência comparativamente às células planctónicas, dificulta a eliminação do biofilme (Galié et al. 2018). Os microrganismos que formam biofilmes na indústria alimentar podem ser patogénicos para o Homem, colocando em risco a saúde do consumidor (Galié et al. 2018). Estão também associados à corrosão das superfícies e a perdas económicas (Galié et al. 2018). Os compostos bioativos presentes nas plantas, que apresentem atividade antimicrobiana, podem representar uma possibilidade para o combate a estas comunidades. Os compostos bioativos podem ainda contribuir para o prolongamento do período de vida útil dos alimentos, ou ser utilizados como adoçantes naturais, entre outros.

1. Revisão bibliográfica

O recurso da humanidade às plantas leva-nos a tempos remotos. O início da medicina tradicional começou pela procura da cura de patologias distintas, através da utilização e/ou ingestão de partes das plantas (Viegas et al. 2006). Contendo as plantas uma enorme diversidade de compostos, as ações terapêuticas, procuradas pelos nossos ancestrais, estavam relacionadas com a presença destes compostos, que demonstram diferentes propriedades, entre elas, a atividade antimicrobiana (Weleni 2017).

1.1 Plantas aromáticas e medicinais

1.1.1 *Arbutus unedo* (Medronheiro)

O medronheiro (*Arbutus unedo*) é um arbusto que pertence à família *Ericaceae*, nativo da região do Mediterrâneo, abundante no Algarve, cresce junto às zonas costeiras e em algumas zonas do interior (Figura 1) (Oliveira et al. 2011). O medronheiro é dos poucos arbustos em que é possível encontrar o fruto e a flor ao mesmo tempo (Delgado-Pelayo et al. 2016). Este arbusto é importante do ponto de vista ecológico, uma vez que evita a erosão dos solos, ajuda a manter a fauna e flora, cresce em solos pobres e em zonas fustigadas por incêndios, regenerando rapidamente (Oliveira et al. 2011).



Figura 1 – *Arbutus unedo* (Medronheiro)

As diferentes estruturas do medronheiro têm propriedades terapêuticas e medicinais. As folhas e raízes parecem ser utilizadas no tratamento de infeções urinárias, doenças do foro dermatológico, doenças renais, hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares. Os frutos e os caules têm menos utilizações, mas são referidos no tratamento de infeções urinárias, doenças do foro dermatológico, doenças cardiovasculares e desconforto gastrointestinal (Oliveira et al. 2011).

As folhas do medronheiro têm aplicações na área farmacêutica e na área dos suplementos alimentares (Orak et al. 2011), e a sua atividade antimicrobiana foi referida por Oliveira et al. (2011), sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Enterococcus faecalis*.

Os frutos conhecidos por medronhos, têm forma esférica e a sua superfície está coberta por pequenos cones que conferem uma textura característica (Fonseca et al. 2015). O fruto sofre alteração de cor ao longo do seu processo de amadurecimento, iniciando num tom verde/amarelo, até atingir a cor característica do pico de maturação, o vermelho-escuro, o que ocorre entre outubro e dezembro (Figura 2). Os frutos são uma importante fonte de rendimento nas zonas rurais, para a produção de aguardente, melosa, produtos de pastelaria e compotas (Oliveira et al. 2011).



Figura 2 - Medronhos nos diferentes estádios de maturação.

A nível nutricional o fruto é fonte de minerais, e apresenta um valor razoável de proteína. O açúcar é o composto em maior quantidade e que varia ao longo do amadurecimento (Oliveira et al. 2011). Os compostos identificados nos frutos de *Arbutus unedo* incluem vitaminas (A, C e E), considerando-se o medronho como uma fonte de antioxidantes. A cor vermelha dos frutos, que determina o seu estado de maturação, deve-se à presença de antocianinas (Delgado-Pelayo et al. 2016).

Os medronhos maduros podem ser considerados como fonte de ácidos gordos ómega 3, ómega 6, fitoesteróis e tocoferóis. Estes nutrientes têm demonstrado efeitos benéficos na saúde, sendo possível considerar os medronhos como fonte de fitoquímicos valiosos com fins nutricionais (Fonseca et al. 2015).

De acordo com Alarcão-e-Silva et al. (2001) os frutos de *Arbutus unedo*, podem ser considerados como uma potencial fonte de corante alimentar, devido à presença de beta-caroteno e antocianinas que são responsáveis pelas cores laranja e vermelho.

A principal classe química presente nos três estágios de maturação são os álcoois, que diminuem ao longo da maturação. No entanto, no ponto de maturação máximo, e em comparação com os restantes compostos, é o grupo presente em maior concentração (Oliveira et al. 2011).

1.1.2 *Corema album* (Camarinha)

A camarinheira (*Corema album*) é um arbusto dióico, que pode atingir 1 metro de altura, pertencente à família *Ericaceae*. É endémico nas dunas e falésias da costa atlântica da Península Ibérica e no noroeste da Galiza até Gibraltar (Figura 3) (Santos et al. 2014). Foi identificada uma subespécie, *C. album subsp. azoricum* Pinto da Silva, que é nativa do arquipélago dos Açores (Andrade et al. 2017).



Figura 3 – *Corema album* (camarinheira) com os seus frutos

A floração ocorre em sintonia entre as flores femininas e masculinas nos meses de fevereiro a abril. Os frutos amadurecem entre junho e setembro, momento de temperaturas altas, ausência de chuvas e elevada radiação solar. As plantas femininas produzem bagas, as camarinhas (Andrade et al. 2017). Estes pequenos frutos, 5-8 mm de diâmetro, têm sabor agradável, mas levemente ácido. A sua polpa é rica em fibra e açúcar (Andrade et al. 2015). São consumidas frescas, ou transformadas em geleia ou licores. No campo da medicina tradicional são utilizadas no tratamento da febre e infeções por parasitas (León-González et al. 2013).

Quando as camarinhas estão maduras, a sua cor pode variar entre o branco-pérola e um tom levemente rosa até um aspeto translúcido, em que é possível visualizar as sementes (Figura 4) (Andrade et al. 2017).



Figura 4 –Pormenor das camarinhas brancas e translúcidas (adaptado de De Oliveira & Dale 2012).

Os frutos contêm elevada concentração de alguns grupos de compostos bioativos com atividade anti-bacteriana, anti-inflamatória e anti-cancerígena, que podem trazer benefícios à saúde do consumidor, nomeadamente na prevenção de algumas patologias, como as doenças cardiovasculares, oncológicas e infeções urinárias (León-González et al. 2013).

Devido à fraca disponibilidade de água, elevadas temperaturas no verão, baixo teor em nutrientes, ação abrasiva do mar e aos solos de drenagem rápida, *Corema album* possui folhas de reduzidas dimensões, de modo a proteger os estomas, diminuindo a transpiração, a perda de água e permitindo uma melhor adaptação ao habitat costeiro (Marques 2007).

Esta espécie encontra-se em extinção, devido à destruição dos habitats costeiros para fins urbanísticos, recreativos ou pela presença de espécies invasoras (Jornal Público, 2018).

1.2 Compostos bioativos de origem vegetal

Os compostos bioativos extraídos das plantas, têm despertado interesse na comunidade científica devido às suas aplicações, tanto na indústria alimentar, como na área da saúde, cosmética, aromaterapia e agricultura (Dima & Dima 2015). Assim, a flora surge como uma possibilidade para contrariar os desafios encontrados pela indústria alimentar e farmacêutica, uma vez que são fonte de moléculas com atividade antimicrobiana, anti-fúngica, anti-viral, anti-parasitária, anti-séptica, antioxidante, anti-inflamatória, anestésica (Chouhan et al. 2017; Pandey et al. 2017), anti-cancerígena, antidiarreica e analgésica (Sasidharan et al. 2007).

Na indústria alimentar as moléculas bioativas podem ser utilizadas como antimicrobianos (Perricone et al. 2015), antioxidantes (Turek & Stintzing 2013), aromatizantes (Dima & Dima 2015) ou como suplementos alimentares (Oliveira et al. 2011). Os compostos bioativos podem ser aplicados de forma direta ou em sinergia com outros aditivos, acrescentando valor ao produto final por serem considerados “naturais” (Takwa et al. 2018). As plantas aromáticas e medicinais, podem ser utilizadas não só para dar sabor, mas também como conservantes, devido à presença dos diversos compostos que têm demonstrado atividade antimicrobiana sobre microrganismos que afetam a qualidade e o tempo de vida útil dos alimentos (Gottardi et al. 2016).

Na medicina, o uso excessivo de antibióticos e a capacidade de adquirir e transmitir resistência por parte das bactérias deu origem a um problema de saúde pública (Górniak et al. 2019), que é responsável pelo aumento da morbilidade e mortalidade (Weleni 2017). O aumento da resistência aos antibióticos tem originado a escassez de agentes antimicrobianos eficazes, sendo necessária e urgente a pesquisa

e desenvolvimento de novos compostos (Górniak et al. 2019). A sinergia entre antibióticos e outras moléculas bioativas pode ser uma possibilidade para contornar esta problemática (Chouhan et al. 2017).

1.2.1 Definição de compostos bioativos, óleos essenciais e extratos vegetais

Compostos bioativos são definidos como metabólitos secundários das plantas, que provocam efeitos farmacológicos, ou toxicológicos, em humanos e animais (Azmir et al. 2013). Estes compostos são produzidos pelas diversas estruturas presentes nas plantas e armazenados nos tricomas e bolsas secretoras (Figueiredo et al. 2014). As moléculas bioativas, são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade (Pandey et al. 2017), sendo por isso consideradas como seguras (Generally Recognized as Safe - GRAS) (Pandey et al. 2017). Os metabólitos secundários são os compostos que dão valor medicinal às plantas, com o objetivo destas se adaptarem melhor ao meio em que se inserem, designadamente como defesa afastando possíveis predadores, proteção aos raios UV, (Jamwal et al. 2018) pragas, ou na atração de polinizadores (Cushnie & Lamb 2005). Os metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários, visto que os primários são os compostos essenciais à vida das plantas, tais como proteínas, hidratos de carbono e lípidos (Moghaddam & Mehdizadeh 2017).

De acordo com a metodologia utilizada na extração de compostos bioativos, a mistura final deverá ser classificada como extrato ou óleo essencial. De acordo com a ISO 9235:2013 a definição de extrato consiste num “produto obtido de matéria-prima natural, com a utilização de um ou vários solventes.” A solução obtida poderá ser filtrada e/ou os solventes parcialmente ou totalmente removidos. A definição de óleo essencial é determinada pela Norma Portuguesa NP-90, 1987, que os define como produtos aromáticos obtidos exclusivamente por destilação com vapor de água (ou destilação fracionada) de materiais vegetais ou, por expressão, no caso do pericarpo dos citrinos, com posterior separação por centrifugação (Nogueira & Lourenço 2007).

Os óleos essenciais consistem em misturas complexas, constituídas por aproximadamente 20-60 compostos em concentrações variáveis, em que alguns estão presentes em concentrações razoavelmente altas (20-70%) e outros em baixas concentrações. Os compostos bioativos presentes em maior concentração, são importantes na atividade biológica do óleo essencial, no entanto os compostos secundários desempenham um papel significativo, pois podem potencializar os efeitos dos compostos principais (Perricone et al. 2015). Os óleos essenciais são solúveis em álcool e éter, mas insolúveis em água. São geralmente líquidos e incolores à

temperatura ambiente e com um odor característico, sendo constituídos por compostos de natureza volátil (Dhifi et al. 2016).

Os extratos e óleos essenciais podem ser obtidos através das diversas partes da planta: raízes, caules, flores, folhas, frutos e sementes. As plantas que são normalmente utilizadas, ou que despertam maior interesse devido aos resultados obtidos, encontram-se na zona mediterrânica, em climas mais temperados e áreas tropicais (Perricone et al. 2015). A ampla gama de possíveis utilizações dos óleos essenciais, ou extratos, resulta da diversidade encontrada na sua composição (Turek & Stintzing 2013).

1.2.2 Fatores que afetam a produção de compostos bioativos

Todos os fatores a que a planta está exposta têm influência direta na biossíntese, distribuição, composição e concentração de compostos bioativos, podendo resultar numa grande variabilidade química dentro da mesma espécie. Estes fatores dividem-se em fatores intrínsecos e extrínsecos (Dhifi et al. 2016). Os fatores intrínsecos incluem as características genéticas da planta (espécie e quimiótipo), órgão da planta, estágio de desenvolvimento e idade. Os fatores extrínsecos incluem fatores ambientais, tais como condições climáticas, aplicação de fertilizantes, temperatura, humidade, radiação, vento, rega, propriedades do solo, localização geográfica, estação do ano e métodos de secagem e extração (Moghaddam & Mehdizadeh 2017).

A influência dos fatores anteriormente referidos está refletida no facto de extrações efetuadas durante ou imediatamente após a floração, normalmente originarem óleos essenciais com uma forte atividade antimicrobiana (Vergis et al. 2015).

1.2.3 Métodos de extração

A extração é o momento em que retiramos da matriz os compostos bioativos, sendo importante conservar os tecidos vegetais, de modo que os compostos se mantenham viáveis. A conservação pode ser através da congelação ou desidratação (liofilização), mas o material vegetal pode ser utilizado fresco (Dai & Mumper 2010).

O método de extração de compostos bioativos depende da sua estrutura molecular, polaridade, pH, concentração, tempo de extração, temperatura utilizada, estabilidade térmica, rácio entre solvente e amostra. Devido à complexidade do processo de extração é difícil escolher um único método que se aplique aos mais variados tecidos vegetais (Khoddami et al. 2013).

O tempo e a temperatura utilizados aumentam a solubilidade dos compostos bioativos, no entanto, parte dos compostos pode sofrer degradação ou reações indesejáveis, como a oxidação por tempos de extração prolongados e temperaturas

elevadas. Todos estes parâmetros são diferentes de amostra para amostra, e poderão ter como resultado final compostos distintos (Khoddami et al. 2013).

Assim sendo, a metodologia escolhida deverá estar de acordo com objetivo pretendido, uma vez que as propriedades dos compostos bioativos obtidos através de diferentes métodos variam, obtendo-se misturas distintas. A hidrodestilação, extração com solvente orgânico, *enfleurage*, utilização de ultra-sons, alta pressão hidrostática (HHPE), micro-ondas ou fluido supercrítico – CO₂, são as opções disponíveis para a obtenção de extratos vegetais ou óleos essenciais (Moghaddam & Mehdizadeh 2017).

1.2.3.1 Extração com solvente orgânico

As extrações com recurso a solventes, são dos procedimentos mais utilizados na extração de compostos bioativos, devido à sua eficiência e facilidade de aplicação a qualquer tipo de amostra. É importante determinar qual o solvente a utilizar, uma vez que a escolha irá influenciar os compostos extraídos. Metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo e algumas combinações, com diferentes proporções de água, têm sido utilizados para a extração de diferentes compostos (Dai & Mumper 2010).

Após a extração pode ser necessário eliminar o solvente utilizado. Para a sua eliminação, o equipamento utilizado é o rota-vapor. Este equipamento tem como vantagem o aumento da velocidade de evaporação, uma vez que reduzindo a pressão, reduz-se o ponto de ebulição do solvente. A rotação do balão durante este processo aumenta a área de evaporação e mantém a temperatura da mistura (Bennour et al. 2019). A desvantagem deste tipo de extração é a possível perda de compostos voláteis durante a remoção do solvente (Moghaddam & Mehdizadeh 2017).

1.2.3.2 Extração com ultra-sons

A utilização de ultra-sons facilita a extração de compostos bioativos de matrizes sólidas. A sonicação corresponde à produção de ondas sonoras, que criam bolhas de cavitação próximas do tecido da amostra, fracionando as paredes celulares e libertando o conteúdo celular. O extrato obtido é influenciado pelo tempo de sonicação, temperatura, seleção do solvente, frequência e distribuição das ondas (Khoddami et al. 2013).

1.2.4 Atividade antimicrobiana

Devido à presença de inúmeros compostos químicos nos extratos ou óleos essenciais, a atividade antimicrobiana não é atribuída a um único mecanismo específico, mas sim a uma “cascata” de reações, que se iniciam num determinado alvo celular e

que avançam para outro local de ação como consequência de um primeiro alvo celular. A estrutura química dos compostos bioativos afeta o seu modo de ação e a atividade antibacteriana. Uma característica importante destes compostos químicos é sua hidrofobicidade, que lhe permite danificar os lípidos da membrana celular, coagular o citoplasma e alterar a fluidez da membrana, tornando-a mais permeável e originando a saída extensiva dos conteúdos celulares, tendo como consequência a morte celular (Figura 5)(Burt 2004).

Os compostos bioativos podem também atuar sobre as proteínas celulares presentes na membrana citoplasmática, que estão delimitadas por moléculas lipídicas. Os bioativos podem acumular-se na bicamada lipídica e distorcer a interação entre os lípidos e a proteína; ou promover interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína (Figura 5) (Burt 2004).

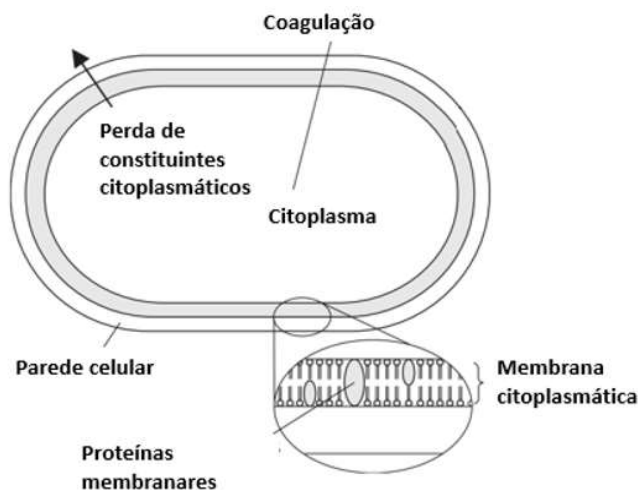


Figura 5 - Localizações e mecanismos na célula bacteriana considerados locais de ação pelos compostos bioativos (adaptado de Burt 2004).

De um modo geral, as bactérias Gram positivas são mais suscetíveis aos compostos bioativos do que as Gram negativas. A parede celular das bactérias Gram positivas é constituída por peptidoglicano (90-95%), ácido teicóico e proteínas. A estrutura da parede celular das bactérias Gram negativas é mais complexa, sendo composta por uma monocamada de peptidoglicano, envolvida por uma membrana externa composta por proteínas e lipopolissacarídeos (camada LPS), que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. Este limite externo funciona como uma barreira. No entanto, alguns compostos hidrofóbicos podem ultrapassar esta estrutura bacteriana e aceder ao citoplasma ou a outras estruturas celulares (Figura 6) (Khorshidian et al. 2018).

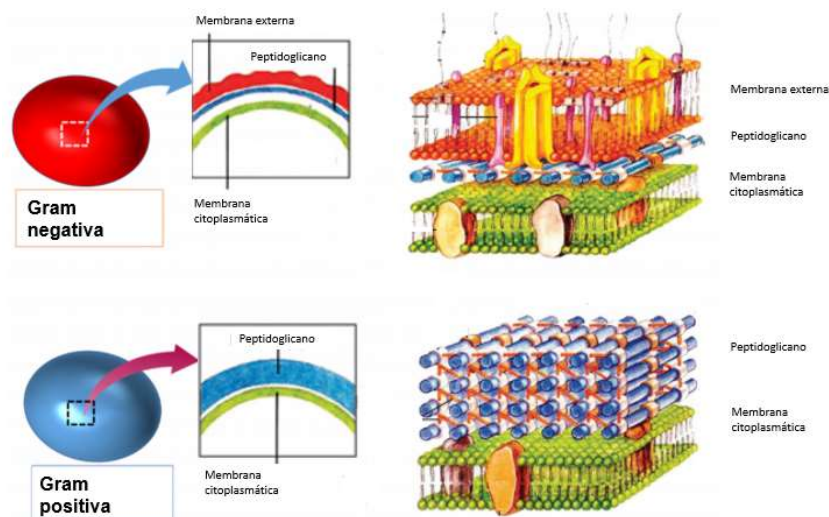


Figura 6 - Constituição da parede celular das bactérias Gram negativas e Gram positivas (adaptado de Ogunsona et al. 2020).

1.3 Segurança dos alimentos e as doenças transmitidas por alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), representam um problema económico e de saúde pública, que abrange desde os países mais desenvolvidos até aos países em desenvolvimento, sendo estes últimos os mais afetados (WHO, 2021). Desconhece-se a verdadeira dimensão deste problema, uma vez que parte dos casos não são reportados. Cerca de um terço da população dos países desenvolvidos é anualmente afetada por doenças transmitidas por alimentos (Veiros et al. 2009). Estas doenças são causadas pelo consumo de alimentos, ou água, contaminados por agentes infecciosos, e podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia de produção. As doenças transmitidas por alimentos mais comuns são causadas por *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* e *Listeria*, e têm como sintomas náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, e em casos extremos a morte (EFSA, 2021).

As doenças transmitidas por alimentos, vulgarmente chamadas toxinfecções alimentares (TIAs) dividem-se em infeções e intoxicações. As infeções alimentares são causadas pela presença no alimento de um agente patogénico. No caso das intoxicações, a sintomatologia surge pela ingestão das toxinas previamente sintetizadas pelo agente patogénico (Viegas 2015).

Os surtos de toxinfecções alimentares podem estar relacionados com o incumprimento do binómio tempo/temperatura, falta de formação por parte dos manipuladores, higiene pessoal insuficiente, contaminação cruzada entre os diversos géneros alimentícios a processar ou processados, contaminação com as superfícies dos equipamentos, incumprimento de códigos de boas práticas ou processos de limpeza e higienização deficientes (Forsythe 2013). Outros motivos também devem ser

considerados, tais como o aumento do comércio internacional, o envelhecimento da população, as alterações climáticas, a migração e viagens internacionais, agravam este problema e expõem a população a perigos aos quais nunca tinham estado expostos (World Health Organization 2008).

A legislação europeia relativa à segurança dos alimentos é das mais complexas e exigentes a nível mundial, tendo como base o princípio da precaução e a defesa do consumidor. Dada a importância da alimentação, este setor tem evoluído para se ajustar a todas as alterações necessárias, desde a legislação em vigor à adaptação a novas realidades e oportunidades de mercado. A publicação de vários diplomas legais, do qual se destaca o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de abril, relativo à higiene dos géneros alimentícios, descreve as obrigações dos operadores económicos, nomeadamente a necessidade de formação, o cumprimento dos requisitos de higiene, a aplicação de procedimentos baseados nos princípios do HACCP, o respeito pelos critérios microbiológicos e a recolha e análise de amostras. O regulamento (CE) n.º 1831/2003 do parlamento europeu e do conselho de 22 de setembro estabelece os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, determinando um limite para a aceitabilidade e um conjunto de regras para a recolha e preparação de amostras para análise. Os critérios microbiológicos são aplicáveis aos produtos colocados no mercado, durante todo o seu período de vida útil. Têm carácter obrigatório e o não cumprimento conduz à rejeição, reproprocessamento ou retirada do produto do mercado. O Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do parlamento europeu e do conselho de 28 de janeiro tem como objetivo assegurar um elevado nível de saúde pública impedindo a colocação de géneros alimentícios para humanos e alimentos para animais, que não sejam seguros no mercado e estabelecendo regras gerais ao comércio de géneros alimentícios. Este regulamento cria ainda a autoridade europeia para a segurança dos alimentos e o sistema de alerta rápido para os géneros alimentícios e alimentos para animais (RASFF). A rastreabilidade de todos os géneros alimentícios ao longo da cadeia de produção e comércio inicia-se também com este documento legal.

1.3.1 Microrganismos presentes nos alimentos

Na perspetiva da microbiologia alimentar, os microrganismos podem ser divididos em três grupos: microbiota tecnológico, patogénico ou deteriorativo. No grupo tecnológico, estão incluídas as bactérias que podem ser utilizadas na produção de alimentos, como os alimentos fermentados, destacando-se os membros do género *Enterococcus*. No segundo grupo, microbiota patogénico, estão as bactérias que causam doença, representando perigo para a saúde pública, como *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e

como representante das bactérias deteriorativas, ou seja, bactérias que vão causar alteração das características do alimento, que o vai tornar inaceitável para o consumidor, temos como exemplo *Pseudomonas* (Gram et al. 2002).

Aeromonas hydrophila

As bactérias do género *Aeromonas* são em forma de bacilo, Gram negativas, anaeróbias, não formadoras de esporos e móveis (Citterio & Biavasco 2015). O intervalo de temperatura mais adequado ao desenvolvimento deste microrganismo é entre 4 a 42 °C, com uma temperatura ótima de 28 °C (Pattanayak et al. 2020). É considerada uma bactéria oportunista (World Health Organization 2008). A sua distribuição é ubíqua, mas típica de ambientes aquáticos, surgindo com frequência em pescado (Citterio & Biavasco 2015). O género *Aeromonas* apresenta capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas (Talagrand-Reboul et al. 2017).

Bacillus cereus

As bactérias do género *Bacillus*, pertencem à família *Bacillaceae*, amplamente distribuída na natureza, em forma de bacilo, Gram positiva, aeróbia, móvel (Montville et al. 2017), formadora de esporos resistentes a elevadas temperaturas e a agentes de desinfecção (Fink et al. 2017). Este género tem como temperatura ótima de multiplicação 30 a 40 °C, e um pH ótimo entre 4,9 e 9,3 (Schneider et al. 2020).

A espécie *B. cereus* produz duas toxinas, a diarreica e a emética. A toxina emética, termorresistente, provoca como sintoma principal, o vômito. Está associada a alimentos ricos em amido, como o arroz (Montville et al. 2017; World Health Organization 2008). Neste tipo de surtos a intoxicação deve-se à ingestão do alimento com a toxina (Huang et al. 2020). A toxina diarreica, que é termosensível, está associada a alimentos proteicos, como peixe (Montville et al. 2017; World Health Organization 2008). Neste caso a toxina é produzida e libertada no intestino do consumidor pelas células vegetativas (Huang et al. 2020).

Os esporos de *B. cereus* resistem a condições ambientais extremas, como a pasteurização, congelação, desidratação e radiação, constituindo assim uma preocupação durante o processamento dos alimentos (Huang et al. 2020). *B. cereus* é conhecido por produzir biofilmes que representam uma possível fonte de contaminação dos alimentos (Huang et al. 2020).

Enterococcus spp.

O género *Enterococcus* é constituído por 72 espécies (Lpsn, 2021), entre elas *E. faecalis* e *E. faecium*, que correspondem às espécies mais frequentemente encontradas em alimentos (Giraffa 2003).

Os membros do género *Enterococcus* caracterizam-se por serem cocos, Gram positivos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (Fisher & Phillips 2009).

A gama de temperatura para a multiplicação de *Enterococcus* situa-se entre 5 a 50 °C, com um pH que pode variar entre 4,6 a 9,9. Estas bactérias toleram elevadas concentrações de sal, conseguindo sobreviver em ambientes adversos (Fisher & Phillips 2009).

As bactérias deste género são parte essencial e natural da microbiota intestinal do ser humano e de outros animais. São considerados microrganismos oportunistas, e nas últimas décadas têm sido responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde, maioritariamente infeções do trato urinário (Fisher & Phillips 2009). A maior preocupação em relação às estirpes pertencentes a este género é a sua resistência a antibióticos (Hugas et al. 2003).

Os enterococos pertencem ao grupo de organismos conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL) (Fisher & Phillips 2009), que proporcionam aroma, sabor e textura aos produtos alimentares (Franz et al. 2003). Dado que produzem bacteriocinas, os enterococos têm sido utilizados nos produtos fermentados, como culturas *starter* e/ou como probióticos (Fisher & Phillips 2009).

Ao nível da segurança dos alimentos, o género *Enterococcus*, particularmente a espécie *E. faecalis* é considerado um indicador de contaminação fecal, uma vez que reflete as condições de higiene na indústria alimentar (Kim et al. 2020). Em meio industrial têm a capacidade de formar biofilmes (Liu et al. 2020). Nos alimentos, a presença de *Enterococcus* pode ser detetado no leite e pode estar associada à deterioração de produtos cárneos (Franz et al. 2003).

Escherichia coli

O género *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bactérias em forma de bacilo, Gram negativas e anaeróbias facultativas (Aijuka & Buys 2019). A temperatura de multiplicação de *E. coli* situa-se entre os 7 a 50 °C, com uma temperatura ótima de 37 °C (World Health Organization 2008).

A espécie *E. coli* divide-se em seis grupos, de acordo com os seus fatores de virulência, mecanismos de infeção e sintomas clínicos (Montville et al. 2017). Estas bactérias podem ser encontradas no meio ambiente e em animais de sangue quente, nomeadamente no intestino do ser humano onde são parte integrante da microbiota, residindo em simbiose com outros microrganismos (Aijuka & Buys 2019). As estirpes patogénicas causam diarreia, infeções no trato urinário, podendo ser preocupantes para crianças e indivíduos imunocomprometidos. Os surtos estão normalmente associados ao consumo de carne parcialmente confeccionada, enchidos, vegetais, queijo curado, leite cru e consumo de água contaminada. Em ambiente de produção de alimentos, esta bactéria tem a capacidade de formar biofilmes (Vidács et al. 2018).

***Listeria* spp.**

O género *Listeria* inclui atualmente vinte e oito espécies (Lpsn, 2021), caracterizam-se por serem bacilos, Gram positivos, aeróbios (Duze et al. 2021), não formadores de esporos (Duze et al. 2021), com mobilidade conferida por flagelos (Montville et al. 2017). A temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37 °C, com capacidade de se desenvolver a temperaturas de refrigeração (Montville et al. 2017) e capaz de proliferar em pH ácido e elevadas concentrações de sal (Duze et al. 2021).

De entre as espécies referidas, *Listeria monocytogenes* é considerada como uma bactéria patogénica transmitida por via alimentar (Jemmi & Stephan 2006). É responsável pela listeriose, doença provocada pelo consumo de alimentos contaminados, que apresenta elevada taxa de mortalidade e morbilidade (Disson et al. 2021; Duze et al. 2021).

A sua distribuição é ubiquitária (Montville et al. 2017) e pode ser encontrada em diversos alimentos tais como carne, vegetais congelados, peixe, leite e produtos lácteos, gelados e alimentos prontos a consumir. Também pode ser encontrada em superfícies e ambientes de processamento de alimentos, sendo que a capacidade de formar biofilmes lhe permite colonizar diferentes superfícies e persistir em ambiente industrial (Duze et al. 2021).

***Pseudomonas* spp.**

O género *Pseudomonas* tem como características o facto de serem bacilos Gram negativos, aeróbios, não formadores de esporos e com mobilidade conferida por flagelos (Quintieri et al. 2019). A temperatura ótima de multiplicação é 37 °C, (LaBauve & Wargo 2012) e o pH deve situar-se entre 4,5 a 9,5 (Klein et al. 2009). Outra das características deste grupo de bactérias é a sua capacidade para formar biofilmes, tendo assim disponível mais uma via para melhorar a sua capacidade de adaptação e dificultar a erradicação (Quintieri et al. 2019). Deteriora alimentos e é frequentemente identificada em lacticínios, produtos cárneos e água (Quintieri et al. 2019).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista, responsável por infeções associadas aos cuidados de saúde que afetam indivíduos imunocomprometidos (LaBauve & Wargo 2012). Devido à sua capacidade de adaptação, multiplicação rápida e reduzida necessidade nutricional, é facilmente encontrada no meio ambiente, onde está amplamente distribuída (Xu et al. 2019).

***Salmonella* spp.**

O género *Salmonella* está dividido em nove espécies (Lpsn, 2021), que pertencem à família *Enterobacteriaceae* e se caracterizam por serem bacilos, Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e móveis. A temperatura de multiplicação situa-se entre os 2 a 54 °C, com uma temperatura ótima de 37 °C,

podendo sobreviver durante bastante tempo em alimentos congelados. Ao nível do pH, a proliferação pode ocorrer entre 4,5 a 9,5 com um pH ótimo entre 6,5 a 7,5 (Montville et al. 2017). Tal como muitos outros microrganismos, as bactérias pertencentes ao género *Salmonella* têm a capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies como aço inoxidável, vidro e plástico, conseguindo sobreviver na presença de desinfetantes (Steenackers et al. 2012).

A espécie *Salmonella enterica* é o agente responsável por grande percentagem dos surtos de origem alimentar a nível mundial (Spector & Kenyon 2012). Após o consumo de alimentos contaminados a infeção, conhecida por salmonelose, ocorre principalmente em indivíduos com sistema imunitário fragilizado. Os alimentos associados à salmonelose são carnes parcialmente confeccionadas, ovos, vegetais, leite cru (WHO 2017) e ervas aromáticas (Lins 2018).

Staphylococcus aureus

O género *Staphylococcus* caracteriza-se por bactérias em forma de cocos, Gram positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e não móveis. O intervalo de temperatura que permite a sua multiplicação é de 7 a 46 °C com uma temperatura ótima de 35 a 37 °C. O intervalo de pH adequado ao seu desenvolvimento é de 4,5 a 9,3 (ASAE, 2021).

A espécie *Staphylococcus aureus* pode ser encontrada na pele, nariz e garganta, considerando-se o Homem como portador natural. *S. aureus* é disseminado sobre superfícies e equipamentos por contato direto, por fragmentos de pele ou através dos aerossóis que se formam quando os manipuladores falam, tosse ou espirram (Montville et al. 2017). As condições associadas a surtos são geralmente a refrigeração inadequada, preparação dos alimentos com grande antecedência, higiene pessoal deficiente e alimentos que requerem muita manipulação (Montville et al. 2017). A intoxicação alimentar por *S. aureus* é o resultado do consumo de alimentos com a toxina termorresistente, sendo esta o agente responsável pela sintomatologia (ASAE, 2021).

1.3.2 Importância dos biofilmes na indústria alimentar

Na indústria alimentar as superfícies e equipamentos podem ser colonizados por microrganismos formadores de biofilmes. Apesar de os biofilmes serem muitas vezes prejudiciais, têm um importante contributo na produção de cerveja, vinagre e no tratamento de águas residuais. Na indústria alimentar, após adesão e formação do biofilme, os microrganismos que lhe deram origem reduzem a eficácia das estratégias de processamento alimentar e de higienização, e constituem uma possível fonte de contaminação e deterioração dos géneros alimentícios. Por estes motivos os biofilmes comprometem a qualidade e segurança dos alimentos, constituindo uma ameaça para

a saúde pública. Estão associados a perdas económicas, rejeição do produto e doenças relacionadas com o consumo de alimentos contaminados (Rodrigues et al. 2012).

1.3.2.1 Definição de biofilme

Pode definir-se biofilme como uma comunidade microbiana dinâmica, com bactérias aderentes a uma superfície, e incorporadas numa matriz extracelular (EPS – Extracellular Polymeric Substance) (Miladi et al. 2016), produzida pelas próprias, composta por polissacáridos, ácidos nucleicos e proteínas (Kumar & Anand 1998; Kumar et al. 2017).

A matriz EPS é um sistema dinâmico que confere estabilidade e proteção à comunidade bacteriana de condições externas adversas, tais como a dessecação (a matriz incorpora grandes quantidade de água), radiação e resistência a agentes antimicrobianos, permitindo a sua sobrevivência (Simões et al. 2013). Devido à matriz, os biofilmes contemplam um conjunto de mecanismos de proteção, como a elevada viscosidade da matriz diminuindo a difusibilidade de compostos antimicrobianos (Simões et al. 2013), aumentando a resistência a temperaturas elevadas, a ambientes ácidos e a ambientes com concentrações de sal (Jadhav et al. 2013).

Esta proteção é bastante eficaz, uma vez que a resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos no estado de biofilme, aumenta entre 10 a 1000 vezes comparativamente às células planctónicas (Górniak et al. 2019). No entanto, a proteção conferida pela matriz pode ficar reduzida quando esta estrutura é danificada (Kumar & Anand 1998). Com a idade do biofilme, o nível de proteção da matriz aumenta, porque aumenta a produção de EPS (Kumar & Anand 1998). Além da defesa proporcionada pela matriz, as bactérias presentes nos biofilmes podem produzir enzimas com capacidade de degradar os compostos antimicrobianos (Kumar & Anand 1998).

A formação e arquitetura do biofilme está dependente da espécie, estirpe, estágio de desenvolvimento, presença de flagelos, pili e fimbrias, propriedades da superfície de adesão, pH, temperatura, nutrientes disponíveis e dinâmica de fluidos (Whitehead & Verran 2015). Assim, uma bactéria pode ser considerada boa produtora de biofilme em condições específicas que, quando alteradas, originam uma resposta diferente por parte do microrganismo (Simões et al. 2013). No meio ambiente um biofilme é normalmente formado por diversas espécies, o que origina biofilmes mais espessos e mais estáveis, visto que a matriz produzida por uma espécie pode aumentar a estabilidade das outras espécies, assim como a resistência aos agentes antimicrobianos (Simões et al. 2013).

1.3.2.2 Etapas de formação de biofilme

A formação do biofilme é um processo dinâmico, cíclico e gradual, no qual as bactérias passam de um estado unicelular para um estado multicelular (Simões et al. 2013). O número de etapas do processo de formação de biofilme não é consensual entre autores. A Figura 7 apresenta uma esquematização deste processo considerando cinco etapas (Magana et al. 2018).

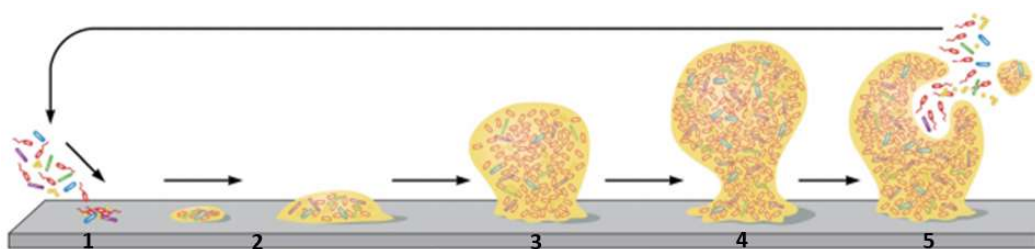


Figura 7 – As diversas fases de formação do biofilme (Adaptado de Magana et al. 2018).

1 – Condicionamento da superfície

A formação do biofilme, começa com a bactéria na sua forma planctónica, que inicia o contacto com qualquer superfície. Nos ambientes de processamento de alimentos, as bactérias e os nutrientes provenientes dos géneros alimentícios formam um filme condicionador que favorece a formação do biofilme (Kumar & Anand 1998).

2 – Adesão celular

A adesão celular ocorre em duas fases: primeiramente a adesão reversível seguida pela adesão irreversível. Para a formação do biofilme é necessário que a célula se fixe à superfície. A adesão está dependente das estruturas celulares de locomoção e fixação, tais como os flagelos, pili e fimbrias, que ganham nesta fase grande importância para garantir uma fixação estável. A disponibilidade de nutrientes e a fase de multiplicação das bactérias influenciam a adesão (Simões et al. 2013).

Entre a bactéria e a superfície tem de existir interação, para que esta se fixe. A interação entre as duas superfícies implica, um conjunto de forças de atração, forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Durante esta fase as bactérias podem ser facilmente removidas, visto que as forças existentes na interação são de intensidade reduzida, tornando esta adesão reversível, podendo as bactérias voltar ao modo planctónico (Kumar & Anand 1998).

Na adesão irreversível as células bacterianas estabelecem interações dipolo-dipolo, ligações por pontes de hidrogénio, ligações iónicas e covalentes e interações hidrofóbicas. Para espécies móveis, as fimbrias estabelecem pontes entre a bactéria e a superfície formando uma associação irreversível, assim como os flagelos que superaram as forças repulsivas entre a bactéria e a superfície. Em espécies não móveis,

as bactérias aumentam a produção de adesinas na sua superfície, aumentando a sua viscosidade. Este aumento de viscosidade promove a aderência célula-célula e a aderência à superfície (Simões et al. 2013).

As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostram que a adesão microbiana melhora com o aumento da hidrofobicidade da superfície (Rodrigues et al. 2009), superando as forças repulsivas que possam existir (Simões et al. 2013).

3 – Formação de microcolónias

As bactérias fixadas de modo irreversível, multiplicam-se, formando microcolónias, recolhendo do ambiente circundante os nutrientes necessários. As microcolónias aumentam e formam uma camada de células que cobre a superfície. No decorrer da multiplicação celular, as células produzem EPS que auxilia na estabilização e fixação à superfície (Kumar & Anand 1998).

4 – Formação do biofilme

A fixação continua de células e a sua multiplicação em simultâneo com a produção de EPS, origina o biofilme. A composição do biofilme pode ser heterogénea, devido à colonização por diferentes microrganismos (Kumar & Anand 1998). O biofilme formado tem uma arquitetura complexa, sendo constituído por bactérias organizadas em microcolónias, intercaladas com regiões menos densas da matriz que incluem canais de água altamente permeáveis, que transportam nutrientes e produtos residuais (Rahman et al. 2016).

5 – Dispersão

A dispersão das células que constituem o biofilme pode ser considerada como uma estratégia para a colonização proativa de novos ambientes, antes que os nutrientes se tornem limitantes (Rahman et al. 2016). A rutura da biomassa pode ser dividida em dois modos: erosão e descolamento. A erosão consiste num despreendimento contínuo de pequenos fragmentos do biofilme. O descolamento é a perda massiva de biomassa do biofilme (Simões et al. 2013).

1.3.2.3 Problemas na indústria alimentar

A fixação de bactérias e posterior formação de biofilmes em superfícies e equipamentos, é prejudicial (Kumar & Anand 1998). Os biofilmes estão associados a parte das toxinfecções alimentares (Srey et al. 2013). Sendo a melhor estratégia evitar a formação dos mesmos, higienizando correta e regularmente, impedindo assim que as células se fixem às superfícies (Srey et al. 2013).

Os biofilmes podem desenvolver-se em tapetes transportadores, tubagens, juntas, circuitos de água potável e esgotos, permutadores de calor, e partes internas dos equipamentos onde é difícil higienizar (Wirtanen et al. 2000; Rodrigues et al. 2012). Pela sua presença em vários locais ao longo das linhas de produção, os biofilmes reduzem a transferência de calor, diminuindo a eficácia do processo e aumentando o consumo de energia. São também responsáveis pela corrosão das superfícies metálicas e aumentam a resistência dos fluídos nas tubagens (Kumar & Anand 1998). De modo a prevenir a adesão de microrganismos é importante a escolha de materiais que de algum modo possam impedir a adesão bacteriana e a escolha de agentes químicos de limpeza e desinfeção, adequados a cada indústria.

2. Objetivos

As plantas medicinais acompanharam o início da medicina e da indústria farmacêutica, pelo facto de serem o único recurso acessível por parte da população a qualquer tipo de terapêutica. Com o avanço da ciência, têm sido identificadas diversas atividades biológicas associadas às plantas, devido à presença de compostos bioativos. Estes compostos podem ser utilizados de variadíssimas formas em diferentes áreas. Na indústria alimentar podem ser utilizados como antimicrobianos, de modo a inibir ou eliminar microrganismos que tenham a capacidade de aderir e formar biofilmes nas superfícies de processamento ou armazenamento dos alimentos. Os biofilmes são estruturas multicelulares, altamente organizadas, que fornecem proteção aos microrganismos, dificultando a ação de agentes agressores externos, permitindo a sua sobrevivência e consequentemente a contaminação dos alimentos, estando frequentemente na origem de doenças veiculadas por alimentos. Assim, os compostos bioativos constituem uma possível estratégia de controlo microbiano na indústria alimentar, devido às suas diversas atividades biológicas e origem natural.

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram:

- ✓ Extrair compostos bioativos de duas espécies vegetais, *Arbutus unedo* e *Corema album*, recorrendo a diferentes solventes;
- ✓ Avaliar a capacidade de formação de biofilme por microrganismos relevantes na indústria alimentar, a duas temperaturas e períodos de incubação distintos;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais sobre microrganismos (deteriorativos ou patogénicos), associados a alimentos;
- ✓ Determinar concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas para os extratos com maior potencial antimicrobiano (células planctónicas em cultura pura e mista);
- ✓ Determinar concentrações mínimas de erradicação de biofilme (CMEB).

3. Material e métodos

3.1 Recolha de plantas produtoras de compostos bioativos

3.1.1 *Arbutus unedo* (Medronheiro)

Entre junho e novembro de 2017, foram recolhidos na Aldeia da Pedralva, folhas, caules, raízes e frutos do medronheiro. Todos os arbustos cresceram nas mesmas condições climáticas e sem intervenção humana. Os medronhos foram colhidos aleatoriamente em diferentes datas, tendo sido por cada data, colhidos os três estádios de maturação (imaturo, intermédio e maduro). Os frutos foram colocados em sacos estéreis, e transportados no mesmo dia para o laboratório (mantidos sobre gelo, numa caixa isotérmica durante o transporte), onde foram congelados a -80 °C. Os arbustos foram enrolados em papel-jornal de modo a secarem uniformemente em local seco e escuro, mantendo-se sempre à temperatura ambiente.

Em novembro de 2019 foram efetuadas novas recolhas, apenas de folhas e frutos maduros. Todo o material vegetal foi recolhido na mesma área geográfica das amostras anteriores. As folhas foram guardadas em local seco, ao abrigo da luz solar e à temperatura ambiente. Os medronhos foram mantidos a -20 °C, tendo sido posteriormente transportados para o laboratório do mesmo modo que na recolha anterior, e mantidos a -80 °C até utilização.

3.1.2 *Corema album* (Camarinheira)

As bagas e as respetivas folhas, de ambos os sexos, foram recolhidas aleatoriamente no final do mês de julho de 2019, no concelho de Aljezur, junto ao litoral, numa zona em que surgem de forma natural e espontânea. As bagas foram separadas em dois estados de maturação: imaturo - camarinhas brancas; maduro - camarinhas translúcidas; que foram armazenadas no mesmo dia a -80 °C, tendo sido posteriormente transportadas em gelo, no mês de setembro, para o laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária. As folhas foram envolvidas em papel-jornal e armazenadas em local seco, ao abrigo da luz solar e à temperatura ambiente.

3.2 Extração de compostos bioativos

Os medronhos e as camarinhas foram pesados e liofilizados (Scanvac cool sate, Dinamarca), durante 4 dias, a vácuo e a uma temperatura aproximada de -55 °C. Após liofilização, os frutos foram novamente pesados e mantidos a -80 °C. De modo a preparar o passo seguinte, foi necessário reduzir as dimensões dos frutos liofilizados e das folhas do medronheiro. Os frutos foram esmagados e as folhas do medronheiro

cortadas em pequenos fragmentos. As folhas de camarinheira foram mantidas inteiras, devido à sua reduzida dimensão.

Para a extração de compostos bioativos, pesaram-se quatro alíquotas de cerca de 2,0 g de cada amostra, e adicionaram-se 20 ml da mistura água:acetona (Fisher) ou água:etanol (Merck) ou água:metanol (Honeywell), na proporção 1:1 (v/v); a quarta alíquota foi colocada em água destilada, sem adição de solvente orgânico. Os quatro erlenmeyers (por amostra) foram tapados com parafilm e cobertos com papel de alumínio para proteger da incidência da luz (com o objetivo de evitar a degradação dos compostos bioativos).

De seguida, os erlenmeyers foram colocadas num banho de ultra-sons, (Grant, MXB14), durante 20 minutos, à temperatura ambiente, adicionando-se gelo ao banho de água, de modo a prevenir o aumento da temperatura. Após terminada a primeira sonicação, as amostras repousaram durante 1 hora. Durante este compasso de espera os erlenmeyers foram novamente tapados com parafilm e cobertos com papel de alumínio. Repetiu-se o processo de sonicação por mais 20 minutos.

Os extratos resultantes foram filtrados dentro da hotte, com filtros de pregas de 90 mm de diâmetro (Whatman e Filtres Laurent-Prat-Dumas), para balões previamente tratados (ie, mantidos em estufa a 103 °C, e transferidos para o exsiccador durante 20 minutos), dando-se de seguida início à evaporação do solvente, no rota-vapor (Heidolph G3), com o banho de água a uma temperatura de 40 °C, 150 rpm e a baixa pressão, até à evaporação total do solvente, obtendo-se assim extratos aquosos. O tempo e a pressão variaram de acordo com o a amostra e o solvente a evaporar (otimizado caso a caso). Nota: o rota-vapor foi utilizado apenas para os extratos com a solução à base de solventes orgânicos, para o extrato à base de água este passo não foi efetuado.

No final do processo os extratos foram divididos em alíquotas devidamente identificados e conservados a 4 °C até posterior utilização. As seguintes referências correspondem às publicações consultadas para definição do protocolo final acima descrito, que foi adaptado e otimizado durante o presente estudo (Orak et al. 2011; Jurica et al. 2017; Takwa et al. 2018).

3.3 Microrganismos em estudo e manutenção de culturas

Para a realização dos ensaios foi necessário recorrer a diferentes bactérias, comumente associadas a toxinfecções alimentares e/ou à deterioração de alimentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Microrganismos incluídos no estudo e temperaturas ótimas de multiplicação.

Microrganismos		Temperatura ótima de multiplicação (°C)
Gram negativas	<i>A. hydrophila</i> (A259)	28
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	37
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	37
	<i>S. enterica</i> (CECT 4300)	37
Gram positivas	<i>B. cereus</i>	30-40
	<i>E. faecalis</i> (V583)	37
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 911)	30-37
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	30-37
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	35-37

Legenda: (ATCC - American Type Culture Collection; CECT - Colección Española de Cultivos Tipo).

Antes de iniciar qualquer um dos ensaios a seguir descritos todos os microrganismos foram inoculados em meio BHI (Brain Heart Infusion) sólido, incubados em estufa *over-night*, e conservados a 4 °C até utilização, de modo a manter culturas viáveis e metabolicamente ativas durante todo o estudo.

3.3.1 Preparação de suspensões bacterianas

No início de cada ensaio, os microrganismos foram repicados para meio BHI sólido, e incubados a 37 °C *over-night*. De seguida iniciou-se a preparação de suspensões bacterianas, que foram realizadas sempre da mesma forma para as diferentes estirpes, de modo a obter a mesma concentração celular em todas as suspensões, padronizando assim o inóculo a usar.

Num microtubo com 2 ml de solução de Ringer colocou-se com a ansa uma fração da cultura bacteriana metabolicamente ativa e homogeneizou-se no vórtex. Previamente à leitura da densidade ótica das suspensões, preparou-se uma cuvete com 1000 µl de solução de Ringer, que foi utilizada como referência. Transferiu-se para uma nova cuvete 900 µl de solução de Ringer, e adicionou-se 100 µl da suspensão bacteriana preparada anteriormente (diluição de 1:10). Homogeneizou-se por inversão e leu-se a densidade ótica (DO) no espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) a um comprimento de onda de 600 nm. De seguida, efetuou-se o cálculo do volume a retirar da suspensão inicial de modo a obter todas as suspensões com uma concentração celular final de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Converteu-se o valor da absorvância, considerando que 1 Unidade de absorvância (UA) corresponde a 1×10^8 UFC/ml, obtendo-se o volume a utilizar. Transferiu-se da suspensão inicial para novos microtubos, a quantidade necessária e centrifugou-se (Microtubo, Cenytrifuge 5415R) durante 5 minutos, à velocidade máxima de 13,2 rpm e a 4 °C. Descartou-se o

sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 200 µl de solução de Ringer. De seguida homogeneizou-se por agitação no vórtex, obtendo-se assim suspensões com igual concentração de células bacterianas. Nos ensaios em que se utilizaram culturas mistas (*Listeria monocytogenes* CECT 934 e *P. aeruginosa*), após agitação no vórtex, transferiu-se o volume correspondente a cada suspensão bacteriana para um novo microtubo, na proporção de 1:1.

3.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Prepararam-se as suspensões bacterianas para cada microrganismo a estudar, de acordo com o procedimento descrito em 3.3.1. Em microplacas de 96 poços (VWR Tissue Culture Plates, China) distribuíram-se 150 µl de BHI líquido efetuando-se de seguida, um ciclo de UV (duração de 15 minutos) à placa e respetiva tampa na câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II Advance) para eliminar possíveis contaminações durante a distribuição do meio de cultura. De seguida, efetuou-se a inoculação com 3 µl de cada suspensão bacteriana, respeitando a ordem que está descrita na Figura 8. Para cada microrganismo foram realizadas duas réplicas técnicas por microplaca, e para cada ensaio, três réplicas biológicas (três experiências independentes). Após inoculação, as microplacas foram colocadas dentro de caixas plásticas com papel absorvente humedecido, de modo a diminuir a taxa de evaporação do meio de cultura. Seguidamente as microplacas foram incubadas a 37 e 10 °C. O procedimento de inoculação foi repetido a cada 24 horas, perfazendo tempos de incubação de 72, 48 e 24 h, de modo a avaliar a formação de biofilmes ao longo do tempo e a cada uma das temperaturas em estudo.

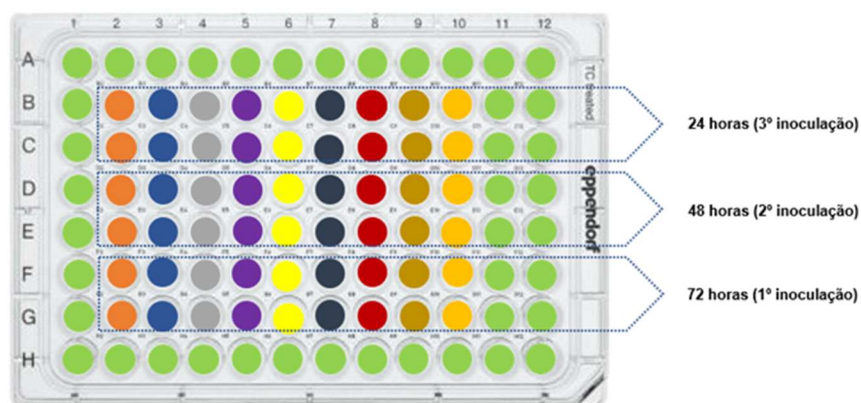


Figura 8 – Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para a quantificação da formação de biofilmes.

A verde estão indicados os controlos de esterilidade (apenas meio de cultura BHI líquido). Coluna 2 – *L. monocytogenes* (CECT 934); Coluna 3 – *L. monocytogenes* (CECT 911); Coluna 4 – *B. cereus*; Coluna 5 – *S. aureus*; Coluna 6 – *E. faecalis*; Coluna 7 – *P. aeruginosa*; Coluna 8 – *S. enterica*; Coluna 9 – *E. coli*; Coluna 10 – *A. hydrophila*.

No final do período de incubação, o biofilme formado foi quantificado recorrendo à técnica da coloração por cristal violeta (O'Toole 2010). Em resumo, retirou-se o conteúdo da microplaca por inversão da mesma e submergiu-se a placa na horizontal em água destilada, com os poços voltados para cima. Retirou-se novamente por inversão o seu conteúdo, e repetiu-se o procedimento de lavagem 3 vezes. Sobre a bancada, colocou-se papel absorvente, inverteu-se a microplaca e retirou-se o excesso de água, movimentando-a contra o papel sobre a bancada. O passo seguinte foi a secagem da placa à temperatura ambiente. Após secagem, foi adicionado a cada poço 100 µl do corante violeta cristal a 0,2 % (p/v), e aguardou-se 15 minutos. Repetiu-se o processo de lavagem e secagem acima referidos, adicionando-se de seguida 125 µl de solução de etanol:acetona (80:20, v/v) a cada poço. Aguardou-se 15 minutos e efetuou-se a leitura a 580 nm, com agitação normal durante 30 segundos, no leitor de microplacas (SUNRISE, Serial number 1708003498, XFLUOR4 Version V 4.51) (O'Toole 2010). Todo o procedimento foi efetuado em câmara de fluxo laminar, de modo a garantir as condições de assépsia, excetuando o procedimento de coloração.

Para análise dos resultados, utilizou-se a seguinte fórmula, de modo a classificar as bactérias em quatro níveis (BFI -Biofilm Formation Index), de acordo com a capacidade de formar biofilme (Lucero-Mejía et al. 2020):

$$BFI = \frac{AB - CW}{GB - GW}$$

AB - absorvância a 580 nm do poço inoculado com a bactéria em estudo;

CW - absorvância a 580 nm do controlo negativo (esterilidade);

GB - absorvância a 620 nm do poço inoculado com a bactéria em estudo;

GW - absorvância a 620 nm do controlo negativo (esterilidade).

Interpretação de resultados:

BFI < 0,35 - considera-se a bactéria como não produtora de biofilme

Quando BFI entre 0,35 e 0,69 - considera-se fraca produtora de biofilme

BFI entre 0,70 e 1,09 - considera-se a bactéria como moderada produtora de biofilme

BFI > 1,10 - considera-se como forte produtora de biofilme

3.4 Atividade antimicrobiana

3.4.1 Método de difusão em meio sólido: *screening* inicial

Atribuiu-se a cada placa de Petri com BHI sólido um microrganismo, dividindo-se a superfície da placa pelo número de extratos a testar.

Distribuíram-se 15 ml de meio BHI semi-sólido (0,75 % agar) em tubos de ensaio, colocando-os no banho a 50 °C, para que o meio de cultura não solidificasse. Adicionou-se a cada tubo de ensaio a suspensão bacteriana previamente preparada como descrito anteriormente (ver 3.3.1). Homogeneizou-se no vórtex, a baixa velocidade, de modo a não criar espuma e verteu-se o conteúdo dos tubos de ensaio sobre as placas com meio BHI sólido previamente secas na estufa, obtendo-se deste modo uma distribuição homogênea do inóculo por toda a placa. Deixou-se a placa solidificar e, sobre a camada adicionada, no centro da respetiva quadrícula, adicionaram-se 5 µl de cada extrato, previamente homogeneizado no vórtex. Deixou-se secar e incubou-se a 37 °C *overnight*. No dia seguinte mediu-se o diâmetro (em mm) dos halos formados. Esta medição foi efetuada utilizando sempre a mesma régua. Como controlo foram utilizadas as diferentes soluções de extração (água:acetona, água:etanol, água:metanol e água destilada). O procedimento decorreu sempre em condições de assépsia.

3.4.2 Método de microdiluição - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB)

Prepararam-se suspensões para cada um dos microrganismos a testar e para a cultura mista, de acordo com o procedimento descrito em 3.3.1. Em microplacas de 96 poços (VWR, Tissue Culture Plates, EUA) distribuíram-se 150 µl de BHI líquido efetuando-se de seguida um ciclo de UV (duração de 15 minutos) à placa e respetiva tampa na câmara de fluxo laminar, de modo a eliminar possíveis contaminações. Num microtubo adicionaram-se 500 µl de água destilada esterilizada e 500 µl do extrato a testar, previamente homogeneizado no vórtex. Nos poços B2 a G2 (Figura 9), adicionou-se 150 µl da diluição previamente preparada, perfazendo nesses poços, um volume de 300 µl. De seguida efetuaram-se as diluições seriadas de 1:2 (v/v), iniciando na segunda coluna e concluindo na penúltima coluna, em que se descartou 150 µl.

Após conclusão das diluições seriadas, e antes de adicionar o inóculo, pipetou-se 5 µl do extrato puro; da 1ª diluição efetuada em microtubo e das diluições efetuadas de B1 a B5, (Figura 9) para uma fita indicadora de pH. Por comparação com a escala de referência do fabricante, anotaram-se os resultados observados.

De seguida, incorporou-se 3 µl de cada suspensão bacteriana nos respetivos poços, de acordo com a Figura 9. Para a temperatura de incubação de 10 °C a duração do ensaio foi de 48 horas, enquanto para a temperatura de 37 °C o ensaio teve uma duração de 24 horas.

Após o período de incubação, retirou-se 5 µl para uma placa de BHI sólido, previamente seca, dos seguintes poços:

- ✓ Controlo positivo (apenas meio de cultura e a estirpe em estudo) e controlo negativo (apenas meio de cultura BHI líquido);
- ✓ Poços em que visivelmente não ocorreu multiplicação celular,
- ✓ Dos dois poços anteriores e dos dois poços posteriores ao poço em que não se observou multiplicação celular;
- ✓ Todas as incubações foram realizadas *over-night*.

Exceção: foi feita recolha em todas as situações em que devido ao sedimento acumulado (precipitado do próprio extrato) não fosse possível comprovar o desenvolvimento (ou não) de microrganismos.

Após análise das microplacas foi possível determinar a CMI e CMB. A CMI corresponde à menor concentração em que não se observou multiplicação bacteriana, ou seja, o poço a partir do qual não se observou turvação do meio de cultura. A CMB, consiste na concentração mais baixa que elimina/mata os microrganismos. A ausência de multiplicação é visível nas placas de BHI sólido, após incubação.

Em paralelo, e após recolha das alíquotas acima mencionadas, procedeu-se à coloração da microplaca com violeta cristal, tal como anteriormente descrito (ponto 3.3.2)

Este ensaio foi realizado em triplicado (réplicas biológicas), e para cada microrganismo foram realizadas duas réplicas técnicas por microplaca. Todo o procedimento decorreu na câmara de fluxo laminar, de modo a garantir as condições de assépsia, exceto o procedimento de coloração.



Figura 9 – Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para a determinação das CMI e CMB.

A verde estão indicados os controlos de esterilidade, contendo apenas meio de cultura BHI líquido. A laranja está representada *L. monocytogenes* (CECT 934), a azul *P. aeruginosa* e a roxo a mistura destas duas estirpes. Na coluna 12, estão os controlos positivos (multiplicação na ausência de extracto) para cada bactéria e para a mistura bacteriana, que contém meio de cultura BHI líquido e inóculo.

3.4.3 Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB)

De modo a avaliar a capacidade de erradicação de biofilme, por parte dos extratos foi utilizada, com algumas alterações, a metodologia descrita por Ceri et al. (1999). Para obter contacto entre o biofilme formado e os extratos, utilizaram-se tampas com espigões (Nunc Transferable Solid Phases Screening System, Fisher Scientific Inc., Denmark), de acordo com a Figura 10. Estas tampas permitem que o biofilme se forme nos espigões (representado pela cor verde na figura 10), e posteriormente seja mergulhado no extrato a testar, de forma a verificar se o mesmo tem capacidade de erradicar o biofilme. Este ensaio foi realizado em triplicado (réplicas biológicas) para cada temperatura de incubação, e duas réplicas técnicas para cada microrganismo.

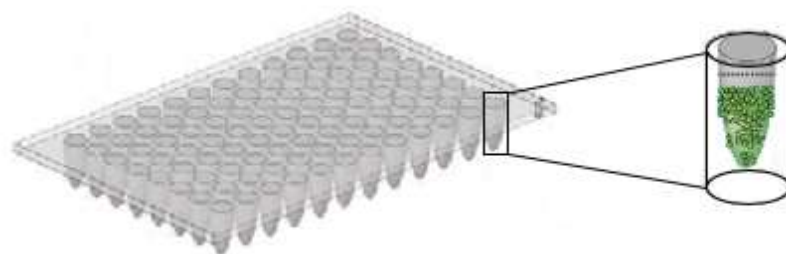


Figura 10 - Esquema representativo da tampa em espigão. O biofilme formado está representado a verde (adaptado de Harrison et al. 2010).

Prepararam-se as suspensões metabolicamente ativas de acordo com o procedimento descrito em 3.3.1. Foram preparadas microplacas de 96 poços, em que se distribuíram 150 µl de BHI líquido efetuando-se de seguida um ciclo de UV com uma duração de 15 minutos, à placa e respetiva tampa na câmara de fluxo laminar, de modo a eliminar possíveis contaminações. De seguida efetuou-se a inoculação, pipetando para os respetivos poços 3 µl da suspensão bacteriana, de acordo com a Figura 11.

As microplacas foram de seguida incubadas a 37 °C durante 24 horas e a 10 °C durante 48 horas, com a respetiva tampa em espigão de modo a permitir a formação de biofilme nos espigões.

No final da incubação foi preparada a microplaca de erradicação. Esta placa continha o extrato aquoso puro e diferentes concentrações do mesmo. Em detalhe a distribuição do extrato ocorreu da seguinte forma: distribuiu-se 150 µl de água estéril da coluna 1 à coluna 6, exceto nos poços B1 a G1. Nestes poços (B1 a G1) adicionou-se 150 µl de extrato de metanol assim como na coluna 2 (B2; C2; D2; E2; F2; G2). Da coluna 2 à coluna 5, efetuou-se diluições seriadas, descartando 150 µl na coluna 5, obtendo-se assim, diferentes concentrações de extrato.

Antes da utilização da placa de erradicação, foi necessário lavar a tampa com os espigões, de modo que estes apenas transportassem o biofilme. Para tal, submergiram-se os espigões, por três vezes numa microplaca de lavagem que continha 150 µl de solução de ringer estéril, passando de seguida a tampa com espigões para a placa de erradicação onde permaneceu durante 1 hora. De seguida, procedeu-se novamente à lavagem numa outra microplaca com 150 µl de solução de ringer, três vezes. Distribuiu-se 150 µl de BHI líquido numa nova microplaca, e colocou-se a tampa com os espigões durante mais 24 horas a 37 °C e 48 horas a 10 °C. Para a determinação da CMEB, é necessária incubação das alíquotas em BHI sólido, referentes aos dois poços anteriores e aos dois poços posteriores ao poço em que não se observou multiplicação microbiana. Assim é possível determinar qual a concentração mais baixa que elimina as bactérias que formaram o biofilme. Todo o procedimento decorreu na câmara de fluxo laminar de modo a garantir as condições de esterilidade.



Figura 11– Esquema ilustrativo da microplaca utilizada no ensaio para determinação da CMEB.

A laranja está representada *L. monocytogenes* (CECT 934), a azul *P. aeruginosa* e a roxo a mistura bacteriana. Os controlos negativos e de esterilidade correspondem à cor verde. Os controlos positivos estão localizados na linha A e H e coluna 6.

3.5 Análise de dados

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme, utilizaram-se os dados obtidos nos três períodos de incubação diferentes (24, 48 e 72 h) e nas diferentes temperaturas de incubação (10 °C e 37 °C). De seguida aplicou-se a fórmula BFI, em que se calculou a média dos três ensaios e das duas réplicas para cada microrganismo e para cada condição a avaliar. A este valor subtraiu-se a média dos controlos de esterilidade, para leituras efetuadas a 580 nm. Para o cálculo do denominador, efetuaram-se os mesmos cálculos dos referidos anteriormente, mas para leituras efetuadas a 620 nm. No ensaio de determinação da CMI e CMB, comparamos a ação

de três extratos vegetais a diferentes concentrações sobre duas culturas puras e uma cultura mista a duas temperaturas distintas. Para os cálculos necessários utilizou-se o software Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versão 2110 Build 16. 0. 14527. 20234) e para a elaboração dos gráficos, recorreu-se ao software livre R (R version 4.0.3).

4. Resultados e discussão

4.1 Extração de compostos bioativos

A atividade laboratorial iniciou-se com a extração de compostos bioativos de diferentes órgãos do medronheiro - *Arbutus unedo*, designadamente raízes, caules, folhas e fruto (recolhidos na Aldeia da Pedralva). Assumindo que a produção destes compostos varia ao longo do ano (Maleš et al. 2006; Maleš et al. 2013), optou-se por efetuar várias colheitas entre junho e dezembro, apenas de medronho (fruto) nos diversos estádios de maturação (imaturo, intermédio e maduro). O restante material vegetal, folhas, raízes e caules foi colhido uma única vez, em junho.

Os medronheiros são caracterizados por uma grande variabilidade genética, morfológica e fenotípica, quer em pontos de colheita próximos quer afastados (Miguel et al. 2014). Num estudo realizado ao longo do nosso País, foram identificados quatro “clusters”. No Algarve foram identificados dois clusters geograficamente próximos, mas que apresentam diferenças genéticas (Figura 12) (Ribeiro et al. 2017).

A presença de alelos diferentes, pode refletir-se ao nível dos quimiótipos e, consequentemente, das propriedades associadas. Este facto poderá influenciar os compostos químicos presentes nos frutos.

Uma comparação entre frutos colhidos em seis locais no centro de Portugal (Fonseca et al. 2015), permitiu observar uma grande variabilidade na fração lipídica.

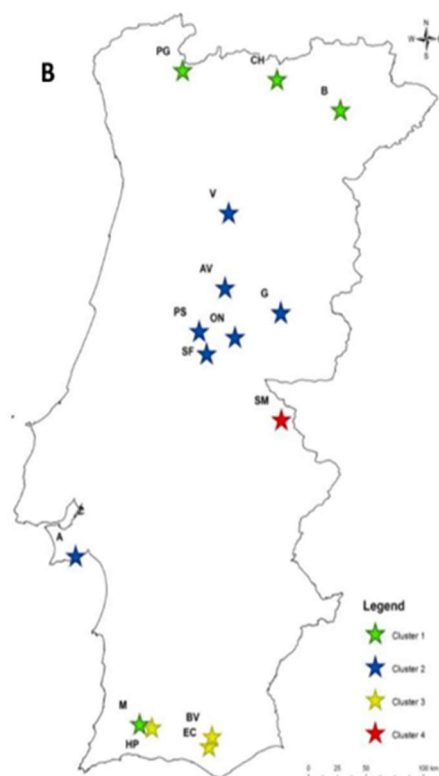


Figura 12 - Clusters identificados em Portugal (adaptado de Ribeiro et al. 2017).

Dada a grande variabilidade da espécie *A. unedo*, e considerando que os metabólitos secundários são uma mistura de diversos compostos com diferentes características e polaridades, utilizaram-se solventes com polaridades distintas, de modo a obter um extrato final representativo dos metabólitos secundários produzidos pela planta em análise. Polaridades diferentes indicam que cada solvente irá extrair compostos distintos.

De facto, existem duas possibilidades a considerar para os solventes utilizados na extração: a utilização de solventes puros ou a sua utilização em solução aquosa. Para as primeiras extrações por nós efetuadas, com o aconselhamento da Professora Doutora Patrícia Rijo, da Universidade Lusófona de Lisboa, recorreu-se à utilização de solventes orgânicos puros (acetona e metanol) e de água. A diversidade de solventes utilizados, prendeu-se com a perigosidade associada a cada solvente e ao facto de apresentarem polaridades diferentes. É ainda importante referir que, de acordo com o método utilizado para a extração de compostos bioativos, o presente estudo assenta sobre extratos de origem vegetal e não óleos essenciais, tal como referido no capítulo 2. Devido à informação descrita por Joshi (2019), que refere que temperatura acima dos 40 °C, destrói as moléculas bioativas, a temperatura do banho na etapa de evaporação foi limitada a 40 °C. A etapa de sonicação foi adicionada de acordo com as indicações referidas por Azmir et al. (2013), indicando que melhora a eficiência e o rendimento da

extração de compostos bioativos, justificando assim a utilização deste recurso e o aumento de mais um período de sonicação, no sentido de otimizar a extração.

Posteriormente introduzimos a camarinheira – *Corema album*, tendo as bagas e respetivas folhas sido recolhidas aleatoriamente no final do mês de julho, no concelho de Aljezur, numa zona em que surgem de forma natural e espontânea.

Para extração dos compostos bioativos presentes nas amostras foram introduzidas algumas alterações ao protocolo (descritas no material e métodos). Utilizou-se um novo solvente, o etanol, e soluções aquosas (1:1) de acetona, etanol e metanol, em detrimento dos solventes puros. O equipamento “rota-vapor” também foi diferente do utilizado anteriormente, sendo que neste último é possível ajustar a pressão ao solvente a utilizar, bem como controlar de forma rigorosa a temperatura do banho. Tal como anteriormente, os frutos foram liofilizados e os restantes elementos das plantas apenas cortados em pequenos pedaços. Seguiu-se a sonicação, a maceração e a evaporação em rota-vapor para eliminação dos solventes orgânicos. Os solventes foram evaporados a baixa pressão, com uma duração de 45 minutos a 1h 15 minutos, dependendo do solvente a evaporar.

Uma vez que o pH exerce ação inibitória sobre o desenvolvimento de microrganismos, principalmente se os valores estiverem próximos de um dos extremos da escala (cada microrganismo apresenta um valor de pH máximo, mínimo e ótimo para multiplicação), considerámos importante registar o valor de pH dos extratos obtidos. Foi descrito por Rivas et al. (2010) que valores baixos de pH aumentam a hidrofobicidade das moléculas bioativas, uma vez que estas moléculas unem-se às zonas hidrofóbicas das proteínas, permitindo que a molécula se dissolva melhor na fase lipídica, inibindo o desenvolvimento bacteriano. Com o aumento do pH a inibição diminui. Assim, no presente trabalho, procedeu-se à medição do valor de pH, através do teste colorimétrico, para o extrato bruto e para as diluições. Por comparação com a escala, o valor de pH obtido foi de 6, para todos os extratos obtidos. Este valor aproxima-se da neutralidade, pelo não deverá exercer muita influência na multiplicação microbiana.

Quanto à estabilidade dos extratos e de acordo com Gyawali & Ibrahim (2014) os compostos bioativos são suscetíveis à oxidação durante o armazenamento, podendo ocorrer alterações na composição funcional, bem como nas propriedades antimicrobianas. A utilização de água como solvente dos compostos bioativos pode aumentar a instabilidade das moléculas e a probabilidade de alterações químicas (Michel & Blanc 2001). No presente estudo o solvente foi água, na impossibilidade de ressuspender os extratos noutra solvente uma vez que não é possível realizar a liofilização dos extratos (como será devidamente explicado de seguida). Durante todo o

trabalho experimental os extratos foram armazenados a temperaturas de refrigeração e ao abrigo da luz, mas a sua alteração ao longo do tempo não pode ser excluída.

4.2 Método de difusão em meio sólido: *screening* inicial

Este ensaio consistiu numa primeira abordagem, para avaliar quais os extratos mais promissores na inibição bacteriana. A eficácia antimicrobiana dos extratos pode ser avaliada pelo diâmetro do halo de inibição formado, uma vez que as moléculas bioativas presentes nos extratos difundem-se no meio de cultura, entrando em contacto com os microrganismos distribuídos uniformemente em toda a placa. Se o microrganismo for suscetível, este não irá crescer junto ao local onde foi colocado o extrato, formando uma zona de inibição variável, que demonstra a sua maior ou menor suscetibilidade aos compostos antimicrobianos. Se o microrganismo não for suscetível, existirá multiplicação microbiana em toda a placa/quadrícula (Faleiro 2007). A inexistência de halos também pode estar associada às limitações deste método, que consistem na fraca difusibilidade das moléculas bioativas no meio de cultura devido às características hidrofóbicas, e à sua volatilidade. É, no entanto, um método simples e muito utilizado, de baixo custo, em que os resultados são fáceis de interpretar (Balouiri et al. 2016).

É ainda importante referir que a escolha dos microrganismos para o presente estudo teve como princípio criar uma amostra representativa de bactérias comumente associadas a alimentos. Assim, foram selecionados microrganismos patogénicos, deteriorativos e com interesse tecnológico, englobando tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas.

O protocolo utilizado para este *screening* inicial está de acordo com a metodologia apresentada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, com algumas adaptações, visto que as diretrizes estão direcionadas para a análise de antibióticos e não de óleos essenciais ou extratos de origem natural (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012). Em substituição dos discos de papel de filtro impregnados no composto em análise, optámos por colocar 5 µl de cada extrato (bruto, ie, sem diluição) sobre a superfície do meio de cultura sólido.

Nos primeiros ensaios realizados com solventes puros, não se observou qualquer efeito inibitório sobre os microrganismos indicadores (*E. faecalis*, *L. monocytogenes* (CECT 911) *L. monocytogenes* (CECT 934), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (PAOI), *E. coli*, *S. enterica* (CECT 4300) e *A. hydrophila*. A posteriori percebemos que esse facto poderá ter estado relacionado com a liofilização do extrato após evaporação dos solventes.

A liofilização é considerada como uma etapa importante na conservação e concentração de amostras. No entanto, no decorrer do trabalho prático deparámo-nos com o facto de a liofilização “eliminar ou alterar” os compostos bioativos. De acordo com os autores Dai & Mumper (2010) a liofilização pode causar efeitos indesejáveis nos compostos presentes nas amostras. Já, de Torres et al. (2010) comparou diversos compostos presentes na película externa das uvas após a liofilização e a secagem em estufa e concluiu que a liofilização mantinha a composição dos compostos químicos estudados, considerando-a como uma boa opção para a indústria alimentar. Dos diversos investigadores contactados, nomeadamente Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo, Professora Doutora Susana Alves, Professora Doutora Aida Moreira da Silva e Professora Doutora Maria João Barroca, nenhum referiu conhecer alterações associadas a este processo. Esta condição foi identificada acidentalmente, uma vez que sem evaporação dos solventes, obtivemos zonas sem multiplicação bacteriana (ação inibitória). Após evaporação e liofilização, observámos que os halos detetados inicialmente tinham “desaparecido”. No sentido de identificar a causa desta alteração nos extratos, estes foram testados, após a evaporação e após a liofilização.

Como forma de eliminar possíveis falhas no liofilizador utilizado na FMV, várias alíquotas foram liofilizadas no aparelho da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Os resultados obtidos foram a perda de inibição, independentemente do equipamento utilizado, como é possível verificar na Figura 13.

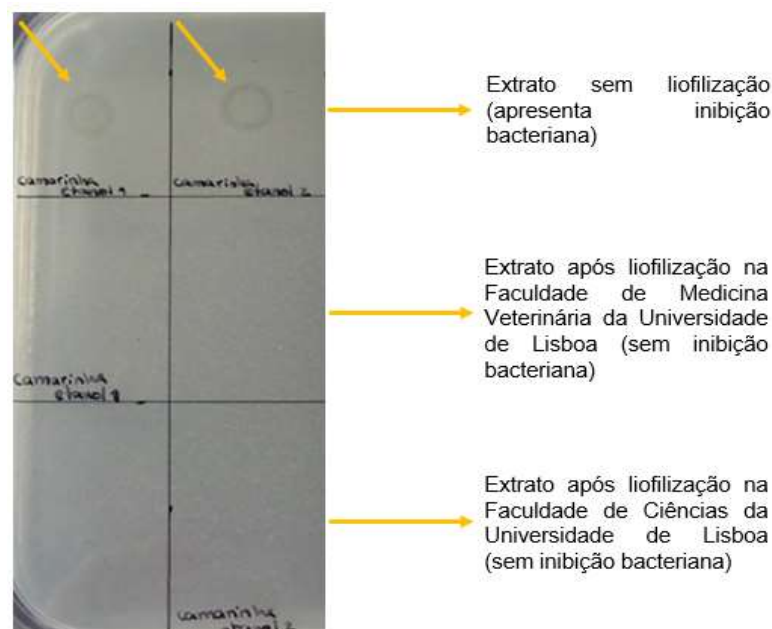


Figura 13 – Comparação dos halos de inibição formados antes e após liofilização, utilizando aparelhos distintos, na FMV e FCUL (exemplo).

Por este motivo a liofilização foi eliminada do procedimento na fase final da extração, bem como a ressuspensão em DMSO. Este processo foi utilizado apenas nos frutos, logo no início do processo de extração. Devido a constrangimentos de tempo, decidimos avançar apenas com os extratos que apresentaram inibição. Assim, não é possível afirmar, se a liofilização inicial dos frutos, terá logo à partida, eliminado ou alterado alguns compostos bioativos que teriam um potencial antibacteriano.

Com base nas questões referidas anteriormente e com o trabalho desenvolvido apenas se obtiveram halos de inibição para os extratos obtidos a partir das folhas do medronheiro, com recurso às diferentes soluções de extração. Os extratos obtidos do fruto e extratos em que apenas se adicionou água, não apresentam inibição, sendo excluídos dos ensaios posteriores deste estudo. Os resultados obtidos no teste de difusão em agar para os extratos das folhas do medronheiro, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Diâmetro dos halos para os extratos obtidos a partir das folhas do medronheiro (em mm).

Microrganismos		água:acetona	água:etanol	água:metanol
Gram negativas	<i>A. hydrophila</i>	10	9	9
	<i>E. coli</i>	9	9	9
	<i>P. aeruginosa</i>	13	10	12
	<i>S. enterica</i>	11	9	11
Gram positivas	<i>B. cereus</i>	9	10	7
	<i>E. faecalis</i>	9	9	9
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 911)	7	10	8
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	10	10	10
	<i>S. aureus</i>	9	9	9

As bactérias Gram negativas apresentam maior suscetibilidade aos extratos, nomeadamente *P. aeruginosa*. Das bactérias em estudo, *L. monocytogenes* (CECT 911) e *B. cereus* apresentaram menor suscetibilidade. O extrato que registou maior efeito antibacteriano sobre as bactérias Gram negativas, foi o extrato água:acetona. No grupo das bactérias Gram positivas, o extrato água:etanol.

De modo a comparar os resultados obtidos com trabalhos publicados, organizou-se a informação, recolhida após pesquisa bibliográfica, na Tabela 3.

Tabela 3 – Compilação de resultados obtidos por outros autores (halos em mm).

	Microrganismos	Zona de colheita	Parte da planta	Tipo de extrato	Dimensão da zona de inibição	Referência bibliográfica
Gram negativas	<i>E. coli</i> (K12 MBLA)	Marrocos	Folhas	Metanol Etanol	12 9	(Bouyahya et al. 2016)
		Turquia	Folhas	Aquoso	Sem inibição	(Orak et al. 2011)
		Argélia	Raízes	Aquoso Metanol	30 15	(Dib et al. 2013)
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Croácia	Folhas	Aquoso Metanol	Sem inibição	(Jurica et al. 2017)
		Sérvia	Folhas	Etanol	15	(Pavlović et al. 2014)
		Marrocos	Folhas	Metanol Etanol	13 Sem inibição	(Bouyahya et al. 2016)
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Sérvia	Folhas	Etanol	Sem inibição	(Pavlović et al. 2014)
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Croácia	Folhas	Aquoso Metanol	10 22	(Jurica et al. 2017)
		Argélia	Raízes	Aquoso Metanol	9 Sem inibição	(Dib et al. 2013)
Gram positivas	<i>B. cereus</i> (ATCC11771)	Covilhã	Folhas	Acetona/água (60:40)	10.0	(Ferreira et al. 2012; Miguel et al. 2014)
				Etanol 95%	11.3	
				Metanol (Soxhlet)	10.0	
				Metanol (maceração)	10.7	(Ferreira et al. 2012; Miguel et al. 2014)
				Etanol (maceração)	9.3	
				Acetona/água (60:40)	8.0	
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	Covilhã	Folhas	Etanol 95%	6.5	(Ferreira et al. 2012; Miguel et al. 2014)
				Metanol (Soxhlet)	7.0	
				Metanol (maceração)	7.3	
				Etanol (maceração)	7.3	(Jurica et al. 2017)
				Aquoso	Sem inibição	
				Metanol	8.0	
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 4032 4B)	Marrocos	Folhas	Metanol	27	(Bouyahya et al. 2016)
				Etanol	41	
		Argélia	Raízes	Aquoso	12	(Dib et al. 2013)
				Metanol	11	
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Turquia	Folhas	Aquoso	10.5 (10µl/disc)	(Orak et al. 2011)
					13.8 (20µl/disc)	
					21.1 (40µl/disc)	

			Acetona/água (60:40)	9.3	(Ferreira et al. 2012;
			Etanol 95%	12.0	Miguel et al. 2014)
	Covilhã	Folhas	Metanol (maceração)	9.3	
			Etanol (maceração)		
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	Sérvia	Folhas	Etanol	Sem inibição	(Pavlović et al. 2014)
<i>S. aureus</i> (CECT 976)	Marrocos	Folhas	Metanol	14	(Bouyahya et al. 2016)
			Etanol	17	

Após análise da Tabela 3, constatou-se que os extratos obtidos pelos diversos autores apresentaram inibição bacteriana sobre algumas das espécies bacterianas utilizadas no presente estudo. *E. coli*, apresentou um halo com dimensão semelhante ao obtido no estudo aqui apresentado. Os extratos aquosos não conseguiram inibir *E. coli*, situação idêntica à que ocorreu nos ensaios por nós realizados. O único extrato que difere é o extrato metanol com origem na Croácia, em que o referido extrato não demonstrou atividade antibacteriana, contrariamente ao nosso. Para *P. aeruginosa*, os extratos de etanol, não demonstraram capacidade inibitória, situação contrária aos resultados apresentados, uma vez que o extrato de água:etanol conseguiu inibir a multiplicação bacteriana. O extrato aquoso obtido através das folhas do medronheiro, com ponto de recolha na Croácia, demonstrou capacidade de inibir *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o contrário, ou seja, os extratos não apresentaram efeito inibitório.

Para o grupo das bactérias Gram positivas, *B. cereus*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*, os extratos produzidos com solventes orgânicos demonstraram inibição bacteriana, resultado coincidente com os dados obtidos no ensaio. O extrato aquoso não demonstrou inibir *E. faecalis*, apresentando assim um resultado semelhante ao obtido. *S. aureus* apresentou suscetibilidade aos extratos aquosos, o que contraria os resultados aqui apresentados. No entanto para extratos obtidos por solventes orgânicos, a inibição confirma-se. O extrato de folhas à base de etanol, colhido na Sérvia contradiz com os resultados apresentados.

Para análise da Tabela 3, devemos ter em conta que a comparação dos dados obtidos pelos diversos autores com os dados recolhidos no presente estudo, deve ser feita de forma cautelosa, visto que, as estirpes, os métodos de extração, o ponto de recolha e a grande variabilidade da espécie pode resultar numa enorme diversidade de fatores. A discrepância de resultados nos extratos de folhas (presença ou ausência de inibição e dimensão dos halos), pode ser justificada pelas recolhas em pontos geográficos diferentes, que estão sujeitos a condições climáticas diferentes, tipo de solo,

estágio de desenvolvimento das plantas diferente, dando origem à produção de metabolitos secundários distintos (Maleš et al. 2006).

A ausência de publicações relativas ao efeito antimicrobiano de moléculas bioativas extraídas dos frutos, poderá indicar que estes órgãos da planta não contêm moléculas bioativas, possivelmente por não possuírem estruturas de produção e armazenamento de metabólitos secundários.

De acordo com a revisão bibliográfica efetuada, as bactérias Gram positivas normalmente são mais suscetíveis comparativamente às bacterias Gram negativas (Khorshidian et al. 2018). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo indicaram que as bactérias Gram negativas foram mais suscetíveis aos extratos testados, quando comparadas com as Gram positivas, ou seja, o contrário do expectável. O que pode estar relacionado com o facto de a parede das bactérias Gram negativas permitir a passagem de alguns compostos, não sendo totalmente impermeável (Khorshidian et al. 2018).

Relativamente a *Corema album*, foi igualmente realizado este ensaio inicial (difusão em meio sólido) com o objetivo de determinar quais os extratos que apresentavam um efeito inibitório nos microrganismos em estudo. Os resultados obtidos nesta primeira triagem indicaram que, os extratos de frutos e os extratos obtidos recorrendo apenas à adição de água não apresentaram inibição microbiana, tendo sido excluídos dos ensaios posteriores.

Após observação das placas de BHI sólido e medição dos halos formados, foi possível reunir na Tabela 4, os diâmetros observados para cada extrato e bactéria.

Tabela 4 – Média do diâmetro dos halos para os extratos obtidos a partir das folhas da camarinheira (em mm).

Microrganismos		água:acetona	água:etanol	água:metanol
Gram negativas	<i>A. hydrophila</i>	9	9	8
	<i>E. coli</i>	7	7	7
	<i>P. aeruginosa</i>	6	7	7
	<i>S. enterica</i>	8	7	7
Gram positivas	<i>B. cereus</i>	9	9	9
	<i>E. faecalis</i>	9	10	9
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 911)	9	10	9
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	9	9	9
	<i>S. aureus</i>	8	9	9

De um modo geral, as bactérias Gram positivas apresentaram maior suscetibilidade comparativamente às Gram negativas. As Gram negativas apresentam

um conjunto de estruturas que as protege, como a membrana externa junto à parede celular, que impede a difusão de diferentes compostos, e a presença de enzimas no espaço periplasmático que podem degradar algumas moléculas (Klančnik et al. 2010).

No grupo das bactérias Gram negativas, *A. hydrophila*, será a bactéria mais suscetível, e no grupo das Gram positivas, *E. faecalis* e *L. monocytogenes* (CECT 911), podem ser consideradas como as bactérias mais suscetíveis, embora entre os dois grupos não existam diferenças consideráveis.

Relativamente às bactérias Gram negativas não é possível identificar um extrato que demonstre maior efeito antibacteriano, uma vez que em média as dimensões dos halos são idênticas. No grupo das Gram positivas, o extrato que demonstrou maior efeito antibacteriano foi o obtido com a mistura água:etanol.

Embora todos os extratos de folhas tenham mostrado atividade antimicrobiana, a resposta de cada bactéria testada foi diferente, o que leva a considerar que os extratos testados têm composição química diferente e locais de ação distintos.

A Universidade de Coimbra desenvolveu alguns estudos no sentido de determinar as propriedades antimicrobianas da camarinheira. Para a extração utilizaram solventes orgânicos puros, liofilizaram os extratos e ressuspenderam-nos em DMSO. Dos extratos obtidos, o único que demonstrou atividade antimicrobiana foi o extrato da camarinha (fruto). O extrato de folhas não demonstrou qualquer atividade antimicrobiana (unpublished results). Estes resultados, à semelhança, dos resultados relativos ao medronheiro, podem estar relacionados com o facto de o local de colheita das camarinhas ter sido diferente (Praia de Mira) daquele em que foram colhidas as nossas amostras, o que terá influenciado a produção de metabólitos secundários.

É ainda importante referir que a identificação dos compostos bioativos presentes nos extratos da camarinheira e medronheiro não foram efetuados, embora esta identificação estivesse planeada, que devido à pandemia acabou por não se concretizar. Os extratos têm na sua composição uma enorme diversidade de compostos químicos com inúmeras atividades biológicas, tornando importante a sua identificação. Esse estudo seria realizado no âmbito de uma parceria com a Faculdade de Ciências de Lisboa, e teria a importância de identificar quais os compostos, a sua concentração e possíveis efeitos entre eles.

Como considerações futuras é ainda importante sugerir: (1) Efetuar recolha de amostras de *Arbutus unedo* e de *Corema album* em diversos pontos geográficos; (2) Caracterizar quimicamente os extratos sujeitos a liofilização e os não sujeitos a liofilização obtidos dos diferentes pontos geográficos; (3) Comparar a atividade antimicrobiana dos diversos extratos obtidos.

4.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

As doenças veiculadas por alimentos abrangem uma ampla gama de agentes, que em alguma etapa do processo contaminaram os alimentos ou a água (Srey et al. 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças transmitidas por alimentos são consideradas um problema emergente de saúde pública (Srey et al. 2013). Alguns destes surtos estão associados a biofilmes (Srey et al. 2013), sendo estas estruturas reconhecidas como fonte de contaminação em ambientes de processamento alimentar. Os biofilmes têm a capacidade de resistir a agressões externas, designadamente desinfetantes, representando um sério problema nesta indústria (Srey et al. 2013).

O ensaio para avaliação da capacidade de formação de biofilmes foi realizado em microplacas de 96 poços, em que o biofilme foi quantificado através da técnica colorimétrica – Cristal violeta, que vai corar a biomassa presente, não fornecendo informação sobre o número de células viáveis (Lin et al. 2017).

Este ensaio teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme perante dois fatores: temperatura, 10 e 37 °C e tempo de incubação, 24, 48 e 72h, de modo a inferir acerca da dinâmica de formação de biofilme das estirpes em análise. A quantificação de biofilme foi realizada a cada 24 horas, através da leitura da densidade ótica (absorvância).

Na indústria alimentar as temperaturas podem variar bastante. -18 °C para produtos congelados, até temperaturas acima de 100 °C para a esterilização. A temperatura de 10 °C foi escolhida para os ensaios, uma vez que está relacionada com as condições existentes na indústria alimentar, onde a cadeia de frio é indispensável e não pode ser quebrada seja na laboração, no transporte ou no armazenamento. A temperatura de 37 °C foi incluída por representar a temperatura corporal normal e temperatura ótima de multiplicação para os microrganismos patogénicos humanos.

Para a classificação das bactérias relativamente à sua capacidade de formação de biofilme, aplicou-se a fórmula descrita anteriormente no ponto 3.3.2., sendo BFI (Biofilm formation index) uma correlação entre a biomassa bacteriana e a produção de biofilme, constituindo um indicador de maior ou menor produção de biofilme. Para o cálculo de BFI, calculou-se a média dos três ensaios e das duas réplicas para cada microrganismo a avaliar, e para cada condição testada. A este valor subtraiu-se a média dos controlos de esterilidade, para a condição a avaliar. Para o cálculo do denominador, efetuaram-se os mesmos cálculos dos referidos anteriormente, mas para leituras efetuadas a 620 nm.

Assim, a capacidade de formar biofilmes foi avaliada para os 9 isolados e expressa como BFI, com base nos critérios propostos por Lucero-Mejía et al. (2020). A

Tabela 5, apresenta as respectivas classificações de acordo com a temperatura de incubação.

Tabela 5 – Classificação de acordo com o valor de BFI da capacidade de formação de biofilme das bactérias testadas.

	Microrganismos	BFI a 10 °C	Classificação	BFI a 37 °C	Classificação
Gram negativas	<i>A. hydrophila</i> (A259)	0	Não produtora	0,06	Não produtora
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,09	Não produtora	0,03	Não produtora
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	1,28	Forte produtora	0,17	Não produtora
	<i>S. enterica</i> (CECT 4300)	0,13	Não produtora	0,12	Não produtora
Gram positivas	<i>B. cereus</i>	0,12	Não produtora	1,35	Forte produtora
	<i>E. faecalis</i> (V583)	0,04	Não produtora	0,06	Não produtora
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 911)	0,03	Não produtora	1,12	Forte produtora
	<i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	0,17	Não produtora	1,29	Forte produtora
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0,04	Não produtora	0,17	Não produtora

Escala: BFI < 0,35 bactéria não produtora de biofilme; BFI entre 0,35 e 0,69 bactéria fraca produtora de biofilme; BFI entre 0,70 e 1,09 bactéria moderada na produção de biofilme; BFI > 1,10 bactéria forte produtora de biofilme.

Após 72 horas de incubação, a 10 °C, 88,88% (8) dos isolados testados foram considerados como não produtores de biofilmes, existindo apenas 11,11% (1) fortes produtores de biofilme. A 37 °C, 66,66% (6) dos isolados continuaram com a classificação não produtores de biofilme, e 33,33% (3) foram classificados como fortes produtores de biofilmes (Tabela 5). De modo geral, e principalmente as bactérias Gram positivas aumentaram a capacidade de formar biofilme com o aumento da temperatura, o que coincide com Tilahun et al. (2016), que indica que a temperatura ótima de um microrganismo, neste caso 37 °C, está associada a um aumento da ingestão de nutrientes, resultando na multiplicação das populações e na formação rápida de biofilme.

Iniciando a análise mais detalhada, pelas bactérias Gram negativas, a única que demonstrou capacidade para formar biofilme, foi *P. aeruginosa*. Esta bactéria apresenta capacidade de formar biofilme a 10 °C, no entanto a 37°C a sua capacidade de formar biofilme diminuiu. Kim et al. (2020) indica que a formação de biofilme por *P. aeruginosa* aumenta a temperatura inferior a 25 °C. Neste estudo foi testada a capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* entre os 20 °C e os 37 °C, concluindo que a

biomassa total aumentou a 20 °C em comparação com as restantes temperaturas testadas. Acima de 25 °C, a produção de biofilme volta a aumentar, a um ritmo lento, formando biofilmes pouco estruturados, demonstrando que tanto a quantidade como a estrutura do biofilme são afetados pela temperatura. A conclusão anteriormente descrita difere em parte dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a 37 °C não se detetou formação de biofilme, no entanto com a diminuição da temperatura a produção de biofilme por *P. aeruginosa* aumentou. Uma vez que a 37 °C não existiu produção de biofilme, esta condição poderá resultar do esgotamento de nutrientes disponíveis no meio de cultura, ou a utilização da matriz como recurso alternativo para a obtenção de nutrientes para sobrevivência, reduzindo a matriz corada e consequentemente diminuindo o valor da absorvância obtido. Outra possibilidade para a discrepância de resultados é o facto de Castro et al. (2021), indicarem que entre 35 a 37° C num período de aproximadamente 3 h, é possível a adesão e formação de biofilme. Uma vez que o ensaio decorreu por um período de 72 horas, permitindo a adesão e dispersão de diversos ciclos de formação de biofilme que no decorrer do procedimento de coloração, principalmente no momento da lavagem da microplaca, grande parte da matriz ter-se-á perdido, diminuindo o valor da absorvância.

De acordo com os valores obtidos para o indicador BFI, *A. hydrophila*; *E. coli*; *S. enterica*, não demonstraram capacidade de formação de biofilme a qualquer uma das temperaturas em estudo. De acordo com os estudos efetuados por Mizan et al., (2018), a produção de biofilme pelos isolados de *A. hydrophila* apresentou um aumento significativo a temperaturas entre 20 a 25 °C, diminuindo acima de 25 °C (30, 35 e 37 °C) e abaixo de 20 °C. Já o estudo publicado por Nagar et al., (2017) indica que a maioria dos isolados de *A. hydrophila*, apresentaram capacidade de formação de biofilme a 10 °C e a 37 °C. Estes autores referem ainda que a temperatura ideal para a multiplicação bacteriana (28 °C) pode não ser ideal para a adesão celular uma vez que a temperatura afeta as propriedades das bactérias, alterando a sua capacidade de aderir às superfícies. Os resultados descritos são contrários aos resultados obtidos.

Ma et al., (2019) compararam a formação de biofilme de várias estirpes de *E. coli* a 13 e 22 °C, indicando que a 13 °C as estirpes de *E. coli* reduziram drasticamente a formação de biofilme comparativamente a 22 °C. A fraca formação de biofilme a 13 °C poderá estar relacionada com o lento crescimento das bactérias a baixas temperaturas resultando em fracos biofilmes, ou pelo facto de a produção das fímbrias de *E. coli* estar dependente da temperatura, não existindo a produção destes filamentos a baixas temperaturas, dificultando a aderência das bactérias às superfícies. Também Nesse et al., (2014) descrevem que os isolados de *E. coli* demonstraram capacidade de produzir

biofilme a 12, 20 e 37 °C, não coincidindo assim os resultados publicados com os resultados obtidos neste estudo.

Os resultados apresentados por Roy et al., (2021) sobre a capacidade de formação de biofilme de *S. enterica* a 4, 10, 25, 37 e 42 °C, indica que não houve formação de biofilme a temperaturas mais baixas (4 e 10 °C), sugerindo que o intervalo de temperatura em que se forma biofilme é 25 a 42 °C. Os resultados descritos no referido estudo coincidem com os obtidos neste estudo para a temperatura mais baixa, no entanto para 37 °C, os resultados diferem.

No grupo das Gram positivas, *E. faecalis*, foi classificada como não produtora, uma vez que não conseguiu produzir biofilme, independentemente da temperatura. De acordo com os autores Chajęcka-Wierżchowska et al. (2016) que estudaram a capacidade de formação de biofilmes de isolados de *E. faecalis*, os dados obtidos indicaram que nenhum dos isolados apresentou forte capacidade de formar biofilme, apenas dois isolados apresentaram capacidade moderada de produção de biofilme e treze isolados apresentaram fraca capacidade de produzir biofilme a 37 °C com um período de incubação de 24 h. Os resultados destes autores são semelhantes aos resultados obtidos a 37 °C no presente estudo. No trabalho desenvolvido por Marinho et al. (2013) em que 65 isolados de *Enterococcus* resistentes a antibióticos foram sujeitos a quatro temperaturas diferentes (10 °C, 28 °C, 37 °C e 45 °C) por um período de incubação de 18 h, 80% dos isolados não apresentaram capacidade de formar biofilme, restando apenas 20% que demonstraram capacidade de formar biofilme a 10 °C, sendo classificados como fracos produtores de biofilmes. A 37 °C, a temperatura ideal para *Enterococcus*, 50,8% dos isolados apresentaram capacidade de formar biofilme, sendo estes isolados classificados como fracos produtores, 26,2% como isolados de produção moderada e 12,3% como fortes produtores de biofilme. 20,8 % não apresentam capacidade de formar biofilme (Marinho et al. 2013). Os resultados obtidos aproximam-se dos resultados descritos nos dois estudos anteriormente referidos, uma vez que em ambos os artigos ou não existiu produção ou os isolados foram maioritariamente classificados como fracos produtores de biofilme.

O mesmo ocorreu com *S. aureus*, embora a 37 °C o valor de BFI seja ligeiramente superior, manteve-se a classificação de não produtora tanto a 10 como a 37 °C. Chen et al. (2020) testou a capacidade de formação de biofilmes de 97 isolados de *S. aureus*, em que apenas 70 produziram biofilme. Destes 70 isolados, 55 % foram classificados como fracos produtores de biofilmes a 37 °C, 14 % foram classificados como moderados produtores de biofilmes e 3 % como fortes produtores de biofilmes, ou seja, na sua maioria os isolados não demonstraram capacidade de produzir biofilme a

37 °C. A descrição efetuada por Thiran et al. (2018) também para uma temperatura de 37 °C descrevem que 54 % dos isolados não demonstraram capacidade de formar biofilme e 46 % demonstraram fraca capacidade de formar biofilme, coincidindo com os resultados descritos neste trabalho a 37 °C. Informações contrárias podem ser encontradas nos diversos artigos publicados. Esta discrepância pode estar relacionada com as condições experimentais utilizadas pelos diversos grupos de investigação. No trabalho de investigação de Di Ciccio et al. (2015) que foram utilizados 67 isolados incubados a 12 e 37 °C durante 72 horas, os resultados descrevem uma maior capacidade de formação de biofilme a 37 °C comparativamente aos resultados obtidos a 12 °C, embora neste estudo não tenham classificado os isolados com escala semelhante à utilizada, houve produção de biofilme, situação que não ocorreu no presente estudo. De Souza et al. (2014) também refere uma maior formação de biofilme a 28 °C comparativamente a 7 °C, para *S. aureus*.

B. cereus a 10 °C, não demonstrou capacidade de produzir biofilme, mas a 37 °C foi classificado como forte produtor de biofilme. Wijman et al. (2007), descreve que apenas algumas estirpes desta espécie demonstram capacidade de formar biofilme em microplacas de poliestireno. Os autores Wijman et al. (2007), descrevem a capacidade de um isolado de *B. cereus* para formar biofilme a 37 °C, o que corresponde ao resultado obtido no presente estudo. Os resultados apresentados por Park et al. (2020), vêm reforçar os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que os autores referem que o crescimento da maioria dos isolados de *B. cereus* é geralmente inibido quando a temperatura está abaixo de 10 °C e é classificado como forte produtor de biofilme a 30 °C. Independentemente da classificação dada a *B. cereus* na sua produção de biofilme a baixas temperaturas, Kumari and Sarkar (2014) descrevem a formação de biofilme por *B. cereus* num tanque de armazenamento de leite pasteurizado a 4 °C.

A última bactéria em análise no grupo das Gram positivas é *L. monocytogenes*, que aumentou a classificação enquanto formadora de biofilme, o que era expetável, uma vez que aumentamos a temperatura para a sua temperatura ótima de multiplicação. Segundo os resultados apresentados por Di Bonaventura et al. (2008) *L. monocytogenes* é capaz de aderir e formar biofilmes em poliestireno, independentemente da temperatura testada (4, 12, 22 e 37 °C), apresentando uma maior produção de biofilmes a 37 °C, o que vem confirmar os resultados obtidos. Resultados semelhantes foram publicados por Tomicic et al. (2016).

Uma vez que entre as Gram positivas analisadas estão incluídas duas estirpes de *Listeria monocytogenes*, optámos por fazer uma análise mais detalhada ao seu comportamento às duas temperaturas em estudo.

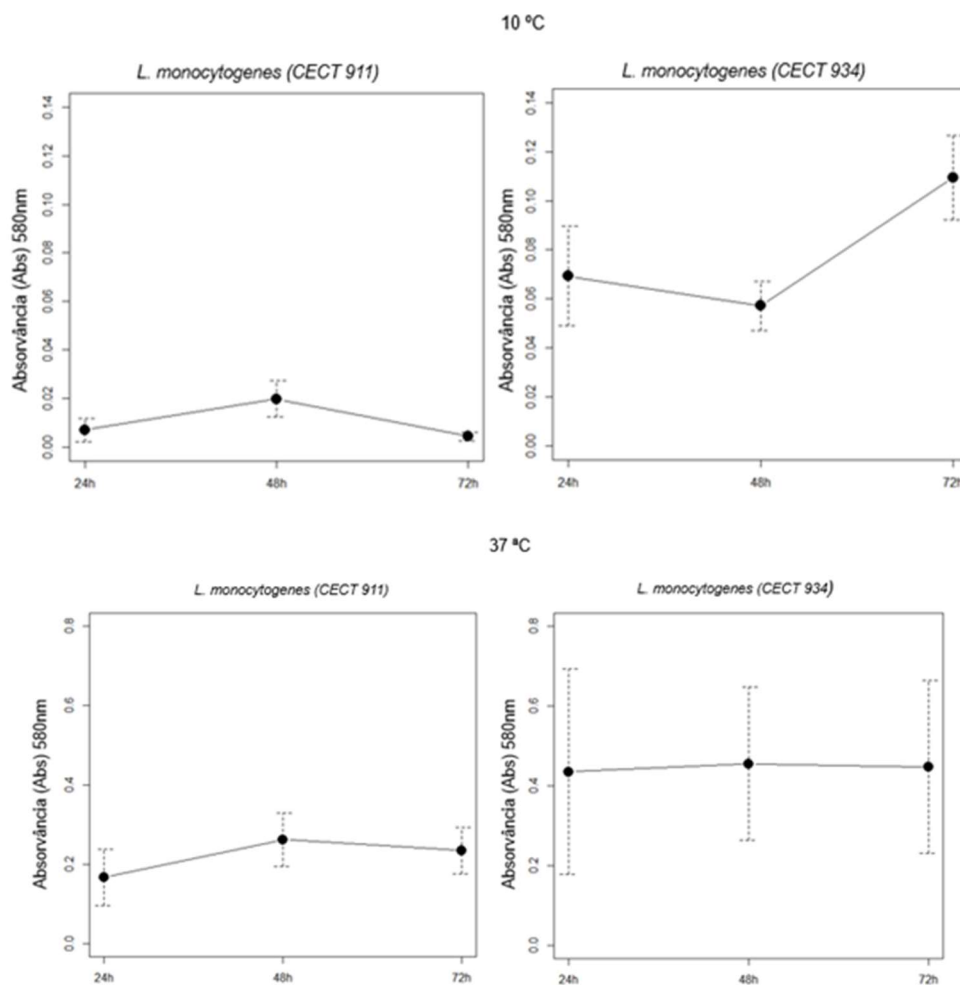


Figura 14– Comparação entre a formação de biofilme de *L. monocytogenes* a 10 e a 37 °C. (Para a elaboração dos gráficos, recorreu-se ao software livre R (R version 4.0.3))

Os gráficos apresentados na Figura 14, mostram o comportamento de *L. monocytogenes* pertencentes a dois serótipos diferentes, quando comparadas reparamos que, embora da mesma espécie, têm dinâmicas de produção de biofilme diferentes, a 10 °C e a 37 °C. Os trabalhos de investigação que tentaram encontrar uma correlação entre os serótipos de *L. monocytogenes* e a sua capacidade de formação de biofilme não conseguiram demonstrar qualquer correlação, existindo até resultados contraditórios ou inconclusivos (Borucki et al. 2003). Doijad et al. (2015) também não observaram qualquer relação entre os serótipos e a capacidade de formação de biofilme, afirmando os autores que dos 98 serotipos diferentes testados, nenhum foi predominante para a capacidade de formação de biofilme.

Em relação à capacidade de produção de biofilme a duas temperaturas distintas, a 10 °C independentemente do serótipo, a classificação foi de não produtora e a 37 °C a classificação foi de forte produtora. Doijad et al. (2015) testou 98 isolados a 37 °C durante 24 h, 62 (63,26%) isolados foram classificados como fracos formadores de

biofilme ou não formadores, 27 (27,55%) moderados formadores de biofilme e 9 (9,18%) eram fortes formadores de biofilme.

Através da observação da Figura 14, é também possível perceber que a *L. monocytogenes* (CECT 934) a 10 °C, consegue crescer e formar mais biofilme comparativamente com *L. monocytogenes* (CECT 911). Pela análise gráfica, *L. monocytogenes* (CECT 934), esta estirpe a 10 °C inicia a fase de dispersão às 24 h, enquanto *L. monocytogenes* (CECT 911), inicia às 48 h, ou seja, a 10 °C podemos observar o início e fim de um ciclo de formação de biofilme, situação que não ocorre a 37 °C, em que para ambas as estirpes, o biofilme formado, manteve-se nas fases de crescimento e maturação, não chegando à fase de dispersão. Mesmo à temperatura ótima de multiplicação, é possível observar esta diferença entre as estirpes na dinâmica de formação de biofilmes, em que a estirpe *L. monocytogenes* (CECT 934) formou mais biofilme (Figura 14).

Comparando com isolados de outros gêneros bacterianos, na Figura 15, é possível verificar que a 10 °C, *L. monocytogenes* (CECT 934) apresenta valores de absorvância superior, comparativamente a *B. cereus*.

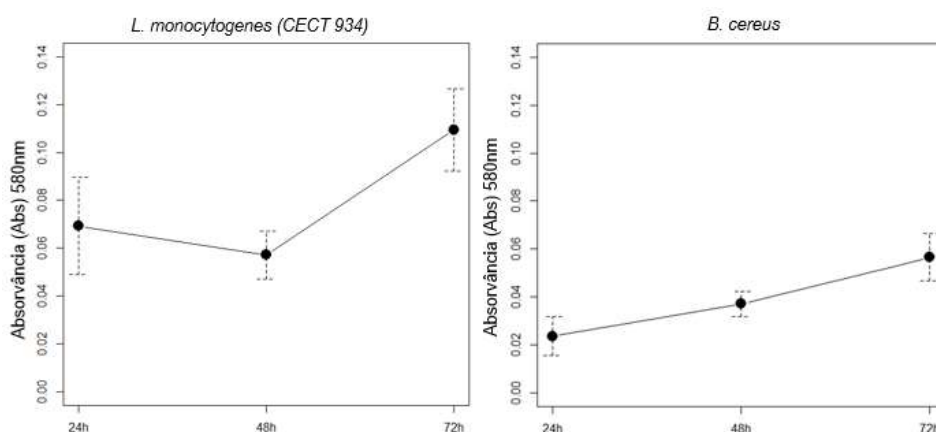


Figura 15 - Gráfico de formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *B. cereus* a 10 °C.
(Para a elaboração dos gráficos, recorreu-se ao software livre R (R version 4.0.3))

A 10 °C *L. monocytogenes* (CECT 934), consegue multiplicar-se, uma vez que é classificada como psicrotrófila devido à sua capacidade de sobreviver em ambientes com temperaturas entre 0 a 50 °C (Mazaheri et al. 2021), sendo possível que consiga a esta temperatura concluir e iniciar ciclos de formação de biofilme. Esta capacidade de multiplicação, contribui para a persistência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento alimentar, o que representa um perigo permanente de contaminação dos gêneros alimentícios (Mazaheri et al. 2021), estando associada a diversos surtos em alimentos (Matle et al. 2020).

A 37 °C, temperatura ótima de multiplicação de *B. cereus* este apresenta um comportamento semelhante ao descrito no gráfico anterior (Figura 16). Em concordância com algumas estirpes de *B. cereus* que conseguem formar biofilme entre 24 a 48 h, a 30 °C, em que a sua dispersão pode ocorrer nas 24 ou 48 h seguintes, que também coincide com a informação descrita, em que a partir das 24 - 48 h indicadas no gráfico iniciou-se um novo ciclo de formação de biofilme (Wijman et al. 2007).

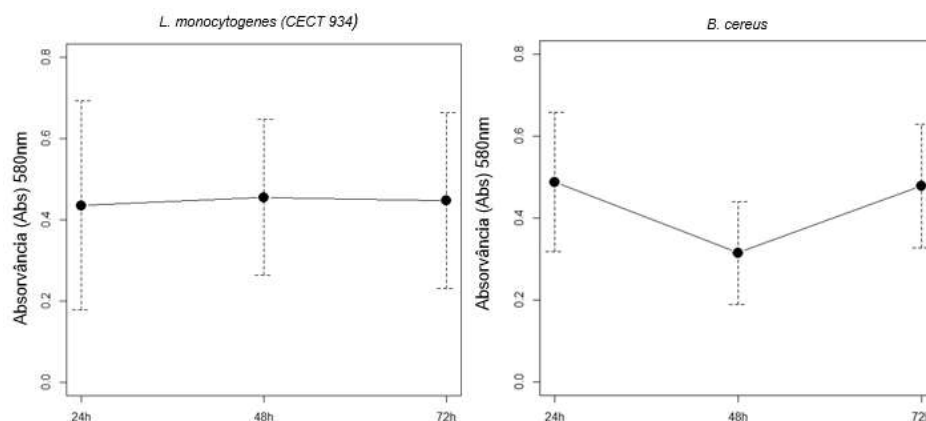


Figura 16 - Gráfico de formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *B. cereus* a 37 °C. (Para a elaboração dos gráficos, recorreu-se ao software livre R (R version 4.0.3))

L. monocytogenes (CECT 934), também está na sua temperatura ótima de multiplicação (37 °C), no entanto manteve valores de absorvância constantes ao longo de todo o ensaio, o que pode indicar, de acordo com análise gráfica descrita por (Lucero-Mejía et al. 2020) que esta bactéria formou o biofilme que se manteve durante o ensaio, possivelmente não chegando à fase de dispersão, que graficamente corresponderia a uma diminuição dos valores de absorvância.

Nos ensaios em que se pretende estudar a formação de biofilmes, um dos principais obstáculos na quantificação é o facto de o seu desenvolvimento consistir num processo com inúmeras variáveis (meio de cultura, temperatura, tempo de incubação, material utilizado no desenvolvimento de biofilme) (Roberto et al. 2020). A produção pode assumir infinitas direções, raramente resultando em cópias exatas, mesmo que as condições experimentais sejam mantidas (Heydorn et al. 2000), o que pode explicar a discrepância apresentada em alguns dos casos descritos.

Adicionalmente, os resultados acima expostos, relativos à capacidade de produção de biofilme a duas temperaturas, serviram de base para a seleção de duas bactérias, uma Gram negativa e uma Gram positiva, para os ensaios subsequentes. A escolha destes dois microrganismos (*L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*) foi fundamentada pela maior capacidade de formação de biofilme nos dois grupos bacterianos. Para além da análise gráfica, também foi considerado o facto de o número

de casos de listeriose ter aumento desde o início da vigilância em 2008, estabilizando em 2017 (EFSA 2018).

4.4 Determinação das CMI e CMB – Método da microdiluição

O método da microdiluição (utilizando microplacas de 96 poços) é um método quantitativo, simples, muito utilizado pela sua eficiência e que permite utilizar volumes reduzidos. Este teste permite quantificar a suscetibilidade microbiana a diferentes compostos. São preparadas diluições seriadas do extrato, onde posteriormente é adicionado o inóculo (Balouiri et al. 2016). Neste método é possível efetuar combinações microbianas e/ou misturas de extratos (Klančnik et al. 2010).

Este ensaio teve como objetivo determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB). CMI considera-se como a menor concentração de extrato com capacidade de inibir a multiplicação de microrganismos, correspondendo ao efeito bacteriostático. Esta concentração é determinada pela observação direta da microplaca, identificando o poço em que não se observa turvação. CMB, consiste na menor concentração de extrato que reduz a multiplicação de microrganismos em 99.9 %, eliminando assim, quase na totalidade a população bacteriana. Esta concentração é determinada pela observação de crescimento em placas de meio sólido (descrição no material e métodos). Este critério corresponderá ao efeito bactericida (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012).

Para o presente ensaio além das culturas puras foram utilizadas culturas mistas, que pretendem reproduzir o ambiente de processamento de alimentos, dado que os biofilmes formados em ambiente fabril são geralmente constituídos por vários microrganismos (Bridier et al. 2015). Nestes ensaios (realizados a duas temperaturas) utilizaram-se *L. monocytogenes* (CECT 934) e *P. aeruginosa*, em cultura pura, e a cultura mista formada por ambas.

De acordo com as publicações e definições de CMI e CMB, a concentração é geralmente expressa em mg/mL ou mg/L. No presente estudo não foi possível apresentar a concentração desta forma, uma vez a ressuspensão dos extratos em DMSO foi eliminada do protocolo (devido aos problemas de perda de efeito inibitório após liofilização), impedindo o cálculo da concentração dos extratos em análise. Assim, de acordo com o descrito pelos autores Sa et al. (2011), que utilizaram como unidade de referência para a CMI o volume de bacteriocina utilizado, serão apresentados os volumes de extrato utilizado.

Tal como referido anteriormente, é importante relembrar que o efeito antimicrobiano que se pretende analisar com a determinação das CMI e CMB, pode ser afetado pela espécie e estirpe do microrganismo, método de extração, material vegetal

utilizado, volume do inóculo, fase de crescimento do microrganismo, meio de cultura utilizado, pH, tempo e temperatura de incubação (Burt 2004). A natureza antimicrobiana dos compostos bioativos é determinada pelas suas propriedades químicas, como a hidrofobicidade, solubilidade e volatilidade (Negi 2012).

No presente estudo, os extratos obtidos de *Corema album* demonstraram efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* (CECT 934). Para *P. aeruginosa* e para a cultura mista, os extratos não demonstraram qualquer efeito, bactericida ou bacteriostático a nenhuma das duas temperaturas testadas. Das bactérias Gram negativas *P. aeruginosa*, parece ser pouco sensível à ação de compostos bioativos (Burt 2004), característica que se confirmou após realização do presente ensaio.

Relativamente aos extratos obtidos a partir de *Arbutus unedo*, não foi possível determinar a CMI devido à alteração de cor dos mesmos, que impediu a determinação visual da presença/ausência de turbidez, associada à multiplicação microbiana.

Quanto à CMB, observou-se sempre multiplicação microbiana nas placas de BHI sólido. De acordo com Nunes (2017) os extratos de folhas de medronheiro, recolhidos em Lagos, não demonstraram qualquer inibição bacteriana, nomeadamente, *L. monocytogenes* (CECT 934) e *P. aeruginosa*, embora o processo de extração utilizado no referido trabalho, tenha sido diferente do descrito neste trabalho.

Relativamente aos extratos obtidos a partir de *Corema album*, após incubação das microplacas, foi necessário observar atentamente os poços para determinar a CMI, e quais os poços escolhidos para a determinação da CMB. A Figura 17 apresenta um exemplo de uma microplaca após a incubação a 10°C, em que é possível observar o precipitado formado durante a incubação e como é determinada a CMI.

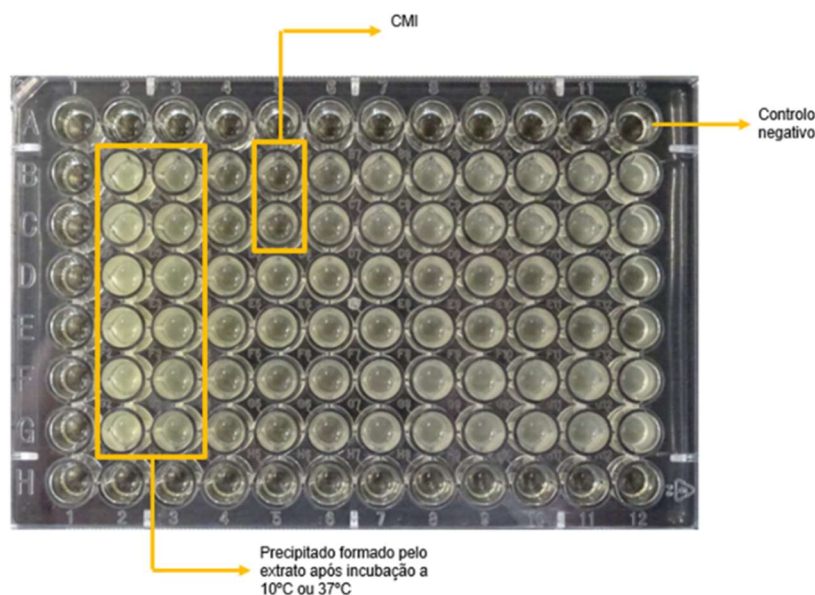


Figura 17 - Microplaca para determinação de CMB e CMI, para o extrato de folha de camarinha água:etanol, a 10 °C (exemplo).

Na Figura 18 é possível observar a determinação da CMB. Nesta placa de BHI sólido é possível observar quais os poços em que o extrato eliminou a bactéria a estudar, sendo que o poço em que a concentração de extrato é menor determina a CMB.

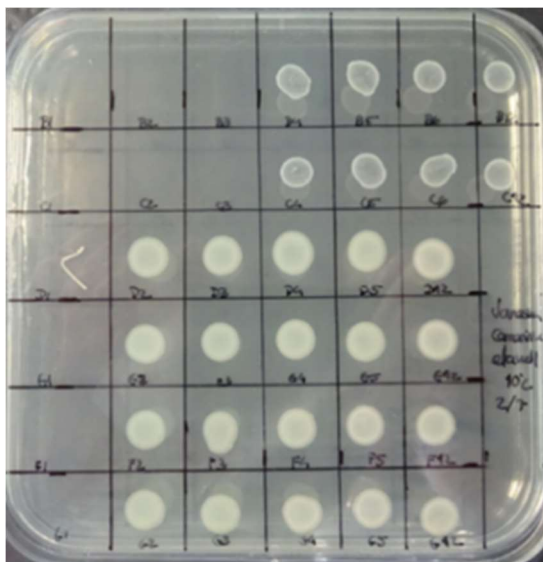


Figura 18 - Placa de BHI sólido, em que se determina a CMB, para o extrato de folha de camarinha água:etanol, a 10 °C (exemplo).

Os volumes do extrato obtido de folhas de *C. album*, utilizados para a determinação de CMI e CMB (10 °C e 37 °C), estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Média e desvio-padrão do volume de extrato de folha de camarinha (µl) necessário para atingir a CMI e CMB sobre *L. monocytogenes* (CECT 934).

Extrato	água:acetona				água:etanol				água:metanol			
	10 °C		37 °C		10 °C		37 °C		10 °C		37 °C	
Temperatura	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	4,69	31,3	5,47	7,82	4,69	18,8	12,5	18,8	7,82	37,5	9,38	18,8
Desvio padrão	0	8,84	3,20	2,42	0	0	4,84	0	2,42	0	0	0

Após análise da Tabela 6, é possível observar que existem diferenças entre as duas temperaturas testadas. De acordo com Michel & Blanc (2001), “alterações na estrutura da membrana e da parede celular decorrentes do aumento da temperatura podem ter consequências na suscetibilidade de muitas bactérias aos compostos químicos”. Este facto poderá estar relacionado com a temperatura influenciar a fluidez da parede celular. A 37 °C a parede celular está mais fluida permitindo mais facilmente a passagem dos compostos bioativos, enquanto a 10 °C a fluidez da parede celular diminui, não permitindo a passagem dos compostos bioativos. Tal como indicado, a temperatura influencia a cinética de difusão, a taxa de multiplicação, as propriedades da

parede celular e a atividade enzimática (Michel & Blanc 2001). Assim, 37 °C deverá corresponder à temperatura em que o volume de extrato será menor para o efeito pretendido, princípio que foi possível verificar na determinação da CMB.

Para o efeito bacteriostático (CMI) é necessário um volume maior, a 37 °C comparativamente ao volume necessário a 10 °C para inibir *L. monocytogenes* (CECT 934) em qualquer um dos extratos utilizados. A 37 °C é possível que alguns compostos voláteis evaporem, sendo necessário uma maior quantidade de extrato para o mesmo efeito, pode ainda acontecer que as enzimas degradem mais rapidamente os compostos bioativos, visto que corresponde à temperatura ótima de multiplicação do microrganismo em estudo. A 10 °C, os extratos mais eficazes no efeito bacteriostático foram os extratos água:acetona e água:etanol com o mesmo volume de 4,69 µl, ficando por último o extrato água:metanol com um volume 7,82 µl. Para a temperatura de 37 °C, o extrato mais eficaz foi água:acetona com um volume de 5,47 µl, seguido do extrato água:metanol com 9,38 µl e por fim o extrato água:etanol com o volume de 12,50 µl. Em qualquer uma das temperaturas e para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), o extrato mais eficaz foi água:acetona.

No efeito bactericida (CMB) foi necessário um volume maior a 10 °C, do que a 37 °C para que a morte celular ocorra. Esta condição verificou-se para o extrato água:acetona e água:metanol. Para o extrato água:etanol o volume foi idêntico para as duas temperaturas. A 10 °C a parede celular está menos permeável, motivo pelo qual é necessário um volume maior, para que ocorra a morte celular. A 37 °C, o extrato mais eficaz foi o extrato água:acetona, com um volume de 7,82 µl, seguido pelos extratos água:etanol e água:metanol com um volume 18,75 µl. Para a temperatura de 10 °C, o extrato mais eficaz foi o extrato água:etanol com um volume de 18,75 µl, seguido do extrato água:acetona com um volume de 31,25 µl e por último o extrato água:metanol com o volume de 37,50 µl. O extrato de água:acetona volta a surgir como um dos mais eficazes.

De um modo geral, o volume necessário para o efeito bactericida é superior ao volume necessário para o efeito bacteriostático, para as duas temperaturas testadas, o que é compreensível, visto que o volume para a morte bacteriana deverá ser maior, comparativamente ao volume que causará apenas inibição da multiplicação.

Pela análise de dados na Tabela 6, existem diferenças nos extratos finais uma vez que existem variações entre os volumes bactericidas para cada uma das soluções de extração utilizadas. A mesma situação ocorre para o efeito bacteriostático. O que parece indicar que, para cada solvente utilizado, podem ter sido extraídos compostos bioativos distintos.

4.5 Determinação da CMEB - método da microdiluição

As infecções bacterianas e a deterioração dos alimentos têm na maioria das vezes, origem nos biofilmes. Os biofilmes constituem um dos maiores problemas na indústria alimentar. Para a erradicação de biofilme pode ser necessária uma concentração até 1000 vezes superior do agente antimicrobiano, comparativamente à concentração utilizada para eliminar as mesmas bactérias em estado planctónico. Toda esta resistência a fatores externos, está associada à produção da matriz EPS pelas bactérias formadoras do biofilme. Esta matriz confere resistência às agressões externas, impedindo a penetração dos agentes antimicrobianos, tornando assim difícil a sua erradicação, sendo a prevenção da formação de biofilmes a melhor estratégia (Górniak et al. 2019).

Os biofilmes são normalmente constituídos por múltiplas espécies, e não apenas por uma. Podem ser encontrados na natureza, em dispositivos médicos e nas indústrias alimentares. Nos biofilmes constituídos por várias espécies, as bactérias podem trocar material genético entre si, aumentando a estabilidade do biofilme e tornando a erradicação mais difícil (Simões et al. 2013).

Para a realização deste ensaio foi utilizada a técnica *Calgary Biofilm Device*, com algumas adaptações, de modo a determinar se os extratos apresentavam a capacidade de erradicar o biofilme de *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* (CECT 934) e da cultura mista. De acordo com a técnica (detalhes descritos no material e métodos), prepararam-se as microplacas em que se produziram os biofilmes nos espigões, mergulhando-os no extrato a diferentes concentrações, com o objetivo de verificar se o extrato tinha a capacidade de erradicar o biofilme já formado. Após contacto entre o biofilme e o extrato, os espigões voltaram a ser mergulhados em microplacas de 96 poços com BHI líquido e foram novamente incubadas. Após incubação, retirou-se uma alíquota do meio de cultura líquido e inoculou-se em placas de BHI sólido, de modo a verificar se existia (ou não) multiplicação microbiana.

Nesta fase do trabalho, apenas o extrato de folha de camarinha em água:metanol foi testado, pois era o único em stock.

Os resultados obtidos para as temperaturas de incubação de 10 e 37 °C, demonstraram que o extrato de folha de camarinha água:metanol não erradicou o biofilme formado por *L. monocytogenes* (CECT 934), *P. aeruginosa* ou a cultura mista, para nenhum dos volumes de extrato testados (150 µl a 9,38 µl). Tanto a 10 °C, com um período de incubação de 48 h, como para 37 °C com um período de incubação de 24 h, qualquer um dos microrganismos em estudo ultrapassou a fase de maior vulnerabilidade, ou seja, a fase de adesão reversível, já estando numa fase de maturação e consolidação do biofilme. *L. monocytogenes* em 24 h a 37 °C, consegue

produzir biofilme (Doijad et al. 2015), enquanto a 10 °C, precisa de 48 h, de acordo com a análise gráfica referida no ponto anterior.

Assim, de modo a eliminar o biofilme existente, seria necessária a utilização de uma concentração superior, uma vez que na placa de BHI sólido observou-se sempre multiplicação bacteriana (CMEB). Assim, considerando os resultados obtidos, a melhor estratégia seria concentrar o extrato por liofilização. Essa possibilidade não foi explorada, devido aos problemas anteriormente relatados, associados a este processo.

Em conclusão, para que a utilização de extratos de *Arbutus unedo* e *Corema album* na indústria alimentar ou noutras indústrias seja uma realidade, é necessário avançar no estudo da espécie, e das características químicas dos seus metabólitos secundários.

5. Conclusão

Na generalidade, consideramos que o trabalho desenvolvido atingiu os objetivos inicialmente propostos, apesar das dificuldades encontradas, uma vez que a abordagem desenvolvida contribuiu significativamente para a aquisição de conhecimentos.

O presente estudo teve como principal objetivo a extração de compostos bioativos de *Arbutus unedo* e *Corema album* e a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos sobre bactérias patogénicas, deteriorativas e tecnológicas, associadas à indústria alimentar. O efeito antimicrobiano dos extratos foi avaliado sobre células bacterianas na sua forma planctónica e de biofilme, avaliando também o seu efeito sobre culturas puras e mistas.

- Iniciou-se o estudo pela extração e isolamento de compostos bioativos das duas espécies em análise, *Arbutus unedo* e *Corema album*, recorrendo a diversos órgãos da planta e diferentes solventes. O processo de extração foi otimizado ao longo do presente trabalho, de modo a adequar o processo extrativo aos tecidos em estudo. Nesta etapa concluiu-se que não existe um processo padrão de extração, e que qualquer passo ao longo da extração deverá ser testado antes da definição do procedimento final. A ação antimicrobiana observada deverá ser resultado dos compostos químicos presentes e não do efeito do pH, uma vez que o valor obtido para os extratos estava próximo da neutralidade.

- A avaliação da capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno foi analisada para duas temperaturas de incubação, 10 e 37 °C. Considerando que a temperatura é um dos fatores mais importante para o desenvolvimento microbiano, os resultados demonstraram que, para a maioria dos isolados, o aumento da temperatura não promoveu um aumento da produção de biofilme. Esta premissa apenas se verificou para os dois serótipos de *Listeria monocytogenes*. *Pseudomonas aeruginosa*

demonstrou comportamento contrário ao esperado. Os restantes isolados, independentemente da temperatura, não demonstraram capacidade de produzir biofilme, nas condições em análise.

- No *screening* inicial, recorrendo ao método de difusão em agar, apenas os extratos obtidos a partir das folhas e utilizando misturas de extração, para as duas espécies vegetais, apresentaram inibição sobre os microrganismos testados. Para os extratos de *Arbutus unedo*, as bactérias Gram negativas apresentaram maior suscetibilidade, quando comparadas às Gram positivas. No grupo das Gram negativas a que demonstrou maior suscetibilidade foi *P. aeruginosa*, para o grupo das Gram positivas, as bactérias mais suscetíveis foram *L. monocytogenes* (CECT 911) e *B. cereus*. Para os extratos de *Corema album*, as bactérias Gram positivas apresentam maior suscetibilidade comparativamente às Gram negativas, sendo nas Gram negativas *A. hydrophila*, a bactéria mais suscetível, e no grupo das Gram positivas *E. faecalis* e *L. monocytogenes* (CECT 911). Os resultados obtidos neste estudo, e de acordo com os diversos autores anteriormente citados, pode ser o resultado da variabilidade genética existente em *Arbutus unedo*, e da influência do meio ambiente. Foi ainda possível concluir que o tempo de extração influencia a dimensão dos halos obtidos, uma vez que quanto maior o tempo de evaporação menor a zona de inibição.

- Os diferentes extratos obtidos a partir da folha de *Corema album* demonstraram capacidade bactericida e bacteriostática sobre *L. monocytogenes* (CECT 934), apresentando assim potencial antimicrobiano sobre a sua forma planctónica, não apresentando capacidade para inibir *P. aeruginosa* nem a cultura mista.

- No ensaio para a determinação da capacidade de erradicação de biofilme (CMEB), o extrato utilizado não demonstrou capacidade de erradicar o biofilme existente pelas culturas puras ou mistas, nas duas temperaturas testadas, sendo necessário a utilização de concentrações superiores para a sua destruição. Este resultado demonstra a resistência acrescida dos biofilmes bacterianos a agentes antimicrobianos, comparativamente às células planctónicas.

De modo geral, consideramos que o presente estudo apresenta uma possibilidade de utilização de compostos bioativos como agentes antimicrobianos provenientes de matérias primas vegetais. No entanto, é essencial a continuação deste trabalho, no sentido de confirmar e desenvolver novas estratégias antimicrobianas para a sua utilização na indústria alimentar.

Perspetivas futuras

A camarinheira é um arbusto pouco estudado, e por este motivo muita informação sobre a espécie está por descobrir, assim como possíveis utilizações na

indústria alimentar ou outras. Considerando que cada vez surgem mais microrganismos com algum tipo de resistência aos agentes antimicrobianos usados diariamente, é urgente a pesquisa de novos compostos que possam ser utilizados como alternativa aos já existentes.

É então relevante a concretização de mais estudos de modo a identificar os compostos químicos presentes em extratos vegetais e eventualmente em óleos essenciais, assim como a identificação de possíveis quimiótipos, bem como o mecanismo de ação dos bioativos presentes na camarinhira sobre as bactérias na sua forma planctónica ou em biofilme, contribuindo tanto para a indústria alimentar como farmacêutica.

A realização de um ensaio “Food model”, de modo a testar a eficácia dos extratos na preservação microbiológica dos géneros alimentícios, deverá ser considerado em estudos futuros. Devido a constrangimentos relacionados com o tempo e o aparecimento da pandemia, este ensaio não se concretizou, estando definida a sua realização baseada na aplicação dos extratos (por pulverização) em frutos vermelhos, e observação da multiplicação de microrganismos ao longo do tempo.

Referências bibliográficas

- Aijuka M, Buys EM. (2019). Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. *Food Microbiol.* 82(March):363–370. doi:10.1016/j.fm.2019.03.018.
- Alarcão-e-Silva MLCMM, Leitão AEB, Azinheira HG, Leitão MCA. (2001). The Arbutus Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *J Food Compos Anal.* 14(1):27–35. doi:10.1006/jfca.2000.0962.
- Andrade S, Gonçalves F, Pinho R. (2015). Physical-chemical properties of *Corema album* (white crowberry or camarinha). *Int Conf Eng Soc.*(January):9.
- Andrade S C, Gonçalves F, Pf Guiné R. (2017). Contribution for the physical-chemical characterization of Portuguese Crowberry (*Corema album*). *Int J Food Sci Nutr.* 2(July):9–14. www.foodsciencejournal.com.
- Andrade S C, Guiné RPF, Gonçalves FJA. (2017). Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (*Corema album*). *J Food Meas Charact.* 11(4):1936–1946. doi:10.1007/s11694-017-9576-4.
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Acedido em 1/03/2021, <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 117(4):426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 6(2):71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Bennour N, Mighri H, Eljani H, Zammouri T, Akrouit A. (2019). Effect of solvent evaporation method on phenolic compounds and the antioxidant activity of *Moringa oleifera* cultivated in Southern Tunisia. *South African J Bot.* doi:10.1016/j.sajb.2019.05.005.
- Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Ianieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol.* 104(6):1552–1561. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7336–7342. doi:10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003.
- Bouyahya 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. *Br Biotechnol J.* 14(3):1–10. doi:10.9734/bbj/2016/26488.
- Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard JC, Naïtali M, Briandet R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45(PB):167–178. doi:10.1016/j.fm.2014.04.015.

- Burt S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int J Food Microbiol.* 94(3):223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Castro M, da Silva Fernandes M, Kabuki DY, Kuaye AY. (2021). Modelling *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on stainless steel surfaces and controlling through sanitisers. *Int Dairy J.* 114:104945. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104945.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* doi:10.1128/jcm.37.6.1771-1776.1999.
- Chajęcka-Wierżchowska W, Zadernowska A, Łaniewska-Trokenheim Ł. (2016). Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *Lwt.* 69:117–122. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.034.
- Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W, Zheng Z, Wang H. (2020). Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen.* 9(1):1–11. doi:10.1002/mbo3.946.
- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines.* 4(3):58. doi:10.3390/medicines4030058. <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/58>.
- Di Ciccio P, Vergara A, Festino AR, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control.* 50:930–936. doi:10.1016/j.foodcont.2014.10.048.
- Citterio B, Biavasco F. (2015). *Aeromonas hydrophila* virulence. *Virulence.* 6(5):417–418. doi:10.1080/21505594.2015.1058479.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: CLSI document M02-A11. Approved standard - Eleventh edition. Pennsylvania
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI document M07. Approved Standard—Ninth Edition Pennsylvania
- Cushnie TPT, Lamb AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 26(5):343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- Dai J, Mumper RJ. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 15(10):7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313.
- Delgado-Pelayo R, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Méndez D. (2016). Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chem.* 199:165–175. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.135.
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines.* 3(4):25. doi:10.3390/medicines3040025.

- Dib MEA, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. J Saudi Chem Soc. 17(4):381–385. doi:10.1016/j.jscs.2011.05.001.
- Dima C, Dima S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. Curr Opin Food Sci. 5:29–35. doi:10.1016/j.cofs.2015.07.003.
- Disson O, Moura A, Lecuit M. (2021). Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol.:1–12. doi:10.1016/j.tim.2021.01.008.
- Doijad SP, Barbuddhe SB, Garg S, Poharkar K V., Kalorey DR, Kurkure N V., Rawool DB, Chakraborty T. (2015). Biofilm-forming abilities of *listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. PLoS One. 10(9):1–14. doi:10.1371/journal.pone.0137046.
- Duze ST, Marimani M, Patel M. (2021). Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments. Food Microbiol. 97(July 2020):103758. doi:10.1016/j.fm.2021.103758.
- European Food Safety Authority, EFSA, acedido a 9/03/2021; <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA journal. European Food Safety Authority, 16(12), <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Faleiro L. (2007). Actividade antimicrobiana. Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro (Eds) (2007), Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
- Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. Nat Prod Res. 26(16):1558–1560. doi:10.1080/14786419.2011.569504.
- Figueiredo, A. Cristina, Pedro, Luis G.; Barroso, José G. (2014) Óleos essenciais e outros extratos - Plantas aromáticas. Revista da APH N.º 114, página 24.
- Fink R, Oder M, Stražar E, Filip S. (2017). Efficacy of cleaning methods for the removal of *Bacillus cereus* biofilm from polyurethane conveyor belts in bakeries. Food Control. 80:267–272. doi:10.1016/j.foodcont.2017.05.009.
- Fisher K, Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 155(6):1749–1757. doi:10.1099/mic.0.026385-0.
- Fonseca DFS, Salvador ÂC, Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Silvestre AJD, Rocha SM. (2015). Bioactive phytochemicals from wild *Arbutus unedo* L. Berries from different locations in portugal: Quantification of lipophilic components. Int J Mol Sci. 16(6):14194–14209. doi:10.3390/ijms160614194.
- Forsythe SJ. (2013). Microbiologia da segurança dos alimentos. Porto Alegre;Artmed; 2º edição.

Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. (2003). Enterococci in foods - A conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* 88(2–3):105–122. doi:10.1016/S0168-1605(03)00174-0.

Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front Microbiol.* 9(MAY):1–18. doi:10.3389/fmicb.2018.00898.

Giraffa G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 88(2–3):215–222. doi:10.1016/S0168-1605(03)00183-1.

Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev* 18, 241–272 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>

Gottardi D, Bukvicki D, Prasad S, Tyagi AK. (2016). Beneficial effects of spices in food preservation and safety. *Front Microbiol.* 7(SEP):1–20. doi:10.3389/fmicb.2016.01394.

Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 78(1–2):79–97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.

Gyawali R, Ibrahim SA. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 46:412–429. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.047.

Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. (2010). Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: A miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc.* 5(7):1236–1254. doi:10.1038/nprot.2010.71.

Heydorn A, Ersboll BK, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S. (2000). Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology.* 146(10):2409–2415. doi:10.1099/00221287-146-10-2409.

Huang Y, Flint SH, Palmer JS. (2020). *Bacillus cereus* spores and toxins – The potential role of biofilms. *Food Microbiol.* 90(March):103493. doi:10.1016/j.fm.2020.103493.

Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol.* 88(2–3):223–233. doi:10.1016/S0168-1605(03)00184-3.

Jadhav S, Shah R, Bhavé M, Palombo EA. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control.* 29(1):125–130. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.071.

Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 9(December 2017):26–38. doi:10.1016/j.jarmap.2017.12.003.

Jemmi T, Stephan R. (2006). *Listeria monocytogenes*, food-borne Pathogenesis and virulence factors. *Microbiol Rev.* 25(2):571–580.

Jornal Público (2018), acedido em 21/10/2020 <https://www.publico.pt/2018/11/08/fugas/noticia/perolas-atlantico-dao-sabor-saude-1850324?fbclid=IwAR3t3qAwVOGWmYEmmTkk0zr1QkIOBB5q33z3lf1-xXQpgkOOoj31TzYmbdY>

- Joshi V K, Sharma R, Kumar V. (2019). Antimicrobial Activity of Essential Oils. *International Journal of food and fermentation technology*.(October 2011):1–22. doi:10.1007/978-3-319-72473-7_28-1.
- Jurica K, Gobin I, Kremer D, Čepo DV, Grubešić RJ, Karačonji IB, Kosalec I. (2017). Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J Herb Med.* 8:17–23. doi:10.1016/j.hermed.2017.03.006.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 18(2):2328–2375. doi:10.3390/molecules18022328.
- Khorshidian N, Yousefi M, Khanniri E, Mortazavian AM. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 45(March 2017):62–72. doi:10.1016/j.ifset.2017.09.020.
- Kim S, Li XH, Hwang HJ, Lee JH. (2020). Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 86(22):1–11. doi:10.1128/AEM.01584-20.
- Kim SH, Kim DH, Lim HW, Seo KH. (2020). High prevalence of non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators. *Lwt.* 126(March):109271. doi:10.1016/j.lwt.2020.109271.
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.* 81(2):121–126. doi:10.1016/j.mimet.2010.02.004.
- Klein S, Lorenzo C, Hoffmann S, Walther JM, Storbeck S, Piekarski T, Tindall BJ, Wray V, Nimtz M, Moser J. (2009). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Mol Microbiol.* 71(3):551–565. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x.
- Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 307(8):481–489. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.016.
- Kumar CG, Anand SK. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *Int J Food Microbiol.* 42(1–2):9–27. doi:10.1016/S0168-1605(98)00060-9.
- Kumari S, Sarkar PK. (2014). Invitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control.* 36(1):153–158. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.014.
- LaBauve AE, Wargo MJ. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol.*(SUPPL.25):1–11. doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25.
- León-González AJ, Truchado P, Tomás-Barberán FA, López-Lázaro M, Barradas MCD, Martín-Cordero C. (2013). Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *J Food Compos Anal.* 29(1):58–63. doi:10.1016/j.jfca.2012.10.003.

Lin S, Yang L, Chen G, Li B, Chen D, Li L, Xu Z. (2017). Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. *Microb Pathog.* 111:285–291. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.005.

Lins P. (2018). Detection of *Salmonella* spp. in spices and herbs. *Food Control.* 83:61–68. doi:10.1016/j.foodcont.2017.05.040.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, acedido em 1/07/2021, <https://lpsn.dsmz.de/search?word=salmonella>

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, acedido em 1/07/2021, [\https://lpsn.dsmz.de/search?word=Listeria

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, acedido em 1/07/2021 <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Enterococcus>

Liu F, Jin P, Gong H, Sun Z, Du L, Wang D. (2020). Antibacterial and antibiofilm activities of thyme oil against foodborne multiple antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis*. *Poult Sci.* 99(10):5127–5136. doi:10.1016/j.psj.2020.06.067.

Lucero-Mejía JE, Romero-Gómez S de J, Hernández-Iturriaga M. (2020). A new classification criterion for the biofilm formation index: A study of the biofilm dynamics of pathogenic *Vibrio* species isolated from seafood and food contact surfaces. *J Food Sci.* 85(8):2491–2497. doi:10.1111/1750-3841.15325.

Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin Microbiol Rev.* 31(3):1–49. doi:10.1128/CMR.00084-16.

Maleš Ž, Plazibat M, Vundać VB, Žuntar I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm.* 56(2):245–250.

Maleš Ž, Šarić D, Bojić M. (2013). Quantitative determination of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *arbutus unedo* L. using thin layer chromatography. *J Anal Methods Chem.* 2013:2–5. doi:10.1155/2013/385473.

Marinho AR, Martins PD, Ditmer EM, d'Azevedo PA, Frazzon J, Sand STV Der, Frazzon APG. (2013). Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *enterococcus faecalis* and *enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian J Microbiol.* 44(2):423–426. doi:10.1590/S1517-83822013005000045.

Marques E. M. M. S. (2007). Caracterização das populações de Camarinha (*Corema album* L.) no Cabo Carvoeiro. Dissertação de Mestrado em ciências da terra e da vida para o ensino, Universidade de Lisboa

Matle I, Mbatha KR, Madoroba E, Division B, Africa S, Health A, Africa S. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis *Listeria* species. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* :1–20. doi - 10.4102/ojvr.v87i1.1869

Mazaheri T, Cervantes-Huamán BRH, Bermúdez-Capdevila M, Ripolles-Avila C, Rodríguez-Jerez JJ. (2021). *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: Is the

current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? Microorganisms. 9(1):1–19. doi:10.3390/microorganisms9010181.

Michel C, Blanc G. (2001). Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: The temperature effect. Aquaculture. 196(3–4):311–318. doi:10.1016/S0044-8486(01)00544-0.

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. (2014). Arbutus unedo L.: Chemical and biological properties. Molecules. 19(10):15799–15823. doi:10.3390/molecules191015799.

Miladi H, Mili D, Ben Slama R, Zouari S, Ammar E, Bakhrouf A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen Salmonella strain. Microb Pathog. 93:22–31. doi:10.1016/j.micpath.2016.01.017.

Moghaddam M, Mehdizadeh L. (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In Handbook of Food Bioengineering, Soft Chemistry and Food Fermentation, Academic Press, 2017, Pages 379-419, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>.

Montville Thomas J., Matthews Karl R., Kniel Kalmia E. (2012). Food Microbiology: An Introduction. ASM Press, Washington, DC. 3th Edition, 570 pages.

Negi PS. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol. 156(1):7–17. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.

Nogueira MTD, Lourenço JAA. 2007. Óleos essenciais: A normalização e a sua importância no âmbito do regulamento reach. Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro (Eds) (2007), Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Nunes, R. J. S. (2017). Design microencapsulated Arbutus unedo leaves and fruits by spray drying for supplements and functional foods. Dissertação de Doutoramento. Universidade do Algarve.

O'Toole GA. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. J Vis Exp.(47):10–11. doi:10.3791/2437.

Ogunsona EO, Muthuraj R, Ojogbo E, Valerio O, Mekonnen TH. (2020). Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. Appl Mater Today. 18:100473. doi:10.1016/j.apmt.2019.100473.

Oliveira I, Guedes De Pinho P, Malheiro R, Baptista P, Pereira JA. (2011). Volatile profile of Arbutus unedo L. fruits through ripening stage. Food Chem. 128(3):667–673. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.084.

De Oliveira PB, Dale A. (2012). Corema album (L.) D. Don, the white crowberry-a new crop. J Berry Res. 2(3):123–133. doi:10.3233/JBR-2012-033.

Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinci N. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf. *Food Sci Biotechnol.* 20(5):1249–1256. doi:10.1007/s10068-011-0172-9.

Ordem dos Médicos, Silva, Manuel (2010) Garcia de Orta (SÉC. XVI) – O mundo das plantas medicinais consultado a 17/04/2021 [http://ordemdosmedicos.pt/wp-content/uploads/2017/09/GARCIA_DE_ORTA__p_EAU_.pdf,]

Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front Microbiol.* 7(JAN):1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.02161.

Park KM, Kim HJ, Jeong M, Koo M. (2020). Enterotoxin Genes, Antibiotic Susceptibility, and Biofilm Formation of Low-Temperature-Tolerant *Bacillus cereus* Isolated from Green Leaf Lettuce in the Cold Chain. *Foods.* 9(3). doi:10.3390/foods9030249.

Pattanayak S, Priyadarsini S, Paul A, Kumar PR, Sahoo PK. (2020). Diversity of virulence-associated genes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolates and their in vivo modulation at varied water temperatures. *Microb Pathog.* 147(May):104424. doi:10.1016/j.micpath.2020.104424.

Pavlović D, Lakušić B, Kitić D, Milutinović M, Kostić M, Miladinović B, Kovačević N. (2014). Antimicrobial activity of selected plant species of genera *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna salisb.* and *Erica* L. (Ericaceae). *Acta Fac Medicae Naissensis.* 31(1):81–85. doi:10.2478/afmnai-2014-0009.

Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. (2015). Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Front Microbiol.* 6(FEB):1–7. doi:10.3389/fmicb.2015.00076.

Quintieri L, Fanelli F, Caputo L. (2019). Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. *Foods.* 8(9):1–32. doi:10.3390/foods8090372.

Regulamento (CE) no 178/2002 do Parlamento Europeu e Conselho de 28 de Janeiro de 2002. (2002). Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar. *J.Of. da União Eur.* L31/1

Regulamento (CE) no 852/2004 do Parlamento Europeu e Conselho de 29 de Abril de 2004. (2004). Relativo à higiene dos géneros alimentícios. *J.Of. da União Eur.* L139/1

Regulamento (CE) no 1441/2007 do Parlamento Europeu e Conselho de 5 de Dezembro de 2005. (2005). Relativo à higiene dos critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios. *J.Of. da União Eur.* L322/12

Ribeiro MM, Piotti A, Ricardo A, Gaspar D, Costa R, Parducci L, Vendramin GG. (2017). Genetic diversity and divergence at the *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) westernmost distribution limit. *PLoS One.* 12(4):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0175239.

Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, O'Brien M, Navarro-Villa A, Fanning S, Duffy G. (2010). Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol.* 139(1–2):70–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029.

Roberto AG, Itzel-Maralhi CF, Lilia-Lizette GD, Yesenia RS, Abigail PV, Carlos OP, Maria-Cristina SD, Arturo RP. (2020). Biofilm production by enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* in different materials and under different environmental conditions. *Microorganisms*. 8(7):1–13. doi:10.3390/microorganisms8071071.

Rodrigues D, Martinis E De, Teixeira P, Gualtar C De, Alegre M. (2012). 18. Biofilmes na indústria alimentar. Azevedo NF, Cerca N (ed), *Biofilmes - Na Saúde, No Ambiente Na Indústria*.:173–187.

Rodrigues LB, Ruschel L, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP De, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Pinheiro V. (2009). Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Sci Vet*. 37(December 2008):225–230. doi:10.13140/2.1.5145.4404.

Sa, A., Krishnaa, R. S., Pavithrab, V., Hemalathab, V., & Ingalea, P. 2011. Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *International Journal of Current Sciences*. 1:109–115.

Santos MS, De Oliveira CM, Valdivieso T, De Oliveira PB. (2014.) Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. *J Berry Res*. 4(4):183–192. doi:10.3233/JBR-140079.

Sasidharan, Sreenivasan; Chen, Yeng; Dharmaraj, Saravanan; Karupiah, Sundram; Lachimanan, Yoga (2007). Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants? Extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. doi 10.4314/ajtcam.v8i1.60483

Schneider KR, Schneider RG, Silverberg R, Kurdmongkoltham P. (2020). Preventing Foodborne Illness : *Bacillus cereus*. *Transmission of Foodborne Illness*. :1–5.

Simões, Manuel; Mergulhão, Filipe. (2013) *Biofilms on bioengineering*. New York: Nova Biomedical.

de Souza EL, Meira QGS, Barbosa I de M, Athayde AJAA, da Conceição ML, de Siqueira JP. (2014). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Brazilian J Microbiol*. 45(1):67–75. doi:10.1590/S1517-83822014000100010.

Spector MP, Kenyon WJ. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Int*. 45(2):455–481. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.056.

Srey S, Jahid IK, Ha S Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 31(2):572–585. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int*. 45(2):502–531. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038.

Takwa S, Caleja C, Barreira JCM, Soković M, Achour L, Barros L, Ferreira ICFR. (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *LWT - Food Sci Technol*. 88:47–55. doi:10.1016/j.lwt.2017.09.041.

- Talagrand-Reboul E, Jumas-Bilak E, Lamy B. (2017). The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems. *Front Microbiol.* 8(JAN). doi:10.3389/fmicb.2017.00037.
- Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A, Hummerjohann J. (2018). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *J Dairy Sci.* 101(2):1000–1012. doi:10.3168/jds.2017-13696.
- Tilahun A, Haddis S, Teshale A, Hadush T. (2016). Review on Biofilm and Microbial Adhesion. *Int J Microbiol Res.* 7(3):63–73. doi:10.5829/idosi.ijmr.2016.63.73.
- Tomicic R, Cabarkapa I, Vukmirovic D, Levic J, Tomicic Z. (2016). Influence of growth conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Food Feed Res.* 43(1):19–24. doi:10.5937/ffr1601019t.
- de Torres C, Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I, Pérez-Coello MS. (2010). Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin.
- Turek C, Stintzing FC. (2013). Stability of essential oils: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 12(1):40–53. doi:10.1111/1541-4337.12006.
- Veiros MB, Proença RPC, Santos MCT, Kent-Smith L, Rocha A. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control.* 20(10):936–941. doi:10.1016/j.foodcont.2009.02.002.
- Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. (2015). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55(10):1320–1323. doi:10.1080/10408398.2012.692127.
- Vidács A, Kerekes E, Rajkó R, Petkovits T, Alharbi NS, Khaled JM, Vágvölgyi C, Krisch J. (2018). Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.179>.
- Viegas Jr C, Bolzani V da S, Barreiro EJ. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova.* 29(2):326–337. doi:10.1590/s0100-40422006000200025.
- Viegas SJ. 2015. *Segurança Alimentar - Guia de Boas Práticas do Consumidor*. Odivelas. Guide – Artes Gráficas, Lda
- Whitehead KA, Verran J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr Opin Food Sci.* 2:84–91. doi:10.1016/j.cofs.2015.02.003.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 2017. *The Burden of Foodborne Diseases in the WHO European Region*.
- Wijman JGE, De Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol.* 73(5):1481–1488. doi:10.1128/AEM.01781-06.
- Wirtanen G, Saarela M, Mattila-Sandholm T. (2000). Biofilms - impact on hygiene in food industries. *Biofilms II Process Anal Appl.*:327–372.

World Health Organization. (2008). Section 6: Features of important foodborne diseases. Foodborne Dis Outbreaks Guidel Investig Control.:54–93. http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/Section_6.pdf.

World Health Organization, WHO, acedido a 9/03/2021, https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2

Xu Z, Xie J, Soteyome T, Peters BM, Shirtliff ME, Liu J, Harro JM. (2019). Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. *Curr Opin Food Sci.* 26(March):57–64. doi:10.1016/j.cofs.2019.03.006.