



CATÓLICA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES EXTRATOS NATURAIS  
CONTRA PATOGÉNICOS ALVO DA INDÚSTRIA ALIMENTAR

Por

TIAGO LUÍS AMARANTE DIAS ALVES RIBEIRO

Dezembro de 2021



CATOLICA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES EXTRATOS NATURAIS  
CONTRA PATOGÉNICOS ALVO DA INDÚSTRIA ALIMENTAR

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da  
Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em  
Engenharia Alimentar

Por

Tiago Luís Amarante Dias Alves Ribeiro

Orientação: Joana Inês Bastos Barbosa

Coorientação: Paula Cristina Maia Teixeira

Dezembro de 2021

## Resumo

A utilização de extratos naturais na indústria alimentar de forma a combater patogénicos presentes em alimentos tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Consequentemente, este trabalho teve como objetivo testar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos naturais contra patogénicos alvo da indústria alimentar. Os extratos com maior atividade foram usados numa solução para marinar uma matriz cárnica e avaliar a sua capacidade em inibir ou reduzir a carga microbiana de três patogénicos alimentares.

Inicialmente foi avaliada a capacidade antimicrobiana de diferentes extratos naturais: Microalgas (*Chlorella* spp., *Chlorococcum* spp., *Nannochloropsis*), péptidos e plantas e fungos (Alecrim, Oleuropeína, Shiitake), contra diferentes estirpes dos patogénicos *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter* spp. e *Clostridium* spp. A capacidade antimicrobiana dos extratos de *Chlorella* spp., *Chlorococcum* spp. e *Nannochloropsis* foi avaliada através de curvas de crescimento bacteriano, mas sem reduções da carga microbiana ao longo do tempo. Dois dos péptidos (3.1 e CA-M) inibiram o crescimento de todos os patogénicos, com concentrações mínimas inibitórias inferiores a 25,00 % (V/V) para todas as bactérias testadas. O extrato de Oleuropeína inibiu todos os patogénicos para valores abaixo do limite de deteção da técnica de enumeração (<1,3 log UFC/mL), e os extratos de Alecrim e Shiitake também demonstraram elevada capacidade antimicrobiana contra os patogénicos testados, tendo sido registadas, respetivamente, reduções de  $3,77 \pm 0,32$  e  $3,81 \pm 0,32$  ciclos logarítmicos para *E. coli*,  $3,97 \pm 0,98$  e  $3,54 \pm 0,67$  ciclos logarítmicos para *L. monocytogenes*,  $3,64 \pm 0,32$  e  $3,57 \pm 0,17$  ciclos logarítmicos para *Salmonella* spp., e  $4,02 \pm 0,82$  e  $4,44 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos para *Campylobacter* spp. As elevadas inibições registadas levaram à utilização destes extratos para marinar uma matriz alimentar cárnica contaminada artificialmente. No entanto, apesar de algumas reduções observadas nos patogénicos testados, nenhuma dessas reduções foi significativa.

Este estudo demonstrou a promissora capacidade antimicrobiana de extratos naturais contra patogénicos presentes em alimentos. Seriam interessantes futuros estudos da sinergia entre os extratos estudados, bem como a sua incorporação em diferentes matrizes alimentares, os quais acreditamos que levariam a novas descobertas benéficas para toda a indústria alimentar.

**PALAVRAS-CHAVE:** EXTRATOS NATURAIS, INDÚSTRIA ALIMENTAR, MATRIZ ALIMENTAR

## Abstract

The use of natural extracts in the food industry in order to combat pathogens present in food has been the object of study in recent years. Consequently, this work aimed to test the antimicrobial activity of different natural extracts against pathogens targeted by the food industry. The extracts with the highest activity were used in a solution to marinate a meat matrix and evaluate their ability to inhibit or reduce the microbial load of three food pathogens.

Initially, the antimicrobial capacity of different natural extracts was evaluated: Microalgae (*Chlorella* spp., *Chlorococcum* spp., *Nannochloropsis*), peptides and plants and fungi (Rosemary, Oleuropein, Shiitake), against different strains of pathogens *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. The antimicrobial capacity of *Chlorella* spp., *Chlorococcum* spp. and *Nannochloropsis* was evaluated using bacterial growth curves, but without reductions in the microbial load over time. Two of the peptides (3.1 and CA-M) inhibited the growth of all pathogens, with minimal inhibitory concentrations less than 25.00% (V/V) for all bacteria tested. Oleuropein extract inhibited all pathogens to values below the detection limit of the enumeration technique ( $<1.3$  log CFU/mL), and Rosemary and Shiitake extracts also demonstrated high antimicrobial capacity for tested pathogens, having been observed, respectively, reductions of  $3,77 \pm 0,32$  and  $3,81 \pm 0,32$  log cycles for *E. coli*,  $3,97 \pm 0,98$  and  $3,54 \pm 0,67$  log cycles for *L. monocytogenes*,  $3,64 \pm 0,32$  and  $3,57 \pm 0,17$  log cycles for *Salmonella* spp., and  $4,02 \pm 0,82$  and  $4,44 \pm 0,08$  log cycles for *Campylobacter* spp. The high inhibitions recorded have led to the use of these extracts to marinate an artificially contaminated meat food matrix. However, despite some reductions seen in the pathogens tested, none of these reductions was significant.

This study demonstrated the promising antimicrobial capacity of natural extracts against foodborne pathogens. Future studies of the synergy between the studied extracts would be interesting, as well as their incorporation in different food matrices, which we believed would lead to new beneficial discoveries for the food industry

**KEYWORDS:** NATURAL EXTRACTS, FOOD INDUSTRY, FOOD MATRIX

## **Agradecimentos**

O meu percurso pela Universidade Católica Portuguesa, mais especificamente na Escola Superior de Biotecnologia representa um marco importante e inesquecível para o resto da minha vida. Os dois anos de mestrado em Engenharia Alimentar proporcionaram-me memórias e amizades que se irão prolongar para o resto da minha vida, tanto a nível profissional como a nível pessoal. Em primeiro lugar, tenho de agradecer aos meus pais, por me terem proporcionado a oportunidade de estudar nesta faculdade e por me terem sempre direcionado para os estudos. Em segundo lugar, gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas de mestrado, que me permitiram realizar este curso com maior alegria, entusiasmo e dedicação. E, por último, gostaria de agradecer a todos os colegas de trabalho que me acompanharam ao longo deste estágio curricular, com especial carinho pela Marta que me acompanhou todos os dias no laboratório e sempre com uma ótima disposição que se apegava a toda a gente que tivesse a sorte de estar na sua companhia; à Joana por se ter demonstrado sempre disponível para me ajudar em tudo o que fosse necessário; e à professora Paula, que me proporcionou um ótimo estágio, excelentes condições de trabalho e uma motivação para ir trabalhar todos os dias feliz com aquilo que estava a fazer.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Agradecimentos</b> .....	4
<b>Lista de Figuras</b> .....	7
<b>Lista de Tabelas</b> .....	8
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	9
<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>1.1 Microrganismos</b> .....	12
<b>1.1.1 Bactérias</b> .....	12
<b>1.1.2 Vírus</b> .....	14
<b>1.1.3 Protozoários</b> .....	15
<b>1.1.4 Fungos</b> .....	15
<b>1.1.5 Arquea</b> .....	15
<b>1.1.6 Algas</b> .....	16
<b>1.2 Patogénicos na Indústria Alimentar</b> .....	17
<b>1.2.1 <i>Listeria spp.</i></b> .....	17
<b>1.2.2 <i>Salmonella spp.</i></b> .....	18
<b>1.2.3 <i>Staphylococcus spp.</i></b> .....	19
<b>1.2.4 <i>Escherichia coli</i></b> .....	19
<b>1.2.5 <i>Campylobacter spp.</i></b> .....	20
<b>1.3 Extratos de Plantas</b> .....	20
<b>2. Objetivo</b> .....	22
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	23
<b>3.1 Meio de Cultura</b> .....	23
<b>3.2 Cinética de Crescimento de vários patogénicos</b> .....	23
<b>3.3 Atividade Antimicrobiana</b> .....	24
<b>3.3.1 Microalgas</b> .....	24
<b>3.3.2 Péptidos</b> .....	26
<b>3.3.3. Extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake</b> .....	28
<b>3.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas incorporados numa matriz alimentar cárnea</b> .....	29
<b>3.3.5 Preparação dos microrganismos usados no estudo</b> .....	29

3.3.6	Contaminação artificial da matriz e respetivas marinadas .....	30
3.3.7	Análise Estatística .....	30
4.	Resultados e Discussão .....	31
4.1	Curvas de crescimento de vários patogénicos na presença de extratos naturais....	31
4.1.1	Extratos de microalgas <i>Chlorococcum</i> e <i>Chlorella smooth</i> .....	31
4.1.2	Extratos de microalgas <i>Chlorococcum amblystomatis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> .....	35
4.1.3.	Extratos de microalgas <i>Chlorococcum</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Nannochloropsis</i>	36
4.1.4	Péptidos .....	38
4.1.5	Extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake .....	40
4.1.6	Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de Alecrim, Oleuropeína e Shiitake incorporados numa matriz alimentar cárnea.....	42
5.	Conclusões gerais .....	46
6.	Trabalho Futuro.....	47
7.	Bibliografia .....	48
ANEXOS .....		53
ANEXO I – Condições de extração dos extratos Oleuropeína, Alecrim e Shiitake.....		54
ANEXO II – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogénicos para extratos de <i>Chlorella smooth</i> e <i>Chlorococcum</i> , a pressões de 500, 420, 300 e 100 MPa e não sujeitos a pressão. ....		59
ANEXO III – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogénicos para extratos de <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella vulgaris smooth</i> e <i>Chlorococcum amblystomatis</i> .....		72
ANEXO IV – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogénicos para extratos de <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorococcum</i> e <i>Nannochloropsis</i> . ....		76

## Lista de Figuras

Figura 1. 1 - Percentagem de surtos de toxinfecção alimentar em Portugal por enterotoxinas estafilocócicas entre os anos 2015 e 2017.....	10
Figura 1. 1. 1. 2. 1 - Curva de crescimento característica de uma bactéria com a indicação das diferentes fases de crescimento (Adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2015). .....	14
Figura 4. 1. 1. 1 - Densidade ótica em função do tempo de <i>Listeria monocytogenes</i> para cada um dos extratos de <i>Chlorococcum</i> . .....	31
Figura 4. 1. 1. 2 - Densidade ótica em função do tempo de <i>Listeria monocytogenes</i> para cada um dos extratos de <i>Chlorella smooth</i> . .....	32
Figura 4. 1. 1. 3 - Densidade ótica em função do tempo de <i>Staphylococcus aureus</i> para cada um dos extratos de <i>Chlorella smooth</i> . .....	33
Figura 4. 1. 1. 4 - Densidade ótica em função do tempo de <i>Staphylococcus aureus</i> para cada um dos extratos de <i>Chlorococcum</i> . .....	33
Figura 4. 1. 2. 1 - Valores de densidade ótica em função do tempo para <i>Acinetobacter baumannii</i> inoculada com diversos extratos. ....	35
Figura 4. 1. 2. 2 - Valores de densidade ótica em função do tempo para <i>Yersinia enterocolitica</i> inoculada com diversos extratos.....	36
Figura 4. 1. 3. 1 - Valores de densidade ótica em função do tempo para <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada com extratos das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorococcum</i> e <i>Nannochloropsis</i> .....	37
Figura 4. 1. 3. 2 - Valores de densidade ótica em função do tempo para <i>Escherichia coli</i> inoculada com extratos das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorococcum</i> e <i>Nannochloropsis</i> . .....	38
Figura 4. 1. 6. 1 - Contagens de <i>L. monocytogenes</i> na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.....	43
Figura 4. 1. 6. 2 - Contagens de <i>Salmonella spp.</i> na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.....	43
Figura 4. 1. 6. 3 - Contagens de <i>Escherichia coli</i> na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.....	44
Figura 4. 1. 6. 4 - Contagens de <i>Campylobacter spp.</i> na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.....	44

## Lista de Tabelas

Tabela 1. 1 .1 - Diferentes espécies de microrganismos organizados de acordo com a coloração de Gram. ....	13
Tabela 3. 3. 1. 1 - Massa de extrato (mg) e respetivo rendimento (mg/mg) para cada condição de extração (Pressão, Tempo, Solvente) para a microalga Chlorococcum. ....	24
Tabela 3. 3. 1. 2 - Massa de extrato (mg) e respetivo rendimento (mg/mg) para cada condição de extração (Pressão, Tempo, Solvente) para a microalga Chlorella smooth. ....	25
Tabela 3. 3. 1. 3 - Condições de extração e diferentes massas (mg) de vias provenientes da Universidade do Minho. ....	26
Tabela 3. 3. 2. 1 - Indicação da massa molar, código e volume de cada péptido analisado. ...	27
Tabela 4. 1. 5. 1 - Resultados da inibição provocada pelos extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake contra diferentes microrganismos. ....	41
Tabela 4. 1. 6. 1 - Contagens obtidas em três réplicas realizadas de carne não contaminada artificialmente para diferentes microrganismos. ....	42
Tabela 4. 1. 6. 2 – Reduções dos diferentes microrganismos em contacto com os compostos utilizados, na ausência da matriz cárneas. ....	42

## **Lista de Abreviaturas**

BHIA - Brain Heart Infusion Agar

BHIB - Brain Heart Infusion Broth

BPW - Buffered Peptone Water

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

MCCD - Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar

MHA - Mueller Hinton Agar

MHB - Mueller Hinton Broth

TSA - Trypto-Casein Soy Agar

TSB - Trypto-Casein Soy Broth

UFC – Unidades formadoras de colónias

## 1. Introdução

Nas últimas décadas o uso e estudo de microrganismos na indústria alimentar tem sido alvo de enorme contemplação devido às diversas aplicações que estes podem ter tanto na bioproteção contra elementos extrínsecos e intrínsecos, como na preservação de alimentos, no aperfeiçoamento de qualidades organolépticas, entre outros (Talon & Zagorec, 2017). Por outro lado, a contaminação microbiana pode ocorrer de forma indesejada e prejudicial, levando ao desenvolvimento de diversos aspetos prejudiciais tais como à evolução de doenças, infeções e intoxicações, ou deterioração alimentar (Morya *et al.*, 2020). As contaminações tanto podem ocorrer no processamento fabril, transporte, distribuição ou até no pós-venda ao consumidor (Harrigan & Park, 1991), quando o alimento não é armazenado nas condições ideais, o que pode levar à proteólise e putrefação em produtos ricos em proteínas e gorduras, como é o caso de laticínios (Wiking *et al.* (2002). Estas contaminações podem levar a surtos de toxinfecção alimentar, uma doença infecciosa ou tóxica que é causada pelo consumo de um género alimentício ou água contaminada por microrganismos, toxinas ou metabolitos produzidos pelos mesmos, e que afete dois indivíduos ou mais. Em Portugal, verifica-se que os surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas foram uma constante ao longo dos anos de 2015, 2016 e 2017, como se observa na Figura 1.1 (Adaptado de INSA, 2021).

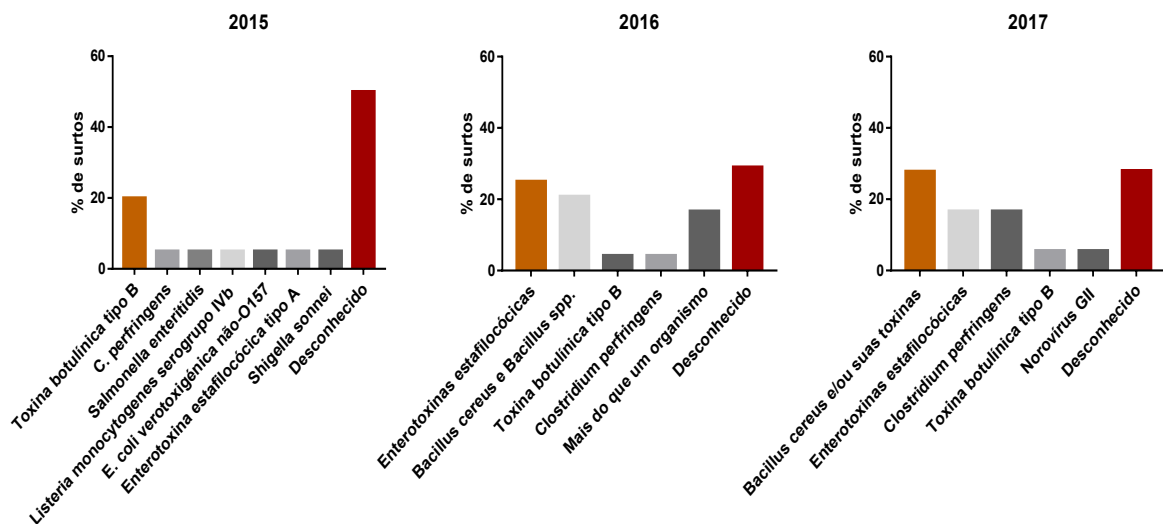


Figura 1.1 - Percentagem de surtos de toxinfecção alimentar em Portugal por enterotoxinas estafilocócicas entre os anos 2015 e 2017.

Estas proteínas são geralmente muito estáveis ao calor, não sendo destruídas em condições normais de cozimento (ex.: a pasteurização elimina *Staphylococcus aureus*, mas não as enterotoxinas produzidas por esta bactéria) (Silva *et al.*, 2017), sendo que a sobrevivência destas está normalmente associada à ineficiência das condições de refrigeração.

Ao longo dos anos referidos, têm sempre surgido em Portugal surtos causados pela toxina botulínica tipo B, tendo sido, em 2015, o agente causador mais recorrente (dentro dos identificados). Pelo que se verificou nos relatórios do INSA, esta toxina foi encontrada essencialmente em alheiras e presuntos, o que sugere que no fabrico de enchidos e fumados tradicionais portugueses não tenha ocorrido um correto processo de fabrico (ex. fermentação, salga, fumagem). É ainda de referir que não é adicionado nitrito no fabrico de alheira. Uma das funções deste conservante é inibir a multiplicação de *Clostridium botulinum*. Apesar dos fatores negativos que influenciam a indústria alimentar, as boas práticas de higiene e segurança alimentar, a implementação de um plano de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), e a contínua aplicação das linhas orientadoras provenientes, por exemplo, do *Codex Alimentarius*, dos Regulamentos da União Europeia, dos Decretos de Lei nacionais e o dos referenciais ISO (*International Organization for Standardization*) permitem o controlo e inibição da proliferação de microrganismos na cadeia alimentar. Nas últimas décadas estes documentos têm servido como uma linha guia para toda a cadeia alimentar, sendo que é necessário um cuidado acrescido para estar a par de quaisquer alterações realizadas às diretivas publicadas, de forma a estar ao corrente de quaisquer melhoramentos às boas práticas alimentares. Por exemplo, o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (JO L 338 de 22.12.2005, p. 1-26), tem sofrido alterações ao longo dos anos, sendo a última no ano de 2020, relativamente à presença de *Salmonella* spp. na carne de répteis (Europeia, 2015).

Dentro das muitas boas práticas que são possíveis aplicar a todo o processo de produção, distribuição e armazenamento de alimentos, o controlo de fatores extrínsecos como temperatura, humidade relativa, atmosfera gasosa (concentração e presença de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), fatores intrínsecos como o pH dos alimentos, a disponibilidade de nutrientes, atividade da água, estruturas e constituintes antimicrobianos, potencial de oxidação-redução e até o processo industrial aplicado, como a filtração ou centrifugação que removem fisicamente o microrganismo, tratamentos térmicos como a refrigeração, congelação, pasteurização ou esterilização, entre outros, são fatores que demandam uma maior atenção para fornecer um produto seguro do ponto de vista microbiológico (Motarjemi & Lelieveld, 2013).

O uso controlado de microrganismos específicos tem as suas vantagens, por exemplo, a sua utilização em diversos processos alimentares de forma a aprimorar o produto final em todos os aspetos possíveis. Em processos de fermentação, as culturas de bactérias do ácido láctico podem produzir bacteriocinas que são estáveis em condições altamente ácidas, resistentes ao calor, e apresentam uma elevada atividade antimicrobiana principalmente contra *L.*

*monocytogenes*, enaltecendo a fermentação láctica como um processo em que o uso de bactérias se demonstra extremamente útil (Daba & Elkhateeb, 2020). A cultura de células *Saccharomyces cerevisiae* é usada para a fermentação alcoólica destinada à produção comercial de cerveja, sendo um ótimo exemplo do valor que estas culturas de microrganismos têm para a indústria. Nos últimos anos têm sido exploradas várias aplicações na indústria tais como a produção de vitaminas em ambientes controlados, produção de bio emulsionantes (Alizadeh-Sani *et al.*, 2018), entre outros. É de valorizar, mais uma vez, a relevância que os microrganismos têm para a indústria alimentar e para todo um ciclo produtivo que afeta diretamente a qualidade, gestão, produção e futuro dos produtos alimentares a uma escala global.

## **1.1 Microrganismos**

Existem vários tipos de microrganismos podendo estes serem divididos em seis grupos distintos: bactérias, vírus, arquea, protozoários, fungos e algas (Pelczar, 2020).

### **1.1.1 Bactérias**

As bactérias são caracterizadas como sendo seres unicelulares que vivem em grupo em quase todos os ambientes e condições a que são sujeitas. Estas fazem parte dos seres procarióticos, organismos sem um núcleo distinto e outros organelos devido à ausência de membranas internas. As bactérias podem variar de forma, metabolismo, ambiente e tamanho, dividindo-se, por exemplo, em formas esféricas, curvas, com forma de bastonete ou pleomórficas, que apresentam formatos diversos (Pelczar, 2020). Apesar de certos autores aderirem a esta classificação, não podemos ignorar o facto de que o ambiente em que estas estão inseridas e a biodisponibilidade de nutrientes podem alterar o crescimento e forma das bactérias (Young, 2006).

Além das características referidas, é de realçar a divisão mais diferenciadora entre este tipo de microrganismo, as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Utilizando uma técnica de coloração com cristal-violeta e safranina, as bactérias que retêm a cor azul/roxo são classificadas como Gram-positivas, e as que apresentam uma cor vermelho/rosa são classificadas como Gram-negativas. Apesar deste método desenvolvido por Hans Christian Gram (Coico, 2006) não identificar a espécie em análise, permite diferenciar rapidamente estes dois grupos distintos de bactérias. Esta forma de coloração depende das diferenças estruturais das superfícies celulares das células, onde as Gram-positivas têm uma multicamada espessa de peptidoglicanos e ausência de uma membrana lipídica exterior, resultando na retenção da

coloração na parede de peptidoglicanos. As Gram-negativas tem uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana lipídica exterior, não havendo retenção do corante após processo de descoloração com álcool, que faz com que as bactérias Gram-negativas retenham a cor do corante secundário, enquanto que as Gram-positivas, após a descoloração, retêm a cor do corante primário, resultando assim na obtenção de duas cores distintas. Na Tabela 1.1.1 estão representadas algumas das espécies correspondentes a cada grupo:

Tabela 1. 1 .1 - Diferentes espécies de microrganismos organizados de acordo com a coloração de Gram.

Gram Positivo		Gram Negativo	
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Erysipelothrix</i> spp.	<i>Actinobacillus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.	<i>Bordetella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
<i>Actinomycetes</i> spp.	<i>Rhodococcus</i> spp.	<i>Brucella</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.
		<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Borrelia</i> spp.
		<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.
		<i>Escherichia</i> spp.	<i>Helicobacter</i> spp.
		<i>Francisella</i> spp.	<i>Leptonema</i> spp.
		<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Leptospira</i> spp.
		<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Treponema</i> spp.
		<i>Legionella</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.
		<i>Moraxella</i> spp.	<i>Pasteurella</i> spp.

### 1.1.1.2 Crescimento Bacteriano

O crescimento bacteriano é definido como a proliferação de uma célula mãe, através de fissão binária, uma reprodução assexual que resulta na formação de duas novas células, duplicando assim todo o material genético presente na célula mãe (Margolin, 2014). Estas continuam a reproduzir-se indefinidamente até que o meio em que estão inseridas perde a capacidade de fornecer as condições necessárias ao crescimento. As bactérias seguem uma cinética de crescimento muito característica, podendo ser observadas quatro fases distintas da sua proliferação: fase *lag*, *log* ou exponencial, estacionária e morte.

A fase *lag* é definida como o período em que as bactérias estão a adaptar-se ao meio em que estão inseridas, sintetizando proteínas e outras moléculas necessárias para a replicação, sendo que não ocorre proliferação nesta fase. Na fase log ou exponencial é possível observar a elevada taxa de crescimento bacteriano, onde as células se dividem por fissão binária e apresentam uma elevada atividade metabólica. Quando estas atingem a taxa máxima de crescimento, atingem a fase estacionária, onde o número de células a serem replicadas iguala o número de mortes celulares devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes e à competição por estes, resultando numa diminuição da atividade metabólica (Jun *et al.*, 2018). Por fim, quando o número de células mortas é maior que o número de replicações, atinge-se a fase de morte. Todas estas fases representam a curva de crescimento característica de uma bactéria, sendo que a representação gráfica do crescimento em ordem ao tempo pode ser observada na Figura 1.1.1.2.1.

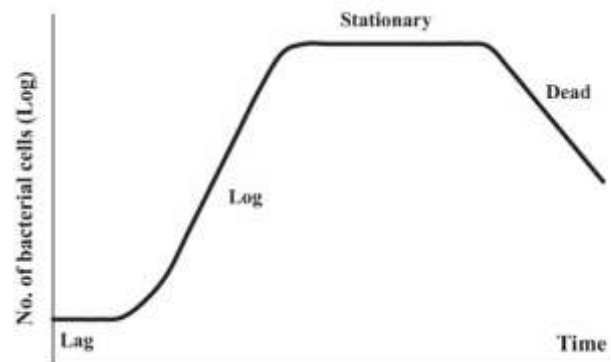


Figura 1. 1. 1. 2. 1 - Curva de crescimento característica de uma bactéria com a indicação das diferentes fases de crescimento (Adaptado de Wang *et al.*, 2015).

## 1.1.2 Vírus

Os vírus são um grupo de agentes infecciosos que replicam apenas dentro de células de um organismo vivo, distinguindo-se pela sua organização celular e processo de duplicação. Estes tipos de agentes são constituídos por uma ou mais moléculas de RNA ou DNA que estão protegidas por várias camadas de carboidratos, lípidos e proteínas, formando uma cápsula proteica. Este tipo de microrganismo difere dos restantes devido à sua organização celular, dependem completamente de um hospedeiro vivo para se reproduzirem, ao contrário de seres eucariotas e procariotas, e quase todos apresentam apenas ou DNA ou RNA na sua constituição (Moelling, 2020).

### **1.1.3 Protozoários**

Este tipo de microrganismos eucariotas é definido por não ter parede celular, são geralmente móveis, distinguem-se das algas por serem quimiorganoheterotróficos (degradam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia) e são unicelulares. Existem quatro grupos de protozoários: os flagelados, que se movem através de flagelos; os ciliados, que se movem através de cílios; as amibas, que se alimentam e movem através de pseudópodes e os esporozoários, parasitas intracelulares que necessitam de um hospedeiro para completar o ciclo de vida e podem reproduzir-se sexuadamente, ao contrário dos outros três grupos que se reproduzem de forma assexuada, sendo todos eles responsáveis por doenças infecciosas para o homem. São exemplos a malária, leishmaniose e toxoplasmose (Andrews *et al.*, 2014).

### **1.1.4 Fungos**

Os fungos são um grupo de organismos eucariotas que podem ser divididos em leveduras ou fungos filamentosos (bolors) e multicelulares. Estes podem produzir micotoxinas, que são substâncias tóxicas produzidas por algumas estirpes de fungos que decompõe os alimentos. O aparecimento destas substâncias está normalmente associado à falta de um armazenamento apropriado, levando assim à criação das condições ideais (temperatura e humidade) para a produção destas substâncias químicas. Estas são altamente resistentes a condições adversas. Apesar da conotação negativa dada a este tipo de microrganismo, existem algumas espécies de fungos que são benéficos para o ser humano, como os produtores de penicilina, os quais tiveram um enorme impacto na medicina desde a sua descoberta (Lobanovska & Pilla, 2017).

### **1.1.5 Arquea**

Este domínio inclui microrganismos unicelulares procariotas e difere das bactérias e dos seres eucariotas, levando à sua diferenciação do resto dos microrganismos, devido às características do seu RNA ribossómico, identificado originalmente por Carl Woese (Woese *et al.*, 1990). Além de apresentarem capacidade de resistir a ambientes extremos de pH, temperatura e salinidade, apresentam algumas características diferenciadoras, tais como a estrutura da parede celular que contém pseudopeptidoglicanos (ao contrário das bactérias que contêm peptidoglicano) e a da membrana plasmática que contém cadeias de hidrocarbonetos ligadas a glicerol por ligações éter em vez de ácidos gordos ligados por ligações éteres (Kandler & König, 1998).

### 1.1.6 Algas

Existem diversos tipos de microalgas (algas unicelulares) caracterizadas por serem microrganismos fotossintéticos que normalmente são encontradas em água salgada ou doce. Existem vários métodos para diferenciar as microalgas existentes na natureza, pois estas são diferentes na estrutura, tamanho, composição, entre outros. De forma a clarificar de forma mais simples, podemos dividir de acordo com a cor, como por exemplo: microalgas verdes (Chlorophyta), que contêm clorofilas a, b, e carotenoides; microalgas com aparência castanha (Bacillariophyceae), que contêm clorofila a, c, e carotenoides, microalgas vermelhas (Rhodophyta), entre outras (Nwoba *et al.*, 2020). Os extratos de algas têm sido estudados nos últimos anos devido à sua capacidade antioxidante (Rehana *et al.*, 2017) e antimicrobiana (Zbakh *et al.*, 2020) *in vitro* e posteriormente analisada *in vivo*. Tal como os extratos de plantas, os extratos de algas têm sido estudados devido à possibilidade de serem utilizados em outras indústrias, como a indústria cosmética (Guleri & Tiwari, 2020), uma vez que apresentam uma elevada capacidade protetora contra raios ultra violeta sem apresentarem quaisquer efeitos negativos na pele humana (Álvarez-Gómez *et al.*, 2019) ou até na medicina, onde o uso de polissacarídeos derivados destes extratos está a ser estudado como uma possível alternativa para combater aterosclerose (Patil *et al.*, 2018). É possível enaltecer duas espécies que irão ser alvo de estudo nesta dissertação: *Chlorococcum* spp. e *Chlorella vulgaris*.

As microalgas pertencentes ao género *Chlorococcum* spp. são um tipo de algas verdes pertencentes à família *Chlorococcaceae*. A reprodução deste tipo de alga tanto pode ocorrer de forma assexuada, através de zoósporos ou aplanósporos (em caso de stresse) ou de forma sexuada, através da fusão de isogâmetas (gâmetas morfológicamente idênticos) (Blackwell *et al.*, 1991). Caracteristicamente apresentam uma elevada tolerância ao pH e temperatura elevados, facilidade de cultivo e uma taxa de reprodução elevada, sendo que estas características levaram ao uso de *Chlorococcum* spp. para a formação de biodiesel devido à sua constituição lipídica (Halim *et al.*, 2011), ao estudo de como ocorre a bio fixação de CO<sub>2</sub> (Mistry *et al.*, 2020), ou até à averiguação do uso da microalga para a indústria alimentar devido ao seu elevado desempenho na formação de biomassa (Aravantinou & Manariotis, 2016).

Outro tipo de células de microalga verde é *Chlorella vulgaris* pertencente à família *Chlorellaceae*. Este tipo de microalga reproduz-se rapidamente nas condições ideais, através de reprodução assexuada via mitose. Contém ácido eicosapentaenóico, responsável por inibir a ação de diversas doenças como a aterosclerose, o que tem elevado o interesse neste tipo de microalga devido ao seu potencial para a criação de fármacos (Rahman, 2020). Tal como *Chlorococcum* spp., o elevado conteúdo proteico levou ao estudo do uso desta na indústria

alimentar devido às diversas aplicações possíveis da *C. vulgaris* (Koyande *et al.*, 2019). Além disto, o conteúdo lipídico torna possível a sua incorporação na formação de biodiesel e a capacidade de biomassa para a produção de energia, levando à criação de diversos estudos para explorar o potencial desta microalga (Chi *et al.*, 2019).

## 1.2 Patogénicos na Indústria Alimentar

Existem vários patogénicos que ameaçam a segurança e viabilidade comercial dos alimentos em todas as fases a que estes são sujeitos antes de chegarem ao consumidor final (Bhunja *et al.*, 2020). Diferentes tipos de produtos apresentam riscos específicos, ou seja, cada produto está ligado principalmente a um ou mais tipos de microrganismos, mas nunca ao espectro completo. Por exemplo, na carne e produtos derivados normalmente realizam-se testes microbiológicos para a presença de *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e contagem do número de colónias aeróbias (Luning *et al.*, 2011). Os planos de amostragem, limites de colónias (UFC/g) presentes no alimento e métodos de análise do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, definem os microrganismos mais prováveis de serem encontrados em certos tipos de produtos, bem como que medidas devem ser aplicadas no caso de os resultados obtidos pelas análises microbiológicas não corresponderem ao esperado. Apesar de todos os patogénicos gerarem preocupação na indústria alimentar, é de realçar a importância de três microrganismos que, devido às suas características e presença num grande número de alimentos, requerem um olhar mais cuidado nesta dissertação: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp.

### 1.2.1 *Listeria* spp.

A espécie de bactérias pertencentes ao género *Listeria* são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas (tanto crescem na ausência como presença de oxigénio). Dentro das várias espécies pertencentes a este género, *Listeria monocytogenes* é provavelmente a mais estudada devido à sua capacidade de infetar humanos e à sua constante presença e deteção na indústria alimentar. Podem ser encontradas em praticamente qualquer tipo de ambiente, onde se podem multiplicar e proliferar, representando assim um dos patogénicos mais comuns a afetar a saúde humana (EFSA, 2018). A sua capacidade para formar biofilmes cria uma dificuldade acrescida para a remoção desta em ambientes fabris de produção alimentar, dificultando o processo de desinfeção de superfícies (Kocot & Olszewska, 2017).

Esta apresenta uma taxa de crescimento ideal a temperaturas entre os 30 e 37 °C e a pH neutro ou ligeiramente alcalino, podendo crescer até um pH de 9,8 (Gray & Killinger, 1966), apesar de conseguirem crescer tanto em condições ácidas (pH 3,6) como a temperaturas extremamente baixas de refrigeração (4 °C), as quais podem até aumentar a virulência deste microrganismo (Ryser & Marth, 2007). Relativamente à atividade da água ( $a_w$ ) esta cresce a um limite mínimo de cerca de 0,93, sendo que este valor pode sofrer ligeiras alterações de acordo com a literatura consultada (Nyhan *et al.*, 2018), devido à variação de temperatura, meio de inoculação, concentração de sal e metodologia utilizada para a determinação deste valor.

Esta espécie é um patogénico que é capaz de infetar humanos, principalmente adultos com imunidade reduzida, grávidas e neonatos, causando a infeção listeriose (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). A listeriose está normalmente associada ao consumo de alimentos contaminados, ao contacto com animais ou contaminação cruzada, pelo que a aplicação de condições de higiene no ambiente fabril e condições de armazenamento apropriadas eliminam a propagação de *L. monocytogenes*.

### 1.2.2 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*, caracterizadas por serem Gram-negativas, moverem-se por flagelos, terem a forma de bastonetes, não formadoras de esporos e apresentarem um metabolismo anaeróbio facultativo (D'Aoust & Maurer, 2007). São causa de várias infeções alimentares devido à sua presença em diversos tipos de alimentos, sendo um dos mais comuns o ovo (Greig & Ravel, 2009). Este microrganismo cresce a condições ótimas quando a atividade da água é de 0,99 (Keerthirathne *et al.*, 2016), a um valor de pH entre 4 e 9 e a uma temperatura ideal de 35-37 °C, apesar de também crescer, mas com maior dificuldade a temperaturas fora da gama ideal (Tajkarimi, 2007). Dentro deste tipo de bactérias existem vários serótipos que são caracterizadas por serem patogénicos, causando diversos sintomas no ser humano, como é o caso de *Salmonella* Typhi.

A febre tifoide é causada por *S. Typhi*, normalmente associada à ingestão de água ou produtos animais contaminados, ou pelo contacto próximo com alguém infetado, sendo característica por ter o ser humano como único hospedeiro (Crump, 2019). A infeção ocorre quando a bactéria penetra a mucosa intestinal e se espalha pelo organismo a um ritmo acelerado, podendo causar perfuração intestinal, apesar de inicialmente esta não causar uma resposta imediata por parte do hospedeiro, sendo que este não apresenta sintomas como diarreia ou qualquer tipo de resposta inflamatória aquando da infeção. Após o período de incubação, a febre tifoide causa fadiga, vómitos, tosse, pulsação acelerada e dores de cabeça (Dougan & Baker,

2014), sendo que a bactéria pode ficar meses no hospedeiro aumentando assim a probabilidade infecciosa da mesma. Apesar da importância que *S. Typhi* tem na saúde humana, os serótipos não tifóide apresentam uma maior relevância em alimentos, como é o caso de *Salmonella* Enteritidis, que pode provocar gastroenterites nos seres humanos, tendo sido responsável por aproximadamente 65% das infecções por serótipos não tifóide de 2001 a 2005 (Eng *et al.*, 2015).

### **1.2.3 *Staphylococcus* spp.**

Dentro deste gênero é de realçar a relevância da espécie *Staphylococcus aureus* para a indústria alimentar, devido à sua presença em diversos alimentos, como produtos cárneos, fruta processada, marisco, produtos lácteos, entre outros (Viegas *et al.*, 2017), tendo a tendência de ser encontrada em produtos que normalmente são manipulados após o processamento. Este patogénico é uma bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa, apesar de se encontrar de forma natural nas membranas mucosas. As células têm forma de cocos e não têm nenhuma forma de locomoção, não apresentando qualquer tipo de mobilidade. Esta cresce a temperaturas tão baixas como 8 °C e idealmente a temperaturas por volta dos 20 °C. Relativamente ao valor de pH e de  $a_w$ , esta cresce entre 4,2 e 9,3, respetivamente, tendo um valor de pH ótimo à volta de 7,0 e tem também a capacidade osmótica de proliferar a valores de  $a_w$  de 0,86 (Valero *et al.*, 2009).

Algumas estirpes de *Staph. aureus* podem produzir toxinas (enterotoxinas) sendo responsáveis por grande parte das intoxicações alimentares no ser humano (Bhatia & Zahoor, 2007). Estas crescem a condições semelhantes à própria estirpe, são termorresistentes e hidrossolúveis, podendo resistir a processos térmicos, como é o caso da pasteurização, que elimina a bactéria, mas não os produtos tóxicos produzidos pela mesma. Após a ingestão de alimentos contaminados por endotoxinas, os hospedeiros demonstram sintomas gastrointestinais, como diarreia e dores abdominais, vômitos, náusea, entre outros, surgindo até 6 h após a ingestão (Balaban & Rasooly, 2000).

### **1.2.4 *Escherichia coli***

Esta bactéria é Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, tendo forma de bastonetes e pode ou não mover-se por flagelos. Esta demonstra um crescimento ideal a 37 °C (Noor *et al.*, 2013), sendo que os valores podem variar ligeiramente de acordo com a literatura consultada. Em relação ao valor de pH e  $a_w$ , o valor ideal para um

crescimento ótimo é de um pH de 7,0, sendo que pode sofrer alterações dependendo do resto das condições de crescimento (Visser *et al.*, 2011), e uma  $a_w$  de 0,95 (Beuchat *et al.*, 2013).

Este patogénico encontra-se naturalmente no intestino de humanos e alguns animais sem provocar sintomas, sendo que existem certos tipos de *E. coli* que, aquando a ingestão de alimentos contaminados, podem provocar gastroenterites com diarreia intensa (Amisano *et al.*, 2011) ou até infeções urinárias em mulheres (Vincent *et al.*, 2010). Este patogénico encontra-se em diversos tipos de alimentos como, por exemplo, produtos frescos, sumos não pasteurizados e carne de vaca, sendo que os surtos provocados por este patogénico estão normalmente associados à falta de higiene pessoal, a não higienização no processo fabril, ou até práticas de saneamento que não estão de acordo com as normas de segurança e higiene alimentar (Erickson & Doyle, 2007).

### **1.2.5 *Campylobacter* spp.**

*Campylobacter* spp. pertencem à família *Campylobacteriaceae*, em que as células têm forma de bastonete curvo e apresentam um crescimento ideal em condições de microaerofilia. Esta cresce idealmente em ambientes com uma temperatura de 42 °C (Oh *et al.*, 2015) e com baixa percentagem de oxigénio (Reuter *et al.*, 2010). Existem diversos tipos de *Campylobacter*, sendo que é importante realçar a importância de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* devido à sua prevalência em alimentos e na indústria alimentar, onde é normalmente detetada em aves, gado, ovelhas, pássaros selvagens e porcos (Fitzgerald, 2015), pelo que a ingestão de alimentos contaminados com este patogénico causa diversas patologias, sendo a mais comum gastroenterite em humanos (Sheppard & Maiden, 2015). Diversas medidas podem ser tomadas de forma a combater a proliferação deste patogénico na indústria alimentar, como o uso de antibióticos e vacinação que inibem o crescimento nos animais, ou até a descontaminação de carcaças no processamento industrial (Umaraw *et al.*, 2017).

### **1.3 Extratos de Plantas**

Recentemente o uso de extratos de plantas para combater os microrganismos presentes nos alimentos tem sido um tema cada vez mais explorado e debatido, não só devido às suas capacidades antimicrobianas, resultante da evolução dos mecanismos protetores contra stresses bióticos e abióticos (Kasote *et al.*, 2019), mas também devido aos benefícios de saúde que estes proporcionam (Del Rio *et al.*, 2013). Esta nova abordagem à segurança alimentar apresenta possibilidades inovadoras que irão permitir a redução do uso de componentes artificiais na

indústria alimentar, antioxidantes sintéticos, no combate às reações de deterioração que ocorrem nos alimentos (Caleja *et al.*, 2017). Estas reações podem ser causadas devido a diversos fatores tais como alterações enzimáticas, oxidação, fatores como o frio ou calor, ou até deteriorações químicas. O aparecimento de microrganismos num produto alimentar pode levar ao desenvolvimento de características indesejáveis como alterações de sabor, odor e aparência desagradável e perdas nutritivas, resultando num produto indesejado, tanto numa perspetiva organolética como na segurança do consumidor; alguns microrganismos patogénicos são produtores de toxinas (Lopez *et al.*, 2018). A utilização de produtos de origem vegetal para incorporação em alimentos de consumo humano tem sido uma ação predominante nos últimos anos, devido ao crescente interesse na redução de componentes artificiais e em produtos mais saudáveis pelo consumidor, pelo que diversas empresas têm vindo a apostar nesta nova ideologia.

Apesar do tema mais recorrente ser a incorporação destes extratos em alimentos, estes têm sido estudados para serem utilizados em outras indústrias, como para a produção de inseticidas que eliminam mosquitos na fase de vida larval (Ghosh *et al.*, 2012), a redução de iões metálicos a nanopartículas devido à utilização de biomoléculas presentes nos extratos de plantas (Mittal *et al.*, 2013) ou até para a produção de pesticidas de base vegetal (Gurjar *et al.*, 2012).

Propôs-se, assim, o estudo da atividade antimicrobiana de diferentes compostos naturais contra patogénicos alvo que são mais comuns na indústria alimentar, como *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Staph. aureus*, *Pseudomonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Campylobacter* spp. No capítulo de Materiais e Métodos são descritos os procedimentos laboratoriais necessários para analisar a capacidade antimicrobiana destes compostos naturais, bem como a análise minuciosa dos resultados observados no capítulo Resultados/Discussão.

## **2. Objetivo**

A incorporação de extratos de plantas, entre outros, em alimentos tem sido alvo de estudo nos últimos anos, de forma a combater patógenos alvo da indústria alimentar que diminuem o valor de mercado, alteram as características físico-químicas dos alimentos e, em certos casos, podem ser prejudiciais para a saúde humana. Apesar dos esforços da indústria para combater os surtos alimentares, nem sempre é possível eliminar os microrganismos, mesmo ao aplicar metodologias e regras ao processo fabril, condições de higiene, entre outros.

Esta dissertação teve como objetivo testar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos naturais contra patógenos alvo da indústria alimentar. Para isso avaliou-se a cinética de crescimento de diferentes bactérias quando em contacto com diferentes extratos. Para os extratos de interesse, foi avaliada a sua atividade antimicrobiana quando usados numa solução para marinar uma matriz alimentar cárnea, contaminada artificialmente com três patógenos alimentares.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Meio de Cultura

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos meios de cultura adequados às necessidades específicas de crescimento dos microrganismos estudados, preparados de acordo com as indicações dos fabricantes. Utilizou-se TSA (*Trypto-Casein Soy Agar*; Biokar Diagnostics, Beauvais, França); YE (Extrato de levedura; Biokar Diagnostics); BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*; Biokar Diagnostics); Solução de Ringer (Biokar Diagnostics); DMSO (Dimetilsulfóxido), MHA (*Mueller-Hinton Agar*; Biokar Diagnostics); gelose columbia + 5% (V/V) sangue de ovelha (BioMérieux, Craponne, França), MCCD (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*; Merck, Darmstadt, Alemanha), BPW (*Buffered Peptone Water*; Biokar Diagnostics), Rapid *Salmonella* (BioRad, Marnes-la-Coquette, França), Palcam Agar (Biokar Diagnostics), e TBX Agar (*Tryptone-Bile-x-Glucuronate*; Biokar Diagnostics).

#### 3.2 Cinética de Crescimento de vários patogénicos

De forma a observar o crescimento de diferentes microrganismos aeróbios, *Salmonella* Enteritidis ESB008, *L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ESB029, *Y. enterocolitica* NCTC 10406, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *B. cereus* ESB014 (todos pertencentes à coleção de culturas da ESB-UCP) foram inoculados em placas de TSA suplementado com 6 g/L de extrato de levedura; e incubados a 37 °C durante 24 h. Após incubação, uma colónia isolada de cada patogénico foi transferida para um tubo contendo 5 mL de BHIB. Após incubação a 37 °C durante 24 h as células foram centrifugadas a 12800 rpm durante 5 min numa Minispin Plus (Eppendorf). Descartou-se o sobrenadante, as células foram lavadas e ressuspensas no mesmo volume com solução de Ringer. A absorvância de cada cultura foi medida a 600 nm num espectrofotómetro Spectronic 200 (Thermo Scientific), utilizando solução de Ringer como branco. Diluíram-se as diferentes culturas até que as absorvâncias registadas apresentassem um valor próximo de 1  $\lambda$ .

Cada cultura foi diluída em solução de Ringer e plaqueada em TSAYE de forma a confirmar as UFC/mL da cultura inicial.

Numa microplaca de 96 poços foi colocada cada cultura com meio de cultura numa proporção de amostra/meio de 1:10, correspondendo a um total de 250  $\mu$ L por poço (25  $\mu$ L microrganismo + 225  $\mu$ L meio), tendo-se utilizado BHIB e DMSO a 3,125% (V/V) como meios de crescimento. Poços apenas com meio de cultura foram usados como controlos negativos. As absorvâncias a 600 nm foram registadas num leitor de microplacas Multiskan Sky (Thermo

Scientific), a 37 °C, a cada 20 min durante 24 h. Realizou-se uma réplica da microplaca, nas mesmas condições, de forma a confirmar os resultados.

### 3.3 Atividade Antimicrobiana

#### 3.3.1 Microalgas

Após a análise da curva de crescimento dos diferentes microrganismos e da confirmação da sua pureza, testou-se a atividade antimicrobiana de extratos de microalgas *Chlorococcum*, *Chlorella smooth* e *Nannochloropsis*.

Prepararam-se as suspensões de *S. Enteritidis* ESB008, *L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ESB029, *Y. enterocolitica* NCTC 10406, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *B. cereus* ESB014 como descrito anteriormente (secção 3.2).

Determinou-se a atividade antimicrobiana de 40 extratos de plantas das microalgas *Chlorococcum* e *C. smooth*, fornecidos pela Universidade de Aveiro, contra os diferentes microrganismos em estudo numa microplaca de 96 poços de fundo redondo. As condições de extração de cada extrato estão presentes nas Tabelas 3.3.1.1 e 3.3.1.2.

Tabela 3. 3. 1. 1 - Massa de extrato (mg) e respetivo rendimento (mg/mg) para cada condição de extração (Pressão, Tempo, Solvente) para a microalga *Chlorococcum*.

Condições (Pressão/ Tempo)	Amostra N°	Solvente	m extrato obtido (mg)	Rendimento % (mg/mg)
500 MPa/ 15 min	CL2	Água	18,10	14,52
	CL6	Etanol 48%	14,70	11,67
	CL7	Etanol 96%	4,10	3,29
	CL11	Acetona	4,50	3,61
420 MPa/ 9 min	CL13	Água	11,60	9,21
	CL16	Etanol 48%	13,00	10,35
	CL19	Etanol 96%	4,50	3,60
	CL23	Acetona	1,90	1,51
300 MPa/ 15 min	CL26	Água	16,40	13,18
	CL29	Etanol 48%	13,90	11,09
	CL33	Etanol 96%	5,90	4,75
Controlos 15 min	CL35	Acetona	4,70	3,78
	CLC3	Água	12,00	9,59
	CLC6	Etanol 48%	12,50	9,87
	CLC9	Etanol 96%	4,60	3,67
Controlos 9 min	CLC10	Acetona	5,50	4,41
	CLC15	Água	12,40	9,99
	CLC17	Etanol 48%	12,10	9,71
	CLC19	Etanol 96%	2,00	1,59
	CLC23	Acetona	2,80	2,23

Tabela 3. 3. 1. 2 - Massa de extrato (mg) e respetivo rendimento (mg/mg) para cada condição de extração (Pressão, Tempo, Solvente) para a microalga *Chlorella smooth*.

Condições (Pressão/ Tempo)	Amostra N°	Solvente	m extrato obtido (mg)	Rendimento % (mg/mg)
420 MPa/ 9 min	CS2	Água	14,90	11,86
	CS5	Etanol 48%	11,80	9,44
	CS9	Etanol 96%	5,70	4,56
	CS10	Acetona	4,00	3,17
300 MPa/ 8 min	CS14	Água	15,70	12,58
	CS18	Etanol 48%	11,50	9,18
	CS20	Etanol 96%	5,40	4,32
	CS24	Acetona	3,20	2,57
100 MPa/ 8 min	CS27	Água	14,10	11,34
	CS30	Etanol 48%	10,80	8,68
	CS32	Etanol 96%	4,30	3,45
	CS36	Acetona	2,70	2,15
Controlos 9 min	CSC3	Água	13,40	10,71
	CSC6	Etanol 48%	9,20	7,36
	CSC7	Etanol 96%	3,70	2,96
	CSC10	Acetona	1,90	1,51
Controlos 8 min	CSC14	Água	11,10	8,86
	CSC18	Etanol 48%	10,10	8,08
	CSC22	Etanol 96%	2,90	2,32
	CSC24	Acetona	3,20	2,55

Adicionalmente, também se procedeu à análise de nove extratos de *C. vulgaris*, *C. vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis* (CH Auto UADM, CH Auto UAE, CH Auto UAUS, CH Hetero UADM, CH Hetero UAE, CH Hetero UAUS, C-DM, CE UA, C US UA) provenientes da Universidade de Aveiro onde as condições de extração estão referidas na Tabela 3.3.1.3.

Tabela 3. 3. 1. 3 - - Identificação da microalga, lote, extrato utilizado e quantidade de extrato obtido para cada vial.

Nomenclatura no vial	Microalga	Lote	Extração	Quantidade de extrato (mg)
Ch - auto DM	<i>Chlorella vulgaris</i> "bio"	2019CB127	diclorometano:metanol	1,5
Ch - auto E	<i>Chlorella vulgaris</i> "bio"	2019CB127	diclorometano:metanol	2,1
Ch - auto US	<i>Chlorella vulgaris</i> "bio"	2019CB127	diclorometano:metanol	1
Ch - hetero DM	<i>Chlorella vulgaris</i> "smooth"	2019S0071	etanol	2
Ch - hetero E	<i>Chlorella vulgaris</i> "smooth"	2019S0071	etanol	1
Ch - hetero US	<i>Chlorella vulgaris</i> "smooth"	2019S0071	etanol	1,1
C - DM	<i>Chlorococcum amblyostomatis</i>	L201860112	etanol+ultrassons	3,1
C - E	<i>Chlorococcum amblyostomatis</i>	L201860112	etanol+ultrassons	2,8
C - US	<i>Chlorococcum amblyostomatis</i>	L201860112	etanol+ultrassons	1,5

A proporção de amostra/meio manteve-se a (1:10) correspondendo a um total de 250 µL por poço (25 µL microrganismo + 225 µL meio com extrato). Usou-se DMSO a 3,125% (V/V) e BHIB como controlo negativo, e os mesmos inoculados com cada microrganismo como

controlo positivo. Os extratos com água e etanol 48% (V/V) como solventes foram dissolvidos em DMSO 100% (V/V) e os extratos com acetona e etanol 98% (V/V) como solventes foram dissolvidos em DMSO 50% (V/V).

As microplacas, em duplicado, foram incubadas a 37 °C e as absorvâncias a 600 nm foram registadas a cada 20 min durante 24 h, conforme descrito anteriormente (secção 3.2).

Além das amostras referidas, também foram analisados 18 extratos de plantas de *Chlorococcum sp.* (Vials: 121,122,123,124,125,126), *C. vulgaris* (Vials: 109,110,112,112,113,114) e *Nannochloropsis* (Vials: 115,116,117,118,119,120), provenientes da Universidade do Minho (Tabela 3.3.1.3), mas apenas contra duas bactérias Gram-negativas (*S. Enteritidis* ESB008 e *E. coli* ATCC 25922) e duas Gram-positivas (*L. monocytogenes* 2542 e *Staph. aureus* 6538). Estes compostos foram extraídos com etanol a 88% (v/v) a 70 °C e diluídos com 1 mL DMSO 100 % (v/v).

Tabela 3. 3. 1. 4 - Condições de extração e diferentes massas (mg) de vials provenientes da Universidade do Minho.

Chlorella vulgaris	Vial	Tratamento Óhmico (OH)	Frequência	t (min)	Cinética de aquecimento OH = COV	M vial (g)	M vial+ extrato (g)	M extrato total (mg)
	H 109	X	25 kHz	5		5	2,3364	2,3423
H 110	2,3504				2,356		5,6	
H 111	2,3514				2,3576		6,2	
H 112	X	25 kHz	5	5	2,3408	2,3465	5,7	
H 113					2,3506	2,3563	5,7	
H 114					2,3639	2,3696	5,7	
Nannochloropsis	Vial	Tratamento Convencional (COV)	Tratamento Óhmico (OH)	Frequência	t (min)	M vial (g)	M vial+ extrato (g)	M extrato total (mg)
	H 115	X			15	2,3851	2,3978	12,7
	H 116					2,3346	2,3473	12,7
	H 117					2,3524	2,3652	12,8
	H 118	X	25 kHz	15	15	2,3343	2,3469	12,6
	H 119					2,3722	2,3848	12,6
H 120	2,3751					2,3877	12,6	
Chlorococcum	Vial	Tratamento Convencional (COV)	Tratamento Óhmico (OH)	Frequência	t (min)	M vial (g)	M vial+ extrato (g)	M extrato total (mg)
	H 121	X		25 kHz	15	2,3669	2,3769	10
	H 122					2,3278	2,3375	9,7
	H 123					2,3706	2,3806	10
	H 124	X		-	15	2,3353	2,345	9,7
	H 125					2,3456	2,3552	9,6
H 126	2,3641					2,3736	9,5	

### 3.3.2 Péptidos

A atividade antimicrobiana de 17 péptidos (Tabela 3.3.2.1) dissolvidos em água a uma concentração de 10 mg/mL e fornecidos pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP) foi testada contra diferentes microrganismos: i) oito estirpes anaeróbias - *Clostridium*

*perfringens* (Estirpes: 1.16, 1.19, 3, 4) e *Clostridium sporogenes* (Estirpes: 1.31, 1.34, 1.61, 1.22) – crescidas em meio BHIA ou BHIB durante 48 h em câmara de anaerobiose a 37 °C; ii) seis estirpes microaerofílicas de *Campylobacter* spp. (Estirpes: DFVF 1099; NCTC 11168; C21A; C3, CJ305; C) - crescidas em gelose columbia + 5% (V/V) sangue de ovelha, durante 48 h em câmara de CO<sub>2</sub> (18%) a 42 °C; iii) oito estirpes aeróbias - *S. Enteritidis* ESB008, *L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538, *E. coli* ATCC 25822, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas fluorescens* ESB284 -crescidas em TSAYE a 37° C durante 24h.

Tabela 3. 3. 2. 1 - Indicação da massa molar, código e volume de cada péptido analisado.

<i>MM (g/mol)</i>	<b>Péptido</b>	<b>Volume (µL)</b>
1314.75	aLF1-11	590
1341.74	bLF1-11	540
1311.73	cLF1-11	450
1315.70	nhLF1-11	440
1372.74	rhLF1-11	340
1762.99	aLF17-31	720
1992.09	bLF17-31	570
1909.00	cLF17-31	350
1938.06	oLF17-31	360
2821.55	aLF17-41	630
3984.68	oLF17-31	700
2112.11	aLF268-284	~200
2046.18	bLF268-284	~200
2088.16	cLF268-284	~200
2043.10	nhLF268-284	700
1395	3.1	920 (volume a adicionar)
1770	CA-M	863 (volume a adicionar)

Após o período de crescimento, foi feita uma suspensão de 0.5 na escala McFarland de cada cultura e com uma zaragatoa fez-se um tapete em MHA. De seguida, gotas de 2 µL de cada péptido foram colocadas no cimo do tapete e as placas foram incubadas de acordo com as condições acima referidas para cada género de bactéria. No caso dos *Clostridium* spp. também se realizaram tapetes com as culturas crescidas em BHIB.

Depois do período de incubação, as placas foram analisadas num contador de colónias SCAN 500 (Interscience) de forma a analisar a presença ou ausência de halos que indicassem atividade antimicrobiana dos péptidos.

### 3.3.2.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Determinou-se a CMI dos péptidos 3.1 e CA-M para três bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538 e *Clostridium* 1.31) e três Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ESB008 e *Campylobacter* NCTC 11168). A concentração inicial

de cada péptido foi de 66,00% (V/V). Após diluições sucessivas, 75 µL de cada diluição foram colocados nos poços correspondentes numa microplaca de 96 poços de fundo redondo e inoculados com 25 µL de cada cultura bacteriana, preparadas como previamente descrito. As concentrações de péptido obtidas em cada poço foram de 50,00; 25,00; 12,50, 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20 0,10; 0,05 e 0,02 % (V/V). Também foram realizados controlos em Ringer, isto é, cada cultura bacteriana foi colocada em ringer e respetivas diluições, sem adição de péptidos. Após o período de incubação, 24 h para os aeróbios e 48 h para *Cl. 1.31* e *Campylobacter* NCTC 11168, as amostras de concentrações 50.00 e 25.00% (V/V) no caso das bactérias aeróbias, e 50.00, 25.00 e 0.02% (V/V) no caso de *Campylobacter* NCTC 11168 e *Cl. 1.31*, foram diluídas 10x em Ringer e plaqueadas com o auxílio do easySpiral (Interscience) em TSAYE, MCCD e TSAYE, respetivamente. As placas foram incubadas nas condições apropriadas e registaram-se no contador de colónias referido anteriormente (secção 3.3.2).

### 3.3.3. Extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake

Foi realizada a análise da cinética de crescimento dos microrganismos aeróbios *S. Enteritidis* ESB008, *L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ESB029, *Y. enterocolitica* NCTC 10406, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *B. cereus* ESB014 e *E. faecalis* ATCC 29212 na presença de três extratos de plantas, *Olive* 20 % Oleuropeína, Alecrim (1:4) e Shiitake 8% *Polysaccharides* (Infinite Choice; normas disponíveis no ANEXO I).

Cada cultura bacteriana foi preparada como descrito anteriormente. Em microplacas de 96 poços, foram usados 50 µL de cada microrganismo com 150 µL meio/extrato. Os extratos foram preparados em diferentes concentrações: Alecrim a 64 mg/mL (Tsai *et al.*, 2007), Oleuropeína a 250 mg/mL (Tranter *et al.*, 1993) e Shiitake a 250 mg/mL (Asri *et al.*, 2019) (Infinite Choice). Foram registadas as absorvâncias a 600 nm, a 37 °C, a cada 20 min durante 24h.

Para as bactérias anaeróbias *Cl. perfringens* (Códigos: 1.16, 1.19, 3, 4) e *Cl. sporogenes* (Estirpes: 1.31, 1.34, 1.61, 1.22) e bactérias microaerofílicas *Campylobacter* spp. (Estirpes: DFVF 1099; NCTC 11168; C21A; C3, CJ305; C9), após crescimento em condições apropriadas, foram preparadas microplacas de 96 poços com as mesmas concentrações de cada extrato e com a mesma proporção de amostra/meio em cada poço. Após incubação durante 48h em condições de anaerobiose ou microaerofilia, 3 µL de cada amostra contendo *Clostridium* spp. ou *Campylobacter* spp. foram colocados em MHA ou MCCD, respetivamente.

Os resultados de inibição foram registados ao fim de 48h num contador de colónias, como referido anteriormente (secção 3.3.2).

### **3.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas incorporados numa matriz alimentar cárnea**

#### **3.3.4.1. Incorporação dos extratos na matriz alimentar**

Como matriz alimentar foram usados peitos de frango adquiridos em grandes superfícies comerciais. Foram cortados 10 g de carne e colocados individualmente em sacos de plástico estéreis. Para ser usada a carne do mesmo lote em todas as experiências realizadas, todos os sacos contendo 10 g de carne foram congelados e apenas descongelados no dia anterior ao da experiência. Foram realizadas três réplicas independentes.

#### **3.3.5 Preparação dos microrganismos usados no estudo**

Diferentes espécies foram usadas neste estudo. Repicaram-se isolados de culturas puras para os meios de cultura e em condições de incubação apropriados de forma a confirmar a sua pureza, e posteriormente, todas as estirpes pertencentes à mesma espécie foram juntas e usadas sob a forma de *cocktail* para contaminar a matriz. Foram usadas **7 estirpes de *L. monocytogenes*** (Estirpes: *L. monocytogenes* 2542, *L. monocytogenes* FSL N1-227, *L. monocytogenes* FSL N3-013, *L. monocytogenes* FSL R2-499, *L. monocytogenes* FSL J1-031, *L. monocytogenes* MF4077 e *L. monocytogenes* FSL J1-031), **5 estirpes de *Salmonella* spp.** (Estirpes: *S. Typhimurium* 27C, *S. Enteritidis* ESB029, *S. Senftenberg* 775W, *S. Infantis* M2016 e *S. Typhimurium* SLM 1), **3 estirpes de *E. coli*** (Estirpes: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739 e *E. coli* DSM 423) e **6 estirpes de *Campylobacter* spp.** (Estirpes: DFVF 1099; NCTC 11168; C21A; C3, CJ305 e C9). Uma colónia de cada microrganismo foi transferida para um tubo de 5 mL BHIB (pré-inóculo) e após um período de 24 h a 37 °C transferiram-se 50 µL para novos tubos de BHIB, com nova incubação às mesmas condições. No caso das estirpes de *Campylobacter* spp. transferiram-se 100 µL de suspensões de culturas puras para 5 mL de BHIB + 100 µL sangue de ovelha, seguindo-se incubação em câmara de CO<sub>2</sub> durante 48h.

Após o período de incubação, as células de cada cultura foram lavadas e tratadas como referido anteriormente (secção 3.2). Juntaram-se 500 µL de cada espécie (*cocktail*) e diluíram-se de forma a estes ficarem com uma concentração de cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

### 3.3.6 Contaminação artificial da matriz e respectivas marinadas

Inocularam-se 10 µL de cada cocktail em 10 g de frango e cada saco com a matriz contaminada foi guardado durante 24h no frigorífico.

Os extratos para a marinada da matriz foram preparados em água desionizada estéril nas concentrações selecionadas nas experiências anteriores, ou seja, Alecrim a 64 mg/mL, Shiitake e Oleuropeína a 250 mg/mL. A cada saco com o frango contaminado foram adicionados 100 mL de cada extrato, de forma a garantir a sua completa imersão. Paralelamente e como controlo, adicionaram-se 100 mL de H<sub>2</sub>O estéril a cada 10g de frango contendo cada um dos cocktails. Colocaram-se os sacos no frigorífico durante 24h para simular uma carne marinada antes de ser cozinhada. Ao fim das 24h na marinada, cada 10g de carne foi retirada da marinada e colocada em sacos de *stomacher* BagLight 400 mL (Interscience) com 90 mL de *Buffered Peptone Water* (BPW), sendo a solução misturada num BagMixer da Interscience, a uma velocidade 4 durante 30 segundos. Ainda como controlo da carga microbiana da matriz, 10 g de carne não inoculada (não marinada, mas deixada no frigorífico por 24h) foram igualmente analisados. Também para determinar o efeito da marinada sem a incorporação numa matriz, 0,1% (v/v) de cada cocktail foi adicionado a tubos contendo cada marinada, deixados no frigorífico por 24 h e usados como controlo.

Cada amostra de carne, bem como de marinadas, e respetivas diluições em solução de Ringer foram plaqueadas em duplicado, usando o easySpiral, nos meios de cultura apropriados: *Salmonella* spp. em Rapid *Salmonella*, *Listeria* spp. em Palcam Agar, *Campylobacter* spp. em MCCD e *E. coli* em TBX Agar. Após condições de incubação adequadas, os resultados foram analisados no programa SCAN 500® da Interscience.

### 3.3.7 Análise Estatística

Realizou-se uma análise de variância para testar as diferenças entre os compostos usados para marinar a matriz cárnica contaminada com cada um dos patogénicos. As comparações múltiplas foram avaliadas pelo teste post-hoc de Tukey e todas as análises foram realizadas usando IBM SPSS Statistics, 27 (IBM Corporation, EUA). A diferença média foi considerada significativa ao nível de 0,05.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Curvas de crescimento de vários patogénicos na presença de extratos naturais

#### 4.1.1 Extratos de microalgas *Chlorococcum* e *Chlorella smooth*

Os resultados obtidos para os 40 extratos das microalgas *Chlorococcum* spp. e *Chlorella smooth* são apresentados de acordo com as diferentes condições de extração para uma análise mais clara. Serão apresentados como exemplo a análise de uma bactéria Gram-positiva (*L. monocytogenes* 2542) e uma bactéria Gram-negativa (*S. aureus* 6538), visto que os restantes resultados obtidos foram semelhantes aos discutidos nesta secção (ANEXO II).

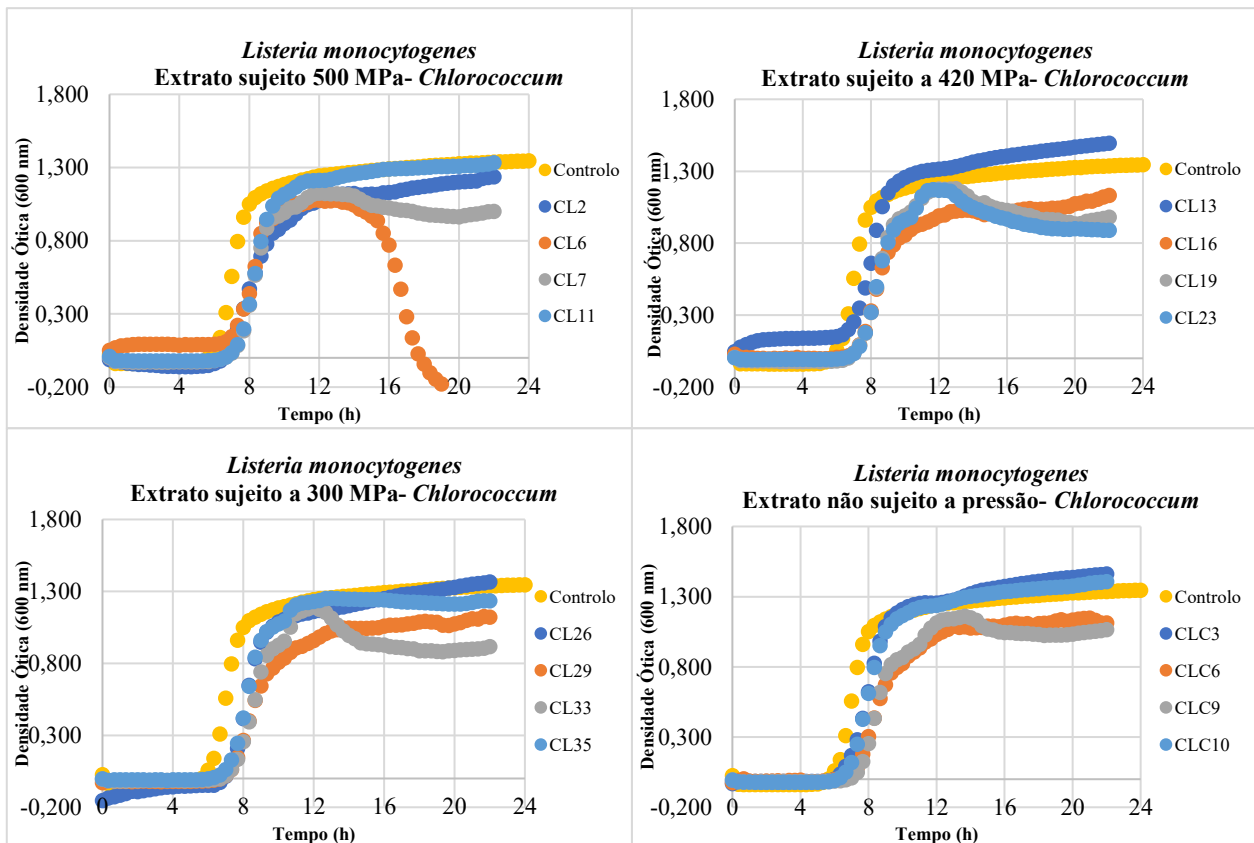


Figura 4. 1. 1. 1 - Densidade ótica em função do tempo de *Listeria monocytogenes* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

Quanto ao patogénico *L. monocytogenes*, tanto para as amostras de *Chlorococcum* extraídas sem pressão como para as amostras extraídas por HPP a diferentes pressões e com diferentes solventes, houve uma ligeira diferença na fase *lag* de crescimento (Figura 4.1.1.1). No entanto, a bactéria conseguiu crescer para todas as condições quando comparada com o controlo (bactéria crescida em meio de cultura sem extrato). Uma exceção ocorreu para a amostra CL6 extraída a 500 MPa, em que um inexplicável decréscimo da densidade ótica

ocorreu após 16 horas. Para os extratos de *C. smooth* (Figura 4.1.1.2), apesar do comportamento ser semelhante para todas as amostras (independentemente da pressão e solvente), os valores de densidade ótica obtidos foram inferiores para todas as amostras extraídas com etanol a 48% V/V (CSC18, CS30, CS18 e CS5). É também possível observar um decréscimo da densidade ótica nas amostras CS14 (sujeita a 300 MPa) e CSC14 (controlo 8 minutos sem pressão), ambos extraídos com água.

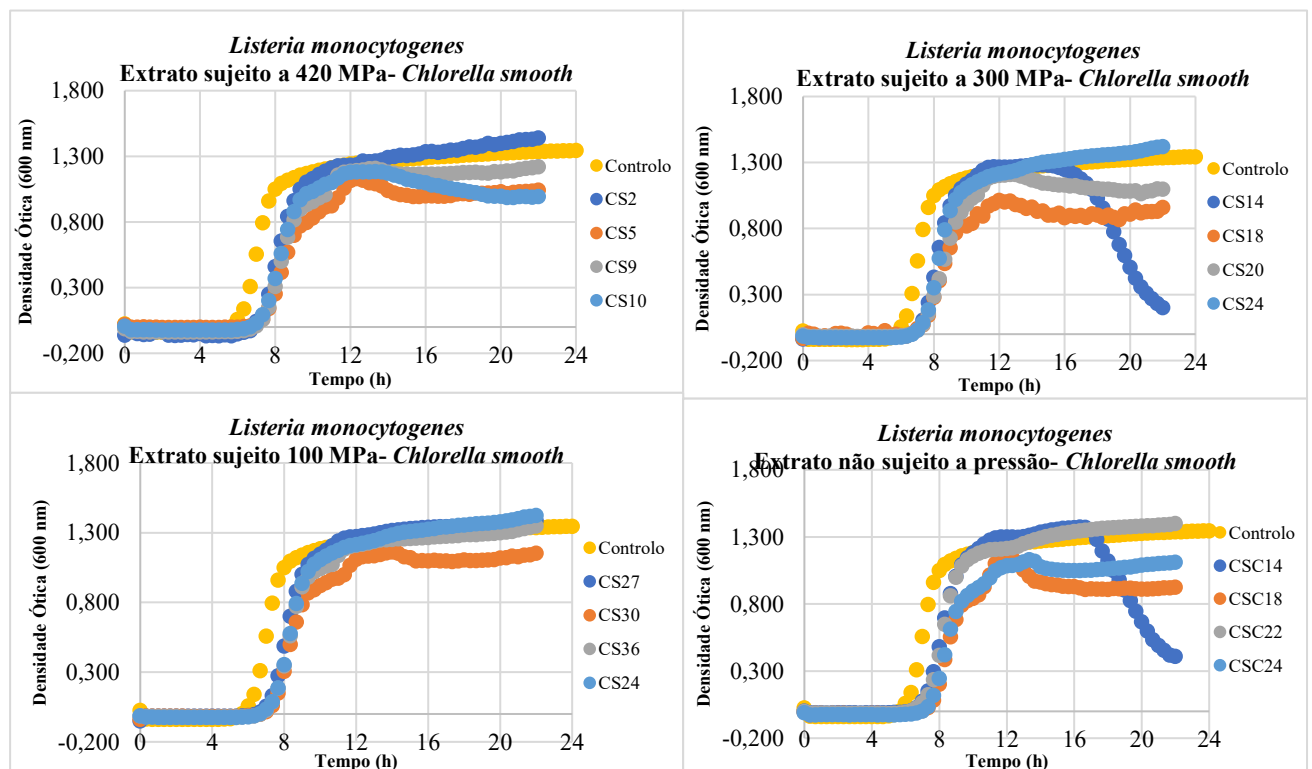


Figura 4. 1. 1. 2 - Densidade ótica em função do tempo de *Listeria monocytogenes* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

Em relação ao patogénico *Staph. aureus*, também foi possível verificar uma redução dos valores de densidade ótica para alguns dos extratos de *C. smooth* (Figura 4.1.1.3). Todos os extratos sujeitos a uma pressão de 420 MPa apresentaram uma redução considerável em relação ao controlo, apesar de todos apresentarem solventes diferentes. Além disso, registaram-se diminuições da densidade ótica inexplicáveis tanto no extrato CS14 (sujeito a 300 MPa), após 16h de análise, como nos controlos CSC3 e CSC14 (com tempos de extração de 8 e 9 minutos, respetivamente, e sem pressão) após 13h de análise, sendo que todos foram extraídos com água. Para os extratos de *Chlorococcum* (Figura 4.1.1.4), observou-se uma redução dos valores registados de densidade ótica com exceção das amostras CS24, CSC10 (extraídas com acetona) e CS27 (extraída com água), que ultrapassaram os valores registados dos controlos.

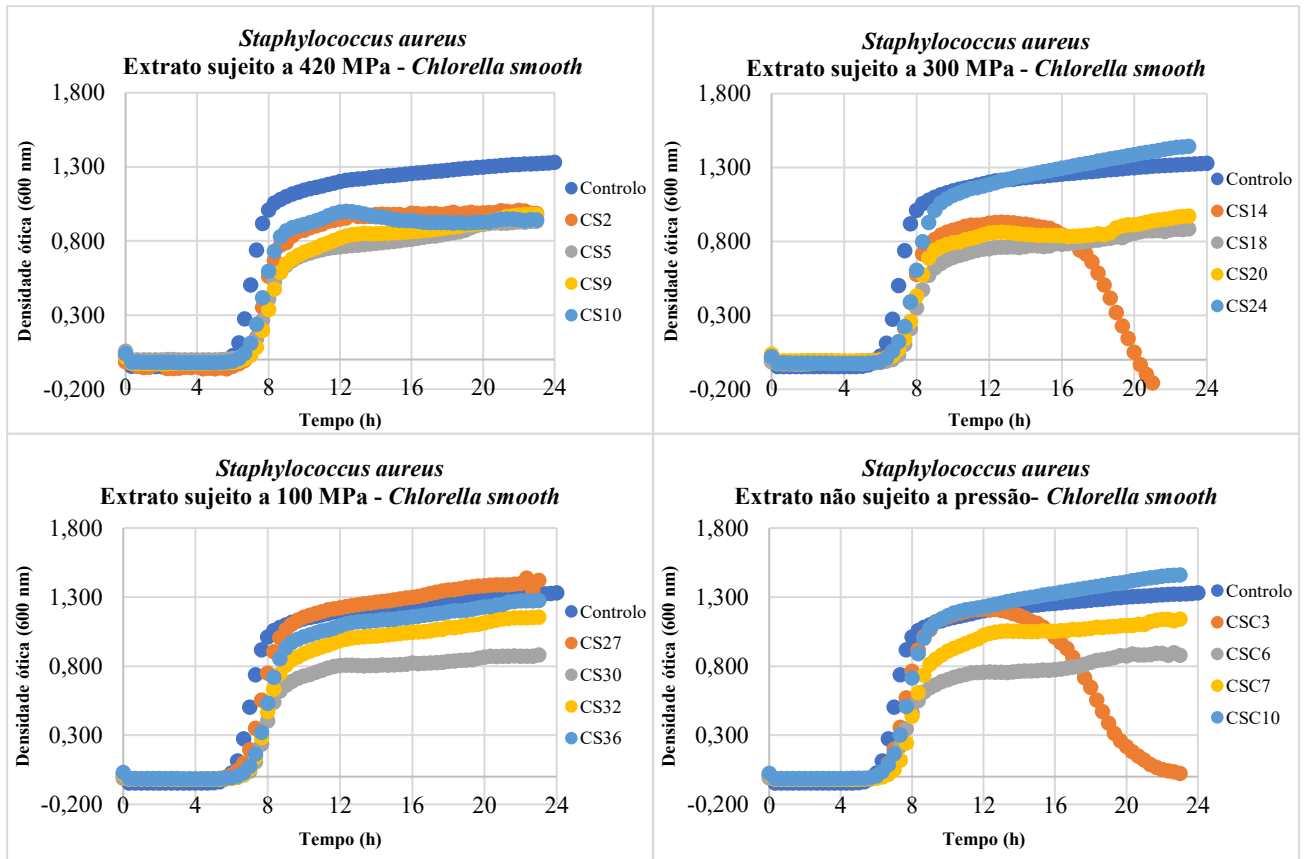


Figura 4. 1. 1. 3 - Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

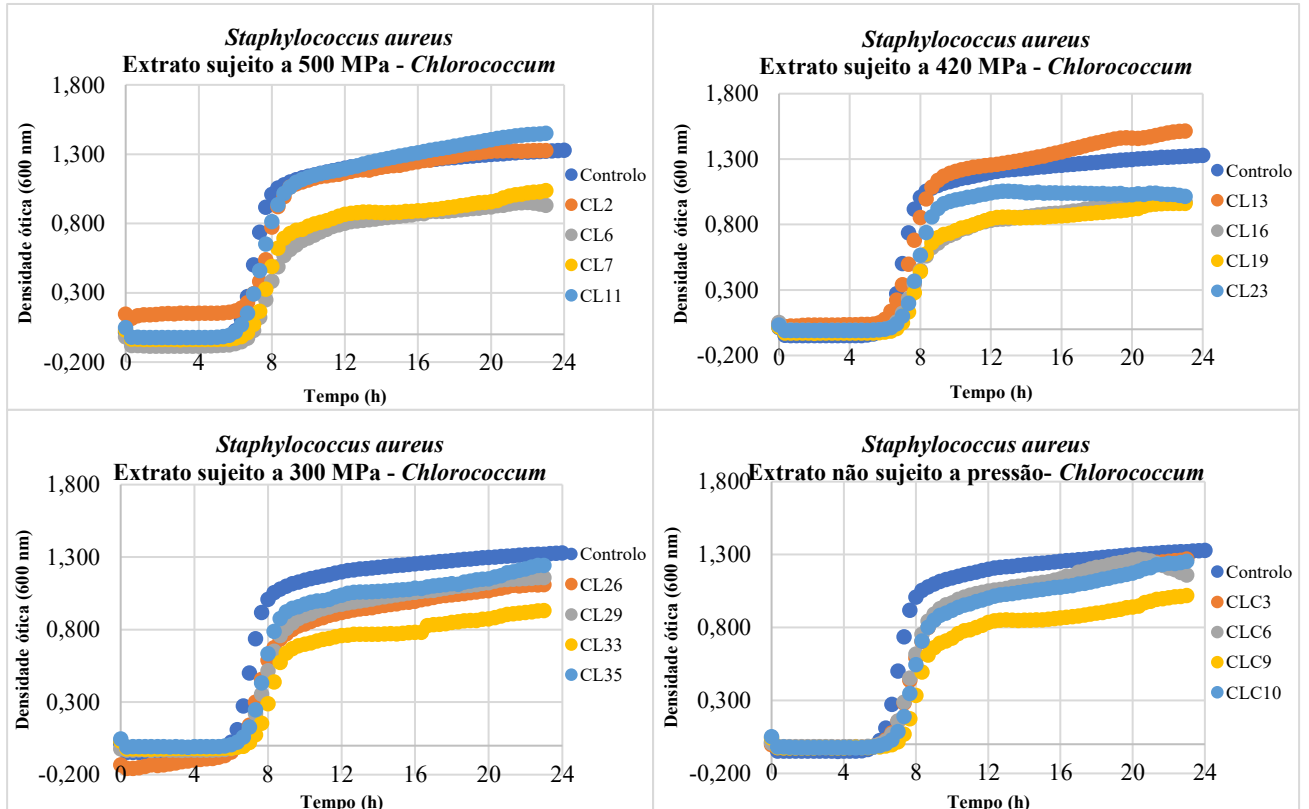


Figura 4. 1. 1. 4 - Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

Apesar do comportamento semelhante de todas as amostras, é de realçar a diminuição da densidade ótica das amostras extraídas com etanol a 96 % (V/V) (CL7, CL19, CL33 e CLC9), visto que a diminuição alcançada é facilmente distinguível do resto das amostras.

Após uma análise aos patogénicos *L. monocytogenes* e *Staph. aureus*, foi possível observar uma clara distinção das diferentes fases de crescimento onde se registou uma fase *lag* de adaptação, uma clara fase exponencial e um período estacionário que demonstra uma tendência crescente. Todos os patogénicos em análise comprovaram ter um comportamento semelhante aos patogénicos alvo de discussão neste capítulo, pelo que os resultados obtidos da densidade ótica registada em função do tempo podem ser consultados no ANEXO II.

As reduções da densidade ótica das amostras de *Chlorococcum* spp. extraídas com etanol a 96% (V/V) não foram tão grandes para *L. monocytogenes* como foram para *Staph. aureus*, sendo que a extração pode ter tido um papel importante na inibição do crescimento deste patogénico. A bibliografia mostra que a utilização de etanol a 100% (V/V) resulta em inibições elevadas contra *B. subtilis*, *Staph. aureus* e *S. typhi* (Elshobary *et al.*, 2020). Verificou-se também que os extratos aquosos não apresentaram capacidade antimicrobiana, o que está em conformidade com os resultados obtidos no estudo de Elshobary *et al.* (2020). Por outro lado, os valores de densidade ótica de *Staph. aureus* nas amostras de *Chlorococcum* spp. extraídas com acetona não foram muito diferentes em relação aos do controlo. No estudo de (Uma *et al.*, 2011), os autores verificaram que a extração com acetona resultou numa elevada diminuição da carga microbiana de *E. coli* e *Staph. aureus* (Uma *et al.*, 2011), sendo inexplicável o comportamento das amostras CS24 e CSC10 no presente estudo.

Em relação à microalga *C. smooth*, o comportamento das amostras extraídas com 48% etanol (V/V) pôde dever-se tanto aos compostos fenólicos presentes na microalga como ao etanol usado na sua extração. Outros autores avaliaram a atividade antimicrobiana de amostras de *Chlorella* sp. extraídas com etanol, metanol e acetato de etilo contra diferentes patogénicos Gram-positivos e negativos, nomeadamente *L. monocytogenes* e *E. coli*, e reportaram que os compostos fenólicos estavam associados à capacidade antimicrobiana da microalga (Dahmen-Ben Moussa *et al.*, 2021). Por outro lado, noutra estudo recente, a microalga *Chlorella* spp., quando extraída com metanol, acetato de etilo e hexano não exibiu atividade antimicrobiana contra patogénicos tanto Gram-positivos como negativos (Gupta *et al.*, 2021), pelo que a relação entre o solvente utilizado na extração e a quantidade de compostos fenólicos presentes na microalga são fatores determinantes para a atividade antimicrobiana desta. Observou-se ainda o decréscimo dos valores de densidade ótica consequentes da atividade antimicrobiana

dos extratos, especialmente das microalgas extraídas com água, sendo que não se encontrou quaisquer fatores que explicassem este comportamento.

#### 4.1.2 Extratos de microalgas *Chlorococcum amblystomatis* e *Chlorella vulgaris*

Os resultados obtidos para os patogénicos *A. baumannii* ESB029 e *Y. enterocolitica* NCTC 10406 na presença dos extratos de microalgas *Chlorococcum amblystomatis* e *C. vulgaris* (CH Auto UADM, CH Auto UAE, CH Auto UAUS, CH Hetero UADM, CH Hetero UAE, CH Hetero UAUS, C-DM, CE UA, C US UA), estão representados nas Figuras 4.1.2.1 e 4.1.2.2., respetivamente. Os resultados obtidos para os restantes patogénicos foram semelhantes e, como tal, estão apenas apresentados no ANEXO III.

Para o patogénico *A. baumannii* ESB029 foi possível observar que os valores de densidade ótica foram inferiores para os extratos CH Hetero UAE, CH Auto UAS DM, C DM e CH Hetero UADM em relação ao controlo (Figura 4.1.2.1), sendo que para os extratos C US UA, CH Hetero UAUS e CH AUTO UAE os valores de densidade ótica obtidos foram semelhantes aos do controlo. Este caso apresenta semelhanças com os patogénicos *S. Enteritidis* ESB008, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC15442, visto que os valores de densidade ótica obtidos para praticamente todos os extratos foram reduzidos ou semelhantes em comparação aos controlos efetuados.

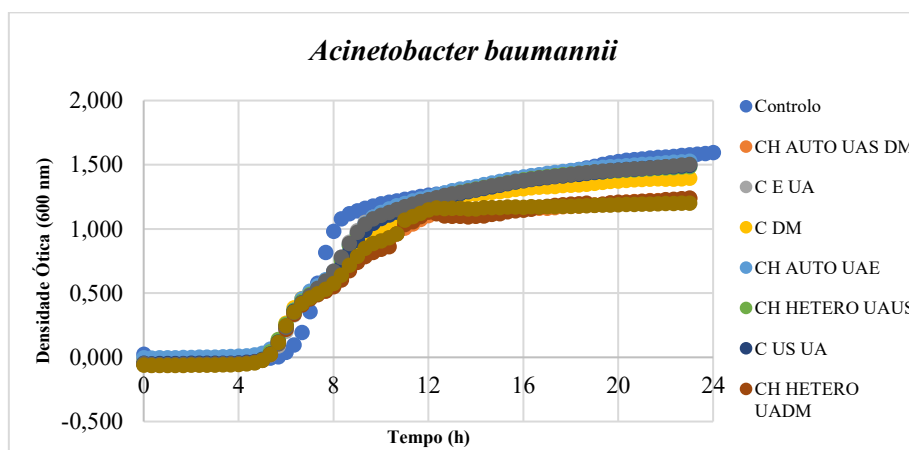


Figura 4. 1. 2. 1 - Valores de densidade ótica em função do tempo para *Acinetobacter baumannii* inoculada com diversos extratos.

No caso do patogénico *Y. enterocolitica* NCTC10406 verificou-se o oposto, uma vez que os valores de densidade ótica obtidos para todos os extratos em análise foram superiores ao controlo efetuado (Figura 4.1.2.2). A própria coloração e opacidade dos extratos em análise poderão ter influenciado os valores registados, sendo que esta é uma possível explicação para os valores não conformes de densidade ótica. Foi também possível observar semelhanças nos resultados obtidos de diferentes patogénicos onde os valores de densidade ótica obtidos para

todos os extratos foram acima aos do controlo efetuado, como é o caso do patogénico *B. cereus* ESB014, com exceção do extrato CH Auto UAS DM, *Staph. aureus* 6538, com exceção dos extratos CH Hetero UAE e C E UA, e *L. monocytogenes* 2542, com exceção dos extratos CH Hetero UA DM, C US UA e CH Hetero UAE.

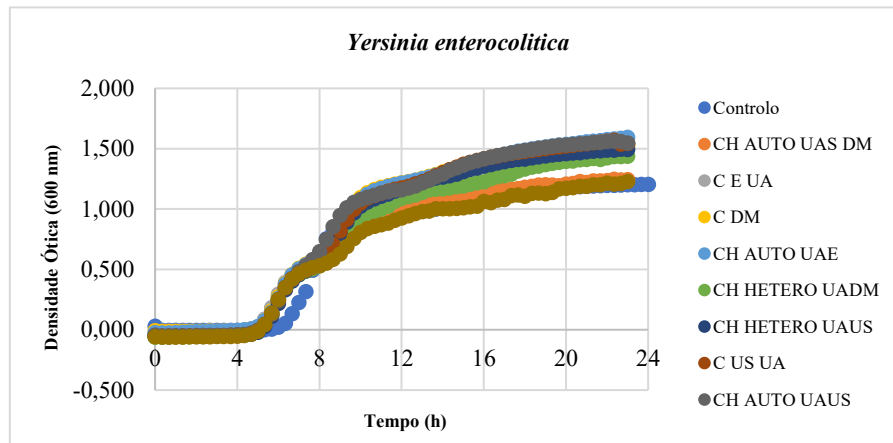


Figura 4. 1. 2. 2 - Valores de densidade ótica em função do tempo para *Yersinia enterocolitica* inoculada com diversos extratos.

Através dos resultados obtidos, foi possível observar que nenhum dos extratos em análise atuou de forma semelhante em todos os patogénicos em estudo (independentemente do solvente utilizado para a extração e do tipo de microalga), sendo que não é possível realçar qualquer relação direta entre um extrato específico e a sua eficácia na redução da densidade ótica registada quando inoculado com os patogénicos em estudo. Ocorreram diferentes interações entre os patogénicos e cada extrato utilizado, sendo que o registo dos valores de densidade ótica pode ter sido afetado pela própria coloração do extrato e a sua opacidade, estando esta diretamente relacionada com a capacidade do equipamento utilizado em registar os valores de densidade ótica.

#### 4.1.3. Extratos de microalgas *Chlorococcum*, *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis*

Os 18 extratos de *Chlorococcum* spp., *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis* spp., provenientes da Universidade do Minho, foram testados apenas contra duas bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* 2542 e *Staph. aureus* 6538) e duas Gram-negativas (*S. Enteritidis* e *E. coli* ATCC 25922) (ANEXO IV), com a premissa de se testarem contra um maior número de microrganismos, caso os extratos tivessem atividade antimicrobiana. Devido às semelhanças, apenas os resultados obtidos para os patogénicos *L. monocytogenes* e *E. coli* são apresentados nas Figuras 4.1.3.1. e 4.1.3.2, respetivamente (resultados dos restantes patogénicos apresentados no Anexo IV).

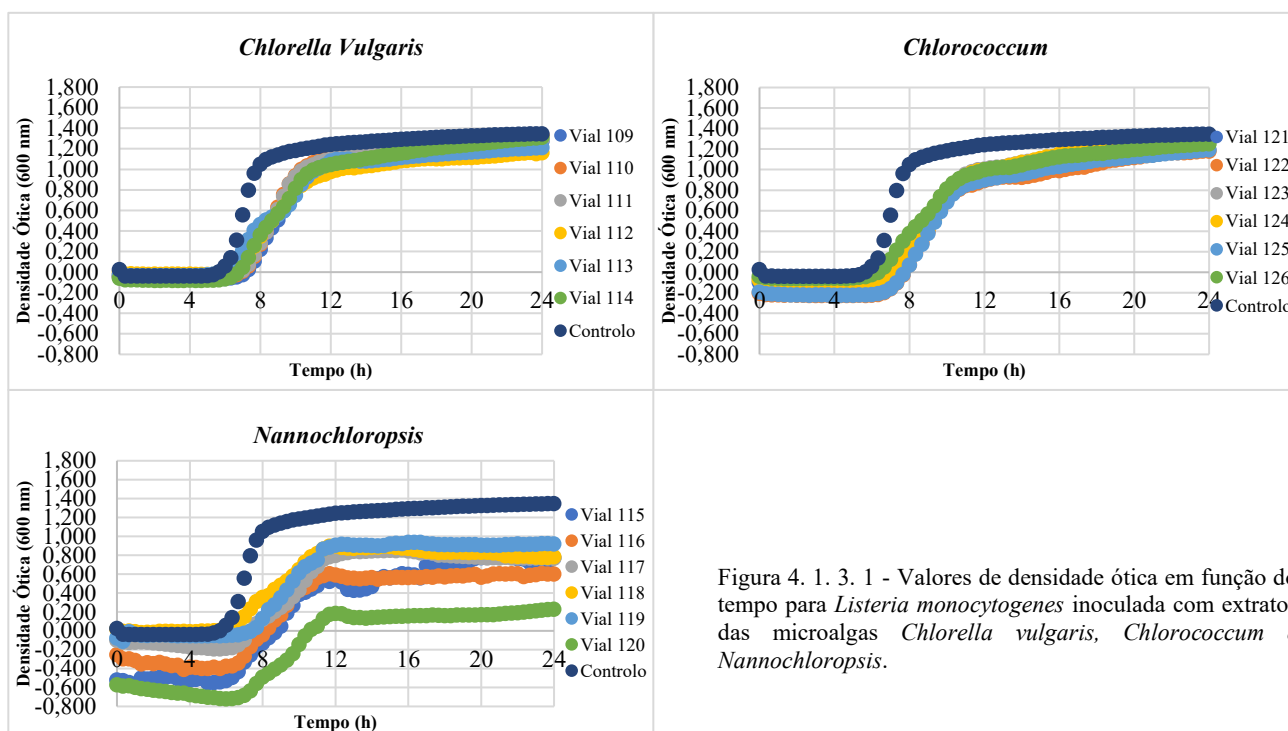


Figura 4. 1. 3. 1 - Valores de densidade ótica em função do tempo para *Listeria monocytogenes* inoculada com extratos das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* e *Nannochloropsis*.

No caso do patogénico *L. monocytogenes* (Figura 4.1.3.1), uma redução dos valores de densidade ótica em relação ao controlo (bactéria crescida em meio de cultura sem extrato) foi obtida para os extratos das microalgas *Chlorococcum* e *C. vulgaris*. O mesmo aconteceu para o patogénico *Staph. aureus*, onde para ambos se verificou que na presença dos extratos da microalga *Nannochloropsis*, apesar de se encontrarem abaixo do controlo, os valores de densidade ótica foram extremamente dispersos.

No caso do patogénico *E. coli* (Figura 4.1.3.2), verificou-se que os valores de densidade ótica dos extratos de *Chlorococcum* e *Nannochloropsis* foram semelhantes tanto para os patogénicos Gram-positivos, como para o patogénico *S. Enteritidis*. Ocorreu uma redução dos valores de densidade ótica na presença de ambas as microalgas, além de que a discrepância que ocorreu nos valores da microalga *Nannochloropsis* manteve-se. Por outro lado, os extratos de *C. vulgaris* apresentaram valores de densidade ótica semelhantes ou superiores aos registados no controlo.

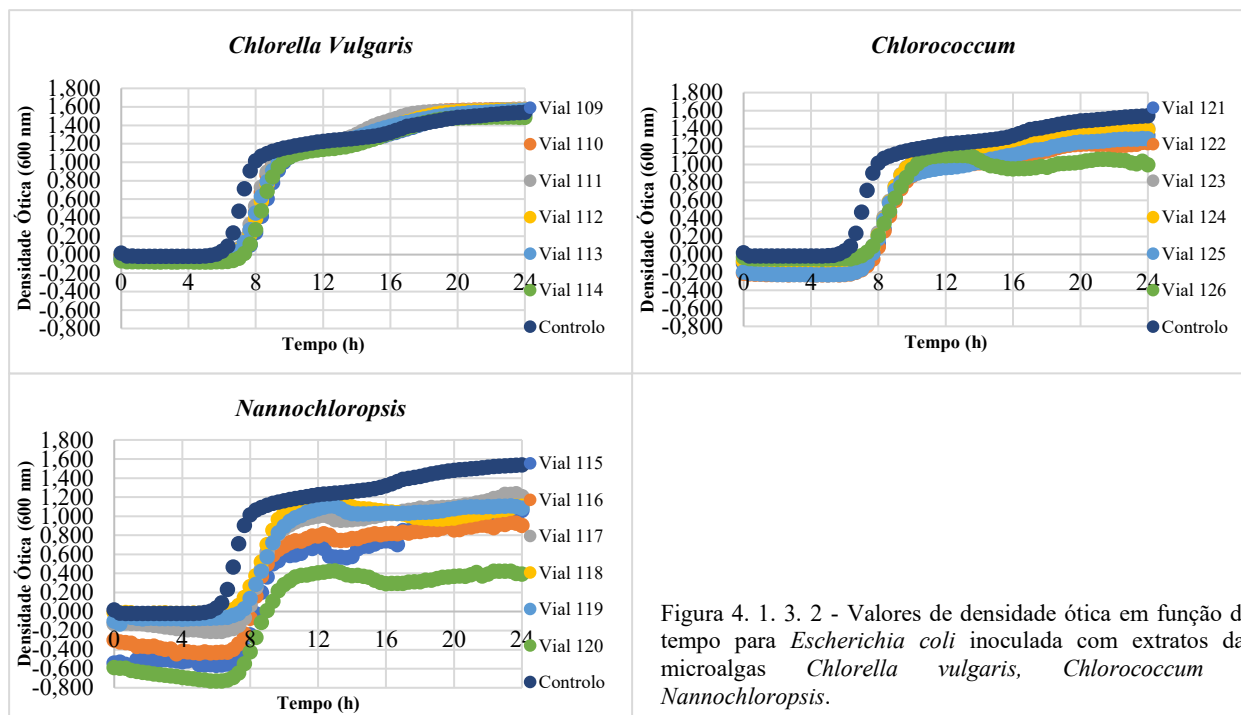


Figura 4. 1. 3. 2 - Valores de densidade ótica em função do tempo para *Escherichia coli* inoculada com extratos das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* e *Nannochloropsis*.

Tanto para os patogénicos Gram-positivos como Gram-negativos foi claro um começo tardio da fase *lag* (aproximadamente 1 h) bem como um registo de valores negativos de densidade ótica na presença dos extratos 115,116 e 120 da microalga *Nannochloropsis*. Esta diferença de valores pode dever-se à diferença de concentração inicial de células em relação ao controlo, devido à realização do trabalho experimental em dias diferentes, o que pode ter originado um crescimento tardio dos patogénicos. Por outro lado, apesar das condições de extração serem diferentes para cada microalga, a semelhança entre as condições de extração das algas *Chlorococcum* e *Nannochloropsis* impossibilita concluir que este seja o fator responsável pelo registo variado de valores de densidade ótica, pelo que estes valores poderão dever-se a uma contaminação que tenha ocorrido nos extratos de *Nannochloropsis*, justificando assim a discrepância de valores obtidos quando inoculados com os patogénicos em estudo.

#### 4.1.4 Péptidos

A atividade antimicrobiana de 17 péptidos provenientes da FFUP foi também testada contra diversas espécies. Apenas os péptidos 3.1 e CA-M apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas, onde um possível mecanismo de atuação é a interação com as membranas celulares dos patogénicos de forma a ocorrer a sua despolarização, levando assim à sua morte (Powers & Hancock, 2003). Realizaram-se estudos com péptidos de

estrutura semelhante ao CA-M que demonstraram que este é um péptido com forte atividade antibacteriana para patogênicos alvo deste estudo, tais como *Staph. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (Cao *et al.*, 2010). Existem também estudos recentes que exploram a capacidade de péptidos inibirem o crescimento de *S. Enteritidis* permeabilizando a membrana celular e levando assim à lise celular (Hao *et al.*, 2017), bem como a utilização de péptidos como a colistina, que destroem a membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas, como é o caso do patogênico *P. fluorescens* (Naghmouchi *et al.*, 2012). A inibição dos oito isolados de *Campylobacter* spp. apenas ocorreu pela ação dos péptidos 3.1 e CA-M. A inibição destes patogênicos é descrita na literatura através da utilização de péptidos de origem animal (van Dijk *et al.*, 2012).

Além da inibição dos oito isolados de *Clostridium* spp. pela ação dos péptidos CA-M e 3.1, observou-se também uma inibição pelos péptidos nhLF1-11, bLF17-31 e oLF17-41, em que cada um inibiu seis isolados. A inibição deste patogênico tem sido observada na literatura; Caly *et al.* (2017) explorou a utilização de dois péptidos sintetizadas pelo patogênico *E. faecalis*, de forma a inibirem a proliferação de *Cl. perfringens* (Caly *et al.*, 2017).

Apenas a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos péptidos 3.1 e CA-M foi determinada uma vez que apenas estes péptidos inibiram todas as bactérias testadas. No entanto, tendo em conta a quantidade de amostra, apenas foram selecionadas três bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* 2542, *Staph. aureus* 6538 e *Clostridium* 1.31) e três Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ESB008 e *Campylobacter* NCTC 11168).

As CMIs dos dois péptidos foram <25,00 % (V/V) para todas as bactérias aeróbias. Semelhantes resultados têm sido reportados noutros estudos; Daoud *et al.* (2005) obtiveram uma CMI do péptido  $\alpha$  107-136 de 76  $\mu$ M para *E. coli* e *S. Enteritidis* (Daoud *et al.*, 2005). No caso do isolado *Cl.* 1.31, a CMI do péptido 3.1 foi de <25,00 % (V/V) e a do péptido CA-M entre 25 e 0.02 % (V/V). Para *Campylobacter* NCTC 11168 observou-se uma CMI entre 25 e 0.02 % (V/V) para ambos os péptidos, em conformidade com outros estudos presentes na literatura, em que a CMI do péptido *TriaA1* foi de 3.13  $\mu$ g/mL contra *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (Cochrane & Vederas, 2014).

Apesar da promissora capacidade inibitória dos péptidos 3.1 e CA-M num ambiente controlado, o pequeno volume disponível de cada extrato impossibilitou a avaliação da sua eficácia quando incorporados numa matriz alimentar.

#### 4.1.5 Extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake

Para analisar a atividade antimicrobiana dos extratos Olivo 20% Oleuropeína, Alecrim (1:4) e Shiitake 8% *Polysaccharides*, determinaram-se os valores de densidade ótica ao longo do tempo. No entanto, talvez devido à elevada concentração dos extratos, o registo desses valores não foi possível. Por esse motivo, colocaram-se os microrganismos em contacto com cada um dos extratos durante 24 h numa microplaca de 96 poços (em condições de incubação apropriadas) e após esse período, colocaram-se 3  $\mu\text{L}$  de cada poço em meio de cultura apropriado e observou-se a capacidade de crescimento de cada microrganismo. Os resultados das inibições podem ser consultados na Tabela 4.1.5.1.

Não ocorreu uma inibição geral para cada género de bactérias, ou seja, ocorreram inibições específicas entre cada extrato e cada bactéria. No caso das bactérias aeróbias, verificou-se que o extrato de Alecrim não apresentou qualquer tipo de atividade inibitória, apesar de que pode ter ocorrido redução da carga microbiana, nomeadamente de *Staph. aureus* e *E. coli*, sendo que não foi possível avaliar a diminuição de carga microbiana com o método utilizado. Por outro lado, verificou-se inibição do extrato Shiitake contra praticamente todas as bactérias aeróbias, como é o caso dos patogénicos *A. baumannii* e *Staph. aureus*, mas não contra *E. coli* e *S. Enteritidis* (Erdoğan Eliuz, 2021). Segundo dados encontrados na bibliografia, este extrato tem a capacidade de apresentar atividade antimicrobiana contra isolados de *E. coli* e *S. Enteritidis*, mas quando incorporado com outros elementos (Van Ba *et al.*, 2016). Em relação ao extrato de Oleuropeína, observou-se a inibição de apenas uma bactéria Gram-positiva (*Bacillus cereus*), apesar de, na literatura, estar reportada a maior capacidade de inibição deste extrato contra este grupo de bactérias (Casas-Sanchez *et al.*, 2007). Verificou-se também as inibições dos patogénicos *E. coli*, *P. fluorescens* e *A. baumannii*, sendo que no estudo de Dominciano *et al.* (2016), os autores demonstraram a capacidade antimicrobiana deste extrato contra isolados de *E. coli* e *S. Enteritidis*.

Relativamente aos patogénicos *C. sporogenes* e *C. perfringens* não se verificou capacidade inibitória por parte dos extratos em análise, sendo que a combinação com outros extratos naturais poderia facilitar a inibição. Um extrato de Alecrim combinado com um extrato de Tomilho apresentou capacidade de reduzir a carga microbiana de *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *Staph. aureus* (Andrade *et al.*, 2018).

Tabela 4. 1. 5. 1 - Resultados da inibição provocada pelos extratos de Oleuropeína, Alecrim e Shiitake contra diferentes microrganismos.

Microrganismo	Atividade antimicrobiana		
	Oleuropeína	Alecrim	Shiitake
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	-	-
<i>L. monocytogenes</i> 2542	-	-	+
<i>Staph. aureus</i> 6538	-	-	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis ESB008	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ESB029	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> NCTC 10406	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> ESB014	+	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ESB284	+	-	+
<i>Clostr. perfringens</i> 1.16	-	-	-
<i>Clostr. perfringens</i> 1.19	-	-	-
<i>Clostr. perfringens</i> 3	-	-	-
<i>Clostr. perfringens</i> 4	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> 1.22	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> 1.31	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> 1.34	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> 1.61	-	-	-
<i>Campylobacter</i> DFVD 1099	-	-	+
<i>Campylobacter</i> NCTC 11168	-	-	-
<i>Campylobacter</i> C3	-	-	+
<i>Campylobacter</i> CJ305	-	-	+
<i>Campylobacter</i> C21A	-	-	+
<i>Campylobacter</i> C9	-	+	+

Legenda: (+) Presença de inibição; (-) Ausência de inibição.

Em relação ao patogênico *Campylobacter*, apenas se verificou a inibição do isolado *Campylobacter* C9 pelo extrato de alecrim e dos patogênicos *Campylobacter* C3, *Campylobacter* C9, *Campylobacter* 21A, *Campylobacter* CJ305 e *Campylobacter* DFVD 1099 pelo extrato de Shiitake. No entanto, outros extratos de Alecrim têm demonstrado capacidade inibitória contra outras estirpes de *Campylobacter* spp. (Thanissery *et al.*, 2014).

A incorporação dos extratos em estudo com outros extratos naturais permitiria a exploração da sinergia entre extratos contra a proliferação de microrganismos. No entanto, a atuação individual de cada um dos extratos testados demonstrou que estes são promissores para serem incorporados numa matriz alimentar.

#### 4.1.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de Alecrim, Oleuropeína e Shiitake incorporados numa matriz alimentar cárnea

Para esta experiência, utilizaram-se *cocktails* com várias estirpes de quatro importantes bactérias – *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. e *E. coli*, todos com uma contagem inicial de  $10^9$  UFC/mL. Cada matriz foi inoculada de forma a se obterem contagens entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL e, por cada amostra contaminada, foi feita uma marinada com cada extrato e o respetivo controlo sem marinada. Os resultados da análise microbiana da carne não contaminada artificialmente estão apresentados na Tabela 4.1.6.1.

Tabela 4. 1. 6. 1 - Contagens obtidas em três réplicas realizadas de carne não contaminada artificialmente para diferentes microrganismos.

		Microrganismo			
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Contagem (log UFC/g)	1ª Réplica	<1,30	<1,30	<1,30	<1,30
	2ª Réplica	3,90	<1,30	<1,30	<1,30
	3ª Réplica	<1,30	<1,30	<1,30	<1,30

É possível verificar que a carne não estava contaminada com nenhum dos microrganismos testados, exceto para a segunda réplica, onde foram encontrados 3,90 log UFC/g de *E. coli*. A presença de *E. coli* na segunda réplica, apesar de se não se ter detetado nas restantes, não é um caso isolado, visto que é normalmente detetada em produtos de carne de frango comercial (Mitchell *et al.*, 2015; Monte *et al.*, 2017) .

Também se realizaram controlos da marinada, isto é, cada *cocktail* foi colocado em contacto com cada um dos compostos preparados e analisado após 24 h no frio, de forma a comparar o efeito da matriz cárnea. As reduções obtidas estão apresentadas na Tabela 4.1.6.2.

Tabela 4. 1. 6. 2 – Reduções dos diferentes microrganismos em contacto com os compostos utilizados, na ausência da matriz cárnea.

	Log N/N0		
	Oleuropeína	Alecrim	Shiitake
<i>Escherichia coli</i>	-7,63 ± 0,00	-3,77 ± 0,32	-3,81 ± 0,32
<i>Listeria monocytogenes</i>	-7,61 ± 0,00	-3,97 ± 0,98	-3,54 ± 0,67
<i>Salmonella</i> spp.	-7,53 ± 0,00	-3,64 ± 0,32	-3,57 ± 0,17
<i>Campylobacter</i> spp.	-7,19 ± 0,00	-4,02 ± 0,82	-4,44 ± 0,08

O extrato de Oleuropeína demonstrou capacidade inibitória contra todos os *cocktails* de patogénicos (Tabela 4.1.6.2), com contagens inferiores ao limite de deteção da técnica utilizada

(<1,30 log UFC/mL) e, como tal, com reduções superiores a 7 ciclos logarítmicos. No caso do extrato de Alecrim ocorreram elevadas reduções em relações aos controlos realizados:  $3,77 \pm 0,32$  ciclos logarítmicos para *E. coli*,  $3,97 \pm 0,98$  ciclos logarítmicos para *L. monocytogenes*,  $3,64 \pm 0,32$  ciclos logarítmicos para *Salmonella* spp. e  $4,02 \pm 0,82$  ciclos logarítmicos para *Campylobacter* spp. Adicionalmente, para o extrato Shiitake verificaram-se reduções de  $3,81 \pm 0,32$  ciclos logarítmicos para *E. coli*,  $3,54 \pm 0,67$  ciclos logarítmicos para *L. monocytogenes*,  $3,57 \pm 0,17$  ciclos logarítmicos para *Salmonella* spp. e  $4,44 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos para *Campylobacter* spp.

Os resultados relativos à análise microbiológica de cada microrganismo na matriz sem marinada (controlo) ou marinada numa solução com cada extrato, estão apresentados nas Figuras 4.1.6.1 a 4.1.6.4.

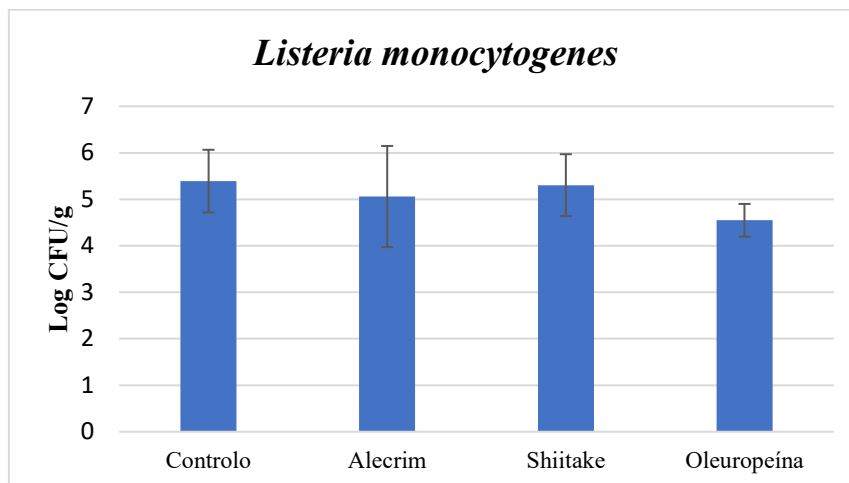


Figura 4. 1. 6. 1 - Contagens de *L. monocytogenes* na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.

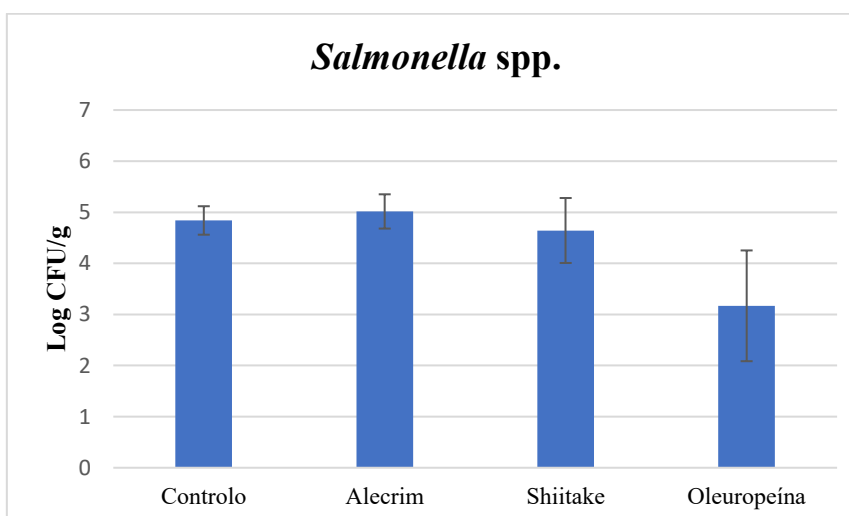


Figura 4. 1. 6. 2 - Contagens de *Salmonella* spp. na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.

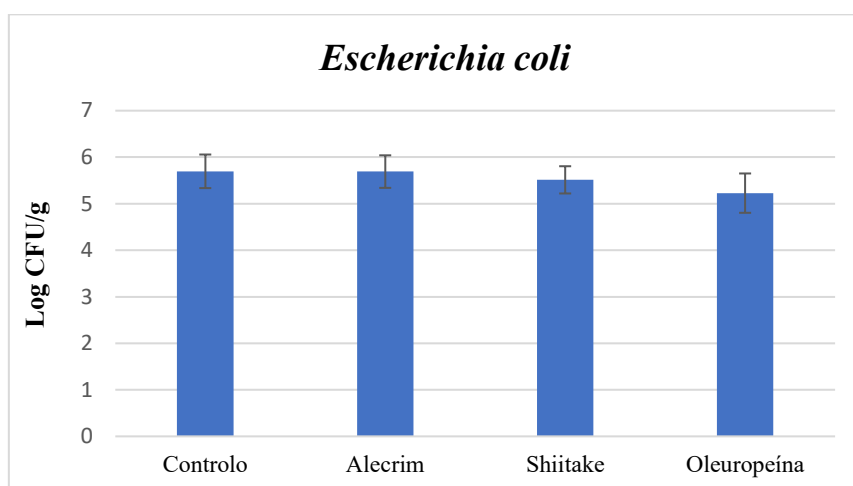


Figura 4. 1. 6. 3 - Contagens de *Escherichia coli* na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.

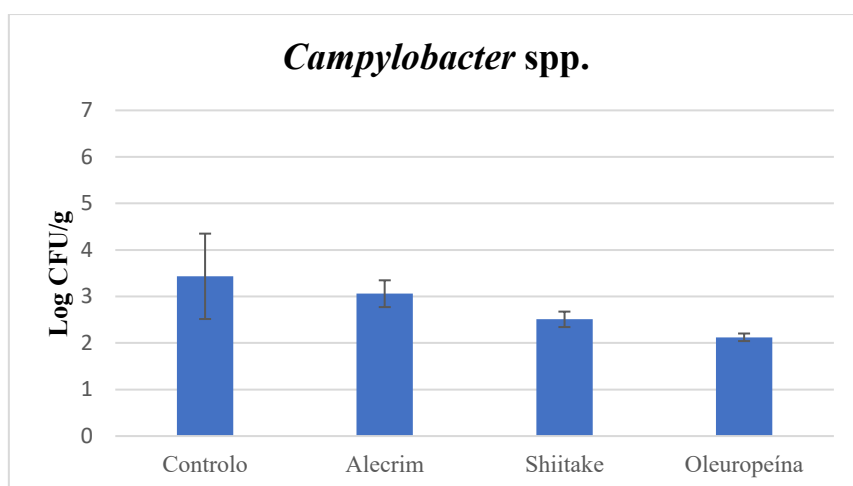


Figura 4. 1. 6. 4 - Contagens de *Campylobacter* spp. na matriz de frango não tratada (Controlo) e tratada com cada um dos extratos testados.

É possível observar que tanto para *L. monocytogenes* (Figura 4.1.6.1) como para *Salmonella* spp. (Figura 4.1.6.2) houve uma redução de cerca de 1 ciclo logarítmico na carne marinada com a solução de Oleuropeína em relação ao controlo, no entanto, essas reduções não foram significativamente diferentes ( $P=0,537$  e  $P=0,477$ , respetivamente), devido aos elevados desvios entre as réplicas. As reduções obtidas para *E. coli* (Figura 4.1.6.3) foram mínimas para todas as condições, sem diferenças significativas encontradas ( $P=0,395$ ). Já para *Campylobacter* spp. (Figura 4.1.6.4), observaram-se reduções superiores a 1 ciclo logarítmico na carne marinada com a solução de Oleuropeína e Shiitake, significativamente diferentes em relação ao controlo ( $P=0,071$  e  $P=0,033$ , respetivamente). Apesar de promissores, estes extratos não permitiram uma grande redução dos patogénicos testados, uma vez que os mesmos estavam protegidos pela matriz cárnica. Esta resiliência dos microrganismos pode dever-se às

propriedades da própria matriz, que confere nutrientes e um ambiente não-nocivo para a sobrevivência dos patogênicos (Burgain *et al.*, 2014). A capacidade de sobrevivência de *Salmonella* spp. numa matriz alimentar é reportada na literatura, onde é sugerida a interação entre a membrana externa do patogênico e péptidos provenientes de uma matriz alimentar láctica, demonstrando elevada afinidade e estabilidade de ligação, o que enaltece a função protetora da matriz (Godínez-Oviedo *et al.*, 2021). Tais interações podem ocorrer entre o patogênico e constituintes da matriz alimentar, como por exemplo, cálcio, magnésio, glutamato, entre outros, o que causa um efeito protetor em relação ao patogênico, como é o caso de *E. coli* (Li *et al.*, 2016). A possibilidade da microbiota, composição e nível de processamento da matriz influenciarem a sobrevivência microbiana é descrito por Ziegler *et al.* (2019), onde o patogênico *L. monocytogenes* atingiu um potencial máximo de crescimento de 2.80 log UFC/g numa matriz vegetal. O patogênico *Campylobacter* spp. tem elevada presença em matrizes cárneas, tendo sido detetada em 76% de amostras de um total de 361 produtos de frango, com contagens médias de 0,82 log UFC/g (Guyard-Nicodème *et al.*, 2015). Recentemente têm sido utilizados extratos naturais que apresentam atividade antimicrobiana contra este patogênico, como é o caso da bacaleína, um extrato de planta, que inibe a concentrações de 32 e 64 µg/mL para *C. jejuni* e *C. coli*, respetivamente (Gahamanyi *et al.*, 2020). Tendo em conta os resultados obtidos, as reduções superiores a 1 ciclo logarítmico na carne marinada com a solução de Oleuropeína e Shiitake poderiam garantir a eliminação total deste patogênico em produtos de carne de frango. De qualquer forma, a redução logarítmica do patogênico *Campylobacter* spp. obtida no presente estudo com os extratos de Oleuropeína e Shiitake representa uma enorme vantagem para a indústria alimentar.

A utilização dos três extratos em simultâneo poderia resultar numa maior capacidade de inibição para os *cocktails* dos diferentes patogênicos, levando a reduções logarítmicas superiores às observadas, pelo que seria interessante testar a sinergia destes compostos e avaliar a eficácia antimicrobiana dos mesmos.

## **5. Conclusões gerais**

A presença de extratos naturais em alimentos é uma alternativa à utilização de outros compostos atualmente utilizadas pela indústria alimentar. Relativamente à capacidade antimicrobiana das microalgas analisadas verificou-se uma redução dos valores de densidade ótica correspondentes à presença das mesmas com os diferentes patogénicos, apesar de não se ter observado uma inibição total, pelo que seriam necessários novos estudos de forma a analisar a capacidade antimicrobiana destes extratos. De todos os péptidos testados, apenas os péptidos 3.1 e CA-M inibiram todos os patogénicos em estudo demonstrando elevada capacidade antimicrobiana, sendo que o volume disponível impossibilitou a inoculação numa matriz alimentar cárnea. Adicionalmente, os extratos de Alecrim, Oleuropeína e Shiitake demonstraram resultados promissores, reduzindo a carga microbiana dos patogénicos, tanto em meio de cultura como quando usados para marinar uma matriz alimentar cárnea, o que demonstrou o potencial antimicrobiana destes extratos.

Esta dissertação demonstrou a capacidade antimicrobiana de extratos naturais contra patogénicos da indústria alimentar, acentuando a importância de investigar e utilizar novas alternativas de forma a combater a presença de microrganismos em matrizes alimentares.

## 6. Trabalho Futuro

Como referido anteriormente, a quantidade insuficiente de extratos dos péptidos e das microalgas *Chlorococcum* spp., *Chlorella* spp. e *Nannochloropsis* spp. impossibilitou a sua inoculação numa matriz alimentar, pelo que seria interessante verificar se estes são capazes de manter a sua atividade antimicrobiana com a adição de outros fatores. Além disso, seria interessante determinar novas curvas de crescimento bacteriano com a determinação das UFC/mL ao longo do tempo, possibilitando uma avaliação mais precisa do comportamento de cada microrganismo.

A repetição dos ensaios das concentrações mínimas inibitórias para os péptidos 3-1 e CA-M seria necessária de forma a confirmar os resultados obtidos, e ainda, se possível, alargar os ensaios a um maior número de microrganismos.

Por fim, dever-se-ia explorar a inoculação noutras matrizes alimentares, de forma a verificar se os extratos são capazes de manter a sua capacidade em reduzir a carga microbiana das diferentes bactérias utilizadas, bem como testar o sinergismo entre os extratos utilizados, o que poderia resultar em reduções de carga microbiana superiores às observadas. Além disso, a realização de análises sensoriais permitiria avaliar se, após a adição de extratos naturais, estes alterariam as qualidades organoléticas do produto.

## 7. Bibliografía

- Alizadeh-Sani, M., Hamishehkar, H., Khezerlou, A., Azizi-Lalabadi, M., Azadi, Y., Nattagh-Eshtivani, E., Fasihi, M., Ghavami, A., Aynehchi, A., & Ehsani, A. (2018). Bioemulsifiers derived from microorganisms: Applications in the drug and food industry. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 8(2), 191.
- Álvarez-Gómez, F., Korbee, N., Casas-Arrojo, V., Abdala-Díaz, R. T., & Figueroa, F. L. (2019). UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts. *Molecules*, 24(2), 341.
- Amisano, G., Fornasero, S., Migliaretti, G., Caramello, S., Tarasco, V., & Savino, F. (2011). Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. *New Microbiologica*, 34(1), 45-51.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Bonito, M. C. C., Saraiva, M., & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Lwt*, 92, 497-508.
- Andrews, K. T., Fisher, G., & Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 95-111.
- Aravantinou, A. F., & Manariotis, I. D. (2016). Effect of operating conditions on *Chlorococcum* sp. growth and lipid production. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(1), 1217-1223.
- Asri, R. M., Yahya, H., Rehan, M. M., & Yahya, H. N. (2019). Antibacterial properties of ethanolic extract of mushrooms sold in malaysian local market. *East Afr J Agri Life Sci*, 2, 516-522.
- Balaban, N., & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*, 61(1), 1-10.
- Beuchat, L. R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R. P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H. M., & Ter Kuile, B. H. (2013). Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 76(1), 150-172.
- Bhatia, A., & Zahoor, S. (2007). Staphylococcus aureus enterotoxins: a review. *J Clin Diag Res*, 3(1), 188-197.
- Bhunja, A. K., Bisha, B., Gehring, A. G., & Brehm-Stecher, B. F. (2020). Advances in Foodborne Pathogen Analysis. In: Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Blackwell, J. R., Cox, E. J., & Gilmour, D. J. (1991). The morphology and taxonomy of *Chlorococcum submarinum* (Chlorococcales) isolated from a tidal rockpool. *British phycological journal*, 26(2), 133-139.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A., Cailliez-Grimal, C., & Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in colloid and interface science*, 213, 21-35.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food chemistry*, 216, 342-346.
- Caly, D. L., Chevalier, M., Flahaut, C., Cudennec, B., Al Atya, A. K., Chataigné, G., d'Inca, R., Auclair, E., & Drider, D. (2017). The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity. *International journal of antimicrobial agents*, 49(3), 282-289.
- Cao, Y., Yu, R. Q., Liu, Y., Zhou, H. X., Song, L. L., Cao, Y., & Qiao, D. R. (2010). Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Current microbiology*, 61(3), 169-175.
- Casas-Sanchez, J., Alsina, M. A., Herrlein, M. K., & Mestres, C. (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285(12), 1351-1360.
- Chi, N. T. L., Duc, P. A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 184-188.

- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2014). Unacylated tridecaptin A1 acts as an effective sensitiser of Gram-negative bacteria to other antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*, 44(6), 493-499.
- Coico, R. (2006). Gram staining. *Current protocols in microbiology*(1), A. 3C. 1-A. 3C. 2.
- Crump, J. A. (2019). Progress in typhoid fever epidemiology. *Clinical infectious diseases*, 68(Supplement\_1), S4-S9.
- D'Aoust, J.-Y., & Maurer, J. (2007). Salmonella species. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 187-236). American Society of Microbiology.
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101750.
- Dahmen-Ben Moussa, I., Masmoudi, M. A., Choura, S., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2021). Extraction optimization using response surface methodology and evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of polyphenols in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-14.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N.-E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26(5), 713-719.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Dominciano, L. C., Lee, S. H., Santello, J. M., De Martinis, E. C., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. (2016). Effect of oleuropein and peracetic acid on suspended cells and mono-species biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Integr Food Nutr Metab*, 3, 314-317.
- Dougan, G., & Baker, S. (2014). Salmonella enterica serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annual review of microbiology*, 68, 317-336.
- EFSA. (2018). Listeria infections increase in vulnerable groups. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180124>
- Elshobary, M. E., El-Shenody, R. A., Ashour, M., Zayed, H. M., & Qi, X. (2020). Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*. *Food Bioscience*, 35, 100567.
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293.
- Erdoğan Eliuz, E. A. (2021). Antibacterial activity and antibacterial mechanism of ethanol extracts of *Lentinula edodes* (Shiitake) and *Agaricus bisporus* (button mushroom). *International Journal of Environmental Health Research*, 1-14.
- Erickson, M. C., & Doyle, M. P. (2007). Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 70(10), 2426-2449.
- Europeia, C. (2015). Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. In (pp. 1): Jornal Oficial da União Europeia.
- Fitzgerald, C. (2015). *Campylobacter*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 289-298.
- Gahamanyi, N., Song, D.-G., Cha, K. H., Yoon, K.-Y., Mboera, L. E., Matee, M. I., Mutangana, D., Amachawadi, R. G., Komba, E. V., & Pan, C.-H. (2020). Susceptibility of *Campylobacter* strains to selected natural products and frontline antibiotics. *Antibiotics*, 9(11), 790.
- Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research*, 135(5), 581.
- Godínez-Oviedo, A., Cuellar-Núñez, M., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., & Hernández-Iturriaga, M. (2021). A dynamic and integrated in vitro/ex vivo gastrointestinal model for the evaluation of the probability and severity of infection in humans by *Salmonella* spp. vehiculated in different matrices. *Food microbiology*, 95, 103671.

- Gray, M. L., & Killinger, A. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews*, 30(2), 309.
- Greig, J., & Ravel, A. (2009). Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International journal of food microbiology*, 130(2), 77-87.
- Guleri, S., & Tiwari, A. (2020). Algae and Ageing. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 267-293). Springer.
- Gupta, P., Banerjee, A., Castillo, A., & Bandopadhyay, R. (2021). Novel phenolic compound from Southern Ocean microalgae *Chlorella* sp. PR-1 and its antibacterial activity. *Gayana Botanica*, 78(1), 29-37.
- Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M., & Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management.
- Guyard-Nicodème, M., Rivoal, K., Houard, E., Rose, V., Quesne, S., Mourand, G., Rouxel, S., Kempf, I., Guillier, L., & Gauchard, F. (2015). Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *International journal of food microbiology*, 203, 8-14.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(1), 178-185.
- Hao, Y., Yang, N., Wang, X., Teng, D., Mao, R., Wang, X., Li, Z., & Wang, J. (2017). Killing of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* and neutralization of lipopolysaccharide by 17-residue bovine lactoferricins: improved activity of Trp/Ala-containing molecules. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Harrigan, W. F., & Park, R. (1991). *Making safe food*. Elsevier.
- Jun, S., Si, F., Pugatch, R., & Scott, M. (2018). Fundamental principles in bacterial physiology—history, recent progress, and the future with focus on cell size control: a review. *Reports on Progress in Physics*, 81(5), 056601.
- Kandler, O., & König, H. (1998). Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(4), 305-308.
- Kasote, D. M., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2019). Leaf Disc Assays for Rapid Measurement of Antioxidant Activity. *Scientific Reports*, 9(1), 1884. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38036-x>
- Keerthirathne, T. P., Ross, K., Fallowfield, H., & Whiley, H. (2016). A review of temperature, pH, and other factors that influence the survival of *Salmonella* in mayonnaise and other raw egg products. *Pathogens*, 5(4), 63.
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *Lwt*, 84, 47-57.
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., & Show, P.-L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16-24.
- Li, H., Garcia-Hernandez, R., Driedger, D., McMullen, L. M., & Gänzle, M. G. (2016). Effect of the food matrix and food constituents on pressure resistance of *Escherichia coli*.
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Focus: drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? *The Yale journal of biology and medicine*, 90(1), 135.
- Lopez, M. E., Gontijo, M. T., Boggione, D. M., Albino, L. A., Batalha, L. S., & Mendonça, R. C. (2018). Microbiological contamination in foods and beverages: Consequences and alternatives in the era of microbial resistance. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 49-84). Elsevier.
- Luning, P. A., Jacxsens, L., Rovira, J., Osés, S. M., Uyttendaele, M., & Marcelis, W. J. (2011). A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. *Food Control*, 22(3-4), 555-565.
- Margolin, W. (2014). Binary Fission in Bacteria. *eLS*.

- Mistry, A. N., Upendar, G., Singh, S., Chakrabarty, J., Bandyopadhyay, G., Ghanta, K. C., & Dutta, S. (2020). Sequestration of CO<sub>2</sub> using microorganisms and evaluation of their potential to synthesize biomolecules. *Separation Science and Technology*, 55(2), 332-345.
- Mitchell, N. M., Johnson, J. R., Johnston, B., Curtiss III, R., & Mellata, M. (2015). Zoonotic potential of Escherichia coli isolates from retail chicken meat products and eggs. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 1177-1187.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.
- Moelling, K. (2020). Viruses more friends than foes. *Electroanalysis*, 32(4), 669-673.
- Monte, D. F., Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvão, J. A., Franco, B. D., Lincopan, N., & Landgraf, M. (2017). Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant Escherichia coli strains carrying mcr-1 genes in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02718-02716.
- Morya, S., Amoah, A. E. D. D., & Snaebjornsson, S. O. (2020). Food poisoning hazards and their consequences over food safety. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 383-400). Elsevier.
- Motarjemi, Y., & Lelieveld, H. (2013). *Food safety management: a practical guide for the food industry*. Academic Press.
- Naghmouchi, K., Le Lay, C., Baah, J., & Drider, D. (2012). Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of Pseudomonas fluorescens and antibiotic-resistant variants. *Research in microbiology*, 163(2), 101-108.
- Noor, R., Islam, Z., Munshi, S. K., & Rahman, F. (2013). Influence of temperature on Escherichia coli growth in different culture media. *J Pure Appl Microbiol*, 7(2), 899-904.
- Nwoba, E. G., Ogbonna, C. N., Ishika, T., & Vadiveloo, A. (2020). Microalgal pigments: a source of natural food colors. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 81-123). Springer.
- Nyhan, L., Begley, M., Mutel, A., Qu, Y., Johnson, N., & Callanan, M. (2018). Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on Listeria growth in media and complex food matrices. *Food microbiology*, 74, 75-85.
- Oh, E., McMullen, L., & Jeon, B. (2015). Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in Campylobacter jejuni under aerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6, 295.
- Patil, N. P., Le, V., Sligar, A. D., Mei, L., Chavarria, D., Yang, E. Y., & Baker, A. B. (2018). Algal polysaccharides as therapeutic agents for atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 153. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214344/>
- Pelczar, M. J. a. P., . Rita M. (2020). Microbiology. Encyclopedia Britannica.
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691.
- Rahman, K. M. (2020). Food and high value products from microalgae: market opportunities and challenges. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 3-27). Springer.
- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S., & Rahiman, A. K. (2017). In vitro antioxidant and antidiabetic activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(6), 943-957. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1758-2>
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., & van Vliet, A. H. (2010). Biofilm formation by Campylobacter jejuni is increased under aerobic conditions. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), 2122-2128.
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC press.
- Sheppard, S. K., & Maiden, M. C. (2015). The evolution of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a018119.
- Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. (2017). Staphylococcus aureus em alimentos. *DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*, 4(4), 15-31.

- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.
- Tajkarimi, M. (2007). Salmonella spp. *California Department of Food and Agriculture, April*, 4.
- Talon, R., & Zagorec, M. (2017). Beneficial Microorganisms for Food Manufacturing—Fermented and Biopreserved Foods and Beverages. In: Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Thanissery, R., Kathariou, S., & Smith, D. (2014). Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit Salmonella and Campylobacter in vitro. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(2), 221-227.
- Tranter, H., Tassou, S. C., & Nychas, G. (1993). The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 253-259.
- Tsai, P.-J., Tsai, T.-H., & Ho, S.-C. (2007). In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of Streptococcus sobrinus. *Food chemistry*, 105(1), 311-316.
- Uma, R., Sivasubramanian, V., & Niranjali Devaraj, S. (2011). Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, Desmococcus olivaceus, Chlorococcum humicola and Chlorella vulgaris. *J Algal Biomass Utln*, 2(3), 74-81.
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V., & Singh, V. (2017). Control of campylobacter in poultry industry from farm to poultry processing unit: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4), 659-665.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J. M., García-Gimeno, R., & Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 186-194.
- Van Ba, H., Seo, H.-W., Cho, S.-H., Kim, Y.-S., Kim, J.-H., Ham, J.-S., Park, B. Y., & Nam, S. P. (2016). Antioxidant and anti-foodborne bacteria activities of shiitake by-product extract in fermented sausages. *Food Control*, 70, 201-209.
- van Dijk, A., Herrebout, M., Tersteeg-Zijderfeld, M. H., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Bleumink-Pluym, N., Jansman, A. J., Veldhuizen, E. J., & Haagsman, H. P. (2012). Campylobacter jejuni is highly susceptible to killing by chicken host defense peptide cathelicidin-2 and suppresses intestinal cathelicidin-2 expression in young broilers. *Veterinary microbiology*, 160(3-4), 347-354.
- Viegas, S., Brazão, R., Fernandes, P., Dias, M. d. G., & Oliveira, L. (2017). Guia para o estabelecimento de critérios microbiológicos em géneros alimentícios.
- Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P.-P., Tellis, P. A., & Ziebell, K. (2010). Food reservoir for Escherichia coli causing urinary tract infections. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 88.
- Visser, D. F., Hennessy, F., Rashamuse, J., Pletschke, B., & Brady, D. (2011). Stabilization of Escherichia coli uridine phosphorylase by evolution and immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(3-4), 279-285.
- Wiking, L., Frost, M., Larsen, L., & Nielsen, J. (2002). Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft*, 57(4), 190-194.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 660-703.
- Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., & Guldemann, C. (2019). Growth potential of Listeria monocytogenes in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International journal of food microbiology*, 296, 83-92.

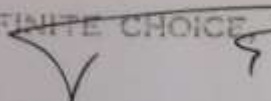
# ANEXOS

**ANEXO I – Condições de extração dos extratos Oleuropeína, Alecrim e Shiitake.**

**OLIVO 20% OLEUROPEINA**  
**CERTIFICATO DI ANALISI**

Cadmio	< 1 ppm
Mercurio	< 0.1 ppm
Pesticidi	Conforme al Reg. 2008/839 /CE
Idrocarburi policiclici aromatici	Conforme al Reg. UE 1933/2015/CE
Aflatossine	Aflatossina B1 : < 5 ppb Aflatossine totali (B1,B2,G1,G2): < 10 ppb
Carica batterica (TAMC)	<10000 cfu/g
Lieviti e Muffe(TYMC)	<100 cfu/g
Patogeni	Salmonella: assente in 25 g Escherichia coli: assente in 1 g
Enterobacteriaceae	<= 100 cfu/g
Conservazione	In luogo fresco, asciutto e ventilato, al riparo dalla luce, nei contenitori originali, ben chiusi, o in contenitori di plastica inerte.
Note	Prodotto non contenente OGM (Reg. 1829/2003 - 1830/2003 CE). Prodotto non irradiato. BSE/TSE FREE –
GLUTEN FREE	Si
Certificato Kosher	No
Certificato Halal	No

Data:  
**06/04/2020**

INFINITE CHOICE S.p.A.  
  
 TECHNICAL DEPARTMENT


 <b>Infinite Choice</b> <small>NOBLE SOURCE WITH NOBLE QUALITY</small>	IC Internal Code: 107461
	Data as received from our supplier
	Page 2/2

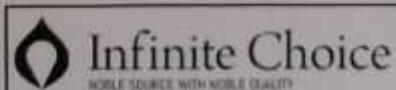
Figura I.I – Condições de extração do extrato de Oleuropeína (1).

OLIVO 20% OLEUROPEINA  
CERTIFICATO DI ANALISI

Lotto	NUT/20/0674
Data di produzione	25/03/2020
Data di scadenza	31/03/2023
Nome prodotto	Olivo 20% Oleuropeina
Nome botanico	Olea europaea L.
Famiglia botanica	Oleaceae
Numero CAS	84012-27-1
Solvente d'estrazione	EtanoLo/ Acqua
Rapporto D/E	10/12:1
Eccipienti	Maltodestina
Sostanze ausiliarie	<= 0.5% silice colloidale amida
Tipo di preparazione utilizzata	Estratto secco
Parte della pianta usata	Foglia
Sito di produzione	Italia
<b>DESCRIZIONE</b>	<b>RISULTATO</b>
Aspetto	Polvere fine
Colore	Marrone/ Marrone-verdastro
Odore	Caratteristico
Sapore	Caratteristico
Identificazione	TLC positiva
Titolo: oleuropeina	20.11% metodo HPLC
Granulometria	Conforme
Densità T	Conforme
Perdita all'essiccamento	3.8%
Metalli pesanti	< 10 ppm
Piombo	< 3 ppm

Data:  
06/04/2020

INFINITE CHOICE S.p.A.  
TECHNICAL DEPARTMENT



IC Internal Code: 107461  
Data as received from our supplier  
Page 1/2

Figura I.II – Condições de extração do extrato de Oleuropeína (2).

ROSEMARY 1/4  
CERTIFICATE OF ANALYSIS



Batch	NUT/20/1428
Manufacture date	13/07/2020
Expiry date	31/07/2023
Product name	Rosemary 1:4
Botanical name	Rosmarinus officinalis L.
Botanical family	Lamiaceae
Can number	84604-14-8
Extraction solvent	Water/Ethanol
E:D ratio	1:4
Excipients	Maltodextrin
Auxiliary substances	<=0.5 colloidal anhydrous silica
Preparation Type	Dry extract
Part of plant used	Leaf
Origin	Italy
<b>DESCRIPTION</b>	<b>RESULT</b>
Appearance	Fine powder
Color	Beuno
Odor	Caratheristic
Taste	Caratheristic
Identification	TLC
Particle size	Not less than 90% passes by the sieven: 500
Density	0.5 g/ml
Humidity	3.2%
Heavy metals	Complies
Lead	<3ppm
Cadmium	<1 ppm

Date:  
01/10/2020

INFINITE CHOICE, LDA.  
TECHNICAL DEPARTMENT


 <b>Infinite Choice</b> <small>NOBLE SOURCE WITH NOBLE QUALITY</small>	IC Internal Code: 107161
	Data as received from our supplier
	Page 1/2

Figura I.III – Condições de extração do extrato de Alecrim (1).

ROSEMARY 1/4  
CERTIFICATE OF ANALYSIS



Mercury	<0.1 ppm
Residual solvents	Complies to Dir. 2009/32/CE
Pesticides	Complies to Reg. 2008/839/CE
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Complies to Reg. UE 1933/2015
Aflatoxins	Aflatoxin B1: <5 ppb Total Aflatoxins (B1,B2,G1,G2):< 10 ppb
Bacterial count (TAMC)	< 20000 c.f.u./g.
Yeast and Moulds (TYMC)	< 200 c.f.u./g
Pathogens	Salmonella : absent in 25 g. Escherichia Coli: absent in 1 g.
Enterobacteriaceae	<100 ufc/g
Storage	In a cool, dry and ventilated place, away from light, in the original containers, well closed, or in the inert plastic containers.
Note	GMO FREE (Reg. 1829/2003 - 1830/2003 EC). Non irradiated. - BSE/TSE FREE - Melamin conform to Reg. Ue 594/2012. This product does not contain food allergens (Annex II of the Reg. 1169/2011/EC).
GLUTEN FREE	Yes
Kosher identificatio	No
Halla identification	No
Vegan food	Yes
Organic certification	No
Food	Yes

Date:  
01/10/2020

INFINITE CHOICE, L.D.A.  
TECHNICAL DEPARTMENT


 <b>Infinite Choice</b> <small>NOBLE SOURCE WITH NOBLE QUALITY</small>	IC Internal Code: 107161
	Data as received from our supplier
	Page 2/2

Figura I.IV – Condições de extração do extrato de Alecrim (2).

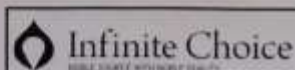
SHIITAKE 8% POLISACCARIDI  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Batch	NUT/365/0428
Production date	04/2020
Expiry date	30/04/2023
Product name	Shiitake 8% Polysaccharides
Botanical name	Lentinula edodes
Botanical family	Marasmiaceae (ex Omphalotaceae)
Extraction solvent	Water
E/D Ratio	1:10
Excipients	Maltodextrin (derived from maize)
Preparation type	Dry extract
Part of plant used	Sporophore
Origin	China
<b>DESCRIPTION</b>	<b>RESULT</b>
Appearance	Powder
Color	Brown
Odor	Characteristic
Taste	Characteristic
Assay: Polysaccharides	8.15% (met. HPLC)
Particle size	>= 90% through 80 mesh
Preservatives	absent
Loss on drying	3.9%
Heavy Metals	<= 10 ppm Pb < 3 ppm, Cd < 1 ppm, Hg < 0.1 ppm, As < 3 ppm
Residual solvents	Complies to Directive 2009/32/EC
Pesticides	Complies to Reg. 2008/839 /CE
Aflatoxins	Aflatoxin B1: <5 ppb Total aflatoxins(B1,B2,G1,G2): <10 ppb
Bacterial count (TAMC)	Complies
Yeast and Moulds (TYMC)	Complies
Pathogens	Salmonella: absent in 25 g Escherichia coli: absent in 1 g
Storage	In a cool, dry and ventilated place, away from light, in the original containers, well closed, or in the inert plastic containers
GLUTEN FREE	Yes
Kosher certification	No
Halal certification	No
Organic certification	No
Food	Yes

Date:  
24/08/2020

INFINITE CHOICE, L.D.A.

TECHNICAL DEPARTMENT



IC Internal Code: 107189  
Data as received from our supplier  
Page 1/1

Figura I.V – Condições de extração do extrato de Shiitake.

**ANEXO II – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogênicos para extratos de *Chlorella smooth* e *Chlorococcum*, a pressões de 500, 420, 300 e 100 MPa e não sujeitos a pressão.**

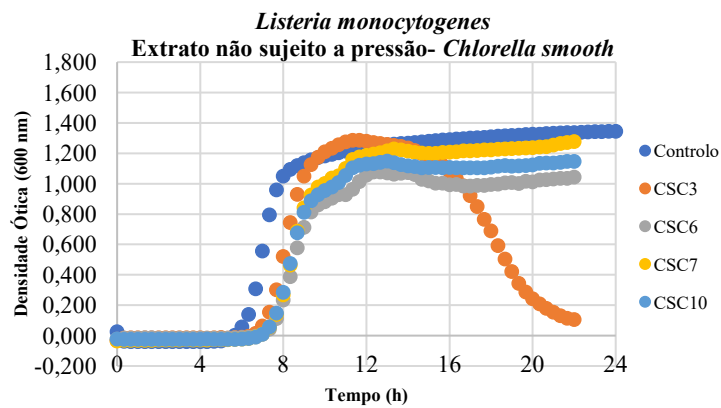


Figura II.I - Densidade ótica em função do tempo de *Listeria monocytogenes* para o extratos de *Chlorella smooth* não sujeitos a pressão.

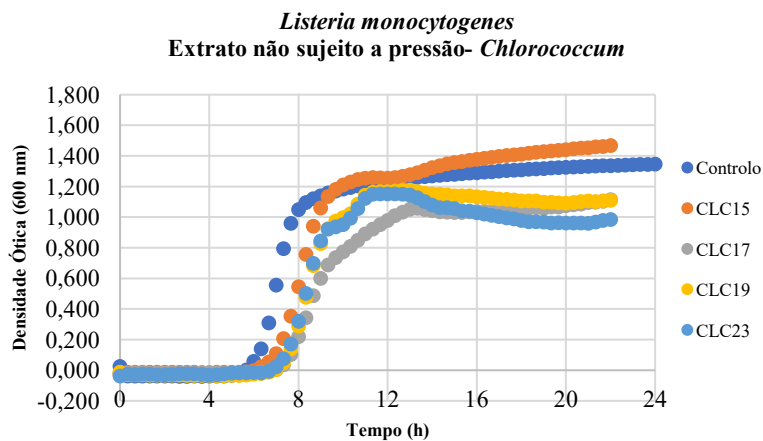


Figura II.II - Densidade ótica em função do tempo de *Listeria monocytogenes* para o extratos de *Chlorococcum* não sujeitos a pressão.

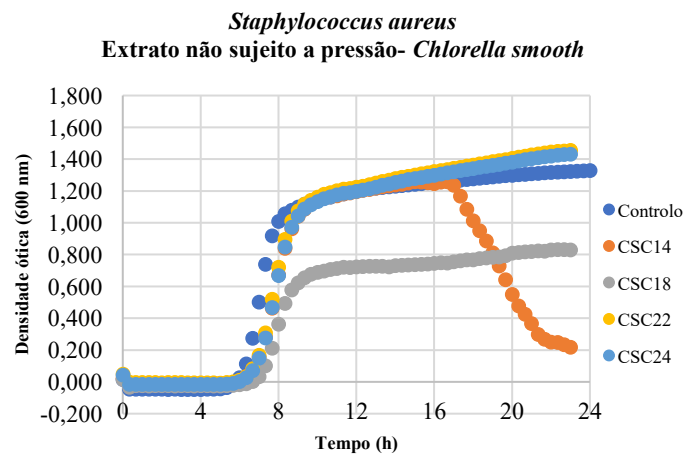


Figura II.III - Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para o extratos de *Chlorella smooth* não sujeitos a pressão.

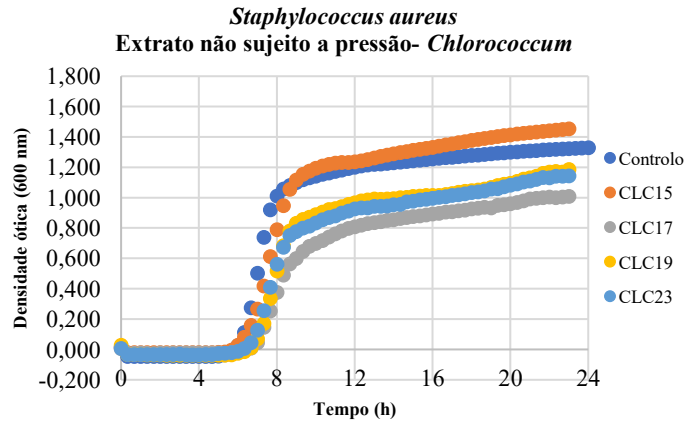


Figura II.IV – Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para o extratos de *Chlorococcum* não sujeitos a pressão.

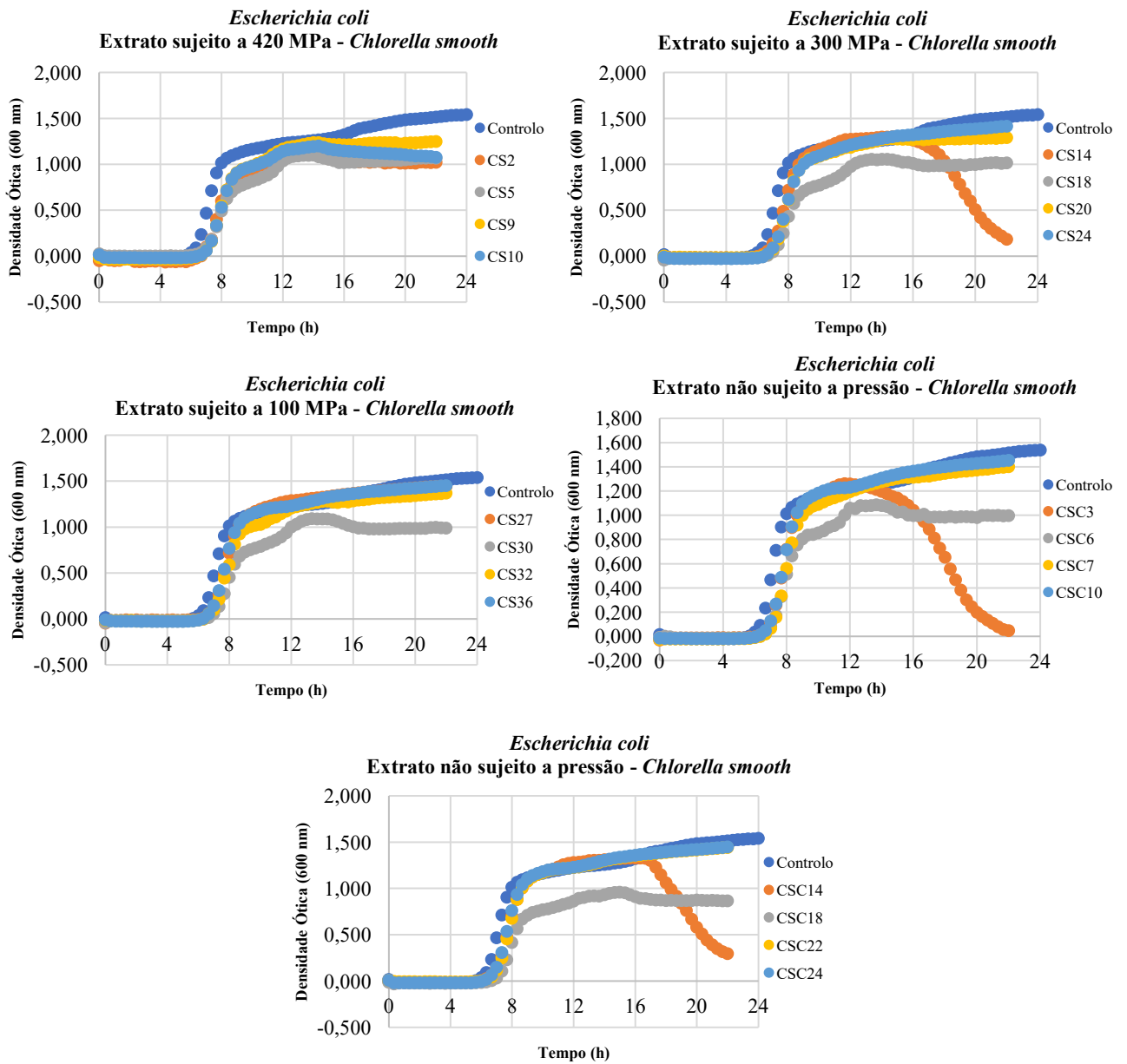


Figura II.V - Densidade ótica em função do tempo de *Escherichia coli* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

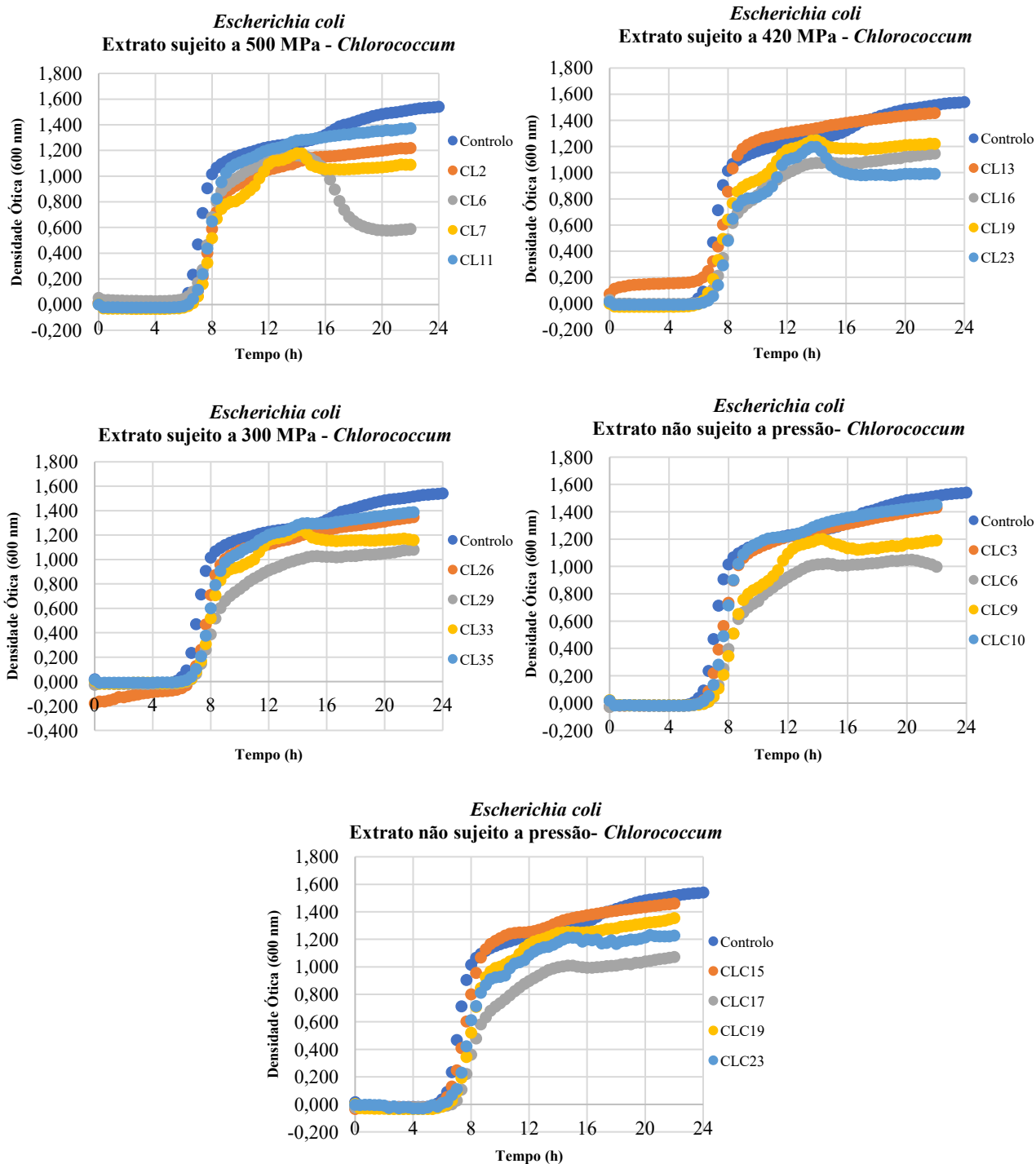


Figura II.VI - Densidade ótica em função do tempo de *Escherichia coli* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

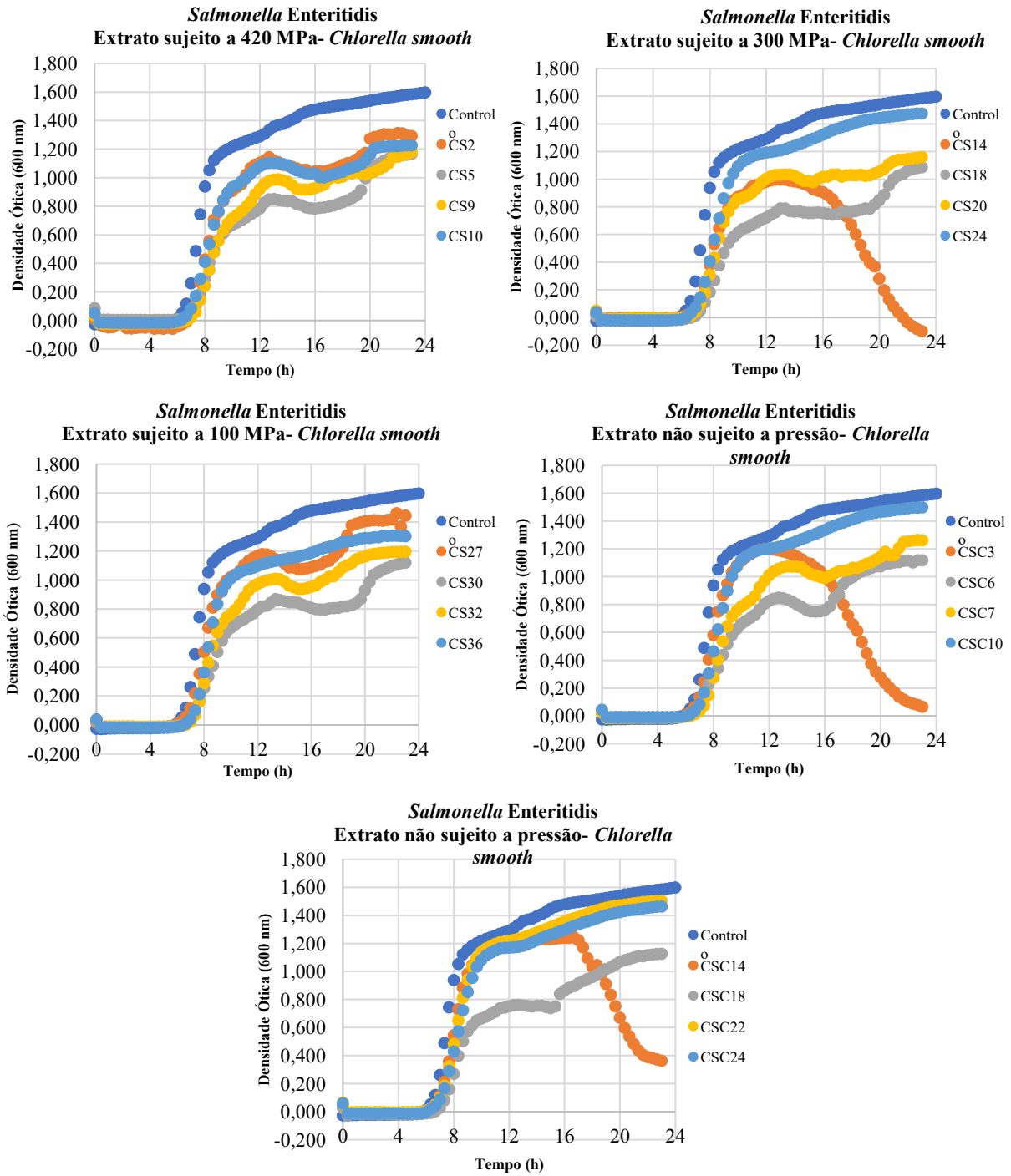


Figura II.VII - Densidade ótica em função do tempo de *Salmonella Enteritidis* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

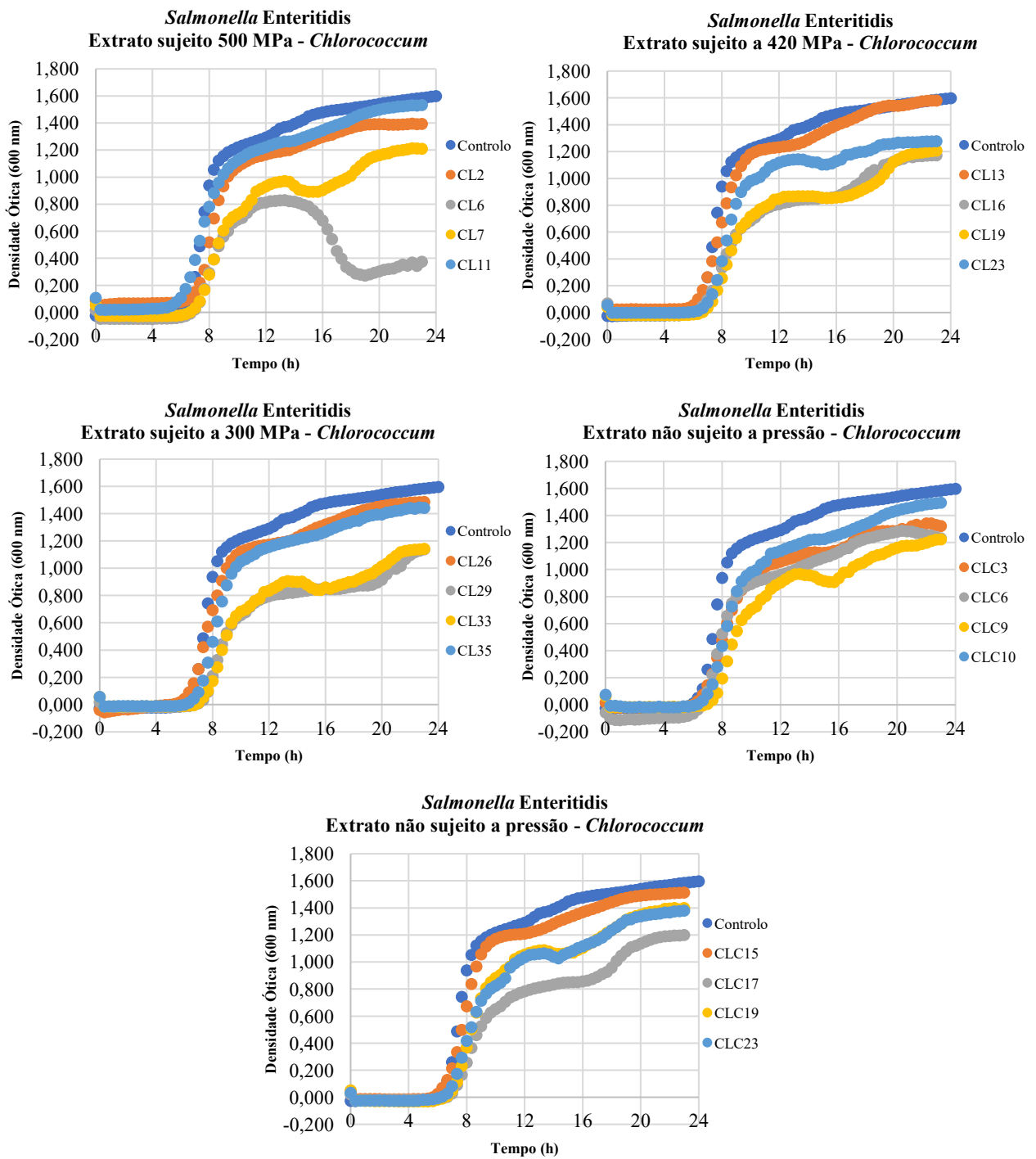


Figura II.VIII - Densidade ótica em função do tempo de *Salmonella Enteritidis* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

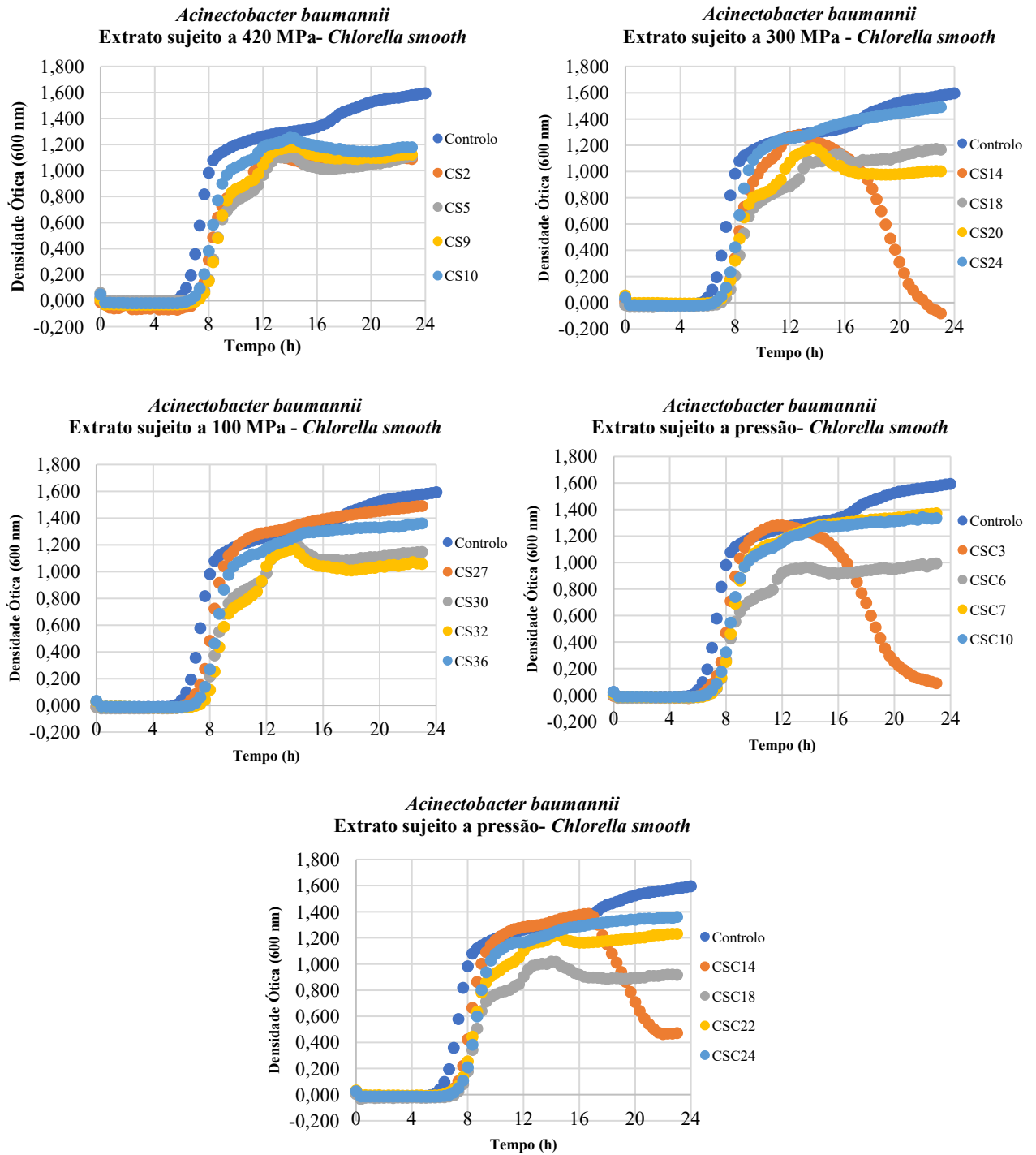


Figura II.IX - Densidade ótica em função do tempo de *Acinetobacter baumannii* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

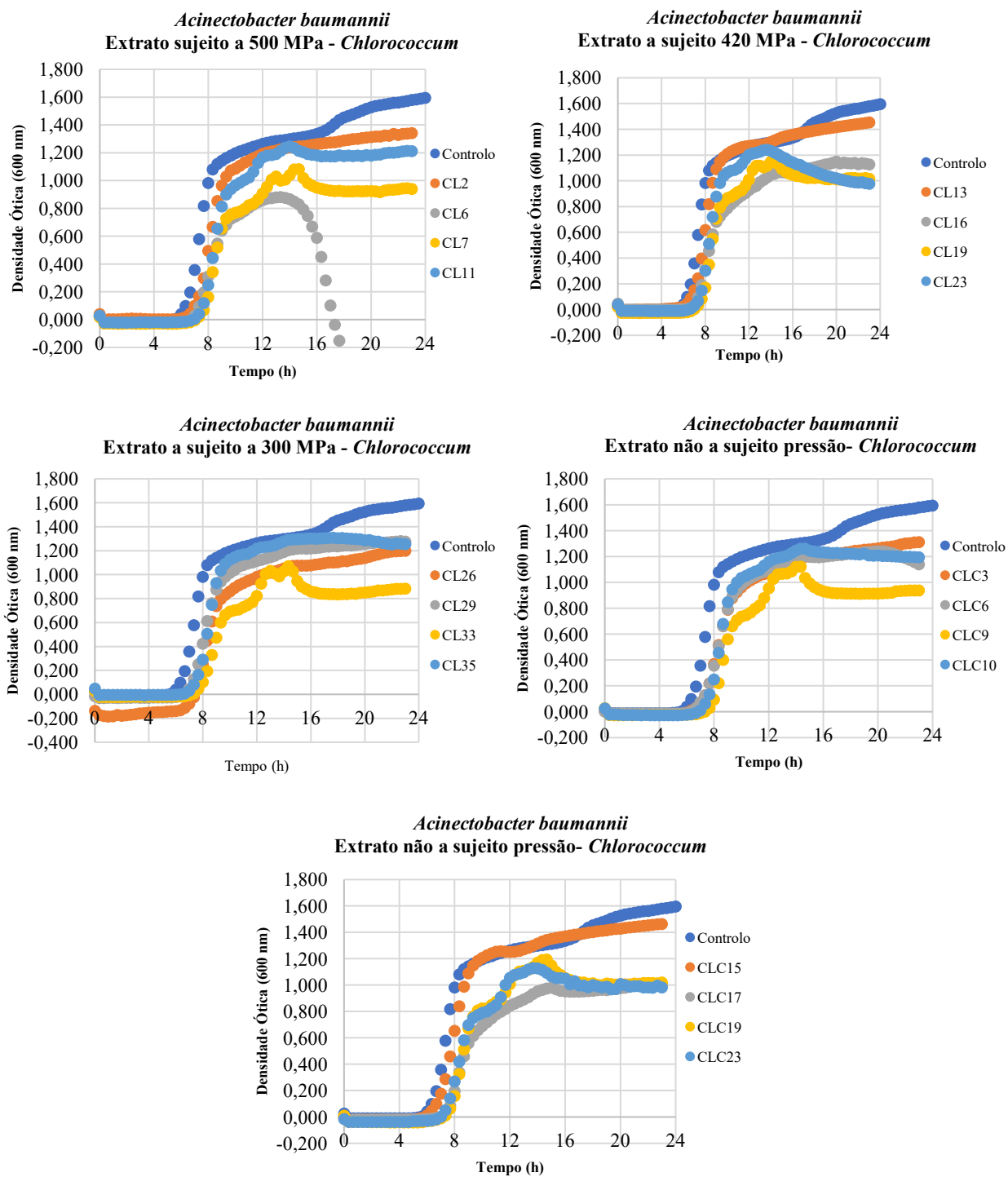


Figura II.X - Densidade ótica em função do tempo de *Acinetobacter baumannii* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*

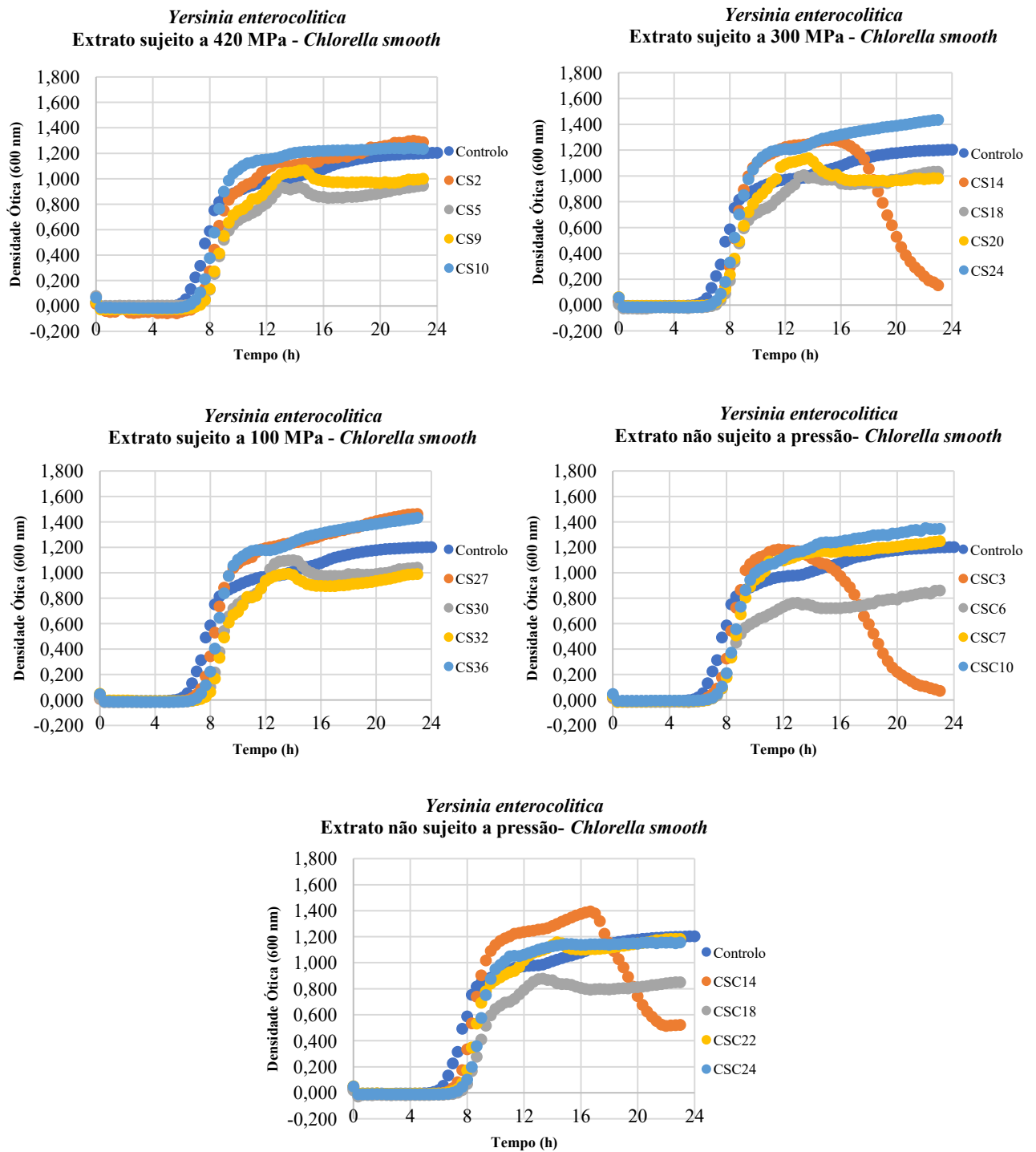


Figura II.XI - Densidade ótica em função do tempo de *Yersinia enterocolitica* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

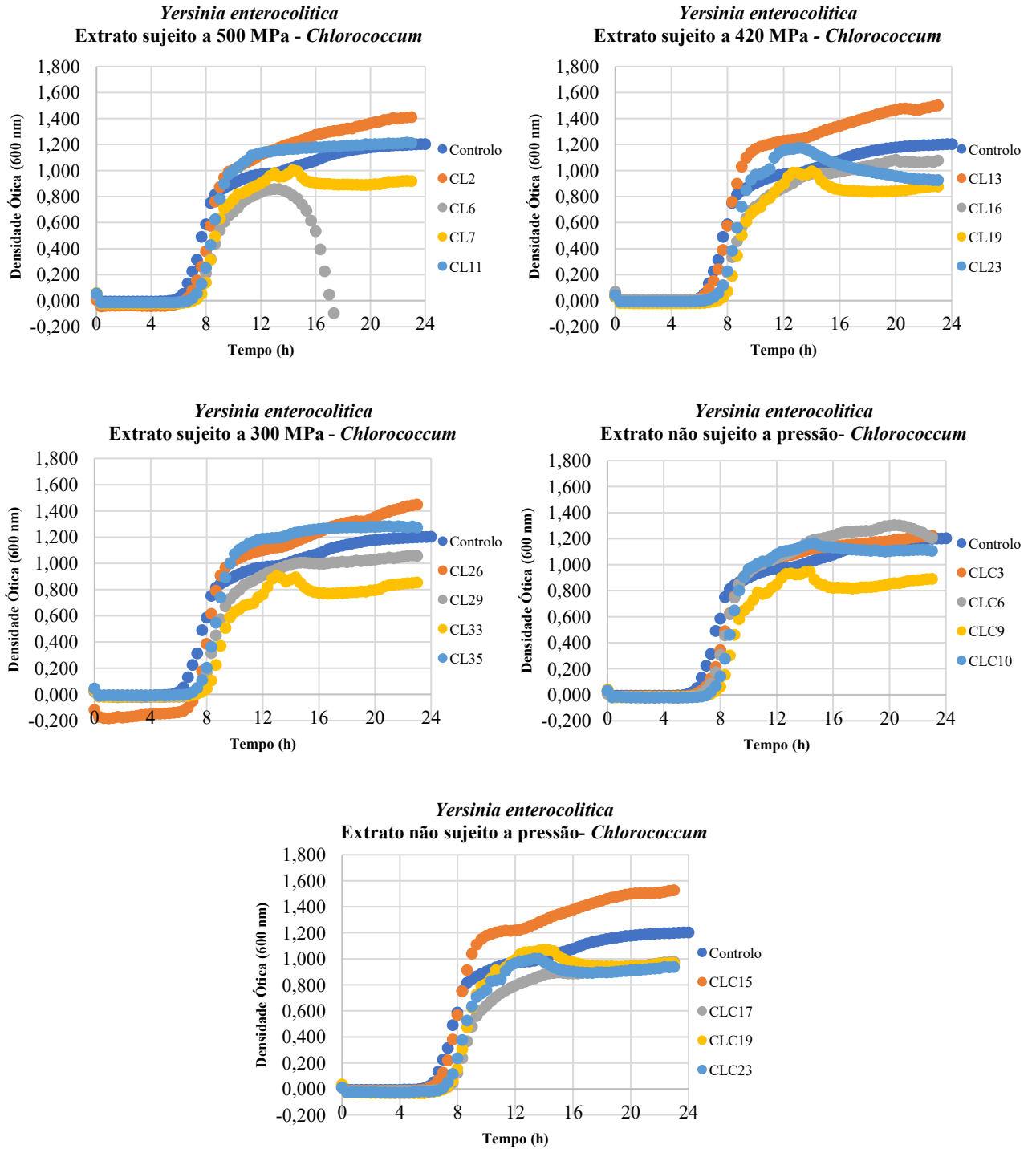


Figura II.XII - Densidade ótica em função do tempo de *Yersinia enterocolitica* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

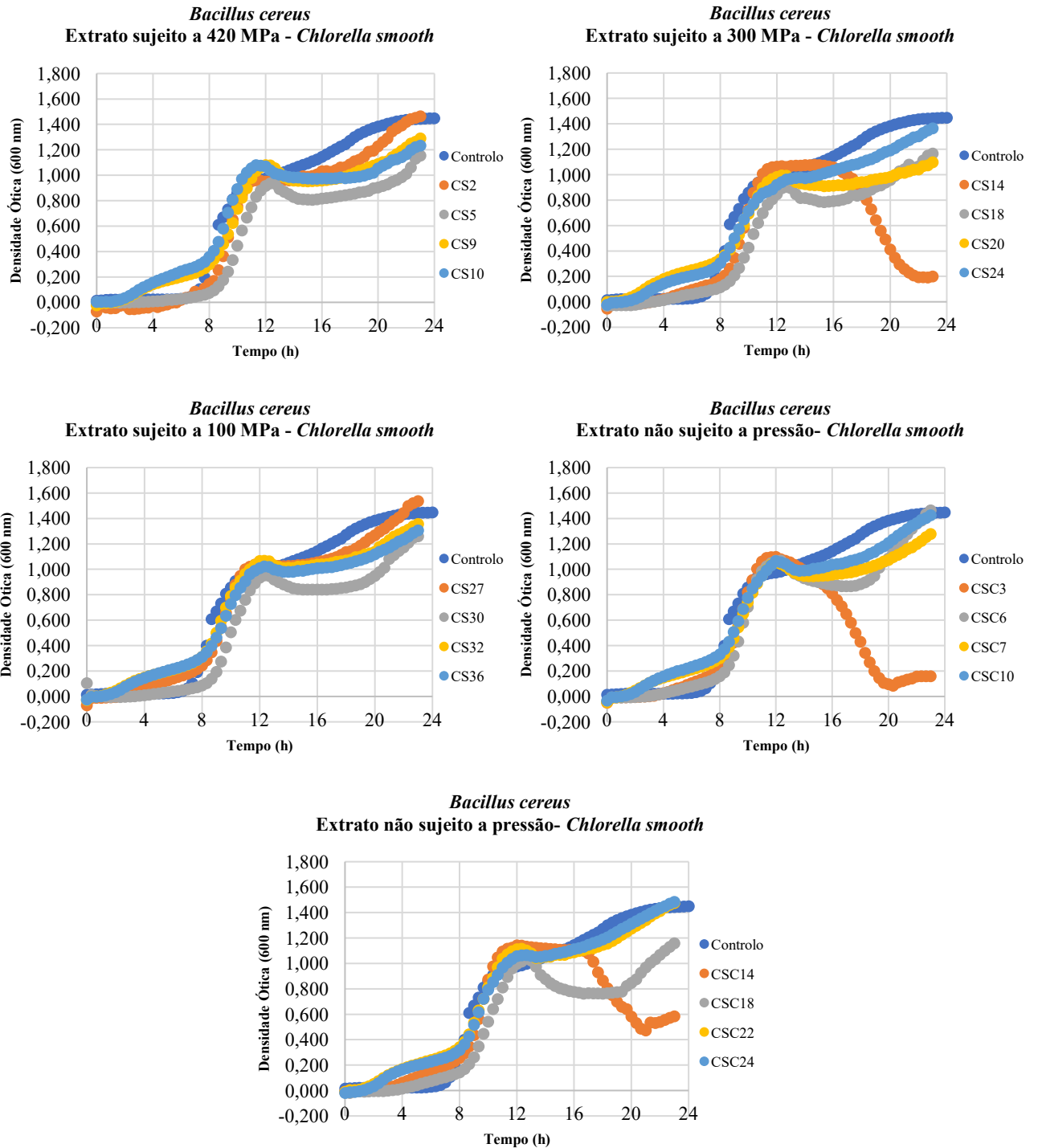


Figura II.XIII - Densidade ótica em função do tempo de *Bacillus cereus* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

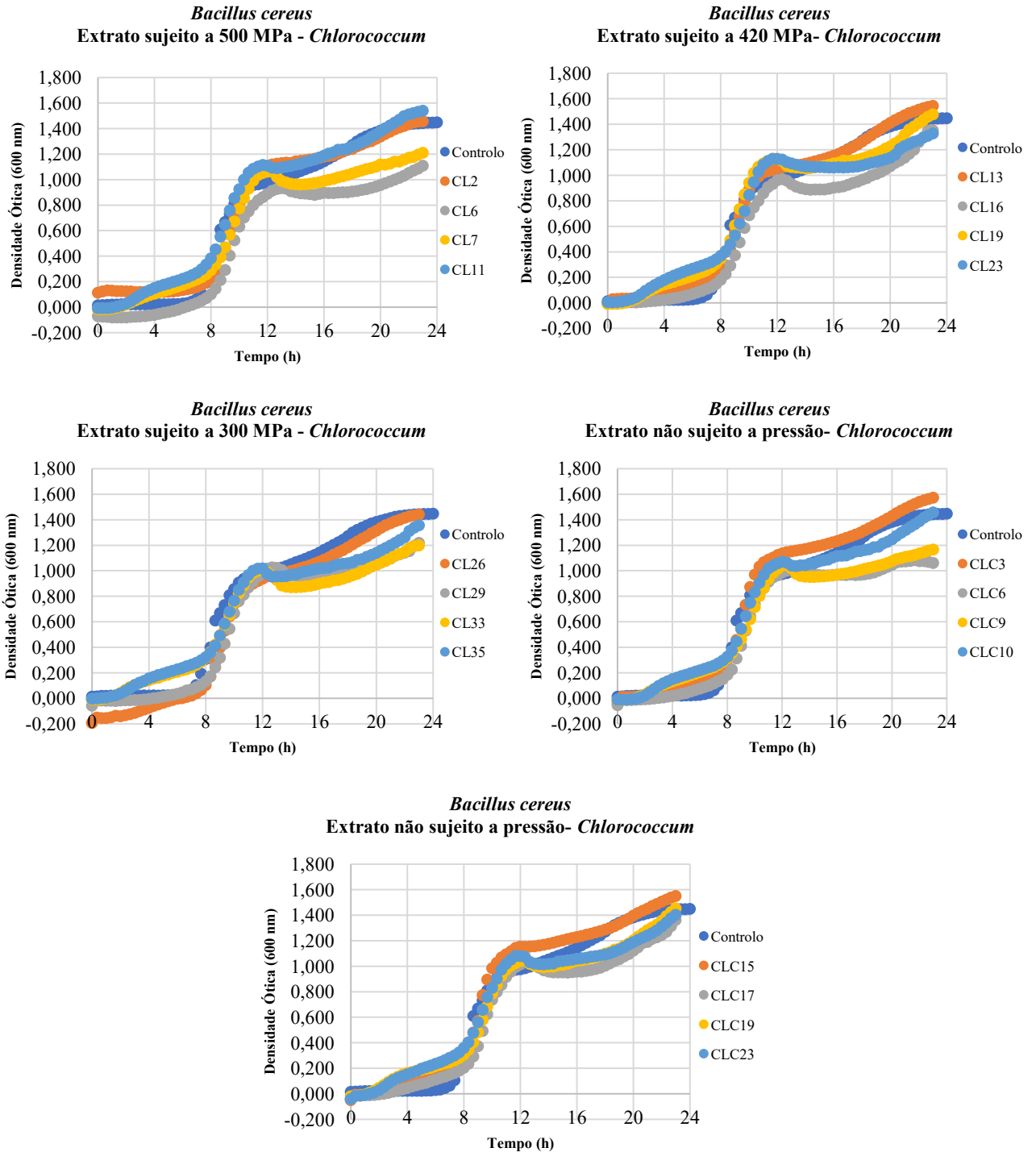


Figura II.XIV- Densidade ótica em função do tempo de *Bacillus cereus* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

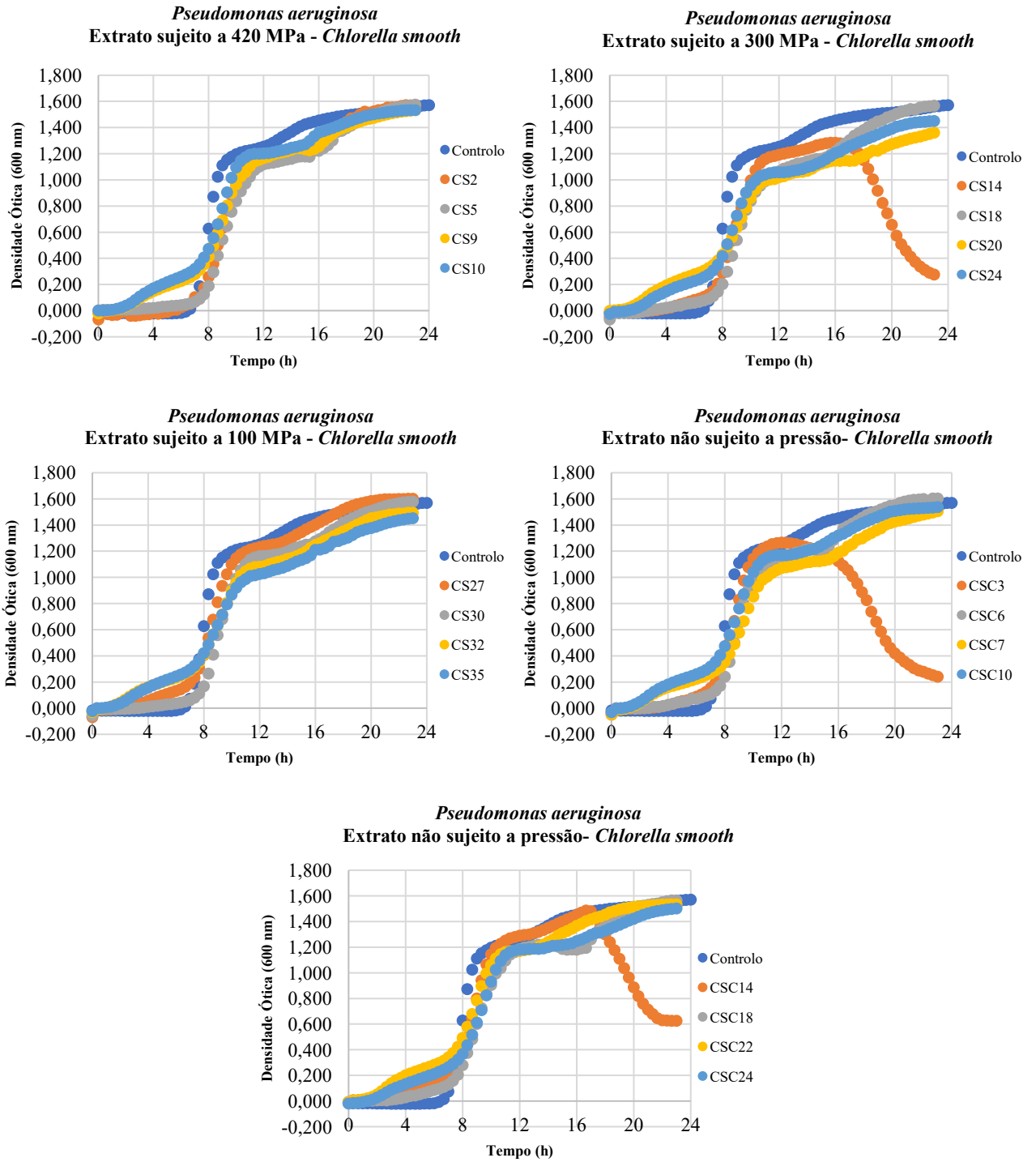


Figura II.XV- Densidade ótica em função do tempo de *Pseudomonas aeruginosa* para cada um dos extratos de *Chlorella smooth*.

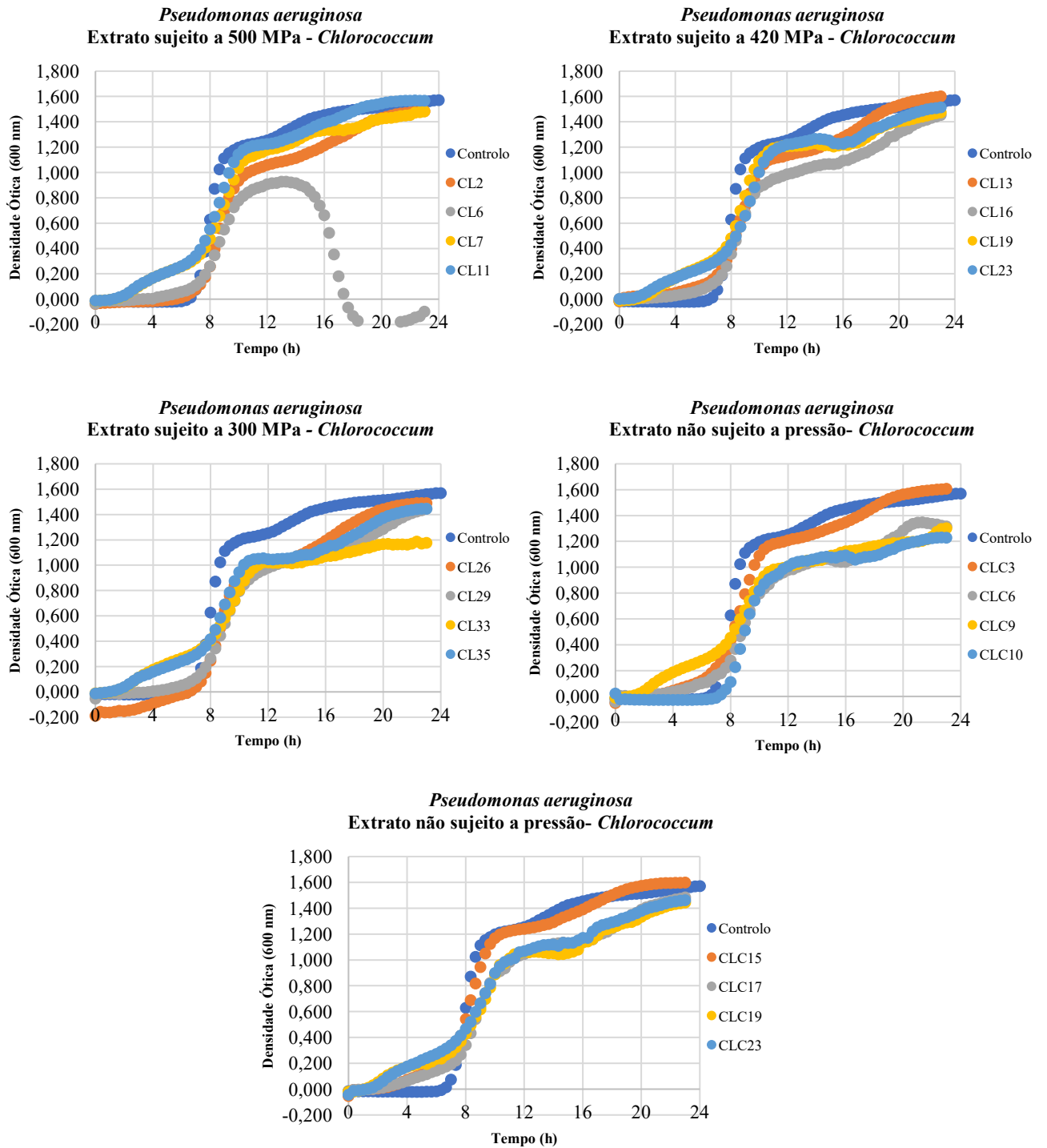


Figura II.XVI- Densidade ótica em função do tempo de *Pseudomonas aeruginosa* para cada um dos extratos de *Chlorococcum*.

**ANEXO III – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogênicos para extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis***

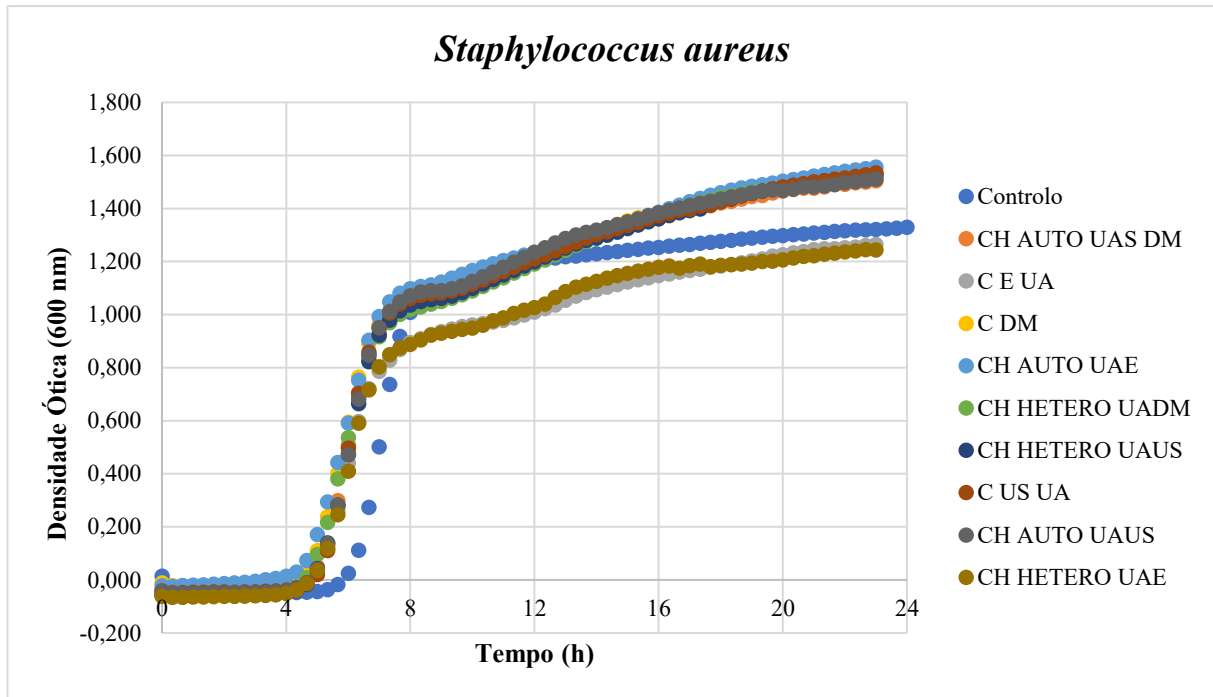


Figura III.I - Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis*.

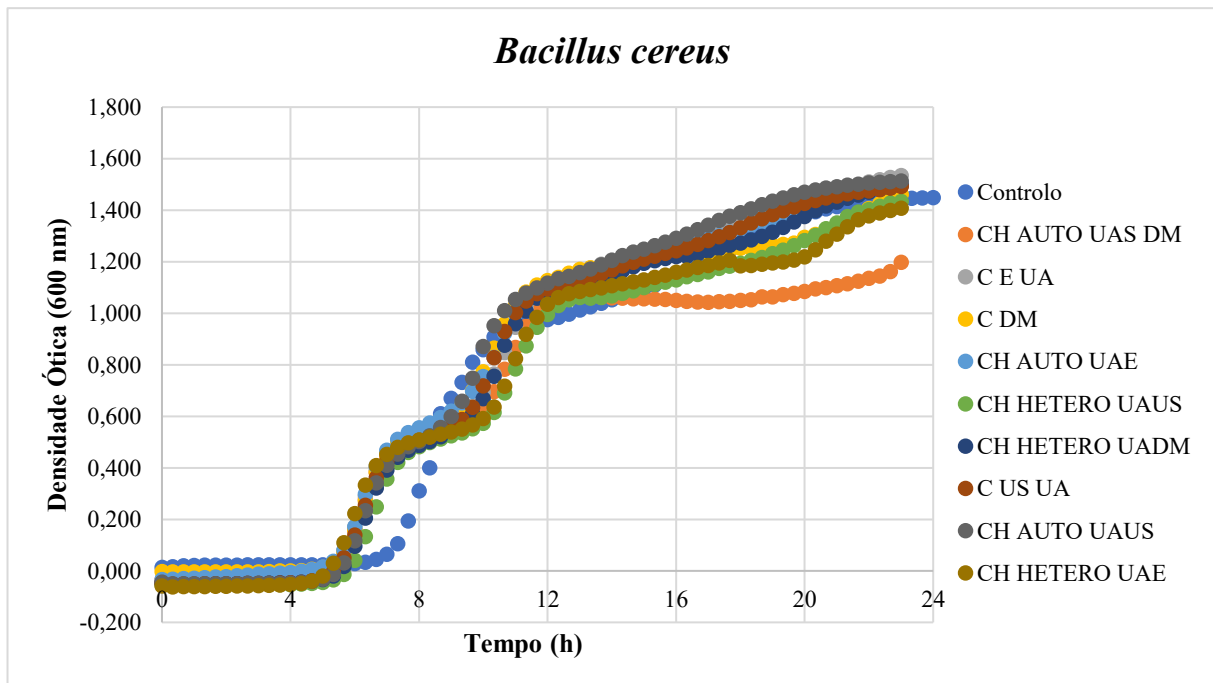


Figura III.II - Densidade ótica em função do tempo de *Bacillus cereus* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis*.

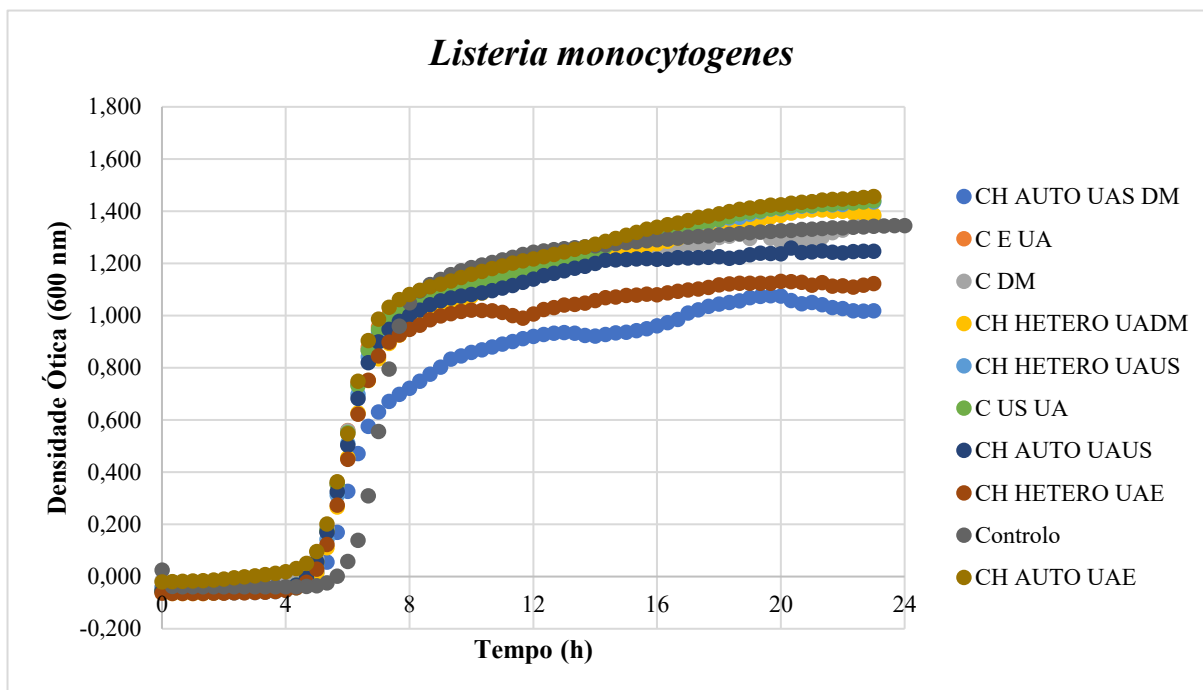


Figura III.III - Densidade ótica em função do tempo de *Listeria monocytogenes* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblystomatis*.

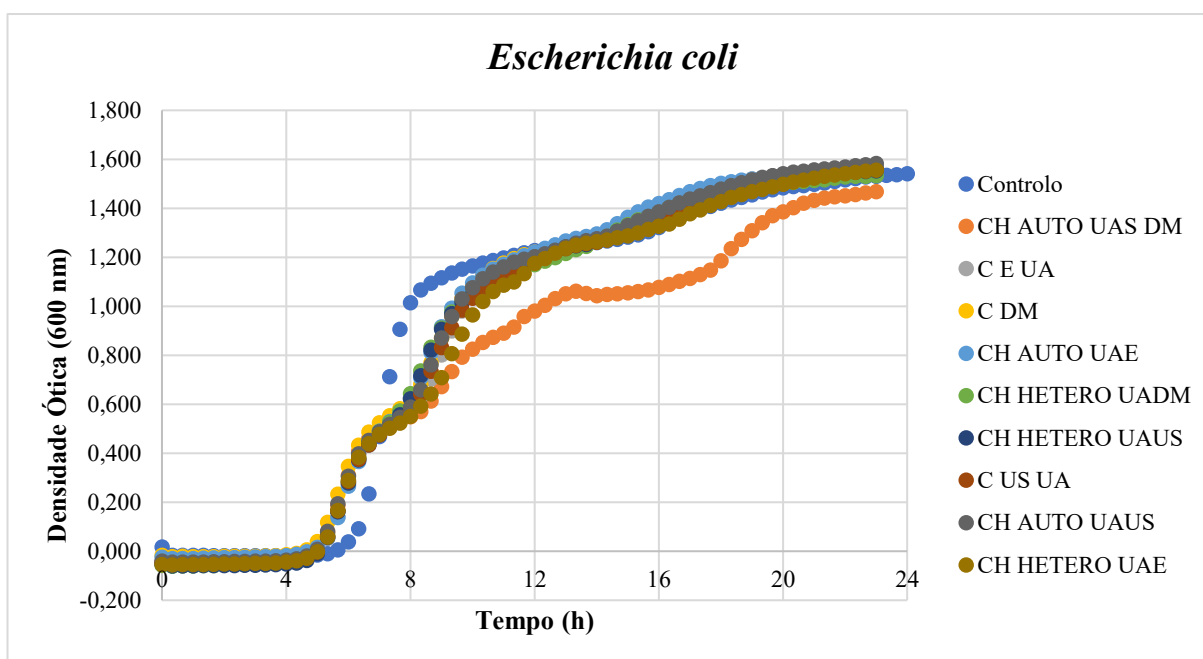


Figura III.IX - Densidade ótica em função do tempo de *Escherichia coli* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblystomatis*.

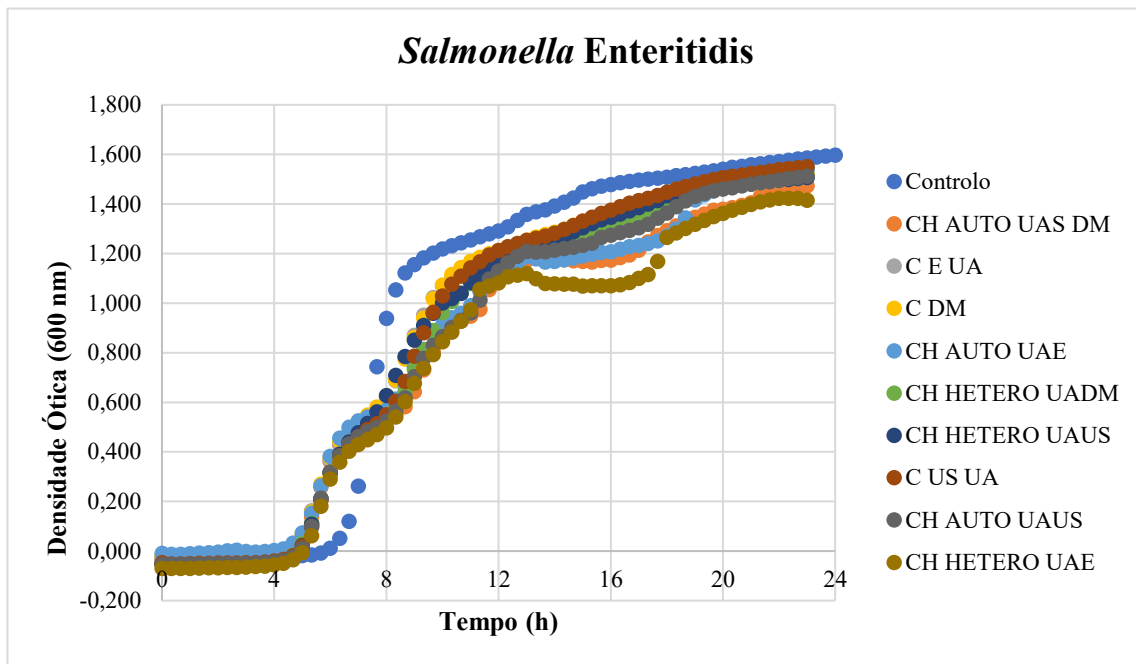


Figura III.V - Densidade ótica em função do tempo de *Salmonella Enteritidis* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis*.

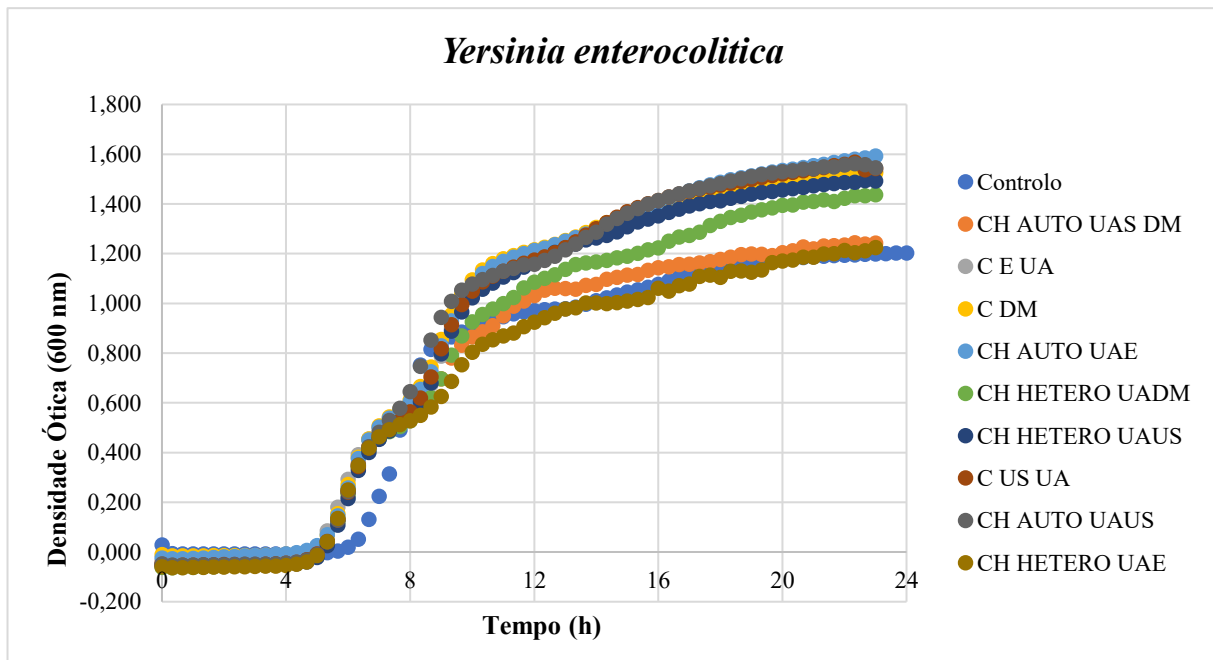


Figura III.VI - Densidade ótica em função do tempo de *Yersinia enterocolitica* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblyostomatis*.

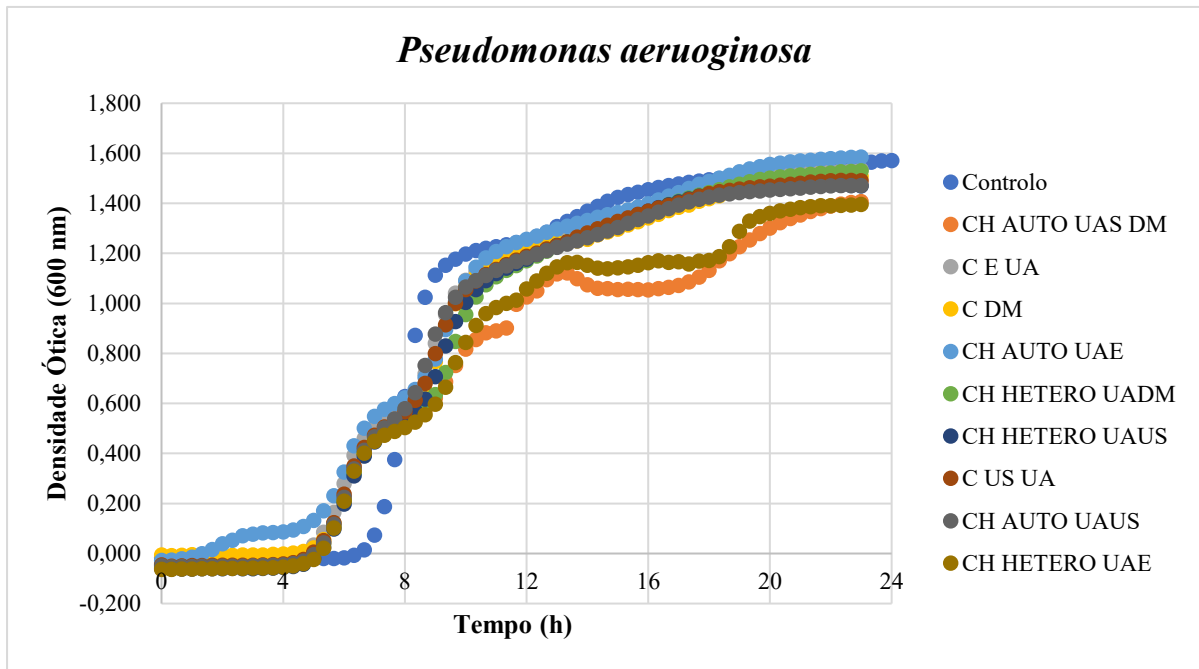


Figura III.VII - Densidade ótica em função do tempo de *Pseudomonas aeruginosa* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblystomatis*.

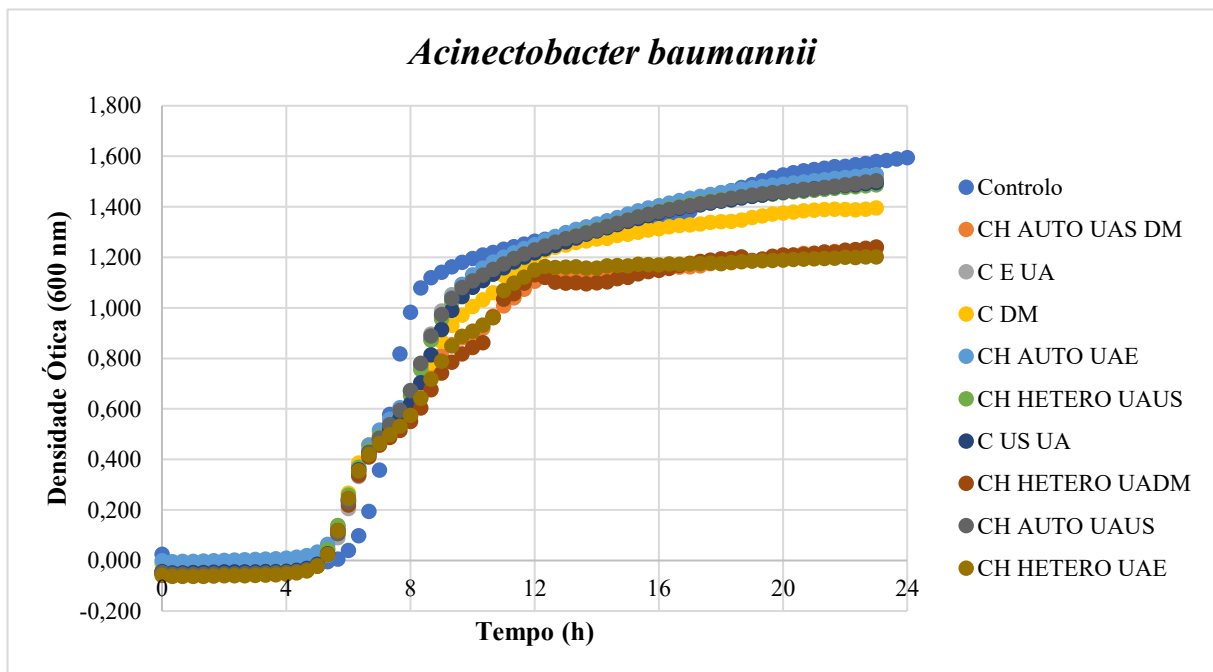


Figura III.VIII - Densidade ótica em função do tempo de *Acinetobacter baumannii* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris smooth* e *Chlorococcum amblystomatis*.

**ANEXO IV – Densidade ótica em função do tempo de diferentes patogénicos para extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* e *Nannochloropsis*.**

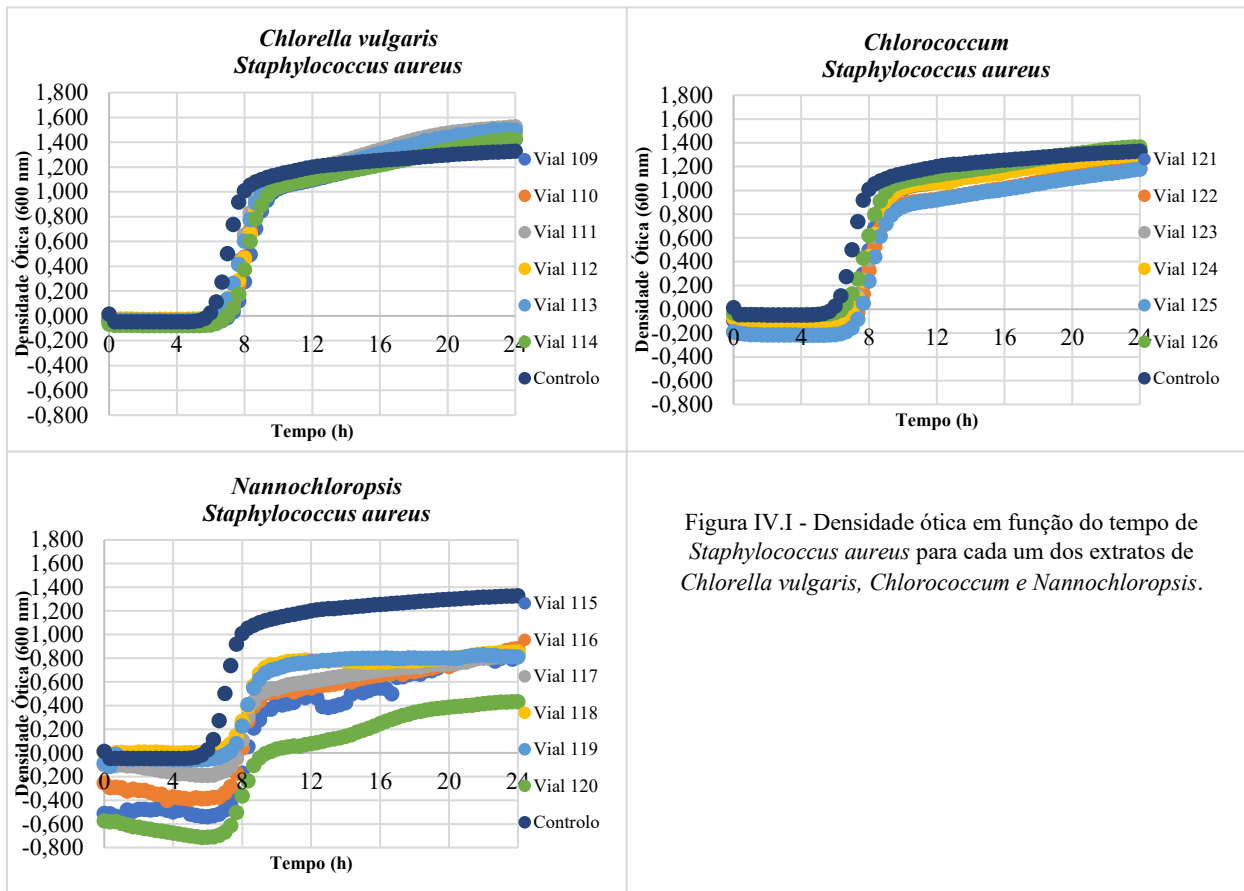


Figura IV.I - Densidade ótica em função do tempo de *Staphylococcus aureus* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* e *Nannochloropsis*.

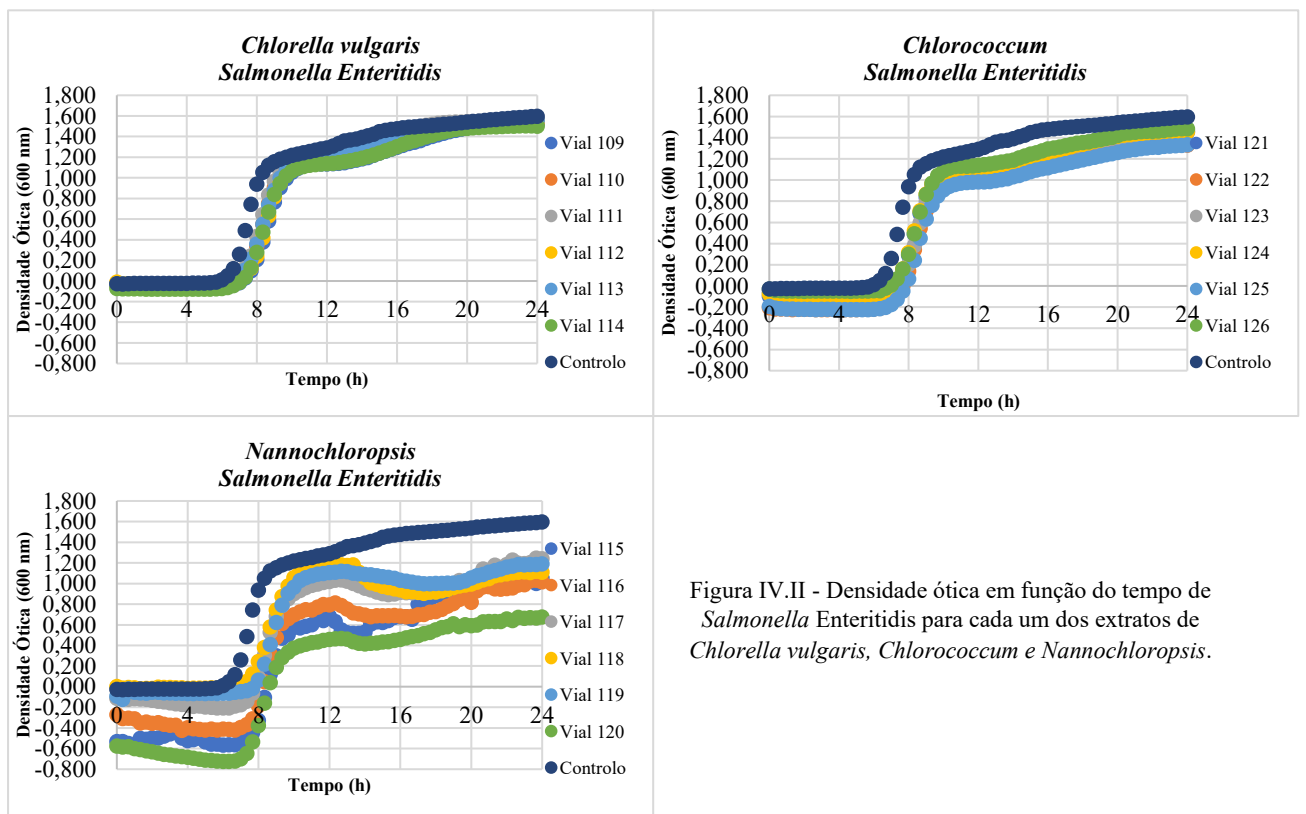


Figura IV.II - Densidade ótica em função do tempo de *Salmonella Enteritidis* para cada um dos extratos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* e *Nannochloropsis*.