

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**AValiação da Atividade Antibacteriana de *Adansonia digitata*  
L. e *Euclea natalensis* A.DC: SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NUM  
PRODUTO CÁRNEO**

Maria dos Anjos Samuel Quilombo Valente

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor António Salvador Ferreira Henriques  
Barreto

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

**ORIENTADORA**

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2017

LISBOA

---



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Adansonia digitata*  
L. E *Euclea natalensis* A.DC: SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NUM  
PRODUTO CÁRNEO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

Maria dos Anjos Samuel Quilombo Valente

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques  
Barreto

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADORA

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2017

LISBOA

## **Dedicatória:**

À memória do meu pai “Velho jovem, meu, moi” como carinhosamente o chamavamos pelo apoio moral e psicológico que sempre nos deu, pois foi mais que um pai, foi um amigo e conselheiro que soube dar sempre uma palavra de incentivo e apoiou-nos nos bons e maus momentos. Dedico principalmente a ele esta dissertação, pois foi este homem de garra que me ensinou a ser perseverante quando queremos atingir os nossos objetivos.

Ao meu esposo Armando Manuel Valente pelo apoio compreensão, carinho e por ser o meu porto seguro cada vez que precisei, lá estava com uma palavra de conforto, para que este sonho se tornasse realidade.

E aos meus filhos:

Divaldo Valente

Natália Valente

Jandira Valente

João Valente

Márcia Valente

Pelo apoio, amor, carinho e dedicação. Foram dias difíceis, e esta é a prova de que é preciso sermos guerreiros quando queremos atingir os nossos objetivos.



## **Agradecimentos:**

Nada seria possível sem contar com o apoio dos meus familiares, em especial da minha mãe e do tio João Maria. Agradeço a todos o encorajamento para concluir este trabalho.

À Dra. Cleonice Costa, agradeço o seu importante apoio e confiança.

Foi difícil, mas consegui vencer graças ao apoio de pessoas queridas a quem quero agradecer

À Prof. Dra. Maria João Fraqueza minha orientadora, pela disponibilidade, dedicação e por me ter mostrado que a exigência e o rigor são a chave para uma melhor aprendizagem.

À Eng. Maria José Fernandes e à Sra. D. Maria Helena Fernandes, não tenho palavras para descrever o quanto foram importantes e continuam a ser, obrigada por todo o vosso amor carinho e amizade.

À Sra. D. Maria de Jesus, ” Ju” ,até hoje carrego as suas palavras, na vida vivemos uns para os outros. Obrigada querida.

À Prof. Dra. Cristina Mateus Alfaia, que desde o primeiro momento acreditou que era possível encontrar um tema de trabalho com a *múkua*, obrigada pelo seu incentivo e sobretudo a sua dedicação para que o trabalho chegasse ao fim.

Ao Prof. Dr. João Salavessa pelo envio das raízes de *Euclea natalensis* A.DC (*mulala*) de Nampula, Moçambique.

Lembro ainda a Prof. Dra. Marília Ferreira e o Prof. Dr. António Barreto, que todos os dias tinham uma palavra encorajadora. Fui abençoada, muito obrigada pelo vosso carinho.

Os meus agradecimentos vão também para Sra. D. Paula, Sr André de Nascimento, Dr Londa Vueba, Dr. Pedro Guilherme, Dr. Sebastião José, Dr. Francisco Simão, Dr. Pepe Lamassares, Dra Ana Rita, Dra Amélia Vueba. E aos colegas André Rocha, Ana Margarida, Ellen Moisés, Laura Luzia, Isabel Salgueiro e a todos quanto me apoiaram para o término deste trabalho.

À Prof. Dra. Isabel Neto, pela força quando achei que tudo estava perdido, ofereceu-me ajuda, obrigada.

À família Fonseca, dizer obrigada é pouco. As últimas palavras de encorajamento do meu pai foram na vossa casa, o meu muito obrigada por me ajudarem com os meus filhos. Hoje cheguei ao fim graças a esse apoio.

Para terminar agradeço à minha colega Susana por me livrar do sofrimento de várias vezes enfrentar o frio da madrugada e o perigo para chegar a casa. O seu apoio incondicional foi o começo de uma nova era, minha salvadora, o meu muito obrigada pela compreensão.

É enorme a relação de pessoas que muito contribuíram em prol deste trabalho e como é lógico muitos não poderão ser citados aqui, mas a todos eles expresseo o meu eterno agradecimento.



## Resumo -

O objetivo do presente estudo, foi avaliar a atividade antibacteriana dos extratos orgânico e aquoso de *múkua* e *mulala*. Para tal, foi utilizada uma metodologia modificada a partir de Vuyst, Callewaert & Pol (1996), utilizando como indicadores *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. O extrato orgânico de *mulala* demonstrou ter efeito inibitório em *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* e não evidenciou nenhum efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* e *E. coli*. No caso do extrato aquoso de *múkua*, observou-se um efeito inibitório em *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*, não tendo sido registado efeito inibitório em *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Posteriormente, realizou-se um ensaio experimental de aplicação dos extratos de *múkua* e *mulala* no fabrico de um preparado de carne tendo-se utilizado como modelo almôndegas. Para avaliar o efeito antimicrobiano sobre a microbiota da carne, adicionou-se 5%, de extrato de *múkua* e 1,5% de extrato de *mulala*. As almôndegas foram embaladas em atmosfera protetora e em aerobiose sendo conservadas a 4 °C durante 22 dias. Efetuaram-se contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, *Brochothrix thermosphacta*, bactérias ácido lácticas, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* coagulase-negativa ao longo do período de armazenamento (0, 4, 8, 12, 18 e 22 dias). Nas almôndegas adicionadas de 5% de *múkua* observou-se um maior efeito inibitório para todos os grupos de microrganismos estudados, sendo maior nas *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase-negativa e *B. thermosphacta*. Realizou-se um segundo ensaio com a aplicação do extrato de 1% de *múkua* em salsichas embaladas em atmosfera protetora, conservadas a 7 °C durante 30 dias. Efetuaram-se contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido lácticas ao longo do período de armazenamento (0, 5, 10, 20 e 30 dias). Os extratos vegetais utilizados, mostraram ser efetivos na inibição dos microrganismos patogénicos e de deterioração estudados, tendo-se revelado o extrato aquoso com adição de 5% de *múkua* o melhor candidato como aditivo natural a utilizar em produtos cárneos. Os resultados evidenciaram que a adição de *múkua* aos preparados de carne durante o armazenamento reduziu o pH do produto, o que favorece a inibição da multiplicação bacteriana. Os resultados demonstraram que a cor não foi influenciado significativamente  $P > (0,05)$  pelos diferentes tipos de embalagem (aerobiose e atmosfera protetora) a que foram sujeitos os preparados de carne durante os dias de armazenamento. Nas salsichas adicionadas de 1% de *múkua* observou-se um efeito inibitório nas *Enterobacteriaceae* no dia 20 mas de modo geral não ocorreu qualquer inibição da microbiota presente.

**Palavras-chave:** *Adansonia digitata*, *Euclea natalensis*, atividade antibacteriana, conservante natural.

## Abstract -

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of organic and aqueous extracts *múkua* and *mulala*. Therefore, a modified method of Vuyst, Callewaert Pol (1996), was employed to test their inhibitory effect using *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* as indicators. The organic extract of *mulala* demonstrated an inhibitory effect on *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* and *S. aureus* but did not show any inhibitory effect on *L. monocytogenes* and *E. coli*. In the case of the aqueous extract of *múkua* was shown an inhibitory effect on *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* and *E. coli* but no effect on *S. aureus* and *L. monocytogenes*. In the case of the aqueous extract of *múkua*, an inhibitory effect was observed in *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* and *E. coli*; no inhibitory effect was observed on *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Subsequently, an experimental test of *múkua* and *mulala* extracts application was carried out in the manufacture of a prepared meat product using meatballs as a model. To evaluate the antibacterial effect on the meat microbe added 5% of extract *múkua* and 1,5 % extract *mulala* was added. The meatballs were packed in a protected atmosphere and aerobically being conserved at 4 °C during 22 days. The total microorganism aerobic at 30 °C, *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and *S. coagulase-negative* counts were performed, during the storage period (0, 4, 8, 12, 18 and 22 days). A strong inhibitory effect for all groups of microorganisms studied were observed in 5% *múkua* meatballs, mainly on *Enterobacteriaceae*, coagulase-negative staphylococci and *Brochothrix thermosphacta*. A second experimental application with 1% *múkua* extract in sausages packed in a protected atmosphere and stored at 7 °C for 30 days was assessed. The total microorganism aerobic at 30 °C, *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria counts were evaluated throughout the storage period (0, 5, 10, 20 and 30 days). In the meatballs with 5% *múkua* was observed an inhibitory effect on microbiota development, which may be considered a good candidate as natural preservative. The results showed that addition of *múkua* to the meat pre-cooked during storage reduced the pH of the product, increasing the inhibition of bacterium multiplication. The results showed that the color was not significantly influenced  $P > 0,05$  by the different types of aerobic packaging and protective atmosphere to which the meat preparations were subjected during storage days. In the added sausages with 1% *múkua* an inhibitory effect was observed on *Enterobacteriaceae* at day 20, but generally no inhibition occurred in the present microbiota.

**Palavras-chave:** *Adansonia digitata*, *Euclea natalensis*, antibacterial activity, natural preservatives.

## Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de abreviaturas e símbolos .....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
1.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA <i>MÚKUA</i> E DA <i>MULALA</i> .....	3
1.1.1 A árvore Embondeiro ou imbondeiro.....	3
1.1.1.1 Distribuição geográfica e comercialização de <i>múkua</i> .....	4
1.1.1.2 O fruto de <i>Adansonia digitata</i> L. ( <i>Múkua</i> ).....	5
1.1.1.3 Nomes vernáculos de <i>Adansonia digitata</i> L.....	6
1.1.1.4 Lendas e mitos de <i>Adansonia digitata</i> L.....	6
1.1.2 A planta <i>Euclea natalensis</i> A.DC ( <i>Mulala</i> ).....	7
1.1.2.1 Distribuição geográfica e comercialização de <i>Mulala</i> .....	7
1.1.2.2 A planta de <i>Euclea natalensis</i> A.DC ( <i>Mulala</i> ).....	7
1.1.2.3 Nomes vernáculos de <i>Euclea natalensis</i> A.DC( <i>Mulala</i> ).....	8
1.1.2.4 Lendas e mitos de <i>Euclea natalensis</i> A.DC ( <i>Mulala</i> ).....	8
1.1.3 Caracterização química da <i>Múkua</i> e <i>Mulala</i> .....	9
1.1.4 Atividade antioxidante da <i>Múkua</i> .....	11
1.1.4.1 Ácido ascórbico (vitamina C).....	11
1.1.5 Importância económica e potenciais aplicações de <i>Adansonia digitata</i> L. e <i>Euclea natalensis</i> A.DC.....	12
1.1.5.1 <i>Adansonia digitata</i> L.....	12
1.1.5.2 <i>Euclea natalensis</i> A.DC.....	15
1.2 CARATERIZAÇÃO DE PREPARADOS DE CARNE.....	15
1.2.1 Definição de preparado de carne.....	15
1.2.1.1 Definição de salsicha fresca.....	16
1.2.2 Adição de especiarias ou outros condimentos em preparados de carne.....	16
1.2.2.1 Aditivos.....	17
1.2.3 Caraterísticas de higiene e segurança.....	17
1.2.3.1 Indicadores microbiológicos de qualidade higiénica do processo de fabrico e de segurança de géneros alimentícios.....	18
1.2.3.1.1 Microrganismo aeróbios totais a 30°C.....	19
1.2.3.1.2 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	19
1.2.3.1.3 Bactéria ácido láctico.....	20
1.2.3.1.4 <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	21
1.2.3.1.5 <i>Pseudomonas spp.</i> .....	21

1.2.3.1.6	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
1.2.3.1.7	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
1.2.3.1.8	<i>Salmonella spp.</i> .....	23
1.2.3.1.9	<i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>ADANSONIA DIGITATA</i> L. E <i>EUCLEA NATALENSIS</i> A.DC: SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NUM PRODUTO CÁRNEO</b>	<b>25</b>
2.1	JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS .....	25
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
2.2.1	Desenho experimental .....	25
2.2.2	Colheita de <i>múkua</i> e das raízes de <i>mulala</i> .....	26
2.2.3	Preparação de <i>múkua</i> e das raízes de <i>mulala</i> .....	26
2.2.4	Preparação dos extratos .....	27
2.2.5	Preparação e diluição dos extratos.....	27
2.2.6	Ensaio da atividade antibacteriana do extrato orgânico e extrato aquoso de <i>múkua</i> e <i>mulala</i> .....	28
2.2.7	Metodologia para avaliação da atividade antibacteriana .....	29
2.2.8	Aplicação do extrato de <i>múkua</i> e <i>mulala</i> em preparado de carne embalado em atmosfera protetora e em aeróbios.....	31
2.2.8.1	Procedimento tecnológico para a elaboração de almôndegas .....	32
2.2.9	Aplicação do extrato com adição de 1% de <i>múkua</i> em salsicha fresca .....	33
2.2.9.1	Procedimento tecnológico para a elaboração de salsicha.....	34
2.2.10	Análises Microbiológicas .....	34
2.2.10.1	Preparação da amostra .....	34
2.2.10.2	Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 ° C .....	35
2.2.10.3	Contagem de bactérias ácido láctico.....	35
2.2.10.4	Contagem de <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	35
2.2.10.5	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	36
2.2.10.6	Contagem de <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> .....	36
2.2.11	Análises físico-químicas.....	36
2.2.11.1	Determinação do pH.....	36
2.2.11.2	Determinação da cor .....	36
2.2.11.3	Determinação do gás O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> .....	37
2.2.12	Análise estatística dos resultados .....	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
3.1	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EO E EA DE <i>MULALA</i> E <i>MÚKA</i> .....	38
3.2	EFEITO DA APLICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>MULALA</i> E DE <i>MÚKUA</i> NUM PREPARADO DE CARNE-MODELO.....	41
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>

4.1	RECOMENDAÇÕES .....	52
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - A árvore do embondeiro no município de Belas, bairro projeto Nova Vida, Luanda-Angola.....	3
Figura 2 - Distribuição da <i>A. digitata</i> L.(Venter & Witkowski, 2010a).....	4
Figura 3 - O fruto do embondeiro ( <i>múkua</i> ) (a) fruto do embondeiro aberto (b) (originais) .....	5
Figura 4 - Sementes de <i>múkua</i> envolvidas na polpa (a) Fibras e sementes de <i>múkua</i> (b) (originais).....	5
Figura 5 - A raiz de <i>E. natalensis</i> A.DC. ....	8
Figura 6 - Procedimento utilizado para obtenção dos extratos de <i>múkua</i> e das raízes de <i>mulala</i> . .....	28
Figura 7 - Processo de avaliação da atividade antibacteriana dos extratos <i>múkua</i> e de <i>mulala</i> , adaptado de Vuyst, <i>et al.</i> (1996). ....	31
Figura 8. Aspeto da salsicha fresca embalada: testemunha (a) com adição de 1% de <i>múkua</i> (b) .....	34
Figura 9 - Atividade do extrato orgânico de <i>mulala</i> na inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> e <i>E. coli</i> .....	38
Figura 10 - Atividade do extrato aquoso de <i>mulala</i> na inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> e <i>E. coli</i> . ....	39
Figura 11 - Atividade do extrato orgânico de <i>múkua</i> na inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> e <i>E. coli</i> .....	40
Figura 12 - Atividade do extrato aquoso de <i>múkua</i> na inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritid</i> e <i>E. coli</i> .....	40
Figura 13 - Evolução ( médias dias) de diferentes grupos microbianos (a), (b), (c ) e (d) em almôndegas (Testemunha, 1,5% de <i>Mulala</i> e 5% de <i>Múkua</i> embaladas em atmosfera protetora e aerobiose armazenadas a 4°C durante 22 dias. ....	41
Figura 14 - Multiplicação (log /g) de <i>Brochothrix thermosphacta</i> , para as três formulações de almôndegas (a) e por tipo de embalagem (b).....	44
Figura 15 - Avaliação do pH nas três formulações de almôndegas .....	44
Figura 16 - Avaliação da cor nas três formulações de almôndegas .....	46
Figura 17 - Curva de multiplicação de A.T a 30° C e BAL em duas formulações de salsichas frescas (testemunha e adicionada de 1% <i>múkua</i> ) armazenadas ao longo do tempo de armazenamento .....	47

Figura 18 - Curva de multiplicação das <i>Enterobacteriaceae</i> , em duas formulações de salsichas frescas armazenadas ao longo do tempo de armazenamento .....	49
Figura 19 - Avaliação do pH nas duas formulações de salsichas frescas.....	50
Figura 20 - Avaliação dos gases O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> presente nas salsichas frescas.....	51

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição química da polpa de <i>múkua</i> (adaptado por Kamatou et al., 2011).....	10
Tabela 2 - Comparação dos teores de vitamina C (mg/100 g) presentes na <i>múkua</i> e noutros frutos. ....	12
Tabela 3 - Algumas aplicações da árvore <i>A. digitata</i> na medicina tradicional em África (Kamatou et al., 201). ....	14
Tabela 4 - Identificação das estirpes selecionadas para o estudo. ....	29
Tabela 5 - Matéria prima e quantidades utilizadas na elaboração das almôndegas.....	33
Tabela 6 - Matérias primas e quantidades utilizadas na elaboração das salsichas.....	33

## Lista de abreviaturas e símbolos

*A. suarezensis* - *Adansonia suarezensis*

*A. digitata* L. - *Adansonia digitata* Lineu

*A. fony* – *Adansonia fony*

*A. grandidieri*- *Adansonia grandidieri*

*A. gregorri* – *Adansonia gregorri*

*A. madagascariensis* - *Adansonia madagascariensis*

*A. perrieri* – *Adansonia perrieri*

*A. za* - *Adansonia za*

$\alpha$  – Alfa

*B. termosphacta* – *Brochothrix termosphacta*

BAL - bacteria ácido lácticas

BHI- Brain and Heard Infusion

$\beta$  – Beta

CE – Comunidade Europeia

CFU – Unidade Formadora de Colónias

cm – Centímetro

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade ótica

*E. natalensis* – *Euclea natalensis*

*E. coli* – *Escherichia coli*

EAEC - *E. coli* entero agregativa

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

EHEC - *E. coli* entero-hemorrágica

EIEC - *E. coli* entero invasiva

EPEC - *E. coli* enteropatogénica

ETEC – *E. coli* toxinogénica

EU – União Europeia

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

FDA - Food and Drug Administration

FIB- Food Ingredients Brasil

g – grama

*L. monocytogenes* – *Listeria monocytogenes*

Log – Logaritmo

m- metros

mg – Miligrama

ml – Mililitro

μL- Microlitro

NP – Norma Portuguesa

O<sub>2</sub> – Oxigénio

OIE – Organização Internacional de Epizootias

*P. aeruginosa* – *Pseudomona aeruginosa*

pH – Potencial Hidrogeniónico

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*S. Enteritidis* - *Salmonella* Enteritidis

UNCTAD - United Nations Conference on Trade and Development

VTC - *E. coli* verotoxigenica

°C – Graus Celsius

% – Percentagem

## Introdução

É direito das pessoas, terem a expectativa de que os alimentos que consomem são seguros e adequados para o consumo. As doenças e os danos provocados por alimentos não seguros são, na melhor das hipóteses, desagradáveis, e, na pior das hipóteses, fatais. Portanto, um controle eficaz da qualidade higiosanitária dos alimentos torna-se imprescindível para se evitar consequências prejudiciais na saúde e na economia. Assim, todos os intervenientes na cadeia alimentar têm a responsabilidade de garantir que o alimento seja seguro e adequado para consumo (*Codex Alimentarius*, 2006).

Neste contexto, o uso de antibacterianos naturais, nos quais se incluem os compostos de origem vegetal com capacidade para inibir a multiplicação de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, constituem cada vez mais uma nova e promissora forma de garantir alimentos seguros, mantendo-se inalteradas a sua qualidade nutricional e organoléptico. Estes compostos vegetais podem conter substâncias com propriedades benéficas, como os flavonóides, taninos e outras substâncias com ação antibacteriana (Food Ingredients Brasil [FIB], 2010; Kamatou, Vermaak, & Viljoen, 2011).

*Adansonia digitata L.*, ou simplesmente o embondeiro, é uma árvore presente nas zonas de savanas quentes e secas de Angola e de alguns outros países Africanos. Com o seu fruto, vulgarmente conhecido em Angola por *múkua*, preparam-se algumas bebidas refrescantes (sumo), doces, geleias e gelados, como aplicações mais comuns. O seu interesse vem crescendo nos últimos anos, reconhecendo-se-lhe como provam alguns estudos científicos, acção antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (Rahul *et al.*, 2015).

Segundo alguns autores, a *múkua* é muita rica em vitamina C (ácido ascórbico) tendo aproximadamente um teor sete vezes superior ao da laranja (Kaboré, *et al.*, 2011; Kamatou *et al.*, 2011), além do que deve as suas potenciais propriedades benéficas, a substâncias com triterpenos e compostos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos entre outros. Estes compostos secundários presentes no fruto do embondeiro parecem contribuir para a sua capacidade antibacteriana, o que poderá justificar o seu uso popular no tratamento de muitas doenças com sinais clínicos associados de febre, diarreias, disenterias (Kubmarawa, Ajoku, Enwerem, & Okorie, 2007; Kamatou *et al.*, 2011).

Outra espécie vegetal com potenciais propriedades antibacterianas é a *Euclea natalensis* A.DC, que é muito utilizado por alguns povos de África, sobretudo em Moçambique, na higiene bucal (dentes) e para fins terapêuticos, em particular pelos terapeutas tradicionais, por apresentarem na sua composição substâncias como as naftoquinonas, em particular 7-metiljuglona, diospirina e triterpenos pentacíclicos que lhe conferem propriedades

antibacterianas (Filipe, Gomes, Serrano & Silva, 2008). A *E. natalensis* A.DC, vulgarmente conhecida por *mulala* em Moçambique e por Pau-Preto em Angola, é uma árvore da família *Ebenaceae* que se distribui nos trópicos da África subtropical, sendo muito comum na costa leste da África do Sul (Xavier, 2011).

A utilização e valorização destas espécies vegetais devido às suas propriedades antibacterianas, poderão, eventualmente estender-se aos alimentos, pelo que se levou a cabo o presente trabalho cujos objetivos são:

- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *múkua* e *mulala* sobre algumas espécies microbianas potencialmente deterioradoras ou patogénicas, presentes nos alimentos, nomeadamente nos produtos cárneos;
- Avaliar o efeito da aplicação de extratos de *múkua* e de *mulala*, no controlo da deterioração microbiana de um preparado de carne – modelo as almôndegas, selecionando o extrato que se adegue melhor para aumentar o período de conservação deste produto cárneo em condições de armazenamento em embalagem protetora e em aerobiose mantida em refrigeração a 4 °C durante 22 dias.
- Aplicar o extrato vegetal com maior potencial antibacteriano em salsichas frescas embaladas em atmosfera protetora e mantidas em refrigeração a 7 °C durante 30 dias.

## 1 Revisão bibliográfica

### 1.1 Caracterização botânica da *Múkua* e da *Mulala*

#### 1.1.1 A árvore Embondeiro ou imbondeiro

*Adansonia digitata* L., é o nome científico atribuído à árvore do embondeiro, pertencente à família *Malvaceae*. Esta designação *Adansonia* foi atribuída em homenagem a Michel Adanson (1727-1806), que descreveu a árvore pela primeira vez, depois de uma viagem realizada ao Senegal (Rahul *et al.* 2015). É uma árvore originária das savanas quentes e secas da África Central e Austral. Este género é constituído por oito espécies, sete encontram-se no continente africano das quais seis são restritas à ilha de Madagáscar, nomeadamente *A. madagascariensis*, *A. perrieri*, *A. fony*, *A. za*, *A. suarezensis*, *A. grandidieri*, uma de África *A. digitata* e uma endémica da Austrália a *A. Gregorri* (Kamatou, *et al.*, 2011; Sanchez, Osbom & Hag, 2010).

A árvore, em função do povo ou região onde se encontra possui muitos nomes comuns, sendo o *Baobab*, o nome mais conhecido em muitos países africanos e o seu fruto é conhecido por *baobá*. Em Angola, a árvore é conhecida pelo nome de embondeiro ou imbondeiro (Figura 1) e o seu fruto é denominado de *múkua* ( Kuende, 2010).

Figura 1 - A árvore do embondeiro no município de Belas, bairro projeto Nova Vida, Luanda- Angola.



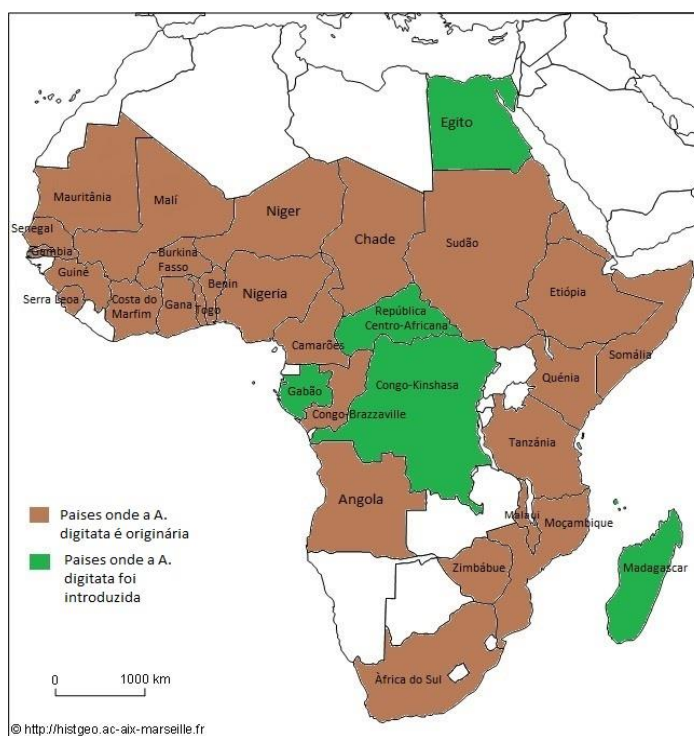
O embondeiro apresenta folhagem muito caduca, atingindo alturas entre 5 a 25 metros e mais excepcionalmente 30 metros; o tronco robusto e espesso na base, pode apresentar 7 metros de perímetro podendo por vezes atingir 11 metros (Magaia, 2015). Podem viver milhares de anos, provavelmente pela capacidade de armazenar até 120.000 litros de água. As

árvores prosperam em florestas e savanas até aos 1500 metros de altitude acima do nível do mar, com uma precipitação anual de 300 a 500 mililitros (Wickens, 2008).

#### 1.1.1.1 Distribuição geográfica e comercialização de *múkua*.

A *A. digitata L.*, ou simplesmente a árvore do embondeiro é amplamente distribuída por toda a floresta e savana quente da África subsariana (Caluwé, Halamová & Van Damme, 2010). Na África Austral, é comum encontrar a árvore do embondeiro em Malawi, Zimbábue, Angola, Moçambique e principalmente na África do Sul. Na África oriental, o embondeiro é encontrado no Quênia, Uganda e Tanzânia, podendo ainda ser encontrado na parte noroeste de África, nomeadamente no Mali, Benin, Senegal, Costa do Marfim, Camarões e Burkina Faso (Venter & Witkowski, 2010a). Na Figura 2 está representada o mapa de países onde se encontra distribuída a *A. digitata L.*

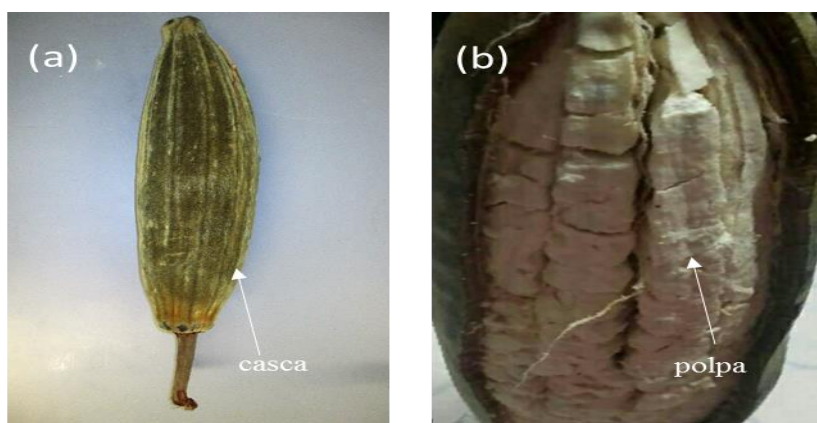
Figura 2 - Distribuição da *A. digitata L.* (Venter & Witkowski, 2010a)



### 1.1.1.2 O fruto de *Adansonia digitata* L. (*Múkua*)

Os frutos do embondeiro, designados por *múkua*, quando maduros, medem de 12 a 40 cm de comprimento, com formatos variáveis, ovoides a cilíndricos. O fruto apresenta uma cápsula resistente, epicarpo, tal como representado na Figura 3, variando entre 7,5- 54 cm de comprimento. A polpa comestível (Figura 3b) apresenta coloração esbranquiçada ou rosa, textura farinhenta seca, desfaz-se na boca e possui um sabor ligeiramente ácido, (Kivoloka, 2015).

Figura 3 - O fruto do embondeiro (*múkua*) (a) fruto do embondeiro aberto (b) (originais)

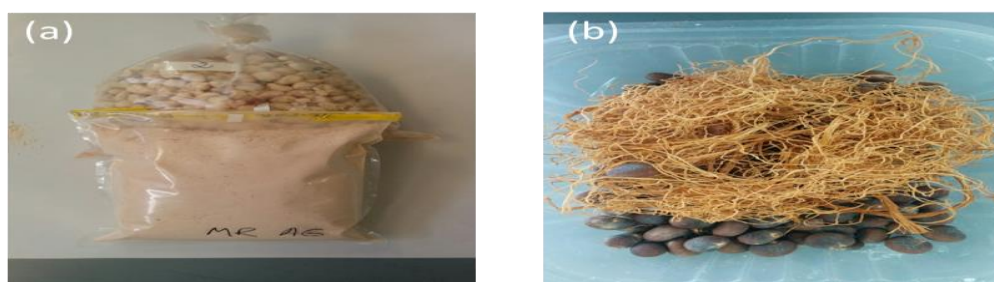


Os frutos não abrem na época da maturação, são abertos quando quebrados ou se caírem sobre uma superfície dura. A colheita dos frutos é efetuada trepando nas árvores ou utilizando varas compridas, ou recolhendo-os do chão, caídos naturalmente ou por influência do vento (Kivoloka, 2015).

Estes frutos, atualmente, têm merecido especial atenção por parte dos investigadores devido as inúmeras propriedades que parecem possuir (Kuende, 2010).

As sementes do fruto estão envolvidas pela polpa (Figura 4a) apresentando uma coloração castanho-escura ou preta avermelhada, em forma de rim, enquanto as fibras são vermelhas ou esbranquiçadas, dividindo a polpa (Figura 4b) em segmentos (Wickens, 2008).

Figura 4 - Sementes de *múkua* envolvidas na polpa (a) Fibras e sementes de *múkua* (b) (originais)



### 1.1.1.3 Nomes vernáculos de *Adansonia digitata* L.

Em Angola, a árvore é maioritariamente conhecida como embondeiro ou imbondeiro, tendo cada região outras formas de o denominar, conforme a língua praticada em cada um desses povos. Assim, é denominada *Nkondo* pelos habitantes das províncias do Zaire e Uíge (*Mokongos*), e os da província de Cabinda (*Fiotes*). Já o povo *Umbundo*, da província de Benguela e Huíla, chama-lhe *Ukwa* e o povo *Kimbundo*, nas províncias de Luanda e Malange, denominam a árvore de *Mbondo* (E. NKombo, comunicação pessoal, novembro 15, 2015).

Na língua tigrigna da Etiópia a árvore é conhecida por *Momret* e em Suali como *Muou*, *Mkuu*, *Hapingwa*, *Mkuu hafungwa* e *Muuyu*. Pelos povos da língua Hausa, da África Ocidental, é conhecida por *Kuka*. Na língua Francesa é denominada por “arbre de mille ans” (árvore de mil anos) ou “calebassier du Senegal,” nome que deu origem a “Calabaceira” em Português, tal como é conhecida pelos povos de Guiné- Bissau e Cabo Verde. Também pode ser chamada de árvore de creme tártaro (Kuende, 2010).

No entanto, entre a comunidade científica o embondeiro é designado como “Chemistry tree” (árvore da química) (Kuende, 2010). Outros nomes de carácter menos científico foram atribuídos ao embondeiro tais como: árvore do rato morto, devido à forma como os frutos se encontram na árvore; árvore do macaco- pão, devido à associação feita à pele do macaco e pelo seu interior seco semelhante a farinha; árvore de cabeça para baixo devido à morfologia dos ramos esparsos se assemelharem a uma raiz; árvore garrafa porque pode armazenar no seu caule até 120.000 litros de água (Rahul *et al.*, 2015; Waldman, 2015).

O fruto é maioritariamente conhecido em Angola como *múkua*. Já na África ocidental é conhecido como *baobá* provavelmente proveniente da palavra árabe *bu-hibab* que significa fruto de muitas sementes (Kuende, 2010). Em Moçambique a designação varia sendo em algumas regiões *Mulambe* e noutras *Ulapha* (D. Cabral, comunicação pessoal, maio 2, 2016).

### 1.1.1.4 Lendas e mitos de *Adansonia digitata* L.

Uma das lendas africanas mais conhecidas sobre a origem dos embondeiros conta que no momento da criação, Deus presenteou todos os animais com a semente de uma árvore. O babuíno, um macaco conhecido pela sua preguiça, recebeu as sementes da *múkua* e, ao invés de as plantar, jogou-as na terra. As sementes germinaram de cabeça, deixando as raízes da árvore a descoberto e a sua copa enterrada. Alguns povos africanos atribuem a aparência da árvore a esta incrível lenda.

Uma segunda lenda diz que a árvore reinava sobre a África, mas o embondeiro era tão soberbo que os deuses se enfureceram e colocaram-no de cabeça para baixo como castigo. A lenda narra ainda que aqueles que comerem do seu fruto serão amaldiçoados com a morte pela boca de um leão (Eder & Rezende, 2012).

### 1.1.2 A planta *Euclea natalensis* A.DC (*Mulala*)

A *E. natalensis* A.DC é um arbusto ou uma pequena árvore da família *Ebenaceae*, pertencente ao género *Euclea*. Em Moçambique é conhecida como *mulala* e em algumas regiões de Angola é conhecida pelo nome de pau preto em outras de *Mukonki*. Os arbustos ou pequenas árvores tem de 0,5–1,8 metros de altura, com folhagem verde-escura, onduladas, longas e direitas. Crescem em regiões até 1525 metros de altitude acima do nível do mar (Xavier, 2011)

#### 1.1.2.1 Distribuição geográfica e comercialização de *Mulala*

A *E. natalensis* A.DC encontra-se distribuída em regiões da África subtropical e é comum na costa leste da África do Sul. Estão também presentes e utilizados em Angola, Zâmbia, Zimbabwe e em outros países da zona leste da África Austral. Em Moçambique, a *E. natalensis* é mais abundante no distrito de Matutuíne. Além da madeira muito apreciada algumas regiões de África utilizam a raiz como medicamento. A sua comercialização é realizada, por vários povos de África, em mercados informais ou em zonas rurais (Retief, Siebert & Van Wyk, 2008)

#### 1.1.2.2 A planta de *Euclea natalensis* A.DC (*Mulala*)

A *Euclea natalensis* A.DC apresenta pequenos arbustos com folhagens verde-escuras, onduladas, direitas e longas, com superfícies externa crenada e com alguns pelos epidérmicos. As suas raízes (Figura 5) podem ser cortadas em fragmentos de 30-40 centímetros de comprimentos. A superfície externa da raiz varia de castanha escura a preta, e a medula de castanho clara a alaranjado. Apresenta uma textura fibrosa, com um odor a terra característico, tendo um sabor amargo e adstringente que causa dormência na língua (Filipe, *et al.* 2008).

Figura 5 - A raiz de *E. natalensis* A.DC.



#### 1.1.2.3 Nomes vernáculos de *Euclea natalensis* A.DC(*Mulala*)

A *E. natalensis* A.DC dependendo da zona geográfica recebe vários nomes. Em Moçambique é conhecida pelo nome popular de *mulala*, *kitana*, *mcriparipa*, *uchangula* (Silva, Izidine & Amude, 2004). Em Angola, os povos que as utilizam, em particular os da zona rural, têm designações diferentes conforme cada grupo étnico. Assim, o povo *Umbundu*, habitantes da província de Benguela e Namibe, denomina-a de *Mumboto*, *Jimboto*, *Mboto*.

Já no povo Ganguela, a raiz é designada por *Antinum*, ou *Otinu*. O povo Lunyaneka chama-lhe *Omokunia* ou *Omuhime*, *Omonyime*, *Otyntiko*; por último o povo Mukunhantinu denominam-a *Omundine* ou *Otyime* (Lopes, 1972).

Na comunidade Zulu (África do Sul) é apelidada de *ichitamuzi*, *isinzimane*, *umshekisane*, *ilizimane*. Na língua inglesa tem os nomes de *Hairy guarri*, *Natal gwarri*, *Natal ebony*, *large-leaved guarri*, *Natal guarri*, *large-leaved euclea* (Loffler & Loffler, 2005). Em Afrikaans chama-lhe *Natalghwarrie*, *bergghwarrie*, *swartbashoom*. No Sotho do Norte toma os nomes de *mohlakola*; em Setswana chamam-lhe *molthakola*, *molthakola- o- montsho*, *molthakola-wa-kgomo*, *mossawane* (Xavier, 2010).

#### 1.1.2.4 Lendas e mitos de *Euclea natalensis* A.DC (*Mulala*)

Antigamente, vários povos africanos, utilizavam a raiz da *mulala* para a lavagem dos dentes. Esta prática continua a ser utilizada por muitos povos de África, porque acreditam que a raiz é mais eficiente do que a pasta de dentes, acreditando que a mesma chega a manter os dentes intactos até a velhice. Em algumas comunidades, realizam-se rituais para exaltar a beleza feminina, sobretudo em ocasiões festivas. Por exemplo, uma mulher é embelezada ao ser apresentada ao noivo e à família, para tal é recolhida a raiz da *mulala* fresca que é utilizada

como batom natural e bronzeador do rosto de modo a torná-la mais atraente (N. Kombo, comunicação pessoal, novembro 15, 2015).

### 1.1.3 Caracterização química da *Múkua* e *Mulala*

Os compostos fitoquímicos, são compostos químicos, biologicamente ativos, presentes em alguns vegetais e que apresentam efeitos benéficos para a saúde ou têm um papel ativo na melhoria do estado de saúde de indivíduos com enfermidades (Nhukarume, chikwambi, Muchuweti & Chipurura, 2010).

A identificação destes compostos fitoquímicos em algumas espécies vegetais tem sido explorada nos últimos anos, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos e pela procura dos consumidores por alimentos com características bioativas (Lessa, 2011). Estas fitomoléculas possuem características químicas diversas e algumas vezes apresentam alto grau de complexidade, não interferindo nas funções vitais das espécies vegetais, ao contrário do que ocorre no metabolismo primário, onde os seus constituintes químicos fazem parte da atividade celular de praticamente todos os seres vivos. No metabolismo secundário os compostos fitoquímicos são encontrados em apenas alguns grupos de vegetais (Silva, 2012).

Os vegetais possuem dois tipos de metabolismo, primário e secundário. Os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Os metabólitos secundários estão intimamente associados a estratégias de defesa das plantas por apresentarem atividade biológica contra herbívoros e microrganismos. A sua função não é melhorar a qualidade dos alimentos mais sim mantê-la (Silva, Costa, Santana, & Koblitz, 2010).

Entre as várias funções, dos compostos vegetais estudados, destacam-se os compostos fenólicos, onde se incluem os fenóis (flavonoides e taninos), os terpenos (carotenoides) e a vitamina C, que possuem propriedades antioxidantes, sendo recomendados como fontes de compostos antioxidantes (Severo *et al.* 2010). Muitos dos compostos acima referidos, estão presentes em algumas espécies da família Malvaceae.

Existem poucos estudos sobre a importância destes frutos na nutrição humana, bem como sobre os seus aspetos botânico e fitoquímico. Até à data, a espécie que maior atenção tem merecido por parte dos investigadores é a *A. digitata* L. (Ibrahima, *et al.*, 2013).

Estudos realizados por Lockout (2002) e Soloviev (2004) citados por Kamatou *et al.* (2011) observaram que a polpa do fruto de *múkua* representa 14 a 28% do total do peso do fruto sendo baixo o teor de água da polpa.

O fruto *múkua* possui grande quantidade de hidratos de carbono, e a polpa, folhas e as sementes são excelentes fontes de minerais, tais como, potássio, cálcio, magnésio, manganésio, sódio, fósforo, ferro, zinco e cobre. Na polpa pode-se ainda encontrar vitaminas como, a vitamina A, C, B1, B2, B3, B6, e outros compostos benéficos para a saúde (Chadare, Linnemann, Hounhouigan, Nout & Van Boekel, 2009; Assogbadjo, Chadare, Kakai, Fandohan & Baidu-Forson, 2012; Kamatou *et al.*, 2011). Na Tabela 1 apresenta-se a composição fitoquímica da polpa de *múkua*.

Tabela 1 - Composição química da polpa de *múkua* (adaptado por Kamatou *et al.*, 2011).

Humidade %	<15
Cinza %	5,7
Fibra %	11,2
Proteína %	2,2
Matéria gorda %	0,4
Hidratos de carbono %	70
Cálcio mg/100g	344,2
Potássio mg/100g	1578,5
Ferro mg/100g	10

A polpa de *múkua*, por apresentar um índice elevado de cálcio, é considerada uma fonte natural de suplementação de cálcio para as mulheres grávidas ou em amamentação, tal como, para crianças e adultos em geral (Kamatou *et al.*, 2011). Outros compostos importantes para a alimentação humana foram identificados na polpa de *múkua* dos quais se destacam terpenos, flavonóides e aminoácidos essenciais tais como arginina, glicina, lisina, metionina, prolina, serina, valina (United Nations Conference on Trade and Development [UNCTAD], 2005).

Alguns estudos têm demonstrado o uso de *E. natalensis* (*mulala*) pelos terapeutas tradicionais no tratamento de algumas doenças, devido ao seu potencial antimicrobiano sobre microrganismos na cavidade bucal (Xavier, 2011). Filipe *et al.* (2008), relacionam a atividade antimicrobianas da *mulala* com a presença de compostos fitoquímicos tais como as naftoquinonas, em particular a 7 metiljuglona, diospirinas e isodiospirina. Outros compostos que também foram identificados nesta espécie vegetal são os triterpenos pentacíclicos.

#### 1.1.4 Atividade antioxidante da *Múkua*

Uma das vantagens no consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e outros fitonutrientes relaciona-se com as suas propriedades antioxidantes, definidas como a ação de substâncias que, quando estão presentes em baixas concentrações, atrasam ou previnem de forma significativa a oxidação do substrato (Severo *et al.*, 2010). Em tecidos vegetais, estas biomoléculas podem ser enzimas, vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos (Dias, *et al.*, 2015).

Os antioxidantes alimentares, particularmente os vegetais, são eventualmente de grande interesse para os consumidores, o consumo de alguns deles tem sido associado a um menor risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cancro (Dias *et al.*, 2015).

Os alimentos ricos em compostos fenólicos e outros fitonutrientes podem ter um papel inibitório sobre os radicais livres e outros prooxidantes que ocorrem naturalmente, durante a atividade catalítica de certas enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição a fatores exógenos. Estes radicais livres e outros prooxidantes podem causar *stress* oxidativo, causando danos teciduais e o aparecimento de doenças degenerativas crónicas como cancro, doenças cardiovasculares, cataratas, distúrbios do sistema imunitário, disfunções cerebrais e outros (Silva *et al.*, 2010).

##### 1.1.4.1 Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico, também conhecido por vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel importante na nutrição humana. Esta é uma das vitaminas mais importantes presente nos frutos e habitualmente usada como agente antioxidante. No entanto, quimicamente é uma vitamina fotossensível e termolábil (Compaoré *et al.*, 2011; Parkouda *et al.*, 2012).

A polpa de *múkua* tem um elevado teor de ácido ascórbico e fibra, apresentando por esta razão um particular interesse quando se compara com outros frutos. Na Tabela 2 podem observar-se os teores de vitamina C presentes na *múkua* em comparação aos de outras frutas. O teor de vit. C da *múkua* pode variar entre 280-300mg/100g, sendo sete a dez vezes superior ao valor encontrado noutros frutos (Kamatou *et al.*, 2011).

O consumo de 40 g de polpa de *múkua* pode proporcionar 100% de ingestão diária de vitamina C em mulheres grávidas de 19-30 anos (Kamatou *et al.*, 2011).

A *múkua* é comumente utilizado em África como complemento do leite materno, uma vez que a sua riqueza em vitamina C promove a absorção do ferro e do cálcio (Wickens, 2008).

Tabela 2 - Comparação dos teores de vitamina C (mg/100 g) presentes na *múkua* e noutros frutos.

		<b>Vitamina C (mg/100g)</b>	<b>Referência</b>
<b>Múkua</b>	<i>Adansonia digitata L.</i>	280- 300	Kamatou <i>et al.</i> , 2011
<b>Kiwi</b>	<i>Actinidia chinensis</i>	72	colINSA, 2006
<b>Laranja</b>	<i>Citrus sinensis</i>	57	

### 1.1.5 Importância económica e potenciais aplicações de *Adansonia digitata L.* e *Euclea natalensis A.DC*

#### 1.1.5.1 *Adansonia digitata L.*

A grande importância do embondeiro reveste-se no facto de se poder aproveitar, várias partes da planta, nomeadamente, folha, casca, semente e polpa da fruta que tem sido muito utilizada pelos habitantes de África para o seu consumo e fins terapêuticos.

Venter & Witkowski (2010b) defendem que a *A. digitata L.* contribui de forma importante para a subsistência das populações, servindo como alimento e medicamento no tratamento de doenças, principalmente em zonas rurais.

Os frutos de *múkua* e os seus produtos, em particular o óleo das sementes, são exportados para países fora de África, principalmente para Europa, Canadá e EUA. Estes produtos são também trocados e vendidos em mercados locais informais, bem como em centros urbanos. Os extratos de *múkua* tornaram-se populares e prevê-se que a sua procura aumente (Buchamann, Prehsler, Hart & Volg, 2010).

Em Cabo Verde e em outros países de África, é usada a polpa de *múkua* seca, misturada com água e açúcar, resultando num sumo altamente nutritivo. É também utilizada esta polpa para a preparação de bebidas espirituosas com baixo teor de álcool, misturadas com aguardente de cana-de-açúcar e outros componentes para fazer uma bebida com o nome de ponche de Kalbisera; a polpa é também utilizada para preparar doces e geleias (Malta, 2013).

Em alguns países da África Ocidental, as folhas, polpa de frutas e sementes são ingredientes de molhos, sopas, papas e bebidas tradicionais, néctares e barras de cereais. No entanto, existem outras finalidades, incluindo óleo das sementes, cordas e tecidos a partir da fibra da casca,

tanino extraído da casca da árvore utilizado no tratamento de peles, cola extraída dos grãos de pólen das flores, etc (Yusha'u, Hamza & Abdullahi, 2010; Parkouda *et al.*, 2012).

A polpa seca é comumente usada para preparar um sumo de fruta com níveis mais elevados de vitamina C e cálcio do que os da laranja ou do leite, respetivamente (Assogbadjo *et al.*, 2012).

O fruto do embondeiro, constitui uma fonte de renda de muitos povos de África, para além de servir de alimentos e medicamentos; alguns embondeiros oferecem também proteção no mau estado de tempo e providenciam água nas aldeias do oeste de África, principalmente na época de seca. Estima-se que o tronco tem capacidade de armazenar até 120.000 litros de água (Venter & Witkowski, 2010b). Neste contexto, em 2008 a União Europeia aprovou a utilização e o consumo de fruto de embondeiro como ingrediente alimentar em barras de cereais com níveis entre 10 a 15% (Buchamann *et al.*, 2010).

Em 2009, a FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos da América, reconheceu como seguro o uso da polpa do fruto como ingrediente alimentar (Kamatou *et al.*, 2011).

Buchamann *et al.* (2010), referem que a Phyto Trade África, organização sem fins lucrativos, comercializou o fruto em benefício de cerca de 2,5 milhões de famílias pobres na África Austral.

O volume de negócios de medicamentos botânicos e suplementos dietéticos quase duplicou de 12,4 bilhões em 1994, para 20,3 bilhões em 2003 (UNCTAD, 2005).

São vários os estudos feitos, com extratos preparados a partir de diferentes plantas, sobretudo aquelas que demonstram ter na sua composição diversos compostos fitoquímicos nomeadamente; fenóis (flavonoides), terpenos (carotenoides), vitamina C, minerais e outros.

Todos estes compostos contribuem de certo modo para o bem-estar do homem devido às atividades biológicas que possuem (Kaboré *et al.* 2011; Severo *et al.*, 2010).

A Tabela 3 apresenta os diversos usos na medicina tradicional e partes da planta utilizada pelos povos de África no tratamento de várias doenças. Entre as propriedades conhecidas da *A. digitata*, podem ser mencionadas: propriedades antioxidantes, devido ao elevado teor de vitamina C presente na polpa do fruto, propriedades imuno-estimulante, anti-inflamatória, analgésica, antissética e repelente, pesticida, antifúngica, antiparasitária, antiviral e outras (Vimalanathan & Hudson, 2009; Kamatou *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Algumas aplicações da árvore *A. digitata* na medicina tradicional em África (Kamatou et al., 201).

<b>Usos terapêuticos</b>	<b>Parte da planta utilizada</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Dores de dentes, gengivas	Folhas	Burkina Faso	Tapsoba & Deschamps, 2006
Malária	Casca e folhas	Nigéria	Ajaiyeoba <i>et al.</i> , 2004
Cicatrização de feridas	Casca	Malí	Inngjerdingen <i>et al.</i> , 2004
Diarreia, febre, doenças renais, bexiga, asma	Folhas	Tânzania	Brendler <i>et al.</i> , 2003
Anemia	Extrato de casca	Nigéria	Adesanya <i>et al.</i> , 2002
Febre, disenteria	Folhas e raízes	Sudão	Gebauer <i>et al.</i> , 2002
Doenças microbianas	Frutas	Nigéria e Senegal	Hostettmann <i>et al.</i> , 2000
Diarreia, febre, inflamação, doenças renais	Folhas	África do Sul	Van wyk & Gericke, 2000
Tónicos, diuréticos, cistites, distúrbios hepáticos, hipogalactia	Casca com carne	Burkina Faso	Kerharo & Adam, 1974, Nacoulma, 1999
Disenteria, diarreia, febre, haemoptisis	Frutas e sementes	Tânzania	FAO, 1993
Diarreia, parasitas, refrescantes	Folhas, sementes e frutas	Côte d' Ivoire	Aké Assi, 1992
Sudurese, xarope	Folhas	Quênia	Abbiw, 1990
Rins, bexiga, picada de insetos	Folhas	Quênia	Wickens, 1982
Febre e diarreia	Sementes	África do Sul	Watt & Breyer- Brandwijk, 1962
Tosse	Pó de sementes	África do Sul	Watt & Breyer- Brandwijk, 1962
Disenteria, febre, refrescantes	Sementes e frutas	Camarões e R.C. Africana	Watt & Breyer- Brandwijk, 1962
Malária e febre	Folhas	Serra Leoa	Watt & Breyer- Brandwijk, 1962

### 1.1.5.2 *Euclea natalensis* A.DC

Os produtos naturais, são uma fonte importante de compostos químicos com propriedades relevantes Filipe *et al.* (2008), relataram que a *mulala* tem atividade antibacteriana contra vários microrganismos da flora bucal. De facto, a raiz de *Euclea natalensis* A.DC tem sido muito utilizada por alguns povos de África.

Apesar da sua utilização não ser muito frequente nas zonas urbanas, em algumas zonas rurais de Moçambique a *mulala* é amplamente utilizada sobretudo pelos terapeutas tradicionais que utilizam a raiz de *E. natalensis* A.DC no tratamento de algumas doenças, como: febre, dores de cabeça, hemorragias e malária. É também utilizada tradicionalmente como batom natural, uma vez que após o seu uso, deixa uma coloração alaranjada na boca e nos dentes, que desaparecem ao fim de algumas horas (Matope, 2012).

Utilizam – se também as cascas queimadas ou pulverizadas em pó fino no tratamento de úlceras, febre, amarela, cefaleias, distúrbios gástricos, lesões cutâneas, gonorreia, distúrbios ginecológicos, hemorragias, lepra e como emético. Pode ainda ser utilizado como purgante, estimulante sexual e em algumas doenças venéreas (Xavier, 2010).

As aplicações medicinais não são, todavia, as únicas referidas na literatura. Há indicações sobre o uso desta planta na cortimenta da pele. E na Tanzânia, um corante negro dela extraído é utilizado em tinturaria (Lopes, 1972).

## 1.2 Caraterização de preparados de carne

### 1.2.1 Definição de preparado de carne

Quando a carne fresca, incluindo carne fragmentada, é adicionada de outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos, ou é submetida a um processamento que não é capaz de alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar as suas características de carne fresca, é considerada um preparado de carne (Regulamento UE 853/2004). Este conceito diferencia-se de carne picada, carne desossada que foi picada e que contém na sua composição menos de 1% de sal (Regulamento UE 853/2004).

### 1.2.1.1 Definição de salsicha fresca

A salsicha fresca é um preparado de carne. De acordo com a NP 723/2006, trata-se de um enchido cru, de massa granulosa, constituído por carne e gordura de porco frescas, adicionadas de condimentos (sal refinado e especiarias), aditivos nomeadamente aromatizantes, emulsionantes, estabilizadores, reguladores de acidez, antioxidantes, intensificadores de sabor, conservantes, água potável (gelo) e corantes. Pode-se utilizar, facultativamente, sangue ou plasma fresco em quantidades não superior a 2% do total da matéria-prima e alguns aditivos autorizados pelo Regulamento (UE) n° 1129/2011.

Tem formato cilíndrico com diâmetro e comprimento variável, apresentando-se em cadeia, por simples torção de tripa natural de ovino. A salsicha fresca tem cor rosada, brilhante e de aspeto marmoreado, característica mais perceptível quando se realiza uma avaliação do interior do enchido, onde se verifica um contraste de cor-de-rosa e branco, resultante da presença de carne e gordura respetivamente.

O produto deverá conter no mínimo 11% de proteína total e 30% de gordura livre no máximo. Pode ainda conter proteínas não cárneas no máximo de 5%, do total de ingredientes. A humidade do produto desengordurado, não deve ser superior a 84% (NP 723/2006).

O sal comum tem um papel preponderante na massa dos produtos da salsicharia, bem como em todos os produtos cárneos. Para além de realçar o sabor do produto, facilita a solubilidade das proteínas, inibe o crescimento microbiano com a redução da atividade da água e reduz a atividade de algumas enzimas, reduzindo também o processo de oxidação. Para a elaboração da massa final da salsicha, o sal não deverá ultrapassar a concentração de 1,5 a 2%, tendo em conta que o sal próprio da carne é de aproximadamente 1% (Ruiz, 2007).

### 1.2.2 Adição de especiarias ou outros condimentos em preparados de carne

As especiarias e outros condimentos tem origem em plantas que pelo seu conteúdo natural em substâncias saborizantes e aromatizantes são indicadas como ingredientes para condimentar ou potenciar o sabor (Banach, Stratakou, van der Fels - Klerx, Besten & Zwietering, 2016).

O pimentão doce, o cravo da Índia, o alecrim, o orégão, o tomilho, o cravinho, a erva-doce, o cominho, entre muitos outros, são substâncias frequentemente utilizadas como especiarias. Estas substâncias são conhecidas pela sua eficácia na prevenção da oxidação lipídica, propriedade decorrente da presença de compostos fenólicos, flavonoides e antioxidantes na sua composição (Zotte, Celia, C & Szendro, 2016).

Algumas especiarias ou os seus óleos essenciais podem também ter propriedade antimicrobianas. O alho contém componentes ativos voláteis como aliina e alicina e que contribuem para um efeito antibacteriano sobre *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella thyhi* e outros. Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais derivam especialmente de componentes ativos específicos. A pimenta preta, o cravo, o gerânio, a noz-moscada, o orégão e o tomilho, contêm um componente antimicrobiano comum, o carvacrol sendo eficazes na inibição de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus*, e *Yersinia enterocolitica* (Zotte *et al.*, 2016)

#### 1.2.1.1. Aditivos

São vários os aditivos utilizados na indústria de carnes, desempenhando funções de conservação, melhoria das qualidades organolépticas, transformação, como no seu rendimento. Deve-se ter em conta que os aditivos podem ser tóxicos para os consumidores quando utilizados em doses elevadas. Os aditivos permitidos na elaboração de salsichas frescas tais como sulfitos, corantes ou outros, estão referidos no Regulamento (UE) nº 1129/2011.

#### 1.2.3 Características de higiene e segurança

Os cuidados com a higiene na manipulação de alimentos, são fundamentais para controlar a contaminação por microrganismos, evitando assim as possíveis toxinfecções alimentares. A carne crua das várias espécies animais é considerada como veículos potencial de infeções alimentares em seres humanos (Doulgeraki, Ercolini, Villani, John & Nycha, 2012). A carne é um dos alimentos mais perecíveis, devido à sua composição química, favorecendo a proliferação de uma vasta gama de espécies microbianas. O número real de infeções alimentares atribuídas ao consumo de carne, é difícil de avaliar com precisão, principalmente porque apenas uma pequena porção de casos de doença é oficialmente relatada. Por outro lado, mesmo dos casos relatados apenas um número limitado permite a identificação do alimento que esteve na origem da infeção. Os dados de surtos constituem uma interessante fonte de informação, permitindo associar aos casos de doenças transmitidas por alimentos, a identificação dos respetivos veículos alimentares e agentes causais. A presença de um grande número de microrganismos na carne crua, provoca-lhe alterações químicas e sensoriais, tornando-a por vezes inaceitável para consumo humano (Niyonzima *et al.* 2015).

A microbiota inicial na carne, depende do *status* da matéria prima, assim como da sua exposição a outros fatores como a temperatura ou outras condições que possam ter sido introduzidas na fase do

processamento ou armazenamento e durante a distribuição, factos que podem também influenciar o grau de deterioração da carne (Safarpour, 2014).

São sobretudo as condições de armazenamento da carne, que permitem que os diferentes grupos de microrganismos se desenvolvem e potenciem a deterioração da carne (Doulgeraki *et al.*, 2012).

Entre os microrganismos que predominam na carne fresca encontram-se *Micrococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp*, *Lactococcus spp*, *Bacteroides spp*, *Clostridium spp*, *Pseudomonadaceae*, *Acynectobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Brochothrix thermosphacta*, fungos e outros (Doulgeraki *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta como principais perigos na carne, os contaminantes químicos e biológicos, com maior ênfase nas bactérias tais como *Salmonellas* e *E.coli* (Doulgeraki *et al.*, 2012). Já na União Europeia, as carnes picadas e preparados de carne, são dos produtos mais implicados a casos de salmonelose sendo frequentemente considerados não conformes nas inspeções.

Entre os graves surtos de gastroenterite, a Salmonellose tem sido reportada como a segunda doença mais frequente segundo a Autoridade Europeia para a segurança Alimentar (European Food Safety Agency [EFSA], 2012).

#### 1.2.3.1 Indicadores microbiológicos de qualidade higiénica do processo de fabrico e de segurança de géneros alimentícios

A utilização de indicadores higiénicos sanitários visa avaliar a higiene do processo tecnológico de fabrico dos géneros alimentícios. Neste sentido, utilizam-se grupos de microrganismos indicadores que normalmente podem fornecer informações sobre a contaminação de origem fecal, falhas de refrigeração ou processuais, potencial presença de agentes patogénicos, indicando as condições sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento do alimento. Um critério essencial para a qualidade microbiológica da carne é seu *status* higiénico, que é decisivamente determinado pela presença e multiplicação de microrganismos (Mingura, Hendriksen, Fraile & Aarestrup, 2014). Os microrganismos indicadores associados às práticas de higiene incluem, entre outros, a contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C, a contagem de *Enterobacteriaceae*, a contagem de

*E. coli*, e de *S. aureus*. Os microrganismos aeróbios mesófilos e as *Enterobacteriaceae* permitem ter um conhecimento mais abrangente da eficácia da higienização das instalações, superfícies e equipamentos e dos processos tecnológicos aplicados (Lues & Van Tonder, 2007). Conforme o Regulamento (CE) n.º 1441 de 2007, os critérios microbiológicos usados como indicadores de

segurança e de higiene de processo para os preparados de carne, são respetivamente *Salmonella* e *E. coli*, pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*.

#### 1.2.3.1.1 Microrganismo aeróbios totais a 30°C

O reconhecimento de que as bactérias- indicadoras são um instrumento eficaz na avaliação da higiene dos processos foi bem documentada pela EFSA (2012). Em particular, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C, cujo intervalo ótimo de multiplicação bacteriana se situa entre os 30°C e os 45 °C é usada geralmente para avaliar a higiene de todo o processo de produção tecnológico (Barco, Belluco, Roccatto & Ricci, 2015).

Têm sido utilizados como indicadores microbiológicos de qualidade, proporcionando uma ideia sobre o tempo de vida útil, apontando matérias-primas contaminadas ou processamento insatisfatório, potenciais riscos para a saúde do consumidor, ou tempo ou temperatura inadequados durante a produção ou o armazenamento, sem especificar qual o tipo de bactéria presente. Ainda assim, elevadas contagens de mesófilos revelam a existência de condições favoráveis para o desenvolvimento de agentes patogénicos como por ex. *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e outros (Barco *et al.*, 2015).

#### 1.2.3.1.2 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* caracteriza-se por possuir bactérias com uma parede celular do tipo Gram-negativo, serem aeróbias ou anaeróbias facultativas, imóveis ou móveis por flagelos peritríquios e não formadores de esporos. Geralmente são catalase positiva e oxidase negativa e bioquimicamente caracterizam-se pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos e fermentar a glicose com produção de ácido e/ou gás (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2005).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são usados vulgarmente, como microrganismos indicadores para avaliar a higiene do processo dos alimentos. Estas bactérias são amplamente

distribuídas na natureza, na água, solo, plantas e intestino de vários animais, incluindo o homem (Drebes, Majolo & Fröde, 2012).

Como a família das *Enterobacteriaceae* engloba muitos géneros de origem não fecal, a contagem dos mesmos é usada mais como um indicador da qualidade higiosanitária dos alimentos, do que como um indicador de contaminação de origem fecal (Barco *et al.*, 2015).

#### 1.2.3.1.3 Bactéria ácido láctico

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de bactérias Gram-positivas, de diferentes géneros, que surgem como cocos ou bacilos não formadores de esporos, catalase negativo e anaeróbias facultativas. Podem ser encontradas em qualquer ambiente, principalmente se for rico em hidratos de carbono. No corpo humano e animal, as BAL fazem parte da microflora normal do trato gastrointestinal (Mozzi, Royo & Vignolo, 2010). Entre os géneros BAL de maior importância contam-se, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e outros (Lima *et al.*, 2012). Embora as BAL englobem diversos géneros, agrupam-se em homofermentativas e heterofermentativas, com base no produto final da sua fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico como produto final da sua fermentação e as heterofermentativas, produzem, a partir da fermentação da glucose, ácido láctico, e também outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, ou são capazes de decompor os açúcares como fonte de energia no metabolismo (Martins *et al.*, 2006; Alcantara, Morais, Matos & Sousa, 2012).

Quando a carne é embalada a vácuo ou é usada uma atmosfera protetora com mais de 20% de CO<sub>2</sub>, a multiplicação de *Pseudomonas* spp. é suprimido. Contudo, sob estas condições, durante o armazenamento dos produtos embalados em atmosfera protetora e conservados em refrigeração, as BAL multiplicam-se rapidamente e são frequentemente os microrganismos dominantes (Leroi, Fall, Pilet, Chevalier & Baron, 2012).

As BAL desempenham um papel importante na fermentação contribuindo para uma maior variedade de alimentos fermentados, como iogurtes e queijos, bem como no processamento de bebidas alcoólicas e vegetais fermentados. Além de conferirem aos géneros alimentícios características sensoriais particulares, permitem a sua conservação e ainda podem ser usadas como probióticos. Os probióticos são bactérias vivas existentes nos alimentos que após ingestão exercem efeitos benéficos ao hospedeiro (Martins *et al.*, 2006). No entanto, em algumas situações as BAL também podem ser responsáveis pela produção de aromas e sabores

indesejáveis nesses produtos fermentados (Lima *et al.*, 2012). Além da importância industrial, algumas BAL, particularmente os *Enterococcus*, também são relevantes para a saúde pública, uma vez que têm sido implicados como agentes etiológicos de doenças como endocardites, bacteriemia e septicemias em pacientes como o sistema imuno debilitados.

#### 1.2.3.1.4 *Brochothrix thermosphacta*

*B. thermosphacta* é geralmente associado à deterioração de produtos cárneos, sendo responsável pelo aparecimento de odores desagradáveis, descoloração e produção de gás. O seu potencial deteriorativo resulta da capacidade de metabolizar glúcidos presentes na carne e da sua atividade proteolítica (Vasilopoulos, Vuyst & Leroy, 2015).

O *B. thermosphacta*, pertence ao género *Brochothrix*, caracterizado por serem bactérias em forma de bacilos ou cocobacilos Gram positivos, catalase positivos e oxidase negativos, sem mobilidade. São microaerófilos e crescem a temperaturas que variam entre 20 e 25 °C podendo, no entanto, crescer no intervalo de temperatura entre 0 e 30 °C (Nowak, Rygala, Oltuszk-Walczak & Walczak, 2011).

Este género partilha várias características com *Lactobacillus* e *Listeria spp.* Na ausência de oxigénio, algumas bactérias tidas como deterioradoras da carne, como as *Pseudomonas*, não se desenvolvem e nestas condições os microrganismos microaerófilos, como *B. thermosphacta* e *Lactobacillus*, são os que mais predominam (Alcantara *et al.*, 2012).

#### 1.2.3.1.5 *Pseudomonas spp.*

As bactérias *Pseudomona. spp.* são bacilos Gram-negativos, móveis, não fermentadores de hidratos de carbono, produtores de pigmentos hidrossolúveis e estão amplamente distribuídos no solo e na água (Alcantara *et al.*, 2012).

*Pseudomonas spp.* utilizam preferencialmente a glicose disponível. Quando a glicose é esgotada, os organismos iniciam o catabolismo dos aminoácidos. Enquanto os produtos do metabolismo da glicose são inofensivos, os do catabolismo de aminoácidos, tais como amónia, aminas e sulfuretos orgânicos, resultam em odores e sabores questionáveis, mesmo quando em pequenas quantidades (Alcantara *et al.*, 2012). Entre os defeitos causados por microrganismos em condições de aerobiose podemos citar a morrinha superficial, alteração na cor dos pigmentos da carne (hemopigmentos) e rancificação. A ocorrência da morrinha está relacionada

com a temperatura de armazenamento e com a quantidade de água disponível no produto (Franco & Landgraf, 2008).

#### 1.2.3.1.6 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é um microrganismo potencialmente patogénico, comensal da pele e mucosas dos animais, podendo atuar como patogénico oportunista, ao causar desde infeções cutâneas a doenças invasivas graves e potencialmente fatais. Este microrganismo emergiu como um importante patogénico tanto para infeções nosocomiais como para infeções adquiridas nas comunidades (Kadariya, Smith & Thapaliya, 2014). *S. aureus* não formam esporos, são anaeróbios facultativos, imóveis, catalase positiva, oxidase negativa, e podem contaminar os produtos alimentares durante a sua preparação e processamento (Quinn *et al.*, 2005).

*S. aureus* podem multiplicar-se a uma temperatura ótima de 30 a 37°C, com um pH que varia entre 4,2 a 9,3 podendo desenvolver-se em elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl), até 15%. É um microrganismo tolerante à dessecação, com capacidade de sobreviver em ambientes potencialmente secos e stressantes, como na pele e superfícies inanimadas. Estas características favorecem a multiplicação do microrganismo em muitos produtos alimentares, podendo permanecer viáveis nas mãos e superfícies ambientais por tempos prolongados (Kadariya, *et al.*, 2014).

As toxinfecções provocadas por este microrganismo são devidas à ingestão de enterotoxinas produzidas e libertadas pela bactéria durante a sua multiplicação no alimento e representando um perigo para a saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e pode estar presente no alimento mesmo após a cozedura, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de toxinfecção de origem alimentar. Sendo este agente responsável duma grande parte das toxinfecções alimentares no mundo, as suas presenças estão nos alimentos, quando um manipulador de alimentos os contamina e em seguida o alimento não é devidamente refrigerado. Outras fontes de contaminações dos alimentos incluem os equipamentos, e superfícies em que os alimentos são preparados (Casey, Kim, Larsen, Price & Nachman, 2015).

#### 1.2.3.1.7 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* é o agente responsável pela Listeriose. É uma doença infecciosa e potencialmente fatal de animais, pássaros, peixes, crustáceos e humanos onde a septicemia e a

encefalite podem ser observadas. Na maioria das vezes, é uma infecção subclínica em animais, mas as formas graves podem também ocorrer. A doença caracteriza-se por septicemia, encefalite, meningite, meningoencefalite, aborto, morte fetal infecções perinatais e gastroenterite. O organismo tem um ciclo de vida intracelular podendo atravessar a barreira sanguínea, o que explica a sua patogênese e sinais clínicos (Dhama *et al.*, 2015).

Dhama *et al.* (2015), relatam que a Listeriose é causada por membros do género *Listeria*, que atualmente tem 17 espécies, a *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensi*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. innocua*, *L. fleischmannii*, *L. weihens tephansensis*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*. No entanto, apenas duas espécies são consideradas patogénicas a *L. monocytogenes* para o homem e animais e a *L. ivanovii* para os ruminantes, e ocasionalmente humanos.

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, saprofita, móvel por flagelos. Distribui-se de forma ubíqua no ambiente, não forma esporos e é pleomorfa com capacidade de variar de forma de acordo com as condições ambientais, saprófito a outro potencialmente patogénico e fatal. Esta bactéria possui importantes fatores de virulência, produzindo hemolisina, listeriolisina, e internalina fosfolipase, que são necessárias à adesão celular e à patogenicidade e são primariamente reguladas pela proteína PrfA (Vera, González, Dominguez & Bello, 2013).

A bactéria pode tolerar uma vasta gama de pH e temperaturas. A multiplicação bacteriana dá-se a temperaturas ótimas entre os 30 e 37 °C, mas pode multiplicar-se dos 4 aos 45 °C. Em relação ao pH, pode crescer a valores de 4,5 a 9,6, no entanto a sua multiplicação é mínima a baixo pH e baixas temperaturas. O tratamento térmico efetivo para destruir a *Listeria* é pasteurização com temperaturas de 72 °C, e durante 15-20 minutos (Rotariu, Thomas. Goodburnc, Hutchison & Strachana, 2013).

#### 1.2.3.1.8 *Salmonella spp*

*Salmonella* entérica representa um importante patogénico de origem alimentar e zoonótico, e constitui o agente causador de gastroenterites e febre tifoide. Entre 1 de maio e 12 de outubro de 2016, foram notificados 148 casos de Salmonellose na Bélgica, Holanda, Noruega, Dinamarca, Suécia, Luxemburg, Croácia e Reino Unido, dos quais 112 foram confirmados, resultando em uma morte possivelmente associada a este caso (European Food Safety Agency [EFSA], 2016).

O reservatório comum de *Salmonella* é o trato gastrointestinal de uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens. Por essa razão, uma grande gama de produtos alimentares, incluindo os de origem animal e vegetal, podem ser uma fonte de infecção. A transmissão da doença geralmente ocorre quando os organismos são introduzidos nas áreas de preparação de alimentos e se multiplicam nos mesmos, consequência de quebras de temperatura, armazenamento inadequado, alimentos mal cozidos ou contaminação cruzada com alimentos prontos-a-comer (Quinn, *et al.*, 2005). A utilização de água contaminada com fezes de animais de sangue quente, incluindo o homem será outro veículo de infecção.

A dose infecciosa depende da idade e da saúde do hospedeiro, bem como das diferentes estirpes. Considera-se toxinfecção alimentar declarada, se for efetuada a ingestão de um grande número de bactérias viáveis (cerca de  $10^6$ ) sendo o período de incubação, nos casos mais agudos, apenas de 12 horas, ou até 4 a 5 dias em casos menos graves. Os sintomas e a infecção duram, geralmente, alguns dias. A mortalidade derivada a *Salmonella* é geralmente baixa e menos de 1% dos casos tornaram-se fatais (EFSA, 2012).

#### 1.2.3.1.9 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. É um bacilo não esporulante, geralmente móvel, com flagelo peritricos, estas bactérias têm a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito e de fermentar glicose. São oxidase negativa e catalase positiva. São capazes de metabolizar uma ampla variedade de substâncias tais como hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lípidos, e ácidos orgânicos e utilizar amoníaco como a única fonte de carbono e azoto (Vidotto, Lima, Fritzen, Freitas, Venâncio & Ono, 2009).

Embora a bactéria *E. coli* faça parte da microflora normal de espécies animais e em humanos, algumas estirpes são patogénicas devido a características específicas. Estas podem ser classificadas em seis grupos, nomeadamente *E. coli* enteropatogénica (EPEC); *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC); *E. coli* toxinogénica (ETEC); *E. coli* entero agregativa (EAEC); *E. coli* entero invasiva (EIEC) e *E. coli* (Quinn *et al.*, 2005).

As *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* são mais frequentemente usadas para avaliar a contaminação entérica ao longo do processo de fabrico dos alimentos. Os produtos alimentares podem constituir uma importante fonte de transmissão deste microrganismo (Barco *et al.*, 2015).

## **2 Avaliação da atividade antibacteriana de *Adansonia digitata* L. e *Euclea natalensis* A.DC: sua potencial aplicação num produto cárneo**

### 2.1 Justificação e objetivos

*A. digitata* L.(*múkua*) e a *E. natalensis* A.DC (*mulala*), são consumidos ou utilizados com fins terapêuticos por algumas comunidades em África, em particular em Angola e em Moçambique, desde tempos remotos. As suas virtudes, quer usados como alimento (*múkua*), quer como uso curativo (*múkua* e *mulala*), são desde há muito narradas com frequência no seio das comunidades angolana e moçambicana, mesmo sem sustentação científica.

Entretanto, na literatura científica mundial vão surgindo indicadores que vão, de alguma forma, sustentando as afirmações destas comunidades.

Foi neste sentido, e considerando a necessidade de se satisfazer importantes nichos de consumidores no mundo, que exigem cada vez mais a utilização de aditivos naturais em substituição dos aditivos químicos, que se desenvolveu o presente trabalho para determinar o potencial da *múkua* e da *mulala* como aditivos naturais. Assim, os objetivos propostos foram:

- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *múkua* e *mulala* sobre as espécies microbianas potencialmente deterioradoras ou patogénicas, presentes nos alimentos, nomeadamente nos produtos cárneos;
- Avaliar o efeito da aplicação de extratos de *múkua* e de *mulala*, num preparado de carne – modelo, as almôndegas, no controlo da deterioração de origem microbiológica, selecionando aquele que se adegue melhor para aumentar o período de conservação deste produto cárneo quando mantido em condições de armazenamento sob embalagem protetora e
  - em refrigeração a 4°C durante 22 dias.
- Aplicar o extrato vegetal com maior potencial antibacteriano em salsichas frescas embaladas em atmosfera protetora e mantidas em refrigeração a 7 ° C durante 30 dias.

### 2.2 Materiais e métodos

#### 2.2.1 Desenho experimental

De modo a cumprir os objetivos preconizados, o presente trabalho foi dividido em três fases diferentes: a) avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos de *múkua* e *mulala* sobre algumas bactérias patogénicas e de deterioração pertencentes à coleção de estirpes do laboratório de Tecnologia de Produtos Animais da FMV; b) aplicação experimental dos extratos

de *múkua* e *mulala* para avaliação do potencial antimicrobiano em almôndegas, embaladas em atmosfera protetora e em aerobiose, conservadas em câmara de refrigeração a 4°C durante 22 dias. Os testes microbiológicos realizados incluíram a contagem de microrganismos aeróbios totais (A.T), a 30 °C *Enterobacteriaceae*, Bactérias do ácido láctico (BAL), *Brochothrix thermosphacta* e *Staphylococcus coagulase negativa*, nos dias 0, 4, 8, 12, 18 e 22; c) aplicação experimental do extrato de *múkua* em salsicha fresca. Elaboração de salsichas frescas com adição de 1% de extrato de *múkua*, as quais foram embaladas em atmosfera protetora e conservadas em câmara de refrigeração a 7 ° C. Os testes microbiológicos incluíram a contagem de microrganismos A.T a 30 °C, *Enterobacteriaceae* e BAL nos dias 0, 5, 10, 20 e 30.

### 2.2.2 Colheita de *múkua* e das raízes de *mulala*

A colheita dos frutos do embondeiro *múkua*, foi realizada em 2015, na região de Icolo e Bengo, aldeia de Cassoneca, a 190 km da cidade de Luanda. Os frutos foram embalados em sacos de polietileno de recolha da amostra, acondicionados em caixas isotérmicas e transportados para Portugal por via aérea. A recolha dos frutos foi feita de forma aleatória.

As raízes de *Euclea natalensis* A.DC, conhecida em Moçambique como *mulala*, foram colhidas a norte de Moçambique, na região de Nampula. Acondicionados em sacos de recolha de amostras, foram transportadas para Portugal por via aérea.

### 2.2.3 Preparação de *múkua* e das raízes de *mulala*

O fruto do embondeiro *múkua*, está revestido por uma cápsula externa muito resistente. Os frutos foram cortados, removeu-se a sua casca dura e separou-se a polpa da fibra.

Para a separação da semente envolvida pela polpa, recorreu-se à utilização de um almofariz e um pilão. Em seguida, a polpa foi macerada, reduzida a pó, e passada numa peneira; o pó obtido (cerca de 250g) foi transferido para um saco de polietileno de recolha de amostra.

As raízes da planta *E. natalensis* A.DC, *mulala* foram submetidas a um processo de secagem à temperatura ambiente por 3 dias, depois retirou-se a casca, seguiu-se uma redução a pó com auxílio de um ralador metálico. Pesaram-se aproximadamente 250 g para saco de polietileno de recolha de amostra.

#### 2.2.4 Preparação dos extratos

Procedeu-se à preparação dos extratos aquoso e orgânico, seguindo a técnica descrita por Predrag *et al.* (2005). Pesaram-se numa balança analítica (Sartorius analytic A-200S, Alemanha) 25g do pó de cada uma das amostras (*múkua* ou *mulala*) para balão de Soxhlet, e adicionaram-se 250 mL de etanol a 96% ou 250 mL de água destilada fervente para obtenção dos extratos orgânico e aquoso, respetivamente. Os extratos foram homogeneizados durante 30 minutos em vórtex (IKA C-MAG HS7, USA) e incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 72 h. Em seguida, procedeu-se a uma filtração com papel de filtro nº 1 (Machery-Nagel, Alemanha). O extrato orgânico foi concentrado num rota- evaporador (Buchi - RE 111, Suíça) e seco em estufa a 37 ° C durante meia hora. Após secagem conservou-se a 4 ° C. O extrato aquoso, depois de filtrado, foi congelado a -80 ° C e posteriormente liofilizado (Liofilizador Scanvac cool sate, Dinamarca). Após a liofilização, o extrato aquoso foi conservado a -18 ° C até posterior utilização. A Figura 6 resume o procedimento utilizado para obtenção dos extratos de *múkua* e de raízes de *mulala*.

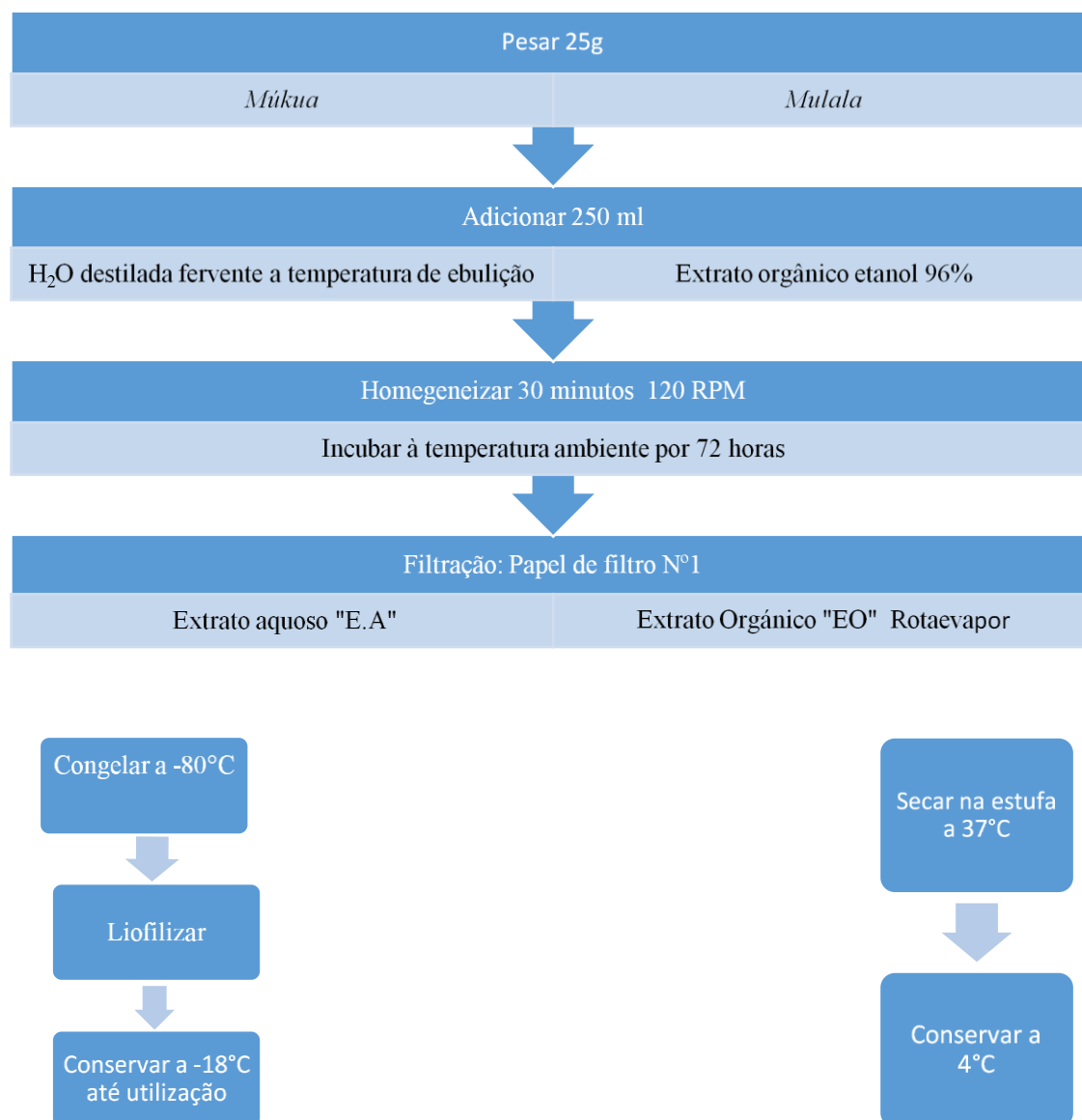
#### 2.2.5 Preparação e diluição dos extratos

Os extratos de *múkua* e de *mulala* foram preparados numa gama de diferentes concentrações a serem testadas.

Para a preparação dos extratos orgânicos de *múkua* e de *mulala*, procedeu-se à pesagem de 0,5g dos extratos acima referidos por forma a obter a concentração inicial de 500mg/mL. Posteriormente foram diluídas em 1ml da solução de dimetilsulfóxido a 50% (DMSO 50%, Sigma- Aldrich, Brasil). Foram realizadas diluições sucessivas para obtenção das concentrações 250 mg/mL; 150 mg/mL e 50 mg/mL.

Relativamente ao extrato aquoso, procedeu-se a pesagem de 1g de cada um dos extratos *múkua* e *mulala*, diluídos em 5mL de água destilada estéril de modo a obter a concentração inicial de 200mg/ml e posteriormente foram efetuadas as diluições sucessivas 175 mg/mL; 150 mg/mL; 125 mg/mL em água destilada estéril.

Figura 6 - Procedimento utilizado para obtenção dos extratos de *múkua* e das raízes de *mulala*.



### 2.2.6 Ensaio da atividade antibacteriana do extrato orgânico e extrato aquoso de *múkua* e *mulala*

Para avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos orgânico e aquoso, procedeu-se, numa primeira fase, à cultura das estirpes indicadoras. Para tal, foram utilizadas as estirpes da coleção do laboratório de Tecnologia de Produtos Animais/FMV conservadas na câmara de congelação a -80 ° C, em caldo de infusão de cérebro e coração BHI (*Brain Heart Infusion*, Scharlau, Espanha) com 15% de glicerol. Foram selecionadas como indicadores, estirpes bacterianas de agentes patogénicos Gram positivos e Gram negativos (Tabela 4). As estirpes foram descongeladas e retirou-se 0,1 mL de cada uma das culturas das estirpes selecionadas

para tubos de ensaio com 5mL de caldo (BHI). Procedeu-se à homogeneização com um agitador orbital (Geninus 3, Alemanha) e incubou-se na estufa durante 24 h a 42 ° C, para a *E. coli*, e a 37 ° C para o resto das estirpes selecionadas. Após a incubação, os tubos foram novamente homogeneizados e retirou-se 0,1 mL dos inóculos para novos tubos de ensaio com 5 mL de caldo BHI tendo sido incubados às mesmas temperaturas, respetivamente.

Em seguida, retirou-se uma alíquota de inóculo de cada tubo com uma ansa de 10µL e semeou-se por estria em caixas de Petri contendo o meio de cultura Triptona de soja com 1,5% de agar (TSA, Scharlau, Espanha). As caixas de Petri inoculadas foram incubadas de 24 a 48 h, tendo em conta a temperatura ótima de incubação para cada uma das estirpes selecionadas.

Tabela 4 - Identificação das estirpes selecionadas para o estudo.

Estirpes	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 ATCC
<i>Listeria monocytogenes</i>	4ACECT 934
<i>Salmonella Enteritidis</i>	CECT 40300
<i>E. coli</i>	ATCC
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 15442

#### 2.2.7 Metodologia para avaliação da atividade antibacteriana

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos procedeu-se em conformidade com a metodologia descrita por Vuyst *et al.* 1996, com ligeiras adaptações.

Preparou-se uma suspensão, a partir de uma cultura de 24 h das estirpes em estudo, tendo sido ajustada a sua densidade ótica (D. O.) entre 0,8 e 1,0, a um comprimento de onda de 625 nm, utilizando um espectrofotómetro (Ultrspec-2000 Pharmacia Bisteca, Inglaterra).

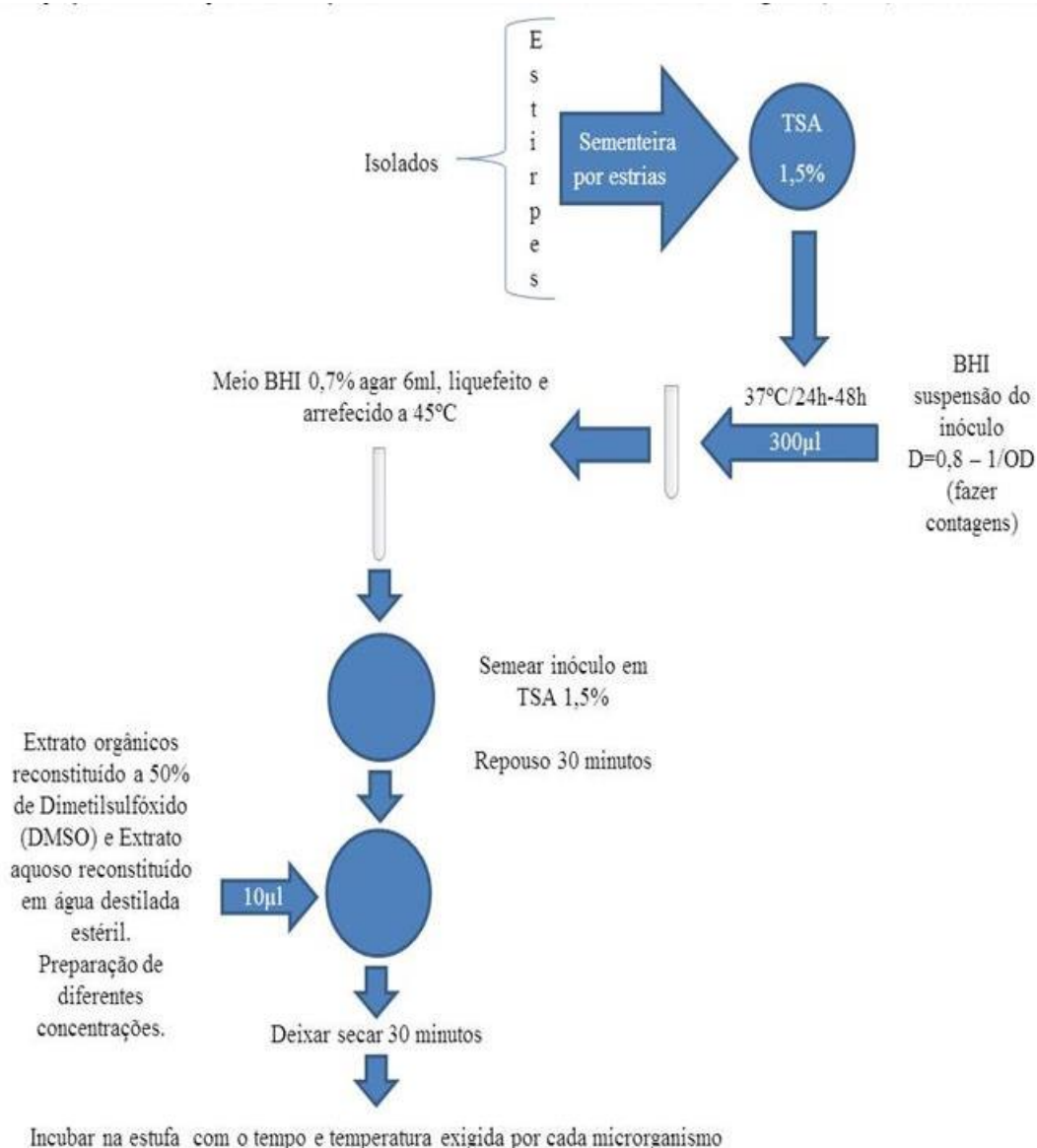
Foram retirados 300 µL dessa suspensão para tubos de ensaio com 6 mL de meio de cultura BHI com 0,7% de agar, previamente fundido. Os tubos foram mantidos em placas de aquecimento a uma temperatura de 45±1 °C (Digital Heatblock, USA). Após a homogeneização da suspensão no meio de cultura, este foi transferido para caixas de Petri contendo meio de cultura de Triptona de soja com 1,5% de agar (TSA) e deixou-se solidificar durante meia hora.

Posteriormente, depositou-se à superfície do meio 10 µL da solução de extrato nas concentrações de 500 mg/mL; 250 mg/mL; 150 mg/mL e 50 mg/mL para o extrato orgânico reconstituído em dimetil sulfóxido DMSO a 50% (Sigma- Aldrich, Brasil) e 200 mg/mL; 175 mg/mL; 150 mg/mL; 125 mg/mL do extrato aquoso reconstituído em água destilada estéril.

Após um período de secagem de meia hora, as caixas de Petri foram incubadas na estufa durante 24 h, de acordo com as exigências de temperatura de cada microrganismo indicador selecionado. A Figura 7, ilustra a técnica utilizada para o processo de avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *múkua* e de *mulala*.

Como controlos positivos, foram utilizadas as preparações das soluções dos extratos e para controlos negativos, utilizou-se a solução de DMSO a 50% para o extrato orgânico, e água destilada estéril para o extrato aquoso. A observação dos halos de inibição foi feita por apreciação qualitativa. A inibição considerou-se positiva na presença de halo e negativa na sua ausência.

Figura 7 - Processo de avaliação da atividade antibacteriana dos extratos *múkua* e de *mulala*, adaptado de Vuyst, *et al.* (1996).



## 2.2.8 Aplicação do extrato de *múkua* e *mulala* em preparado de carne embalado em atmosfera protetora e em aeróbios

Neste estudo pretendeu-se verificar o efeito antibacteriano do extrato aquoso de *múkua* e *mulala* aplicada a um preparado de carne. Para tal foram realizadas duas formulações experimentais de almôndegas com adição de 5% de extrato aquoso de *múkua* e 1,5% de *mulala*, embaladas em atmosfera protetora e em aerobiose e conservadas em câmara de refrigeração a 4 ° C. Este ensaio de elaboração das almôndegas com adição de 5% de extrato de *múkua* e 1,5%

de extrato de *mulala* foi repetido três vezes em dias de trabalho diferentes. Na Tabela 5 estão representadas as formulações aplicadas.

Os testes microbiológicos realizados incluíram a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C (A.T), *Enterobacteriaceae*, Bactérias do ácido láctico (BAL), *B. thermosphacta* e *S. coagulase negativo*, aos dias 0, 4, 8, 12, 18 e 22.

#### 2.2.8.1 Procedimento tecnológico para a elaboração de almôndegas

O processo de fabrico das almôndegas, teve em conta as boas práticas de higiene que contribuem para a obtenção de um alimento seguro.

Na Tabela 5, estão representadas as matérias primas e respetivas quantidades utilizadas na formulação das almôndegas. A Formulação (I) corresponde a amostras controlo sem adição de *múkua* e *mulala*. A formulação (II) representa a mistura de carne picada com adição de 1,5% de sal, água gelada e 5% de extrato de *múkua*. A formulação (III) representa a mistura de carne picada com adição de 1,5%, de sal , água gelada e 1,5% de extrato de *mulala*.

Selecionaram-se aparas de porco (trimmings) 80:20, mistura de carne magra (80%) e gordura (20%).

As aparas passaram pelo disco de 7-8mm da picadora (Braher P22, Espanha). Procedeu-se à pesagem de 500g da carne picada numa balança (Bizerba EC130E, Brasil) e de todos os ingredientes de acordo com a formulação descrita na Tabela 5. A adição de 1,5% de sal foi efetuada após prévia solubilização em água gelada. A homogeneização da mistura foi efetuada em misturadora de eixo planetário.

As almôndegas foram moldadas e colocadas em sacos de alta barreira, resistentes a tração, com excelente vedação dos resíduos do produto, ampla faixa de temperatura de vedação, excelente brilho e clareza do produto, com velocidade de transferência de O<sub>2</sub> (OTR) de 3 cc/m<sup>2</sup>/dia, CO<sub>2</sub> e vapor de água (WVTR) de 7g /m<sup>2</sup>/dia, TOPLEX HB- L- PE FP 80 (Plastopil, Israel). Os sacos foram selados posteriormente à injeção de uma mistura de gases ALIGAL\*13, CO<sub>2</sub> a 30% e N<sub>2</sub> a 70% (atmosfera protetora), (Air liquide, Portugal) utilizando-se a máquina (Henkovac T4, Holanda). Um segundo grupo de amostras foi embalado em aerobiose.

Tabela 5 - Matéria prima e quantidades utilizadas na elaboração das almôndegas

Formulação	Almôndegas		
	Matérias primas	I-Testemunha	II- <i>Múkua</i>
Carne picada de porco	500g	500g	500g
Sal comum	7,5g	7,5g	7,5g
Água gelada	50g	50g	50g
<i>Múkua</i>	-	25g	-
<i>Mulala</i>	-	-	7,5g

### 2.2.9 Aplicação do extrato com adição de 1% de *múkua* em salsicha fresca

Neste estudo pretendeu-se verificar o efeito antibacteriano com adição de 1% de extrato de *múkua* aplicada a salsichas frescas. Para tal foram realizadas duas formulações de salsichas frescas, uma testemunha e outra com adição de 1% de extrato de *múkua*, embaladas em atmosfera protetora e conservadas em câmara de refrigeração a 7 ° C. Este ensaio de elaboração das salsichas com adição de 1% de extrato de *múkua*, foi repetido três vezes em dias de trabalho diferentes. Na Tabela 6 estão representadas 2 formulações aplicadas no processo de fabrico de salsicha fresca. Os testes microbiológicos incluíram a contagem de microrganismos A. T a 30 ° C , *Enterobacteriaceae* e BAL nos dias 0, 5, 10, 20 e 30 dias. Avaliou-se também a cor através dos sistemas CIELab e o pH das amostras em estudo. Para as amostras embaladas em atmosfera protetora foi medida a percentagem de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

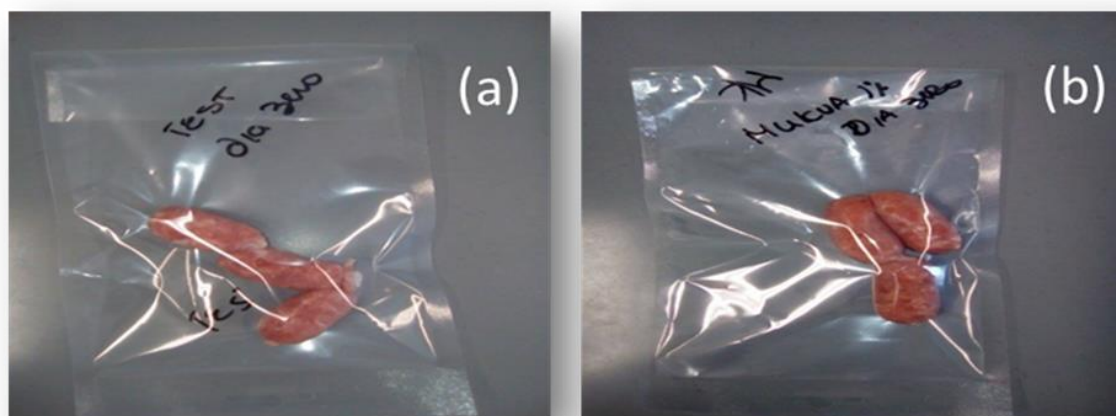
Tabela 6 - Matérias primas e quantidades utilizadas na elaboração das salsichas

Matérias primas	Fórmula Salsichas	
	Testemunha	<i>Múkua</i>
Carne picada de porco	1000g	1000g
Sal comum	15g	15g
Água gelada	200g	200g
Pimenta branca	1g	1g
Corante E- 120	2g	2g
<i>Múkua</i>	-	10g

### 2.2.9.1 Procedimento tecnológico para a elaboração de salsicha

Para elaboração da salsicha fresca pesaram-se 1000 g de aparas de carne de porco que foram picadas numa picadora (Braher P22, Espanha). A carne foi colocada numa misturadora de eixo planetário, na qual se dispersou o sal e condimentos dissolvidos em água gelada, (corante E-120, Espanha) e pimenta branca em pó. A massa obtida foi colocada numa enchedora (TALSA H15, EI, USA) procedendo-se ao seu enchimento em tripas de carneiro dessalgadas, de calibre 22/24, sendo porcionadas por torção. As salsichas obtidas foram acondicionadas em sacos de alta barreira (Toplex Hb L- PE PF 80, Plastopil, Israel) e embaladas em atmosfera protetora na máquina (Tecnotrip, Portugal) conforme ilustra a Figura 8a (salsicha fresca) e a Figura 8b (salsicha fresca com 1% de *múkuua*), numa mistura de CO<sub>2</sub> a 30% e N<sub>2</sub> a 70% (Air liquide, Portugal) sendo posteriormente mantidas em refrigeração a 7 ° C.

Figura 8. Aspeto da salsicha fresca embalada: testemunha (a) com adição de 1% de *múkuua* (b)



### 2.2.10 Análises Microbiológicas

#### 2.2.10.1 Preparação da amostra

Para a realização das análises microbiológicas, as amostras foram preparadas no laboratório de microbiologia, respeitando todos os cuidados de assepsia recomendados e de acordo com a norma ISO 6887-2/1999. Pesaram-se 10 g da amostra em estudo para um saco de *Stomacher* e adicionaram 90 mL do soluto de Triptona sal. Procedeu-se à homogeneização da suspensão –inicial ( $10^{-1}$ ) no homogeneizador *Stomacher* (Bag Mixer 400 P, Interscience, França) durante dois minutos. Procedeu-se de seguida a diluições seriadas tal como preconizado pela norma.

#### 2.2.10.2 Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 ° C

A contagem de microrganismos A.T a 30 ° C, foi realizada com sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em caixas de Petri. Posteriormente, foi adicionado o meio de cultura TGA-“Tryptona Glucose Extrato Agar” (Scharlau, Espanha) previamente fundido e mantido em banho-maria a 45±1 ° C. As placas foram incubadas na estufa a 30 ° C durante 48 a 72 h conforme a NP 4405: 2002. Após este período, efetuaram-se as contagens de unidades formadoras de colónias (ufc) sendo os resultados expressos em log.ufc/g.

#### 2.2.10.3 Contagem de bactérias ácido láctico

A contagem das BAL foi realizada por sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em caixas de Petri. Em seguida foi adicionado o meio de cultura MRS “De Man Rogosa and Sharpe.”(Scharlau, Espanha), suplementado com 1 mL de suplemento 2-3-5 trifeniltetrazólio a 1% por cada 100 mL do meio e 2 mL de acetato de tálio a 5% por cada 100 mL do meio de cultura. As placas foram incubadas na estufa a 30 ° C durante 48 h a 72 h no interior de uma caixa de anaerobiose, em que se colocaram geradores de anaerobiose GENbox anaer (Biomérieux SA, França), conforme rege a norma ISO 15214: 1998. Após este período foram efetuadas contagens das colónias características de coloração amarela e os resultados foram expressos em log.ufc /g.

#### 2.2.10.4 Contagem de *Brochothrix thermosphacta*

A contagem de *Brochothrix thermosphacta*, foi realizada com uma sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em caixas de Petri. Em seguida foi adicionado o meio de cultura STAA-agar “Streptomycin-thallos-acetate-actidione agar”(Oxoid, Inglaterra), enriquecido com o suplemento seletivo de STAA liofilizado (Oxoid LTD, Inglaterra), diluído com 2 mL de água destilada estéril, por cada 500 mL do meio de cultura STAA. As placas semeadas foram incubadas na estufa a 25 °C em microaerofilia, conforme a norma ISO 13722: 1996. Após este período foram efetuadas contagens das colónias características, brilhantes redondas ou circulares, com coloração amarela e os resultados foram expressos em log.ufc/g.

#### 2.2.10.5 Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada, com sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em caixas de Petri, adicionando o meio de cultura VRBD – agar “Crystal-violet neutral-red bile dextrose agar” (Scharlau, Espanha), e incubando na estufa a 37° C durante 48 h, de acordo com a ISO 21528-2: 2004. Após este período foram efetuadas contagens das colónias característica, de coloração vermelha e os resultados foram expressos em log.ufc/g.

#### 2.2.10.6 Contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa

A contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa foi realizada com sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal em caixas de Petri, adicionando o meio de cultura MSA agar “Mannitol Salt Agar” (Scharlau, Espanha), enriquecido com gema de ovo (Scharlau, Espanha), incubado a 37 ° C durante 48 a 72 h conforme a NP 4400-2: 2002. Após este período foram efetuadas contagens das colónias características com coloração amarela e os resultados foram expressos em log.ufc/g.

#### 2.2.11 Análises físico-químicas

##### 2.2.11.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com a NP 3441 (2008), utilizando um potenciómetro Portátil HI 9023 (HANNA Instrumento, Itália), munido de um elétrodo de perfuração do mesmo fabricante. O valor do pH foi calculado a partir da média aritmética de três medições consecutivas.

##### 2.2.11.2 Determinação da cor

Para a determinação da cor das amostras em estudo foi utilizado um colorímetro (CR-400 Minolta, Japão), que mede a luz refletida em cada comprimento de onda e quantifica os dados espectrais para determinar as coordenadas da cor do objeto no espaço. Este método baseia-se

num espaço tridimensional de modos que cada cor é representada por um único ponto, esse espaço é definido pelas coordenadas  $L^*a^*b^*$  onde:

Eixo  $L^*$  representa a luminosidade numa escala de 0 (preto) a 100 (branco).

Eixo  $a^*$  representa uma escala de tonalidade de vermelho (0+a) a verde (0-a).

Eixo  $b^*$  representa uma escala de tonalidade amarela (0+b) a azul (0-b).

O valor da média da cor obteve-se pela determinação aritmética de três valores consecutivos, dando comprimento do requisito da repetibilidade. E os resultados são dados em termos numéricos.

#### 2.2.11.3 Determinação do gás $O_2$ e $CO_2$

Para a medição do gás foi utilizado um medidor de gás portátil (Oxbaby- M+i  $O_2/CO_2$ , Alemanha) munido de uma agulha hipodérmica de perfuração, e um autoadesivo de apoio. A leitura dos resultados da % de oxigénio e dióxido de carbono é dada em termos numéricos.

#### 2.2.12 Análise estatística dos resultados

No tratamento dos resultados obtidos recorreu-se à análise descritiva e representação gráfica utilizando o Microsoft Excel® versão 2016 e o IBM-SPSS® Statistics 23.

Para o estudo do efeito dos fatores tipo de extratos utilizados nas almôndegas e condições de embalagem, em tempos fixos de armazenamento, utilizou-se o modelo de análise General L.r Model Multivariate, recorrendo ao programa IBM-SPSS Statistics 23. Quando o valor F foi significativo recorreu-se ao teste de Tukey a 95% de significância (IBM-SPSS Statistics 23) para testar comparações múltiplas. Na comparação entre períodos de armazenamento, e considerando as diferentes condições, efetuou-se análise de variância univariada one-way ANOVA para amostras independentes.

Os resultados relativos ao efeito da atividade antibacteriana com adição de 1% de *múkua* na salsicha fresca foram analisados estatisticamente pelo teste de variância univariada one-way ANOVA, com níveis de confiança de 95%, utilizando o programa IBM-SPSS Statistics 23.

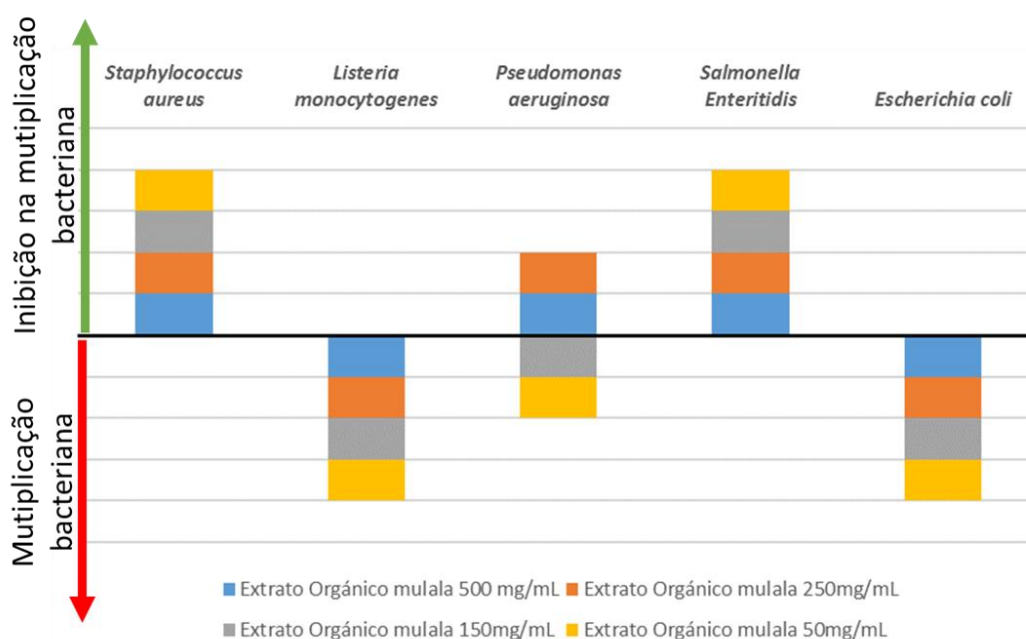
### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaio da atividade antibacteriana dos EO e EA de *mulala* e *múka*

No presente trabalho estudou-se o efeito da atividade antibacteriana dos extratos orgânico e aquosos da raiz de *mulala* e da *múka* sobre os microrganismos *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*.

Na Figura 9 podem-se observar os resultados da avaliação do efeito do extrato orgânico da *mulala* em cinco espécies de microrganismos. Só para 3 dos microrganismos indicadores se observou atividade antibacteriana em todas as concentrações de *mulala* em teste, sendo o caso de *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*. Neste último indicador apenas as concentrações mais elevadas mostraram efeito inibitório (500 e 250 mg/mL).

Figura 9 - Atividade do extrato orgânico de *mulala* na inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*



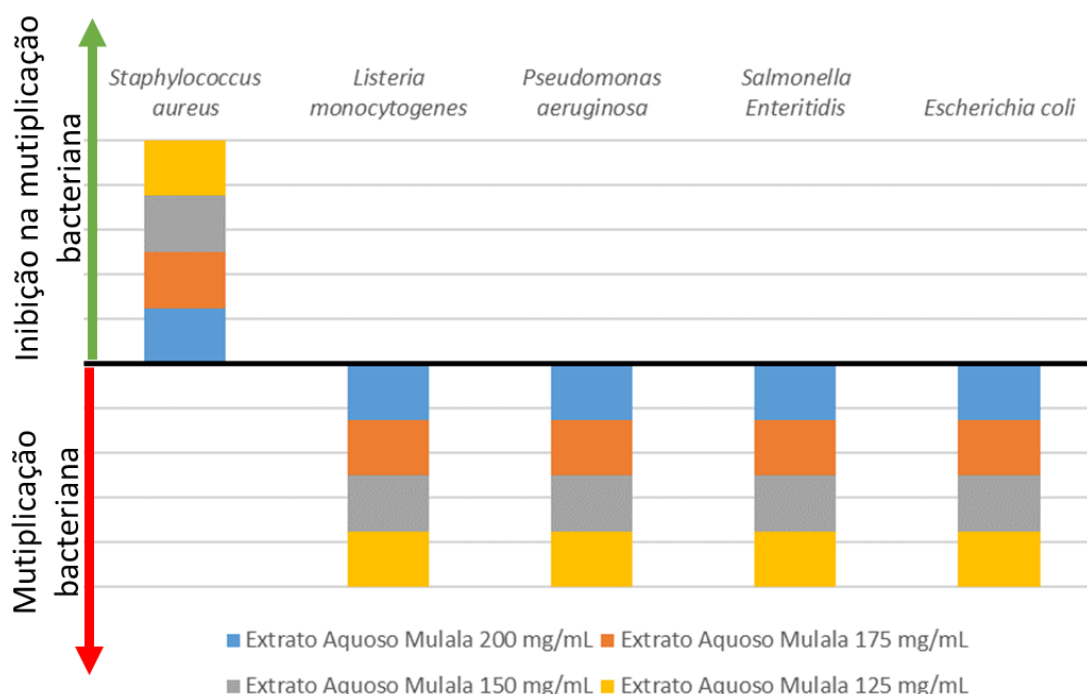
Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por outros autores que verificaram que os compostos químicos presentes na raiz de *E. natalensis*, tais como 7-metiljuglona, os seus dímeros (diospirinas, isodiospirina, neodiospirina), e os tripterpenos pentacíclicos, apresentam atividade antibacteriana (Lagnika, Sanni, Djimon & Anago, 2011).

O extrato orgânico de *E. natalensis* não apresentou efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* e *E. coli*. (Figura 9). Contudo, estes resultados contrariam o estudo efetuado por Lall & Meyer (2000) que referem um efeito inibitório sobre *E. coli*.

Relativamente à *L. monocytogenes* não foram encontradas quaisquer referências acerca do efeito inibitório do extrato orgânico de *mulala*.

Tal como se pode observar na Figura 10, contrariamente aos resultados do extrato orgânico, os resultados obtidos com o extrato aquoso da raiz de *mulala* não mostraram evidências de terem qualquer efeito inibitório sobre 4 dos 5 microrganismos testados. Apenas para *S. aureus* se observou inibição de multiplicação em todas as concentrações testadas do extrato aquoso de *mulala*. Estes resultados são concordantes com estudo efetuado por Neves (2010), que comprovou o efeito inibitório do extrato aquoso de *mulala* sobre *S.aureus*.

Figura 10 - Atividade do extrato aquoso de *mulala* na inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*.



Para o extrato orgânico de *múkua* (Figura 11) não foi observado qualquer efeito na inibição de multiplicação bacteriana. Os resultados obtidos não estão de acordo com o estudo efetuado por Yagoub, (2008) que também avaliou a atividade antibacteriana do extrato orgânico de *múkua*, tendo evidenciado efeito inibitório sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, e *E. coli*.

Estudos realizados por Kubmarawa *et al.* (2007) demonstraram que o uso de extratos aquosos e orgânico de diversas partes de plantas do embondeiro não tem efeito antibacteriano sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*. Em parte, estes resultados foram contrariados por Yagoub (2008) que investigou a atividade antibacteriana dos extratos aquosos e

orgânico de diversas partes de plantas do embondeiro tendo demonstrado o efeito inibitório sobre *E.coli*. Neste sentido, os nossos resultados (Figuras 11 e 12) diferem dos resultados obtidos por este autor, quando afirma que o extrato orgânico e aquoso do embondeiro tem efeito inibitório sobre *E.coli*.

Figura 11 - Atividade do extrato orgânico de *múkua* na inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*

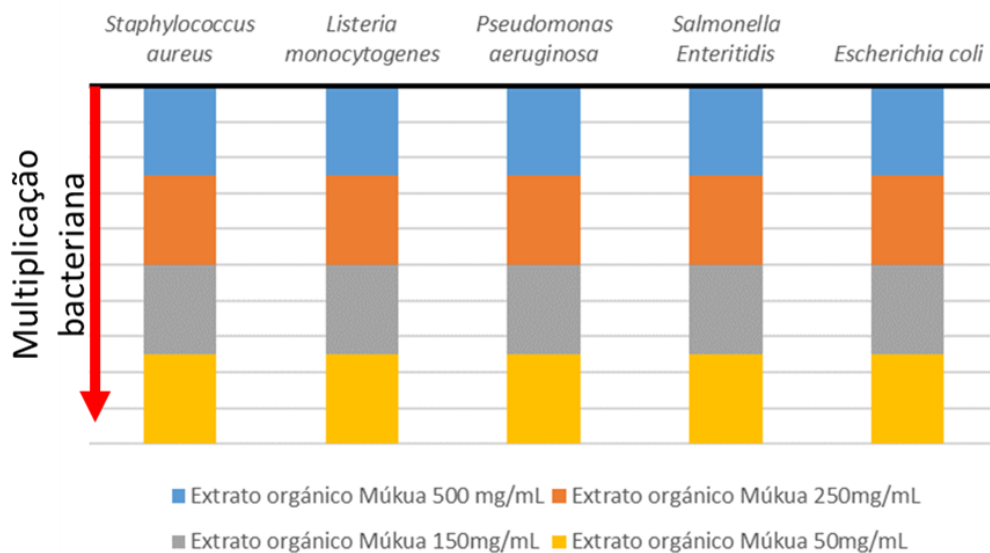
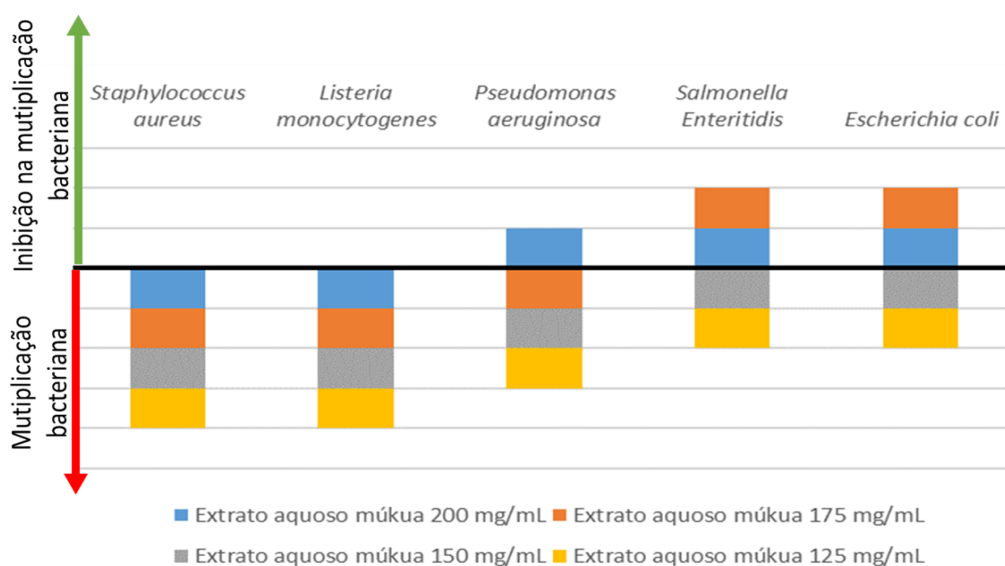


Figura 12 - Atividade do extrato aquoso de *múkua* na inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* e *E. coli*

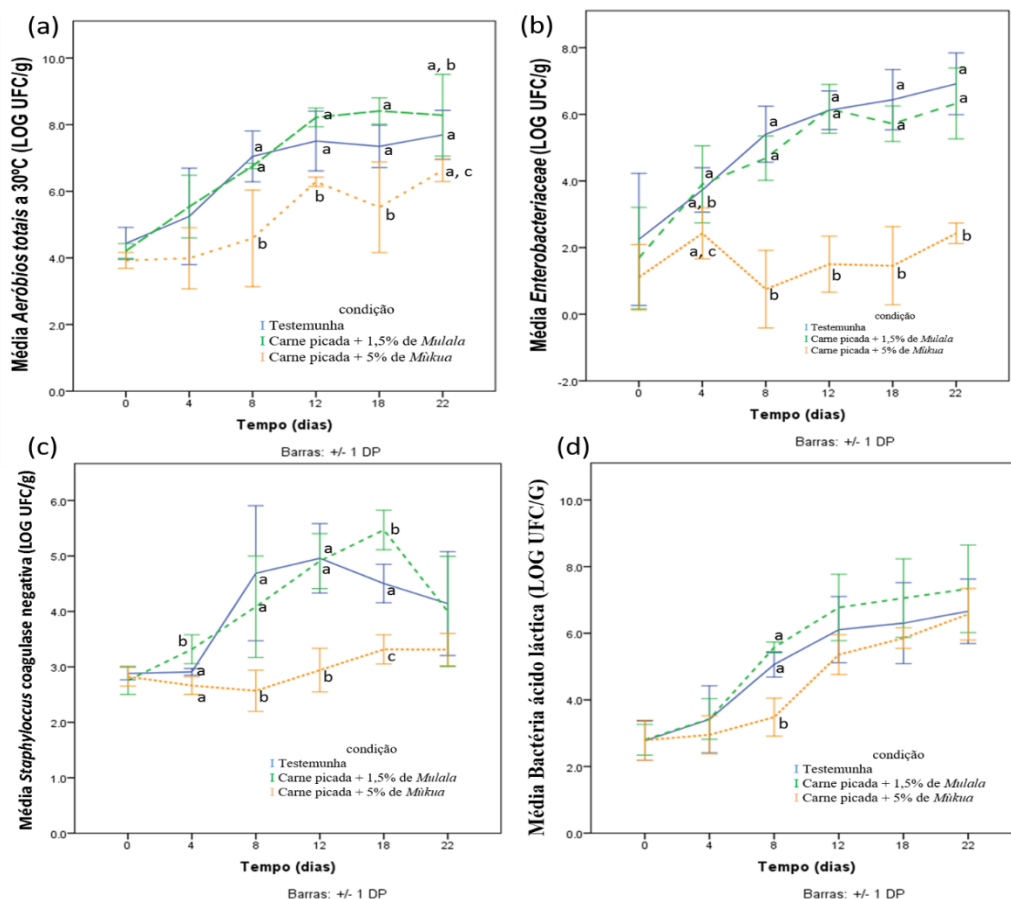


### 3.2 Efeito da aplicação dos extratos aquosos de *mulala* e de *múkua* num preparado de carne-modelo

O efeito da aplicação dos extratos aquosos de *mulala* e *múkua* em preparados de carne-almôndegas, foi avaliado em dois tipo de embalagem (atmosfera protetora e aerobiose) através de (i) indicadores microbiológicos com contagens microbianas (log.ufc /g) de aeróbios totais a 30°C, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Brochothrix thermosphacta* e Bactérias do ácido láctico (BAL); (ii) parâmetros físico-químicos: pH, percentagem de CO<sub>2</sub>, e de O<sub>2</sub> e índices de cor (L\*a\*b\*).

A Figura 13 mostra a evolução em média dos diferentes grupos microbianos, (a)- A.T a 30°C b)-*Enterobacteriaceae* c)-*S.* coagulase negativa e d)- BAL, nas almôndegas com 1,5% de extrato aquoso de *mulala* e 5% de extrato aquoso de *múkua*, durante um período de armazenamento pré-estabelecidos (0, 4, 8, 12, 18 e 22 dias) para as três formulações de almôndegas (Testemunha, 1,5% de *Mulala* e 5% de *Múkua*).

Figura 13 - Evolução ( médias dias) de diferentes grupos microbianos (a), (b), (c) e (d) em almôndegas (Testemunha, 1,5% de *Mulala* e 5% de *Múkua* embaladas em atmosfera protetora e aerobiose armazenadas a 4°C durante 22 dias.



\*letras diferentes ( a, b, c ) correspondem a diferenças significativa (P <0,05) entre médias em cada período de tempo.

De um modo geral, observou-se a mesma tendência de multiplicação nas três condições em estudo, similar à clássica curva sigmoide de multiplicação microbiano. Contudo, verificou-se que a formulação de almôndegas com adição de *múkua* apresentou consistentemente médias de log.ufc/g inferiores às das restantes formulações, para os quatro grupos microbianos.

As almôndegas testemunha e com *mulala* apresentam valores médios de A.T a 30°C semelhantes e significativamente mais elevados dos apresentados pelas almôndegas com *múkua* aos 8, 12 e 18 dias. As almôndegas com *múkua* demonstraram maior aptidão para inibir a multiplicação microbiana. No dia 22, há diferenças significativa (P<0,00) entre as médias obtidas com a *múkua* e a *mulala*, sendo os valores da *múkua* inferiores aos da *mulala*.

Entretanto, não se observaram diferenças significativas (P>0,05) entre as médias dos dois tratamentos (*múkua* e *mulala*) e a média da testemunha. A contagem de A.T a 30 ° C, permite estimar a totalidade dos microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, sem, contudo, especificar a que grupo mais restrito pertencem. A garantia da qualidade microbiológica no preparado da carne é essencial para que o produto seja apto para o consumo. Neste sentido, os critérios microbiológicos de qualidade estabelecidos no regulamento da (CE) nº 1441/2007 devem ser rigorosamente cumpridos por todos os operadores.

Em termos de durabilidade verificou-se mediante os resultados obtidos na formulação da almôndega testemunha o valor inicial de A.T a 30°C no dia zero de 4,43 log.ufc/g, tendo aumentado no dia 4 para 5,32 log.ufc/g. De acordo com o estudo efetuado por Vasilopoulos *et al.*, 2015, o limite de aceitabilidade para A.T é de 10<sup>6</sup> ufc /g, assim estabeleceu-se como prazo de validade da almôndega testemunha, se conservadas a uma temperatura entre 0 e 4° C, 5 dias.

Este mesmo critério pode ser aplicado para a formulação da almôndega com adição de *mulala* por apresentar valores similares de A.T a 30°C. A adição de *múkua* parece indicar um melhor desempenho na redução do teor microbiano. Observou-se que no dia zero revelou um valor de 3,92 log.ufc /g e no dia 12 o valor de 6, 35 log.ufc/g.. Estabeleceu-se então como prazo de durabilidade 10 dias, aproximadamente, desde que conservadas a uma temperatura entre 0 e 4 ° C. Na Tabela 1 Anexo 1, estão representados os valores das médias e desvio padrão obtidos nas três formulações.

Em relação ao *B. thermosphacta*, não foram quantificados microrganismos durante os 22 dias de armazenamento, nas almôndegas, adicionadas de *múkua*. De acordo com Vasilopoulos *et al* (2015) o valor aceitável das *B.thermosphacta* situa-se entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup>ufc/g.

Quanto à contagem de *Enterobacteriaceae* é de realçar a evolução das diferenças encontradas entre as contagens obtidas nas almôndegas com *múkua* e as das restantes

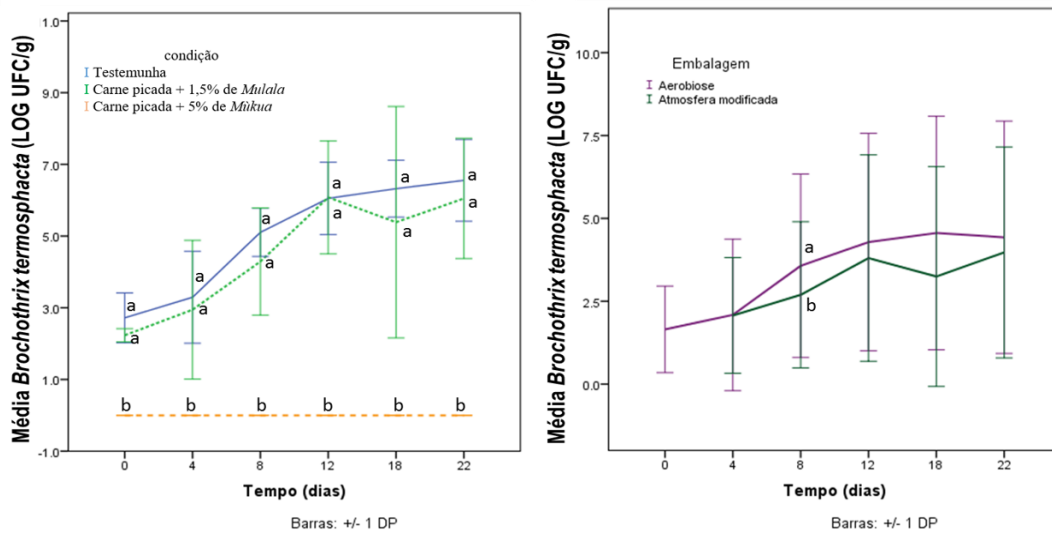
formulações, que aumentaram para mais do dobro (almôndega testemunha e com *mulala*), entre os dias 4 e 22 de armazenamento. Confirmou-se a tendência da *múkua* adicionada nas almôndegas inibir com maior preponderância a multiplicação microbiana. Os resultados obtidos coincidem com os estudos efetuados por Yagoub (2008) e de Kaboré *et al* (2011), que confirmaram o efeito inibitório do extrato de *múkua* para *Enterobacteriaceae*.

Relativamente a *Staphylococcus* coagulase negativa (Figura 13- c) demonstrou-se que as médias de contagem nas almôndegas com *mulala* e com *múkua* exibiram uma diferença significativa ( $P < 0,01$ ) com os resultados das contagens obtidos com as almôndegas testemunha aos 4 dias de armazenamento. Contudo, aos 8 e 12 dias observou-se uma subida substancial dos valores médios de contagem de *Staphylococcus* nas almôndegas com *mulala* sendo significativas as diferenças com os resultados obtidos nas almôndegas com *múkua* ( $P < 0,00$ ). No dia 18 observaram-se diferenças significativas entre as médias obtidas nas almôndegas das três formulações ( $P < 0,01$ ), sendo a almôndega com *múkua* a que exibiu os valores mais baixos. Estes resultados coincidem com estudos efetuados por Yagoub (2008) que demonstraram o efeito inibitório do extrato aquoso de *múkua* sobre *Staphylococcus*. Contrariamente, Kubmarawa *et al.* (2007) demonstraram que o extrato aquoso de *múkua* não tem efeito inibitório sobre *Staphylococcus*.

Quanto às contagens obtidas no grupo BAL (Figura 13- d), observou-se que o seu comportamento era idêntico nas almôndegas das três formulações ao longo tempo. Apenas no dia 8 houve diferenças significativas entre a *múkua* e as restantes formulações ( $P < 0,03$ ).

Relativamente às contagens de *B. thermosphacta*, (Figura 14-a) observou-se que na formulação de almôndegas com *múkua* esta foi inferior a 10 ufc /g. Nas formulações com *mulala* e testemunha, a multiplicação desta bactéria não mostrou diferenças significativas durante o tempo de armazenamento ( $P > 0,05$ ). Na mesma (Figura, 14- b) observa -se a contagens de *B. thermosphacta*, para a totalidade das almôndegas, em função do tipo de embalagem, tendo-se evidenciado para o dia 8 diferenças significativas entre os dois tipos de embalagem ( $P < 0,00$ ). Neste sentido, foram as almôndegas com *múkua* sob influência da embalagem protetora que exibiram os valores mais baixos de multiplicação microbiana. Estes resultados estão de acordo com os estudos efetuados por Vasilopoulos *et al* (2015) que observaram que as embalagens com atmosfera protetora favorecem a estabilização do teor microbiano, controlam as reações enzimáticas atrasando a degradação e aumentam a conservação da carne durante um período de tempo mais longo.

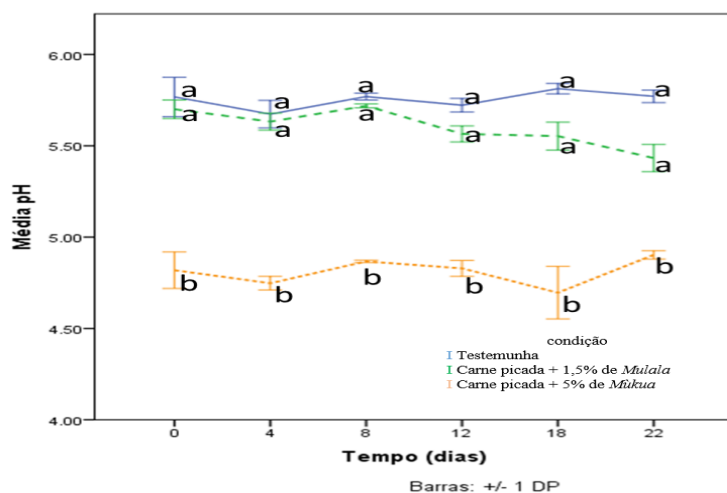
Figura 14 - Multiplicação (log /g) de *Brochothrix thermosphacta*, para as três formulações de almôndegas (a) e por tipo de embalagem (b)



Os resultados deste trabalho mostraram as potencialidades dos metabolitos secundários presentes na *múkuá* como aditivo natural na redução da multiplicação de algumas espécies microbianas potencialmente patogênicas, tal como foi demonstrado nos estudos efetuados por Assogbadjo *et al.* (2012), que observaram que a *múkuá* possui compostos fitoquímicos como, terpenos, flavonoides e taninos, substâncias com propriedades antibacterianas. Resultados similares foram previamente obtidos por Masola, Mosha & Wanbura (2009), que também atribuíram a atividade antibacteriana da *múkuá* sobre microrganismos patogênicos à presença destes compostos.

Quando se analisou o comportamento do pH nas três formulações de almôndegas (testemunha, mulala e *múkuá*), tal como se mostra na Figura 15, observaram-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Figura 15 - Avaliação do pH nas três formulações de almôndegas



Os valores médios de pH da almôndega adicionada de *múkua* foram consistentemente mais baixos comparativamente às restantes formulações (Testemunha e *mulala*) durante o período de armazenamento, sendo os valores de pH superiores na formulação da almôndega testemunha.

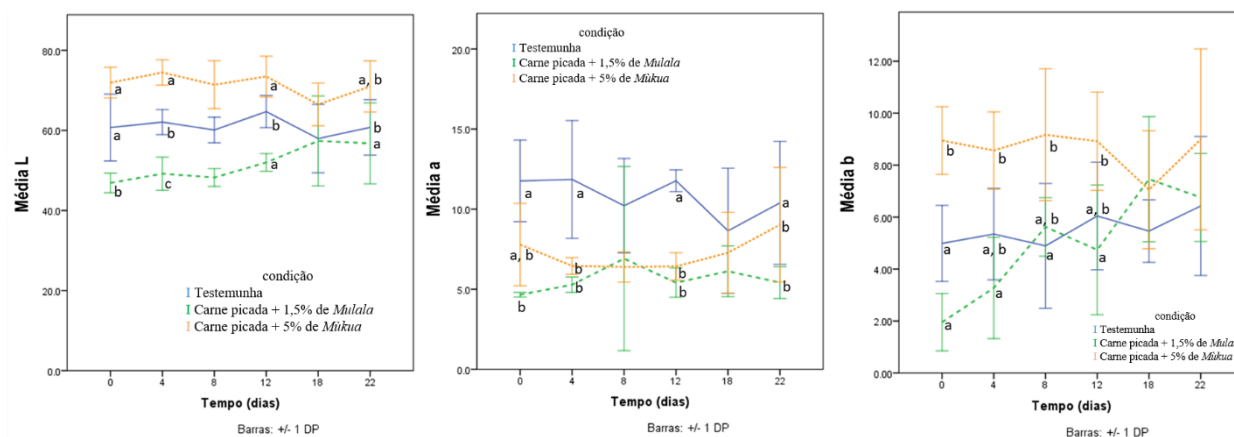
O ligeiro aumento do pH da almôndega adicionada de *múkua* no dia 22, pode estar relacionado

com a carga microbiana nesta fase de armazenamento. Estudos efetuados por Hernandez-Macedo, Barancelli & Conteras - Castillo (2011), determinaram as características da microbiota em carne embaladas em atmosfera protetora e a vácuo concluindo que a presença de bactérias anaeróbias facultativas em produtos refrigerados e embalados nas condições referidas são capazes de metabolizar os aminoácidos para produzirem aminas e amoníacos, podendo causar o início do processo de deterioração da carne.

Em relação ao efeito da cor das almôndegas, os resultados demonstraram que os tipos de embalagens (atmosfera protetora e aerobiose) a que foram sujeitas as três formulações de preparado de carne (testemunha, *mulala* e *múkua*) durante os dias de armazenamento, não influenciaram significativamente este parâmetro físico-químico ( $P > 0,05$ ). Estes resultados podem ser atribuídos ao efeito das misturas de gases contidas nas embalagens, sendo 30% CO<sub>2</sub> e 70% de N<sub>2</sub> (Holley & Gill, 2005).

A análise de variância dos valores obtidos para a cor, avaliada pela luminosidade L\*, intensidade do vermelho a\* e intensidade de amarelo b\* no preparado de carne (almôndegas) em estudo está representada na Figura 16. Foram observadas variações entre as três formulações de almôndegas (testemunha, *mulala* e *múkua*) durante o período de armazenamento. A interação entre os fatores foi significativa em todos os parâmetros da cor.

Figura 16 - Avaliação da cor nas três formulações de almôndegas



Quanto à medição do índice L\* verificou-se um valor ligeiramente baixo para a formulação contendo *mulala* (+56,7) quando comparado com as formulações testemunha (+60,7) e formulação com *múkua* (+70,9) durante os 22 dias de armazenamento. Porém, os resultados obtidos neste estudo evidenciaram diferenças significativas ( $P < 0,00$ ) nos dias 0, 8 e 12 entre as três formulações. No dia 22 os resultados revelaram diferenças significativas ( $P < 0,02$ ) entre a formulação com adição de *mulala* e a formulação com adição de *múkua*. A cor das almôndegas com a adição de *múkua* aparece rosa clara explicando-se esta diferença comparativamente com a testemunha pela ação do pH na carne induzida pela *múkua* ao provocar desnaturação proteica e maior reflexão da luz. Por outro lado, a adição de *mulala* torna o preparado mais escuro.

Estudos, realizados por Teixeira, Carvalho, Neves, Lima & Perreira (2013) com extratos de vegetais adicionados a preparados de carne, registaram valores de luminosidade relativamente baixos, estes autores concluíram que valores mais baixos de L\* indicam produto mais escuro. Os nossos resultados corroboram aos resultados obtidos por estes autores.

Quanto à intensidade do amarelo b\* verificou-se que a formulação de 1,5% de *mulala* inicialmente apresentou o valor mais baixo (+1,9) tendo aumentado gradualmente ao longo do tempo até 6,7 no dia 22, apesar da formulação testemunha apresentar um valor ligeiramente mais baixo (+6,4). Contudo não foram evidenciadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os dias 18 e 22.

No dia zero os resultados obtidos revelam diferenças significativas  $P < 0,04$  entre as três formulações. No dia 8 a formulação com adição de *múkua* difere das duas formulações (testemunha e *mulala*) já no dia 12 observou-se diferença significativa ( $P < 0,03$ ) entre a formulação com adição de *múkua* e a formulação com adição *mulala* e estas não diferem da testemunha. Segundo Alcantara *et al.* (2012), um dos fatores que podem influenciar este parâmetro, é a oxidação lipídica, que é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, podendo conduzir à modificação de cor, do sabor e da textura. E muitas destas alterações

causadas por reações oxidativas são por vezes difíceis de serem controladas devido à complexidade e variabilidade das reações envolvidas, a variação do pH também pode influenciar.

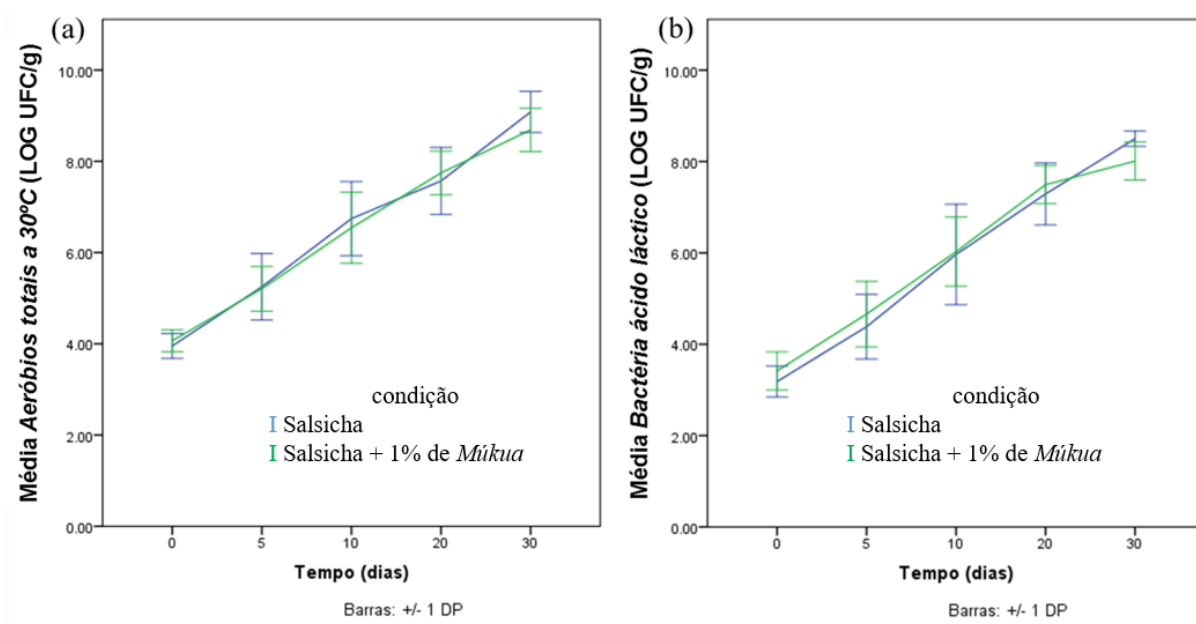
Relativamente ao parâmetro  $a^*$ , observou-se no dia zero diferenças significativas ( $P \leq 0,01$ ) entre a formulação testemunha (+11,7) com as formulações *mulala* (+4,5) e *múkua* (+7,7), apesar das formulações *mulala* e *múkua* não serem diferentes entre si. No entanto, nos dias 8 e 18, não foram observadas diferenças  $P > 0,05$  no parâmetro  $a^*$  nas três formulações. Já no dia 12, observaram-se diferenças significativas entre a testemunha e as formulações *mulala* e *múkua* apesar destas não diferenciarem entre si. No dia 22, observou-se que a formulação testemunha foi apenas diferente  $P < 0,02$  da formulação com *mulala* mas não com formulação contendo *múkua*. Efeito da aplicação do extrato aquoso a 1% de *múkua* na salsicha fresca

Os resultados obtidos com este trabalho mostram que a *múkua* foi efetiva na inibição da multiplicação microbiana, pelo que se aplicou este extrato aquoso a 1% na formulação da salsicha fresca.

De acordo com a Figura 17, observou-se uma mesma tendência de multiplicação dos A.T. a 30°C nas duas condições em estudo (curva clássica sigmoide de multiplicação microbiana).

Contudo, não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre as médias das duas formulações.

Figura 17 - Curva de multiplicação de A.T a 30° C e BAL em duas formulações de salsichas frescas (testemunha e adicionada de 1% *múkua*) armazenadas ao longo do tempo de armazenamento



As contagens de A.T. a 30 ° C na salsicha fresca (testemunha), no tempo zero, é de 3,95 log.ufc/g e na salsicha adicionada de *múkua* é de 4,06 log.ufc/g. No dia 5, o valor de A.T. a 30 °C passou a ser de 5,25 log.ufc/g na salsicha fresca (testemunha) e de 5,20 log.ufc/g na salsicha com *múkua* (Tabela nº 1, anexo 2). Se o teor de aeróbios totais a 30 °C for estimado em  $10^5$ , logo o prazo de durabilidade para as duas formulações é de 4 dias.

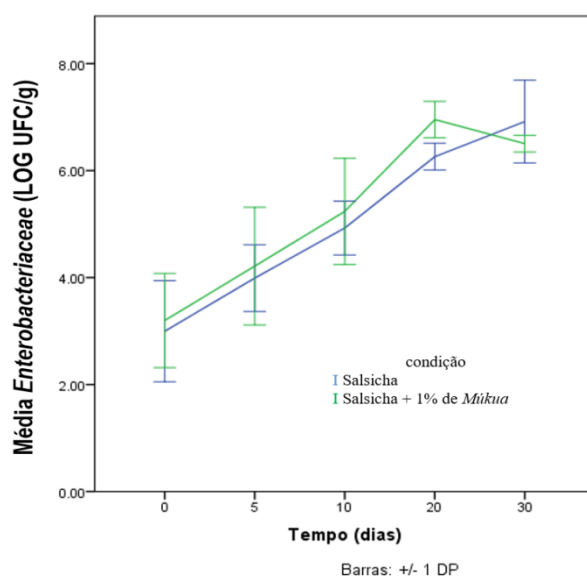
Relativamente às BAL, observou-se também a mesma tendência de multiplicação nas duas condições em estudo. Isto revela que estes microrganismos apresentam uma multiplicação exponencial, o que revela uma boa adaptação ao produto cárneo. Este resultado pode ter sido influenciado por diversos fatores entre os quais se destacam o teor microbiano inicial, pH da microbiota, métodos de processamento e o ambiente. Para as BAL, não se observaram diferenças significativas ( $P > 0,05$  entre as duas formulações e durante o período de armazenamento. Estes

resultados podem ser explicados em parte pela capacidade de competição das BAL com grande adaptação às matrizes cárneas conforme evidenciado por Alcantara *et al.* (2012).

Ao que parece, a *múkua* não inibiu os diferentes grupos de microrganismos aqui estudados, já que os resultados das análises de microrganismos A.T a 30 °C e BAL efetuadas em salsichas com *múkua* não mostraram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) com a testemunha.

Observou-se uma tendência similar na multiplicação das *Enterobacteriaceae* (Figura 18) entre as duas condições de salsicha (testemunha e salsicha com *múkua*). Só ao fim de 20 dias de armazenamento, a contagem de *Enterobacteriaceae* na salsicha com *múkua* foi significativamente superior  $P<0,04$  à salsicha fresca (testemunha).

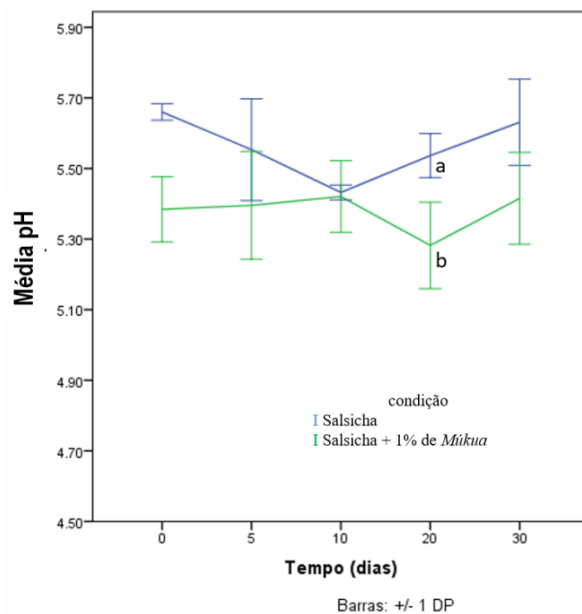
Figura 18 - Curva de multiplicação das *Enterobacteriaceae*, em duas formulações de salsichas frescas armazenadas ao longo do tempo de armazenamento



A julgar pelos resultados obtidos, a adição de *múkua* na percentagem utilizada não foi satisfatória quanto à sua capacidade inibitória nesta família de microrganismo. No entanto, esta quantidade de apenas 1 % de *múkua* teve como objetivo não introduzir alterações drásticas na cor do produto.

Quando se analisou o comportamento do pH nas duas formulações da salsicha (Figura 19), observaram-se diferenças significativas no dia 20 ( $P<0,04$ ), sendo os valores na salsicha testemunha sempre superiores ao obtidos com salsicha com *múkua*. Entre o dia 0 e 10, o valor médio de pH na salsicha testemunha diminuiu e a partir do dia 10 aumentou.

Figura 19 - Avaliação do pH nas duas formulações de salsichas frescas



Contrariamente, o pH na salsicha com *múkuia* mostrou um comportamento oposto, tendo aumentado ligeiramente entre o dia 0 e 10, depois diminuiu do dia 10 ao dia 20 e voltou a aumentar até ao dia 30. Esta diminuição do pH na salsicha com *múkuia* entre o dia 10 e 20, não chegou a criar uma situação acentuada de acidez de modo a provocar a inibição da microbiota do produto.

Analisando os resultados obtidos nos parâmetros da cor, verificou-se pelas médias iniciais, que as salsichas frescas possuem tons claros ( $L^*$ ), avermelhados  $a^*$  e  $b^*$  amarelos, sendo que estes valores, não apresentaram diferenças significativas entre tipos de embalagens para  $P(>0,05)$ .

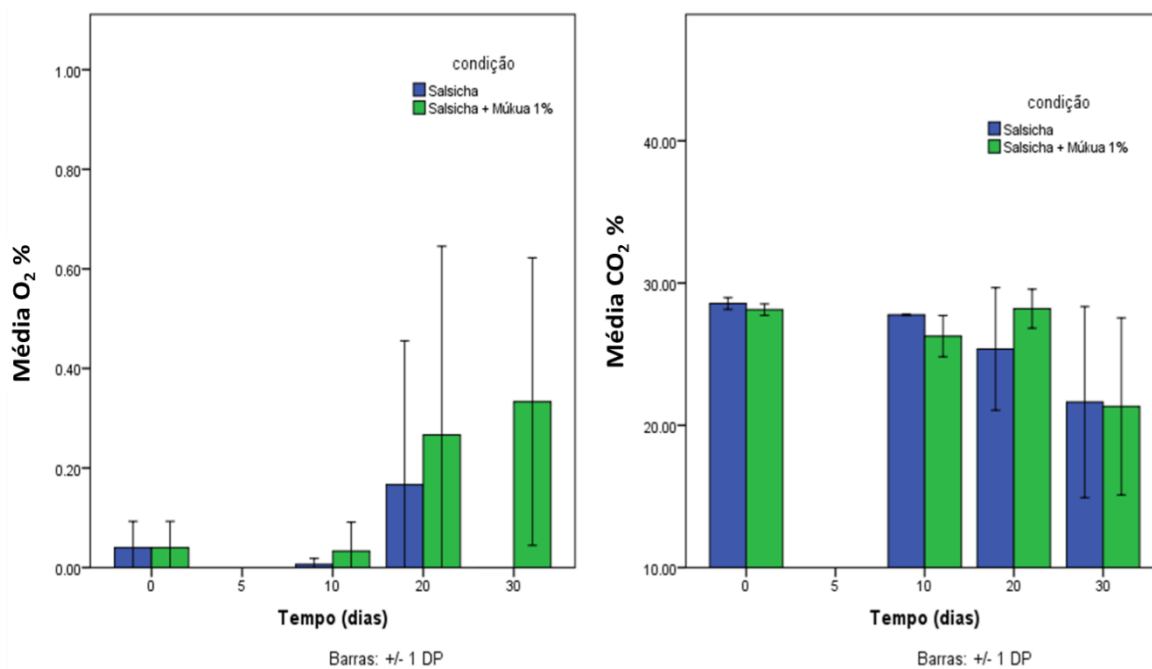
Os valores iniciais de  $L^*$  entre as duas formulações, salsichas (testemunha) e salsicha adicionada de *múkuia*, demonstraram valores superiores nos preparados de carne durante os 30 dias de armazenamento, tendo a salsicha (testemunha) apresentado valor (+61,0) ligeiramente superior no de salsicha adicionada de *múkuia* que registou o valor de (+60,9).

A medição dos valores do parâmetro  $a^*$  é considerado como um dos melhores parâmetros para estudar a estabilidade da cor sendo um atributo de qualidade com maior influência na decisão de compra dos consumidores (Alcantara *et al.*, 2011). Este conceito também foi verificado neste estudo, pois o parâmetro  $a^*$  apresentou valores relativamente superiores na salsicha (testemunha) com valores de (+17,7). Contudo verificou-se que a salsicha adicionada de *múkuia* evidenciou diferença significativa no valor de  $a^*$  no tempo 10 para um  $P < 0,01$  comparado ao apresentado pela salsicha testemunha.

Os valores do parâmetro  $b^*$  na salsicha testemunha foram ligeiramente baixos. Contudo não foi observada diferença significativa entre ambas as formulações. Na Tabela 2 do anexo 2, estão representadas as médias dos referidos parâmetros

A Figura 20 mostra os resultados das análises realizadas para avaliação dos gases, existentes nas embalagens protetoras usada para salsichas testemunha e salsichas com 1% de *múkua*.

Figura 20 - Avaliação dos gases  $O_2$  e  $CO_2$  presente nas salsichas frescas



Observou-se que no dia 0, a concentração de  $CO_2$  na embalagem das salsichas com *múkua* era de 28,1%, enquanto que na salsicha testemunha o valor era de 28,5. No referido período, a presença de  $O_2$  foi residual nas duas formulações. Estes valores estão de acordo com os valores recomendados para este tipo de embalagens demonstrando as vantagens da utilização deste tipo de embalagens no prolongamento da vida útil da carne (Holley & Gill, 2005)

## 4 Conclusões

Os extratos vegetais utilizados, mostraram ser efetivos na inibição dos microrganismos patogénicos e deterioradores.

Entre os extratos utilizados para comprovar a atividade antibacteriana, o extrato aquoso com adição de 5% de *múkua*, mostrou ser o melhor candidato como aditivo natural no produto cárneo-modelo. Contudo, poderá ser otimizada a sua incorporação para se conseguir esse efeito sem que se produzam alterações nas características organolépticas.

O extrato aquoso adicionado numa concentração de 1% de *múkua* mostrou ser insuficiente para inibir a multiplicação da microbiota com aumento do período de vida das mesmas. Contudo, a sua incorporação poderá ser otimizada para se conseguir esse efeito sem que se produzam alterações nas características organolépticas.

### 4.1 Recomendações

Aprofundar os estudos comprovativos da atividade antibacteriana de extratos vegetais, em particular da *múkua* e da *mulala*.

Realizar ensaios de otimização da aplicação da *múkua* em produtos cárneos.

Incentivar as pesquisas locais sobre o nosso património natural com pesquisas científicas, de modo a que as informações sejam documentadas para posterior uso.

Avaliar a potencial utilização de outros extratos vegetais, ainda não estudados, como aditivos naturais.

## 5 Bibliografia

- Alcantara, M., Morais, I. C. L., Matos, C. & Sousa, O.C.C. (2012). Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Revista brasileira de higiene e sanidade animal*, 6 (1), 1- 20.
- Assogbadjo, A. E., Chadare, F. J., Kakaï, R. G., Fandohan, B. & Baidu-Forson, J. J. (2012). Variation in biochemical composition of *baobab* (*Adansonia digitata*) pulp, leaves and seeds in relation to soil types and tree provenances. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 157, 94-99.
- Banach, J. L., Stratakou, I., H. J. van der Fels-Klerx , Besten & Zwietering, M. H. (2016). European alerting and monitoring data as inputs for the risk assessment of microbiological and chemical hazards in spices and herbs. Acedido em Out. 18, 2016, disponível em <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.
- Barco, L., Belluco, S., Roccato, A & Ricci, A. (2015). A systematic review of studies on *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* on beef carcasses at the slaughterhouse, *International Journal of Food Microbiology*, 30-39.
- Buchamann, C., Prehsler, S., Hart, A. & Volg, C. R. (2010). The important of *baobab* (*Adansonia digitata* L) in rural west African subsistence – suggestion of a cautionary approach to international market export of baobab fruit. *Eology of food and nutrition*, 49,145-172.
- Caluwé, E., Halamová, K. & Van Damme, P. (2010). *Adansonia digitata* L: A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika focus*, 23, (1), 11-51.
- Casey, J. A., Kim, B. F Larsen, J., Price, L. B. & Nachman, K. E. (2015). Industrial food animal production and community health. *Global environmental health*. 2, 259-271.
- Codex Alimentarius (2006). Higiene dos Alimentos. Textos básicos. Acedido em jul. 24, 2016, disponível em: [http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

- Chadare, F. J., Linnemann, A. R., Hounhouigan, J. D., Nout, M. J. R & Van Boekel M. A. J. S. (2009) *Baobab* Food Products: A Review on their Composition and Nutritional Value. *Critic Rev. Food Science. Nutrition*, 49, 254-274.
- Compaoré, W. R., Nikiéma, P.A., Bassolé, H. I. N., Savadogo, A., Mouecoucou J., J., Hounhouigan, D. J. & Traoré, S. A. (2011). Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biblobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3 (1), 64-72.
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S. & Singh, R. K. (2015). *Listeriosis* in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review, *Veterinary Quarterly*. Acedido em Nov. 2, 2016, disponível em: [http// dx.doi.org/](http://dx.doi.org/)
- Dias, T., Melo, H. C., Alves, F. R. R., Carvalho, R. F., Carneiro, K.S., & Sousa, C. M. (2015). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos tomateiros mutantes fotomorfogénicos. *Ciência rural*, Santa Maria, 45 (5), 782-787.
- Drebes, T., Majolo, C. & Fröder, H. (2012). Avaliação do uso de placas de petrifilm EB para a enumeração de *Enterobacteriaceae* em amostras de frango, *Ciência tecnológica dos alimentos*, Campinas 32 (3), 588-593.
- Doulgeraki, A. I, Ercolini, D, Villani, F, John, G & Nycha, E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in diferente conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 157, 130- 141.
- Eder & Rezende, F. (2012). As lendas do *Baobab* Africa- Quatro cantos do mundo. Acedido em junho 24, 2016, disponível em: <http://quatrocantosdomundo.wordpress.com/>
- EFSA (2012) - Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. European Food Authority. Acedido em 24 de Outubro, 2016, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/>

EFSA, (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. European Food Safety Authority. Parma, Italy: *EFSA Journal* 2015, 13, 1- 3991.

EFSA, (2016). Update on Multi-Country *Salmonella* Outbreaks in 2016. Steep fall in reported cases. European Food Safety Authority. Acedido em 3 de Novembro, 2016, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/>

Filipe, M., Gomes, E.T., Serrano, R. & Silva, O. (2008). *Caraterização farmacognóstica da raiz de Euclea natalensis*. Workshop. Plantas medicinais e fitoterapêuticas nos trópicos. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia

FIB (2010). Agentes antimicrobianos químicos e naturais. Food Ingredients Brasil, nº15, acedido em junho 24, 2016, disponível em: <http://www.revista-fi.com/>

Franco, B. D. G. M. & Landgraf, M. (2008). Microbiologia dos alimentos. São Paulo Editora Atheneu, 93- 98.

Hernández- Macedo, M.L, Brancelli, J. V & Contreras- Castillo, C.J. (2011). Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: A review, acedido em 3 de Novembro, 2016, disponível em <http://dx.doi.org/>

Food and Drug Administration (2009). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000273. Acedido em julho 9, 2016, disponível em: <http://www.fda.gov/>.

Holley, R. A. & Gill, C. O. (2005). Uso da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. Palestra. III Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de carnes

Ibrahima, C., Didier, M., Max, R., Pascal, D., Benjamin, Y. & Renaud, B. (2013). Biochemical and nutritional properties of *baobab* pulp from endemic species of Madagascar and the African mainland, *African Journal of Agricultural*, 8(47), 6046-6054.

- ISO 13722 (1996). Meat and meat products- Enumeration of *Brochothrix thermosphacta*- colony- count technique.
- ISO 15214 (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees C.
- ISO 6887-2 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs- preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination./General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 21528 – 2 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* Part 2: Colony-count method.
- INSA. (2006). Instituto nacional de saúde Dr. Ricardo Jorge. Centro de segurança alimentar e nutricional. Tabela da composição dos produtos alimentares.
- Kaboré, D., Sawadogo- Lingani, H., Diawaral, B., Compaoré, C. S., Dicko, M. H. & Jakobsen, M. (2011). A review of baobab (*Adansonia digitata*) products: Effect of processing techniques, medicinal properties and uses, *African Journal of Food Science*, 5 (16), 833-844.
- Kadariya, J., Smith, T. C & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*. Volume 9. Acedido em Nov. 2, 2016, disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/>
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I. & Viljoen, A. M. (2011). An updated review of *Adansonia digitata*: A commercially important African tree. *South African Journal of Botany*, 77, 908-919.
- Kivoloka, F. P. (2015). *Estudo para valorização da polpa do fruto da Adansonia digitata L.* Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar- Qualidade e Segurança Alimentar: Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Lisboa.

- Kubmarawa, D., Ajoku, G. A., Enwerem, N. M. & Okorie, D. A. (2007). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria . *African journal of biotechnology*, 6 (14), 1690-1696.
- Kuende, J. P. (2010). *Extração e quantificação das vitaminas B2 (Riboflavina) e B6 (Piridoxina) no sumo de múkua*. Luanda: Dissertação de Licenciatura em Química: Faculdade de Ciências - Universidade Agostinho Neto.
- Lagnika, L., Sanni, A., Djimon, G. J. & Anago, E (2011). Antibacterial Activity and Phytochemical Study of Six Medicinal Plants used in Benin. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14 (7), 449-555.
- Lall, N. & Meyer, J. J. (2000). Antibacterial activity of water and acetone extracts of the roots of *Euclea natalensis*, *Journal Ethnopharmacol*, 72, 1-2.
- Lessa, A. O. (2011). *Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo Do potencial para processamento da polpa de frutos de Maracujá das espécies silvestres (Passiflora setacea DC, Passiflora cincinnata MAST)*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste de Bahia.
- Leroi, F., Fall, P.A., Pilet, Chevalier, F. & Baron, R. (2012). Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium*. *Food Microbiology*, 31(2), 222- 228
- Lima, P.C., Bruno, M.L., Figueiredo, E.A.T., Quiberoni, A.L., Carvalho, J.D.G. & Carvalho, A.K.F. (2012). Resistência de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos provenientes de unidades de processamento de queijo Coalho. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42 (6), 1117-1122.
- Loffler, L & Loffler, P. (2005). Swaziland tree atlas- including selected shrubs and climbers report, *Southern African botanical diversity network*, Pretoria, 38-69.
- Lopes, M. H. B. (1972). *Contribuição para o estudo das naftoquinonas de Euclea lanceolata E. Mey ex DC*. Dissertação de Doutorado. Porto: Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto.
- Lues, J. F. R. & Van Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, 18, 326-332.

- Magaia, T. (2015). Chemical analysis to promote the use of wild fruits from Mozambique. Ph.D. Thesis. Lund: Faculty of *Engineering at Lund, Lund University*
- Malta, S. B. (2013). Benefícios nutricionais e medicinais do *baobá*. Caminho de volta. Acedido em julho 14, 2016, disponível em <http://www.caminho de volta.blogs.pt/>
- Martins, A. D. O., Mendonça, R. C. S., Silva, D.L., Ramos, M.S., Martins, M.C., Donzele, J.L. & Andrade, N. J. (2006). Resistência de bactérias lácticas isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 5(1), 53-59.
- Matope, J. (2012). Coisas de Moçambique *Mulala*. Acedido em: julho, 9, 2016, disponível, em <http://www.mmo.co.mz/mulala/>
- Masola, S.N., Mosha, R. D. & Wambura, P. N., (2009). Assessment of antimicrobial activity of crude extract of stem and root barks from *Adansonia digitata* (*Bombacaceae*) Africa baobab African *Journal of Biotechnology* 8, 5076, 5083).
- Mingura, L.G., Hendriksenc, R. S., Fraile, L. & Aarestrupc, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 170, 1-9.
- Mozzi, F., Raya, R.R. & Vignolo, G. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. (2nd ed.), Argentina, Wiley- Blackwell.
- Neves, C.S (2010). Avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade aguda do extrato bruto das raízes de *Euclea natalensis* A.DC (Mulala) Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- Nhukarume, L., Chikwambi, Z., Muchuweti, M. & Chipurura, B. (2010). Phenolic content and antioxidant capacities of *Parinari curatelifolia*, *Strychnos spinosa* and *Adansonia digitata*. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 207-221.

Niyonzima, E., Ongol, P. M., Kimonyo, A. & Sindic. M. (2015). Risk factors and control measures for bacterial contamination in the bovine meat chain: A Review on *Salmonella* and Pathogenic *E.coli*. *Journal of Food Research*; 4, 5;1927-0895.

Nowak, A., Rygala, A., Oltuszek-Walczak, E. & Walczak, P. (2010). The Prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways. Research Article Society of Chemical Industry, *Food Agriculture*, 92, 1304, 1310.

NP 723 (2006), Norma Portuguesa Salsicha fresca. Definição e características. (2ª edição) Lisboa: Instituto Português de Qualidade.

NP 3441 (2008) Norma Portuguesa. Carnes e produtos cárneos. "Medição do pH. Métodos de referência." Lisboa: Instituto Português de Qualidade

NP 4400-2- (2002) Norma Portuguesa. Microbiologia alimentar. – "Regras gerais para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva. *Staphylococcus aureus* e outras espécies Parte 2 Técnica sem confirmação de colónias. Métodos corrente de colónias." Lisboa: Instituto Português de Qualidade.

NP 4405 (2002), Norma Portuguesa. Microbiologia alimentar. – "Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30 °C." Lisboa: Instituto Português de Qualidade.

Oliveira, D. M.& Bastos, D.H.M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. Acedido aos Out. 31, 2016, disponível em <http://www.dox.doi.org/>

Parkouda, C., Sanou, H., Tougiani, A., Korbo, A., Nielsen, D. S., Debrah, K.T., Raebild, A., Diawara, B. & Jensen, J. S. (2012). Variability of Baobab (*Adansonia digitata* L.) fruits' physical characteristics and nutrient content in the West African Sahel. *Agroforest systems*, 85, 455-463.

Predrag, L., Song, H., Cong, U., Azaizeh, H. & Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 198-204.

- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2005) *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas, Família Enterobacteriaceae*. In P. J Quinn (Ed). Porto Alegre: Editora Artmed S.A.
- Rahul, J., Jain, M. K., Singh, S. P., Kamal, K. R., Anuradha, Naz, A., Gupta, A. K. & Mrityunjaya, S. K. (2015). *Adansonia digitata* L. (*baobab*): a review of traditional information and taxonomic description. *Asian Pacific Journal of tropical biomedicine*, 5 (1), 79-84.
- Retief, E, Siebert, S. J. & Van Wyk, A.E. (2008). A new species of *Euclea* (Ebenaceae) from ultramafic soils in Sekhukhuneland. South Africa, with notes on its ecology, *Bothalia* 38, (1), 31-37.
- Regulamento (CE) nº 853/2004 de 29 de abril de 2004. Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/55.
- Regulamento (UE) nº 1129 /2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº 333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, mediante o estabelecimento de uma lista de aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295/1
- Regulamento (CE). nº 1441/ 2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o regulamento (CE)nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. (Texto relevante para efeitos do EEE).
- Rotariu, O., Thomas, D. J. I., Goodburnc, K. E., Hutchison, M. L & Strachana, N. J. C. (2013). Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes* *Food Control*, 284-292.
- Ruiz, J. (2007). Ingredients. F. Toldrá (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. (pp. 59-76). Oxford: Blackwell publishing professional.
- Safarpour, H. (2014). Microbiological Quality of Fresh Beef Meat After *Salvia officinalis* L. Essential Oil Treatment and Vacuum Packaging. *Journal of Applied Science and Agriculture*, 9 (2): 471-473.

- Sanchez, A. C., Osbom, P. E. & Haq, N. (2010). Identifying the global potential for baobab tree cultivation using ecological niche modeling. *Agroforestry systems*, 80, 191-201.
- Severo, J., Lima, C. S. M., Coelho, M. T., Rufatto, A. R., Rombaldi, C. V. & Silva, J. A. (2010). Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis* (*Physalis- peruviana*, L) durante o amadurecimento e o armazenamento, *Agrociência, Pelotas* 16, 77-82.
- Silva, M. C., Izidine, S. & Amude, A. B. (2004). A preliminary checklist of the vascular plants of Mozambique Catálogo provisório de plantas superiores de Moçambique. *Sabonet, Southern African Botanical Diversity Network Report*, 30.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S. & Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos e atividade antioxidante em produtos vegetais: *Ciências Agrárias*, 31 (3), 669-682.
- Silva, P.D. (2012). *Determinação de compostos fenólicos por HPLC*. Dissertação de Mestre em Química Industrial. Covilhã: Faculdade de Ciências - Universidade de Beira Interior.
- Teixeira, E. M. B., Carvalho, M. R. B., Neves, V. A., Lima, T. M. A. & Pereira, L. A. (2013). *Characterization of beef burger made with Moringa (Moringa oleífera Lam.)*. *Brazilian Soc. Food Nutr*, 38 (3), 220-232.
- UNCTAD (United Nations Conference on Trade and Development), (2005). Market brief in the European union for selected natural ingredients derived from native species. *Adansonia digitata* L. (*Baobab*). Acedido em julho 9, 2016. disponível em [http// www.biotrade.org/](http://www.biotrade.org/)
- Varela, C.L. S. (2014) *Efeitos induzidos por pressões isostáticas sequenciais em bactérias deteriorativas a espécie Brochothrix thermosphacta*. Dissertação de mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa.
- Vasilopoulos, C., Vuyst, L & Lero, F. (2015) Shelf-life Reduction as an Emerging Problem in Cooked Hams Underlines the Need for Improved Preservation Strategies, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(10), 1425-1443.

- Venter, S. M. & Witkowski, E. T. F. (2010a). *Baobab (Adansonia digitata L.) density, size-class distribution and population trends between four land-use types in northern Venda, South Africa. Forest Ecology and Management, 259, 294-300*
- Venter, S. M. & Witkowski, E. T. F. (2010b). *Baobab (Adansonia digitata L): fruit production in communal and conservation land – use types in Southern Africa. Forest Ecology and Management, 261, 630-639.*
- Vera, A., González, G., Dominguez, M. & Bello, H. (2013). *Main virulence factors of Listeria monocytogenes and regulation. Rev Chilena Infectol, 30, 407-416.*
- Vidotto, M. C., Lima, N. C. S., Fritzen, J. T.T, Freitas, J. C., Venâncio. E. J & Ono, A. M. (2009). *Frequency of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 40 (1) 1678- 4405.*
- Vimalanathan, S. & Hudson, J. B. (2009). *Multiple inflammatory and antiviral activities in Adansonia digitata (Baobab) leaves, fruits and seeds. Journal of Medicinal Plants Research, 3, 576-582.*
- Vuyst, L., Callewaert, R. & Pol, B. (1996). *Characterization and antagonistic activity of Lactobacillus amylovorus D C E 471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. Systematic and Applied Microbiology, 19, 9-20.*
- Waldman, M. (2015). *O baobá na paisagem Africana. Jornal angolano de artes e letras, acedido em Agosto 6, 2015, disponível em: <http://jornalcultura.sapo.ao/>.*
- Wickens, G. E. (2008). *Historical Background In G .E. Wickens (Ed).The Baobabs: Pachycauls of Africa, Madagascar and Australia. Netherlands: Springer Netherlands, 1-2.*
- Xavier, C. N. H. (2011). *Avaliação in situ do efeito do gel contendo Euclea natalensis na superfície dentária antes do desafio erosivo seguido da abrasão. Dissertação de Mestrado em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas aplicadas na área de concentração de saúde coletiva. Bauru: Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo.*

- Yagoub, S.O. (2008). Antimicrobial activity of *Tamarindus Indica* and *Adansonia digita* extracts against *E.coli* isolated from urine and water specimens. *Research Journal of Microbiology*, 3(3), 193-197.
- Yusha'u, M., Hamza, M. M. & Abdullahi, N. (2010). Antibacterial activity of *Adansonia digitata* stem bark extracts on some clinical bacterial isolates. *International Journal of Biomedical and Health Sciences*, 6(3), 129-135.
- Zotte, A. D., Celia, C. & Szendrő, Zs. (2016). Herbs and spices inclusion as feedstuff or additive in growing rabbit diets and as additive in rabbit meat: A review *Livestock Science*, 189, 82–90. Acedido em Out. 18,2016. Disponível em [http:// www.elsevier.com/locate/livsci/](http://www.elsevier.com/locate/livsci/)

## **Anexos**

## 6 Anexos

### Anexo 1

#### ALMÔNDEGAS

#### Medidas de Aeróbios totais

Condição			Tempo (dias)						Total
			0	4	8	12	18	22	
Testemunha	Aerobiose	N	3	3	3	3	3	3	18
		Média	4.433	5.323	7.083	7.710	7.313	7.663	6.588
		DP	0.483	1.729	0.846	0.956	0.660	0.785	1.536
	Atmosfera protetora	N		3	3	3	3	3	15
		Média		5.170	7.013	7.307	7.383	7.723	6.919
		DP		1.488	0.857	0.989	0.755	0.857	1.274
	Total	N	3	6	6	6	6	6	33
		Média	4.433	5.247	7.048	7.508	7.348	7.693	6.738
		DP	0.483	1.445	0.763	0.898	0.636	0.736	1.411
Carne picada + 1.5% de <i>Mulala</i>	Aerobiose	N	3	3	3	3	3	3	18
		Média	4.210	5.737	6.767	8.093	8.477	8.340	6.937
		DP	0.219	1.149	0.012	0.237	0.531	1.401	1.733
	Atmosfera protetora	N		3	3	3	3	3	15
		Média		5.343	6.747	8.340	8.347	8.227	7.401
		DP		0.885	0.127	0.312	0.306	1.330	1.386
	Total	N	3	6	6	6	6	6	33
		Média	4.210	5.540	6.757	8.217	8.412	8.283	7.148
		DP	0.219	0.942	0.081	0.282	0.394	1.223	1.578
Carne picada + 5% de <i>Múkua</i>	Aerobiose	N	3	3	3	3	3	3	18
		Média	3.927	3.877	4.920	6.353	5.840	6.693	5.268
		DP	0.237	1.154	1.298	0.081	1.164	0.350	1.357
	Atmosfera protetora	N		3	3	3	3	3	15
		Média		4.103	4.257	6.220	5.203	6.563	5.269
		DP		0.855	1.801	0.166	1.724	0.381	1.443
	Total	N	3	6	6	6	6	6	33
		Média	3.927	3.990	4.588	6.287	5.522	6.628	5.269
		DP	0.237	0.917	1.450	0.138	1.361	0.335	1.374
Total	Aerobiose	N	9	9	9	9	9	9	54
		Média	4.190	4.979	6.257	7.386	7.210	7.566	6.264
		DP	0.364	1.458	1.274	0.933	1.352	1.090	1.684
	Atmosfera protetora	N		9	9	9	9	9	45
		Média		4.872	6.006	7.289	6.978	7.504	6.530
		DP		1.127	1.653	1.058	1.689	1.099	1.625
	Total	N	9	18	18	18	18	18	99
		Média	4.190	4.926	6.131	7.337	7.094	7.535	6.385
		DP	0.364	1.265	1.438	0.969	1.489	1.062	1.655

## Anexo 2

AT

Condição		Tempo (dias)					Total
		0	5	10	20	30	
Salsicha	N	3	3	3	3	3	15
	Média	3.953	5.250	6.743	7.570	9.083	6.520
	DP	0.473	1.264	1.405	1.273	0.780	2.067
Salsicha + 1% de <i>Múkua</i>	N	3	3	3	3	3	15
	Média	4.067	5.207	6.543	7.747	8.690	6.451
	DP	0.414	0.850	1.348	0.832	0.823	1.889
Total	N	6	6	6	6	6	30
	Média	4.010	5.228	6.643	7.658	8.887	6.485
	DP	0.402	0.963	1.236	0.967	0.749	1.946

## SALSICHAS

Médias Aeróbios totais a 30

Médias do parâmetro da luminosidade

L

Condição		Tempo (dias)					Total
		0	5	10	20	30	
Salsicha	N	3	3	3	3	3	15
	Média	68.006	65.019	61.720	60.728	60.967	63.288
	DP	5.149	6.700	4.293	7.270	1.804	5.417
Salsicha + 1% de <i>Múkua</i>	N	3	3	3	3	3	15
	Média	66.456	65.450	65.674	62.208	61.091	64.176
	DP	2.869	2.728	5.435	5.013	2.065	3.933
Total	N	6	6	6	6	6	30
	Média	67.231	65.234	63.697	61.468	61.029	63.732
	DP	3.823	4.581	4.887	5.644	1.736	4.673

Médias do parâmetro a\*

A

Condição		Tempo (dias)					
		0	5	10	20	30	Total
Salsicha	N	3	3	3	3	3	15
	Média	17.658	15.687	16.942	15.390	12.809	15.697
	DP	2.131	2.234	0.213	1.309	1.245	2.190
Salsicha + 1% de <i>Múkua</i>	N	3	3	3	3	3	15
	Média	16.844	14.414	14.816	13.953	14.403	14.886
	DP	1.430	2.860	0.369	0.303	2.451	1.860
Total	N	6	6	6	6	6	30
	Média	17.251	15.051	15.879	14.672	13.606	15.292
	DP	1.683	2.399	1.196	1.158	1.946	2.039

Médias do parâmetro b\*

B

Condição		Tempo (dias)					
		0	5	10	20	30	Total
Salsicha	N	3	3	3	3	3	15
	Média	8.882	5.836	5.112	4.991	5.663	6.097
	DP	3.513	0.474	1.116	1.568	1.501	2.198
Salsicha + 1% de <i>Múkua</i>	N	3	3	3	3	3	15
	Média	7.930	7.500	6.412	5.557	5.216	6.523
	DP	2.222	1.415	1.607	0.325	0.514	1.616
Total	N	6	6	6	6	6	30
	Média	8.406	6.668	5.762	5.274	5.439	6.310
	DP	2.680	1.312	1.427	1.059	1.033	1.908