

# **Avaliação das Propriedades Antimicrobianas de extratos de Feijão-frade**

**Mariana Revez Candeias**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Coorientadora: Doutora Cátia Maria de Jesus Nunes Trindade Soares

**Júri:**

Presidente: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Associada com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa



## Agradecimentos

A realização deste trabalho assinala o fim de um capítulo da minha vida, que no seu percurso teve altos e baixos próprios da sua evolução natural e que por uma outra razão, aconteceram. Foram estes altos e baixos que me ensinaram lições de vida importantes para o meu crescimento tanto a nível profissional como pessoal. Tal não seria possível sem a presença de pessoas com as quais pode contar incondicionalmente em todo o percurso, com o seu apoio e disponibilidade para a minha formação e crescimento. Por tudo isto quero aqui deixar o meu profundo e reconhecido agradecimento a estas pessoas que sempre estiveram presentes com o seu apoio imprescindível.

Um agradecimento especial à minha orientadora Professora Luísa Brito, pela sua orientação e disponibilidade, pela paciência e acompanhamento, pela compreensão e apoio, pela amizade e carinho, demonstrado.

À minha coorientadora Doutora Cátia Nunes, por toda a ajuda, suporte, disponibilidade e por me ter permitido estar envolvida no projeto CoHeSus.

Tenho que agradecer a todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia. À Ana Carla Silva, ao Acácio Salamandane, pela disponibilidade, auxílio, amizade e carinho ao longo do trabalho. Às minhas colegas de mestrado, aos alunos de doutoramento pela boa disposição, por permitirem bom ambiente de trabalho, onde me sentisse tão bem.

A todos os docentes que me acompanharam ao longo deste percurso e contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento académico.

Aos meus amigos, especialmente à Jéssica, à Mariana e ao Paulo, e aos meus colegas que me acompanharam ao longo do percurso no ISA.

Aos meus amigos por todo o apoio e disponibilidade, por estarem presentes em todos os momentos permitindo ultrapassá-los da melhor maneira.

Aos meus pais, por todos os sacrifícios que fizeram, toda a ajuda, apoio que me deram, para que durante o meu percurso académico pudesse ter acesso às coisas que tanto gostava e pudesse fazer aquilo que mais queria. Aos meus irmãos por ouvirem as minhas frustrações e inseguranças, todo o apoio e disponibilidade que demostram diariamente, e me permitirem não esquecer da minha essência.

Um agradecimento a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram em todo este percurso.

E por último, ao Santander pela atribuição do prémio Santander Universidades/Instituto Superior de Agronomia, que me proporcionou esta oportunidade.

Obrigada a Todos!

## Resumo

A crescente preocupação dos consumidores, da indústria alimentar e das autoridades de saúde, acerca das doenças transmitidas pelos alimentos e o uso de conservantes alimentares tem vindo a aumentar.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto CoHeSus (financiado pela FCT) que visa identificar, caracterizar e proteger variedades locais de Feijão-frade (*Vigna unguiculata*), uma leguminosa rica em proteína, em macro e micronutrientes e com potencial atividade antimicrobiana. Pretendeu-se, assim, estudar as propriedades antimicrobianas de extratos hidroalcoólicos de Feijão-frade, sobre bactérias patogénicas de origem alimentar gram-positivas (*Listeria monocytogenes*) e gram-negativas (*Salmonella*), assim como sobre bactérias não patogénicas (*Listeria innocua* e *Escherichia coli*) e fungos filamentosos (*Penicillium* e *Aspergillus*). Foram utilizados extratos de grão, de vagens e de folhas de cinco variedades (1E, 3E, 5V, 9L e 13B), para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC) e das concentrações mínimas bactericidas (MBC).

Os extratos de folhas foram os extratos que apresentaram resultados mais promissores, tendo a MIC variado entre 1,1 e 18,1 mg/mL e a MBC entre 1,1 e 9,1 mg/mL. Com os extratos de vagem, a MIC variou de 5,1 a 87,7 mg/mL e a MBC de 20,3 a 87,7 mg/mL. Ambos os extratos inibiram a atividade das quatro bactérias em teste, sendo que as bactérias gram-positivas apresentaram maior suscetibilidade. Já em relação ao grupo das bactérias gram-negativas, a bactéria não patogénica *E. coli* foi a menos suscetível. Relativamente aos fungos, apenas *P. expansum* apresentou inibição. A variedade que apresentou melhor atividade antimicrobiana (extratos de folhas e de vagens) foi a variedade 1E (Fradel). Os extratos de grão não apresentaram qualquer tipo de atividade antibacteriana nem antifúngica.

Os resultados aqui apresentados indicam que o Feijão-frade apresenta propriedades antimicrobianas. A preservação do grão para fins alimentares e o aproveitamento sustentável das vagens e das folhas para extração de compostos que possam ser usados como uma alternativa aos conservantes alimentares sintéticos, vem ao encontro dos objetivos de uma economia circular, merecendo assim uma investigação mais aprofundada.

**Palavras-Chave:** Extratos hidroalcoólicos de Feijão-frade (*Vigna unguiculata*); Concentração Mínima Inibitória (MIC); Concentração Mínima Bactericida (MBC); Bactérias patogénicas de origem alimentar; *Penicillium expansum*.

## Abstract

The growing concern of consumers, food industry and health authorities about foodborne diseases and the use of food preservatives has been increasing.

This work was developed under the CoHeSus project (funded by FCT) which aims to identify, characterize and protect local varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*), a legume rich in protein, in macro and micronutrients and with potential antimicrobial activity. It was intended to, therefore, study the antimicrobial properties of Cowpea hydroalcoholic extracts on gram-positive (*Listeria monocytogenes*) and gram-negative (*Salmonella*) foodborne pathogenic bacteria, as well as on non-pathogenic bacteria (*Listeria innocua* and *Escherichia coli*) and filamentous fungi (*Penicillium* and *Aspergillus*). Grain, pod and leaf extracts of five varieties (1E, 3E, 5V, 9L and 13B) were used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC).

The leaf extracts showed the most promising results, with MIC ranging from 1.1 to 18.1 mg/mL and MBC ranging from 1.1 to 9.1 mg/mL. Pod extracts, the MIC ranged from 5.1 to 87.7 mg/mL and the MBC from 20.3 to 87.7 mg/mL. Both extracts inhibited the activity of the four bacteria under test, with gram-positive bacteria showing greater susceptibility. Regarding the gram-negative bacteria group, the non-pathogenic bacteria *E. coli* was the least susceptible. Regarding fungi, only *P. expansum* showed inhibition. The variety that showed the best antimicrobial activity (leaf and pod extracts) was variety 1E (Fradel). Grain extracts showed no antibacterial or antifungal activity whatsoever.

The results presented here indicate that Cowpea has antimicrobial properties. The preservation of the grain for food purposes and the sustainable exploitation of the pods and leaves for the extraction of compounds that can be used as an alternative to synthetic food preservatives meets the objectives of a circular economy and thus merits further research.

**Keywords:** Cowpea hydroalcoholic extracts (*Vigna unguiculata*); Minimum Inhibitory Concentration (MIC); Minimum Bactericidal Concentration (MBC); Foodborne pathogenic bacteria, *Penicillium expansum*.

# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>I</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>II</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
<b>I. Enquadramento e Objetivos .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Leguminosas .....</b>	<b>3</b>
1.1. Importância Nutricional, Ambiental, Agronómica e Económica .....	3
1.2. Compostos Fenólicos .....	5
1.2.1. Estrutura e Classificação dos Compostos Fenólicos .....	7
1.2.2. Importância na alimentação humana .....	7
<b>2. Feijão-frade (<i>Vigna unguiculata</i>).....</b>	<b>9</b>
2.1. Caracterização Botânica, Morfológica e Fisiológica.....	9
2.2. Importância Agronómica, Económica e Social.....	11
2.3. Caracterização Nutricional .....	12
2.4. Compostos Bioativos.....	12
2.4.1. Compostos Fenólicos .....	14
2.4.2. Péptidos Bioativos .....	16
2.5. Propriedades Bioativas.....	19
<b>3. Microrganismos Patogénicos e Contaminantes de Origem Alimentar .....</b>	<b>23</b>
3.1. Bactérias.....	24
3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
3.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.1.3. <i>Salmonella</i> .....	26
3.2. Fungos Filamentosos .....	27
<b>III. Materiais e Métodos .....</b>	<b>29</b>
<b>1. Extratos de Feijão-frade Utilizados .....</b>	<b>29</b>
<b>2. Microrganismos utilizados.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Meios de Cultura e Soluções .....</b>	<b>32</b>
3.1. Meios Líquidos.....	32
3.2. Meios Sólidos .....	32
3.3. Soluções .....	33
<b>4. Preparações de Inóculos .....</b>	<b>34</b>

4.1.	Suspensões de Bactérias .....	34
4.2.	Suspensões de Conídios.....	34
<b>5.</b>	<b>Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....</b>	<b>35</b>
5.1.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) .....	36
5.1.1.	Bactérias.....	36
5.1.2.	Fungos.....	37
5.2.	Determinação da Concentração Mínima Bactericida (MBC) .....	37
5.2.1.	<i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> .....	38
5.2.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	38
5.2.3.	<i>Salmonella</i> Typhimurium .....	38
<b>6.</b>	<b>Interpretação dos resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
1.	Teor de Compostos Fenólicos nos Extratos de Feijão-frade Utilizados.....	39
2.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	39
2.1.	Extratos de Vagem .....	41
2.2.	Extratos de Folha.....	44
<b>V.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>VI.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>82</b>
	Anexo I – Extratos de Vagem.....	82
	Anexo II – Extratos de Folha .....	92

## Índice de Tabelas e Figuras

<i>Tabela 1 – Caracterização Fenólica de extratos de Feijão-frade (grão, folha e vagem).....</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 2 – As cinco variedades de Feijão-frade, fonte dos extratos utilizados. ....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 3 – Teor Fenólico de extratos de Feijão-frade (grão, folha e vagem).....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 4 – Estirpes microbianas utilizadas. ....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 5 – MIC dos extratos de vagem das cinco variedades em teste (1E, 3E,5V, 9L e 13B) (mg/mL), para L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 6 – Redução logarítmica (log) média de L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella, em relação às MICs, com os extratos de vagem das cinco das variedades em estudo (1E, 3E, 5V, 9L e 13B). ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 7 – MBC dos extratos de vagem das cinco variedades em teste (1E, 3E,5V, 9L e 13B) (mg/mL), para L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 8 – Redução logarítmica (log) média de L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella, em relação às MBCs, com os extratos de vagem das cinco das variedades em estudo (1E, 3E, 5V, 9L e 13B). ....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 9 – MIC dos extratos de folha das quatro variedades em teste (1E, 3E, 9L e 13B) (mg/mL), para L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 10 – Redução logarítmica (log) média de L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella, em relação às MICs, com os extratos de folha das quatro das variedades em estudo (1E, 3E, 9L e 13B). ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 11 – MBC dos extratos de folha das quatro variedades em teste (1E, 3E, 9L e 13B) (mg/mL), para L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 12 – Redução logarítmica (log) média de L. innocua, L. monocytogenes, E. coli e Salmonella, em relação às MBCs, com os extratos de folha das quatro das variedades em estudo (1E, 3E, 9L e 13B). ....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 13 – Razão entre MBC e MIC dos extratos de vagem e de folha das variedades em análise (1E, 3E, 5V, 9L e 13B) para L.innocua, L. monocytogenes, E.coli e Salmonella. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 1 – Número de casos reportados de doenças com origem zoonótica na EU em 2019. Fonte: EFSA, 2021. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2 – Representação duma microplaca de 96 poços.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 3 – Controlo do DMSO em relação aos fungos utilizados. ....</i>	<i>40</i>

## Lista de Siglas e Acrónimos

DMSO – Dimetilsulfóxido

GEE – Gases com Efeito de Estufa

HU – *Hemagglutinating Activity Units* (Unidades de Atividade Hemaglutinante)

LPS – Lipopolissacárido

MBC – *Minimum Bactericidal Concentration* (Concentração Mínima Bactericida)

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Mínima Inibitória)

MH – *Mueller-Hinton*

PCA – *Plate Count Agar*

PDA – *Potato Dextrose Agar*

PDB – *Potato Dextrose Broth*

SR – Solução de Ringer

TBX – *Tryptone-Bile-Glucuronate*

TSA-YE – *Tryptone Soya Agar-Yeast Extract*

TSB – *Tryptone Soya Broth*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

## I. Enquadramento e Objetivos

O plano de trabalhos que se segue insere-se numa das tarefas do projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), CoHeSus – Estudo da diversidade genética de Feijão-frade para uma dieta mais saudável e sustentável – que visa identificar, caracterizar e proteger variedades locais de Feijão-frade. O projeto CoHeSus insere-se no panorama atual da necessidade de garantir a segurança alimentar (*Food Security*) para a população global crescente, no contexto atual das alterações climáticas (FAO, WFP e IFAD, 2012).

O Feijão-frade (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa de grão com um valor importante para a alimentação humana e animal, que se desenvolve e é colhido em terrenos marginais propícios para a agricultura. Por ter capacidade de fixar o azoto atmosférico, é uma mais-valia para a sustentabilidade ambiental. Esta leguminosa apresenta um elevado teor em proteínas, aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas, fibra e baixo teor em gordura, que lhe conferem um papel importante numa alimentação equilibrada (Madodé *et al.*, 2012).

O uso de Feijão-frade na agricultura tradicional, durante várias gerações de agricultores, produziu uma grande quantidade de variedades empiricamente selecionadas (*landraces*) e que, por isso, estão muito bem-adaptadas ao solo e clima das regiões onde são cultivadas. A diversidade morfológica e genética destas *landraces* é grande, daí a necessidade de ser estudada e protegida. No projeto CoHeSus já se mostrou que essa diversidade se traduz numa diferente capacidade de resposta ao stress hídrico e a uma clara diferença em termos de conteúdo fenólico e capacidade anti-inflamatória (resultados ainda não publicados).

Nos dias de hoje, os consumidores estão cada vez mais conscientes da importância da relação entre dieta e saúde, e o número de pessoas que procuram uma dieta saudável, variada, equilibrada e sustentável tem vindo a aumentar (Garnett *et al.*, 2014). Tendo sido mostrado que o Feijão-frade se destaca de entre as outras leguminosas por ser rico em polifenóis e flavonóis, o que se traduz em importantes características antioxidantes. Sugere-se, também, que o Feijão-frade apresente efeito antimicrobiano (Khalifa *et al.*, 2015; Singh, 2017). O estudo da ação antimicrobiana dos extratos fenólicos de Feijão-frade irá permitir identificar e quantificar extratos fenólicos capazes de eliminar microrganismos patogénicos de origem alimentar e fungos contaminantes de alimentos, podendo estes extratos ser posteriormente utilizados como conservantes alimentares naturais ou integrando desinfetantes de uso alimentar (Gan *et al.*, 2016; Papuc *et al.*, 2017).

Este trabalho tem, assim, como objetivo estudar as propriedades antimicrobianas de extratos de Feijão-frade, sobre bactérias patogénicas de origem alimentar gram-positivas (*Listeria*

*monocytogenes*) e gram-negativas (*Salmonella*), assim como bactérias não patogênicas (*Listeria innocua* e *Escherichia coli*) e fungos filamentosos (*Penicillium* e *Aspergillus*). As propriedades antimicrobianas dos extratos serão avaliadas através da determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC) e das concentrações mínimas bactericidas (MBC).

## II.Revisão Bibliográfica

### 1. Leguminosas

As leguminosas, *Leguminosae* ou *Fabaceae*, são uma das três maiores famílias de plantas angiospérmicas. Estas caracterizam-se por apresentarem flores em forma papilionácea e frutos em forma de vagem (Hulse, 1991). As vagens encerram em si a parte mais consumida destas plantas, a semente/grão, geralmente conhecidas por "*legumes*" ou "*pulse*". O seu consumo faz-se maioritariamente através das sementes secas, que são usualmente utilizadas quer na alimentação humana quer na alimentação animal (FAO, 1994), mas estas também podem ser consumidas imaturas, incluindo a vagem e até mesmo as folhas da planta (Ehlers e Hall, 1997). O termo "leguminosas" refere-se apenas a plantas colhidas para a produção de grãos secos, como por exemplo, feijão comum, ervilhas, grão de bico, lentilhas, tremçoço, feijão-frade, entre outras, sendo estas as principais espécies de leguminosas consumidas pelo Homem (FAO, 1994).

#### 1.1. Importância Nutricional, Ambiental, Agronómica e Económica

As leguminosas são cultivadas em cerca de 180 milhões de Ha, o que correspondia em 2000, a cerca de 12% a 15% da superfície arável da Terra (Vance, Graham e Allan, 2000), sendo produzidas, anualmente em 2014, 77 milhões de toneladas de leguminosas, o que equivale a um rendimento de 928 quilogramas por Ha (Rawal e Navarro, 2019). O cultivo destas espécies corresponde a 27% da produção agrícola primária do mundo, sendo que as leguminosas de grão contribuem com 33% das necessidades de azoto proteico da dieta humana (Smýkal *et al.*, 2015).

As sementes das plantas da família *Fabaceae* são uma importante fonte de proteína para grande parte da população mundial (FAO, 2016). Estas ocupam um lugar importante na nutrição humana, especialmente nos países em desenvolvimento, pois são uma fonte acessível e concentrada de proteínas, alternativas às proteínas de origem animal de elevado custo (FAO, 2016; Myers *et al.*, 2017). As leguminosas são assim consideradas a carne dos pobres, pois são geralmente uma fonte de hidratos de carbono e proteína (Marinangeli e Jones, 2011; Mudryj, Yu e Aukema, 2014), sendo o teor de proteína aproximadamente igual a alguns tipos de carne (18 a 25%) (Bojňanská *et al.*, 2015). O seu elevado conteúdo proteico também tem levado a uma procura crescente nos países desenvolvidos devido a uma maior consciência dos benefícios da substituição da proteína animal por proteína vegetal (Henchion *et al.*, 2017).

Desde a antiguidade que as leguminosas são utilizadas. As populações indígenas perceberam desde cedo que as leguminosas poderiam servir de complemento ao consumo de cereais e tubérculos, principalmente trigo. Pois os cereais são deficientes em alguns aminoácidos essenciais bem como as leguminosas, no entanto, quando consumidas em conjunto consegue-se um equilíbrio e uma maior qualidade nutricional (Boye, Zare e Pletch, 2010; Mudryj, Yu e Aukema, 2014). Além de que o conteúdo proteico das leguminosas é superior, quando comparado com o conteúdo proteico dos cereais (7 a 13%) (Bojňanská *et al.*, 2015), podendo aquelas servir de complemento ao perfil nutricional dos cereais e tubérculos (Hall, Singh e Ehlers, 2011).

A inclusão de leguminosas na dieta tem efeitos fisiológicos benéficos no controlo e prevenção de várias doenças metabólicas, como: diabetes mellitus, pois têm um baixo índice glicémico, contribuindo para um valor estável de açúcar no sangue; doença cardíaca coronária, devido ao facto de serem ricas em gorduras saudáveis e sem colesterol; cancro, onde a fibra alimentar pode ter implicações na sua prevenção (Carbas *et al.*, 2021); anemia, devido ao facto de serem uma fonte de ferro; doença celíaca, pois as leguminosas não contêm glúten (Carbas *et al.*, 2021); correto desenvolvimento do sistema nervoso, pois são uma ótima fonte de folato (vitamina-B) (Mudryj, Yu e Aukema, 2014); regulação do trânsito intestinal, devido ao alto conteúdo de fibra alimentar (Campos-Vega, Loarca-Piña e Oomah, 2010), entre outros efeitos associados à sua composição nutricional.

Além destas características as leguminosas são ricas em lisina (aminoácido essencial), ricas em hidratos de carbono de digestão lenta (Abbas e Ahmad, 2018), apresentam um baixo teor de gorduras, predominando ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico e o ácido linolénico), monoinsaturados e saturados (Caprioli *et al.*, 2016), sem colesterol e são uma fonte de fibra alimentar, vitaminas e minerais (Abbas e Ahmad, 2018).

As leguminosas para além da sua utilização direta como alimento, podem ser moídas de modo a obter farinha para ser utilizada em pão, tortilhas, batatas fritas (Asif *et al.*, 2013); ou usados na forma líquida para produzir substitutos de leites e iogurtes (Lim *et al.*, 2019; Maphosa e Jideani, 2017; Murevanhema e Jideani, 2013). As leguminosas têm, também, sido usadas industrialmente para preparar plásticos biodegradáveis (Pirsa e Sharifi, 2020; Ricci *et al.*, 2018), óleos, gomas e corantes (Saikia *et al.*, 2020).

Além dos benefícios para a saúde humana, as leguminosas, também têm um benefício importante para o planeta uma vez que apresentam um papel importante no ciclo do azoto, pois devido à sua capacidade de estabelecerem relações simbióticas com bactérias do género *Rhizobium* permitem a fixação de azoto atmosférico transferindo-o posteriormente para o solo.

Desta forma, as leguminosas tornam-se fundamentais no ciclo do azoto, contribuindo para a manutenção da qualidade dos solos, minimizando a necessidade do uso de fertilizantes azotados, evitando a poluição dos lençóis freáticos por lixiviação e a poluição das linhas de água por escoamento superficial, o que contribui para a sustentabilidade do planeta, diminuição do impacto sobre o meio ambiente, entre outras vantagens (Castellano-Hinojosa, Nevins e Strauss, 2021).

Uma outra característica importante das leguminosas é que a introdução em rotações agrícolas auxilia na redução do uso de fertilizantes e energia nos sistemas aráveis e consequentemente na redução das emissões de Gases com Efeito de Estufa (GEE) (equivalentes de CO<sub>2</sub>) (Reckling *et al.*, 2014), em cerca de 13,4% das emissões mundiais (Jensen, Carlsson e Hauggaard-Nielsen, 2020).

As leguminosas são assim uma estratégia para um futuro mais sustentável, pois têm uma produção com emissão de menos equivalentes de CO<sub>2</sub>, menor necessidade da quantidade de água quando comparada com a produção de outros alimentos, para além de serem uma fonte de proteína alternativa e mais acessível que a proteína de origem animais (Das *et al.*, 2012).

## **1.2. Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias bioativas que ocorrem amplamente em plantas alimentícias e são consumidas regularmente por um número substancial de pessoas (Nollet e Gutierrez-Urbe, 2018). Estes estão associados à qualidade sensorial e nutricional de alimentos vegetais frescos e processados, como por exemplo, a cor, o gosto, entre outras características (Lacerda De Oliveira, De, Veras De Carvalho e Melo, 2014). Os compostos fenólicos são também antioxidantes naturais (Nollet e Gutierrez-Urbe, 2018).

Os compostos fenólicos surgem como metabolitos secundários sintetizados maioritariamente através do metabolismo do fenilpropanóide, que envolve precursores da via do ácido chiquímico e da via do ácido malónico (la Rosa, de *et al.*, 2019; Takó *et al.*, 2020). Embora ambas as vias participem na biossíntese dos compostos fenólicos nas plantas, a via do ácido chiquímico é a principal responsável pela produção dos precursores da maioria dos compostos fenólicos. No metabolismo fenilpropanóide há a produção de numerosas moléculas, como ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, flavonóides e lenhinas. No entanto, alguns ácidos hidroxibenzóicos são sintetizados diretamente a partir de um intermediário da via do ácido chiquímico (la Rosa, de *et al.*, 2019).

Com base nas suas estruturas químicas, os compostos fenólicos podem ser divididos em diferentes subgrupos, como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lenhinas, estilbenos e cumarinas (Gan *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos desempenham diversas funções no metabolismo celular (Cory *et al.*, 2018). Podem ser encontrados nos níveis tecidual, celular e subcelular das plantas, uma vez que não se encontram uniformemente distribuídos nas plantas. Os compostos fenólicos insolúveis são os componentes das paredes celulares, enquanto os compostos fenólicos solúveis são compartimentados dentro dos vacúolos da célula vegetal (Shahidi e Yeo, 2016). Ao nível do tecido, as camadas externas das plantas contêm níveis mais elevados de compostos fenólicos do que aqueles localizados no interior (Kayitesi, 2013). Os compostos fenólicos da parede celular, como as lenhinas e os ácidos hidroxicinâmicos estão ligados a vários componentes celulares (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013; Saltveit e others, 2017). Estes compostos contribuem para a resistência mecânica das paredes celulares, desempenham um papel regulador no crescimento e morfogênese das plantas e na resposta celular ao stress e aos patógenos (Chalker-Scott e Fuchigami, 2018; Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013; Mnich *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos são um grupo fitoquímico muito vasto que apresenta uma elevada variabilidade estrutural. Estima-se que estão identificados cerca de 8000 compostos fenólicos (Cory *et al.*, 2018) e a característica estrutural comum a estes compostos é a existência de um anel aromático, fenol, que tem pelo menos um grupo hidroxilo (la Rosa, de *et al.*, 2019). Uma vez que se encontram ligados a componentes da parede celular, apenas são extraídos com solventes orgânicos (Awika e Duodu, 2017).

Os compostos fenólicos têm vindo a ganhar interesse em várias áreas, desde bioquímica vegetal, fisiologia (la Rosa, de *et al.*, 2019; Lattanzio, 2013), química organoléptica (Wang, Chambers e Kan, 2018), sendo cada vez mais utilizados na indústria alimentar (Araújo, de *et al.*, 2021) e farmacêutica (Albuquerque *et al.*, 2021). O interesse nestes compostos deriva dos seus efeitos benéficos de promoção da saúde humana (Cory *et al.*, 2018). Estão associados à atividade antioxidante, anticancerígena, antimutagénica e agentes antiglicémica (Dai e Mumper, 2010; Kumar e Goel, 2019; Tanase, Bujor e Popa, 2019; Vinayagam, Jayachandran e Xu, 2016). No entanto, os compostos fenólicos, naturais e sintéticos, também apresentam atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) contra patógenos humanos (Cetin-Karaca e Newman, 2015; Cueva *et al.*, 2010; Khameneh *et al.*, 2019; Mirela *et al.*, 2014; Takó *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2014).

### **1.2.1. Estrutura e Classificação dos Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os não-flavonóides, onde estão incluídos os ácidos fenólicos, aldeídos e álcoois e; os flavonóides, a que pertencem as antocianinas, flavanóis e flavonóis (la Rosa, de *et al.*, 2019), de acordo com a sua complexidade, como compostos monoméricos e poliméricos (la Rosa, de *et al.*, 2019), ou seja, consoante o número de unidades fenol da sua estrutura molecular, grupos substituintes e/ou o tipo de ligação entre as unidades fenol (Cardona *et al.*, 2013).

Podem também ser categorizados pela forma em que ocorrem. Isto é, podem existir na forma solúvel ou ligados. A maioria dos compostos fenólicos solúveis são sintetizados no retículo endoplasmático intracelular das plantas e armazenados em vacúolos. Os compostos fenólicos ligados são formados a partir dos compostos fenólicos solúveis. Estes compostos fenólicos solúveis são transportados para a parede celular e, conseqüentemente, são combinados com macromoléculas da parede celular, como celulose e proteína, por meio de ligações éster e glicosídicas, contribuindo para a formação da parede celular (Agati *et al.*, 2012; Singla *et al.*, 2019).

A maioria dos não-flavonóides tem uma estrutura simples e possui um ou mais grupos hidroxilo e metoxilo diretamente ligados ao anel fenólico. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel fenólico com um ácido carboxílico sendo derivados do ácido hidroxibenzóico ou hidroxicinâmico (Awika e Duodu, 2017). Os aldeídos fenólicos são estruturalmente semelhantes aos ácidos fenólicos, originam-se pela degradação das lenhinas (Rodrigues Pinto, Borges Da Silva e Rodrigues, 2011) e apresentam propriedades antimicrobianas (Lee, Monnappa e Mitchell, 2012; Patra, 2012; Rodrigues Pinto, Borges Da Silva e Rodrigues, 2011).

### **1.2.2. Importância na alimentação humana**

Nos alimentos, os compostos fenólicos têm impacto sobre alguns atributos como, amargor, adstringência, cor, odor e estabilidade oxidativa, que são aceites nos produtos alimentares (la Rosa, de *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos estão intimamente associados à qualidade sensorial, nutricional e funcional de alimentos vegetais frescos e processados (Lacerda De Oliveira, De, Veras De Carvalho e Melo, 2014). Assim sendo, os extratos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais vegetais ricos em compostos fenólicos têm cada vez mais interesse para a indústria alimentar, pois apresentam características que permitem uma melhor conservação dos alimentos. Por exemplo, a capacidade de retardar a peroxidação lipídica (Shahidi e Ambigaipalan, 2015), ou a presença de compostos que apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Papuc *et al.*, 2017), permitindo, assim,

melhorar a qualidade e o valor nutricional dos alimentos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015), bem como efeitos benéficos para a saúde humana (Vladimir-Knežević *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos têm uma capacidade antioxidante elevada, levando à eliminação de radicais livres, são quelantes de metais, inibem a peroxidação lipídica e apresentam várias atividades fisiológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias, antialérgicas, anticancerígenas, entre outras (Anissi *et al.*, 2014; Comunian *et al.*, 2017; Gülçin, 2012; Huyut, Beydemir e Gülçin, 2017; Papuc *et al.*, 2017; Shahidi e Ambigaipalan, 2015; Thatoi, Patra e Das, 2013; Vodnar *et al.*, 2017).

Outro aspeto importante do uso de compostos fenólicos na alimentação advém do facto dos extratos de algumas plantas alimentícias possuírem propriedades antimicrobianas (Kowalska *et al.*, 2017), o que é um aspeto importante, pois o controlo de microrganismos patogénicos nos alimentos é um fator essencial para reduzir os surtos de doenças de origem alimentar (Gyawali e Ibrahim, 2014; Takó *et al.*, 2020).

A preocupação com a segurança dos alimentos (*Food Safety*), por parte dos consumidores, particularmente o uso de hormonas, aditivos como conservantes, entre outros, tem vindo a aumentar (Birch, Memery e Kanakaratne, 2018; Brewer e Rojas, 2008). Isto leva à necessidade de utilizar conservantes seguros, como alternativa aos conservantes químicos em alimentos. Os compostos fenólicos das plantas são assim uma boa alternativa ao uso de conservantes químicos (Saeed *et al.*, 2019).

## 2. Feijão-frade (*Vigna unguiculata*)

O Feijão-frade é uma leguminosa de grão originária do continente africano (Martillanes *et al.*, 2017) e é uma cultura que apresenta inúmeras vantagens para o planeta. O Feijão-frade caracteriza-se como sendo uma leguminosa, que ao nível da sua componente agronómica, é importante para a sustentabilidade de sistemas agrícolas nos trópicos e, em geral, nas regiões áridas devido à sua elevada tolerância à seca e capacidade de crescimento em solos de baixa fertilidade (Carvalho *et al.*, 2017; Oyeyinka e Oyeyinka, 2018).

As alterações climáticas têm consequências a longo prazo, prevendo-se que irão causar mudanças nas áreas de produção e na ocorrência de pragas e doenças (FAO, 2012; WHO, 2021). Estima-se que a população global irá alcançar 9 mil milhões de pessoas em meados do século XXI, portanto, será necessário aumentar substancialmente, cerca de 70 a 100% a produção de alimentos (United Nations, 2019). Os impactos negativos das mudanças climáticas na produção de alimentos poderiam ser mitigados pelo desenvolvimento de novas variedades de culturas, com maior tolerância a elevadas temperaturas, seca, baixa fertilidade do solo e resistência a pragas e doenças (Vidigal, Romeiras e Monteiro, 2019).

O Feijão-frade é, assim, uma das culturas mais importantes a nível de segurança alimentar (*Food Security*) e a nível nutricional pois, para além, de ser uma das principais fontes de proteína para milhões de pessoas nos países em desenvolvimento (Boukar *et al.*, 2019; Lonardi *et al.*, 2019), a seguir ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e ao grão de bico (*Cicer arietinum*) (FAO, 2014), é uma cultura que apresenta características importantes para a diversificação da dieta e ingredientes alimentares alternativos nas regiões desenvolvidas ou em relação às alterações climáticas (Awika e Duodu, 2017).

### 2.1. Caracterização Botânica, Morfológica e Fisiológica

O Feijão-frade conhecido botanicamente por *Vigna unguiculata*, é uma leguminosa que pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae e género *Vigna* (Baudoin e Maréchal, 2011; Pasquet e Padulosi, 2013; Singh, 2014).

*Vigna* é um género pantropical e altamente variável com várias espécies, o número varia de 84 a 184 (Timko, Ehlers e Roberts, 2007). O género *Vigna* foi subdividido em sete subgéneros: *Vigna*, *Sigmoidotropis*, *Plectotropis*, *Macrophynca*, *Ceratotropis*. O subgénero *Vigna* foi subdividido em seis seções: *Vigna*, *Comosae*, *Macrodontae*, *Reticulatae*, *Liebrechtsia* e *Catiang*. O Feijão-frade pertence à seção *Catiang* que, segundo Steele e Mehra (1980) e Verdcourt (1970) consistia em cinco espécies, *V. unguiculata*, *V. pubescence*, *V. augustifoliolata*, *V. tenuis* e *V. nervosa*. No entanto, Verdcourt (1970) reduziu estes a apenas

duas espécies, *V. unguiculata* e *V. nervosa* e classificou os outros em subespécies de *V. unguiculata*.

O Feijão-frade é uma cultura herbácea de estação quente, anual, que requer temperaturas, pelo menos, de 18 °C em todos os seus estágios de desenvolvimento, tendo uma temperatura ideal de crescimento de 28 °C (Gupta, Gupta e Kumar, 2021), é tolerante à seca, estando adaptado às regiões mais secas dos trópicos (Carvalho *et al.*, 2017; Karapanos *et al.*, 2017), onde outras leguminosas alimentares não têm tão bom desempenho. Esta cultura é tolerante à baixa fertilidade dos solos, devido à sua elevada capacidade de fixar azoto atmosférico através dos seus nódulos que resultam da simbiose com *Rhizobium* (Boukar *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2019), o que do ponto de vista da produtividade agrícola é importante como cultura rotativa com cereais pela sua capacidade de restabelecer a fertilidade dos solos (Carsky, Vanlauwe e Lyasse, 2010). É uma cultura que tem a capacidade de resistir a condições de solo ácido e alcalino (Martillanes *et al.*, 2017), tem um bom crescimento em solos pobres, com mais de 85% de areia e com menos de 0,2% de matéria orgânica e baixos níveis de fósforo (Martillanes *et al.*, 2017; Simion, 2018). O Feijão-frade é uma planta de dia curto ou, em alguns casos, de dia neutro, ou seja, é uma planta que para que ocorra floração é, apenas, necessário ficar exposta à iluminação por um tempo inferior ao seu fotoperíodo crítico ou então florescem independentemente do período de luz ou escuro ao qual são expostas, respetivamente (Santos, 2021; Sysoeva, Markovskaya e Shibaeva, 2010). Ou seja, é uma planta tolerante à sombra e, portanto, compatível de plantar em consórcio com milho, milho, sorgo, cana-de-açúcar e algodão, bem como com várias culturas de plantio, por exemplo, formando assim uma componente valiosa dos sistemas de cultivo tradicionais (Simion, 2018).

O revestimento da semente varia em textura (por exemplo, liso, áspero ou enrugado), cor (por exemplo, branco, creme, verde, amarelo-claro, vermelho, castanho, preto) e uniformidade (por exemplo, sólido, salpicado ou padronizado). As variedades de Feijão-frade mais conhecidas, denominadas como “ervilha-preta” e “pinkeye”, apresentam sementes brancas com uma área preta arredondada ou vermelha pigmentada de formato irregular circundando o hilo que dá à semente a aparência de um olho (Simion, 2018).

## 2.2. Importância Agronômica, Econômica e Social

O Feijão-frade é uma das leguminosas alimentares e forrageiras mais importantes nos trópicos semiáridos que incluem partes da Ásia, África, Sul da Europa, nomeadamente na Bacia do Mediterrâneo, Sul dos Estados Unidos e América Central e do Sul, sendo uma cultura multifuncional, fornecendo alimento quer para o Homem quer para ração animal (Simion, 2018).

A nível nacional, o Feijão-frade é, maioritariamente, cultivado a partir de variedades locais (*landraces*), e, ao longo de várias gerações, foram selecionadas as culturas mais adaptadas às suas condições geográficas. As inúmeras *landraces* de Feijão-frade resultam numa diversidade genética desta cultura que requer ser preservada (Karapanos *et al.*, 2017). À medida que se adotaram práticas de monocultura agrícola, muita da variabilidade existente foi perdida, diminuindo, por exemplo, a riqueza bioativa desta cultura. É importante reverter esta situação, para preservar a variabilidade genética que poderá ser essencial nos processos de melhoramento da espécie (Liu, Kuchma e Krutovsky, 2018).

O Feijão-frade é uma leguminosa com uma elevada importância para a subsistência de milhões de pessoas em países menos desenvolvidos. Pode ser consumido de várias formas, como por exemplo, folhas jovens, vagens verdes e sementes verdes que são usadas como vegetais, e as sementes secas são usadas em várias preparações alimentares, sendo este o principal produto da planta utilizado para a alimentação humana. As folhas são consumidas em países da África Oriental, as sementes verdes são consumidas no sudeste dos Estados Unidos e no Senegal, as vagens verdes são, normalmente, consumidas nas regiões húmidas da Ásia e das Caraíbas. A cultura também é usada para adubo verde, por exemplo no sudeste dos Estados Unidos da América e Austrália, e como forragem em algumas partes do Sahel (Simion, 2018).

As sementes e as folhas são constituídas por cerca de 25% de proteína (com base na massa seco) (Carsky, Vanlauwe e Lyasse, 2010), sendo uma razão pela qual o Feijão-frade é uma importante fonte de proteína, nos países em desenvolvimento (Hall, Singh e Ehlers, 2011) quando os produtos de origem animal escasseiam. Estas são frequentemente colhidas e secas para armazenamento e consumo num momento posterior, ou depois de serem moídas como farinhas (Hall, Singh e Ehlers, 2011).

### **2.3. Caracterização Nutricional**

A composição nutricional do grão de Feijão-frade é semelhante à composição de outras leguminosas, como por exemplo, do Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Gonçalves *et al.*, 2016). Esta leguminosa apresenta um teor relativamente baixo de gordura e por oposição o teor de proteína é elevado, podendo ser este teor duas a quatro vezes superior ao teor de proteína presente nas culturas de cereais e tubérculos. Identicamente às outras leguminosas, as proteínas das sementes de Feijão-frade são ricas em alguns aminoácidos essenciais, como, lisina (Gonçalves *et al.*, 2016) e triptofano quando comparadas com os grãos de cereais, mas baixas em metionina e cisteína quando comparadas às proteínas animais (Petchiammal e Hopper, 2014); são também uma fonte de minerais e vitaminas e, entre as plantas, são das leguminosas que apresentam um dos maiores teores de ácido fólico, por exemplo (Simion, 2018).

O Feijão-frade é também uma fonte de hidratos de carbono, fibra solúvel e insolúvel e minerais apresentando baixos níveis de fatores anti-nutricionais (Sombié *et al.*, 2018), como inibidores de proteases, fitatos, entre outros (Gonçalves *et al.*, 2016). Um atributo interessante desta leguminosa é o facto de ser uma fonte de compostos bioativos considerados antioxidantes naturais (Mudryj *et al.*, 2012), podendo ter um papel importante em processos celulares como expressão génica, apoptose, sinalização intercelular e, possivelmente, possuir efeitos anticancerígenos (Das *et al.*, 2012) .

A eventual inclusão de folhas de feijão-frade numa dieta alimentar pode também ser uma mais valia ao nível nutricional, uma vez que as folhas do Feijão-frade são também uma boa fonte de proteínas, com um teor mais elevado nas folhas mais jovens (Simion, 2018), compostos funcionais (aminoácidos, polifenóis e carotenóides), vitaminas (pró-vitamina A, folato, tiamina, riboflavina e vitamina C) e minerais (cálcio, fósforo e ferro) (Gonçalves *et al.*, 2016).

### **2.4. Compostos Bioativos**

Além dos benefícios nutricionais do Feijão-frade, este também é rico em compostos bioativos importantes que podem beneficiar a saúde humana de várias maneiras. Os compostos bioativos mais importantes presentes no Feijão-frade são os compostos fenólicos, que se concentram principalmente no tegumento (Sombié *et al.*, 2018), com alguns perfis que não se encontram noutras leguminosas, bem como os péptidos bioativos (Awika e Duodu, 2017). Estes compostos são relevantes, não apenas pelas suas propriedades benéficas para a saúde, mas também porque a sua composição influencia diretamente a seleção e uso do

Feijão-frade em diferentes culturas, principalmente devido ao seu efeito na cor do tegumento (Awika e Duodu, 2017).

Os principais compostos fenólicos comuns a todas as variedades de Feijão-frade são compostos fenólicos derivados de ácidos fenólicos e os flavonóides (Ojwang, Dykes e Awika, 2012). Algumas variedades de Feijão-frade contêm, também, antocianinas, flavan-3-óis e flavonóis com um perfil único de compostos fenólicos (Ojwang *et al.*, 2013; Ojwang, Dykes e Awika, 2012), o que implica que eles podem fornecer propriedades bioativas exclusivas que complementam outras *commodities* alimentares (alimentos consumidos devido às suas propriedades nutricionais, como, arroz e cereais, ovos e produtos lácteos, frutas e legumes, entre outros) (Awika e Duodu, 2017).

Uma vez que os compostos fenólicos são responsáveis pela maior parte da coloração das sementes de Feijão-frade (Ojwang, Dykes e Awika, 2012), a relação entre a cor do tegumento e o perfil fenólico é bastante analisada, uma vez que a estrutura e composição fenólica afeta diretamente os mecanismos específicos de prevenção de doenças, sendo uma característica que afeta a escolha do Feijão-frade para uso alimentar em diferentes regiões, e por sua vez influencia a biodisponibilidade de nutrientes (especialmente proteínas e minerais) (Awika e Duodu, 2017).

Os péptidos bioativos e os compostos fenólicos do Feijão-frade, parecem ter efeito anti-inflamatório significativo e benefícios contra o cancro, diabetes e doenças cardiovasculares, com potenciais interações sinérgicas significativas (Quansah *et al.*, 2013; Segura-Campos, Chel-Guerrero e Betancur-Ancona, 2011). Diferentes autores têm também atribuído efeitos antimicrobianos ao Feijão-frade (Ashraduzzaman *et al.*, 2016; Cicero, Fogacci e Colletti, 2017; Hancock, Haney e Gill, 2016; Kritzinger, Lall e Aveling, 2005; Lenny e Rizky, 2020). O perfil fenólico tem um grande impacto sobre estas propriedades. As diferentes variedades podem, portanto, ser selecionadas para benefícios específicos. Além disso, o crescente interesse em dietas com alto teor de proteínas vegetais, novos e diversos ingredientes alimentares e alimentos naturais promotores da saúde em regiões desenvolvidas, sugere que o Feijão-frade provavelmente desempenhará um papel cada vez maior como ingrediente em aplicações modernas de alimentos, não esquecendo as vantagens agronômicas, benefícios nutricionais e para a saúde que este acarreta (Awika e Duodu, 2017).

### **2.4.1. Compostos Fenólicos**

O grão pode apresentar diversas colorações, desde branco a preto, passando pelo creme, salmão, vermelho e cinzento, devido à presença dos compostos fenólicos. São os fenótipos de coloração mais avermelhada que têm tendência a apresentar valores mais elevados de compostos fenólicos, enquanto que as variedades mais claras tendem a apresentar concentrações inferiores (Awika e Duodu, 2017). No entanto, pode haver exceções, pois pode não existir qualquer relação direta entre a cor do grão e o conteúdo fenólico, o que significa que em alguns casos variedades claras podem apresentar um teor fenólico mais elevado que variedades mais escuras (Ojwang, 2012).

Apesar de a concentração e o tipo de compostos fenólicos variar com o fenótipo do grão, por norma, o teor fenólico presente no Feijão-frade é bastante elevado quando comparado com outras leguminosas. Os compostos fenólicos característicos desta leguminosa são, ácidos fenólicos, flavonóis, taninos e antocianinas (Awika e Duodu, 2017).

#### **Ácidos Fenólicos**

Nas sementes de Feijão-frade, os ácidos fenólicos (148 a 1176 µg/g) (Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003) são um componente principal dos compostos fenólicos totais (Dueñas *et al.*, 2005; Nderitu *et al.*, 2013).

O perfil dos ácidos fenólicos do Feijão-frade é constituído, principalmente, por derivados de ácidos protocatecuico, ferúlico e p-cumárico (Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas *et al.*, 2005; Moloto *et al.*, 2020), ácido p-hidroxibenzóico (Avanza *et al.*, 2021), ácido gálico, ácido vanílico (Dueñas *et al.*, 2005), ácido benzoico (Moloto *et al.*, 2020), ácido cafeico e ácido cinâmico (Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003), no entanto, o perfil de ácidos fenólicos varia consideravelmente dependendo do fenótipo (Hachibamba *et al.*, 2013; Nderitu *et al.*, 2013).

Sabe-se que os ácidos fenólicos contribuem para as propriedades antioxidantes atribuídas às leguminosas (Xu e Chang, 2009). No entanto, é também provável que estes tenham benefícios importantes na saúde, tanto os ácidos fenólicos do Feijão-frade assim como o de outras leguminosas (Awika e Duodu, 2017).

#### **Flavonóides**

No Feijão-frade e em outras leguminosas, os flavonóides estão amplamente concentrados no tegumento e por consequência têm um grande impacto na cor do tegumento (Ojwang, Dykes e Awika, 2012), o que é bastante importante porque influencia diretamente a escolha do

Feijão-frade e outras variedades de leguminosas para uso alimentar em várias partes do mundo (Awika e Duodu, 2017).

Os flavonóides são componentes muito importantes dos alimentos, pois apresentam importantes benefícios para a saúde, estando relacionados com o seu efeito direto ou indireto sobre o stress oxidativo, as interações com vários recetores e enzimas associadas à prevenção de doenças (González *et al.*, 2011; Yang, Allred e Awika, 2014), entre outras. Assim sendo, a estrutura que estes compostos apresentam têm um grande impacto na forma como vão influenciar vias bioquímicas específicas relevantes para a saúde. No Feijão-frade as principais classes de flavonóides presentes são flavonóis, flavan-3-ols e antocianinas (Cui *et al.*, 2012; Dueñas *et al.*, 2005; Nderitu *et al.*, 2013; Ojwang *et al.*, 2013; Ojwang, Dykes e Awika, 2012).

### **Flavonóis**

Os flavonóis são flavonóides encontrados em praticamente todos os fenótipos de Feijão-frade (Ojwang, Dykes e Awika, 2012). Os compostos mais importantes são os derivados da quercetina (Moloto *et al.*, 2020; Ojwang, Dykes e Awika, 2012; Wang *et al.*, 2008), kaempferol (Avanza *et al.*, 2021; Kritzinger, Lall e Aveling, 2005; Lattanzio *et al.*, 1997), miricetina (Dueñas *et al.*, 2005). A quantidade presente deste composto no Feijão-frade varia de 27 a 1060 µg/g, sendo que se altera consoante as características fenotípicas da semente do feijão (Ojwang, Dykes e Awika, 2012).

### **Flavan-3-ols**

Os Flavan-3-ols, também conhecidos por flavanóis, têm a capacidade de se ligar diretamente a proteínas e a hidratos de carbono, reduzindo assim a sua biodisponibilidade e, indiretamente, reduzem a digestão e o transporte de nutrientes ao inibir enzimas digestivas e proteínas transportadoras da membrana (Gonçalves, Mateus e Freitas, de, 2011). Podem também ligar-se aos minerais, reduzindo a sua absorção (Kruger *et al.*, 2013).

Os taninos, são as formas poliméricas desta família de compostos, são igualmente conhecidos como antioxidantes com propriedades de promoção da saúde (Tian *et al.*, 2012). Estes têm um particular interesse porque apresentam um grande potencial para serem utilizados como ingredientes naturais para reduzir a carga calórica dos alimentos devido à sua capacidade de se ligarem aos hidratos de carbono e às proteínas (Amoako e Awika, 2016, 2016; Barros, Awika e Rooney, 2012; Dunn *et al.*, 2015). Sugere-se que o Feijão-frade contenha um perfil único de taninos que pode ser favorável para a promoção da saúde com

propriedades "anti-nutricionais" reduzidas (Awika e Duodu, 2017), podendo funcionar de maneiras diferentes quando comparados com o perfil de taninos de outras leguminosas (Awika e Duodu, 2017). Apenas algumas variedades é que contém estes compostos, tendo uma concentração de 2155 a 6297 µg/g (Awika e Duodu, 2017), sendo que são os derivados de catequina, procianidina, os compostos que fazem parte deste perfil (Avanza *et al.*, 2021; Awika e Duodu, 2017; Cui *et al.*, 2012; Nderitu *et al.*, 2013).

## **Antocianinas**

As antocianinas são compostos que conferem a maioria da coloração das folhas, flores, frutos, sementes (Ojwang, Dykes e Awika, 2012). No Feijão-frade, estes compostos foram detetados em algumas variedades (875 a 3860 µg/g), sendo que as antocianinas dominantes são delfinidina-3-O-glucosídeo e cianidina-3-O-glucosídeo (Ojwang, Dykes e Awika, 2012), e alguns derivados de petunidina, peonidina e malvidina (Ojwang *et al.*, 2013).

Resumidamente, os compostos fenólicos estão presentes na composição do Feijão-frade, sendo que consoante a variedade e a parte em análise, o perfil de compostos fenólicos é diferente. Na Tabela 1 estão indicados os perfis fenólicos do grão, folhas e vagens do Feijão-frade.

### **2.4.2. Péptidos Bioativos**

A maioria das proteínas presentes nas leguminosas são proteínas de reserva, que servem sobretudo como nutriente para a germinação da semente (Awika e Duodu, 2017). No entanto, as lectinas (aglutininas) ( $3 \times 10^{-5}$  unidades de atividade hemaglutinante (HU) kg<sup>-1</sup>) (Campos-Vega, Loarca-Piña e Oomah, 2010), inibidores de protease (10,6 g de tripsina e 9,2 g de quimiotripsina inibida por kg<sup>-1</sup>) (Campos-Vega, Loarca-Piña e Oomah, 2010), fatores anti-nutricionais, fazem parte da composição do perfil das proteínas do Feijão-frade, que se acredita terem a função de proteger a semente contra pragas, e que podem ter efeitos potencialmente benéficos contra a inflamação (Cicero, Fogacci e Colletti, 2017), prevenção de cancro (Cicero, Fogacci e Colletti, 2017; Domínguez-Perles *et al.*, 2016), obesidade (Moreno-Valdespino *et al.*, 2020), atividade antimicrobiana (Cicero, Fogacci e Colletti, 2017; Hancock, Haney e Gill, 2016), prevenção de diabetes (Barnes, Uruakpa e Udenigwe, 2015), atividade antioxidante (Marques *et al.*, 2015; Roy, Boye e Simpson, 2010; Segura-Campos, Chel-Guerrero e Betancur-Ancona, 2011), entre outras.

**Tabela 1** – Caracterização Fenólica de extratos de Feijão-frade (grão, folha e vagem).

Família do Composto	Composto	Solvente de Extração	Presença nos extratos			Referência
			Grão	Folha	Vagem	
Ácidos Fenólicos	Ácido p-Hidroxibenzóico e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
	Ácido p-Cumárico e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
		Etanol		X		(Moloto <i>et al.</i> , 2020)
	Ácido Ferúlico e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol			X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
		Etanol		X		(Moloto <i>et al.</i> , 2020)
	Ácido Gálico	Metanol	X			(Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
	Ácido Vanílico	Metanol	X			(Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
	Ácido Protocatecuico e seus derivados	Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
Ácido Cafeico	Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003)	
Ácido Cinâmico	Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003)	
Ácido Benzoico e seus derivados	Etanol		X		(Moloto <i>et al.</i> , 2020)	

<i>Flavan-3-ols</i>	Catequina e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Etanol	X			(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
		Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Cui <i>et al.</i> , 2012)
	Procianidina e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Etanol	X			(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
<i>Flavonóis</i>	Quercetina e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Metanol	X			(Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin, 2003; Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
		Metanol e Etanol		X		(Lattanzio <i>et al.</i> , 1997)
		Etanol		X		(Moloto <i>et al.</i> , 2020)
	Miricetina e seus derivados	Acetona	X			(Nderitu <i>et al.</i> , 2013)
		Metanol	X			(Dueñas <i>et al.</i> , 2005)
		Etanol	X			(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
	Kaempferol	Etanol	X		X	(Avanza <i>et al.</i> , 2021)
		Metanol	X			(Cui <i>et al.</i> , 2012)
Metanol e Etanol			X		(Lattanzio <i>et al.</i> , 1997)	
<i>Antocianinas</i>	Delfinidina e derivados	Acetona	X			(Ojwang <i>et al.</i> , 2013)
	Cianidina e derivados	Acetona	X			(Ojwang <i>et al.</i> , 2013)
	Petunidina e derivados	Acetona	X			(Ojwang <i>et al.</i> , 2013)
	Peonidina e derivados	Acetona	X			(Ojwang <i>et al.</i> , 2013)
	Malvidina e derivados	Acetona	X			(Ojwang <i>et al.</i> , 2013)

## 2.5. Propriedades Bioativas

### Propriedades Antimicrobianas

Os microrganismos patogênicos são capazes de causar doenças graves em humanos e animais (Newell *et al.*, 2010). Alguns fungos patogênicos infestam a semente durante o armazenamento e produzem micotoxinas que, quando ingeridas, podem causar toxicidades agudas e crônicas em humanos e animais (Perdoncini *et al.*, 2019). Já os patógenos bacterianos podem estar presentes em alimentos e águas, e quando são ingeridos podem causar doenças graves (Bintsis, 2017). O uso de extratos de plantas é uma hipótese alternativa ao uso de conservantes alimentares, particularmente no caso da existência de resistência a conservantes por parte dos microrganismos. Muitos dos extratos de plantas contêm compostos secundários, como péptidos bioativos e compostos fenólicos, que têm um efeito inibitório sobre bactérias e fungos patogênicos (Pagare *et al.*, 2015; Rehman e Khan, 2017; Sharma e Kaushik, 2020; Shashirekha, Mallikarjuna e Rajarathnam, 2015; Sitohy *et al.*, 2013; Tak e Kumar, 2020; They e Arendt, 2018).

A inibição por compostos fenólicos varia de composto para composto uma vez que apresentam estruturas e composições químicas diferentes. Alguns dos efeitos antimicrobianos destes compostos podem ser a permeabilização e destabilização da membrana plasmática, a inibição de enzimas extracelulares, a inibição do metabolismo energético, entre outros (Górniak, Bartoszewski e Króliczewski, 2019; Quideau *et al.*, 2011). No entanto, pensa-se que a presença dos grupos OH pode ser o elemento essencial para estas atividades (Figueiredo *et al.*, 2008). O grupo OH é bastante reativo e pode facilmente formar ligações de hidrogênio com os centros ativos das enzimas, levando à inibição de certas reações enzimáticas ou síntese enzimática, na célula microbiana (Jeong *et al.*, 2009).

No entanto, o grau de hidroxilação dos compostos fenólicos pode não influenciar a atividade antimicrobiana destes (Figueiredo *et al.*, 2008). O mecanismo de ação pode ocorrer a partir do ambiente extracelular ou ser limitado pela capacidade de atravessar a membrana celular (Khameneh *et al.*, 2019; Papuc *et al.*, 2017), o que sugere que a polaridade das moléculas pode não explicar, por si só, as diferenças de toxicidade dos compostos (Figueiredo *et al.*, 2008). No entanto, a lipofilicidade é um fator importante na toxicidade destes compostos (Gyawali e Ibrahim, 2014). Esta característica apresenta interações diferentes de bactéria para bactéria, assim como, a componente da célula com que está a interagir.

## **Interação com a Parede Celular**

Os compostos fenólicos interagem de maneira diferente com as bactérias gram-negativas e gram-positivas, sendo as diferenças na composição da parede celular responsáveis por esta diferença (Brown *et al.*, 2015). A parede celular desempenha um papel de proteção osmótica, sendo por isso uma componente essencial da célula. O que significa que qualquer dano na parede celular comprometerá a viabilidade da célula, diminuição da tolerância da célula a elevada força iônica e baixa pressão osmótica (Papuc *et al.*, 2017).

Nas bactérias gram-negativas, a parede celular é composta por uma fina camada de peptidoglicano e membrana externa. Esta membrana é composta por uma bicamada fosfolipídica e proteínas, sendo que a parte externa é composta por lipopolissacáridos (LPS). Nas bactérias gram-positivas não existe a presença da membrana externa o que significa que as paredes celulares são compostas por uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos teicócos (Brown *et al.*, 2015). Ou seja, as bactérias gram-negativas apresentam maior resistência aos compostos fenólicos (Nohynek *et al.*, 2006) , pois os LPS impedem as ligações dos compostos fenólicos às camadas de peptidoglicano destes microrganismos (Cui *et al.*, 2012).

Uma propriedade importante das bactérias gram-negativas é a sua aderência ao tecido do hospedeiro por meio de pequenos filamentos, as fímbrias. Os compostos fenólicos inibem a ligação das fímbrias aos recetores específicos das células bacterianas (Hisano *et al.*, 2012).

## **Interação com a Membrana Celular**

Os compostos fenólicos têm a capacidade de interagir com as proteínas e/ou fosfolípidos da bicamada lipídica da membrana celular. Nas bactérias gram-negativas, a interação com as proteínas da membrana leva à rutura da bicamada lipídica, aumentando a permeabilidade da membrana, afetando a sua fluidez, inibindo a respiração e alterando os processos de transporte de iões (Nazzaro *et al.*, 2013). Hashimoto *et al.* (1999) concluíram que, com o aumento do número de grupos OH, há a diminuição da hidrofobia dos compostos fenólicos, ou seja, diminui a afinidade para a bicamada lipídica.

Relativamente aos fungos, o mecanismo de ação dos compostos fenólicos consiste em inibir a germinação de conídios (Salas *et al.*, 2011), formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas, inibir vias enzimáticas (Arif *et al.*, 2011) e promover a rutura da membrana devido às características lipofílicas dos compostos fenólicos (Arif *et al.*, 2011).

À semelhança do que foi anteriormente descrito, o aumento do grau de hidroxilação resulta num aumento de toxicidade dos compostos, apresentando estes maior capacidade inibitória (Arif *et al.*, 2011).

Sabe-se que, ao longo do tempo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para se defenderem de pragas, patogenos e stresses abióticos (Beer, de e Vivier, 2011; Lacerda *et al.*, 2014). As componentes dos mecanismos de defesa das plantas são péptidos antimicrobianos ricos em cisteína (Stotz, Thomson e Wang, 2009). A atividade antibacteriana por parte dos péptidos pode depender das pontes de enxofre intramoleculares (Zhao *et al.*, 2016), da permeabilização da membrana das células (Matsuzaki, 2019), da inibição da síntese de ácidos nucleicos, síntese de proteínas, atividade enzimática e síntese da parede celular (Brogden, 2005) e da modificação dos fluxos de iões (El-Mounadi *et al.*, 2016).

Nos fungos, os péptidos podem levar à ativação/inativação de vias enzimáticas (Kavanagh e Dowd, 2010; They e Arendt, 2018); lise da célula (Weerden, Van Der, Bleackley e Anderson, 2013); inibição da germinação de conídios ou indução da apoptose das células (El-Mounadi *et al.*, 2016); levar à permeabilização da membrana (Weerden, van der, Lay e Anderson, 2008) e à alteração do fluxo de iões (They e Arendt, 2018).

Relativamente às proteínas e péptidos bioativos presentes nesta leguminosa, também apresentam atividade antimicrobiana em relação a algumas espécies de microrganismos.

Carvalho *et al.* (2001) identificaram dois péptidos antimicrobianos ricos em cisteína e proteínas de transferência de lípidos (LTP) presentes nas sementes de Feijão-frade que mostraram impedir o desenvolvimento dos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani* bem como causavam alterações morfológicas nas hifas dos fungos.

Chikane, Parwate e Ingle (2010) analisaram a atividade antimicrobiana das sementes de Feijão-frade. A determinação da atividade antimicrobiana também permitiu concluir se o processo de conservação por irradiação teria influência na inibição encontrada. Verificaram que os extratos das sementes não irradiadas mostraram ter mais atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumonia*, quando comparados com os extratos de sementes irradiadas. Sendo que *S. aureus* e *E. coli* foram as bactérias que apresentaram maior sensibilidade aos extratos de Feijão-frade não irradiado.

O péptido antimicrobiano presente nas sementes de Feijão-frade, Cp-tionina II, apresenta atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, e gram-

negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae* (Franco *et al.*, 2006), assim como, atividade antifúngica contra *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* (Thery e Arendt, 2018). Segundo Thery e Arendt (2018) o péptido sintético análogo ao péptido Cp-tionina II, KT43C, apresenta atividade antifúngica. Este péptido diminuiu o crescimento fúngico sem induzir alterações morfológicas nas hifas fúngicas.

Um estudo recente determinou que globulinas (7S e 11S) isoladas das sementes de Feijão-frade apresentam atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e para bactérias gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella*. Os mecanismos de ação das globulinas foram visualizados por sinais de deformação celular, lise parcial e completa de componentes celulares das bactérias *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*, por exemplo, utilizando a globulina 11S como agente antibacteriano (Abdel-Shafi *et al.*, 2019). Verificou-se que estes mecanismos se devem ao facto de as globulinas apresentarem cargas positivas que por meio de ligações eletrostáticas com os componentes celulares bacterianos, comprometem a integridade das células (Sitohy *et al.*, 2013; Sitohy e Osman, 2010).

Abdel-Shafi *et al.* (2019) também estudaram a ação da globulina 11S quando esta foi inoculada em determinados alimentos como carne picada. Verificou-se que houve diminuição considerável nas contagens bacterianas de psicrotóxicos e coliformes, concluindo-se que o uso de extratos de Feijão-frade ricos em globulina, terá sucesso no futuro como conservante alimentar.

### **3. Microrganismos Patogénicos e Contaminantes de Origem Alimentar**

As doenças de origem alimentar constituem um problema de saúde a nível mundial. As bactérias patogénicas e/ou toxinas microbianas podem entrar no organismo através de alimentos ou água contaminados (Takó *et al.*, 2020).

Certos patógenos alimentares podem sobreviver a fatores adversos, como a diferentes gamas de temperaturas, ambientes ácidos, elevados teores de sal e podem ainda ter a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas. Estas propriedades podem facilitar o seu crescimento e a sua propagação em superfícies de contacto com alimentos (Mokrani, Nabti e Cruz, 2020).

Alguns destes patógenos alimentares têm vindo a tornar-se tolerantes aos métodos convencionais utilizados na conservação dos alimentos (Gyawali e Ibrahim, 2014).

A crescente preocupação dos consumidores com a saúde, ao pôr em causa a utilização de conservantes químicos nos alimentos, incentivou os investigadores a procurarem alternativas naturais com elevado potencial antimicrobiano. Estas substâncias podem ser utilizadas como conservantes e poderão melhorar a vida útil dos produtos. Algumas das substâncias que têm sido alvo de investigação são os compostos fenólicos presentes nas plantas (Takó *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos podem inibir o crescimento e atividade de microrganismos patogénicos alimentares, como bactérias, fungos e protozoários (Daglia, 2012; Li *et al.*, 2014; T.J. Schmidt *et al.*, 2012). Alguns dos efeitos que estes compostos podem apresentar são ao nível da permeabilização e desestabilização da membrana plasmática ou de inibição da síntese de enzimas extracelulares (Górniak, Bartoszewski e Króliczewski, 2019).

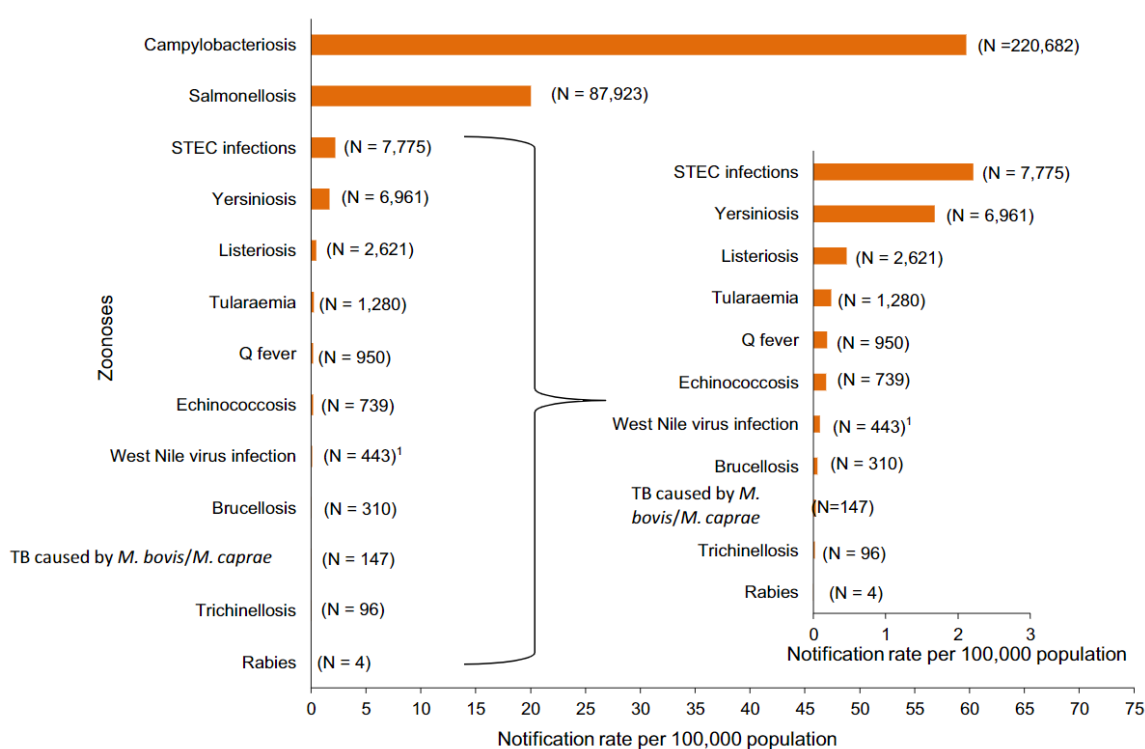
Os compostos fenólicos são compostos por grupos hidroxilo e o seu número influencia as propriedades antioxidantes. A mudança de posição do grupo hidroxilo pode desempenhar um papel importante na atividade antimicrobiana destes compostos (Figueiredo *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos podem suprimir vários aspetos dos microrganismos, como por exemplo, inibir a formação de biofilmes, reduzir a aderência ao hospedeiro, neutralizar toxinas bacterianas, entre outros (Górniak, Bartoszewski e Króliczewski, 2019).

### 3.1. Bactérias

As doenças causadas pela ingestão de alimentos e águas contaminados são um problema importante relativamente à saúde pública, tendo maior incidência o caso de infeções alimentares de origem microbiana (Newell *et al.*, 2010).

As zoonoses mais relatadas em humanos, em 2019, foram a campilobacteriose e a salmonelose (Figura 1). Durante o período de 2015 a 2019 o número de casos confirmados destas duas doenças manteve-se estável (EFSA, 2021).

A infeção por *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) foi a terceira zoonose mais relatada, onde houve um aumento entre o período de 2015 a 2019. Tal como ocorreu com doenças causadas por *Campylobacter* e *Salmonella*, a tendência de casos confirmados de listeriose permaneceu estável entre 2015 a 2019 após um longo período de aumento, sendo a quinta zoonose mais relatada (EFSA, 2021) (Figura 1).



**Figura 1** – Número de casos reportados de doenças com origem zoonótica na EU em 2019.

Fonte: EFSA, 2021.

As bactérias *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* e *Salmonella* estão ligadas a doenças transmitidas por alimentos (Newell *et al.*, 2010). Produtos naturais compatíveis com alimentos não tóxicos podem ser úteis para reduzir patógenos em superfícies de frutas e vegetais e em

conservantes alimentares, como sumos de frutas e vegetais, para desinfeção de carcaças ou para minimizar a contaminação destes alimentos durante o armazenamento e durante o processamento comercial e doméstico (Dwivedi *et al.*, 2017).

O controlo do crescimento bacteriano nos alimentos é um fator importante para reduzir os surtos de origem alimentar (Gyawali e Ibrahim, 2014; Takó *et al.*, 2020).

### **3.1.1. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva pertencente à família *Listeriaceae* que pode crescer na presença ou na ausência de oxigénio. As células têm a forma de pequenos bastonetes, a sua mobilidade é conferida por flagelos, que entre 20 a 25 °C são produzidos mas a 37 °C já não. É um microrganismo muito resistente à congelação, desidratação e ao calor. A sua atividade hemolítica em agar de sangue é uma das características que, juntamente com outras características bioquímicas, permite distinguir *L. monocytogenes* das outras espécies pertencentes ao género *Listeria* (Batt, 2014).

*L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica de distribuição ubiqüitária, responsável por casos isolados e por surtos de listeriose em humanos e em animais. É essencialmente transmitida através do consumo de alimentos contaminados, durante o processo de fabrico do alimento, da contaminação do recém-nascido pela mãe e pelo contacto com animais infetados.

Os surtos de listeriose estão associados ao consumo de diversos alimentos como saladas, patés, queijos, leite pasteurizado, camarões e manteiga. No entanto, os produtos que representam um maior risco são aqueles cujo processo de fabrico não inclui qualquer etapa de redução/eliminação de *L. monocytogenes* e cujas matérias-primas apresentam elevada incidência/concentração da bactéria, como o leite cru, os lacticínios produzidos com leite cru, peixe fumado e alguns enchidos (FDA, 2019). *L. monocytogenes* apresenta a particularidade de crescer à temperatura de refrigeração (Batt, 2014), ou seja, os alimentos cujas características permitem o crescimento da bactéria e que apresentam um tempo de prateleira longo, mesmo que em temperaturas de refrigeração, merecem particular atenção (FDA, 2019).

### **3.1.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. As células têm a forma de bastonetes e apresentam mobilidade ou não por flagelos. As estirpes de *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e

capsulares (K). Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenham um papel importante na virulência da bactéria (Gebisa, Gerasu e Leggese, 2019).

*E. coli* é uma bactéria patogénica entérica sendo um indicador de contaminação fecal em água e em alimentos (Jang *et al.*, 2017). Na sua maioria, *E. coli* não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro, contribuindo para a sua saúde intestinal (FDA, 2019). No entanto, há estirpes que causam doenças gastrointestinais leves a graves e são classificadas com base nos seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade e serologia. Atualmente, consideram-se *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), onde se inclui *E. coli* O157:H7, os principais grupos de *E. coli* patogénicas associadas aos alimentos (Jang *et al.*, 2017).

Alguns animais selvagens, domésticos e humanos são portadores ocasionais de *E. coli* patogénica e podem contaminar carnes e alimentos. A contaminação normalmente ocorre quando as fezes entram em contacto com alimentos ou água. Os humanos podem transmitir a doença quando não se verifica as boas práticas de higiene e de fabrico (FDA, 2019).

Diferentes tipos de *E. coli* tendem a contaminar diferentes tipos de alimentos e água. Alguns dos alimentos que são considerados de risco são alface, rebentos, leite cru e queijos, carne crua ou mal cozinhada, enchidos curados (FDA, 2019). As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), incluindo *E. coli* O157:H7, podem ser particularmente perigosas. As fontes primárias dos surtos de STEC são produtos de carne picada crua ou mal cozinhada, leite cru e queijos, e vegetais contaminados (FDA, 2019).

### **3.1.3. *Salmonella***

*Salmonella* é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. As células têm a forma de bacilos, são anaeróbias facultativas, produzem gás a partir de glicose e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria apresenta mobilidade por flagelos (Popoff e Minor, Le, 2015).

*Salmonella* é uma bactéria que pode ser transmitida pelos manipuladores de alimentos que não lavam as mãos e/ou as superfícies e utensílios que usam entre as etapas de preparação dos alimentos e quando as pessoas consomem alimentos crus ou mal confeccionados. A salmonelose é considerada uma infeção zoonótica, uma vez que é uma doença de animais que pode ser transmitida a humanos. Os animais para consumo são infetados através do contacto com outros animais infetados, por exemplo aves e roedores, ou através do consumo de rações ou de água contaminados (FDA, 2019).

Os alimentos associados à presença desta bactéria são carnes de animais de consumo, leite, ovos e também enchidos, sumos de fruta, peixe, chocolate, molhos, bolos com recheio, manteiga de amendoim, entre outros. Estes alimentos, quando insuficientemente confeccionados, permitem a sobrevivência da bactéria (FDA, 2019).

### **3.2. Fungos Filamentosos**

Os fungos estão associados a problemas como a deterioração e contaminação de alimentos e alterações nas culturas que trazem prejuízos à agricultura (Takahashi *et al.*, 2017). Nos alimentos de origem vegetal a contaminação por fungos ocorre, normalmente, através de metabolitos secundários por estes produzidos. A estes metabolitos secundários dá-se o nome de micotoxinas e estas são capazes de produzir efeitos tóxicos agudos e crónicos (Zain, 2011).

As micotoxinas ocorrem naturalmente em vários alimentos como cereais, nozes, frutos secos, maçãs e legumes sob certas condições ambientais. A maior parte das micotoxinas são estáveis e sobrevivem ao processamento alimentar, destacando-se a aflatoxina, ocratoxina e patulina. Os fungos que produzem estas toxinas são os fungos dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Lopes *et al.*, 2012).

A contaminação dos alimentos com micotoxinas resulta da infeção do alimento por fungos toxicogénicos. Esta contaminação pode dar-se ao longo do ciclo de produção dos alimentos: desde o cultivo, colheita, armazenamento, transporte até ao processamento. Nos alimentos processados podem surgir micotoxinas, quer através das matérias-primas, quer por formação durante ou após o processamento, devido a más condições de armazenamento. Para além de poderem estar presentes nos alimentos destinados ao consumo humano, as micotoxinas podem também entrar na cadeia alimentar ao estarem presentes nos ingredientes das rações para animais, que as podem degradar, acumulá-las ou excretá-las (Lopes *et al.*, 2012).

#### **➤ Aflatoxina**

As aflatoxinas são um grupo de toxinas produzidas por algumas estirpes dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. omius* e *A. parasiticus* (Lopes *et al.*, 2012), em condições favoráveis (temperatura e humidade elevadas). Nessa medida, as maiores concentrações de aflatoxinas encontram-se nos alimentos produzidos e armazenados nas regiões mais quentes (Lopes *et al.*, 2012).

As aflatoxinas podem ser produzidas nas culturas ainda no campo; no entanto, a fase mais problemática é a pós-colheita, designadamente, se houver atrasos no processo de secagem

ou durante o armazenamento, caso haja humidade que permita o crescimento dos fungos. Os alimentos que geralmente contêm maiores níveis de aflatoxinas são frutos secos, cereais e arroz, podendo, também, ser detetadas no leite e produtos lácteos (Lopes *et al.*, 2012).

### ➤ **Ocratoxina**

A ocratoxina A é produzida por estirpes de *P. verrucosum* (em climas temperados) e por algumas espécies de *A. ochraceus* (em zonas quentes e tropicais) (Viegas, 2009).

Esta micotoxina ocorre naturalmente em diversos produtos vegetais, como cereais, café em grão, cacau, especiarias, arroz, milho e frutos secos. Foi detetada em produtos à base de cereais, café, vinho, cerveja e sumo de uva, mas também em produtos de origem animal, como rim de porco e peixe (Qualfood, 2021).

### ➤ **Patulina**

A patulina é um metabolito tóxico produzido por algumas espécies de bolores do género *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*, que crescem em frutos, incluindo maçãs, peras, uvas e outras frutas, mas o mais frequente no contexto da produção alimentar humana é o *P. expansum*, um patógeno que afeta maçãs e pêras (Viegas, 2009).

A patulina foi encontrada em muitas frutas, produtos hortícolas, cereais e outros alimentos com bolor, mas as principais fontes de contaminação são as maçãs e os produtos à base de maçã (Qualfood, 2021).






As doenças transmitidas pelos alimentos são uma grande preocupação para os consumidores, para a indústria alimentar e para as autoridades de saúde. Com a crescente preocupação dos consumidores acerca do uso de conservantes usados nos alimentos, tem havido um aumento da procura de produtos naturais que podem servir como conservantes alternativos de alimentos (Tajkarimi, Ibrahim e Cliver, 2010). Alguns destes compostos são derivados de uma variedade de fontes naturais, uma vez que, já foi demonstrado que certos compostos provenientes das plantas alimentícias apresentam propriedades antimicrobianas (Gyawali e Ibrahim, 2012, 2014; Hayek, Rabin e Ibrahim, 2013; Tajkarimi, Ibrahim e Cliver, 2010).

### III. Materiais e Métodos

#### 1. Extratos de Feijão-frade Utilizados

Para este trabalho, as amostras analisadas de Feijão-frade (*Vigna unguiculata*) correspondentes a cinco variedades diferentes foram obtidas de produtores locais. As suas referências e características encontram-se descritas na Tabela 2. Os extratos obtidos a partir destas variedades foram preparados e armazenados, até à sua utilização, na Unidade de Biotecnologia e Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) Oeiras.

**Tabela 2** – As cinco variedades de Feijão-frade, fonte dos extratos utilizados.

Referência	Origem	Cor do Grão	Cor do hilo	
<b>1E</b>	Variedade comercial Fradel	Branco/Creme	Preto	
<b>3E</b>	Sátão/Viseu	Salmão/Barrento	Castanho/Preto	
<b>5V</b>	Vale Pedro, Vila Maior/Viseu	Preto/Cinza	a)	
<b>9L</b>	Lardosa/Castelo Branco	Branco/Creme	Acastanhado/Esverdeado	
<b>13B</b>	Banco Português de Germoplasma Vegetal (Guarda)	Salmão/Barrento	Castanho/Preto	

a) Não é possível visualizar.

A partir destas cinco variedades, a determinação da atividade antimicrobiana foi feita para extratos de grão (colhido há cerca de um ano, amadurecido na planta e mantido a -20 °C até à sua utilização), folhas (de plantas jovens extraídas logo após a secagem a 65 °C em estufa) e vagens (seca naturalmente na planta, e usada nas semanas seguintes após a recolha do grão).

### ➤ **Otimização da obtenção dos Extratos Fenólicos**

A necessidade de utilização de extratos fenólicos concentrados nos ensaios de atividade antimicrobiana, impôs a necessidade de testar diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos extratos hidroalcoólicos bem como de avaliar o seu impacto sobre a viabilidade microbiana.

Os extratos foram realizados com grão, vagem ou folha secos, moídos (Cyclone Mill Twister, Retsch, Alemanha) a 14000 rpm em farinha com partículas de diâmetro 0,8 mm e armazenada a -20 °C até à preparação dos extratos fenólicos.

Os extratos fenólicos foram preparados de acordo com Lin *et al.* (2008), com ligeiras alterações. Sucintamente, 15 g de farinha foram combinadas com uma de solução etanol:água (50:50 v/v) numa proporção 1:4 (g:mL), seguindo-se agitação com vórtex durante 4 minutos e sonicação (Digital Ultrasonic Cleaner, Argo Lab, Carpi MO, Itália) por 60 minutos a 25 °C. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm (Sorvall ST 16, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) por 15 minutos. O extrato (sobrenadante) foi filtrado com papel de filtro 6 µm 90 mm (Grade 1F, Munktell, Sweden). Todos os extratos finais foram concentrados por secagem (Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco, Kansas, MO, EUA) e ressuspensos em 0,7 mL de etanol:água (50:50 v/v). Os extratos foram filtrados com filtro CA 0,20 µm 25 mm (CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Germany) e armazenados a -20 °C até análise. Este trabalho foi realizado nas instalações do INIAV pela Doutora Cátia Nunes, responsável pelo projeto CoHeSus.

### ➤ **Teor Fenólico dos Extratos**

Na Tabela 3 estão indicados os teores fenólicos dos extratos de grão, folhas e vagens das cinco variedades de Feijão-frade analisadas.

**Tabela 3** – Teor Fenólico de extratos de Feijão-frade (grão, folha e vagem).

**Concentração de Fenóis (mg equivalentes de ácido gálico/100g massa seca) nos extratos**

Variedades	Grão	Folha	Vagem
1E	70,5	339,2	516,7
3E	263,7	339,2	569,2
5V	219,9	339,2	405,9
9L	64,0	339,2	877,2
13B	257,5	339,2	868,7

(Cátia Nunes, comunicação pessoal)

## 2. Microrganismos utilizados

Neste trabalho foram utilizadas estirpes de bactérias patogénicas e não patogénicas de origem alimentar, gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*) e gram-negativas (*Salmonella* e *Escherichia coli*), assim como fungos filamentosos (*Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*). Os microrganismos utilizados foram provenientes de coleções do Laboratório de Microbiologia (ISA/ULisboa), incluindo a CBISA (Tabela 4).

**Tabela 4** – Estirpes microbianas utilizadas.

Referência CBISA <sup>a</sup>	Espécie
3008	<i>Listeria innocua</i> = NCTC11288 <sup>b</sup> = ATCC33090 <sup>c</sup>
3001	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b = NCTC11994 <sup>b</sup> = CECT4032 <sup>d</sup>
3965	<i>Escherichia coli</i> B
3969	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium = ATCC14028 <sup>c</sup>
	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>

(a) CBISA – Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia; (b) NCTC – National Collection of Type Cultures; (c) ATCC – American Type Culture Collection; (d) CECT – Colección Española de Cultivos Tipo

As culturas bacterianas utilizadas encontram-se congeladas -80 °C na CBISA, Laboratório de Microbiologia (ISA/ULisboa).

As culturas, a partir de -80 °C, foram inoculadas em placas de TSA-YE, e incubadas durante a noite a 37 °C, de modo a obter colónias isoladas. Posteriormente, a partir de colónias

isoladas, preparou-se uma coleção de trabalho em TSA-YE semissólido. Esta coleção de trabalho foi mantida a 4 °C até utilização.

### 3. Meios de Cultura e Soluções

#### 3.1. Meios Líquidos

- *Mueller-Hinton* (MH) – Para um litro de meio, pesou-se 21 g de meio MH (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e dissolveu-se em 1 L de água destilada, num frasco Schott. Seguidamente, procedeu-se à sua esterilização em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
- *Potato Dextrose Broth* (PDB) – Para 1 litro de meio, pesou-se 26,5 g de meio PDB (Condalab, Madrid, Espanha) e dissolveu-se em 1 L de água destilada, num frasco Schott. Seguidamente, procedeu-se à sua esterilização em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

#### 3.2. Meios Sólidos

- PALCAM – Pesou-se 68,9 g de meio “PALCAM Listeria – Selective agar” (base) (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), desidratado e, dissolveu-se, num frasco Schott, em 1 L de água destilada previamente aquecida. Esterilizou-se o meio obtido em autoclave, durante 15 minutos a 121 °C. Após a esterilização, procedeu-se ao arrefecimento do meio em banho termostatizado até 50-55 °C. Antes de se proceder à distribuição por caixas de Petri foi adicionado o suplemento seletivo do meio (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Por cada meio litro de meio PALCAM foi adicionado um frasco de suplemento dissolvido em 5 mL de água destilada, previamente esterilizada, seguidamente, procedeu-se à distribuição em caixas de Petri, em câmara de fluxo laminar. Conservou-se a 4 °C até utilização.
- *Plate Count Agar* (PCA) – Para a preparação de um litro deste meio, procedeu-se à pesagem de 20,5 g de “Gelose pour denombrement - enumeration of total microorganisms” (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e, dissolveu-se, num frasco Schott, em 1 L de água destilada previamente aquecida. Esterilizou-se o meio em autoclave, durante 15 minutos a 121 °C. Após esterilização, procedeu-se ao seu arrefecimento em banho termostatizado até 50-55 °C. De seguida, distribuiu-se por caixas de Petri, numa câmara de fluxo laminar.
- *Potato Dextrose Agar* (PDA) – O procedimento de preparação deste meio foi idêntico ao do meio líquido (PDB), tendo sido adicionado a este meio ágar a 1,5-2% (m/v)

(Condalab, Madrid, Espanha), dissolvendo-se por sua vez num litro de água destilada. Após a esterilização em autoclave, durante 15 minutos a 121 °C, arrefeceu-se em banho termostatzado até 50-55 °C. De seguida foi feita a distribuição por caixas de Petri, em câmara de fluxo laminar.

- *Tryptone-Bile-Glucuronate* (TBX) – Para preparar um litro deste meio, pesou-se 30,6 g de “Gelose Tryptone-Bile-Glucuronate - enumeration of positive *Escherichia coli*  $\beta$ -D-glucuronidase” (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e, dissolveu-se, num frasco Schott, em 1 L de água destilada previamente aquecida. Esterilizou-se o meio em autoclave, durante 15 minutos a 121 °C. Após esterilização, procedeu-se ao seu arrefecimento e distribuição em placas, como anteriormente indicado.
- *Tryptone Soya Agar-Yeast Extract* (TSA-YE) – Pesou-se 30 g de meio TSB (*Tryptone Soya Broth*) liofilizado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), 6 g de extrato de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e 20 g de ágar (CE Roeser Hamburgo, Alemanha) e, dissolveu-se, num frasco Schott, em 1 L de água destilada previamente aquecida. Seguidamente, efetuou-se a esterilização, arrefecimento e distribuição por caixas de Petri, como anteriormente indicado.
- XLD Agar – Pesou-se 52,9 g de meio “Gelose XLD (ISO 6579-1) – Detection de Salmonella” (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) para um balão volumétrico esterilizado, por meio de uma colher esterilizada. Utilizando uma proveta esterilizada, mediu-se 1 L de água destilada esterilizada, que se adicionou posteriormente ao balão volumétrico. De seguida, por meio de uma placa de aquecimento, procedeu-se ao aquecimento do meio até ebulição. Durante o aquecimento foi necessário haver agitação constante do meio, através de um agitador magnético. Após a dissolução, procedeu-se ao seu arrefecimento em banho termostatzado até 50-55 °C. De seguida, distribuiu-se por caixas de Petri, em câmara de fluxo laminar.

### 3.3. Soluções

- Solução de Ringer (SR) – Para preparar a solução de Ringer colocou-se uma pastilha de Ringer (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 500 mL de água destilada e agitou-se lentamente até à completa dissolução. Para facilitar a dissolução recorreu-se a um banho de ultrassons. Por fim, esterilizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
- Tween 80 a 0,01% (v/v) – Para preparar a solução de Tween 80 adicionou-se o detergente Tween 80 (Fisher Scientific, Nova Iorque, E.U.A.) numa concentração de

0,01% (v/v) em água destilada. Por fim, esterilizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

## **4. Preparações de Inóculos**

### **4.1. Suspensões de Bactérias**

Os inóculos bacterianos foram preparados em meio MH, recolhendo as colônias necessárias de placas de TSA-YE incubadas durante a noite, de modo que, a concentração do inóculo fosse, aproximadamente,  $1 \times 10^6$  UFC/mL, sujeita a confirmação, posterior.

#### **Confirmação da Concentração do Inóculo**

A concentração do inóculo foi confirmada através do método das gotas (25 µL) (*spot plating*) à superfície de meio TSA-YE. As diluições foram efetuadas de modo a obterem-se *spots* contáveis (10-50 UFC/*spot*). Nomeadamente, efetuaram-se diluições decimais do inóculo em SR, até  $10^{-5}$  e utilizaram-se depois as diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  para os *spots*. Os *spots* correspondentes a estas quatro diluições decimais consecutivas, foram feitos em quadruplicado.

### **4.2. Suspensões de Conídios**

#### **Condições de crescimento dos fungos**

Os discos miceliais dos fungos utilizados, com cerca de 5 mm de diâmetro, encontravam-se em stock em água esterilizada a 4 °C.

Placas de PDA foram inoculadas com os respetivos discos miceliais de *P. expansum*, *A. flavus* e *A. niger*.

Após a inoculação, as placas foram incubadas a 25 °C durante cerca de 5 dias, de modo que, o crescimento micelial atingisse, quase na sua totalidade, a periferia das placas de PDA.

#### **Preparação de suspensões**

As suspensões de conídios dos fungos (*P. expansum*, *A. flavus* e *A. niger*) foram preparadas a partir das referidas culturas de cinco dias em PDA. Procedeu-se primeiro à lavagem do micélio, começando por se inundar as placas com Tween 80 (0,01% (v/v)). Seguidamente, procedeu-se à raspagem superficial do micélio, com o auxílio de um espalhador de aço

inoxidável, de modo a promover o desalojamento dos conídios. A suspensão resultante foi filtrada por um funil esterilizado, com três folhas de gaze esterilizada. O filtrado, contendo os conídios, foi recolhido num tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, os conídios da suspensão foram contados por meio de hemocitómetro (Neubauer Improved Hirschmann Technicolor), de forma a ajustar a concentração da suspensão stock dos esporos para  $1 \times 10^6$  esporos/mL. Quando necessária, foi utilizada água destilada esterilizada para ajustar a concentração. Após obtenção das suspensões stock, estas foram mantidas a 4 °C até utilizações futuras.

## 5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do Feijão-frade (grão, vagem e folha), baseou-se na determinação da concentração mínima inibitória (MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*) e/ou na determinação da concentração mínima bactericida (MBC - *Minimum Bactericidal Concentration*). Os valores apresentados de MIC e MBC são referentes à concentração de compostos fenólicos dos extratos (mg equivalentes de ácido gálico/mL de extrato). A determinação da MBC é complementar à determinação da MIC, uma vez que o valor da MIC corresponde à concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento, enquanto que a MBC indica a concentração mínima de agente antimicrobiano que induz a morte microbiana, após remoção do agente (CLSI, 1999, 2018).

A MIC foi assim definida como a concentração mais baixa do agente que impede o crescimento microbiano visível, após 24 h ou 48 h de incubação, para bactérias e fungos, respetivamente. Para as bactérias, a MIC foi determinada desta forma sempre que as características dos extratos (viscosos e pigmentados) o permitiram. No entanto, a mudança de cor nos extratos nem sempre representou crescimento bacteriano. Sempre que as características dos extratos dificultaram a perceção do crescimento bacteriano, utilizou-se como critério para a MIC uma redução logarítmica superior a 1 log (90% de redução de viabilidade) (Shirazi *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2011; Tajkarimi, Ibrahim e Cliver, 2010) e inferior a 3 log.

A MBC foi definida como a concentração mais baixa do agente que resulta na morte bacteriana, após remoção do agente. Neste trabalho, de acordo com Akinjogunla *et al.* (2021), CLSI (1999), Parreira *et al.* (2017) e Quadros, de *et al.* (2011) utilizou-se como critério para a MBC uma redução logarítmica igual ou superior a 3 log (99,9% de redução de viabilidade microbiana).

## 5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

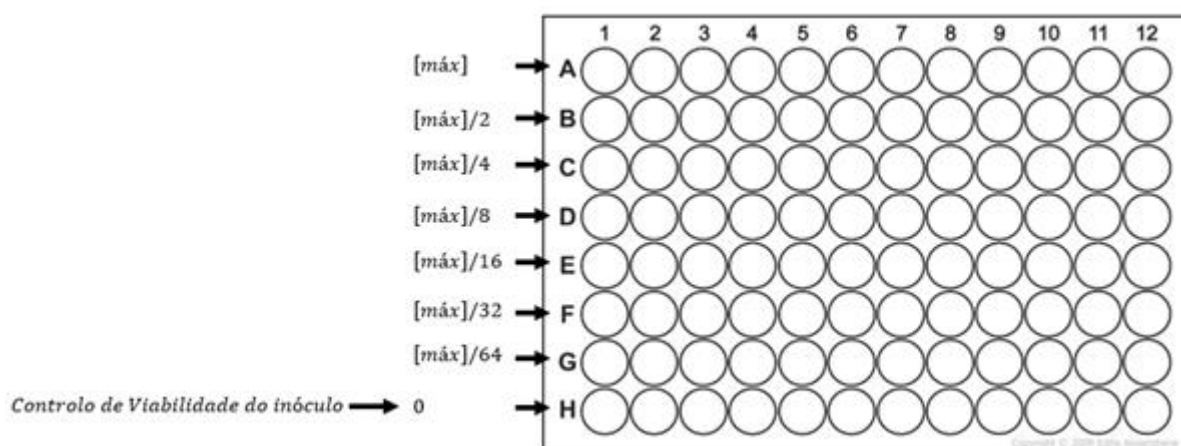
A avaliação da suscetibilidade dos microrganismos aos extratos de Feijão-frade foi efetuada, em microplacas P96 (BioScience, Kremsmünster, Áustria) (Figura 2), de acordo com Lourenço, Neves e Brito (2009) baseado no “Microdilution broth method” (NCCLS, 2002). As microplacas previamente preparadas com o gradiente do agente biocida (100 µL/poço) foram adicionadas de igual volume do inóculo, de modo a obter-se uma concentração final de cerca de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### 5.1.1. Bactérias

A avaliação da suscetibilidade de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium aos extratos de Feijão-frade foi feita em meio de cultura *Mueller Hinton*.

Assim sendo, primeiro distribuiu-se pelos poços, das linhas B a H, nas colunas 5 a 8, 100 µL de meio MH (Figura 2). De seguida adicionaram-se 100 µL do extrato de Feijão-frade, em análise, nos poços das linhas A e B, nas mesmas colunas. Da linha B, retiraram-se 100 µL, de cada poço, efetuando-se passagens sucessivas de 100 µL até à linha G (Figura 2). Os 100 µL retirados de cada poço da linha G foram rejeitados ficando, assim, todos os poços das microplacas com um volume de 100 µL. Por fim, inocularam-se as colunas 5 a 7 das linhas A a H, com 100 µL de suspensão de células de bactérias. Na coluna 8 (controlo de esterilidade do meio) em vez de se colocar a suspensão de bactérias, colocou-se 100 µL de MH em cada poço das linhas A a H (Figura 2). Para prevenir a evaporação do meio durante a incubação (24 horas a 37 °C), que conduziria à alteração das concentrações estabelecidas para cada poço, a todos os micropoços livres foi adicionado 200 µL de água esterilizada.

Para cada microrganismo, realizou-se um ensaio para cada extrato da variedade de Feijão-frade em análise (1E, 3E, 5V, 9L e 13B), com 3 réplicas técnicas em cada microplaca.



**Figura 2** – Representação duma microplaca de 96 poços.

### 5.1.2. Fungos

O procedimento para a avaliação da suscetibilidade de *P. expansum*, *A. flavus* e *A. niger* aos extratos de Feijão-frade, foi semelhante ao descrito no ponto anterior (5.1.1), sendo que o tempo de incubação foi de 48 horas, a temperatura de incubação de 25 °C e o meio de cultura utilizado foi o PDB.

Uma vez que os extratos de Feijão-frade se encontravam ressuspendidos em DMSO, foi também necessário avaliar a suscetibilidade dos microrganismos em estudo ao DMSO. O procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente (5.1.1 e 5.1.2), exceto que os extratos de Feijão-frade foram substituídos por DMSO.

### 5.2. Determinação da Concentração Mínima Bactericida (MBC)

A Concentração Mínima Bactericida (MBC) foi determinada a partir dos ensaios das MICs em microplaca, por inoculação em placas de meio adequado sem o agente em teste (CLSI, 1999, 2018).

Assim, os poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível, e/ou os poços suspeitos, foram inoculados em placas de meio TSA-YE e/ou meio seletivo e diferencial para a bactéria em teste e incubadas durante 24 horas a 37 °C.

### **5.2.1. *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes***

No caso de *L. innocua* e de *L. monocytogenes*, foram transferidos 100 µL de cada poço, da microplaca dos MICs, após incubação e observação dos resultados, para placas de TSA-YE e placas de PALCAM. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, após o que se procedeu à contagem de UFCs.

### **5.2.2. *Escherichia coli***

Em relação a *E. coli*, de forma semelhante, foram transferidos 100 µL de cada poço da microplaca MIC, para placas de TSA-YE e placas de TBX. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas.

### **5.2.3. *Salmonella* Typhimurium**

A determinação da MBC para a *Salmonella* foi efetuada como anteriormente indicado sendo que a partir das microplacas se inocularam placas de XLD. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas.

## **6. Interpretação dos resultados**

Na determinação das MICs, quando pelo menos duas das três réplicas não apresentavam crescimento visível (Lourenço, Neves e Brito, 2009), ou quando duas das três réplicas apresentavam uma redução na viabilidade superior a 1 log e inferior a 3 log, o resultado era considerado negativo (inibição do crescimento).

Na determinação das MBCs, quando pelo menos duas das três réplicas apresentavam uma redução na viabilidade superior a 3 log, o resultado era considerado negativo (morte microbiana).

## **IV. Resultados e Discussão**

### **1. Teor de Compostos Fenólicos nos Extratos de Feijão-frade Utilizados**

Vários estudos demonstram que o teor fenólico do Feijão-frade varia consoante o país de origem (Marathe *et al.*, 2011; Sombié *et al.*, 2018). A variabilidade obtida é devida à diversidade genética do grão (Carvalho *et al.*, 2017), originando não só diferenças no conteúdo fenólico total, mas também na composição fenólica (Awika e Duodu, 2017). Sendo que é no tegumento onde se encontra a maior concentração de compostos fenólicos, a sua concentração é, também, variável conforme as variedades analisadas (Awika e Duodu, 2017; Sombié *et al.*, 2018).

A elevada variabilidade na composição poderá também ser influenciada por fatores como o método e as condições em que foi realizada a extração (por exemplo, o solvente utilizado, a temperatura e o pH) (Wolff, Silveira e Lazzarotto, 2019).

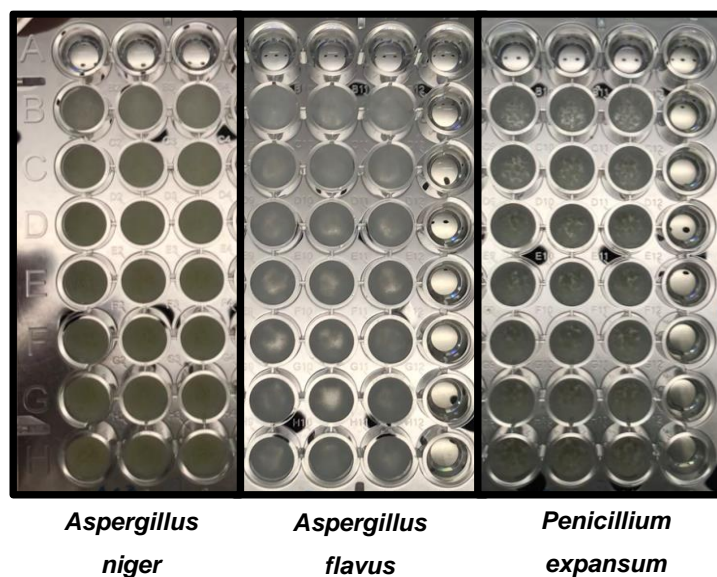
O teor fenólico apresentado foi mais elevado nas vagens, que variou entre 405,9 e 877,2 mg/100g, seguindo-se as folhas, 339,2 mg/100g e, por fim, o grão onde o teor fenólico variou entre 64,0 e 263,7 mg/100g.

Em relação às folhas, não houve nenhuma variedade que se destacasse uma vez que o teor fenólico não variou entre as variedades (Tabela 3). Relativamente ao teor fenólico das vagens, a variedade 9L foi a que se destacou com um teor fenólico mais elevado, seguindo-se a variedade 13B. Em contrapartida, foi a variedade 5V que apresentou menor teor fenólico (Tabela 3). No caso do grão, o teor fenólico foi mais elevado na variedade 3E, seguindo-se a variedade 13B. As variedades 1E e 9L, são as variedades que apresentaram menor teor fenólico (Tabela 3).

Verifica-se, então, que o teor fenólico varia consoante a parte da planta e que o facto de uma variedade apresentar maior teor fenólico no grão, não implica que apresente maior teor fenólico nas vagens, por exemplo.

### **2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de Feijão-frade realizaram-se ensaios controlo, uma vez que os extratos se encontravam dissolvidos em DMSO. Verificou-se que quer o DMSO a 5% quer a 10% não inibiam o crescimento bacteriano. No entanto, estas duas concentrações de DMSO inibiram o crescimento dos fungos (Figura 3).



**Figura 3** – Controlo do DMSO em relação aos fungos utilizados.

Como foi referido anteriormente a avaliação da atividade antimicrobiana do Feijão-frade foi analisada em extratos de grão, vagens secas e folhas jovens. Para cada tipo de extrato foram analisadas quatro a cinco variedades de Feijão-frade, que foram selecionadas de acordo com os objetivos do projeto CoHeSus. Os resultados obtidos serão apresentados por ordem crescente de atividade antimicrobiana obtida: extratos de grão < vagem seca < folha jovem.

Os extratos de grão analisados (variedades 1E, 3E, 9L e 13B) não apresentaram qualquer tipo de atividade contra as bactérias, *L. innocua* e *E. coli*, nem contra *P. expansum*. No entanto, extratos de grão têm vindo a ser referidos como fonte de atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares (Abdel-Shafi *et al.*, 2019; Ashraduzzaman *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2001; Chikane, Parwate e Ingle, 2010; They e Arendt, 2018). Estes resultados podem dever-se aos diferentes métodos de extração utilizados, nomeadamente, n-hexano usado como solvente por aqueles autores. Variáveis como o tempo, temperatura, intensidade de agitação, tamanho das partículas e proporção soluto-solvente, influenciam a qualidade dos extratos obtidos, não esquecendo que a complexidade da matriz vegetal influencia também a eficácia da extração (Wolff, Silveira e Lazzarotto, 2019). Para além do método de extração influenciar os resultados obtidos, o método de análise da atividade antibacteriana é outra variável a considerar.

Já os extratos de vagem apresentaram alguma atividade antibacteriana (ver 2.1), mas nenhuma atividade antifúngica.

Os extratos de folhas foram aqueles que apresentaram os resultados mais promissores, uma vez que apresentaram quer atividade antibacteriana, quer atividade antifúngica contra *P.*

*expansum*. A atividade antifúngica dos extratos de folhas apenas foi avaliada com uma variedade (9L) e a MIC verificada para *P. expansum* foi **18,1** mg/mL. *A. flavus* e *A. niger* não apresentaram qualquer tipo de inibição (ver **2.2**).

Os resultados em bruto relativos aos extratos de vagem e folha encontram-se no **Anexo I e II**, respetivamente.

## 2.1. Extratos de Vagem

Ao contrário do que se verificou com os extratos de grão, os extratos de vagens secas apresentaram alguma atividade antibacteriana embora nenhuma atividade antifúngica.

### Bactérias

#### MIC

A MIC foi determinada visivelmente sempre que possível, ou na sua impossibilidade por uma redução da viabilidade microbiana superior a 1 log, mas inferior a 3 log. Os resultados relativos às MICs das cinco variedades em análise (1E, 3E, 5V, 9L e 13B), em relação a *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5** – MIC dos extratos de vagem das cinco variedades em teste (1E, 3E,5V, 9L e 13B) (mg/mL), para *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*.

<b>Bactérias</b>	<b>MIC (mg/mL)</b>				
	<b>Extratos de Vagem das Variedades</b>				
	<b>1E</b>	<b>3E</b>	<b>5V</b>	<b>9L</b>	<b>13B</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	12,9	14,2	5,1	21,9	-
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	36,9	20,4	29,0	31,4	62,1
<b><i>E. coli</i></b>	51,7	56,9	10,1	87,7	46,5
<b><i>Salmonella</i></b>	73,9	20,4	29,0	62,7	62,1

Legenda: (-) Não houve inibição com a concentração mais elevada em teste.

Em geral, a MIC dos extratos de vagem diferiu com a bactéria e com a variedade em teste. No entanto, destacaram-se as variedades 3E e 5V uma vez que apresentaram melhor

capacidade inibitória (valores de MIC mais baixo) (Tabela 5). O extrato 3E apresentou resultados promissores para as bactérias patogênicas.

As bactérias gram-positivas foram, em geral, mais suscetíveis do que as bactérias gram-negativas (Tabela 5).

A redução logarítmica associada às MICs encontra-se na Tabela 6.

**Tabela 6** – Redução logarítmica (log) média de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, em relação às MICs, com os extratos de vagem das cinco das variedades em estudo (1E, 3E, 5V, 9L e 13B).

**Redução logarítmica (Log)**

<b>Bactérias</b>	<b>Extratos de Vagens das Variedades</b>														
	<b>1E</b>			<b>3E</b>			<b>5V</b>			<b>9L</b>			<b>13B</b>		
	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	6,2	4,2	2,0	6,2	4,1	2,1	6,2	4,3	1,9	6,2	4,6	1,6	-		
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	6,8	1,5	5,3	6,8	4,4	2,4	6,8	0,0	<b>6,8</b>	6,8	4,4	2,4	6,8	0,0	<b>6,8</b>
<b><i>E. coli</i></b>	6,3	1,0	5,3	6,3	0,0	<b>6,3</b>	6,3	4,3	2,0	6,3	0,0	<b>6,3</b>	7,6	3,9	3,7
<b><i>Salmonella</i></b>	6,7	4,8	1,9	6,7	4,7	2,0	6,7	0,0	<b>6,7</b>	6,7	1,0	5,7	6,7	1,6	5,1

Legenda: I e F – Concentração inicial (I) e final (F) em log UFC/mL; Δ - Variação; (-) Não houve inibição com a concentração mais elevada em teste; Negrito – Redução logarítmica total.

Nota: Nos casos em que não houve contagem de UFCs (< 10 UFC/mL), considerou-se para efeitos de cálculo 1 UFC/mL.

**MBC**

A atividade antibacteriana foi avaliada em extratos de vagem das cinco variedades em teste. As MBCs obtidas, em relação a *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7** – MBC dos extratos de vagem das cinco variedades em teste (1E, 3E,5V, 9L e 13B) (mg/mL), para *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*.

<b>Bactérias</b>	<b>MBC (mg/mL)</b>				
	<b>Extratos de Vagem das Variedades</b>				
	<b>1E</b>	<b>3E</b>	<b>5V</b>	<b>9L</b>	<b>13B</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	25,8	28,5	20,3	43,9	-
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	39,6	40,7	29,0	62,7	62,1
<b><i>E. coli</i></b>	51,7	56,9	40,6	87,7	46,5
<b><i>Salmonella</i></b>	-	40,7	29,0	62,7	62,1

Legenda: (-) Não houve inibição com a concentração mais elevada em teste

As MBCs dos extratos de vagem variam com a bactéria e com a variedade de Feijão-frade em teste. Foi a variedade 5V que apresentou valores de MBC mais baixos (Tabela 7).

Em geral, verificou-se que as duas bactérias gram-positivas foram mais suscetíveis aos extratos de vagens secas do que as duas bactérias gram-negativas. Para as bactérias gram-positivas a MBC variou de 20,3 a 62,7 mg/mL, e para as bactérias gram-negativas de 29,0 a 87,7 mg/mL.

Em relação às bactérias gram-positivas, a bactéria não patogénica, *L. innocua*, foi mais suscetível do que *L. monocytogenes*. O mesmo não se verificando com as bactérias gram-negativas. *Salmonella* foi mais suscetível que *E. coli*, não patogénica.

O conhecimento da redução logarítmica associada às MBCs verificadas para as bactérias em estudo pode auxiliar a compreender a atividade antimicrobiana das variedades analisadas. Na Tabela 8 estão apresentadas as respetivas reduções logarítmicas.

**Tabela 8** – Redução logarítmica (log) média de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, em relação às MBCs, com os extratos de vagem das cinco das variedades em estudo (1E, 3E, 5V, 9L e 13B).

**Redução logarítmica (Log)**

<b>Bactérias</b>	<b>Extratos de Vagens das Variedades</b>														
	<b>1E</b>			<b>3E</b>			<b>5V</b>			<b>9L</b>			<b>13B</b>		
	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	6,2	0,0	<b>6,2</b>	6,2	2,1	4,1	6,2	2,3	3,9	6,2	1,6	4,6	-		
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	6,8	1,5	5,3	6,8	0,0	<b>6,8</b>	6,8	0,0	<b>6,8</b>	6,8	0,0	<b>6,8</b>	6,8	0,0	<b>6,8</b>
<b><i>E. coli</i></b>	6,3	1,5	4,8	6,3	0,0	<b>6,3</b>	6,3	0,0	<b>6,3</b>	6,3	0,0	<b>6,3</b>	7,6	3,9	3,7
<b><i>Salmonella</i></b>	-			6,7	0,0	<b>6,7</b>	6,7	0,0	<b>6,7</b>	6,7	1,0	5,7	6,7	1,6	5,1

Legenda: I e F – Concentração inicial (I) e final (F) em log UFC/mL; Δ - Variação; (-) Não houve inibição com a concentração mais elevada em teste; Negrito – Redução logarítmica total.

Nota: Nos casos em que não houve contagem de UFCs (< 10 UFC/mL), considerou-se para efeitos de cálculo 1 UFC/mL.

Alguns extratos levaram à redução logarítmica total (valores a negrito na Tabela 8).

É possível observar que foram as variedades 3E e 5V que apresentaram os resultados mais promissores, uma vez que, as reduções verificadas para três das quatro bactérias estudadas foram totais. *L. monocytogenes* foi a bactéria mais suscetível, apresentando redução total com quatro dos cinco extratos em teste.

Em geral, a MIC foi igual à MBC (Tabela 5 e 7).

## 2.2. Extratos de Folha

### Bactérias

#### MIC

Os resultados obtidos relativos às MICs das bactérias em estudo, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, relativamente aos quatro extratos em análise (1E, 3E, 9L e 13B), encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9** – MIC dos extratos de folha das quatro variedades em teste (1E, 3E, 9L e 13B) (mg/mL), para *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*.

<b>Bactérias</b>	<b>MIC (mg/mL)</b>			
	<b>Extratos de Folha das Variedades</b>			
	<b>1E</b>	<b>3E</b>	<b>9L</b>	<b>13B</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	1,1	1,1	2,3	1,1
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	1,1	1,1	2,3	2,3
<b><i>E. coli</i></b>	9,1	9,1	9,1	9,1
<b><i>S. Typhimurium</i></b>	4,5	9,1	9,1	9,1

As MICs dos extratos de folhas variam com a bactéria, mas não variam muito de variedade para variedade de Feijão-frade. As variedades 1E e 3E foram as que apresentaram melhor capacidade de inibição das bactérias em estudo (valores de MIC mais baixo) (Tabela 9). A variedade 1E destacou-se uma vez que apresentou o valor de MIC mais baixo para *S. Typhimurium*.

Ao comparar as variedades 1E e 3E, verificou-se também que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis que as bactérias gram-negativas, o mesmo acontecendo com as outras variedades.

As reduções logarítmicas associadas às MICs encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10** – Redução logarítmica (log) média de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, em relação às MICs, com os extratos de folha das quatro das variedades em estudo (1E, 3E, 9L e 13B).

**Redução logarítmica (Log)**

Bactérias	Extratos de Folha das Variedades											
	1E			3E			9L			13B		
	I	F	Δ	I	F	Δ	I	F	Δ	I	F	Δ
<i>L. innocua</i>	6,5	3,9	2,6	6,5	3,8	2,7	6,5	2,0	4,5	6,5	2,2	4,3
<i>L. monocytogenes</i>	6,5	4,7	1,8	6,5	3,2	3,3	7,2	4,4	2,8	6,5	0,0	<b>6,5</b>
<i>E. coli</i>	7,2	0,0	<b>7,2</b>	7,2	0,0	<b>7,2</b>	7,4	2,2	5,2	7,4	0,0	<b>7,4</b>
<i>Salmonella</i>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>

Legenda: I e F – Concentração inicial (I) e final (F) em log UFC/mL; Δ - Variação; Negrito – Redução logarítmica total.

Nota: Nos casos em que não houve contagem de UFCs (< 10 UFC/mL), considerou-se para efeitos de cálculo 1 UFC/mL.

**MBC**

A avaliação da suscetibilidade das bactérias foi avaliada em extratos de folhas das variedades 1E, 3E, 9L e 13B. Os resultados relativos às concentrações mínima bactericida (MBC), em relação a *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, encontram-se na Tabela 11.

**Tabela 11** – MBC dos extratos de folha das quatro variedades em teste (1E, 3E, 9L e 13B) (mg/mL), para *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*.

**MBC (mg/mL)**

Bactérias	Extratos de Folha das Variedades			
	1E	3E	9L	13B
<i>L. innocua</i>	2,3	2,3	2,3	1,1
<i>L. monocytogenes</i>	2,3	1,1	4,5	2,3
<i>E. coli</i>	9,1	9,1	9,1	9,1
<i>Salmonella</i>	4,5	9,1	9,1	9,1

Quando comparadas com as MBCs dos extratos de vagem (Tabela 7), verifica-se que os extratos de folha apresentam uma melhor atividade antibacteriana (Tabela 11).

As MBCs dos extratos de folhas diferem com as bactérias, mas não diferem muito de variedade para variedade, sendo para *L. monocytogenes* que ocorreu variação. Nos outros casos, as atividades obtidas com os extratos de folhas das quatro variedades foram muito semelhantes.

Tal como se verificou com os extratos de vagem secas (Tabela 7), as bactérias gram-positivas foram mais suscetíveis aos extratos de folhas jovens que as bactérias gram-negativas (Tabela 11). Para as bactérias gram-positivas a MBC variou de 1,1 a 4,5 mg/mL, e para as bactérias gram-negativas de 4,5 a 9,1 mg/mL.

Esta diferença de suscetibilidade ocorre a nível estrutural, uma vez que as bactérias gram-negativas apresentam uma maior resistência aos extratos. As bactérias gram-negativas apresentam na sua parede celular uma membrana externa, composta por uma bicamada fosfolipídica e proteínas, sendo a parte externa desta membrana composta por lipopolissacáridos (Brown *et al.*, 2015). A presença dos LPS impede que os compostos fenólicos se liguem à camada de peptidoglicano (Cui *et al.*, 2012), conferindo as estas bactérias uma maior resistências aos compostos fenólicos (Nohynek *et al.*, 2006). A fraca atividade demonstrada pelos extratos contra as bactérias gram-negativas pode também ser devida às características lipofílicas apresentadas por certos compostos nos extratos (Brown *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2012; Hisano *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013). De facto, com a diminuição da hidrofobia dos compostos fenólicos verifica-se uma menor afinidade para a bicamada lipídica das bactérias gram-negativas, ou seja, uma menor redução da viabilidade destas bactérias.

Na Tabela 12 estão apresentadas as reduções logarítmicas associadas às MBCs.

**Tabela 12** – Redução logarítmica (log) média de *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*, em relação às MBCs, com os extratos de folha das quatro das variedades em estudo (1E, 3E, 9L e 13B).

**Redução logarítmica (Log)**

<b>Bactérias</b>	<b>Extratos de Folha das Variedades</b>											
	<b>1E</b>			<b>3E</b>			<b>9L</b>			<b>13B</b>		
	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>Δ</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	6,5	0,0	<b>6,5</b>	6,5	0,0	<b>6,5</b>	6,5	2,0	4,5	6,5	2,2	4,3
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	6,5	0,0	<b>6,5</b>	6,5	3,2	3,3	7,2	0,0	<b>7,2</b>	6,5	0,0	<b>6,5</b>
<b><i>E. coli</i></b>	7,2	0,0	<b>7,2</b>	7,2	0,0	<b>7,2</b>	7,4	2,2	5,2	7,4	0,0	<b>7,4</b>
<b><i>Salmonella</i></b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>	7,4	0,0	<b>7,4</b>

Legenda: I e F – Concentração inicial (I) e final (F) em log UFC/mL; Δ - Variação; Negrito – Redução logarítmica total.

Nota: Nos casos em que não houve contagem de UFCs (< 10 UFC/mL), considerou-se para efeitos de cálculo 1 UFC/mL.

Os resultados obtidos mostram que houve extratos de folhas que levaram à redução total das bactérias (Tabela 12).

O extrato de folha da variedade **1E** apresentou os resultados mais promissores, uma vez que, as reduções verificadas foram totais para as bactérias estudadas, incluindo as espécies patogênicas. Apesar de *S. Typhimurium* ser uma das bactérias que apresenta uma MBC mais elevada é, no entanto, a bactéria em que ocorre uma redução total com todos os extratos em teste.

Comparando as Tabelas 9 e 11, verifica-se também que a MIC é, geralmente, igual à MBC.

De acordo com Shanmughapriya *et al.* (2008), quando a razão MBC/MIC é  $\leq 2$ , o agente em teste é considerado bactericida, levando, portanto, à morte dos microrganismos. Quando a razão  $MBC/MIC > 2$ , o agente é bacteriostático, ou seja, inibe o crescimento dos microrganismos. E se a razão  $MBC/MIC \geq 16,0$  o agente é considerado ineficaz. A determinação desta razão permite, assim, aferir qual o mecanismo de antibiose do composto em análise (Parreira *et al.*, 2017). Foi, então, calculada a razão entre a MBC e a MIC para os extratos analisados. Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos, relativos aos extratos de vagem e de folha.

**Tabela 13** – Razão entre MBC e MIC dos extratos de vagem e de folha das variedades em análise (1E, 3E, 5V, 9L e 13B) para *L.innocua*, *L. monocytogenes*, *E.coli* e *Salmonella*.

**Razão MBC/MIC**

<b>Bactérias</b>	<b>Extratos das Variedades</b>								
	<b>1E</b>		<b>3E</b>		<b>5V</b>	<b>9L</b>		<b>13B</b>	
	<b>Vagem</b>	<b>Folha</b>	<b>Vagem</b>	<b>Folha</b>	<b>Vagem</b>	<b>Vagem</b>	<b>Folha</b>	<b>Vagem</b>	<b>Folha</b>
<b><i>L. innocua</i></b>	2	2	2	2	4	2	1	b)	1
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	1	2	2	1	1	2	2	1	1
<b><i>E. coli</i></b>	1	1	1	1	4	1	1	1	1
<b><i>S. Typhimurium</i></b>	a)	1	2	1	1	1	1	1	1

a) Não foi possível determinar MBC (redução < 3 log); b) Não houve inibição com a concentração mais elevada em teste.

Em 22 dos 36 casos analisados a MIC obtida corresponde à MBC (MBC/MIC = 1), como mencionado anteriormente. De acordo com Shanmughapriya *et al.* (2008) é, assim, possível concluir que os respetivos extratos são bactericidas, sendo portanto uma grande vantagem do possível uso destes extratos como conservantes alimentares naturais ou integrando desinfetantes de uso alimentar.

Apenas o extrato de vagem da variedade 5V, é considerado bacteriostático para as bactérias não patogénicas em estudo (*L. innocua* e *E. coli*) (Tabela 13).

Os extratos de folhas são bastante promissores como antimicrobianos, uma vez que podem ser considerados bactericidas.

A crescente preocupação dos consumidores acerca do uso de conservantes usados nos alimentos, bem como o aumento de resistência aos conservantes por parte dos microrganismos, levou à procura de produtos naturais como conservantes alternativos de alimentos (AlSheikh *et al.*, 2020; Tajkarimi, Ibrahim e Cliver, 2010).

As plantas alimentícias são uma boa fonte destes compostos (Cetin-Karaca e Newman, 2015; Elisha *et al.*, 2017; Gonelimali *et al.*, 2018; Gyawali e Ibrahim, 2012, 2014; Hayek, Rabin e Ibrahim, 2013; Khalifa *et al.*, 2015). Estas propriedades antimicrobianas podem ser conferidas pelos metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, como alcalóides, compostos fenólicos e terpenóides (Pagare *et al.*, 2015; Rehman e Khan, 2017; Sharma e Kaushik, 2020; Shashirekha, Mallikarjuna e Rajarathnam, 2015; Tak e Kumar, 2020), bem como por péptidos bioativos (Sitohy *et al.*, 2013; They e Arendt, 2018). O Feijão-frade é uma leguminosa que tem na sua constituição tanto compostos fenólicos como péptidos bioativos (Awika e Duodu,

2017) e, portanto, a atividade antimicrobiana dos seus extratos pode dever-se a estes compostos.

No entanto, os resultados obtidos sugerem que a atividade antimicrobiana dos extratos testados neste trabalho se deva, maioritariamente, à presença dos compostos fenólicos e não aos péptidos, uma vez que para a obtenção dos extratos foi usado etanol, favorecendo-se, assim, a extração compostos fenólicos (Dai e Mumper, 2010). Os péptidos são, normalmente, extraídos com n-hexano. Também Ashraduzzaman *et al.* (2016), Kritzinger, Lall e Aveling, (2005), Lenny e Rizky (2020) e Vats *et al.* (2012) concluíram que as bactérias gram-negativas são mais resistentes a extratos fenólicos que as bactérias gram-positivas, devido à interação com a parede bacteriana. Kritzinger, Lall e Aveling (2005) verificaram que os extratos de Feijão-frade têm potencial para inibir o crescimento de certos patogenos bacterianos e fúngicos. Este potencial pode dever-se, assim, aos compostos fenólicos presentes nas folhas de Feijão-frade.

Estudos realizados por Kritzinger, Lall e Aveling (2005) concluíram que os extratos de folhas de Feijão-frade apresentaram atividade antifúngica na concentração mais elevada, 5 mg/mL, contra *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium equiseti*, *F. proliferatum*. Foi também avaliada a atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de difusão em placas de Petri. A concentração final dos extratos incorporados nas placas de Petri variou entre 0,5 a 5 mg/mL. Relativamente à atividade antibacteriana concluíram também que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis do que as bactérias gram-negativas, uma vez que dentro das bactérias gram-negativas *Enterobacter cloacae* foi a única que apresentou alguma inibição. No entanto, a atividade antibacteriana variou com a bactéria em teste (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *Enterobacter cloacae*). Esta diferença de atividade pode dever-se às características lipofílicas apresentadas por certos compostos dos extratos (Brown *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2012; Hisano *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013).

Lattanzio *et al.* (1997), Lattanzio *et al.* (2000) e Moloto *et al.* (2020) analisaram as folhas do Feijão-frade e concluíram que os compostos fenólicos presentes eram predominantemente flavonóis (quercetina e kaempferol) e ácidos fenólicos (ácido p-cumárico, ácido benzoico, ácido ferúlico). Concluíram também que os compostos apresentavam atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos patogénicos (Adamczak, Ożarowski e Karpiński, 2020; Cueva *et al.*, 2010; Daglia, 2012).

As concentrações fenólicas dos extratos utilizados por Kritzinger, Lall e Aveling (2005) são semelhantes às dos extratos utilizados no presente trabalho. Será talvez a razão para que os resultados obtidos por estes autores sejam semelhantes aos aqui apresentados. No entanto, Kritzinger, Lall e Aveling (2005) obtiveram atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium equiseti*, *F. proliferatum*, a qual não foi obtida no presente estudo. Em relação à atividade antibacteriana, os resultados estão em concordância com os destes autores, uma vez que as concentrações em teste utilizadas por Kritzinger, Lall e Aveling (2005) não inibiram *E. coli* na concentração mais alta em teste (5 mg/mL), e no presente trabalho *E. coli* apresentou valores de MIC de 9,1 mg/mL.

Em 2012, Vats *et al.* analisaram a evolução da atividade antimicrobiana do Feijão-frade *in vitro*, sendo os extratos provenientes de plântulas e calos vegetais. Vats *et al.* (2012) verificaram que os extratos analisados apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, sendo que *Escherichia coli* apresentou maior suscetibilidade (MIC menor),  $110 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ , seguindo-se *Bacillus cereus*,  $125 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ , *Staphylococcus aureus*,  $138 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ , *Proteus mirabilis*, *B. subtilis*,  $150 \mu\text{g/mL}$ , e *Pseudomonas aeruginosa*,  $168 \mu\text{g/mL}$ . Estes autores concluíram que a atividade antibacteriana do extrato podia ser devida ao conteúdo fenólico e flavonóide do calo, e que a diferença de atividades se deveu à presença de diferentes compostos existentes em concentrações variáveis que afetam adversamente o metabolismo das bactérias.

Ashraduzzaman *et al.* (2016) analisaram a atividade antimicrobiana do óleo de sementes de Feijão-frade e verificaram que estes extratos apresentaram atividade antimicrobiana, em diferentes concentrações, para bactérias gram-positivas (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea*, e *Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Sh. sonnei* e *Sh. shiga*) e também para fungos (*Penicillium spp.*, *Mucor spp.* e *Candida albicans*). Ashraduzzaman *et al.* (2016) propuseram que a atividade antimicrobiana dos extratos analisados se poderia dever aos compostos fenólicos presentes no Feijão-frade, uma vez que estes compostos têm sido documentados como uma nova forma de inibir o crescimento de uma gama muito ampla de microrganismos (Daglia, 2012; Li *et al.*, 2014; T.J. Schmidt *et al.*, 2012).

Lenny e Rizky (2020) verificaram também que os extratos das folhas de Feijão-frade inibiam o crescimento de *Staphylococcus aureus*, mas não de *Escherichia coli*. Esta diferença pode, mais uma vez, dever-se ao facto da diferença que existe na estrutura das paredes celulares entre gram-positivos e gram-negativos.

De acordo com os resultados apresentados, no presente trabalho, *S. Typhimurium*, apresenta maior suscetibilidade que *E. coli*. No entanto, segundo alguns autores a diferença de suscetibilidades pode variar consoante o composto em teste. Uma vez que a suscetibilidade das bactérias aos compostos fenólicos depende das espécies bacterianas, da pureza e da estrutura dos compostos, bem como dos métodos usados para a avaliação da atividade antibacteriana (Cetin-Karaca e Newman, 2015; Elisha *et al.*, 2017).

Os resultados apresentados indicam, também, diferenças de inibição relativamente aos fungos. *P. expansum* apresentou maior suscetibilidade aos extratos.

Segundo Dinev *et al.* (2021), Medeiros *et al.* (2021) e Zabka e Pavela (2013) tanto *Aspergillus* como *Penicillium* podem apresentar suscetibilidade aos extratos de Feijão-frade (Mirela *et al.*, 2014; Stefanović, Tešić e Čomić, 2015; Zabka e Pavela, 2013). E dentro do mesmo género e espécie a suscetibilidade pode variar (Korukluoglu, Sahan e Yigit, 2008).

Os resultados obtidos mostram que os extratos de folhas de Feijão-frade apresentam atividades antimicrobianas mais promissoras que os restantes extratos em análise. Uma possível justificação é o facto de as folhas de Feijão-frade apresentarem na sua composição compostos fenólicos como quercetina, kaempferol, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido benzoico (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida *et al.* (2018), que caracterizaram extratos de folhas de kiwi e determinaram a sua atividade antimicrobiana. Almeida *et al.* (2018) concluíram que as folhas de kiwi apresentam alto teor em flavan-3-ols, flavonóis e atividade antimicrobiana contra *S. aureus* mas não para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Estes autores concluíram que a atividade antibacteriana do extrato pode ser devido ao conteúdo fenólico, e que a diferença de atividade pode dever-se à presença de vários compostos existentes em concentrações variáveis que afetam o metabolismo dos microrganismos (Vats *et al.*, 2012).

Stefanović, Tešić e Čomić (2015) avaliaram extratos de *Melilotus albus* (Meliloto-branco) e *Dorycnium herbaceum* (Lótus) como fonte de compostos fenólicos e os seus potenciais antimicrobiano, antibiofilme e antioxidante. Lótus é uma planta que apresenta uma composição fenólica semelhante à composição do Feijão-frade, nomeadamente miricetina, quercetina e kaempferol (Kazantzoglou *et al.*, 2004). Stefanović, Tešić e Čomić (2015) verificaram que a atividade antimicrobiana dos extratos em análise variava dependendo: (1) da espécie de planta, (2) do tipo de extrato da planta e (3) da espécie de microrganismo. Estes autores observaram, à semelhança do que se verificou no presente trabalho, que os extratos apresentaram melhor atividade antibacteriana do que antifúngica, e que as bactérias gram-

negativas em análise, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, apresentaram menor suscetibilidades aos extratos (MIC maior). Para *E. coli* o MIC obtido variou entre 10 mg/mL a 20 mg/mL ou superior. Verificaram também que *Penicillium italicum* e *P. digitatum* apresentaram maior suscetibilidade (MIC menor) que *Aspergillus niger*.

Verificou-se que extratos com uma composição fenólica semelhante, Feijão-frade e Lótus, mas com concentração diferente, extratos de Lótus 10 ou mais vezes concentrado que extratos de Feijão-frade, não apresentaram atividade antimicrobiana semelhante, uma vez que os valores de MIC obtidos por Stefanović, Tešić e Čomić (2015), são superiores às MICs obtidas no presente trabalho (9,1 mg/mL para *E. coli*).

As folhas de Feijão-frade são ricas em compostos fenólicos. No entanto, uma vez que a caracterização fenólica das folhas utilizadas para os extratos ainda está a decorrer, não é possível afirmar ainda quais os constituintes fenólicos das folhas responsáveis pela atividade observada. Segundo vários autores, as folhas de Feijão-frade são compostas por flavonóis como quercetina e kaempferol, e ácidos fenólicos como ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido benzoico (Tabela 1). Admitindo que as folhas utilizadas para os extratos utilizados neste trabalho apresentam uma composição fenólica semelhante ao descrito na bibliografia, sugere-se que a atividade antimicrobiana apresentada pelas folhas provavelmente está relacionada com a presença dos compostos fenólicos, quercetina, kaempferol, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido benzoico, uma vez que estes compostos apresentam atividade antimicrobiana.

Cetin-Karaca e Newman (2015) avaliaram a suscetibilidade de bactérias como *E.coli* e *Salmonella* a alguns compostos fenólicos como ácido clorogénico, curcumina, (-) epicatequina, miricetina, quercetina, rutina e timoquinona. Timoquinona, rutina, (-) epicatequina e miricetina apresentaram inibição para ambas as bactérias, em concentrações diferentes. Concluíram também que o mecanismo de inativação das bactérias gram-negativas baseia-se na desintegração da membrana externa que, por sua vez, leva à lise celular. Relativamente à quercetina, esta não apresentou atividade, no entanto estes resultados foram contraditórios com estudos anteriores.

Há estudos que indicam que a quercetina e o kaempferol apresentam atividade antimicrobiana. A quercetina apresenta atividade antimicrobiana não só para patógenos gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Streptococcus pyogenes*, como também para patógenos gram-negativos, como *E. coli* e *K. pneumoniae* (Barbieri *et al.*, 2017). O mecanismos de ação destes flavonóis consiste na inibição da síntese

de DNA (Chen e Huang, 2011; Hossion *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015) e na permeabilização da membrana citoplasmática (Siriwong *et al.*, 2015).

Puupponen-Pimiä *et al.* (2001) avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos de bagas, uma vez que estas também são ricas em compostos fenólicos. Alguns dos compostos fenólicos presentes nos extratos de bagas fazem, também, parte do perfil fenólico das folhas de Feijão-frade, como por exemplo, ácido ferúlico, kaempferol, quercetina. Puupponen-Pimiä *et al.* (2001) verificaram que a quercetina assim como o ácido ferúlico inibiram o crescimento de algumas estirpes de *E. coli*. A *Salmonella* foi inibida pelo ácido ferúlico.

A diferença de resultados entre Barbieri *et al.* (2017), Cetin-Karaca e Newman (2015) e Puupponen-Pimiä *et al.* (2001) sugere que compostos fenólicos mais hidrofílicos são melhores inibidores do que os menos hidrofílicos (Rashed *et al.*, 2014), ou seja, uma vez que a quercetina e o kaempferol, são de natureza mais lipofílica (um e dois grupos hidroxilo a menos do que na miricetina, respetivamente) (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001), estes flavonóis apresentam uma atividade antimicrobiana mais baixa. Xie *et al.* (2015) concluíram que os grupos hidroxilo em determinadas posições dos anéis aromáticos dos flavonóides aumentam significativamente o efeito antibacteriano, além de que a existências de ligações duplas entre C2 e C3 aumenta a atividade antibacteriana (Xie *et al.*, 2017). A pureza da quercetina também justifica a diferença de atividades antimicrobianas, uma vez que difere de planta para planta (Cetin-Karaca e Newman, 2015).

A diferença de extratos influencia a atividade obtida. Kirigia *et al.* (2018) analisaram a evolução de fitonutrientes nas folhas de Feijão-frade sob diversas variáveis como o estágio de desenvolvimento, a temperatura de armazenamento e a duração do armazenamento. Verificaram que as concentrações de flavonóides nas folhas de Feijão-frade não apresentaram diferenças significativas com as diferentes idades das plantas. No entanto, a secagem das folhas pelo sol reduz significativamente o teor de compostos fenólicos nas folhas e nas vagens. Relativamente aos flavonóides, é de notar que também existe este decréscimo significativo sendo mais evidente nas vagens do que nas folhas (Chikwendu, Igbatim e Obizoba, 2014), o que pode explicar a diferença de atividade antimicrobiana entre os extratos de vagens e os extratos de folhas obtidos neste trabalho, apesar do perfil fenólico poder ser, eventualmente, semelhante (Tabela 1).

Carvalho *et al.* (2021) verificaram que o grão seco de Feijão-frade apresenta menor teor fenólico que as vagens imaturas e do que as sementes imaturas de Feijão-frade. As diferenças de composição e concentração fenólica permitem explicar a diferença de atividade antimicrobiana entre os extratos analisados neste trabalho.

## V. Conclusões

A preocupação com a segurança dos alimentos, incluindo o uso de conservantes, as doenças transmitidas pelos alimentos e o aumento da resistência microbiana a aditivos alimentares, tem vindo a aumentar. Este trabalho veio enfatizar as propriedades antimicrobianas do Feijão-frade, com vista à utilização dos extratos como conservantes alimentares naturais ou integrando desinfetantes de uso alimentar.

As atividades antimicrobianas dos extratos foram determinadas através das MICs e das MBCs, de extratos de grão, vagens e folhas de cinco variedades, sobre bactérias patogénicas de origem alimentar gram-positivas (*Listeria monocytogenes*) e gram-negativas (*Salmonella*), assim como bactérias não patogénicas (*Listeria innocua* e *Escherichia coli*) e fungos filamentosos (*Penicillium* e *Aspergillus*). Verificando-se que:

- Os extratos que apresentaram resultados mais promissores foram os extratos de folhas, seguindo-se os extratos de vagem.
- Os extratos de grão não apresentaram qualquer tipo de atividade antimicrobiana sobre os microrganismos em teste.
- As bactérias gram-positivas apresentaram maior suscetibilidade aos extratos, não havendo, praticamente, diferenças entre *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Já em relação ao grupo das bactérias gram-negativas, além de apresentarem menor suscetibilidades aos extratos, *E. coli* foi menos suscetível que *Salmonella*.
- Relativamente aos fungos, apenas *P. expansum* apresentou inibição com a variedade 9L.
- A variedade que se destacou pela sua atividade antibacteriana foi a variedade comercial 1E (Fradel).

Os resultados aqui apresentados, com as cinco variedades de Feijão-frade em estudo, vão ao encontro de resultados de outros autores, indicando que os extratos de folha e de vagem de Feijão-frade apresentam propriedades antimicrobianas. No entanto, são necessários mais estudos, que incluam a avaliação das características organolépticas, de segurança e de toxicidade dos extratos para os consumidores, bem como um maior número de microrganismos em teste.

A preservação do grão para fins alimentares e o aproveitamento sustentável das folhas e das vagens para extração de compostos que possam ser usados como uma alternativa aos conservantes alimentares sintéticos, vem ao encontro dos objetivos de uma economia circular. Contribuir-se-ia, assim, para o controlo de microrganismos patogénicos nos alimentos, um fator essencial para prevenir os surtos de doenças de origem alimentar.

## VI. Referências

ABBAS, Yasir; AHMAD, Asif - Impact of Processing on Nutritional and Antinutritional Factors of Legumes: a Review. **Annals. Food Science and Technology**. 19:2 (2018) 199–215.

ABDEL-SHAFI, Seham; AL-MOHAMMADI, Abdul Raouf; OSMAN, Ali; ENAN, Gamal; ABDEL-HAMEID, Samar; SITOBY, Mahmoud - Characterization and antibacterial activity of 7S and 11S globulins isolated from cowpea seed protein. **Molecules**. . ISSN 14203049. 24:6 (2019). doi: 10.3390/molecules24061082.

ADAMCZAK, Artur; OŻAROWSKI, Marcin; KARPIŃSKI, Tomasz M. - Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. **Journal of Clinical Medicine**. . ISSN 20770383. 9:1 (2020) 109. doi: 10.3390/jcm9010109.

AGATI, Giovanni; AZZARELLO, Elisa; POLLASTRI, Susanna; TATTINI, Massimiliano - Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**. . ISSN 01689452. 196:2012) 67–76. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014.

AKINJOGUNLA, O. J.; UMO, A. N.; ALOZIE, M. F.; OSHOSANYA, G. O.; SATURDAY, G. I. - Antibacterial activity and time kill kinetics of Amlodipine , Thioridazine and Promethazine against pathogenic clinical bacterial isolates. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**. 22:3 (2021) 397–406.

ALBUQUERQUE, Bianca R.; HELENO, Sandrina A.; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P.; BARROS, Lillian; FERREIRA, Isabel C. F. R. - Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food and Function**. . ISSN 2042650X. 12:1 (2021) 14–29. doi: 10.1039/d0fo02324h.

ALMEIDA, Diana; PINTO, Diana; SANTOS, Joana; VINHA, Ana F.; PALMEIRA, Josman; FERREIRA, Helena N.; RODRIGUES, Francisca; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P. - Hardy kiwifruit leaves (*Actinidia arguta*): An extraordinary source of value-added compounds for food industry. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 259:2018) 113–121. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.113.

ALSHEIKH, Hana Mohammed Al; SULTAN, Insha; KUMAR, Vijay; RATHER, Irfan A.; ALSHEIKH, Hashem; TASLEEM JAN, Arif; HAQ, Qazi Mohd Rizwanul - Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. **Antibiotics**. . ISSN 2079-6382. 9:8 (2020) 480. doi: 10.3390/antibiotics9080480.

AMOAKO, Derrick; AWIKA, Joseph M. - Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. **Current Opinion in Food Science**. . ISSN 22147993. 8:2016) 14–18. doi: 10.1016/j.cofs.2016.01.010.

AMOAKO, Derrick B.; AWIKA, Joseph M. - Polymeric tannins significantly alter properties and in vitro digestibility of partially gelatinized intact starch granule. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 208:2016) 10–17. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.096.

ANISSI, Jaouad; HASSOUNI, Mohammed EL; OUARDAOUI, Abdelkrim; SENDIDE, Khalid - A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: a kinetic approach. **Food chemistry**. England. . ISSN 1873-7072 (Electronic). 150:2014) 438–447. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.009.

ARAÚJO, Fábio Fernandes DE; PAULO FARIAS, David DE; NERI-NUMA, Iramaia Angélica; PASTORE, Glaucia Maria - Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 338:2021). doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127535.

ARIF, Tasleem; BHOSALE, J. D.; KUMAR, Naresh; MANDAL, T. K.; BENDRE, R. S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, Rajesh - Natural products - Antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**. . ISSN 10286020. 11:7 (2011) 621–638. doi: 10.1080/10286020902942350.

ASHRADUZZAMAN, Mohammad; ALAM, Mohammad; KHATUN, Shahanaz; ABSAR, Nurul - Antimicrobial Activity of Vigna unguiculata L. Walp Seed Oil. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**. 5:3 (2016) 70–75. doi: 10.6000/1927-3037.2016.05.03.1.

ASIF, Muhammad; ROONEY, Lloyd W.; ALI, Rashida; RIAZ, Mian N. - Application and Opportunities of Pulses in Food System: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 10408398. 53:11 (2013) 1168–1179. doi: 10.1080/10408398.2011.574804.

AVANZA, M. Victoria; ÁLVAREZ-RIVERA, Gerardo; CIFUENTES, Alejandro; MENDIOLA, José A.; IBÁÑEZ, Elena - Phytochemical and Functional Characterization of Phenolic Compounds from Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Obtained by Green Extraction Technologies. **Agronomy**. . ISSN 2073-4395. 11:1 (2021) 162. doi: 10.3390/agronomy11010162.

AWIKA, Joseph M.; DUODU, Kwaku G. - Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 17564646. 38:2017) 686–697. doi: 10.1016/j.jff.2016.12.002.

BARBIERI, Ramona; COPPO, Erika; MARCHESE, Anna; DAGLIA, Maria; SOBARZO-SÁNCHEZ, Eduardo; NABAVI, Seyed Fazel; NABAVI, Seyed Mohammad - Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**. . ISSN 09445013. 196:2017) 44–68. doi:

10.1016/j.micres.2016.12.003.

BARNES, MJ; URUAKPA, FO; UDENIGWE, CC - Influence of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Peptides on Insulin Resistance. **Journal of Nutritional Health & Food Science**. 3:2 (2015) 1–3. doi: 10.15226/jnhfs.2015.00144.

BARROS, Frederico; AWIKA, Joseph M.; ROONEY, Lloyd W. - Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on in vitro starch digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 60:46 (2012) 11609–11617. doi: 10.1021/jf3034539.

BATT, Carl A. - Listeria: Listeria monocytogenes. Em **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition** [Em linha]. Second Edi ed. [S.l.] : Elsevier, 2014 [Consult. 3 set. 2021]. Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9>. ISBN 9780123847331v. 2. p. 490–493.

BAUDOIN, JP; MARÉCHAL, R. - Genetic diversity in Vigna. Em SR, SINGH; KO, RACHIE (Eds.) - **Cowpea Research, Production and Utilization**. Chichester, England, UK. : John Wiley and Sons, Ltd., 2011

BEER, Abré DE; VIVIER, Melané A. - Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. **BMC Research Notes**. . ISSN 1756-0500. 4:1 (2011) 459. doi: 10.1186/1756-0500-4-459.

BINTSIS, Thomas - Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology**. . ISSN 2471-1888. 3:3 (2017) 529–563. doi: 10.3934/microbiol.2017.3.529.

BIRCH, Dawn; MEMERY, Juliet; KANAKARATNE, Maheshan De Silva - The mindful consumer: Balancing egoistic and altruistic motivations to purchase local food. **Journal of Retailing and Consumer Services**. . ISSN 09696989. 40:October 2017 (2018) 221–228. doi: 10.1016/j.jretconser.2017.10.013.

BOJŇANSKÁ, Tatiana; ŠMITALOVÁ, Jana; VOLLMANNOVÁ, Alena; TOKÁR, Marián; VIETORIS, Vladimír - Bakery products with the addition of soybean flour and their quality after freezer storage of dough. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. . ISSN 1338-5178. 4:Special issue 3 (2015) 18–22. doi: 10.15414/jmbfs.2015.4.special3.18-22.

BOUKAR, Ousmane; BELKO, Nouhoun; CHAMARTHI, Siva; TOGOLA, Abou; BATIENO, Joseph; OWUSU, Emmanuel; HARUNA, Mohammed; DIALLO, Sory; UMAR, Muhammed Lawan; OLUFAJO, Olusoji; FATOKUN, Christian - Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**. . ISSN 14390523. 138:4 (2019) 415–424. doi: 10.1111/pbr.12589.

BOYE, Joyce; ZARE, Fatemeh; PLETCH, Alison - Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 43:2 (2010) 414–431. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.003.

BREWER, M. S.; ROJAS, M. - Consumer attitudes toward issues in food safety. **Journal of Food Safety**. . ISSN 01496085. 28:1 (2008) 1–22. doi: 10.1111/j.1745-4565.2007.00091.x.

BROGDEN, Kim A. - Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**. . ISSN 1740-1534. 3:3 (2005) 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.

BROWN, Lisa; WOLF, Julie M.; PRADOS-ROSALES, Rafael; CASADEVALL, Arturo - Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**. . ISSN 17401534. 13:10 (2015) 620–630. doi: 10.1038/nrmicro3480.

CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. - High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 51:6 (2003) 1623–1627. doi: 10.1021/jf020867b.

CAMPOS-VEGA, Rocio; LOARCA-PIÑA, Guadalupe; OOMAH, B. Dave - Minor components of pulses and their potential impact on human health. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 43:2 (2010) 461–482. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.004.

CAPRIOLI, Giovanni; GIUSTI, Federica; BALLINI, Roberto; SAGRATINI, Gianni; VILA-DONAT, Pilar; VITTORI, Sauro; FIORINI, Dennis - Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. **Food chemistry**. England. . ISSN 1873-7072 (Electronic). 192:2016) 965–971. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.102.

CARBAS, Bruna; MACHADO, Nelson; PATHANIA, Shivani; BRITES, Carla; ROSA, Eduardo AS; BARROS, Ana IRNA Barros - Potential of Legumes: Nutritional Value, Bioactive Properties, Innovative Food Products, and Application of Eco-friendly Tools for Their Assessment. **Food Reviews International**. . ISSN 15256103. 2021). doi: 10.1080/87559129.2021.1901292.

CARDONA, Fernando; ANDRÉS-LACUEVA, Cristina; TULIPANI, Sara; TINAHONES, Francisco J.; QUEIPO-ORTUÑO, María Isabel - Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**. . ISSN 09552863. 24:8 (2013) 1415–1422. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.

CARSKY, RJ; VANLAUWE, B.; LYASSE, O. - Cowpea rotation as a resource management

technology for cereal-based systems in the savannas of West Africa. Em FATOKUN, C. A; TARAWALI, S. A; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. (Eds.) - **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Ibadan, Nigeria : . International Institute of Tropical Agriculture, 2010. ISBN 978-131-190-8. p. 252–266.

CARVALHO, Andre O.; MACHADO, Olga Lima T.; CUNHA, Maura DA; SANTOS, Izabela S.; GOMES, Valdirene M. - Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**. . ISSN 09819428. 39:2 (2001) 137–146. doi: 10.1016/S0981-9428(00)01230-4.

CARVALHO, Márcia; BEBELI, Penelope J.; PEREIRA, Graça; CASTRO, Isaura; EGEE-GILABERT, Catalina; MATOS, Manuela; LAZARIDI, Efstathia; DUARTE, Isabel; LINO-NETO, Teresa; NTATSI, Georgia; RODRIGUES, Miguel; SAVVAS, Dimitrios; ROSA, Eduardo; CARNIDE, Valdemar - European cowpea landraces for a more sustainable agriculture system and novel foods. **J. Sci. Food Agric**. . ISSN 08943796. 3 (2017) 4399–4407. doi: 10.1002/j.

CARVALHO, Márcia; GOUVINHAS, Irene; CASTRO, Isaura; MATOS, Manuela; ROSA, Eduardo; CARNIDE, Valdemar; BARROS, Ana - Drought stress effect on polyphenolic content and antioxidant capacity of cowpea pods and seeds. **Journal of Agronomy and Crop Science**. . ISSN 1439037X. 207:2 (2021) 197–207. doi: 10.1111/jac.12454.

CARVALHO, Márcia; LINO-NETO, Teresa; ROSA, Eduardo; CARNIDE, Valdemar - Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. . ISSN 10970010. 97:13 (2017) 4273–4284. doi: 10.1002/jsfa.8250.

CASTELLANO-HINOJOSA, Antonio; NEVINS, Clayton J.; STRAUSS, Sarah L. - Influence of Cover Crops on Nitrogen Cycling and the Soil Microbial Community. Em **Nitrogen Cycle**. [S.l.] : CRC Press, 2021. p. 264–283.

CETIN-KARACA, Hayriye; NEWMAN, Melissa C. - Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. **Food Bioscience**. . ISSN 22124306. 11:2015) 8–16. doi: 10.1016/j.fbio.2015.03.002.

CHALKER-SCOTT, Linda; FUCHIGAMI, L. H. - The role of phenolic compounds in plant stress responses. Em **Low temperature stress physiology in crops**. [S.l.] : CRC Press, 2018. p. 67–80.

CHEN, Cheng Chieh; HUANG, Cheng Yang - Inhibition of *klebsiella pneumoniae* dnaB helicase by the flavonol galangin. **Protein Journal**. . ISSN 15723887. 30:1 (2011) 59–65. doi: 10.1007/s10930-010-9302-0.

CHIKANE, M. R.; PARWATE, D. V.; INGLE, V. N. - In Vitro Study of Antibacterial Activity of  $\gamma$  - irradiated and Unirradiated Leguminous Seed Coats. **International Journal of**

**Pharmaceutical & Biological Archives.** 1:4 (2010) 335–337.

CHIKWENDU, J. N.; IGBATIM, A C.; OBIZOBA, I. C. - Chemical Composition of Processed Cowpea Tender Leaves and Husks. **International Journal of Scientific and Research Publications.** 4:5 (2014) 1–5.

CICERO, Arrigo F. G.; FOGACCI, Federica; COLLETTI, Alessandro - Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. **British Journal of Pharmacology.** . ISSN 14765381. 174:11 (2017) 1378–1394. doi: 10.1111/bph.13608.

CLSI - M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This document provides procedures for determining the lethal activity of antimicrobial agents. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 19:18 (1999).

CLSI - M11 - Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** . ISSN 07381751. 9:1 (2018) 5–7. doi: 10.1016/0738-1751(90)90024-7.

COMUNIAN, Talita A.; RAVANFAR, Raheleh; CASTRO, Inar Alves DE; DANDO, Robin; FAVARO-TRINDADE, Carmen S.; ABBASPOURRAD, Alireza - Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. **Food chemistry.** England. . ISSN 1873-7072 (Electronic). 233:2017) 125–134. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.085.

CORY, Hannah; PASSARELLI, Simone; SZETO, John; TAMEZ, Martha; MATTEI, Josiemer - The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Frontiers in Nutrition.** . ISSN 2296861X. 5:2018) 1–9. doi: 10.3389/fnut.2018.00087.

CUEVA, Carolina; MORENO-ARRIBAS, M. Victoria; MARTÍN-ÁLVAREZ, Pedro J.; BILLS, Gerald; VICENTE, M. Francisca; BASILIO, Angela; RIVAS, Concepción López; REQUENA, Teresa; RODRÍGUEZ, Juan M.; BARTOLOMÉ, Begoña - Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology.** . ISSN 09232508. 161:5 (2010) 372–382. doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.006.

CUI, En-Ji; SONG, Na-Young; SHRESTHA, Sabina; CHUNG, In-Sik; KIM, Ji-Young; JEONG, Tae-Sook; BAEK, Nam-In - Flavonoid Glycosides from Cowpea Seeds (*Vigna sinensis* K.) Inhibit LDL Oxidation. **Food Science and Biotechnology.** . ISSN 12267708. 21:2 (2012) 619–624. doi: 10.1007/s10068-012-0080-7.

CUI, Y.; OH, Y. J.; LIM, J.; YOUN, M.; LEE, I.; PAK, H. K.; PARK, W.; JO, W.; PARK, S. - AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Food Microbiology.**

England. . ISSN 07400020. 29:1 (2012) 80–87. doi: 10.1016/j.fm.2011.08.019.

DAGLIA, Maria - Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. . ISSN 09581669. 23:2 (2012) 174–181. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.

DAI, Jin; MUMPER, Russell J. - Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. . ISSN 14203049. 15:10 (2010) 7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

DAS, Lipi; BHAUMIK, Eshani; RAYCHAUDHURI, Utpal; CHAKRABORTY, Runu - Role of nutraceuticals in human health. **Journal of Food Science and Technology**. . ISSN 00221155. 49:2 (2012) 173–183. doi: 10.1007/s13197-011-0269-4.

DINEV, Toncho; TZANOVA, Milena; VELICHKOVA, Katya; DERMENDZHIEVA, Diyana; BEEV, Georgi - Antifungal and antioxidant potential of methanolic extracts from acorus calamus L., chlorella vulgaris beijerinck, lemna minuta kunth and scenedesmus dimorphus (turpin) kützing. **Applied Sciences (Switzerland)**. . ISSN 20763417. 11:11 (2021) 4745. doi: 10.3390/app11114745.

DOMÍNGUEZ-PERLES, Raúl; MACHADO, Nelson; ABRAÃO, Ana S.; CARNIDE, Valdemar; FERREIRA, Luís; RODRIGUES, Miguel; ROSA, Eduardo A. D. S.; BARROS, Ana I. R. N. A. - Chemometric analysis on free amino acids and proximate compositional data for selecting cowpea (*Vigna unguiculata* L.) diversity. **Journal of Food Composition and Analysis**. . ISSN 08891575. 53:2016) 69–76. doi: 10.1016/j.jfca.2016.09.006.

DUEÑAS, Montserrat; FERNÁNDEZ, Dolores; HERNÁNDEZ, Teresa; ESTRELLA, Isabel; MUÑOZ, Rosario; ROSARIO MUÑOZ; MUÑOZ, Rosario - Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. England. . ISSN 10970010. 85:2 (2005) 297–304. doi: 10.1002/jsfa.9074.

DUNN, Kristen L.; YANG, Liyi; GIRARD, Audrey; BEAN, Scott; AWIKA, Joseph M. - Interaction of sorghum tannins with wheat proteins and effect on in vitro starch and protein digestibility in a baked product matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 15205118. 63:4 (2015) 1234–1241. doi: 10.1021/jf504112z.

DWIVEDI, Sangeeta; PRAJAPATI, Palash; VYAS, Narendra; MALVIYA, Sapna; KHARIA, Anil - A Review on Food Preservation : Methods , harmful effects and better alternatives. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 3:6 (2017) 193–199.

EFSA - The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 19:2 (2021). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. - **Cowpea ( *Vigna unguiculata* L. Walp.)** [Em linha] Disponível

em WWW:<URL:www.ars-grin.gov>.

EL-MOUNADI, Kaoutar; ISLAM, Kazi T.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, Patricia; READ, Nick D.; SHAH, Dilip M. - Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. **Molecular Microbiology**. . ISSN 13652958. 100:3 (2016) 542–559. doi: 10.1111/mmi.13333.

ELISHA, Ishaku Leo; BOTHA, Francien S.; MCGAW, Lyndy Joy; ELOFF, Jacobus Nicolaas - The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC complementary and alternative medicine**. . ISSN 14726882. 17:1 (2017) 133. doi: 10.1186/s12906-017-1645-z.

FAO - **Definition and classification of commodities - Pulses and derived products** [Em linha], atual. 1994. Disponível em WWW:<URL:http://www.fao.org/es/faodef/fdef04e.htm#4.02>.

FAO - **Second Global Plan of Action for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. [Em linha]. Rome : Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture of the United Nations, 2012 Disponível em WWW:<URL:http://www.fao.org/3/my867en/my867en.pdf>. ISBN 0849326958.

FAO - **No Title** [Em linha], atual. 2014. Disponível em WWW:<URL:http://faostat3.fao.org.>.

FAO - Pulses Contribute to Food Security. **Food and Agriculture Organisation of the United Nations**. 2016) 2016.

FAO; WFP; IFAD - **The state of food insecurity in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition**. Rome, Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012. ISBN 9789251073162.

FDA - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Em **Bad Bug Book**

FIGUEIREDO, Ana Rita; CAMPOS, Francisco; FREITAS, De; HOGG, Tim; FIGUEIREDO, Ana Rita; CAMPOS, Francisco; FREITAS, Víctor DE; HOGG, Tim; COUTO, José António; RITA, Ana; CAMPOS, Francisco; FREITAS, De; HOGG, Tim - Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Food Microbiology**. . ISSN 07400020. 25:1 (2008) 105–112. doi: 10.1016/j.fm.2007.07.004.

FRANCO, Octávio L.; MURAD, Andre M.; LEITE, José R.; MENDES, Paulo A. M.; PRATES, Maura V; BLOCH, Carlos - Identification of a cowpea  $\gamma$ -thionin with bactericidal activity. **FEBS Journal**. . ISSN 1742464X. 273:15 (2006) 3489–3497. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05349.x.

GAN, Ren You; CHAN, Chak Lun; YANG, Qiong Qiong; LI, Hua Bin; ZHANG, Dan; GE, Ying Ying; GUNARATNE, Anil; GE, Jiao; CORKE, Harold - **Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Inc., 2019 Disponível em WWW:<URL: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9>>. ISBN 9780128115251.

GAN, Ren You; DENG, Zi Qing; YAN, Ai Xin; SHAH, Nagendra Prasad; LUI, Wing Yee; CHAN, Chak Lun; CORKE, Harold - Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **Lwt.** . ISSN 00236438. 73:2016) 168–177. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.012.

GARNETT, Tara; APPLEBY, Michael C.; BALMFORD, Andrew; BATEMAN, Ian J.; BENTON, Tim G.; BLOOMER, Phil; BURLINGAME, Barbara A.; DAWKINS, Marian Stamp; DOLAN, Liam; FRASER, David; HERRERO, Mario; HOFFMANN, Irene; SMITH, Pete; THORNTON, Philip K.; TOULMIN, Camilla; VERMEULEN, Sonja J.; GODFRAY, H. Charles J. - What is a sustainable healthy diet? A discussion paper. Em

GEBISA, Eshetu Shumi; GERASU, Minda Asfaw; LEGGESE, Diriba Taddese - A Review on Virulence Factors of Escherichia Coli. **Animal and Veterinary Sciences.** . ISSN 2328-5842. 7:3 (2019) 83. doi: 10.11648/j.av.s.20190703.13.

GOMES, Ana Maria Figueira; NHANTUMBO, Nascimento; FERREIRA-PINTO, Manuela; MASSINGA, Rafael; RAMALHO, José C.; RIBEIRO-BARROS, Ana - Breeding Elite Cowpea [ *Vigna unguiculata* ( L .) Walp ] Varieties for Improved Food Security and Income in Africa : Opportunities and Challenges. **Legume Crops – Characterization and Breeding for Improved Food Security.** 2019) 1–14.

GONÇALVES, Alexandre; GOUFO, Piebiep; BARROS, Ana; DOMÍNGUEZ-PERLES, Raúl; TRINDADE, Henrique; ROSA, Eduardo A. S.; FERREIRA, Luis; RODRIGUES, Miguel - Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: Nutritional advantages and constraints. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** . ISSN 10970010. 96:9 (2016) 2941–2951. doi: 10.1002/jsfa.7644.

GONÇALVES, Rui; MATEUS, Nuno; FREITAS, Victor DE - Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. **Food Chemistry.** . ISSN 03088146. 125:2 (2011) 665–672. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.061.

GONELIMALI, Faraja D.; LIN, Jiheng; MIAO, Wenhua; XUAN, Jinghu; CHARLES, Fedrick; CHEN, Meiling; HATAB, Shaimaa R. - Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. **Frontiers in Microbiology.** . ISSN 1664302X. 9:JUL (2018) 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.

GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. - Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 10408398. 51:4 (2011) 331–362. doi: 10.1080/10408390903584094.

GÓRNIAK, Ireneusz; BARTOSZEWSKI, Rafał; KRÓLICZEWSKI, Jarosław - Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**. . ISSN 1572980X. 18:1 (2019) 241–272. doi: 10.1007/s11101-018-9591-z.

GÜLÇİN, İlhami - Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**. . ISSN 0340-5761. 86:3 (2012) 345–391. doi: 10.1007/s00204-011-0774-2.

GUPTA, Debjyoti Sen; GUPTA, Sanjeev; KUMAR, Jitendra - **Breeding for Enhanced Nutrition and Bio-Active Compounds in Food Legumes**. [S.l.] : Springer, 2021

GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. - Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied microbiology and biotechnology**. Germany. . ISSN 1432-0614 (Electronic). 95:1 (2012) 29–45. doi: 10.1007/s00253-012-4117-x.

GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. - Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**. . ISSN 09567135. 46:2014) 412–429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.

HACHIBAMBA, Twambo; DYKES, Linda; AWIKA, Joseph; MINNAAR, Amanda; DUODU, Kwaku G. - Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science and Technology**. . ISSN 09505423. 48:12 (2013) 2638–2649. doi: 10.1111/ijfs.12260.

HALL, AE; SINGH, BB; EHLERS, JD - Cowpea breeding. **Plant Breed Rev**. 15:2011) 215–274.

HANCOCK, Robert E. W.; HANEY, Evan F.; GILL, Erin E. - The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. **Nature Reviews Immunology**. . ISSN 14741741. 16:5 (2016) 321–334. doi: 10.1038/nri.2016.29.

HASHIMOTO, T.; KUMAZAWA, S.; NANJO, F.; HARA, Y.; NAKAYAMA, T. - Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. England. . ISSN 0916-8451 (Print). 63:12 (1999) 2252–2255. doi: 10.1271/bbb.63.2252.

HAYEK, Saeed A.; RABIN, Gyawali; IBRAHIM, Salam A. - Antimicrobial natural products. Em MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.) - **Microbial pathogens and strategies for combating them science, technology and education** [Em linha]. Badajoz : Formatex Research Center, 2013

Disponível em WWW:<URL: <http://www.antimicrobialbook.org/>>. ISBN 9788493984397 8493984396 9788494213403 8494213407 9788494213410 8494213415. p. 910–921.

HENCHION, Maeve; HAYES, Maria; MULLEN, Anne Maria; FENELON, Mark; TIWARI, Brijesh - Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. **Foods**. . ISSN 23048158. 6:7 (2017) 1–21. doi: 10.3390/foods6070053.

HISANO, Marcelo; BRUSCHINI, Homero; NICODEMO, Antonio Carlos; SROUGI, Miguel - Cranberries and lower urinary tract infection prevention. **Clinics**. . ISSN 18075932. 67:6 (2012) 661–667. doi: 10.6061/clinics/2012(06)18.

HOSSION, Abugafar M. L.; ZAMAMI, Yoshito; KANDAHARY, Rafiya K.; TSUCHIYA, Tomofusa; OGAWA, Wakano; IWADO, Akimasa; SASAKI, Kenji - Quercetin Diacylglycoside Analogues Showing Dual Inhibition of DNA Gyrase and Topoisomerase IV as Novel Antibacterial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 0022-2623. 54:11 (2011) 3686–3703. doi: 10.1021/jm200010x.

HUANG, Yen Hua; HUANG, Chien Chih; CHEN, Cheng Chieh; YANG, Kai Jr; HUANG, Cheng Yang - Inhibition of Staphylococcus aureus PriA Helicase by Flavonol Kaempferol. **Protein Journal**. . ISSN 15734943. 34:3 (2015) 169–172. doi: 10.1007/s10930-015-9609-y.

HULSE, Joseph H. - Nature, Compositions, and Utilization of Grain Legumes. Em **Uses of Tropical Grain Legumes - Proceedings of a Consultants Meeting 27-30 Mar 1989 ICRISAT Center India**. Patancheru : [s.n.]. p. 11–27.

HUYUT, Zübeyir; BEYDEMİR, Şükrü; GÜLÇİN, İlhami - Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Biochemistry Research International**. . ISSN 20902255. 2017:2017). doi: 10.1155/2017/7616791.

JANG, J.; HUR, H. G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S. - Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications - a review. **Journal of Applied Microbiology**. 123:2017) 570–581.

JENSEN, Erik Steen; CARLSSON, Georg; HAUGGAARD-NIELSEN, Henrik - Intercropping of grain legumes and cereals improves the use of soil N resources and reduces the requirement for synthetic fertilizer N: A global-scale analysis. **Agronomy for Sustainable Development**. . ISSN 17730155. 40:1 (2020). doi: 10.1007/s13593-020-0607-x.

JEONG, Ki-Woong; LEE, Jee-Young; KANG, Dong-II; LEE, Ju-Un; SHIN, Song Yub; KIM, Yangmee - Screening of Flavonoids as Candidate Antibiotics against Enterococcus faecalis. **Journal of Natural Products**. . ISSN 0163-3864. 72:4 (2009) 719–724. doi: 10.1021/np800698d.

KARAPANOS, Ioannis; PAPANDREOU, Anastasia; NTATSI, Georgia; PENELOPE, J.;

- SAVVAS, Dimitrios - Cowpea fresh pods: A new legume for the market. Assessment of their quality and dietary characteristics of 37 cowpea accessions grown in southern Europe. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 97:13 (2017) 4343–4352. doi: 10.1002/j.
- KAVANAGH, Kevin; DOWD, Susan - Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. . ISSN 0022-3573. 56:3 (2010) 285–289. doi: 10.1211/0022357022971.
- KAYITESI, Eugénie - Micronisation of cowpeas : The effects on sensory quality, phenolic compounds and bioactive properties. April (2013) 1–190.
- KAZANTZOGLOU, Georgios; MAGIATIS, Prokopios; PANOUTSOPOULOS, Georgios; SKALTSOUNIS, Alexios-Leandros - Dorycnioside, a New Phenylbutanone Glucoside from *Dorycnium pentaphyllum* subsp. herbaceum. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 59:1–2 (2004) 23–26. doi: doi:10.1515/znc-2004-1-205.
- KHALIFA, Hazim O.; KAMIMOTO, Maki; SHIMAMOTO, Toshi; SHIMAMOTO, Tadashi - Antimicrobial effects of blueberry, raspberry, and strawberry aqueous extracts and their effects on virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Phytotherapy Research**. . ISSN 10991573. 29:11 (2015) 1791–1797. doi: 10.1002/ptr.5436.
- KHAMENEH, Bahman; IRANSHAHY, Milad; SOHEILI, Vahid; FAZLY BAZZAZ, Bibi Sedigheh - Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. . ISSN 20472994. 8:1 (2019). doi: 10.1186/s13756-019-0559-6.
- KHODDAMI, Ali; WILKES, Meredith A.; ROBERTS, Thomas H. - Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**. . ISSN 14203049. 18:2 (2013) 2328–2375. doi: 10.3390/molecules18022328.
- KIRIGIA, Dinah; WINKELMANN, Traud; KASILI, Remmy; MIBUS, Heiko - Development stage, storage temperature and storage duration influence phytonutrient content in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Heliyon**. . ISSN 24058440. 4:6 (2018) e00656. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00656.
- KORUKLUOGLU, M.; SAHAN, Y.; YIGIT, A. - Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. **Journal of Food Safety**. . ISSN 01496085. 28:1 (2008) 76–87. doi: 10.1111/j.1745-4565.2007.00096.x.
- KOWALSKA, Hanna; CZAJKOWSKA, Kinga; CICHOWSKA, Joanna; LENART, Andrzej - What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. **Trends in Food Science & Technology**. . ISSN 0924-2244. 67:2017) 150–159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>.
- KRITZINGER, Q.; LALL, N.; AVELING, Tas - Antimicrobial activity of cowpea (*Vigna*

unguiculata) leaf extracts. **South African Journal of Botany**. . ISSN 02546299. 71:1 (2005) 45–48. doi: 10.1016/S0254-6299(15)30147-2.

KRUGER, Johanita; TAYLOR, John R. N.; DU, Xiaogu; MOURA, Fabiana F. DE; LÖNNERDAL, Bo; OELOFSE, André - Effect of phytate reduction of sorghum, through genetic modification, on iron and zinc availability as assessed by an in vitro dialysability bioaccessibility assay, Caco-2 cell uptake assay, and suckling rat pup absorption model. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 141:2 (2013) 1019–1025. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.105.

KUMAR, Naresh; GOEL, Nidhi - Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**. . ISSN 2215-017X. 24:2019) e00370. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.

LA ROSA, Laura A. DE; MORENO-ESCAMILLA, Jesús Omar; RODRIGO-GARCÍA, Joaquín; ALVAREZ-PARRILLA, Emilio - **Phenolic compounds** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Inc., 2019 Disponível em WWW:<URL:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>>. ISBN 9780128132784.

LACERDA, Ariane F.; VASCONCELOS, Érico A. R.; PELEGRINI, Patrícia Barbosa; GROSSI DE SA, Maria F. - Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 5:APR (2014). doi: 10.3389/fmicb.2014.00116.

LACERDA DE OLIVEIRA, Livia DE; VERAS DE CARVALHO, Mariana; MELO, Lauro - Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. **Rev. Ceres**. 61:61 (2014) 764–779.

LATTANZIO, V.; ARPAIA, S.; CARDINALI, A.; VENERE, D. DI; LINSALATA, V. - Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of Vigna to aphids. **Journal of agricultural and food chemistry**. United States. . ISSN 0021-8561 (Print). 48:11 (2000) 5316–5320. doi: 10.1021/jf000229y.

LATTANZIO, V.; CARDINALI, A.; LINSALATA, V.; NG, N. Q.; PERRINO, P. - Flavonoid HPLC fingerprints of wild Vigna species. **Advances in Cowpea Research**. January (1997) 66–74.

LATTANZIO, Vincenzo - Phenolic Compounds: Introduction. Em RAMAWAT, KISHAN GOPAL; MÉRILLON, JEAN MICHEL; (EDS.) (Eds.) - **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin; Heidelberg; Germany : Springer, 2013. ISBN 9783642221446. p. 1543–1573.

LEE, Siseon; MONNAPPA, Ajay Kalanjana; MITCHELL, Robert J. - Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds. **BMB Reports**. . ISSN 19766696. 45:5 (2012) 265–274. doi: 10.5483/BMBRep.2012.45.5.265.

LENNY, Sovia; RIZKY, Dinda Widya - Potential Antibacterial and Antioxidant Activiy of

Methanolic Extract of *Vigna unguiculata* (L.) Walp Leaves. **Proceedings of the 1st International Conference on Chemical Science and Technology Innovation**. 2020) 215–217. doi: 10.5220/0008878602150217.

LI, An Na; LI, Sha; ZHANG, Yu Jie; XU, Xiang Rong; CHEN, Yu Ming; LI, Hua Bin - Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 6:12 (2014) 6020–6047. doi: 10.3390/nu6126020.

LIM, X. X.; KOH, W. Y.; UTHUMPORN, U.; MAIZURA, M.; WAN ROSLI, W. I. - The development of legume-based yogurt by using water kefir as starter culture. **International Food Research Journal**. 26:4 (2019).

LIN, Long Ze; HARNLY, James M.; PASTOR-CORRALES, Marcial S.; LUTHRIA, Devanand L. - The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 107:1 (2008) 399–410. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.038.

LIU, Corsa Lok Ching; KUCHMA, Oleksandra; KRUTOVSKY, Konstantin V. - Mixed-species versus monocultures in plantation forestry: Development, benefits, ecosystem services and perspectives for the future. **Global Ecology and Conservation**. . ISSN 23519894. 15:2018) e00419. doi: 10.1016/j.gecco.2018.e00419.

LONARDI, Stefano; MUÑOZ-AMATRIÁIN, María; LIANG, Qihua; SHU, Shengqiang; WANAMAKER, Steve I.; LO, Sassoum; TANSKANEN, Jaakko; SCHULMAN, Alan H.; ZHU, Tingting; LUO, Ming Cheng; ALHAKAMI, Hind; OUNIT, Rachid; HASAN, Abid Md; VERDIER, Jerome; ROBERTS, Philip A.; SANTOS, Jansen R. P.; NDEVE, Arsenio; DOLEŽEL, Jaroslav; VRÁNA, Jan; HOKIN, Samuel A.; FARMER, Andrew D.; CANNON, Steven B.; CLOSE, Timothy J. - The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Plant Journal**. . ISSN 1365313X. 98:5 (2019) 767–782. doi: 10.1111/tpj.14349.

LOPES, Ana; VEIGA, Alexandra; SILVA, Lubélia; CARRILHO, Elisa; BORGES, Marta; DIAS, Manuel Barreto; SEABRA, Maria João; FERREIRA, Sónia; FERNANDES, Paulo; NUNES, Sofia - **Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal**

LOURENÇO, António; NEVES, Elsa; BRITO, Luisa - Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. **Food Control**. . ISSN 09567135. 20:6 (2009) 585–589. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.08.009.

MADODÉ, Yann E.; LINNEMANN, Anita R.; NOUT, Martinus J. R. R.; VOSMAN, Ben; HOUNHOUGAN, Djidjoho J.; BOEKEL, Martinus A. J. S. J. S. VAN - Nutrients, technological properties and genetic relationships among twenty cowpea landraces cultivated in West Africa. **International Journal of Food Science & Technology**. . ISSN 09505423. 47:12 (2012) 2636–2647. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03146.x>.

MAPHOSA, Yvonne; JIDEANI, Victoria A. - The role of legumes in human nutrition. **Functional food-improve health through adequate food**. 1:2017) 13.

MARATHE, Sushama A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, Sahayog N.; SHARMA, Arun - Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 49:9 (2011) 2005–2012. doi: 10.1016/j.fct.2011.04.039.

MARINANGELI, Christopher P. F.; JONES, Peter J. H. - Whole and fractionated yellow pea flours reduce fasting insulin and insulin resistance in hypercholesterolaemic and overweight human subjects. **British Journal of Nutrition**. . ISSN 00071145. 105:1 (2011) 110–117. doi: 10.1017/S0007114510003156.

MARQUES, Marcelo Rodrigues; SOARES FREITAS, Rosana Aparecida Manólio; CORRÊA CARLOS, Amanda Caroline; SIGUEMOTO, Érica Sayuri; FONTANARI, Gustavo Guadagnucci; ARÊAS, José Alfredo Gomes - Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 168:2015) 288–293. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.049.

MARTILLANES, Sara; ROCHA-PIMIENTA, Javier; CABRERA-BAÑEGIL, Manuel; MARTÍN-VERTEDOR, Daniel; DELGADO-ADÁMEZ, Jonathan - Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. Em **Phenolic Compounds - Biological Activity**. p. 39–59.

MATSUZAKI, Katsumi - Membrane Permeabilization Mechanisms. Em [Em linha] Disponível em WWW:<URL:[http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4_2)>. p. 9–16.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. - *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**. . ISSN 01681605. 92:1 (2004) 15–33. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00326-X.

MEDEIROS, José George Ferreira; ARAUJO NETO, Aderson Costa; SILVA, Edcarlos Camilo; RODRIGUES, Rummenigge De Macêdo; DEMARTELAERE, Andréa Celina Ferreira; SILVA, José Vinicius Bezerra Da - Phytochemical profile and antifungal action of *Anadenanthera colubrina* extract on the quality of maize seeds. **Arquivos do Instituto Biológico**. . ISSN 1808-1657. 88:Xml (2021) 1–9. doi: 10.1590/1808-1657000762019.

MIRELA, Mirela; IMOVI, Imovi; DELA, Frane; GRADVOL, Vedran; KOCEVSKI, Dragana; PAVLOVI, Hrvoje - Antifungal effect of eugenol and carvacrol against foodborne pathogens *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium roqueforti* in improving safety of fresh-cut watermelon. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. 3:3 (2014) 91. doi:

10.5455/jice.20140503090524.

MNICH, Ewelina; BJARNHOLT, Nanna; EUDES, Aymerick; HARHOLT, Jesper; HOLLAND, Claire; JØRGENSEN, Bodil; LARSEN, Flemming Hofmann; LIU, Ming; MANAT, Renil; MEYER, Anne S.; MIKKELSEN, Jørn Dalgaard; MOTAWIA, Mohammed Saddik; MUSCHIOL, Jan; MØLLER, Birger Lindberg; MØLLER, Svenning Rune; PERZON, Alixander; PETERSEN, Bent Larsen; RAVN, Jonas Laukkonen; ULVSKOV, Peter - Phenolic cross-links: building and de-constructing the plant cell wall. **Nat. Prod. Rep.** 37:7 (2020) 919–961. doi: 10.1039/C9NP00028C.

MOKRANI, Slimane; NABTI, El Hafid; CRUZ, Cristina - Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. **Applied Sciences (Switzerland)**. . ISSN 20763417. 10:20 (2020) 1–27. doi: 10.3390/app10207025.

MOLOTO, Mapula R.; PHAN, Anh Dao T.; SHAI, Jerry L.; SULTANBAWA, Yasmina; SIVAKUMAR, Dharini - Comparison of Phenolic Compounds, Carotenoids, Amino Acid Composition, In Vitro Antioxidant and Anti-Diabetic Activities in the Leaves of Seven Cowpea (*Vigna unguiculata*) Cultivars. **Foods**. . ISSN 2304-8158. 9:9 (2020) 1285. doi: 10.3390/foods9091285.

MORENO-VALDESPINO, Cecilia A.; LUNA-VITAL, Diego; CAMACHO-RUIZ, Rosa M.; MOJICA, Luis - Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: Mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 130:2020) 108905. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108905.

MUDRYJ, Adriana N.; YU, Nancy; AUKEMA, Harold M. - Nutritional and health benefits of pulses. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. . ISSN 17155320. 39:11 (2014) 1197–1204. doi: 10.1139/apnm-2013-0557.

MUDRYJ, Adriana N.; YU, Nancy; HARTMAN, Terryl J.; MITCHELL, Diane C.; LAWRENCE, Frank R.; AUKEMA, Harold M. - Pulse consumption in Canadian adults influences nutrient intakes. **British Journal of Nutrition**. . ISSN 00071145. 108:SUPPL. 1 (2012). doi: 10.1017/S0007114512000724.

MUREVANHEMA, Yvonne Y.; JIDEANI, Victoria A. - Potential of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Milk as a Probiotic Beverage-A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 10408398. 53:9 (2013) 954–967. doi: 10.1080/10408398.2011.574803.

MYERS, Samuel S.; SMITH, Matthew R.; GUTH, Sarah; GOLDEN, Christopher D.; VAITLA, Bapu; MUELLER, Nathaniel D.; DANGOUR, Alan D.; HUYBERS, Peter - Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. **Annual Review**

**of Public Health**. . ISSN 15452093. 38:2017) 259–277. doi: 10.1146/annurev-publhealth-031816-044356.

NAZZARO, Filomena; FRATIANNI, Florinda; MARTINO, Laura DE; COPPOLA, Raffaele; FEO, Vincenzo DE - Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. . ISSN 14248247. 6:12 (2013) 1451–1474. doi: 10.3390/ph6121451.

NCCLS - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals ; Approved Standard — Third Edition. 28:8 (2002).

NDERITU, Alice M.; DYKES, Linda; AWIKA, Joseph M.; MINNAAR, Amanda; DUODU, Kwaku G. - Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 141:3 (2013) 1763–1771. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.001.

NEWELL, Diane G.; KOOPMANS, Marion; VERHOEF, Linda; DUIZER, Erwin; AIDARA-KANE, Awa; SPRONG, Hein; OPSTEEGH, Marieke; LANGELAAR, Merel; THREFFALL, John; SCHEUTZ, Flemming; GIESSEN, Joke Van DER; KRUSE, Hilde - Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**. . ISSN 01681605. 139:SUPPL. 1 (2010) S3–S15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021.

NOHYNEK, Liisa J.; ALAKOMI, Hanna-Leena; KÄHKÖNEN, Marja P.; HEINONEN, Marina; HELANDER, Ilkka M.; OKSMAN-CALDENTY, Kirsi-Marja; PUUPPONEN-PIMIÄ, Riitta H. - Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. **Nutrition and Cancer**. 54:1 (2006) 18–32. doi: 10.1207/s15327914nc5401\_4.

NOLLET, Leo M. L.; GUTIERREZ-URIBE, Janet Alejandra - **Phenolic compounds in food: characterization and analysis**. [S.l.] : CRC Press, 2018

OJWANG, L. O. - Anti-inflammatory properties of cowpea phenotypes with different phenolic profiles. Em

OJWANG, Leonard O.; DYKES, Linda; AWIKA, Joseph M. - Ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry profiling of anthocyanins and flavonols in cowpea (*Vigna unguiculata*) of varying genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 60:14 (2012) 3735–3744. doi: 10.1021/jf2052948.

OJWANG, Leonard O.; YANG, Liyi; DYKES, Linda; AWIKA, Joseph - Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 139:1–4 (2013) 35–43. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.117.

OYEYINKA, Samson A.; OYEYINKA, Adewumi T. - A review on isolation, composition,

physicochemical properties and modification of Bambara groundnut starch. **Food Hydrocolloids**. . ISSN 0268005X. 75:2018) 62–71. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.09.012.

PAGARE, Saurabh; BHATIA, Manila; TRIPATHI, Niraj; PAGARE, Sonal; BANSAL, Y. K. - Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. 9:3 (2015) 293–304.

PAPUC, Camelia; GORAN, Gheorghe V.; PREDESCU, Corina N.; NICORESCU, Valentin; STEFAN, Georgeta - Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. . ISSN 15414337. 16:6 (2017) 1243–1268. doi: 10.1111/1541-4337.12298.

PARREIRA, Paula; SOARES, Belinda I. G.; FREIRE, Carmen S. R.; SILVESTRE, Armando J. D.; REIS, Celso A.; MARTINS, M. Cristina L.; DUARTE, Maria F. - Eucalyptus spp. outer bark extracts inhibit *Helicobacter pylori* growth: in vitro studies. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 105:December 2016 (2017) 207–214. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.012.

PASQUET, R. S.; PADULOSI, S. - Genus *Vigna* and Cowpea (*V. unguiculata* [L.] Walp.) taxonomy: current status and prospects. Em **Innovative research along the cowpea value chain. Proceedings of the Fifth World Cowpea Conference on Improving Livelihoods in the Cowpea Value Chain through Advancement in Science**. Saly (Senegal) - 27 Sep - 01 Oct 2010 : IITA, 2013. p. 66–87.

PATRA, Amlan K. - **Dietary phytochemicals and microbes**. ISBN 9789400739260.

PERDONCINI, MRFG; SEREIA, Maria Josiane; SCOPEL, Fabio Henrique Polisel; FORMIGONI, Maysa; RIGOBELLO, Eliane Sloboda; BENETI, Stéfani Caroline; CARDOSO, Flavia Aparecida Reitz; MARCHI, Livia Benossi; JUNIOR, C. GOMES D. E. SILVA; FERNANDES, Paula Gimenez Milani; OTHERS - Growth of fungal cells and the production of mycotoxins. **Cell Growth**. 2019) 23.

PETCHIAMMAL, C.; HOPPER, Waheeta - Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. . ISSN 09751491. 6:SUPPL. 2 (2014) 476–479. doi: 10.13140/2.1.5133.8881.

PIRSA, Sajad; SHARIFI, Kurush Aghbolagh - A review of the applications of bioproteins in the preparation of biodegradable films and polymers. **Jchemlett.Com**. 1:2020) 47–58.

POPOFF, Michel Y.; MINOR, Leon E. LE - Salmonella. Em **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria** [Em linha]. [S.l.] : Wiley, 2015 Disponível em WWW:<URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01166>. ISBN

9781118960608v. 70. p. 1–1.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. M.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. M. - Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**. . ISSN 13645072. 90:4 (2001) 494–507. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x.

QUADROS, Andreza Urba DE; BINI, Daniel; PEREIRA, Priscilla Aparecida Tartari; MORONI, Estela Glória; MONTEIRO, Marta Chagas - Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiologica**. . ISSN 00155632. 56:4 (2011) 349–352. doi: 10.1007/s12223-011-0049-6.

QUALFOOD - **Micotoxinas** [Em linha], atual. 2021. Disponível em WWW:<URL:<https://www.qualfood.com/seguranca-alimentar/micotoxinas/informacao-geral>>.

QUANSAH, Joycelyn K.; UDENIGWE, Chibuikwe C.; SAALIA, Firibu K.; YADA, Rickey Y. - The Effect of Thermal and Ultrasonic Treatment on Amino Acid Composition, Radical Scavenging and Reducing Potential of Hydrolysates Obtained from Simulated Gastrointestinal Digestion of Cowpea Proteins. **Plant Foods for Human Nutrition**. . ISSN 09219668. 68:1 (2013) 31–38. doi: 10.1007/s11130-013-0334-4.

QUIDEAU, Stéphane; DEFFIEUX, Denis; DOUAT-CASASSUS, Céline; POUYSÉGU, Laurent - Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**. . ISSN 14337851. 50:3 (2011) 586–621. doi: 10.1002/anie.201000044.

RASHED, Khaled; ĆIRIĆ, Ana; GLAMOČLIJA, Jasmina; SOKOVIĆ, Marina - Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 59:2014) 210–215. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.021.

RAWAL, Vikas; NAVARRO, Dorian Kalamvrezos - **The Global Economy of Pulses**. Rome : FAO, 2019. ISBN 9781351263191.

RECKLING, Moritz; PREISSEL, Sara; ZANDER, Peter; TOPP, Kairsty; WATSON, Christine; MURPHY-BOKERN, Donal; STODDARD, F. L. - Effects of legume cropping on farming and food systems. **Legume Futures Report 1.6**. 245216 (2014) 1–37.

REHMAN, Sehrish; KHAN, Haroon - Advances in Antioxidant Potential of Natural Alkaloids. **Current Bioactive Compounds**. 13:2 (2017) 101–108.

RICCI, Lucia; UMILTÀ, Eleonora; RIGHETTI, Maria C.; MESSINA, Tiziana; ZURLINI, Chiara;

MONTANARI, Angela; BRONCO, Simona; BERTOLDO, Monica - On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by DSC and TGA. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. . ISSN 10970010. 98:14 (2018) 5368–5377. doi: 10.1002/jsfa.9078.

RODRIGUES PINTO, Paula C.; BORGES DA SILVA, Eduardo A.; RODRIGUES, Alírio Egídio - Insights into oxidative conversion of lignin to high-added-value phenolic aldehydes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. . ISSN 08885885. 50:2 (2011) 741–748. doi: 10.1021/ie102132a.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. - Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 43:2 (2010) 432–442. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.002.

SAEED, Farhan; AFZAAL, Muhammad; TUFAIL, Tabussam; AHMAD, Aftab - Use of Natural Antimicrobial Agents: A Safe Preservation Approach. **Active Antimicrobial Food Packaging**. 2019) 1–18. doi: 10.5772/intechopen.80869.

SAIKIA, Purabi; NAG, Akash; ANURAG, Subham; CHATTERJEE, Sandeep; KHAN, Mohammad Latif - Tropical Legumes: Status, Distribution, Biology and Importance. Em **The Plant Family Fabaceae** [Em linha]. Singapore : Springer Singapore, 2020 Disponível em WWW:<URL:[http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4752-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4752-2_2)>. p. 27–41.

SALAS, Maria Paula; CÉLIZ, Gustavo; GERONAZZO, Hugo; DAZ, Mirta; RESNIK, Silvia Liliana - Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 124:4 (2011) 1411–1415. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.100.

SALTVEIT, Mikal E.; OTHERS - Synthesis and metabolism of phenolic compounds. **Fruit Veget. Phytochem. Chem. Human Health**. 2:2017) 115.

SANTOS, Vanessa Sardinha Dos - Fotoperiodismo - Planta de dia longo e dia curto. 2021).

SEGURA-CAMPOS, Maira Rubi; CHEL-GUERRERO, Luis Antonio; BETANCUR-ANCONA, David Abram - Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. **Process Biochemistry**. . ISSN 13595113. 46:4 (2011) 864–872. doi: 10.1016/j.procbio.2010.12.008.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini - Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 17564646. 18:2015) 820–897. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018.

SHAHIDI, Fereidoon; YEO, Ju Dong - Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**. . ISSN 14203049. 21:9 (2016). doi: 10.3390/molecules21091216.

SHANMUGHAPRIYA, Santhanam; MANILAL, Aseer; SUJITH, Sugathan; SELVIN, Joseph; KIRAN, George Seghal; NATARAJASEENIVASAN, Kalimuthusamy - Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. **Annals of Microbiology**. . ISSN 1869-2044. 58:3 (2008) 535–541. doi: 10.1007/BF03175554.

SHARMA, Meenakshi; KAUSHIK, Prashant - Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnololy**. 36:2020) 1–12.

SHASHIREKHA, M. N.; MALLIKARJUNA, S. E.; RAJARATHNAM, S. - Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 55:10 (2015) 1324–1339. doi: 10.1080/10408398.2012.692736.

SHIRAZI, Mohsen Taheri; GHOLAMI, Hamid; KAVOOSI, Gholamreza; ROWSHAN, Vahid; TAFSIRY, Asad - Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *T. agetes minuta* and *O. cimum basilicum* essential oils. **Food Science & Nutrition**. . ISSN 2048-7177. 2:2 (2014) 146–155. doi: 10.1002/fsn3.85.

SIMION, Tariku - Breeding Cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp for Quality Traits. **Annals of Reviews Research**. 3:3 (2018) 1–7.

SINGH, B. B. - **Cowpea: The Food Legume of the 21st Century**. ISBN 9780891186229.

SINGH, Ishwar - Antimicrobials in higher plants: Classification, mode of action and bioactivities. **Chemical Biology Letters**. 4:2017) 48–62.

SINGH, Upasana; AKHTAR, Shamim; MISHRA, Abhishek; SARKAR, Dhiman - A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents. **Journal of Microbiological Methods**. . ISSN 01677012. 84:2 (2011) 202–207. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.013.

SINGLA, Rajeev K.; DUBEY, Ashok K.; GARG, Arun; SHARMA, Ramesh K.; FIORINO, Marco; AMEEN, Sara M.; HADDAD, Moawiya A.; AL-HIARY, Masnat - Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. **Journal of AOAC International**. 102:5 (2019) 1397–1400.

SIRIWONG, Supatcharee; THUMANU, Kanjana; HENGPRATOM, Tanaporn; EUMKEB, Griangsak - Synergy and Mode of Action of Ceftazidime plus Quercetin or Luteolin on *Streptococcus pyogenes*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. . ISSN 17414288. 2015:2015) 1–12. doi: 10.1155/2015/759459.

SITOHY, Mahmoud; MAHGOUB, Samir; OSMAN, Ali; EL-MASRY, Ragab; AL-GABY, Aly - Extent and Mode of Action of Cationic Legume Proteins against *Listeria monocytogenes* and

Salmonella Enteritidis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. . ISSN 18671306. 5:3 (2013) 195–205. doi: 10.1007/s12602-013-9134-2.

SITOHY, Mahmoud; OSMAN, Ali - Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 120:1 (2010) 66–73. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.071.

SMÝKAL, Petr; COYNE, Clarice J.; AMBROSE, Mike J.; MAXTED, Nigel; SCHAEFER, Hanno; BLAIR, Matthew W.; BERGER, Jens; GREENE, Stephanie L.; NELSON, Matthew N.; BESHARAT, Naghmeh; VYMYSLICKÝ, Tomáš; TOKER, Cengiz; SAXENA, Rachit K.; ROORKIWAL, Manish; PANDEY, Manish K.; HU, Jinguo; LI, Ying H.; WANG, Li X.; GUO, Yong; QIU, Li J.; REDDEN, Robert J.; VARSHNEY, Rajeev K. - Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**. . ISSN 15497836. 34:2015) 43–104. doi: 10.1080/07352689.2014.897904.

SOMBIÉ, Pierre Alexandre Eric Djifaby; COMPAORÉ, Moussa; COULIBALY, Ahmed Yacouba; OUÉDRAOGO, Jeremy Tinga; LA SALLE TIGNÉGRÉ, Jean Baptiste DE; KIENDRÉBÉOGO, Martin - Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) genotypes from Burkina Faso. **Foods**. . ISSN 23048158. 7:9 (2018) 1–9. doi: 10.3390/foods7090143.

STEELE, WM; MEHRA, KL - Structure, Evolution, and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. Em SUMMERFIELD, R. J. ...; BUNTING, A. H. (Eds.) - **Advances in legume science survey**. UK : Royal Botanic Garden, 1980. p. 393–404.

STEFANOVIĆ, Olgica D.; TEŠIĆ, Jelena D.; ČOMIĆ, Ljiljana R. - Melilotus albus and Dorycnium herbaceum extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potentials. **Journal of Food and Drug Analysis**. . ISSN 10219498. 23:3 (2015) 417–424. doi: 10.1016/j.jfda.2015.01.003.

STOTZ, Henrik U.; THOMSON, James; WANG, Yueju - Plant Signaling & Behavior Plant defensins Defense, development and application. . ISSN 1559-2324. 2009). doi: 10.4161/psb.4.11.9755.

SYSOEVA, Marina; MARKOVSKAYA, Eugenia; SHIBAEVA, Tatjana - Plants under Continuous Light: A Review. **Plant Stress**. 4:1 (2010) 5–17.

T.J. SCHMIDT; S.A. KHALID; A.J. ROMANHA; T.MA. ALVES; M.W. BIAVATTI; R. BRUN; F.B. DA COSTA; S.L. DE CASTRO; V.F. FERREIRA; M.V.G. DE LACERDA; J.H.G. LAGO; L.L. LEON; N.P. LOPES; R.C. DAS NEVES AMORIM; M. NIEHUES; I.V. OGUNGBE - The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part I. **Current Medicinal Chemistry**. . ISSN 09298673. 19:14 (2012)

2128–2175. doi: 10.2174/092986712800229023.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. - Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. . ISSN 09567135. 21:9 (2010) 1199–1218. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.

TAK, Yamini; KUMAR, Manoj - Phenolics: A Key Defence Secondary Metabolite to Counter Biotic Stress. Em LONE R., SHUAB R., KAMILI A. (EDS) (Ed.) - **Plant Phenolics in Sustainable Agriculture** [Em linha]. Singapore : Springer Singapore, 2020 Disponível em WWW:<URL:http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4890-1\_13>. p. 309–329.

TAKAHASHI, Jacqueline A.; LIMA, Gesiane Da S.; SANTOS, Gabriel F. DOS; LYRA, Fernanda H.; SILVA-HUGHES, Alice F. DA; GONÇALVES, Flávia A. G. - Filamentous fungi and chemistry: Old friends, new allies. **Revista Virtual de Química**. . ISSN 19846835. 9:6 (2017) 2351–2382. doi: 10.21577/1984-6835.20170141.

TAKÓ, Miklós; KERÉKES, Erika Beáta; ZAMBRANO, Carolina; KOTOGÁN, Alexandra; PAPP, Tamás; KRISCH, Judit; VÁGVÖLGYI, Csaba - Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. **Antioxidants**. . ISSN 20763921. 9:2 (2020). doi: 10.3390/antiox9020165.

TANASE, Corneliu; BUJOR, Oana-Crina; POPA, Valentin I. - **Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants** [Em linha]. 2. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2019 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00003-7>. ISBN 9780128137680.

THATOI, Hrudayanath; PATRA, Jayanta Kumar; DAS, S. K. - Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**. 36:2013) 561–579.

THERY, Thibaut; ARENDT, Elke K. - Antifungal activity of synthetic cowpea defensin Cp-thionin II and its application in dough. **Food Microbiology**. . ISSN 10959998. 73:2018) 111–121. doi: 10.1016/j.fm.2018.01.006.

TIAN, Yan; ZOU, Bo; LI, Chun-Mei Mei; YANG, Jie; XU, Shu-Fen Fen; HAGERMAN, Ann E. - High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both ex vivo and in vivo. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 45:1 (2012) 26–30. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.005.

TIMKO, Michael P.; EHLERS, Jeff D.; ROBERTS, Philip A. - Cowpea. Genome Mapping and Molecular Breeding. Em EDITOR, SERIES; KOLE, CHITTARANJAN (Eds.) - **Pulses, Sugar and Tuber Crops**. [S.l.] : Springer Verlag, Berlin Heidelberg Sci and Edu, 2007. ISBN 9783540345152. p. 49–67.

UNITED NATIONS - **World Population Prospects 2019** [Em linha], atual. 2019. Disponível em WWW:<URL:https://population.un.org/wpp/DataQuery/>.

VANCE, CP; GRAHAM, PH; ALLAN, DL - Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. Em PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E.; (EDS.) (Eds.) - **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**. [S.l.] : Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000. p. 506–514.

VATS, S.; TIWARI, R.; ALAM, A.; BEHERA, KK; PAREEK, R. - Evaluation of Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of in vitro culture of *Vigna unguiculata* L. Walp. **Researcher**. October (2012).

VERDCOURT, B. - **Studies in the Leguminosae-Papilionoideae ' Flora of Tropical East Africa '**. [S.l.] : Kew Bulletin, 1970

VIDIGAL, Patricia; ROMEIRAS, Maria Manuela; MONTEIRO, Filipa - **Crops Diversification and the Role of Orphan Legumes to Improve the Sub-Saharan Africa Farming Systems**. [S.l.] : Intech, 2019

VIEGAS, Silvia Judite - Contaminação microbiológica dos Alimentos. Em **Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação**. ISBN 9789728643539. p. 29–30.

VINAYAGAM, Ramachandran; JAYACHANDRAN, Muthukumar; XU, Baojun - Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. **Phytotherapy Research**. . ISSN 10991573. 30:2 (2016) 184–199. doi: 10.1002/ptr.5528.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, Sanda; BLAŽEKOVIĆ, Biljana; ŠTEFAN, Maja Bival; BABAC, Marija - Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. Em RAO (ED.), V. (Ed.) - **Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**. London; United Kingdom; : IntechOpen Ltd., 2012. p. 150–180.

VODNAR, Dan Cristian; CĂLINOIU, Lavinia Florina; DULF, Francisc Vasile; ȘTEFĂNESCU, Bianca Eugenia; CRIȘAN, Gianina; SOCACIU, Carmen - Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. **Food chemistry**. England. . ISSN 1873-7072 (Electronic). 231:2017) 131–140. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.131.

WANG, Hongwei; CHAMBERS, Edgar; KAN, Jianquan - Sensory characteristics of combinations of phenolic compounds potentially associated with smoked aroma in foods. **Molecules**. . ISSN 14203049. 23:8 (2018). doi: 10.3390/molecules23081867.

WANG, M. L.; GILLASPIE, A. G.; MORRIS, J. B.; PITTMAN, R. N.; DAVIS, J.; PEDERSON, G. A. - Flavonoid content in different legume germplasm seeds quantified by HPLC. **Plant Genetic Resources**. 6:1 (2008) 62–69. doi: 10.1017/S1479262108923807.

WEERDEN, Nicole L. VAN DER; BLEACKLEY, Mark R.; ANDERSON, Marilyn A. - Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**. . ISSN 1420682X. 70:19 (2013) 3545–3570. doi: 10.1007/s00018-013-1260-1.

WEERDEN, Nicole L. VAN DER; LAY, Fung T.; ANDERSON, Marilyn A. - The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **The Journal of biological chemistry**. United States. . ISSN 0021-9258 (Print). 283:21 (2008) 14445–14452. doi: 10.1074/jbc.M709867200.

WHO - **Climate Change and Health** [Em linha], atual. 2021. Disponível em WWW:<URL:https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>.

WOLFF, Sandra Mara; SILVEIRA, Ana Claudia Da; LAZZAROTTO, Marcelo - Metodologia Para Extração De Fenólicos Totais E Antioxidantes Da Erva-Mate. **Iniciação Científica Cesumar**. . ISSN 1518-1243. 21:1 (2019) 45. doi: 10.17765/1518-1243.2019v21n1p45-54.

XIE, Yixi; CHEN, Jing; XIAO, Aiping; LIU, Liangliang - Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. **Molecules**. . ISSN 14203049. 22:11 (2017). doi: 10.3390/molecules22111913.

XIE, Yixi; YANG, Weijie; TANG, Fen; CHEN, Xiaoqing; REN, Licheng - Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current medicinal chemistry**. United Arab Emirates. . ISSN 1875-533X (Electronic). 22:1 (2015) 132–149. doi: 10.2174/0929867321666140916113443.

XU, Baojun; CHANG, Sam K. C. - Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 57:11 (2009) 4754–4764. doi: 10.1021/jf900695s.

XU, Changmou; YAGIZ, Yavuz; HSU, Wei Yea; SIMONNE, Amarat; LU, Jiang; MARSHALL, Maurice R. - Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) Pomace against selected foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 15205118. 62:28 (2014) 6640–6649. doi: 10.1021/jf501073q.

YANG, L.; ALLRED, C. D.; AWIKA, J. M. - Emerging evidence on the role of estrogenic sorghum flavonoid in colon cancer prevention. **Cereal Foods World**. . ISSN 01466283. 59:5 (2014) 244–251. doi: 10.1094/CFW-59-5-0244.

ZABKA, Martin; PAVELA, Roman - Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**. . ISSN

18791298. 93:6 (2013) 1051–1056. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.076.

ZAIN, Mohamed E. - Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**. . ISSN 13196103. 15:2 (2011) 129–144. doi: 10.1016/j.jscs.2010.06.006.

ZHAO, Bing-Chuan; LIN, Hua-Can; YANG, Dan; SIM, Xiyang; LI, Zi-Gang - Disulfide Bridges in Defensins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 16:2 (2016).

## VII. Anexos

NOTA: Os resultados em branco deve-se ao facto de não ter existido inibição com a concentração em teste.

### Anexo I – Extratos de Vagem

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1E	<i>L. innocua</i>	103,3	1,6E+06	6,2	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,2	6,2	6,2
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,2	6,2	6,2
					C	1,8E+04	2,0E+04	1,3E+04	4,2	4,3	4,1	1,9	1,9	2,1
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	147,8	6,5E+06	6,8	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					B	1,0E+00	2,5E+04	1,0E+00	0,0	4,4	0,0	6,8	2,4	6,8
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1E	<i>E. coli</i>	103,3	2,0E+06	6,3	A	1,0E+00	1,0E+00	3,8E+04	0,0	0,0	4,6	6,3	6,3	1,7
					B		2,0E+04			4,3			2,0	
					C	1,6E+03		2,4E+04	3,2		4,4	3,1		1,9
					D	1,6E+04	1,4E+04	2,0E+04	4,2	4,1	4,3	2,1	2,2	2,0
					E	2,5E+04			4,4			1,9		
					F									
					G									
	<i>S. Typhimurium</i>	147,8	4,5E+06	6,7	A	6,8E+04	3,8E+04	5,4E+04	4,8	4,6	4,7	1,8	2,1	1,9
					B									
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3E	<i>L. innocua</i>	113,8	1,6E+06	6,2	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,2	6,2	6,2
					B	1,0E+00	9,9E+03	2,3E+02	0,0	4,0	2,4	6,2	2,2	3,8
					C	9,5E+03	4,5E+04	5,6E+03	4,0	4,7	3,7	2,2	1,5	2,4
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	162,8	6,5E+06	6,8	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					C	3,6E+04	1,7E+04		4,6	4,2		2,3	2,6	
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3E	<i>E. coli</i>	113,8	2,0E+06	6,3	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,3	6,3	6,3
					B			7,6E+03			3,9			2,4
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>S. Typhimurium</i>	162,8	4,5E+06	6,7	A	6,0E+03	6,6E+04	5,4E+04	3,8	4,8	4,7	2,9	1,8	1,9
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,7	6,7	6,7
					C	5,4E+04	5,6E+04	2,6E+04	4,7	4,7	4,4	1,9	1,9	2,2
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5V	<i>L. innocua</i>	81,2	1,6E+06	6,2	A	5,1E+02	1,0E+00	2,1E+02	2,7	0,0	2,3	3,5	6,2	3,9
					B	6,0E+01	2,8E+03	5,0E+01	1,8	3,4	1,7	4,4	2,7	4,5
					C	4,0E+01	4,2E+04	2,8E+03	1,6	4,6	3,5	4,6	1,6	2,7
					D	1,5E+04	2,3E+04	1,6E+04	4,2	4,4	4,2	2,0	1,8	2,0
					E									
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	116,1	6,5E+06	6,8	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					C	3,3E+04			4,5			2,3		
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5V	<i>E. coli</i>	81,2	2,0E+06	6,3	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,3	6,3	6,3
					B	1,0E+00		2,5E+04	0,0		4,4	6,3		1,9
					C		1,8E+04	2,0E+04		4,3	4,3		2,0	2,0
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>S. Typhimurium</i>	116,1	4,5E+06	6,7	A									
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,7	6,7	6,7
					C	9,6E+03			4,0			2,7		
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
9L	<i>L. innocua</i>	175,4	1,6E+06	6,2	A	2,0E+01	1,5E+02	1,0E+00	1,3	2,2	0,0	4,9	4,0	6,2
					B	1,0E+00	1,5E+03	3,0E+01	0,0	3,2	1,5	6,2	3,0	4,7
					C	3,7E+04		4,4E+04	4,6		4,6	1,6		1,5
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	250,9	6,5E+06	6,8	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					C		1,8E+04	3,8E+04		4,2	4,6		2,6	2,2
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
9L	<i>E. coli</i>	175,4	2,0E+06	6,3	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,3	6,3	6,3
					B			1,2E+04			4,1			2,2
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>S. Typhimurium</i>	250,9	4,5E+06	6,7	A	4,6E+00	4,8E+00	4,9E+00	4,6	4,8	4,9	2,0	1,8	1,8
					B	2,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,8	0,0	0,0	3,8	6,7	6,7
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
13B	<i>L. innocua</i>	185,9	1,0E+07	7,0	A									
					B									
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	248,4	6,5E+06	6,8	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,8	6,8	6,8
					C									
					D									
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução				
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
13B	<i>E. coli</i>	185,9	3,9E+07	7,6	A										
					B		3,4E+04	1,7E+03		4,5	3,2		3,1	4,4	
					C										
					D										
					E										
					F										
					G										
	<i>S. Typhimurium</i>	248,4	4,5E+06	6,7	A	5,2E+04	5,0E+04		4,7	4,7		1,9	2,0		
					B	3,5E+04	1,0E+00	1,0E+00	4,5	0,0	0,0	2,1	6,7	6,7	
					C										
					D										
					E										
					F										
					G										

## Anexo II – Extratos de Folha

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1E	<i>L. innocua</i>	72,7	2,9E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F	6,5E+04		7,1E+02	4,8		2,8	1,7		3,6
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	72,7	3,2E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F		4,5E+04	5,3E+04		4,7	4,7		1,8	1,8
					G					0,0	0,0			

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1E	<i>E. coli</i>	72,7	1,5E+07	7,2	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					D	4,4E+04			4,6			2,5		
					E	4,2E+04	6,9E+04		4,6	4,8		2,6	2,3	
					F	1,8E+04			4,2			2,9		
					G									
	<i>S. Typhimurium</i>	72,7	2,5E+07	7,4	A									
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3E	<i>L. innocua</i>	72,7	2,9E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F	5,1E+04		7,8E+02	4,7		2,9	1,8		3,6
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	72,7	3,2E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F	2,0E+03	1,3E+03		3,3	3,1		3,2	3,4	
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução		
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2
<i>E. coli</i>	72,7	1,5E+07	7,2	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
				B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
				C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
				D									
				E		6,6E+04			4,8			2,4	
				F	2,0E+03	6,8E+04	3,7E+03	3,3	4,8	3,6	3,9	2,3	3,6
				G									
<i>S. Typhimurium</i>	72,7	2,5E+07	7,4	A	1,0E+00	1,0E+00		0,0	0,0		7,4	7,4	
				B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
				C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
				D			3,6E+04			4,6			2,8
				E	4,5E+04	2,1E+04	1,8E+04	4,7	4,3	4,3	2,7	3,1	3,1
				F	2,0E+04		5,6E+04	4,3		4,7	3,1		2,6
				G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
9L	<i>L. innocua</i>	72,7	3,0E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,4E+02	8,6E+02	1,0E+01	2,1	2,9	1,0	4,3	3,5	5,5
					F									
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	72,7	1,8E+07	7,2	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,2	7,2	7,2
					E	2,7E+04	3,3E+04		4,4	4,5		2,8	2,7	
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
9L	<i>E. coli</i>	72,7	2,6E+07	7,4	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					C	4,8E+02	7,7E+03	1,0E+00	2,7	3,9	0,0	4,7	3,5	7,4
					D									
					E	4,5E+03			3,7			3,8		
					F	1,4E+04			4,2			3,3		
					G		6,8E+03	8,7E+03		3,8	3,9		3,6	3,5
	<i>S. Typhimurium</i>	72,7	2,5E+06	7,4	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					D	4,3E+03			3,6			3,8		
					E									
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
13B	<i>L. innocua</i>	72,7	3,0E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F	3,5E+02		6,0E+01	2,5		1,8	3,9		4,7
					G									
	<i>L. monocytogenes</i>	72,7	3,2E+06	6,5	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					D	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					E	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	6,5	6,5	6,5
					F									
					G									

Variedade	Bactéria	Concentração do Extrato (mg/mL)	Inóculo Inicial no poço (UFC/mL)	Log Inicial	Contagem placas final (UFC/mL)			Log final			Redução			
					Réplica/ Coluna	1	2	3	1	2	3	1	2	3
13B	<i>E. coli</i>	72,7	2,6E+07	7,4	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					D									
					E									
					F	1,5E+03	9,9E+02	1,7E+04	3,2	3,0	4,2	4,2	4,4	3,2
					G	5,9E+03			3,8			3,6		
	<i>S. Typhimurium</i>	72,7	2,5E+06	7,4	A	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					B	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					C	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	0,0	0,0	0,0	7,4	7,4	7,4
					D									
					E									
					F									
					G									