

Luís Gonçalo Igreja Norinho

Avaliação dos óleos essenciais da flor e da folha da *Acacia dealbata* como potenciais conservantes alimentares: estudo preliminar

Licenciatura em Ciências da Nutrição  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa  
Porto, 2023



Luís Gonçalo Igreja Norinho

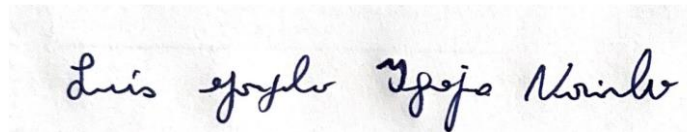
Avaliação dos óleos essenciais da flor e da folha da *Acacia dealbata* como potenciais conservantes alimentares: estudo preliminar

Licenciatura em Ciências da Nutrição  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa  
Porto, 2023

Luís Gonçalo Igreja Norinho

Avaliação dos óleos essenciais da flor e da folha da *Acacia dealbata* como potenciais conservantes alimentares: estudo preliminar

Declaro, para os devidos efeitos, ter atuado com total integridade na elaboração deste Trabalho de Projeto. Atesto a originalidade do trabalho, confirmo que não incorri em plágio e que todas as frases que retirei de textos de outros autores foram devidamente citadas ou redigidas por outras palavras e convenientemente referenciadas na bibliografia.



---

(Luís Gonçalo Igreja Norinho)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciatura em Ciências da Nutrição.

Orientadora:

*Professora Doutora Ana Cristina Vinha*

Coorientadora:

*Professora Doutora Carla Sousa e Silva*



## Índice

<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>II. ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>III. TÍTULO/AUTORES/ AFILIAÇÕES ACADÉMICAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>IV. RESUMO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>V. ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
2.1. AMOSTRAS.....	9
2.2. REAGENTES .....	10
2.3. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS DE FLOR E FOLHA.....	10
2.4. ENSAIO DE DIFUSÃO EM DISCO .....	11
2.5. APLICAÇÃO DOS ÓLEOS DE FLOR E DE FOLHA NA CARNE.....	11
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>11</b>
3.1. ENSAIO DE DIFUSÃO EM DISCO .....	11
3.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS ÓLEOS DE FLOR E DA FOLHA COMO CONSERVANTES .....	13
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>15</b>
<b>5. AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>16</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>16</b>

## I. Índice de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação antimicrobiano de óleos essenciais	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Exemplo da estrutura química de um terpeno aromático e alifático	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Sumidades floridas e morfologia das folhas da <i>Acacia dealbata</i> .	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Atividade antimicrobiana das estirpes inibidas simultaneamente pelos extratos de óleos de flor e de folha da <i>A. dealbata</i>	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Amostras de carne de frango, bovina e suína após aplicação dos extratos de óleo de flor e de folha de <i>Acacia dealbata</i> .	<b>15</b>

## II. Índice de Tabelas

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Microrganismos inibidos pelos diferentes órgãos da <i>A. dealbata</i>	<b>7</b>
<b>Tabela 2.</b> Avaliação da atividade antimicrobiana, através da zona de inibição (mm), dos extratos de óleos de flor e de folha da <i>Acacia dealbata</i> .	<b>12</b>

Avaliação dos óleos essenciais da flor e da folha da *Acacia dealbata* como potenciais conservantes alimentares: estudo preliminar

### **III. Título/Autores/ Afiliações académicas**

Avaliação dos óleos essenciais da flor e da folha da *Acacia dealbata* como potenciais conservantes alimentares: estudo preliminar

Evaluation of flower and leaf *Acacia dealbata* essential oils as potential food preservative

Luís Norinho<sup>1</sup>, Carla Sousa e Silva<sup>2</sup>, Ana Cristina Vinha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante finalista do 1º ciclo de Ciências da Nutrição da Universidade Fernando Pessoa.

<sup>2,3</sup>Professora Associada da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

Luís Gonçalo Igreja Norinho

E-mail: 30507@ufp.edu.pt

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Contagem de palavras: 6752

Número de figuras: 5

Número de tabelas: 2

Número de referências bibliográficas: 59

Conflitos de interesse: nada a declarar

#### IV. Resumo

**Introdução:** Nos últimos anos tem havido uma preocupação crescente com a contaminação microbiana de alimentos crus e processados e, conseqüentemente, com as doenças que a deterioração dos mesmos pode originar. Por outro lado, o uso de aditivos naturais em alimentos, nomeadamente conservantes, tem encontrado grande aceitação por parte do consumidor. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de descobrir novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas, para que possam ser utilizados na indústria alimentar. Os óleos essenciais já mostraram ter potencial inibidor de microrganismos alimentares.

**Objetivo:** Estudo preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos de óleos de flor e de folha da *Acacia dealbata* L. (mimosa), uma planta invasora, com efeitos nocivos no ambiente, economia e saúde, para futura incorporação numa embalagem ativa, como conservante natural. Como microrganismos, utilizaram-se bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos leveduriformes (*Candida albicans*).

**Metodologia:** Obtenção de óleos essenciais de flores e folhas de mimosa, recorrendo ao processo de extração por Soxhlet. A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão em disco. Posteriormente, simulou-se uma embalagem ativa (película aderente com óleo essencial), para avaliar o potencial conservante dos óleos em carnes de suíno, frango e bovino.

**Resultados:** Os óleos extraídos da folha e da flor inibiram *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*. Com base na observação da cor da carne, nenhum dos dois óleos essenciais, aplicados na carne mostrou atividade conservante significativa para o intervalo de tempo estabelecido.

**Conclusão:** Embora os resultados preliminares indiquem que estes óleos essenciais têm potencial como conservantes, mais ensaios deverão ser efetuados. Deverá recorrer-se a outras metodologias para confirmar a atividade antimicrobiana, nomeadamente a ensaios de microdiluição em placa, com a determinação da concentração mínima inibitória. Relativamente à avaliação da qualidade da carne, mais ensaios deverão ser efetuados, quer a nível organolético, como biológico.

**Palavras-chave:** *Acacia dealbata* L., flor, folha, óleo essencial, atividade antimicrobiana, método de difusão em disco, conservante alimentar.

## V. Abstract

**Objective:** To conduct a preliminary evaluation of the antibacterial activity of flower and leaf oil extracts from *Acacia dealbata* L. (mimosa), an invasive plant having negative consequences on the environment, economy, and health, for future use as a natural preservative in active packaging. Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*), gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*), and yeast-like fungi (*Candida albicans*) were utilized as microorganisms.

**Methodology:** Soxhlet extraction is used to extract essential oils from mimosa flowers and leaves. The disk diffusion method was used to assess the oils' antibacterial properties. The preservation ability of oils in pig, chicken, and beef was then assessed using a simulation of an active packaging (adherent film with essential oil).

**Results:** The leaf and floral oils inhibited *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Staphylococcus aureus*. Based on the color of the meat, neither of the two essential oils applied demonstrated substantial preservation activity for the time frame specified.

**Conclusion:** Although preliminary results suggest that these essential oils have potential as preservatives, more research is needed. Plate microdilution assays with measurement of the lowest inhibitory concentration should be employed to confirm antibacterial activity. More tests, both organoleptic and biological, must be performed to assess meat quality.

**Keywords:** *Acacia dealbata* L., flower, leaf, essential oil, antimicrobial activity, disk diffusion method, food preservative.

## 1. Introdução

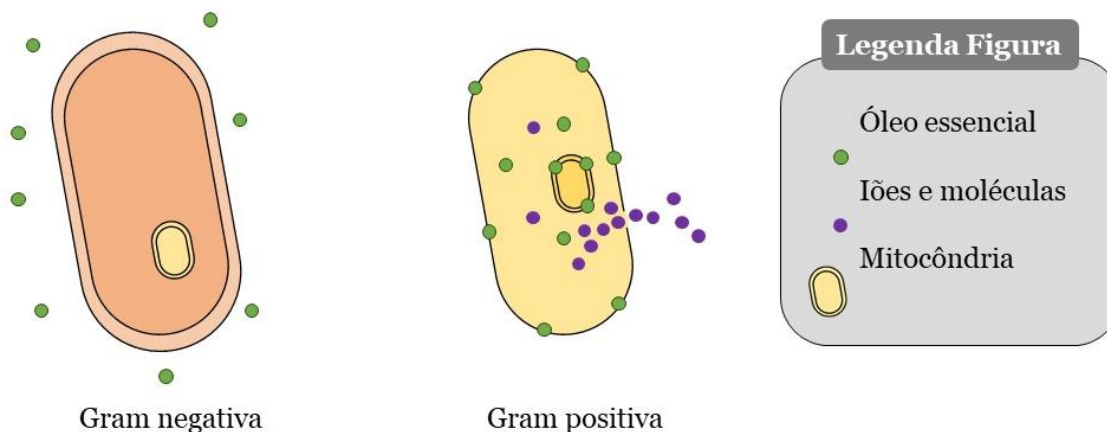
Atualmente o consumidor tornou-se mais conhecedor e exigente relativamente à qualidade dos alimentos que ingere. Este é um dos motivos, pelos quais, a tecnologia alimentar, aliada à investigação científica, se tem vindo a concentrar na utilização e consequente incorporação de compostos bioativos extraídos das plantas em alimentos, no sentido de aumentar a sua segurança e qualidade, ao mesmo tempo que promove a sustentabilidade (1). Os óleos essenciais (OEs) são extraídos das plantas e exibem atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), podendo assim ser usados em produtos alimentares como conservantes naturais, limitando o crescimento ou a sobrevivência de diversos microrganismos (2). Alguns estudos *in vitro* reportam os OEs e os extratos hidroalcoólicos de diversas plantas como agentes eficazes contra bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* (3-5). É do conhecimento geral que a indústria alimentar usa os conservantes sintéticos para melhorar ou manter as propriedades químicas e nutricionais dos alimentos, prolongando a vida útil dos mesmos. No entanto, a segurança e o impacto dos aditivos alimentares sintéticos na saúde humana têm sido discutidos nos últimos anos e alguns estudos relatam o uso destas substâncias sintéticas como responsáveis por reações gastrointestinais, respiratórias, dermatológicas, cardiovasculares, músculo-esqueléticas e neurológicas adversas (6, 7). Nesse sentido, uma das tendências atuais no processamento de alimentos é a substituição de aditivos químicos por compostos naturais, à base de plantas, conhecidos por serem seguros do ponto de vista toxicológico, a fim de satisfazer a exigência dos consumidores por produtos “mais naturais e mais seguros” (8). Para além dos OEs, há relato do uso de outros antimicrobianos naturais para a conservação de carne, como extratos vegetais, flavonoides, ácidos orgânicos, bactericinas, nanopartículas e compostos de origem animal (9).

De facto, devido aos recentes avanços científicos, o interesse pelas propriedades medicinais das plantas tem vindo a crescer, devido à sua baixa toxicidade, propriedades farmacológicas e viabilidade económica (5). Mais recentemente, foi reportado que a adição direta de óleos essenciais aromáticos de plantas e seus extratos a alimentos, resulta numa ação antioxidante e antimicrobiana (6). Uma vez que o uso de antibióticos resultou no aumento de resistência das bactérias aos mesmos, a procura de novos compostos capazes de combater estes microrganismos tornou-se uma necessidade (7). Extratos e óleos essenciais de plantas possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais

e foram identificados como novos agentes promotores da preservação de alimentos e alternativas para o tratamento de doenças infecciosas (8).

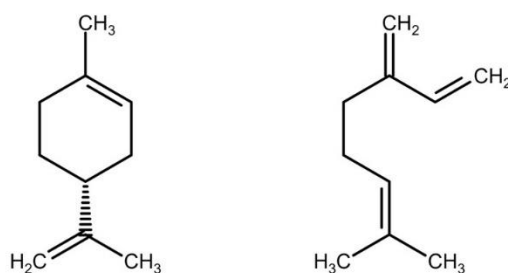
Os óleos essenciais, quando puros, possuem uma densidade menor que a água e são voláteis, líquidos, lipossolúveis, incolores e solúveis em solventes orgânicos. São ricos em terpenos, podendo apresentar diferentes funções químicas, tais como ésteres de ácidos alifáticos e compostos fenólicos. O seu carácter hidrofóbico permite a disrupção dos lípidos presentes na membrana celular e na mitocôndria das bactérias, aumentando a permeabilidade das estruturas celulares. Tal resulta na morte das células bacterianas devido a fugas de moléculas e iões essenciais (10).

Vários fatores determinam a atividade dos óleos essenciais, como a sua composição, grupos funcionais presentes nos seus componentes ativos e as suas ações sinérgicas (11). O mecanismo de ação antimicrobiano varia com o tipo de óleo essencial ou a estirpe de microrganismo utilizado. É sabido que, em comparação com as bactérias gram-negativas, as gram-positivas são mais suscetíveis à ação de óleos essenciais (12). Isto pode ser atribuído ao facto de as bactérias gram-negativas possuírem membrana exterior rígida e rica em lipopolissacarídeos (LPS), o que limita a difusão de compostos hidrofóbicos através da mesma. Os óleos essenciais podem ainda aderir à superfície da célula, penetrando a bicamada fosfolipídica da membrana celular. Isto leva a um distúrbio na integridade da membrana celular, devido à acumulação destes compostos, o que pode prejudicar o metabolismo, resultando na morte celular (13, 14) (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de ação antimicrobiano de óleos essenciais. (Retirado de Cenciarelli et al. (15)).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída à presença de compostos químicos voláteis, como terpenos e fenóis, que demonstram efeitos inibitórios contra uma ampla gama de bactérias, vírus e fungos. Esta propriedade tem sido explorada em diferentes áreas, desde a indústria farmacêutica até à formulação de produtos de higiene pessoal (16). Os terpenos constituem o principal grupo existente nos óleos essenciais, podendo ser aromáticos ou alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (Figura 2). São constituídos por várias unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), podendo ser acíclicos ou cíclicos. Ciclases podem rearranjar os terpenos em estruturas cíclicas, formando compostos monocíclicos ou bicíclicos (17). Modificações bioquímicas de terpenos, através de reações enzimáticas que resultam na adição de moléculas de oxigénio, ou adição/ remoção de grupos metilo, levam à sua funcionalização (17). Os terpenos podem ainda ser subdivididos em álcoois, fenóis, ésteres, aldeídos, éteres, cetonas e epóxidos.



**Figura 2.** Exemplo da estrutura química de um terpeno aromático e alifático.

Nas plantas, a síntese de fenilpropenos ocorre a partir de aminoácidos precursores de fenilalanina, constituindo uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos, designada fenilpropanoídes (18). Uma pequena proporção dos óleos essenciais é composto por fenilpropenos, sendo os mais estudados o safrol, o eugenol, o isoeugenol, a vanilina e o cinamaldeído (19). A atividade antimicrobiana dos fenilpropenos é dependente da estirpe de microrganismo, tipo e número de substituintes no anel aromático, assim como da temperatura e meio de cultura escolhido para o crescimento (20). O cinamaldeído, por exemplo, é um composto orgânico que confere odor e sabor. Este é produzido a partir de árvores de canela e outras espécies semelhantes. Tem a

capacidade de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* sem desintegrar a membrana exterior ou esgotar as reservas de ATP intracelulares (21). Algumas das classes de compostos com atividade antimicrobiana existentes nos óleos essenciais incluem fenóis, aldeídos, ésteres, cetonas, álcoois, éteres e hidrocarbonetos (22).

*Acacia dealbata*, ou acácia australiana como é conhecida em português, é uma árvore perene (Figura 3) com origem no sul da Austrália e Tasmânia, que pertence à família *Fabaceae* e à subfamília *Mimosoideae* (1). Hoje em dia, é tida como uma variante de *Acacia decurrens*, e pode atingir mais de 12 metros de altura e 1,2 metros de copa (2). Em Portugal, esta planta foi introduzida durante o Estado Novo com o intuito de estabilizar dunas e produzir madeira. Reproduz-se de forma rápida e eficaz em solo nacional, uma vez que prolifera em climas húmidos e semi-húmidos (3). A acácia australiana propaga-se facilmente em solos pouco férteis devido à elevada quantidade de sementes que germinam, estabelecendo novos processos de reprodução através de rebentos nas raízes.

Dada a sua rápida proliferação, esta planta é atualmente considerada invasora, uma vez que está associada a um grande número de fogos durante os meses quentes e tem ainda capacidade de ocupar as áreas ardidas e destruídas pelo fogo. A sua eliminação não é, no entanto, fácil, uma vez que esta é resistente ao corte e ao fogo. Atualmente, a forma mais eficaz de proceder à sua eliminação é o corte profundo no seu caule, sem que a árvore caia, deixando que esta seque de forma natural. Para além da associação aos incêndios rurais, a acácia australiana está também associada ao aparecimento de alergias e doenças respiratórias. No entanto, há estudos que se têm focado no potencial da biomassa da acácia para diversas aplicações (3, 4), ou para uso da mesma na captura e sequestro de carbono, o que permitiria também a diminuição do seu impacto negativo no ecossistema.



**Figura 3.** Sumidades floridas e morfologia das folhas da *Acacia dealbata*.

(Retirado de <https://www.nature-and-garden.com/gardening/acacia-dealbata.html>).

Análises prévias demonstraram a presença de vários compostos bioativos na *Acacia dealbata*, como flavonoides, alcaloides, taninos e ácidos fenólicos. No entanto, os potenciais usos dos vários componentes da planta (madeira, folhas, casca e flores), são diferentes, devido à sua composição distinta. A madeira, por exemplo, possui flavonoides importantes (23). Já a casca é rica em chalconas, utilizada para a obtenção de corantes escuros (24). Quanto às flores, estas contêm cumarinas, amins, alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e ácidos fenólicos (9,10), tendo sido reportado que também incluem um alto teor de chalconas, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (25), o que está associado a uma elevada atividade antioxidante. Tal descoberta é de elevada importância, uma vez que indica que a colheita das flores deve ser realizada antes da dispersão do pólen, o que limita a propagação desta espécie invasiva, promovendo um equilíbrio no ecossistema.

O estudo da composição química dos extratos lipofílicos de casca, madeira e folhas de *A. dealbata*, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), demonstrou que os compostos presentes são maioritariamente terpenos, esteróis, ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa, monoglicérides e aromáticos (26). No que toca à citotoxicidade dos extratos, os mesmos autores declararam a sua inexistência, ou com valores extremamente baixos, analiticamente não quantificáveis (26). Triterpenos da família dos lupanos, ursanos e oleanos, extraídos das folhas, incluem esqualeno,  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -amirona,  $\beta$ -amirona e lupeonona (27). As folhas, ricas também em flavonoides e proantocianidinas (28), evidenciam atividade antioxidante, embora

menos significativa do que a descrita nos extratos dos galhos da mesma planta. Na verdade, a atividade antioxidante presente nos extratos estudados deveu-se, maioritariamente, sendo à elevada composição de compostos fenólicos totais. Os flavonoides e os fenólicos possuem atividade antioxidante relativamente aos radicais livres, devido às propriedades redox dos seus grupos hidroxilo, conferindo-lhes poder redutor (29).

Quando comparado o conteúdo fenólico total e de flavonoides na casca, no alburno e no cerne de *A. dealbata*, foi verificado que a primeira possui uma concentração fenólica total 160 vezes superior ao alburno, enquanto o cerne possui um valor intermédio (30). De forma semelhante, o conteúdo de flavonoides mais elevado foi descrito na casca, 6 vezes maior que no alburno (30). Foi ainda demonstrado que o cerne e a casca são ricas em taninos condensados e que esta última possui mais compostos antioxidantes naturais que os outros dois componentes do tronco. Ao nível das sementes, os óleos extraídos a partir das mesmas, demonstraram uma prevalência de ácido linoleico e oleico. Dos 10% de óleo contidos no interior das sementes, 31% são ácido oleico e 40% ácido linoleico (31).

No que toca à atividade antimicrobiana (Tabela 1), os extratos de casca, do alburno e do cerne inibiram o crescimento de *S. Aureus*, *K. pneumoniae* e *L. monocytogenes*. O extrato da casca foi também capaz de inibir *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *P. mirabilis* (30). Os extratos da flor demonstraram uma concentração mínima inibitória (CMI) contra bactérias gram negativas (*E. coli*), gram positivas (*S. aureus*) e levedura *C. albicans*. Todos os extratos supracitados inibiram o crescimento dos microrganismos referidos, mas o extrato de flor correspondente ao estágio inicial de desenvolvimento da mesma foi o que apresentou maior atividade (25). Extratos etanólicos de folha de *A. dealbata* demonstram atividade antimicrobiana moderada contra *E. coli* e leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis*, mas boa eficácia contra *B. cereus* (32). Borges et al. (33) demonstraram também que extratos de folha possuem atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, evidenciando o potencial destes produtos naturais como conservantes naturais.

Num outro estudo, os extratos das folhas e dos galhos da *A. dealbata* evidenciaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. mutans* e *S. mitis* (28). Pensa-se que a atividade antimicrobiana da *A. dealbata* esteja relacionada com a complexidade de diferentes grupos de metabolitos secundários de origem fenólica e não-fenólica (30). No que toca à natureza do solvente extrator, alguns estudos também relacionam a eficácia da extração com a atividade antimicrobiana.

Extratos de casca de *A. dealbata* apresentaram efeitos diversos na atividade antimicrobiana, dependentes do tipo de solvente usado na extração (30). Por exemplo, extratos de n-hexano não possuem efeito limitante no crescimento da maioria das bactérias gram-negativas. No geral, os efeitos inibitórios são menos efetivos contra bactérias gram-negativas do que bactérias gram-positivas, demonstrando um menor diâmetro de inibição. Para leveduras, a inibição foi maior com extratos de n-hexano do que com os solventes polares (34).

**Tabela.1.** Microrganismos inibidos pelos diferentes órgãos da *A. dealbata*

<b>Parte de planta</b>	<b>Microrganismo inibido</b>	<b>Ref.</b>
<b>Casca</b>	<i>S. Aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> e <i>P. mirabilis</i>	(30)
<b>Flor</b>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	(25)
<b>Folha</b>	<i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i>	(28)

Face às propriedades antimicrobianas e antioxidantes desta planta invasora, há potencial para esta ser usada como aditivo alimentar, nomeadamente conservante. Aditivos alimentares são substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos, durante a sua produção, de modo a melhorar as suas características, aumentar o seu tempo de prateleira ou preservar a sua qualidade. Aditivos usados para aumento do período de conservação de alimentos desempenham um papel crucial na prevenção da deterioração e manutenção da segurança geral e frescura dos produtos (35).

Um deste tipo de aditivos é constituído por antioxidantes. Estes ajudam a prevenir a oxidação de gorduras e óleos, que podem levar à formação de ranço e sabores estranhos nos produtos alimentares. Os antioxidantes mais comuns incluem o ácido ascórbico, mais comumente conhecido por vitamina C e tocoferóis (vitamina E). Estes aditivos aumentam o tempo de prateleira dos produtos devido à sua capacidade de inibirem a degradação de gorduras e óleos (36).

Conservantes são uma classe de aditivos alimentares usada para inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos, prevenindo assim a degradação dos produtos alimentares e consequentemente aumentando o seu tempo de prateleira. Alguns

dos conservantes mais utilizados incluem benzoato de sódio, sorbato de potássio e propionato de cálcio. Estes compostos atuam de modo a criar um ambiente inóspito para os microrganismos ou por inibição dos processos metabólicos (35).

Outro exemplo de aditivos alimentares são os nitratos e nitritos utilizados em carnes curadas como bacon, fiambre e salsichas, de modo a prevenir o desenvolvimento de bactérias prejudiciais, em particular, *Clostridium botulinum*, que pode causar botulismo. Estes compostos podem ainda contribuir para a cor e sabor destes produtos. No entanto, estes aditivos têm sido alvo de preocupações devido à potencial formação de nitrosaminas, nomeadamente quando os nitritos entram em contato com certos componentes do sistema digestivo. Como tal, o seu uso é estritamente regulamentado e os seus fabricantes têm de respeitar limites específicos da sua utilização (37).

Dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e outros derivados, como sulfitos, são também usados como conservantes e agentes antimicrobianos numa panóplia de alimentos, incluindo frutos secos, vinhos e algumas carnes processadas. Estes previnem o crescimento de bactérias, leveduras e inibem as enzimas responsáveis pelas reações de Maillard. Apesar dos benefícios referidos, o SO<sub>2</sub> pode também despoletar reações alérgicas em certos indivíduos, principalmente aqueles com asma e sensibilidade a sulfitos. Como tal, a sua presença tem de ser declarada na embalagem (38).

Outro tipo de conservantes bastante utilizado são os agentes quelantes, como o EDTA, usado para ligar e inativar iões metálicos, que catalisam reações de oxidação e levam à deterioração da qualidade dos produtos alimentares. Uma vez que previnem este tipo de reações adversas, os agentes quelantes ajudam a manter a frescura e estabilidade dos produtos empacotados (39, 40-42).

O interesse em embalagens de alimentos com base em macromoléculas naturais surgiu nos últimos anos devido às numerosas preocupações com o ecossistema e meio ambiente, aliados a uma necessidade de reduzir a quantidade de embalagens feitas à base de materiais descartáveis. A biomassa é uma fonte natural abundante, sustentável de biopolímeros. Assim, para assegurar o tempo de vida útil de produtos alimentares, têm vindo a ser desenvolvidas embalagens não só para conferir uma barreira às contaminações microbiológicas e químicas e impermeabilidade ao oxigénio, como também, com a finalidade de interagir de forma benéfica com o alimento. Ainda no âmbito da conservação de alimentos, têm sido desenvolvidos outro tipo de embalagens: embalagens inteligentes e embalagens ativas. As embalagens inteligentes, *smart packaging*, diferenciam-se das embalagens convencionais, normalmente utilizadas, por controlar e

comunicar o estado de conservação dos produtos sem ter de recorrer à data de validade estimada. São muito utilizadas no caso dos alimentos, medicamentos e mercadorias perigosas.

Além de cumprir as funções de uma embalagem convencional, este tipo de embalagem garante a qualidade e a segurança do seu género alimentício em causa. Relativamente às embalagens ativas, contrariamente das anteriores, interagem com os alimentos para aumentar a sua vida útil. Podem conter aditivos no seu interior (num envelope ou etiqueta) que se libertam no momento necessário. Exemplificando uma embalagem ativa, poderá ser, um absorvedor de humidade num pacote de biscoitos para que se mantenham crocantes e as suas características organoléticas não sofram alterações e ainda durante mais tempo evitar, simultaneamente, a proliferação de bactérias (43).

Atendendo às análises realizadas no ano de 2020, 2021 e 2022 do Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de carnes em Portugal, por ordem decrescente, indica que carnes de suíno, carnes de animais de capoeira e carnes de bovino são a de maior relevância de consumo (44).

Um dos parâmetros de qualidade da carne é a cor, cuja alteração ao longo do tempo de armazenamento está relacionada com a carga microbiana, processo oxidativo e valor de pH (45).

Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo a extração dos óleos essenciais das folhas e das flores da *A. dealbata*, e o estudo preliminar da atividade antimicrobiana dos mesmos, no sentido de potenciar a sua utilização como conservante alimentar, tanto na incorporação direta no alimento, como no desenvolvimento de embalagens alimentares inteligentes. Mais concretamente, a avaliação da atividade conservante destes óleos essenciais foi realizada nos 3 tipos de carne mais consumidos em Portugal (porco, frango e bovino), mediante a sua alteração de cor, com o objetivo de os testar para utilização futura numa embalagem ativa.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Amostras**

Foram estudadas folhas e sumidade floridas da *A. dealbata*. As amostras vegetais foram recolhidas em maio de 2023, no norte de Portugal, Penafiel, distrito do Porto. Coordenadas: Latitude 41.207, Longitude -8.28565; 41° 12' 25" Norte 8° 17' 8" Oeste, Portugal. Após a recolha de uma amostra significativa (~5 kg), efetuou-se a separação

das sumidades floridas e das folhas da planta. Para a preparação das amostras, primeiramente procedeu-se à sua moagem e remoção de humidade. A humidade foi removida recorrendo à adição de sulfato de sódio anidro e, de forma a garantir a lise celular e consequente libertação da gordura, adicionou-se areia como agente dispersante.

Os bifes de carne de frango, suíno e bovino *in natura* foram adquiridos numa grande superfície comercial do distrito do Porto e usados frescos.

## 2.2. Reagentes

Para a extração dos óleos das folhas e flores usou-se éter etílico p.a. FischerSci. Os extratos dos óleos foram preparados com etanol absoluto adquirido na FischerSci e água desionizada. O etanol a 70%, usado nos ensaios de difusão em disco, foi adquirido à VWR.

Usaram-se placas de Petri da Corning Gosselin, com nutriente agar da Liofilchem. Os discos de papel de filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m<sup>2</sup>) são provenientes da Oxoid. Para a inoculação das placas usou-se o densitómetro da BioMerieux.

Os extratos de óleos de flor e de folha da *A. dealbata* foram testados frente a 8 estirpes, sendo 7 bactérias (3 gram-positivas e 4 gram-negativas) e um fungo: *B. cereus* - isolado ambiental, confirmado por meios automáticos de identificação; *E. faecalis* ATCC 29212; *S. aureus* ATCC 25923; *E. coli* ATCC 25922; *Salmonella spp* - isolado clínico, confirmado por meios automáticos de identificação; *A. baumannii* - isolado clínico, confirmado por meios automáticos de identificação; *P. aeruginosa* ATCC 27853; *C. albicans* - isolado clínico, confirmado por meios automáticos de identificação. As estirpes foram mantidas a -20°C nos meios de cultura apropriados, adicionados de 15% de glicerol, e repicadas a cada 15 dias para placas de nutriente ágar, mantidas a 4°C.

## 2.3. Extração dos óleos de flor e folha

Para a obtenção dos óleos das folhas e flores, recorreu-se a uma extração por soxhlet. Utilizou-se uma massa conhecida (~10,0 g) de amostra triturada dentro de um cartucho e colocou-se num tubo de soxhlet durante 4 horas, utilizando-se o éter etílico como solvente extrator. Após a extração, o resíduo seco foi dissolvido com um volume conhecido de uma solução hidroalcoólica (70%), recorrendo-se para o efeito a um banho de ultrasons, durante 10 minutos (46).

## **2.4. Ensaio de difusão em disco**

As placas de agar foram inoculadas com as estirpes pretendidas, sendo repicadas para obter um crescimento ativo e incubadas a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $21\pm 3$  horas. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina a 0,9%, com a densidade ótica de 0,5 McFarland. A suspensão foi utilizada para inocular placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton II, utilizando-se uma zaragatoa estéril. Os discos de papel de filtro estéreis foram impregnados com 10  $\mu\text{L}$  de óleo essencial e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24 h. Como controle positivo, usou-se etanol a 70%, e como controle negativo o disco de papel. O diâmetro da zona de inibição foi medido em milímetros (47).

## **2.5. Aplicação dos óleos de flor e de folha na carne**

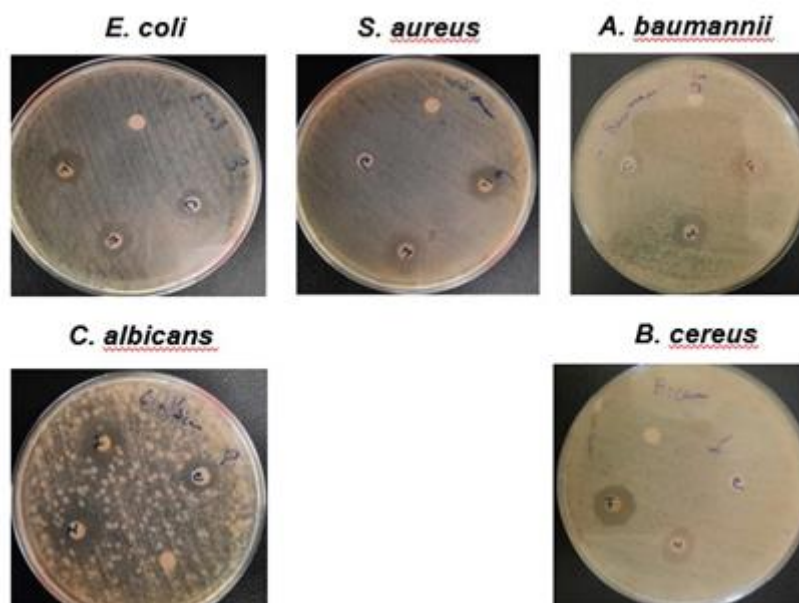
Os óleos de flor e de folha foram aplicados uniformemente em ambos os lados de bifés (aproximadamente 3 mm de espessura) de carne bovina, suína e de frango. Os bifés foram imediatamente isolados em película aderente transparente, colocados em tabuleiros e armazenados, no escuro, sob refrigeração a  $8^{\circ}\text{C}$ , durante 15 dias. Como controle, usaram-se bifés dos três tipos de carne *in natura*. A alteração de cor, avaliada por visualização humana direta, foi realizada diariamente nos primeiros 5 dias e, seguidamente, a cada 2 ou 3 dias.

# **3. Resultados e discussão**

## **3.1. Ensaio de difusão em disco**

Tal como referido anteriormente, os óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana (2). Com base nessa premissa, realizou-se um estudo prévio da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos óleos de flor e de folha da *A. dealbata*, frente a 8 estirpes, cujos resultados se apresentam na Figura 4 e na Tabela 2.

### Halos de inibição



**Figura 4.** Atividade antimicrobiana das estirpes inibidas simultaneamente pelos extratos de óleos de flor e de folha da *A. dealbata*

**Tabela 2.** Avaliação da atividade antimicrobiana, através da zona de inibição (mm), dos extratos de óleos de flor e de folha da *Acacia dealbata*.

Microrganismo	Flor 0,133 (g/ml)	Folha 0,137 (g/ml)	Controlo (EtOH 70%)
<i>Candida albicans</i>	16	16	13
<i>Bacillus cereus</i>	12	14	≤6
<i>Escherichia coli</i>	13	14	11
<i>Salmonella spp</i>	11	13	11
<i>Acinetobacter baumannii</i>	14	13	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	14	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	≤6	≤6	≤6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤6	≤6	11

De acordo com a Figura 4, pode verificar-se que, nos ensaios preliminares de difusão em disco, o extrato de folha inibiu *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp*, com formação de halos de inibição ao redor dos discos impregnados onde foram depositadas as soluções testadas. O extrato de flor inibiu os mesmos microrganismos que o de folha, com exceção da *Salmonella spp*. Não foi verificada inibição das bactérias *E. faecalis*, nem *P. aeruginosa*, por nenhum dos dois extratos provenientes da mimosa.

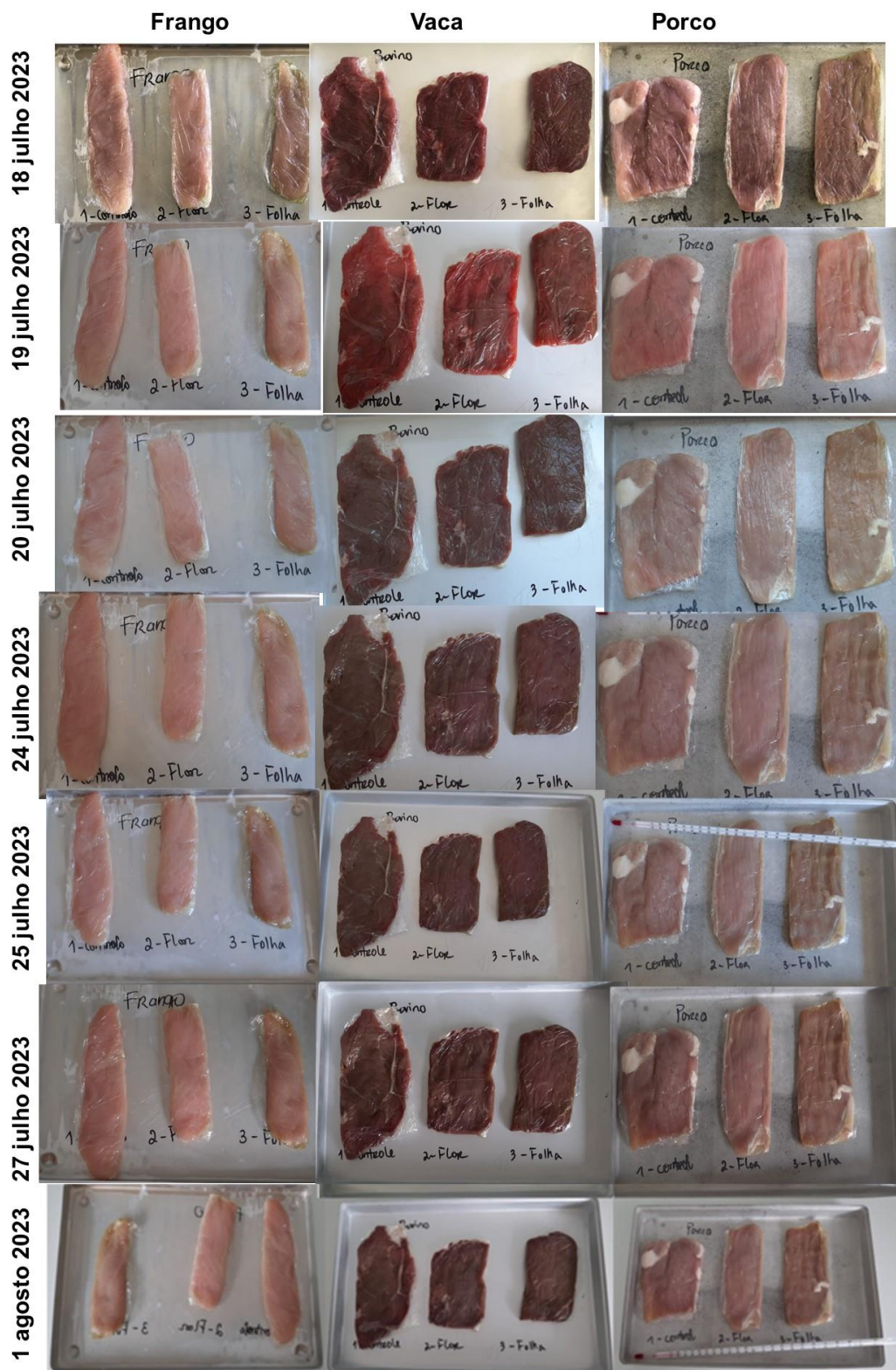
A deterioração da carne pode ser resultante de ação microbiana (bactérias, vírus e parasitas) ou química, sendo esta última associada à oxidação dos constituintes do alimento. Todos os anos, na Europa, a carne está ligada a 2,3 milhões de doenças de origem alimentar, com uma elevada contribuição da carne bovina, sendo muitas destas patologias atribuídas à contaminação bacteriana patogénica (48). Considerando a ação microbiana, a deterioração da carne está relacionada essencialmente com a presença de bactérias psicotróficas, tais como espécies do género *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, entre outras. As bactérias gram-negativas, nomeadamente do género *Pseudomonas*, são frequentemente as responsáveis pelas alterações e perecibilidade da carne. De acordo com Wardhana et al., a carne de frango proveniente de mercados locais da Indonésia, Camboja e Irão apresentava contaminação microbiana, essencialmente por *S. aureus*, *Salmonella spp.*, e *E. coli* (49). A presença de bactérias como *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* é muito preocupante, pois pode originar intoxicações alimentares aos consumidores (48). De entre estas, a infeção por *Salmonella spp.* é a que se encontra associada a maior percentagem de hospitalizações e mortes, sendo esta predominante na carne suína (50, 51). O *B. cereus* também pode provocar intoxicações alimentares, mediante o consumo de alimentos que têm a toxina pré-formada ou resultantes de toxinas produzidas por esta bactéria no intestino humano. A contaminação bacteriana da carne pode acontecer no processo de abate, a partir da água, do ar, do solo, dos trabalhadores e equipamentos envolvidos ou da própria carcaça (52). Esta bactéria pode resistir à temperatura a que cozinhamos a carne, o que leva à germinação e replicação deste patógeno, e à potencial produção de toxinas estáveis ao calor. Fungos, como os do género *Candida*, também são responsáveis pela deterioração da carne.

A avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em disco é um ensaio preliminar, que deverá ser repetido, e confirmado pelo método de microdiluição em placa, que permite determinar a concentração mínima inibitória (CMI) nos extratos vegetais, em relação aos microrganismos cujo crescimento foi inibido.

### **3.2. Avaliação preliminar dos óleos de flor e da folha como conservantes**

Tal como referido anteriormente, a contaminação alimentar advém basicamente do metabolismo das bactérias, que utilizam o alimento como fonte de energia e produzem toxinas e subprodutos, que podem deteriorar e modificar as características dos alimentos (mudança no odor, cor, textura e sabor) e ainda causar danos à saúde (53). Neste trabalho

tentou avaliar-se a alteração de cor das 3 carnes estudadas, cujas imagens se apresentam a seguir (Figura 5).



**Figura 5.** Amostras de carne de frango, bovina e suína após aplicação dos extratos de óleo de flor e de folha de *Acacia dealbata*.

Não se visualizaram alterações significativas entre a cor da carne controle e da que tinha óleo de flor aplicado na superfície, para o mesmo dia do estudo e para qualquer um dos 3 tipos de carne. Relativamente aos bifés revestidos com óleo de folha, estes evidenciaram uma tonalidade amarela/ esverdeada desde o primeiro dia, após aplicação do óleo, o que se justifica pela cor verde intensa do mesmo. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Katiyo et al. (53), que reportam que o uso da cor é um mau indicador de deterioração de carne de frango armazenada por dias diferentes. Os mesmos autores não encontraram correlações entre a cor instrumental e os atributos de aparência e crescimento microbiano nas amostras. As descobertas sugerem que, para os consumidores, o cheiro da carne de frango crua seria um sinal mais confiável de deterioração microbiana do que a aparência.

Mesmo sem ação microbiana, o contacto com o oxigénio do ar e com a humidade, associado à atividade enzimática, promovem o aumento da oxidação lipídica durante o armazenamento refrigerado, levando a alterações de cor, resultantes da deterioração da carne (54, 55). Esta alteração de cor é decorrente de mudanças na estrutura bioquímica da carne. Tratando-se de carne bovina, ocorrem processos oxidativos na mioglobina e oximioglobina durante a refrigeração, na presença de O<sub>2</sub>, transformando-as em metamioglobina, que dá a cor acastanhada à carne (56-59). Como tal, mesmo que a carne seja armazenada no frigorífico, a temperaturas adequadas, o seu consumo deve acontecer no máximo num prazo de 3 dias, devido aos elevados níveis de O<sub>2</sub>.

#### **4. Conclusões**

No âmbito deste trabalho preliminar, aplicaram-se os óleos essenciais da flor e de folha da *A. dealbata*, que mostraram atividade antimicrobiana, diretamente no produto a conservar. Contudo, uma tendência mais recente passa pela aplicação indireta através do material de embalagem, o que poderá ser uma área de investigação a explorar.

Futuramente, dando continuidade a este trabalho deverá fazer-se a avaliação de outros parâmetros da qualidade da carne fresca, para além da cor (pH, alteração de massa, oxidação lipídica, entre outros). A avaliação da cor deverá ser confirmada por um método colorimétrico. No entanto, a atividade antimicrobiana destes óleos, previamente estudada, tem potencial interesse para a prevenção da contaminação das carnes (frango, bovino e

porco) por estirpes como *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

## 5. Agradecimentos

Nesta tão importante etapa da minha vida que se encontra finalizada com a realização deste projeto, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que fosse possível a sua concretização.

Os meus sinceros e memoráveis agradecimentos por toda a orientação e coordenação à Professora Doutora Ana Cristina Vinha e Professora Doutora Carla Sousa e Silva por todos os ensinamentos, lições e conhecimentos que partilharam comigo ao longo de todo este percurso e todo o tempo dispensado.

Foi um gosto enorme participar neste projeto e enfrentar todos os desafios que foram apresentados.

Enorme agradecimento à minha família por todo o apoio possível numa fase tão única e atípica como a vivida neste último ano.

Um enorme obrigado a todos os meus amigos mais próximos que tiveram sempre presentes ao longo de toda esta jornada e me ofereceram sempre o maior suporte possível. Por fim, um agradecimento a todos os colegas de curso que me acompanharam neste percurso.

## 6. Referências bibliográficas

1. Seigler DS. Phytochemistry of Acacia—sensu lato. Biochemical systematics and ecology. 2003;31(8):845-73.
2. Nair KPP. 10 - Wattle. In: Nair KPP, editor. The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World. London: Elsevier; 2010. p. 301-11.
3. da Costa RMF, Bosch M, Simister R, Gomez LD, Canhoto JM, Batista de Carvalho LAE. Valorisation Potential of Invasive *Acacia dealbata*, *A. longifolia* and *A. melanoxylon* from Land Clearings. Molecules. 2022;27(20):7006.

4. Nunes LJR, Raposo MAM, Meireles CIR, Pinto Gomes CJ, Almeida Ribeiro NMC. Carbon Sequestration Potential of Forest Invasive Species: A Case Study with *Acacia dealbata* Link. Resources. 2021;10(5):51.
5. Auddy B, Ferreira M, Blasina F, Lafon L, Arredondo F, Dajas F, et al. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. J Ethnopharmacol. 2003;84(2-3):131-8.
6. Costa DC, Costa HS, Albuquerque TG, Ramos F, Castilho MC, Sanches-Silva A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. Trends in Food Science & Technology. 2015;45(2):336-54.
7. Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science & Technology. 2008;19(3):156-64.
8. Safaei-Ghomi J, Ahd AA. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. Pharmacogn Mag. 2010;6(23):172-5.
9. Papadochristopoulos A, Kerry JP, Fegan N, Burgess CM, Duffy G. Natural Anti-Microbials for Enhanced Microbial Safety and Shelf-Life of Processed Packaged Meat. Foods. 2021;10(7).
10. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. Foods. 2022;11(3):464.
11. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 2000;88(2):308-16.
12. Huang DF, Xu JG, Liu JX, Zhang H, Hu QP. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. Microbiology. 2014;83(4):357-65.
13. Bajpai VK, Sharma A, Baek K-H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. Food Control. 2013;32(2):582-90.
14. Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International. 2011;44(9):3057-64.
15. Cenciarelli O, Pietropaoli S, Gabbarini V, Carestia M, D'Amico F, Malizia A, et al. Use of Non-Pathogenic Biological Agents as Biological Warfare Simulants for the

Development of a Stand-Off Detection System. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2014;6:375-80.

16. Cimino C, Maurel OM, Musumeci T, Bonaccorso A, Drago F, Souto EMB, et al. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):327.

17. Caballero B, Trugo L, Finglas P. *Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10*: Elsevier Science BV; 2003.

18. Koeduka T, Watanabe B, Shirahama K, Nakayasu M, Suzuki S, Furuta T, et al. Biosynthesis of dillapiole/apiole in dill (*Anethum graveolens*): characterization of regioselective phenylpropene O-methyltransferase. *Plant J*. 2023;113(3):562-75.

19. Burčul F, Blažević I, Radan M, Politeo O. Terpenes, Phenylpropanoids, Sulfur and Other Essential Oil Constituents as Inhibitors of Cholinesterases. *Curr Med Chem*. 2020;27(26):4297-343.

20. Pauli A, Kubeczka KH. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Nat Prod Commun*. 2010;5(9):1387-94.

21. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(10):1320-3.

22. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 2012;17(4):3989-4006.

23. Roux DG. The biogenesis of bark and heartwood tannins of some *Acacia* spp. and their taxonomic significance. *South African Journal of Science*. 1962;58(12):389-92.

24. Yadav S, Tiwari KS, Gupta C, Tiwari MK, Khan A, Sonkar SP. A brief review on natural dyes, pigments: Recent advances and future perspectives. *Results in Chemistry*. 2023;5:100733.

25. Paula V, Pedro SI, Campos MG, Delgado T, Estevinho LM, Anjos O. Special Bioactivities of Phenolics from *Acacia dealbata* L. with Potential for Dementia, Diabetes and Antimicrobial Treatments. *Applied Sciences*. 2022;12(3):1022.

26. Oliveira CSD, Moreira P, Resende J, Cruz MT, Pereira CMF, Silva AMS, et al. Characterization and Cytotoxicity Assessment of the Lipophilic Fractions of Different Morphological Parts of *Acacia dealbata*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(5):1814.

27. Rodrigues VH, Portugal I, Silva CM. Experimental optimization of the supercritical fluid extraction of triterpenoids from *Acacia dealbata* Link. Leaves. *Separation and Purification Technology*. 2023;306:122637.

28. Correia R, Duarte MP, Maurício EM, Brinco J, Quintela JC, da Silva MG, et al. Chemical and Functional Characterization of Extracts from Leaves and Twigs of *Acacia dealbata*. *Processes*. 2022;10(11):2429.
29. Debib A, Boukhatem MN. Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of “Chemlali” Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Extracts. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*. 2017;6:38-46.
30. Yildiz S, Gürgen A, Can Z, Tabbouche S, Kilic A. Some bioactive properties of *acacia dealbata* extracts and their potential utilization in wood protection. *Drewno*. 2018;61.
31. Batiha GE-S, Akhtar N, Alsayegh AA, Abusudah WF, Almohmadi NH, Shaheen HM, et al. Bioactive Compounds, Pharmacological Actions, and Pharmacokinetics of Genus *Acacia*. *Molecules*. 2022;27(21):7340.
32. Silva E, Fernandes S, Bacelar E, Sampaio A. Antimicrobial activity of aqueous, ethanolic and methanolic leaf extracts from *acacia* spp. and *eucalyptus nicholii*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016;13(6):130-4.
34. Neiva D, Luís Â, Gominho J, Domingues F, Duarte A, Pereira H. Bark residues valorization potential regarding antioxidant and antimicrobial extracts. *Wood Science and Technology*. 2020;54.
35. Teshome E, Forsido SF, Rupasinghe HPV, Olika Keyata E. Potentials of Natural Preservatives to Enhance Food Safety and Shelf Life: A Review. *ScientificWorldJournal*. 2022;2022:9901018.
36. Poljsak B, Kovač V, Milisav I. Antioxidants, Food Processing and Health. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(3).
37. Karwowska M, Kononiuk A. Nitrates/Nitrites in Food-Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3).
38. Freedman BJ. Sulphur dioxide in foods and beverages: its use as a preservative and its effect on asthma. *Br J Dis Chest*. 1980;74(2):128-34.
39. Evstatiev R, Cervenka A, Austerlitz T, Deim G, Baumgartner M, Beer A, et al. The food additive EDTA aggravates colitis and colon carcinogenesis in mouse models. *Sci Rep*. 2021;11(1):5188.
40. Bhisare D, Thyagarajan D, Churchil R, Punniamurthy N. Bacterial Pathogens in Chicken Meat: Review. 2014;2:1-7.
41. Nørrung B, Buncic S. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*. 2008;78(1):14-24.

42. Roberts T. Microbial Pathogens in Raw Pork, Chicken, and Beef: Benefit Estimates for Control Using Irradiation. *American Journal of Agricultural Economics*. 1985;67(5):957-65.
43. Song T, Qian S, Lan T, Wu Y, Liu J, Zhang H. Recent Advances in Bio-Based Smart Active Packaging Materials. *Foods*. 2022;11(15):2228.
44. (INE) INdE. Consumo humano de carne per capita (kg/ hab.) por Tipo de carnes; Anual - INE, Balanço de aprovisionamento de produtos animais 2020, 2021 e 2022. 2022.
45. Holman BWB, Collins D, Kilgannon AK, Hopkins DL. The effect of technical replicate (repeats) on Nix Pro Color Sensor™ measurement precision for meat: A case-study on aged beef colour stability. *Meat Sci*. 2018;135:42-5.
46. Voon HC, Bhat R, Rusul G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012;11(1):34-55.
47. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
48. Tesson V, Federighi M, Cummins E, de Oliveira Mota J, Guillou S, Boué G. A Systematic Review of Beef Meat Quantitative Microbial Risk Assessment Models. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(3).
49. Wardhana DK, Haskito AEP, Purnama MTE, Safitri DA, Annisa S. Detection of microbial contamination in chicken meat from local markets in Surabaya, East Java, Indonesia. *Vet World*. 2021;14(12):3138-43.
50. Ngo HHT, Nguyen-Thanh L, Pham-Duc P, Dang-Xuan S, Le-Thi H, Denis-Robichaud J, et al. Microbial contamination and associated risk factors in retailed pork from key value chains in Northern Vietnam. *Int J Food Microbiol*. 2021;346:109163.
51. Remenant B, Jaffrès E, Dousset X, Pilet MF, Zagorec M. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiol*. 2015;45(Pt A):45-53.
52. Osman, K.M., Kappell, A.D., Orabi, A. Poultry and beef meat as potential seedbeds for antimicrobial resistant enterotoxigenic *Bacillus* species: a materializing epidemiological and potential severe health hazard. *Sci Rep*. 2018;8:11600.
53. Katiyo W, De Kock R, Coorey R, Buys E. Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage. *LWT*. 2020;128:109468.

54. Milani LIG, Terra NN, Fries LLM, Cichoski AJ, Rezer APdS, Backes ÂM, et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2012;15:118-24.
55. Coombs CE, Holman BW, Friend MA, Hopkins DL. Long-term red meat preservation using chilled and frozen storage combinations: A review. *Meat Sci*. 2017;125:84-94.
56. Yang S, Pei X, Yang D, Zhang H, Chen Q, Chui H, et al. Microbial Contamination in Bulk Ready-to-eat Meat Products of China in 2016. *Food Control*. 2018;91.
57. Rather MA, Aulakh RS, Gill JPS, Ghatak S. Enterotoxin gene profile and antibiogram of bacillus cereus strains isolated from raw meats and meat products. *Journal of Food Safety*. 2012;32(1):22-8.
58. Matarante A, Baruzzi F, Cocconcelli PS, Morea M. Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(9):5168-76.
59. Tewari A, Singh SP, Singh R. Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *J Food Sci Technol*. 2015;52(3):1796-801.