

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**Otimização da germinação de leguminosas com
vista à melhoria da composição nutricional e da
segurança microbiológica**

Sofia Garigali Pestana

Dissertação orientada pela Investigadora Auxiliar Carla Alexandra
Fino Alberto da Motta e coorientado pela Professora Associada com
agregação Madalena Maria Vilela Pimentel

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2023

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Otimização da germinação de leguminosas com vista à melhoria da composição nutricional e da segurança microbiológica

Sofia Garigali Pestana

Dissertação orientada pela Investigadora Auxiliar Carla Alexandra Fino Alberto da Motta e coorientado pela Professora Associada com agregação Madalena Maria Vilela Pimentel

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2023

Resumo

A germinação de leguminosas em ambiente doméstico tem vindo a ganhar popularidade devido à perceção de que é uma prática simples e acessível que pode aprimorar a qualidade nutricional do alimento a germinar. Contudo, as leguminosas germinadas podem acarretar elevados riscos microbiológicos cuja magnitude poderá não ser conhecida pelo público interessado. O presente trabalho de investigação teve como objetivo determinar se a germinação, praticada sob diferentes condições de tempo e temperatura, pode aprimorar a qualidade proteica de leguminosas e produzir rebentos com qualidade higiénica e microbiológica aceitáveis. Sementes de leguminosas orgânicas foram adquiridas em lojas comerciais, lavadas, demolidas e germinadas durante 24 e 48 horas a 18°C ou 25°C sob condições controladas. Um tratamento térmico de 80°C/20s foi aplicado aos rebentos. Para analisar a qualidade microbiológica, foram contados microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e fungos, conforme os respetivos métodos (Normas ISO), nas sementes demolidas e nos rebentos, e pesquisas de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, pelo método VIDAS[®], nos rebentos prontos a consumir. Para avaliar a qualidade proteica, foi realizada a quantificação de aminoácidos totais por UPLC-DAD e da proteína total, das sementes secas e dos rebentos, pelo método de *Kjedahl*. Foram observados níveis Não Satisfatórios de microrganismos aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* na maioria das amostras germinadas. As leveduras estiveram presentes em níveis aceitáveis e os bolores foram somente contados em duas amostras germinadas, também em níveis aceitáveis. Não foram contadas colónias de *E. coli* (<10 ufc/g) e não foram detetadas as presenças de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras. O tratamento térmico estudado não provou ser eficaz na redução da contaminação de microrganismos aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* até níveis aceitáveis para a maioria das amostras. A germinação de leguminosas não demonstrou aprimorar a qualidade proteica das leguminosas estudadas. Sabendo que as sementes foram germinadas sob condições controladas, é possível prever que a prática de germinação caseira, se realizada sem a adoção de medidas higiénicas, pode levar à produção de rebentos com elevado risco microbiológico.

Palavras-chave: leguminosas; germinação; qualidade microbiológica; perfil de aminoácidos; qualidade proteica.

Abstract

Germination of pulses within a domestic environment has been gaining popularity since it is marketed as a quick and simple practice that is claimed to improve pulse seed nutrition. Sprouted seeds can, however, harbor major microbiological risks that may be unknown to consumers who take an interest in practicing home sprouting. The aim of this study is to figure out whether germination performed under different conditions of time and temperature can improve seed protein quality and lead to the production of microbiologically safe and hygienic ready-to-eat legume sprouts. Organic pulses bought from retail stores were washed and soaked and allowed to germinate during 24 and 48 hours at 18°C or 25°C, under controlled conditions. A temperature treatment (80°C, 20 seconds) was applied to the sprouts. Aerobic mesophilic, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, yeasts and molds were quantified with conventional methods (ISO standards) in the soaked seeds and sprouts to evaluate microbiological quality. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were detected by the VIDAS ® method on ready-to-eat sprouts. In order to evaluate samples' protein quality, total amino acid quantification of seeds and sprouts was performed by UPLC-DAD analysis and protein concentration was obtained through the Kjeldahl method. Aerobic mesophilic and *Enterobacteriaceae* were counted at unsatisfactory levels for most sprouted samples. Yeasts were present at acceptable levels for all samples and molds were only counted in two sprouted samples, also at acceptable levels. No *E. coli* were counted (<10 ufc/g), and no *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were ever detected. The temperature treatment studied was not effective in reducing the contamination of CAM and *Enterobacteriaceae* to acceptable levels for most samples. Germination of pulses was not shown to improve protein quality in studied seeds. Considering that seeds were germinated under controlled conditions, we can predict that practicing germination in a domestic environment, without aseptic conditions or hygienic practices, instead of promoting healthy habits through nutritional value, could lead to the production of sprouts with high microbiological risk.

Keywords: pulses; germination; microbial quality; amino acid profile; protein quality.

Agradecimentos

Expresso o meu agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Doutora Carla Motta, por aceitar acompanhar-me neste projeto e por todos os conhecimentos que me transmitiu durante a minha estadia no INSA. O seu apoio foi essencial para ultrapassar as dificuldades que surgiram ao longo do percurso.

À minha coorientadora, a Professora Madalena Pimentel, agradeço a sua pronta colaboração e disponibilidade prestadas na orientação do trabalho.

À Doutora Rosália Furtado, agradeço todo o seu contributo prestado na execução dos procedimentos microbiológicos, bem como a sua disponibilidade face a todas as minhas solicitações no decorrer deste projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Alimentação e Nutrição, em especial à Anabela Coelho, à Maria João e à Sílvia Marcos pelo acolhimento e conselhos que me prestaram e pelo bom ambiente que me proporcionaram.

E por último, um especial obrigado à minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional, paciência e dedicação ao longo de toda esta jornada.

Índice

Resumo.....	i
Abstract	ii
Agradecimentos.....	iii
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras	ix
Lista de gráficos	ix
1. Introdução	1
1.1 Motivação para a dissertação.....	1
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Estrutura da dissertação	2
2. Fundamentos teóricos	4
2.1 Produção e consumo de leguminosas	4
2.2 Conteúdo nutricional das leguminosas	5
2.3. Qualidade proteica.....	6
2.4.1. <i>Score</i> de aminoácidos	7
2.4.2. <i>Score</i> de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas.....	8
2.4.3. <i>Score</i> de Aminoácidos Indispensáveis Digestíveis.....	9
2.3. Germinação de leguminosas	9
2.3.1 Etapas da germinação	10
2.4.3 Efeito da germinação na qualidade proteica de leguminosas	12
2.3 Riscos microbiológicos associados à germinação de leguminosas	14
2.3.1. <i>Salmonella</i> spp.	15
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina <i>Shiga</i>	15
2.4.1. Microrganismos indicadores de higiene e de alteração	16
2.5. Principais causas da contaminação de rebentos	18
2.5.1. Mecanismos de colonização bacteriana	19
2.5.2. Risco microbiológico da germinação caseira	20
2.6 Medidas de mitigação.....	21
2.6.1 Produção de sementes	21
2.6.2 Produção industrial de rebentos	21
2.6.3 Produção caseira de rebentos	22
2.6.4. Legislação europeia	22

2.7 Métodos de descontaminação	24
2.7.1. Sementes	24
2.7.2. Rebentos industrializados	25
2.7.3. Rebentos caseiros	26
3. Materiais e métodos	27
3.1 Amostras	28
3.2 Testes prévios de germinação	28
3.3 Medição do comprimento dos rebentos	29
3.4 Germinação em condições controladas	29
3.5 Tratamento térmico dos rebentos	31
3.6 Análise da qualidade microbiológica	31
3.6.1. Contagem de microrganismos indicadores de higiene	32
3.6.2. Cálculo e expressão de resultados (ISO 7218)	35
3.6.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.8 Avaliação da qualidade proteica	41
3.8.1. Doseamento de aminoácidos	41
3.8.2. Determinação da proteína total	44
3.8.3. <i>Score</i> de aminoácidos	46
3.9 Análise estatística	47
4. Resultados e Discussão	48
4.1 Medição do comprimento dos rebentos	48
4.2. Análise da qualidade microbiológica	50
4.2.1. Microrganismos aeróbios mesófilos	50
4.2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Escherichia coli</i> não patogénica	51
4.2.3. Fungos totais	53
4.2.4 <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	55
4.2.5 Interpretação da qualidade microbiológica das amostras	55
4.3. Tratamento térmico	55
4.4 Análise da qualidade proteica	57
4.4.1 Teor de aminoácidos	57
4.4.2 <i>Score</i> de aminoácidos essenciais	63
4.4.3 Teor proteico	64
5. Conclusões	67
Recomendações para trabalhos futuros	68
Referências Bibliográficas	69

Anexos.....	81
Anexo I – Protocolo experimental para o doseamento de aminoácidos em alimentos	81
Anexo II – Determinação da proteína total pelo Método de Kjeldahl.....	85

Lista de abreviaturas

Ala – Alanina

AA- Aminoácidos

AAA - Aminoácidos Aromáticos

AACE – Aminoácidos Condicionalmente Essenciais

AAE – Aminoácidos Essenciais

AANE – Aminoácidos Não Essenciais

Arg – Arginina

Asp – Asparagina

AAS – Aminoácidos Sulfurados

BPA – Boas Práticas Agrícolas

BPH – Boas Práticas de Higiene

BPM – Boas Práticas de Manipulação

CAM – Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos

Cys – Cisteína

CG – Cromatografia gasosa

DIAAS - *Score* de Aminoácidos Indispensáveis Digestíveis

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DRBCA – Dicloran Rose-Bengal Cloranfenicol Agar

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EHEC – *E. coli* enterohemorrágica

ELFA – Enzyme Linked Fluorescent Assay

FDA – Food and Drug Administration

Gly – Glicina

Glu – Glutamina

HACCP – Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos

His – Histidina

IEC – Cromatografia de troca iónica

Ile- Ieucina

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Leu – Leucina

Lys – Lisina

Met – Metionina

NACMCF - National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – Plate Count Agar

PDCAAS – Score de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas

Phe - Fenilalanina

Pro – Prolina

Ser – Serina

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga*

TBX – Tryptone Bile X-Glucuronidase

Thr – Treonina

TSA – Tryptone Soy Agar

Tyr – Tirosina

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Val – Valina

VIDAS – Vitek Immuno Diagnostic Assay System

VRBG – Violet Red Bile Glucose

Lista de figuras

<i>Figura 2.1</i> - Produção e processamento de leguminosas. (59)	4
<i>Figura 2.2</i> - Morfologia de um rebento de feijão mungo desenvolvido	11
<i>Figura 2.3</i> - Processamento de rebentos industrializados. (59)	12
<i>Figura 2.4</i> - Potenciais fontes de contaminação de rebentos. (75)	19
<i>Figura 3.1</i> - Sementes de feijão frade (a), feijão mungo (b), lentilha (c), grão (d), feijão branco (e) e feijão encarnado (f) após 48 horas de germinação a 25°C.	28
<i>Figura 3.2</i> – Recipientes utilizados durante a germinação das leguminosas.	29
<i>Figura 3.3</i> - Esquema de germinação	30
<i>Figura 3.4</i> – Máquina de vácuo	31
<i>Figura 3.5</i> - Amostras embaladas a vácuo	31
<i>Figura 3.6</i> - Banho-maria.....	31
<i>Figura 3.7</i> - Rotor e forno de micro-ondas de digestão ácida.....	42
<i>Figura 3.8</i> - Unidade de Destilação e sistema de titulação automático utilizados no método Kjeldahl.	45

Lista de gráficos

<i>Gráfico 4.1</i> - Comprimento do hipocótilo de cada rebento conforme as condições de germinação	49
<i>Gráfico 4.2</i> - Evolução do número de microrganismos aeróbios mesófilos conforme as condições de germinação.	50
<i>Gráfico 4.3</i> - Evolução do número de <i>Enterobacteriaceae</i> conforme as condições de germinação.	52
<i>Gráfico 4.4</i> - Evolução do número de leveduras conforme as condições de germinação.....	53
<i>Gráfico 4.5</i> - Teor de aminoácidos não essenciais (AANE) e condicionalmente essenciais (AACE) em mg/100g de amostra seca.	58
<i>Gráfico 4.6</i> - Teor de aminoácidos essenciais em mg/100g de amostra seca.	59

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação de aminoácidos	7
Tabela 2 - Esquema de diluições das amostras.	32
Tabela 3 – Parâmetros microbiológicos e respectivos valores-guia (INSA) utilizados na avaliação da aceitabilidade microbiológica das amostras.	36
Tabela 4 – Parâmetros microbiológicos e respectivos valores-guia (INSA) utilizados na avaliação da segurança microbiológica das amostras.	36
Tabela 5 – Níveis utilizados para interpretar a qualidade microbiológica das amostras analisadas.	36

Tabela 6 - Resumo dos meios de cultura e métodos utilizados nas análises microbiológicas.	40
Tabela 7 - Gradiente de eluição aplicado na análise cromatográfica.	43
Tabela 8 - Estimativa da ingestão adequada de aminoácidos essenciais em adultos	46
Legenda: AAS, aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína); AAA, Aminoácidos aromáticos (trionina + fenilalanina).	46
Tabela 9 – Média e desvio-padrão do comprimento do hipocótilo dos rebentos.	48
Tabela 10 - Variação das contagens de Enterobacteriaceae, CAM e leveduras antes e após o tratamento térmico húmido dos rebentos.	56
Legenda: NT, amostra não tratada; T, amostra tratada; *, contagens; ** variação das contagens em log ufc/g entre a amostra tratada e a não tratada (NT-T).	56
Tabela 11 – Teor de aminoácidos não essenciais ^(a) e condicionalmente essenciais ^(b) .	61
Legenda - Valores apresentados em média±desvio padrão dos duplicados, mg/100g peso seco edível. Os valores sublinhados representam a maior concentração encontrada para cada aminoácido, dentro da mesma amostra de leguminosa.	61
Tabela 12 – Teor de aminoácidos essenciais (mg/100g de peso seco).	62
Legenda - Valores apresentados em média±desvio padrão dos duplicados, mg/100g peso seco edível. Os valores sublinhados representam a maior concentração encontrada para cada aminoácido, dentro da mesma amostra de leguminosa.	62
Tabela 13 - <i>Score</i> de aminoácidos essenciais com base nos requerimentos dietéticos em adultos.	63
Legenda – a, Aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína); b, Aminoácidos aromáticos (tirosina + fenilalanina). Os valores a negrito representam a concentração dos aminoácidos limitantes (<i>score</i> < 1) para cada amostra.	63
Tabela 14 – Teor proteico obtido pela soma dos aminoácidos totais e pelo método <i>Kjedahl</i> .	65
Legenda – valores apresentados em g/100g de peso seco edível.	65

1. Introdução

1.1 Motivação para a dissertação

As leguminosas são importantes fontes de proteína, aminoácidos e micronutrientes como ferro, zinco e ácido fólico especialmente em regimes alimentares que privilegiam o consumo de alimentos de origem vegetal. A sua inclusão na dieta alimentar tem vindo a demonstrar a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crónicas como a diabetes e doenças cardiovasculares. Contudo, para além do seu elevado conteúdo nutricional, contêm compostos anti nutricionais que podem afetar a absorção de nutrientes como o ferro, zinco, cálcio, assim como reduzir a digestão das proteínas e provocar desconforto gastrointestinal. Não obstante, estes efeitos negativos poderão ser minimizados mediante a aplicação de certos métodos de processamento às leguminosas cruas, como é o caso da germinação.

A germinação é uma prática tradicional em diversos países asiáticos que tem recentemente vindo a ganhar popularidade no mundo Ocidental não só pela sua praticidade, mas também pelo impacto positivo que pode ter ao nível da qualidade e valor biológico das proteínas presentes nas leguminosas. Considerando que o consumo de germinados é promovido como sendo uma mais-valia para a saúde dos consumidores, há um interesse crescente pela produção doméstica de rebentos de leguminosas.

Paralelamente, o consumo de rebentos de leguminosas, e de germinados no geral, pode acarretar riscos microbiológicos com significativo impacto na saúde uma vez que são tipicamente consumidos crus ou minimamente processados. Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), a ingestão de rebentos de leguminosas tem sido associada à ocorrência de aproximadamente 50 surtos causados por *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* O157, entre 1973 e 2011. Em comparação com a germinação praticada a nível industrial, a germinação realizada em ambiente caseiro poderá representar um risco microbiológico ainda superior visto que os indivíduos que realizam esta prática poderão não estar informados sobre as medidas higienossanitárias corretas a adotar durante a germinação de alimentos.

Torna-se assim necessário estudar a segurança microbiológica dos métodos de germinação doméstica com o intuito de divulgar um procedimento específico que possa futuramente ser adotado como linha de orientação para o público interessado. Com foco na germinação realizada em ambiente doméstico e com o propósito de otimizar o conteúdo

proteico e a qualidade microbiológica de rebentos de leguminosas, surge, no âmbito da presente dissertação, o interesse em estudar e determinar quais os fatores de germinação que podem influenciar, em simultâneo, a segurança microbiológica e a qualidade proteica de rebentos de leguminosas. Para mais, considerando a escassez de investigação e conhecimento acerca de métodos de descontaminação eficazes que poderão vir a ser aplicados a alimentos germinados num contexto caseiro, há também a curiosidade de desenvolver, durante o decorrer deste trabalho, um procedimento acessível ao consumidor que consiga garantir a inocuidade de rebentos de leguminosas.

1.2 Objetivos

O presente trabalho de investigação teve como principal objetivo a avaliação da qualidade microbiológica e proteica de sementes de quatro tipos de leguminosas submetidas a diferentes condições de germinação - duas temperaturas e dois tempos de germinação. De modo a cumprir este objetivo principal foram estabelecidas metas específicas tais como:

- A pesquisa dos principais microrganismos patogénicos associados a alimentos germinados (*Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*) para avaliar a segurança microbiológica dos rebentos;
- A contagem de microrganismos indicadores de higiene (microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* não patogénica) para aferir a qualidade higiénica dos rebentos e prever a contaminação durante o processo de germinação;
- A comparação entre a qualidade proteica das sementes e dos respetivos germinados através da análise do teor de proteína total, do perfil de aminoácidos essenciais e do cálculo do *score* de aminoácidos essenciais para verificar se as condições de germinação estudadas provocam alguma alteração à qualidade proteica do produto final.

Como objetivo secundário, pretendeu-se estudar a aplicação de um método de tratamento térmico eficaz e acessível aos consumidores que optem por produzir os seus próprios rebentos, com o intuito final de poder vir a ser divulgado ao público geral interessado.

1.3 Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos. O primeiro capítulo aborda uma breve introdução ao tema, bem como a pertinência do estudo e os objetivos que se visam atingir na realização do mesmo. O segundo capítulo inclui uma revisão bibliográfica dos principais conceitos teóricos que são relevantes para expor o tema e as principais limitações a

ele associadas, nomeadamente a importância das leguminosas para a nutrição, a sua qualidade proteica, as principais vantagens da sua germinação, os riscos microbiológicos associados à produção de germinados de leguminosas em contexto caseiro e as principais estratégias de mitigação que visam controlar e/ou reduzir tais riscos. No terceiro capítulo encontram-se apresentadas as metodologias e materiais utilizados durante os processos de germinação das amostras, a análise da qualidade proteica e microbiológica, a aplicação de um método de descontaminação e a análise estatística de parte dos dados obtidos. No quarto capítulo estão evidenciados os resultados obtidos para cada análise descrita no capítulo anterior. Por último, o quinto capítulo destaca as principais conclusões retiradas do trabalho executado e estabelece ainda algumas recomendações para possíveis trabalhos futuros.

2. Fundamentos teóricos

2.1 Produção e consumo de leguminosas

As leguminosas são sementes edíveis de plantas dicotiledóneas da família *Leguminosae*, cujo consumo teve início há mais de 10,000 anos. (1) Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a sua colheita é realizada anualmente e são classificadas segundo o seu principal fim, podendo ser utilizadas para a produção de óleos vegetais ou para a alimentação de animais ou de humanos. (2)

Do ponto de vista global, o cultivo de soja domina a produção total de leguminosas, seguindo-se a produção de amendoim, feijão seco, ervilha seca, lentilha e tremoço, das quais as últimas quatro são as mais importantes para a alimentação humana. (3) Entre 1997 e 2013, o consumo médio global de leguminosas *per capita* aumentou em 1,25 kg possivelmente devido ao crescimento da população nos países em desenvolvimento, que tradicionalmente consomem leguminosas como principais fontes de proteína, e ao aumento da procura por estas sementes em alguns países desenvolvidos. (4) A **Figura 2.1** representa um esquema típico da produção e processamento de sementes de leguminosas.

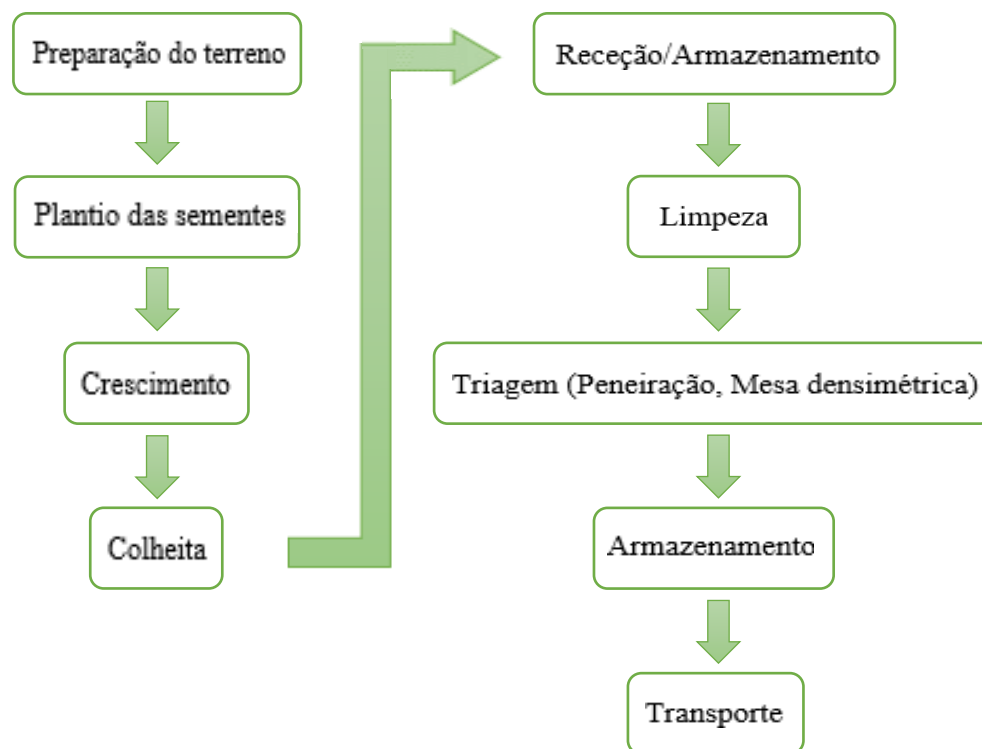


Figura 2.1 - Produção e processamento de leguminosas. (59)

Em Portugal, o feijão seco e o grão são as principais leguminosas produzidas e, em 2021, o consumo *per capita* rondou os 4,3 kg/ano/habitante, dos quais 2,6 kg corresponderam ao feijão e os restantes 1,7 kg ao grão. (5)

É estimado que o mercado das leguminosas aumente gradualmente considerando o aumento da conscientização do consumidor, nomeadamente das populações mais jovens, quanto à realização de escolhas alimentares mais responsáveis do ponto de vista da sustentabilidade ambiental, da ética da alimentação ou da nutrição individual, com a substituição da proteína de origem animal pela alternativa vegetal mais disponível. (4)

2.2 Conteúdo nutricional das leguminosas

As leguminosas são apreciadas pela sua riqueza em hidratos de carbono complexos, proteínas, vitaminas hidrossolúveis do complexo B e minerais como ferro, zinco, magnésio e fósforo. (1) Dado o seu teor de proteínas (20 a 25%) e aminoácidos essenciais como lisina, leucina, arginina, ácido aspártico e glutâmico, são consideradas alimentos fundamentais nas dietas com maior ênfase em alimentos de origem vegetal. Ainda, tendo em conta que não fornecem um perfil de aminoácidos essenciais completo, torna-se importante conjugar o consumo destes alimentos com outros, como por exemplo cereais, visto que os últimos conseguem fornecer os aminoácidos limitantes nas leguminosas. (3,6)

Graças à sua riqueza em hidratos de carbono complexos e fibra solúvel, o seu consumo promove a redução dos níveis de glicemia pós-prandial (7) e o incremento da sensação de saciedade, (8) contribuindo para a diminuição do risco de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. (1) Além do seu aspeto nutricional, são também ótimas fontes de compostos bioativos como péptidos, ácido fítico, polifenóis, lectinas e taninos, que podem fornecer proteção contra diversas condições patológicas. (9) De acordo com a literatura técnico-científica, os péptidos, polifenóis e taninos possuem propriedades hipocolesterolêmicas, (10) antioxidantes (11) e anti mutagénicas (1), respetivamente, e as lectinas e o ácido fítico têm sido associados a efeitos anti carcinogénicos e hipoglicemiantes. (10)

Contudo, alguns destes compostos bioativos podem ser considerados como substâncias anti nutricionais visto que a sua existência nas leguminosas consegue afetar a sua qualidade nutricional. (9) A título de exemplo, a biodisponibilidade de minerais como ferro, cálcio e zinco pode ser afetada pela atividade de taninos e do ácido fítico, os quais têm a habilidade de formar complexos insolúveis com estes micronutrientes. A biodisponibilidade pode ser explicada como

a porção do nutriente que é utilizada pelo organismo (12) Além disso, a biodisponibilidade de proteínas e, conseqüentemente, a sua digestão e absorção, pode igualmente ser reduzida na presença de taninos, através do mesmo mecanismo que afeta a biodisponibilidade de minerais (1,13), e/ou na presença de substâncias que inibem a atividade de enzimas que participam na digestão de proteínas, como as tripsinas e quimiotripsinas. (1) Da mesma forma, compostos inibidores de alfa-amílases limitam a degradação de hidratos de carbono complexos e, por sua vez, a sua digestibilidade e absorção. (12) Para mais, substâncias como lectinas e rafinoses podem causar danos ao nível da mucosa intestinal, desconforto abdominal e flatulência. (1)

Tais efeitos negativos são manifestados em maior magnitude após o consumo da leguminosa no seu estado natural, sem ter sido submetida a qualquer método de processamento. (9) Deste modo, diversas técnicas podem ser empregues durante o processamento destes alimentos para reduzir o conteúdo de compostos anti nutricionais e, por conseguinte, aprimorar a digestibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes. Entre estes métodos, a cozedura, germinação e fermentação são os mais recorrentes a nível industrial. (1,9) O presente trabalho irá focar-se na germinação de leguminosas.

2.3. Qualidade proteica

A qualidade da proteína dietética é um critério crucial para o crescimento muscular, a manutenção da saúde e para o fornecimento de uma alimentação adequada. (14) Tal critério dependerá da facilidade com que a proteína é digerida, absorvida no trato digestivo e utilizada nos processos metabólicos importantes para o funcionamento normal do organismo, bem como da sua composição em aminoácidos e da biodisponibilidade individual de cada aminoácido. Pode ser definido também como a habilidade que certa proteína alimentar tem de fornecer a quantidade de nitrogénio e aminoácidos essenciais necessários para alcançar os requerimentos metabólicos humanos. (15) Diversos fatores como o tipo de processamento aplicado ao alimento, a matriz alimentar e a digestão gastrointestinal individual podem afetar indiretamente a qualidade proteica ao interferir com os aminoácidos e a digestibilidade das proteínas. (16) A título de exemplo, a digestibilidade das proteínas de origem vegetal tende a ser inferior em relação às de origem animal devido à sua riqueza em compostos anti nutricionais e ao facto de apresentarem uma estrutura molecular compacta que dificulta a ação das proteases no desdobramento e lise das proteínas.

2.4.1. *Score* de aminoácidos

Um dos métodos que pode ser utilizado para prever a qualidade proteica consiste no cálculo do *score* de aminoácidos. O *score* de aminoácidos expressa a efetividade através da qual uma determinada fonte de azoto consegue fornecer a quantidade de aminoácidos essenciais necessária para satisfazer as necessidades metabólicas, com base em dois fatores – a composição de aminoácidos da fonte proteica e as recomendações dietéticas de aminoácidos essenciais para uma determinada população. (16)

Os aminoácidos (AA) são moléculas que possuem diferentes propriedades bioquímicas e funcionais, participando na regulação da expressão de genes, no metabolismo celular e na formação e desenvolvimento de órgãos, músculos e hormonas. De entre os 20 aminoácidos existentes, podem ser classificados como aminoácidos essenciais (AAE), não essenciais (AANE) ou condicionalmente essenciais (AACE). Na **Tabela 1** pode-se visualizar os AAE, AANE e os AACE. Os AAE correspondem àqueles que o organismo não consegue sintetizar ou sintetiza de forma incompleta a partir da síntese proteica, sendo assim imperativa a sua obtenção a partir da dieta. No caso de proteínas de origem vegetal, como as presentes em leguminosas, certos aminoácidos essenciais estão presentes em quantidades muito limitadas, como é o caso dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). (8)

Tabela 1 - Classificação de aminoácidos

AAE	AANE
Histidina	Alanina
Treonina	Arginina*
Triptofano	Asparagina
Lisina	Serina
Metionina	Cisteína*
Valina	Glutamina
Isoleucina	Tirosina*
Leucina	Glicina*
Fenilalanina	Prolina*

Legenda - *, aminoácidos condicionalmente essenciais (AACE)

Os AANE, por outro lado, podem ser sintetizados *de novo* pelo organismo em quantidades suficientes. Por último, os AACE são uma subcategoria dos AAE que poderão tornar-se essenciais sob certas condições fisiológicas ou patológicas que requeiram uma maior utilização desses mesmos aminoácidos. Como exemplo, a tirosina, normalmente dispensável, tende a tornar-se essencial em indivíduos que apresentem uma mutação no gene que codifica a enzima responsável por converter a fenilalanina em tirosina. Por este motivo, ao contrário de pessoas saudáveis, tais indivíduos devem recorrer à alimentação para obter a quantidade requerida de tirosina. (17)

O *score* de AA para uma dada proteína é determinado pela comparação entre o teor, em miligramas, de cada aminoácido essencial em 1 grama de proteína analisada e o teor do mesmo aminoácido em 1 grama de proteína de referência. (18) Em outras palavras, a quantidade de cada aminoácido essencial presente em cada grama de proteína testada é comparada com uma proteína de referência que, assumindo uma digestibilidade equivalente a 100%, contém todos os AAE por grama de proteína numa quantidade suficiente para atingir as recomendações dietéticas dispostas para cada faixa etária. (16)

Para calcular o teor de aminoácidos presente numa dada amostra pode recorrer-se à cromatografia de troca iónica (IEC), cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). (14) Tendo em conta que as proteínas dietéticas tendem a ser, em prática, limitadas em 4 AAE específicos – lisina, triptofano, treonina e aminoácidos sulfurados – é recomendado pela opinião conjunta da Organização Mundial da Saúde (WHO), da FAO e da Universidade das Nações Unidas (UNU) realizar o cálculo do *score* com base nestes AAE de acordo com o tipo de proteína que está a ser avaliada. Por exemplo, no caso das proteínas presentes em cereais, o *score* de AA irá ser calculado com base no teor de lisina, visto que é o principal aminoácido limitante nos cereais.

2.4.2. *Score* de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas

Apesar de conseguir prever a qualidade proteica, o *score* de aminoácidos não tem em consideração a verdadeira digestibilidade da proteína, o que pode levar à sobrestimação da habilidade da proteína em estudo de atingir os requerimentos fisiológicos. (18) Dito isto, não pode ser utilizado individualmente para avaliar a qualidade proteica. De modo a ultrapassar este obstáculo, foi recomendado pela OMS um método de avaliação denominado de *Score* de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Digestibilidade Verdadeira das Proteínas (PDCAAS), que corresponde ao *score* de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica. O PDCAAS

permite prever o valor biológico, isto é, a efetividade em que uma proteína pode ser utilizada na dieta com base na sua digestibilidade fecal. (15)

Contudo, este método não prevê a digestibilidade e biodisponibilidade individual de cada aminoácido visto que para tal seria necessário realizar ensaios de digestibilidade *in vivo*. (14) Adicionalmente, os níveis de nitrogénio fecal podem ser influenciados pelo metabolismo de nitrogénio da microbiota intestinal e pode ocorrer a sobrestimação da qualidade de proteínas que contêm compostos anti nutricionais, pois o método não considera os fatores intrínsecos e extrínsecos às proteínas que podem afetar a sua digestibilidade. (16)

2.4.3. Score de Aminoácidos Indispensáveis Digestíveis

Devido às razões mencionadas, passou a ser avaliado o uso do *Score* de Aminoácidos Indispensáveis Digestíveis (DIAAS) pela FAO em 2013. O DIAAS permite calcular o score de cada AAE tendo em consideração a digestibilidade ileal dos AAE e a digestibilidade a nível fecal e ileal da proteína bruta de referência. (16) Enquanto que o PDCAAS determina apenas a digestibilidade proteica e aplica este fator a cada AAE, o DIAAS determina a digestibilidade de cada aminoácido individual, facilitando assim a criação de combinações de diferentes fontes alimentares que se complementem entre si de acordo com a sua qualidade proteica. Por exemplo, fontes proteicas com excesso de lisina digerível podem ser aliadas a proteínas presentes em cereais (que são pobres neste AA) de modo a garantir uma fonte completa de AAE digeríveis e a níveis adequados na dieta. Na teoria, o DIAAS é o método mais efetivo no que toca à predição da qualidade proteica. (19)

Contudo, há ainda imensa dificuldade em aferir a digestibilidade ileal de aminoácidos nomeadamente em alimentos cuja matriz e processamento pode influenciar a digestibilidade. Dito isto, até se tornar disponível uma base de dados completa composta pela digestibilidade preditiva de aminoácidos de uma quantidade substancial e diversa de alimentos para consumo humano, continua a ser preferível recorrer à digestibilidade proteica (PDCAAS) para prever a biodisponibilidade de aminoácidos e a, desta forma, prever a qualidade proteica. (19)

2.3. Germinação de leguminosas

A germinação (*sprouting*) é uma técnica tradicional que surgiu no ano 8.000 a.C com o fim de amolecer e elevar o conteúdo nutricional de cereais e leguminosas. (12) Segundo a Direção Geral de Alimentação e Veterinária DGAV, denomina-se de rebento “*o produto obtido*

pela germinação de sementes e o seu crescimento em água ou outro meio, colhido antes do aparecimento de folhas verdadeiras e destinado a ser comido inteiro, incluindo a semente”. (20)

Em vários países asiáticos, a germinação tem sido tradicionalmente realizada a nível caseiro. Apesar de ser uma técnica já conhecida, o interesse por esta prática tem aumentado significativamente nos últimos anos devido ao seu impacto positivo no conteúdo nutricional e bioativo das leguminosas e nas suas características organolépticas, bem como ao crescimento da indústria de alimentos crus e funcionais. (10–12) Como consequência disto, torna-se possível observar atualmente uma vasta variedade de rebentos produzidos a partir de diferentes espécies de sementes de leguminosas, quer ao nível industrial, quer num contexto caseiro. (21)

Em termos globais, os rebentos são principalmente produzidos a partir de sementes de alfafa, grão, ervilha, feijão mungo, feijão *adzuki*, lentilha e soja. Em Portugal, os mais produzidos e comercializados provêm de sementes de soja e alfafa. (22) Na maioria dos países asiáticos, estes produtos têm tradicionalmente sido consumidos em sopas e saladas após serem sujeitos a um método de cocção ligeiro (*stir-frying*). Contudo, graças ao notável aumento da popularidade de hábitos alimentares que priorizam ou maximizam a ingestão de alimentos minimamente processados, ou na sua forma mais natural, é possível cada vez mais evidenciar o consumo de rebentos frescos, isto é, na sua forma crua. (23)

2.3.1 Etapas da germinação

A dormência é um fenómeno morfológico, físico ou químico que bloqueia a germinação das sementes quando estas atingem a maturidade fisiológica. (24) A germinação é um processo fisiologicamente complexo que demarca o final da dormência da semente. (25) Este processo divide-se em três fases. A primeira fase caracteriza-se pela demolha, na qual se dá a rápida absorção de água por parte dos compostos hidrofílicos da parede celular (proteínas, amidos e o citoplasma), até ser atingido o teor de humidade necessário para promover a reativação dos organelos celulares, a síntese proteica e a estimulação da atividade das enzimas, nomeadamente amilases e proteases, que irão atuar na fase seguinte. (26–28) Considerando diferentes espécies de leguminosas, a velocidade com que se dá a absorção de água irá depender do tamanho, da composição nutricional e da permeabilidade da camada externa de cada semente. (12,29)

Na segunda fase, a água de demolha é drenada e as sementes, previamente dormentes, superam o estado de dormência e rapidamente restauram a sua atividade metabólica, iniciando-se a germinação sob condições controladas. (26,27) Esta fase pode demorar entre 24 e 48 horas

após a demolha e depende de fatores internos tal como a ativação de hormonas inibidoras ou promotoras da germinação e fatores externos como a temperatura e humidade ambientais, as condições atmosféricas e a presença de inibidores da germinação como herbicidas, inseticidas e outros químicos. (6,30) Como regra geral, a temperatura ótima de germinação, isto é, a temperatura que resulta na maior taxa de germinação no menor período de tempo, varia entre os 20 e 30 °C. (31) Contudo, a resposta das sementes a estes valores e aos restantes fatores irá depender da sua natureza genética.

Nesta segunda etapa, a reativação do metabolismo das sementes induz: i) a mobilização e catabolismo dos principais hidratos de carbono, lípidos e proteínas de reserva acumulados nos cotilédones da semente (órgãos de reserva), por ação de enzimas hidrolíticas, resultando na sua conversão em moléculas de menor peso molecular e de maior solubilidade (aminoácidos, monossacáridos e metabolitos lipídicos) que irão ser utilizados para produzir a energia necessária ao metabolismo e crescimento da plântula; ii) a redução do conteúdo de substâncias anti nutricionais, também por degradação enzimática e iii) o aumento do conteúdo de fitonutrientes potencialmente benéficos para a saúde, como ácidos fenólicos, isoflavonas ou glucosinolatos (conforme a espécie de leguminosa), como consequência da polimerização (degradação) de compostos fenólicos previamente existentes na semente, ou como resultado da sua síntese *de novo* a partir de vias metabólicas secundárias. (11,25–29,32,33)

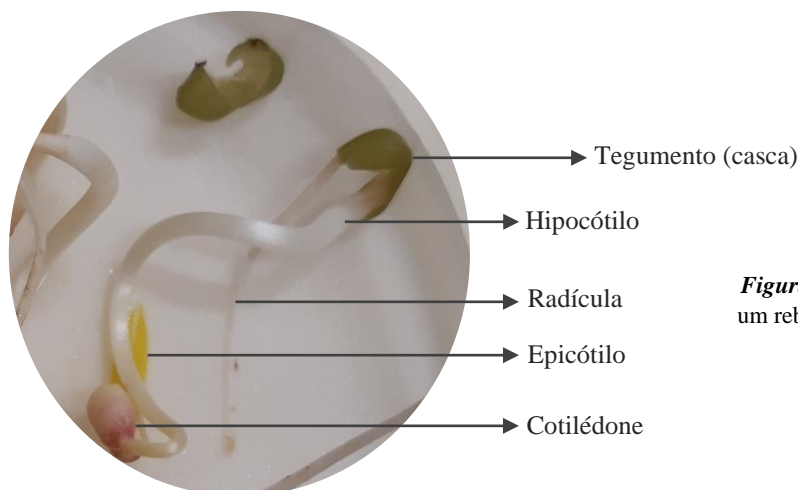


Figura 2.2 - Morfologia de um rebento de feijão mungo desenvolvido

Por último, a última fase caracteriza-se pela emergência e alongamento celular da radícula do eixo embrionário a partir da semente, após a rutura do tegumento (casca), concluindo-se a germinação cerca de 48 a 72 horas após a fase de demolha. (26) Durante esta etapa é importante manter as sementes num ambiente húmido ou fornecer água de forma

periódica de modo a suportar a expansão celular e, na teoria, quanto mais se estender esta fase, maior será o comprimento do rebento. (12) A maturidade do rebento é atingida no momento em que se tornam visíveis os cotilédones, o hipocótilo, o epicótilo e os folíolos, após a emergência da radícula, como se pode verificar na **Figura 2.2**. Conforme as condições de germinação, a espécie de semente e o comprimento e grau de maturidade desejado, o rebento poderá ser consumido entre 1 e 8 dias após o cultivo. (34) No contexto industrial, procede-se à colheita dos rebentos após aproximadamente 5 dias, quando atingem um comprimento entre 9 e 10 centímetros e um diâmetro de 0,3 centímetros. (35) A **Figura 2.3** descreve o processo genérico de produção de rebentos no contexto industrial.

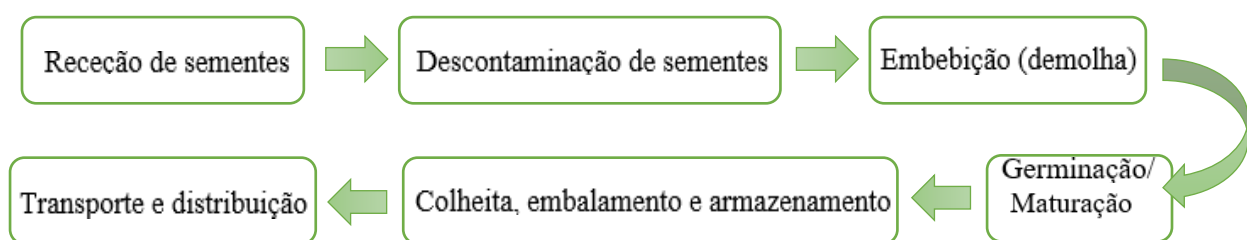


Figura 2.3 - Processamento de rebentos industrializados. (59)

2.4.3 Efeito da germinação na qualidade proteica de leguminosas

Os rebentos de leguminosas podem ser considerados importantes fontes de proteína em dietas vegetarianas e veganas. (10,21,36) Contudo, tendo em conta que a germinação pode modificar o perfil nutricional de leguminosas, é importante aferir se a qualidade das proteínas presentes em sementes de leguminosas sofre alguma alteração, positiva ou negativa, durante o processo de germinação. Dito isto, diversos investigadores têm demonstrado interesse em comparar o teor de proteína entre sementes de leguminosas e os seus respetivos rebentos, de modo a descobrir se estes nutrientes são amplificados no produto germinado final.

2.4.3.1. Teor de proteína total

Quanto ao teor total de proteína, vários estudos reportaram o aumento do teor da proteína bruta em rebentos de lentilha (37–40), feijão mungo (41,42), soja (13,41,43,44), feijão (45,46), tremçoço (45,47,48) e grão-de-bico (40), em comparação com as sementes iniciais. O incremento evidenciado pode ser principalmente justificado pela hidrólise das proteínas de reserva (polipéptidos) presentes nos cotilédones das leguminosas, que tende a ocorrer durante a segunda etapa da germinação. Com base nesta teoria, as proteínas de reserva são transformadas em compostos menores que são utilizados como fonte de energia e azoto para o crescimento da planta e para a síntese de novas proteínas. (37,38,41) Contudo, outros

investigadores defendem que o aumento do teor proteico poderá ser explicado pela diminuição da massa seca da semente germinada, nomeadamente hidratos de carbono (e gorduras em menor proporção) que são utilizados para o crescimento do rebento, levando, portanto, ao aumento da percentagem relativa de proteína. (37,38,40)

Ainda, foi possível verificar a diminuição do teor de proteína bruta em alguns estudos. (48–51) Tendo em conta que o balanço entre a hidrólise e degradação das proteínas de reserva e a síntese de novas proteínas varia conforme a espécie de leguminosa e as condições de germinação (tempo e temperatura), infere-se que a discrepância entre os resultados dos estudos se deva principalmente ao facto de terem sido utilizados diferentes tipos de leguminosas e/ou tempos e temperaturas de germinação. (6,12,52)

2.4.3.1. Teor de aminoácidos livres

Grande parte dos estudos reportou o aumento do teor de péptidos e do conteúdo total de aminoácidos livres, em rebentos de soja, grão e feijão de mungo, potencialmente como resultado da atividade de endopeptidases (enzimas proteolíticas) que tem lugar durante a fase de imbibição da semente. (38,42–44,53) Conforme esta teoria, o aumento da atividade destas proteases, teoricamente motivado pela degradação de substâncias anti nutricionais inibidoras de enzimas proteolíticas (taninos e inibidores de proteases), potencia a degradação e conversão das proteínas de reserva (polipéptidos) presentes nos cotilédones em proteínas solúveis de menor peso molecular (oligopéptidos) que são posteriormente hidrolisados por peptidases e aminopeptidases em aminoácidos livres. (11,38,52,53)

2.4.3.1. Digestibilidade proteica

A estrutura mais simples dos péptidos permite com que sejam mais solúveis e facilmente absorvidos pelo sistema digestivo em comparação com as proteínas complexas originalmente presentes nos vacúolos das células vegetais da semente, possibilitando, deste modo, a libertação de um número superior de aminoácidos. (38,51) Considerando que, quanto maior a quantidade de aminoácidos libertados pelo sistema digestivo, maior será a digestibilidade proteica, é possível estimar que a germinação poderá propiciar o aumento da digestibilidade e qualidade proteica dos rebentos de leguminosas. (45)

Na prática, diversos investigadores conseguiram corroborar esta teoria através do estudo da digestibilidade proteica *in vitro*, com enzimas digestivas, de rebentos de ervilha (51), feijão de mungo (51,54), lentilha (51), grão (54,55) e feijão vermelho (56). Segundo os autores, quanto maior o tempo de germinação, mais elevada será a digestibilidade proteica dos rebentos.

Contudo, seria ainda necessário realizar estudos clínicos para confirmar se esta maior digestibilidade proteica se traduz numa maior biodisponibilidade de proteína e aminoácidos em humanos.

2.4.3.1. Propriedades organolépticas das proteínas

Adicionalmente, foi observado que a germinação pode aprimorar as propriedades funcionais tecnológicas das proteínas presentes nas leguminosas e contribuir para a libertação de moléculas que fornecem sabores agradáveis ao produto final. (39,45,51,53) Graças a estes benefícios, denota-se cada vez mais na Indústria Alimentar a utilização de farinhas, ou preparados, à base de sementes de leguminosas germinadas na formulação de produtos alimentares com propriedades sensoriais otimizadas e maior riqueza nutricional, tal como snacks, massas, bolachas e barras proteicas e produtos de pastelaria. (4,11)

2.3 Riscos microbiológicos associados à germinação de leguminosas

Apesar dos benefícios nutricionais que podem advir da ingestão de rebentos de leguminosas, estes alimentos podem acarretar significantes riscos de origem microbiológica uma vez que a sua produção envolve condições que são ideais à multiplicação e disseminação de agentes patogénicos (microrganismos capazes de induzir doenças) – temperaturas quentes, elevada atividade da água e grande disponibilidade de nutrientes. (36,57) Isto, acoplado ao facto de serem alimentos cada vez mais consumidos crus (prontos a consumir), ou seja, que não são submetidos a qualquer etapa de processamento que assegure a destruição de microrganismos patogénicos, põe em causa a sua segurança microbiológica. (11)

Por esta razão, nas últimas décadas, a ingestão de rebentos de leguminosas, tanto caseiros como industriais, tem sido relacionada com a ocorrência de cerca de 50 surtos de origem alimentar, responsáveis por 2457 hospitalizações e 54 mortes numa escala global, entre 1973 e 2011. (58,59) Os principais rebentos associados à origem dos surtos foram rebentos de alfafa e de feijão mungo. Entre estes eventos, os agentes patogénicos mais frequentemente isolados foram *Salmonella spp.*, e *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga* (stx), ou STEC, (dos serotipos *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O104:H4), sendo que a maioria dos eventos resultou da contaminação de sementes com *Salmonella spp.* (60) Outros microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* foram reportados com menor frequência. (60) De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), na maioria dos incidentes, o uso de um único lote de

sementes contaminadas foi suficiente para originar surtos em diferentes regiões de um país e até em diversos países. (58) Adicionalmente, verificou-se que níveis baixos de *Salmonella spp.*, na ordem dos 4 NMP/kg (equivalendo NMP ao Número Mais Provável), presentes em sementes destinadas à germinação são suficientes para provocar um surto. (58)

2.3.1. *Salmonella spp.*

Salmonella spp. são bactérias Gram-negativas pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* responsáveis por infecções intestinais cuja severidade irá depender não só da estirpe patogénica envolvida, como também da idade e estado imunológico do hospedeiro. (61,62) Mais frequentemente, as infecções intestinais induzidas por *Salmonella spp.* levam a gastroenterites, ligeiras ou mais severas, associadas a sintomas como náuseas e cólicas abdominais seguidos de diarreia com fezes aquosas, febre e vômitos. (63) Por outro lado, em indivíduos de risco, nomeadamente crianças, idosos e grávidas, poderá ocorrer a entrada e disseminação destas bactérias através da corrente sanguínea, ou seja, poderá desenvolver-se uma bacteremia possivelmente contínua. (63) Como consequência disto, poderão surgir infecções invasivas em diversas regiões do organismo como os ossos, pulmões, trato urinário e articulações, que podem causar dor e sensibilidade recorrentes nestas regiões e condições potencialmente fatais como meningite, pneumonia e artrite séptica. (59,62)

De acordo com o relatório da EFSA (2011), entre os surtos de origem alimentar relatados entre 1988 e 2011, aproximadamente 76% destes surtos foram causados por *Salmonella spp.*. No total, o consumo de rebentos contaminados com *Salmonella spp.* causou cerca de 3700 casos e uma morte.

2.3.2. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

STEC, ou *E. coli* produtora de toxina Shiga (stx), patógenos Gram negativos, também pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. Apesar de a maioria dos serotipos de STEC ser inofensiva para o ser humano, existe uma subcategoria, dentro das STEC, denominada de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que inclui serotipos capazes de provocar danos severos nos humanos. Neste caso, a estirpe *E. coli* O157:H7 é responsável por aproximadamente 75% das infecções globais provocadas por EHEC, sendo, por isso, a estirpe protótipo de EHEC. (62)

As infecções causadas por *E. coli* O157:H7 podem provocar diarreias assintomáticas ou leves, potencialmente evoluindo para complicações mais sérias como colites hemorrágicas caracterizadas por manifestações gastrointestinais como diarreia com sangue, dor abdominal e vômitos. (59) Para mais, se a toxina conseguir translocar-se do intestino para a circulação

sistémica, ocorre o desenvolvimento de complicações sistémicas que podem culminar numa condição potencialmente fatal denominada de síndrome hemolítico urémica (SHU), a qual induz a destruição de eritrócitos e dano renal. (62)

Entre os surtos compilados pela EFSA, o mais severo envolveu uma estirpe emergente de STEC, *E. coli* O104:H4, presente em rebentos de feno-grego, caracterizada por ser significativamente mais virulenta e resistente a diversos grupos de antibióticos. Este evento ocorreu em 2011 e envolveu 3793 casos e 2381 hospitalizações num total de 11 países, tendo causado maior impacto da Alemanha. Como consequência da infeção, 800 indivíduos desenvolveram a síndrome hemolítico urémica, dos quais 53 acabaram por falecer.

2.4.1. Microrganismos indicadores de higiene e de alteração

Segundo o National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), nem todos os microrganismos que podem estar presentes em níveis elevados, em rebentos, devem ser considerados como um risco para a saúde. (64) Dentro da categoria dos microrganismos inócuos, ou improváveis de causar doença em indivíduos saudáveis, estão incluídos os indicadores de higiene. Os microrganismos indicadores de higiene e de alteração são empregues para monitorizar a qualidade sanitária dos alimentos prontos a consumir e deste modo prever se as condições de produção e processamento são as adequadas para garantir a higiene do alimento ou se será necessário implementar modificações ao nível dos processos produtivos para atingir este objetivo. (65) Neste contexto, os fungos, os microrganismos aeróbios mesófilos e os microrganismos não patogénicos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, como a *E. coli* não patogénica, são considerados os principais microrganismos indicadores da qualidade sanitária de rebentos prontos a consumir.

2.4.1.1 Fungos

Os fungos são microrganismos eucarióticos conhecidos por colonizar e causar deterioração principalmente em produtos de origem vegetal como cereais, oleaginosas e proteaginosas, conferindo consequentes alterações ao sabor, odor, valor nutritivo e à cor destes produtos. (66) Disseminando-se facilmente no meio ambiente, podem contaminar os alimentos em qualquer uma das etapas do processo produtivo, sempre que estas etapas ocorram sob condições de humidade elevada e temperaturas amenas. Posteriormente, os fungos podem transferir-se a outros alimentos situados junto aos produtos contaminados, bem como a utensílios e equipamentos. (65,67) Outros fatores como a integridade física dos grãos, a sua

microbiota natural e a possível infestação por insetos também contribuem para o crescimento de fungos nas culturas. (66)

A incidência de alguns fungos nos alimentos não constitui um risco para a saúde pública devido ao facto de apenas provocarem danos físicos nos tecidos vegetais que indubitavelmente denunciam a existência de contaminação nos alimentos. Não obstante, existem espécies de fungos mais ameaçantes à saúde que têm a capacidade de sintetizar toxinas indetetáveis, ou dificilmente detetáveis a olho nu, em alimentos expostos às condições suscetíveis ao crescimento destes fungos. (68) Tais toxinas, denominadas de micotoxinas, são metabolitos secundários sintetizados por fungos toxigénicos antes da colheita ou durante o armazenamento de produtos vegetais, que, se ingeridas por humanos ou animais, podem desencadear respostas tóxicas agudas, crónicas, teratogénicas e mutagénicas. Dentro desta categoria de fungos, os pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os mais predominantes em sementes de leguminosas. (66,68,69)

Segundo Tournas (2004), a utilização de sementes de leguminosas previamente contaminadas com fungos para fins de germinação tende a ser a principal causa para a presença e crescimento de fungos em rebentos de leguminosas. Isto deve-se essencialmente ao facto de o processo de germinação propiciar um ambiente extremamente favorável ao crescimento de fungos e de os rebentos frescos serem substratos ideais para a sua nutrição e sobrevivência. (67,69) Adicionalmente, após a germinação, poderá aumentar o número de fungos durante a refrigeração e comercialização dos rebentos. (70) Tango *et al.* (2018), Kim *et al.* (2008), Abadias *et al.* (2007) e Alonzo *et al.* (2006) evidenciaram a presença de níveis elevados de fungos (7,4 a 7,9 log ufc/g) em rebentos de soja, alfafa, feijão mungo e em misturas de rebentos refrigerados e prontos a consumir. Tais níveis elevados podem ser alarmantes considerando que a degradação e o amolecimento progressivo que os fungos provocam aos tecidos vegetais poderá facilitar a penetração e proliferação de bactérias nos rebentos contaminados. Por outro lado, poderão indicar a presença de micotoxinas nestes alimentos se forem fungos com capacidade toxinogénica. (70–72)

2.4.1.2 Microrganismos aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos são microrganismos que crescem e se desenvolvem dentro de um intervalo de temperaturas entre 30 a 37°C e sob condições de presença de oxigénio. Sendo ubiqüitários no ambiente podem estar presentes no ar, água, solo, matérias-primas e nas mãos de manipuladores. (65) Como tal, é de esperar a sua presença em rebentos crus prontos a consumir, podendo estar presentes em níveis de contaminação

superiores a 1×10^8 unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g). (23,64) Tais contagens elevadas podem indicar o incumprimento das Boas Práticas de Higiene (BPH) e Boas Práticas de Manipulação (BPM) por parte dos produtores e manipuladores, a ocorrência de contaminações cruzadas ou a ineficiência ou incumprimento da higienização dos equipamentos e superfícies. (65) Apesar de ser normal encontrar níveis elevados de microrganismos aeróbios mesófilos (CAM) em alimentos minimamente processados, continua a ser pertinente realizar análises adicionais para identificar os microrganismos responsáveis pelos elevados valores.

2.4.1.3 *Enterobacteriaceae* não patogénicas

As *Enterobacteriaceae* estão naturalmente presentes no trato gastrointestinal do Homem e podem disseminar-se facilmente no solo e em alimentos de origem vegetal. À semelhança dos microrganismos aeróbios mesófilos, as *Enterobacteriaceae* podem estar presentes em níveis elevados em alimentos vegetais prontos a consumir. (65) Em rebentos de leguminosas podem ser observados níveis acima de 1×10^7 ufc/g. Tendo em conta que a sua presença é vista como sendo normal ou natural em vegetais frescos e crus, é comum recorrer à análise específica de coliformes fecais como a *E. coli* não patogénica para aferir a qualidade higiénica de rebentos. (72) As *E. coli* não patogénicas são microrganismos comensais do trato intestinal do Homem de animais de sangue quente. Por este motivo, são ótimas indicadoras de contaminações cruzadas com origem em produtos animais ou vegetais e a sua presença em alimentos como sementes germinadas cruas sugere um incumprimento das BPH. (65)

Ainda, apesar de a maioria das estirpes não patogénicas de *Enterobacteriaceae* serem consideradas como inócuas, algumas, denominadas de patógenos oportunistas, poderão desencadear respostas imunes ou enfraquecer o sistema imunitário em indivíduos imunocomprometidos. Por este motivo é desaconselhado o consumo de rebentos crus a este tipo de população. (57)

2.5. Principais causas da contaminação de rebentos

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), a contaminação microbiológica de rebentos pode ser justificada por diversos fatores tais como a utilização de sementes previamente contaminadas, água contaminada na etapa de embebição, meios de germinação contaminados, utensílios, equipamentos ou veículos previamente mal higienizados; o contato com animais infetados ou a execução de práticas de manipulação, transporte ou armazenamento

indevidas, quer pelos retalhistas quer pelos consumidores finais. (73) Na **Figura 2.4** é possível observar um esquema alusivo às potenciais fontes de contaminação dos rebentos.

Conforme o relatado pela EFSA no seu relatório, a maioria dos incidentes relacionados com o consumo de rebentos foram causados por sementes contaminadas por bactérias patogénicas pré-germinação. (58) A deteção destes microrganismos torna-se difícil devido à sua distribuição heterogénea na superfície das sementes. (36) A sua presença em sementes pode dever-se a diversas fontes de contaminação potencialmente introduzidas antes ou após a colheita das sementes, incluindo o uso de fezes de animais contaminadas como adubo (especialmente em culturas biológicas), de solos que em paralelo são utilizados para pastagem de animais possivelmente contaminados, de águas de irrigação inadequadamente tratadas ou o contacto com colaboradores infetados. (36,74,75)

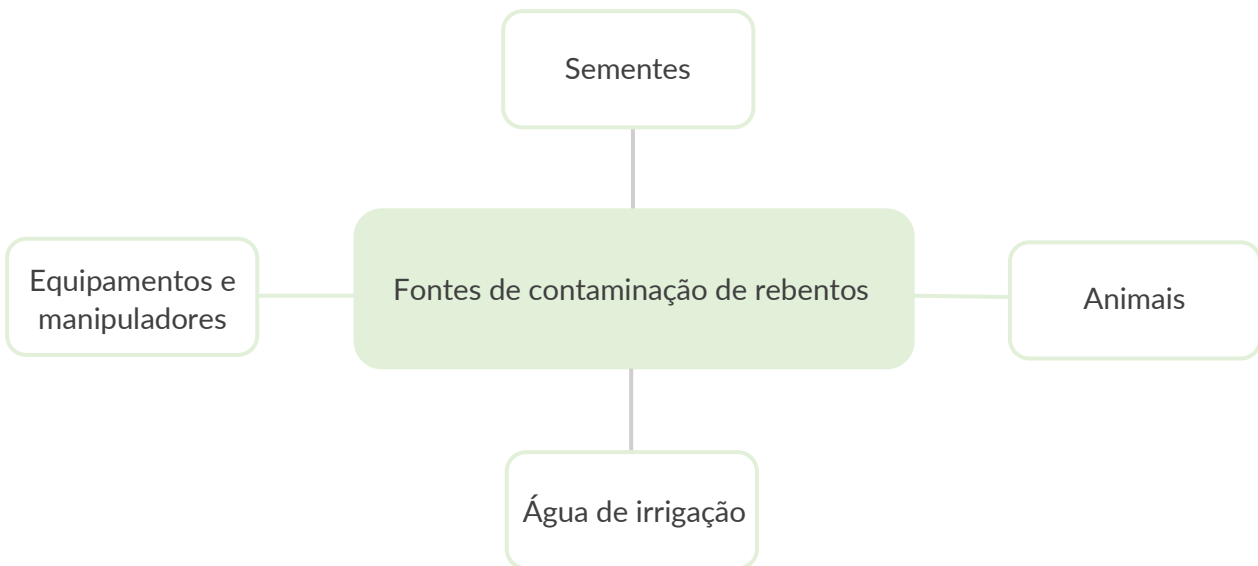


Figura 2.4 - Potenciais fontes de contaminação de rebentos. (75)

2.5.1. Mecanismos de colonização bacteriana

Os microrganismos presentes nas fontes mencionadas, nomeadamente *E. coli* O157:H7 e *Salmonella spp.*, podem posteriormente migrar e aderir à superfície das sementes através de flagelos ou fímbrias. (74) Uma vez aderidos às sementes, poderão sobreviver durante períodos de tempo prolongados antes da germinação, e multiplicar-se, especialmente se as condições de armazenamento (temperatura e humidade relativa) forem favoráveis à proliferação bacteriana. Ainda, poderão também residir nas fissuras ou cavidades de grão danificados, fornecendo a estes microrganismos proteção contra tratamentos químicos aplicados às sementes. (59,75,76)

Além de aderir a sementes, sabe-se que *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. presentes em fontes ambientais podem igualmente colonizar e contaminar rebentos por adesão à planta e posterior internalização a partir de pequenas aberturas presentes na superfície da planta. (34,75)

Adicionalmente, tem sido observada a ocorrência natural de biofilmes, isto é, a formação de populações elevadas de microrganismos que aderem entre si e à superfície das raízes e folíolos, em diversas variedades de rebentos comercialmente produzidos. (34) Segundo Fett (2000), este facto poderá ser uma importante causa de preocupação visto que os biofilmes poderão atuar como barreiras protetoras sobre os locais do rebento onde se dá a adesão de patógenos humanos como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7, mantendo-os mais fortemente aderidos à planta. Como consequência da formação desta camada protetora, e considerando que os biofilmes são significativamente mais resistentes a tratamentos antimicrobianos em comparação com microrganismos individuais, torna-se consideravelmente mais complicado garantir a remoção completa dos patógenos, quer por meio de métodos físicos, quer pela utilização de substâncias antimicrobianas. (34,76–78)

Logo, sabendo que a contaminação por microrganismos pode ocorrer tanto ao nível da semente como ao nível do rebento, durante o seu crescimento ou após a sua colheita, torna-se relevante implementar medidas de controlo ao longo da totalidade do processo de produção de rebentos. (59) Estas medidas irão ser exploradas no **subcapítulo 2.6**.

2.5.2. Risco microbiológico da germinação caseira

É importante referir que apenas uma pequena proporção das sementes cultivadas pelo produtor primário é direcionada aos produtores de rebentos. (58) Acresce que, a decisão do produtor primário de produzir sementes com este propósito é muitas vezes realizada após a colheita. Logo, como os produtores poderão não saber desde um ponto inicial o fim para o qual se destinam as suas sementes, não são incentivados a seguir as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e as BPH, nem são compelidos a implementar um plano de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP). (21,58,74) Caso estas sementes, potencialmente contaminadas, não sejam devidamente tratadas pelos produtores de rebentos ou consumidores finais num contexto de germinação doméstica, a probabilidade de ocorrer a proliferação de agentes patogénicos durante a germinação é elevada. (58)

Por outro lado, ainda que seja garantida a correta descontaminação das sementes por parte dos produtores primários, como já foi reiterado previamente, é necessário considerar a possibilidade de ocorrer a introdução de fontes de contaminação microbiológica durante o

processo de germinação, que posteriormente levem à proliferação incontrolada de microrganismos e à insalubridade do produto final. (59) Tal possibilidade pode ser aumentada numa situação de germinação caseira, assumindo que grande parte dos indivíduos que a realizam não aportam conhecimentos microbiológicos básicos, nem estão sensibilizados para a necessidade de incorporação de boas práticas de higiene e de manipulação de alimentos.

2.6 Medidas de mitigação

Na sequência da ocorrência dos primeiros surtos, a *Comissão do Codex Alimentarius* (CAC) divulgou em 2003 o Código de Boas Práticas de Higiene para frutos e vegetais frescos, contendo um anexo dedicado aos rebentos. Neste documento, é enfatizada a adoção de BPAs, BPHs e de BPM, por parte dos produtores de rebentos, para minimizar o risco de contaminação dos rebentos com bactérias patogénicas, em cada etapa do processo produtivo, e garantir a salubridade do produto final. (21)

2.6.1 Produção de sementes

Durante a produção de sementes, é recomendada a aplicação rigorosa de BPAs e de BPHs, tal como utilizar água de irrigação e fertilizantes seguros, prevenir danos mecânicos nas sementes (que as tornam mais suscetíveis à contaminação por bactérias e fungos), garantir o armazenamento e transporte sob condições apropriadas e garantir que as sementes sejam manipuladas por produtores saudáveis que cumpram os requisitos de higiene. (1,11)

2.6.2 Produção industrial de rebentos

Relativamente à produção de rebentos, para além da adoção de BPMs e de BPHs, aconselha-se a elaboração de um plano de HACCP e a aplicação dos seus princípios durante todas as etapas da produção. (58,73) São recomendadas medidas como utilizar água potável para a demolha, higienizar as instalações e equipamentos, implementar uma cadeia de frio desde o ponto final da produção do rebento até este alcançar o consumidor final e realizar a descontaminação do produto final, conceito este que irá ser aprofundado no subcapítulo **2.7**. (36,60,74) Em geral, os produtores de rebentos e os consumidores, incluindo os que optem por realizar germinações caseiras, devem ser sensibilizados para os riscos microbiológicos que podem surgir durante a germinação de sementes.

2.6.3 Produção caseira de rebentos

Ainda no contexto da germinação caseira, são recomendadas diversas medidas de mitigação aquando da produção dos rebentos, das quais se destacam: i) preferivelmente adquirir e utilizar sementes que tenham sido produzidas com o intuito de serem germinadas e que tenham sido sujeitas a testes preliminares microbiológicos; ii) privilegiar a lavagem correta das mãos antes de iniciar a manipulação de sementes ou rebentos; iii) utilizar água limpa para embeber as sementes; iv) acondicionar as sementes e os rebentos em áreas separadas de outros alimentos crus e de animais; v) colocar os rebentos em recipientes esterilizados e manter em temperaturas de refrigeração. (34)

Segundo a FDA, efetuar a lavagem dos rebentos com água corrente poderá reduzir a contaminação microbiana, mas não a eliminar. Além disso, a redução poderá nem ser significativa já que diversos investigadores reportaram reduções máximas de microrganismos aeróbios totais entre 0,5 log ufc/g e 1,2 log ufc/g. (34,79,80) Dito isto, é recomendado aos consumidores, principalmente os imunocomprometidos, e aos preparadores de alimentos cozinhar inteiramente os rebentos antes do seu consumo de modo a eliminar os microrganismos de maior preocupação e, logo, reduzir o risco de intoxicações alimentares graves. (81)

2.6.4. Legislação europeia

Após a publicação do parecer científico da EFSA sobre o risco constituído por bactérias patogénicas presentes em sementes e sementes germinadas, foram adotados quatro regulamentos alusivos à produção de rebentos, pela União Europeia.

2.6.4.1. Regulamento (UE) n° 208/2013

O Regulamento de Execução (UE) n° 208/2013 da Comissão inclui medidas específicas a ser seguidas para assegurar a rastreabilidade de todos os lotes de rebentos e de sementes direcionadas à germinação que entrem em circulação na União Europeia. (82) Em específico, este regulamento obriga os operadores de empresas produtoras de rebentos ou sementes destinadas à germinação a assegurar, em todas as etapas do processo produtivo e de distribuição, o registo e conservação de toda e qualquer informação associada aos lotes de rebentos e de sementes destinadas à germinação, bem como a transmiti-la ao operador seguinte. Para satisfazer os requisitos de rastreabilidade, os operadores primários deverão elucidar o volume de rebentos ou sementes fornecidas ao operador seguinte, o nome e endereço do operador seguinte ou do destinatário caso for diferente deste, a referência do lote e a data de expedição. (21,82)

2.6.4.2. Regulamento (UE) nº 209/2013

O Regulamento (UE) nº 209/2013 da Comissão, que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005, estabelece critérios microbiológicos adicionais aplicáveis a rebentos e, como alternativa, a águas de irrigação usadas na sua produção, bem como indica a frequência de amostragem mínima para os operadores que produzem rebentos que não tiverem aplicado um sistema de HACCP, com eficácia comprovada, no seu estabelecimento. (83)

Nos termos deste regulamento, é obrigatória a realização de testes preliminares microbiológicos para *Salmonella* spp. e seis serotipos de STEC pelo menos uma vez por mês e na fase em que a probabilidade de encontrar estes patógenos é maior ou, pelo menos, 48 horas após o início da demolha das sementes. (84) Para tal, os produtores de rebentos devem fazer germinar uma amostra representativa de todos os lotes de sementes (0,5% do peso de cada lote em subamostras de 50g) e apenas utilizar os lotes que satisfaçam os critérios microbiológicos para a produção de rebentos prontos a consumir. (84)

De modo a satisfazer estes critérios e, por sua vez, aprovar a entrada dos rebentos no mercado, deverá ser descartada a presença de STEC e *Salmonella* spp. em cinco amostras de 25g de cada amostra representativa previamente germinada. Caso contrário, os rebentos terão que ser submetidos a um tratamento posterior que garanta a eliminação do perigo. Se este tratamento não for eficaz, será interdita a colocação no mercado dos rebentos do lote contaminado. (83)

Para além de cumprir os critérios microbiológicos descritos, os rebentos frescos deverão também satisfazer o critério de segurança relativo à pesquisa de *Listeria monocytogenes* vigente no Regulamento (CE) nº2073/2005. Antes da colocação dos rebentos no mercado, deverá ser garantida a ausência de *L. monocytogenes* em cinco amostras de 25g de cada lote. Após a sua colocação no mercado, as amostras poderão conter até 100 ufc/g de *L. monocytogenes* durante o seu período de vida útil, sendo que este critério apenas se aplica a rebentos que não tenham sido sujeitos a tratamentos químicos, físicos ou biológicos aplicados com o intuito de reduzir o risco microbiológico. (85) Em alternativa à testagem dos lotes, os operadores das empresas que produzem rebentos poderão optar por testar as águas de irrigação usadas na operação, caso incluam um plano de amostragem específico à sua testagem. Os rebentos poderão entrar no mercado após comprovada a ausência de STEC e *Salmonella* spp. em 200 mL de água de irrigação usada. (83)

2.6.4.3. Regulamento (UE) nº 210/2013

O Regulamento (UE) nº 210/2013 da Comissão fornece disposições para a aprovação de estabelecimentos que produzem rebentos. Segundo este regulamento, os estabelecimentos em questão deverão permitir a aplicação de BPH, nomeadamente práticas que forneçam proteção contra a eventual contaminação dos géneros alimentícios entre e durante todas as fases de produção, tal como a limpeza, desinfeção (sempre que necessário), e armazenamento correto dos utensílios e equipamentos de trabalho. Regra geral, qualquer superfície que entre em contato com os géneros alimentícios (equipamentos, utensílios, bancadas) deverá aparentar bom estado de conservação e integridade e permitir que permaneça limpa e devidamente desinfetada. (86)

2.6.4.4. Regulamento (UE) nº 211/2013

O Regulamento (UE) nº 211/2013 da Comissão dispõe requisitos de certificação aplicáveis às importações de remessas, ou quantidades, de rebentos e de sementes destinadas à germinação ao nível da União Europeia. Com base neste regulamento, é apenas aprovada a importação, ou expedição a países terceiros, de remessas de sementes e/ou rebentos acompanhados de um certificado conforme ao modelo disposto no regulamento, o qual comprova que os rebentos e/ou sementes foram produzidos sob condições que satisfazem os requisitos de rastreabilidade (Regulamento de Execução (UE) n.º 208/2013), os critérios microbiológicos (Regulamento (UE) n.º 209/2013 da Comissão) e as disposições de higiene aplicáveis aos estabelecimentos que produzam este tipo de géneros alimentícios (Regulamento (UE) n.º 210/2013 da Comissão). (87)

2.7 Métodos de descontaminação

A nível da União Europeia, não há um consenso científico no que se refere à adoção de tratamentos de descontaminação microbiológica aplicados a sementes destinadas à germinação e/ou a rebentos. Neste sentido, os produtores de sementes e/ou rebentos apenas podem incorporar os tratamentos aprovados pela autoridade nacional competente. (84)

2.7.1. Sementes

A descontaminação aplicada às sementes, antes da sua germinação, é compreendida como sendo uma estratégia de mitigação adicional que é meramente facultativa. (58) Em alguns países membros da União Europeia são aplicados métodos que envolvem o uso de desinfetantes

químicos como hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e ácido peracético, a aplicação de um tratamento térmico ou uma mistura de ambos. (36) Contudo, é extremamente difícil desenvolver um método de descontaminação que garanta a eliminação razoável de contaminantes bacterianos nas sementes sem afetar a sua viabilidade, germinação, o crescimento do rebento e o seu conteúdo nutricional. Adicionalmente, o método teria de ser otimizado conforme o tipo de leguminosa, visto que espécies distintas poderão apresentar diferentes sensibilidades ao mesmo tratamento. (36,58,84)

Dito isto, vários esforços têm sido despendidos com o fim de elaborar um método ideal que assegure a descontaminação de sementes reservadas à produção de rebentos de leguminosas. (88) Diversos investigadores estudaram a efetividade de métodos físicos, como altas temperaturas, altas pressões e irradiação, métodos biológicos como a introdução de microrganismos antagonistas e métodos químicos baseados no uso de cloro, ozono, ácidos orgânicos ou água eletrolítica como desinfetantes. (11,26,60,74) Embora alguns destes métodos tenham levado a uma redução significativa da carga microbiana patogénica em sementes previamente inoculadas, nenhum tratamento físico, químico ou biológico conseguiu até agora assegurar a eliminação completa de microrganismos patogénicos nas sementes tratadas.

Isto pode ser preocupante considerando que, como já foi mencionado previamente, baixos níveis de populações patogénicas presentes em sementes previamente descontaminadas podem evoluir a níveis mais significantes e alarmantes após a sua germinação. A título de exemplo, Saunders e Everis (2014) demonstraram que reduções significativas no número de células de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* presentes em sementes de feijão mungo não foram o suficiente para impedir o crescimento destes microrganismos nos rebentos resultantes. (89) Além disso, muitos destes métodos acabam por afetar a viabilidade e taxa de germinação das sementes estudadas e é desconhecido o seu efeito na qualidade nutricional da semente germinada. (26,36,58,88)

2.7.2. Rebentos industrializados

Quanto à descontaminação de rebentos comercialmente produzidos, existem diversos métodos que podem ser aplicados de modo a maximizar a vida de prateleira e minimizar a perda de conteúdo nutricional dos rebentos. Entre estes, os mais eficazes são os que combinam tratamentos físicos, como ultrassons, irradiação e tratamentos térmicos curtos, com tratamentos químicos à base de ácidos orgânicos, hipocloritos ou bacteoricinas. (36,75,90,91)

2.7.3. Rebentos caseiros

Em relação à descontaminação de rebentos caseiros, por outro lado, há informação muito limitada relacionada com os métodos de descontaminação, ou que permitam a redução da contaminação, mais eficazes. Alguns estudos testaram o uso de diferentes concentrações de ácidos orgânicos na descontaminação de rebentos de leguminosas, os quais podem facilmente ser obtidos pelos consumidores. (89,92,93) Em termos de efetividade, o ácido acético e o ácido cítrico têm demonstrado resultados melhores, mas em concentrações que dificilmente seriam acessíveis ao público geral (até 30%). (89) Por outro lado, a aplicação de concentrações inferiores de ácido cítrico ou acético (2% a 5%) implica um tempo de tratamento prolongado ou a sua conjugação com outros tipos de tratamentos para garantir a descontaminação eficaz dos rebentos. (92,93)

Em países asiáticos diversos tipos de tratamentos térmicos são empregues na preparação de rebentos crus. (92) Neste contexto, a aplicação de tratamentos térmicos húmidos poderá ser um método elegível para reduzir a descontaminação de rebentos e prolongar a sua vida de prateleira visto que o calor húmido consegue inativar as células bacterianas ao afetar principalmente a membrana celular e as enzimas proteicas. (75,94) Quando é controlada a sua temperatura e duração, este tipo de processamento pode preservar a aparência original e a qualidade física dos rebentos, bem como minimizar a perda de nutrientes durante o processo. (41) No âmbito da germinação caseira, o uso destes métodos poderá ser mais prático para o consumidor considerando que implica a execução de técnicas simples e acessíveis que podem ser adaptadas aos tipos de equipamentos que já se encontram presentes em cozinhas de domicílios comuns.

2.7.3.1. Tratamentos térmicos húmidos

Um número limitado de autores dedicou-se a estudar o efeito da aplicação de tratamentos térmicos húmidos com diferentes técnicas e binómios de tempo-temperatura na qualidade microbiológica de rebentos de feijão mungo (92,95), soja (96,97) e alfafa (92).

Kim *et al.* (2008), aplicaram uma técnica de branqueamento (100°C/8min), com o auxílio de um fervedor de água, em rebentos de soja e denotaram uma redução nas contagens de microrganismos mesófilos, psicrófilos e anaeróbios até níveis aceitáveis. Ao aplicar uma etapa adicional de pasteurização *sous vide* (70°C/2min), posterior ao branqueamento, não foi possível detetar quaisquer microrganismos. Contudo, verificou-se uma redução no conteúdo de ácido ascórbico de 59% após o branqueamento e de 70% após a pasteurização (98).

Phua *et al.* (2014) observaram uma redução significativa nos níveis de contaminação de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e microflora natural, em rebentos de feijão mungo previamente inoculados com as estirpes patogénicas, após aplicar um tratamento húmido (70°C/20s) baseado no aquecimento de água desionizada esterilizada com uma placa de aquecimento. No entanto, apesar de ter sido atingida uma redução significativa da carga microbiana, o método não levou à eliminação completa dos microrganismos patogénicos e impactou ligeiramente os atributos físicos dos rebentos. (95)

Pao *et al.* (2008) emergiram rebentos de alfafa e feijão mungo, previamente germinados a partir de sementes inoculadas com estirpes de *Salmonella enterica*, num banho de água quente e com diferentes binómios de temperatura-tempo. Antes do tratamento, os rebentos de alfafa e feijão mungo continham respetivamente um nível de contaminação equivalente a 7.6 log ufc/g e 6.9 log ufc/g de *Salmonella enterica*. Em seguida aos tratamentos térmicos com 70°C/10s, 80°C/5s, 90°C/3s e 100°C/3s verificou-se uma eliminação completa das culturas de *Salmonella* nos rebentos de alfafa. Nos rebentos de feijão mungo, a eliminação foi observada com os binómios 70°C ou 80°C/20s, 90°C/10s e 100°C/5s. Ainda, os autores apontam para a necessidade de ser estudado o impacto destes binómios ao nível das características organoléticas dos rebentos e da sua aceitação sensorial. (92)

Com base nos estudos supramencionados, denota-se que os tratamentos baseados em calor húmido devem continuar a ser investigados e otimizados para garantir a segurança e qualidade de produtos germinados.

3. Materiais e métodos

Neste capítulo estarão descritos as amostras, equipamentos, reagentes, meios e métodos empregues ao longo do processo de germinação das leguminosas, da análise da segurança microbiológica e da qualidade proteica dos rebentos e da subsequente análise estatística dos dados obtidos. A elaboração do presente estudo teve lugar no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P. (INSA) sob a orientação da Dra. Carla Motta e da Dra. Rosália Furtado.

3.1 Amostras

No mercado foram adquiridas sementes de feijão mungo, lentilha e grão-de-bico próprias para germinar e provenientes de agricultura biológica certificada, bem como sementes de feijão frade, feijão encarnado e feijão branco oriundas de agricultura biológica caseira.

3.2 Testes prévios de germinação

Inicialmente foram realizados diversos testes de germinação com o intuito de identificar as leguminosas com maior capacidade para germinar e consequentemente produzir rebentos desenvolvidos e presuntivamente edíveis durante o período de tempo de germinação estipulado. No final foram selecionadas as leguminosas que cumpriram com estes critérios. Na **Figura 3.1** apresentam-se as amostras de leguminosas germinadas.

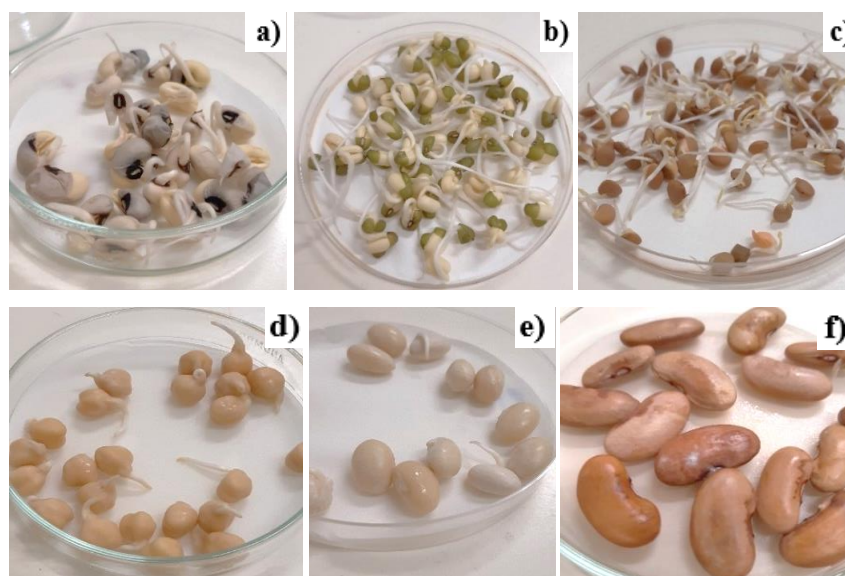


Figura 3.1 - Sementes de feijão frade (a), feijão mungo (b), lentilha (c), grão (d), feijão branco (e) e feijão encarnado (f) após 48 horas de germinação a 25°C.

Com o objetivo de mimetizar o processo de germinação em diferentes momentos do ano, aplicaram-se duas temperaturas de germinação (18°C e 25°C), correspondentes à temperatura média no interior das casas portuguesas durante a estação média e o verão. Adicionalmente foram aplicados dois tempos de germinação, 24 horas e 48 horas.

As amostras foram lavadas, colocadas em duplicado em caixas de petri, cada uma identificada com a respetiva temperatura de germinação, e demolhadas em água da torneira durante 24 horas. Posteriormente foram escorridas, novamente lavadas com água, e dispostas sob folhas de papel de filtro previamente humedecidas, dentro das caixas de petri correspondentes. As amostras foram logo colocadas nas respetivas estufas para dar início à

germinação. Após cada 24 horas analisou-se o aspeto e comprimento dos rebentos. Após cerca de 48 horas de germinação o feijão encarnado começou a desenvolver bolores, indicando que as sementes não estavam viáveis para germinar. Por esta razão, foi retirado da amostragem. O feijão branco foi igualmente descartado visto que poucas sementes conseguiram germinar após 48 horas. Com base nestas observações, as leguminosas selecionadas para as posteriores análises foram as sementes de feijão mungo, feijão frade, grão-de-bico e lentilha.

3.3 Medição do comprimento dos rebentos

Tendo em conta que as sementes foram germinadas durante um máximo de 48 horas, nenhuma amostra germinada chegou a desenvolver epicótilos ou raízes secundárias, tendo apenas demonstrado a emergência do hipocótilo. Logo, de forma a avaliar o crescimento dos rebentos foi medido o hipocótilo de cada leguminosa germinada sob as diferentes condições de temperatura e tempo de germinação. Para tornar a análise mais rigorosa mediu-se o comprimento de três rebentos, aleatoriamente selecionados, pertencentes à mesma amostra.

3.4 Germinação em condições controladas

Para a produção dos rebentos destinados a análises microbiológicas foi utilizado material e água esterilizados de modo a evitar a introdução de fontes externas de contaminação e garantir as melhores condições de higiene aquando da germinação das sementes. Como material de germinação foram empregues recipientes de porcelana provenientes do Laboratório de Microbiologia (**Figura 3.2**). Esta decisão prendeu-se na possibilidade de germinar amostras em maior quantidade, comparativamente com a capacidade das placas de petri utilizadas nos testes prévios de germinação, e de serem, no geral, mais convenientes durante a manipulação e pesagem dos rebentos.



Figura 3.2 – Recipientes utilizados durante a germinação das leguminosas.

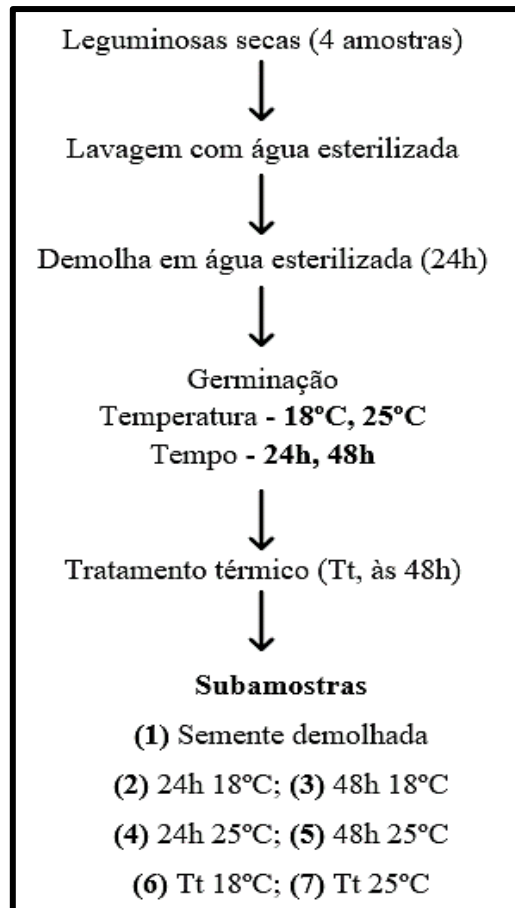


Figura 3.3 - Esquema de germinação

Depois de lavadas com água esterilizada, cada amostra de leguminosa seca foi dividida em duas amostras de 35 gramas, cada uma correspondendo a uma temperatura de germinação. As sementes foram posteriormente demolhadas em água esterilizada durante 24 horas, à temperatura ambiente. Finalizada a demolha, as sementes foram escurridas e lavadas novamente com água esterilizada tendo sido separada uma porção delas para realizar as análises microbiológicas antes de serem colocadas nas estufas respectivas. Após 24 horas de germinação as amostras foram retiradas das estufas e foi novamente separada uma porção de cada amostra para a análise microbiológica. Antes de devolver as amostras às estufas, foi adicionado cerca de 30 mL de água esterilizada às sementes remanescentes de modo a evitar a desidratação das sementes e promover a sua germinação. No final das 48 horas foi separada a quantidade de amostra necessária para as análises e os rebentos remanescentes foram submetidos a um tratamento térmico, que irá ser posteriormente descrito. Como se pode visualizar na **Figura 3.3**, foram obtidas **7 subamostras** por cada amostra inicial de leguminosas.

3.5 Tratamento térmico dos rebentos

Para a execução do tratamento térmico dos rebentos foi adaptado o procedimento proposto por Pao *et al.* (2008). Entre os binómios de temperatura-tempo utilizados com sucesso pelos autores - 70°C/20s, 80°C/20s, 90°C/10s ou 100°C/5s - optou-se por testar apenas o segundo (80°C/20s), visto que há maior dificuldade e probabilidade de erro experimental quando se utilizam tempos de tratamento mais curtos. Com o objetivo de aplicar o tratamento a rebentos prontos a consumir, optou-se por apenas tratar termicamente os rebentos com 48 horas de germinação.



Figura 3.4 – Máquina de vácuo

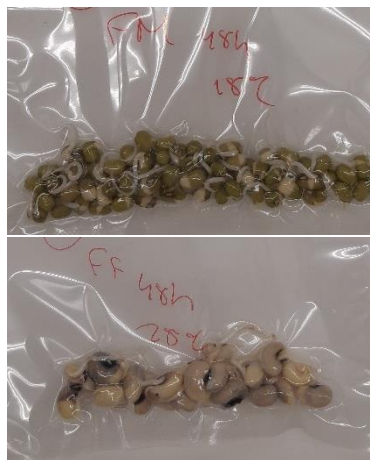


Figura 3.5 - Amostras embaladas a vácuo



Figura 3.6 - Banho-maria

Após atingir o 2º dia de germinação, pesou-se 10g de cada amostra para sacos próprios para vácuo, procedeu-se ao seu embalamento a vácuo (**Figuras 3.4 e 3.5**) e conservou-se em refrigeração a 4°C durante aproximadamente 24 horas. No dia seguinte regulou-se um banho-maria (**Figura 3.6**) a 80°C, retirou-se os sacos com os rebentos do frigorífico e procedeu-se à imersão de cada saco no banho-maria durante 20 segundos. Em seguida as amostras foram colocadas num recipiente com água fria e termoacumuladores durante 3 minutos para provocar um choque térmico aos rebentos e diminuir o desenvolvimento de microrganismos. Após os 3 minutos retirou-se os sacos do recipiente com água fria, secou-se e passou-se álcool pela sua superfície antes de proceder para a análise microbiológica.

3.6 Análise da qualidade microbiológica

A análise da qualidade microbiológica das amostras foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA sob condições controladas

e de acordo as práticas laboratoriais dispostas na Norma ISO 7218. (99) Na **Tabela 6** encontra-se um resumo dos meios de cultura e métodos aplicados para as análises realizadas.

3.6.1. Contagem de microrganismos indicadores de higiene

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* não patogénica e fungos cumpriu-se estritamente os critérios referidos nas Normas ISO 4833-1, ISO-21528-2, EN/ISO 16649-2 e ISO 21527-1 respetivamente. (100–103) Recolheu-se, com o auxílio de uma colher esterilizada, 10 g de amostra demolhada (semente crua demolhada), amostra germinada durante 24 horas e 48 horas e amostra germinada tratada com água quente. As amostras foram pesadas para sacos de amostras, adicionadas de 90 g de água peptonada tamponada (*BioMérieux*) e homogeneizadas no aparelho *Stomacher Circulator (Lab Blender 400)* durante um ciclo de 60s a 230 rpm, obtendo-se assim a suspensão-mãe (diluição 10^{-1}). A partir de cada suspensão-mãe foram feitas diluições seriadas. Para a primeira diluição pipetou-se 1 mL da suspensão mãe para um tubo de ensaio contendo 9 mL de Caldo Triptona-Sal (*Biokar*) e homogeneizou-se com o *vortex mixer*, repetindo-se o mesmo procedimento para as diluições posteriores. O esquema de diluições está representado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Esquema de diluições das amostras.

Amostra	Semente demolhada	Amostra germinada durante 24h	Amostra germinada durante 48h	Amostra germinada tratada com água quente
Diluição final	10^{-6}	10	10^{-9}	10^{-8}

3.6.1.1. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (ISO 4833-1)

Com o objetivo de enumerar microrganismos aeróbios mesófilos, usou-se o meio não seletivo *Plate Count Agar (PCA)*, que é composto por nutrientes favoráveis ao crescimento e metabolismo da maioria das bactérias – triptona, extrato de levedura e glucose.

Da suspensão-mãe e diluições seriadas previamente descritas pipetou-se 1 mL e dispensou-se em placas de petri vazias. Em seguida incorporou-se ao inóculo cerca de 15 mL de meio PCA (*Biokar*) e homogeneizou-se com recurso a movimentos circulares. Após a solidificação do meio as placas foram invertidas e incubadas a 30°C por 72 horas sob condições aeróbias. A contagem das colónias presentes foi feita segundo a norma ISO 4833-1 e os resultados foram expressos de acordo com a norma ISO 7218.

3.6.1.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2)

As *Enterobacteriaceae* são bactérias Gram negativas que fermentam a glucose. Para a sua contagem é utilizado meio seletivo *Violet Red Bile Glucose* (VRBG), que é composto por sais biliares e cristal de violeta que inibem as bactérias Gram positivas, glucose e um indicador de pH que altera a cor do meio para vermelho quando ocorre a degradação da glucose do meio.

Da suspensão-mãe e correspondentes diluições seriadas pipetou-se 1 mL em caixas de petri vazias e incorporou-se cerca de 15 mL do meio de cultura VRBG (*Biokar*), com movimentos circulares até o meio solidificar. Adicionou-se e incorporou-se outra camada (5 a 10 mL) de meio VRBG à placa para garantir condições de semi-anaerobiose, visto que algumas enterobactérias usam a glucose por via fermentativa. De seguida, arrefeceu-se e inverteu-se as placas e incubou-se a 37°C por 24 horas. No dia seguinte efetuou-se a contagem das colónias típicas de coloração violeta/cor-de-rosa conforme a norma 21528-2 e procedeu-se aos testes de confirmação apenas nas placas contendo menos de 150 ufc/g.

Para garantir que as colónias típicas presuntivas pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, torna-se necessário realizar testes bioquímicos, nomeadamente o teste da oxidase e da fermentação da glucose. As colónias testadas deverão ser oxidase negativas e glucose positivas dado a que as enterobactérias não possuem a enzima citocromo oxidase e são capazes de fermentar a glucose.

3.6.1.2.1. Teste da oxidase (ISO 21528-2)

Para o teste da oxidase, dividiu-se uma placa de *Tryptone Soy Agar* (*BioMérieux*) em 5 secções. A partir das placas de VRBG previamente incubadas, escolheu-se 5 colónias típicas presuntivas e, com ansa esterilizada, picou-se cada colónia e transferiu-se para o meio TSA (meio não seletivo) sob a forma de estrias, realizando-se uma sementeira por esgotamento. Esta transferência para meio não seletivo teve como objetivo permitir, sem quaisquer restrições, o desenvolvimento das colónias selecionadas de modo a possibilitar a realização dos testes bioquímicos. Após incubadas as placas de TSA a 37°C por 24 horas, colocou-se 2 a 3 gotas do reagente, indofenol oxidase, num pedaço de papel de filtro e, uma a uma, testou-se cada colónia ao passar uma ansa de inoculação na colónia e posteriormente tocar com a cultura no local do papel onde foram colocadas as gotas do reagente. O resultado é considerado como negativo se, após 10 segundos, a cor do papel de filtro não se alterar para uma tonalidade arroxeadada escura.

3.6.1.2.2. Teste fermentação da glucose (ISO 21528-2)

De seguida, para o teste da fermentação da glucose foram utilizados tubos de ensaio contendo meio semissólido *OF Glucose Agar (Biokar)*. As colónias oxidase negativas foram individualmente inoculadas por picada central no meio previamente regenerado e cobriu-se a superfície de cada tubo com cerca de 1cm de parafina para criar condições de anaerobiose e por sua vez garantir que as bactérias realizem a fermentação. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Considera-se o resultado como positivo se o meio desenvolver uma cor amarela ou negativo se finalizar o período de incubação com uma cor esverdeada.

No final, com base no número de colónias confirmadas como *Enterobacteriaceae*, foram expressos os resultados das contagens segundo a norma ISO 7218.

3.6.1.3. Contagem de *Escherichia coli* (EN/ISO 16649-2)

A contagem de *E. coli* β -D-glucuronidase positivas foi feita por meio de uma sementeira de incorporação em meio seletivo *Tryptone Bile X-Glucuronidase (TBX)*. O meio TBX contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e um substrato cromogéneo (BCIG) que, ao ser clivado pela enzima β -D-glucuronidase forma um precipitado de cor azul.

Foi pipetado 1 mL da suspensão-mãe para uma placa de petri à qual posteriormente se incorporou 15 mL de meio de cultura TBX (Biokar) com movimentos circulares. Após o seu arrefecimento, as placas foram invertidas e incubadas especificamente a 44°C por 18 a 24 horas. Esta temperatura de incubação deve ser respeitada visto que outros microrganismos β -D-glucuronidase positivos podem crescer no mesmo meio sob temperaturas mais baixas. As colónias foram posteriormente contadas segundo o disposto na Norma ISO 16649-2, sendo que as típicas deverão apresentar uma coloração cor azul-turquesa. Os resultados foram posteriormente expressos com base na Norma ISO 7218.

3.6.1.4. Contagem de fungos (ISO 21527-1)

Para a contagem de fungos utilizou-se o meio seletivo *Dicloran Rose-Bengal Cloranfenicol Agar (DRBC)*. Este meio é constituído por nutrientes que garantem o crescimento de leveduras e bolores (peptonas e glucose), um antibiótico que reforça a seletividade do meio (cloranfenicol), um pigmento cor-de-rosa que é assimilado pelas leveduras e facilita a sua contagem (rosa bengala) e sulfatos de cobre e zinco que induzem os bolores a produzirem pigmentos.

Foram pipetados 0,1 mL, 0,3 mL, 0,3 mL e 0,4 mL da suspensão-mãe e 0,1 mL das 2 diluições seguintes (10^{-2} e 10^{-3}) em placas com o meio DRBC (*Biokar*), efetuando-se uma sementeira por espalhamento à superfície com recurso a espalhadores esterilizados. As placas foram posteriormente incubadas, sem inverter, a 25°C durante 5 dias. Com base na norma ISO 21527-1 foi efetuada a contagem, em separado, das colónias de leveduras, que são tipicamente pequenas, lisas e opacas, e dos bolores, que apresentam micélio e podem exibir diversas cores dependendo da espécie. Os resultados foram posteriormente expressos de acordo com a Norma ISO 7218.

3.6.2. Cálculo e expressão de resultados (ISO 7218)

O número de microrganismos (N) presente em cada amostra corresponde à média entre duas diluições sucessivas segundo a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Em que:

ΣC É a soma das colónias típicas contadas na placa, sempre que contenha no mínimo 10 colónias.

V É o volume do inóculo dispensado em cada placa, em mililitros

d É a diluição (10^{-x}) correspondente à primeira diluição contável.

Os resultados das contagens das colónias foram arredondados com dois algarismos significativos e apresentados como log ufc/g.

3.6.2.1. Critérios microbiológicos aplicados

De modo a classificar a qualidade microbiológica das sementes e respetivos germinados e, por sua vez, a sua aceitabilidade e disponibilidade para consumo, empregou-se como forma de critérios microbiológicos os valores-guia microbiológicos recomendados para a avaliação de produtos prontos para consumo. Considerando que as sementes germinadas são produtos hortícolas crus, foram utilizados os critérios aplicáveis ao Grupo 3B de alimentos prontos para consumo – *Frutos e produtos hortícolas crus minimamente processados*. Nas **Tabelas 3 e 4** estão evidenciados os valores-guia aplicados para cada parâmetro microbiológico.

Tabela 3 – Parâmetros microbiológicos e respectivos valores-guia (INSA) utilizados na avaliação da aceitabilidade microbiológica das amostras.

Microrganismos indicadores de higiene	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Microrganismos aeróbios mesófilos	<10 ⁶	10 ⁶ - ≤10 ⁸	>10 ⁸
<i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C	<10 ⁵	10 ⁵ - ≤10 ⁶	>10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	<10 ufc/g (Não detetado)	Não aplicável	>10 ufc/g
Leveduras	<10 ⁵	10 ⁵ - ≤10 ⁶	>10 ⁶
Bolores	<5x10 ²	5x10 ² - ≤10 ³	>10 ³

Tabela 4 – Parâmetros microbiológicos e respectivos valores-guia (INSA) utilizados na avaliação da segurança microbiológica das amostras.

Microrganismos patogênicos	Satisfatório	Não satisfatório	Não satisfatório/Potencialmente perigoso
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado	Detetado	>10 ²
<i>Salmonella</i> spp.	Não detetado	Não aplicável	Detetado

3.6.2.2. Interpretação da qualidade microbiológica das amostras

A interpretação da qualidade microbiológica das amostras analisadas foi efetuada com base nos resultados obtidos para cada parâmetro microbiológico supramencionado, de acordo com os níveis descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Níveis utilizados para interpretar a qualidade microbiológica das amostras analisadas.

Nível da qualidade microbiológica	Significado
Satisfatório	Todos os parâmetros têm resultados satisfatórios
Questionável	Um ou mais do que um parâmetro tem um resultado questionável e nenhum resultado não satisfatório ou potencialmente perigoso
Não satisfatório	Um ou mais do que um parâmetro tem um resultado não satisfatório e nenhum resultado potencialmente perigoso

Não satisfatório/Potencialmente perigoso	Um ou mais do que um parâmetro tem um resultado não satisfatório/potencialmente perigoso
---	--

3.6.3. Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*

3.6.3.1. Sistema VIDAS® (BioMérieux)

O Vitek® Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS®) é um sistema de imunoensaio multiparamétrico que foi utilizado para detetar antígenos de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, através de um ensaio imunoenzimático denominado de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA). O equipamento é composto por um módulo analítico dividido em 5 secções independentes, cada uma contendo 6 subdivisões onde se introduzem as amostras, um fluorímetro (detetor) e um *software multi-task* através do qual se pode identificar a amostra, seleccionar o teste a realizar e visualizar os resultados. (104)

O VIDAS® dispõe ainda de *kits* compostos por barretes e cones (SPR®) específicos à detecção de um determinado antígeno. Cada barrete, para a qual é inicialmente pipetada a amostra, contém os reagentes necessários à reacção imunoenzimática (diluinte, solução de lavagem, enzima) e uma cuvette onde é medida a fluorescência da reacção. Os cones atuam como a fase sólida da reacção e dispõem no seu interior os anticorpos que apresentam afinidade aos antígenos a ser detetados, sendo os responsáveis por pipetar e dispensar continuamente a amostra, da barrete para o sistema, em conjunto com os reagentes da reacção. (104) Para as pesquisas realizadas no presente trabalho foram utilizados os *kits* VIDAS® SLM e VIDAS® LMO2, específicos à detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, respetivamente.

Na presença do antígeno bacteriano alvo (analito) na amostra a ser analisada, este se irá fixar ao anticorpo primário que se encontra adsorvido no cone (anticorpo de captura) e os restantes antígenos, isto é, os que não se fixaram, são removidos por lavagem. Posteriormente, é dispensado pelo cone o anticorpo secundário que se encontra covalentemente conjugado à enzima fosfatase alcalina e que se irá fixar apenas ao antígeno fixado ao anticorpo primário, resultando numa reacção imunoenzimática do tipo *sandwich*. Em seguida, ao ser pipetado o substrato cromogéneo (4-metilumbeliferil fosfato), a fosfatase alcalina reage com este e catalisa a sua hidrólise resultando assim num produto colorido cuja fluorescência é medida a 450 nm e posteriormente emitida e visualizada sob a forma de um sinal fluorescente. Conforme a concentração do produto colorido produzido e, por conseguinte, a intensidade do sinal

fluorescente emitido, o sistema fornece um valor de teste à amostra e o resultado é então deduzido como positivo ou negativo (detetado ou não detetado em 25g/25mL).

3.6.3.2 Pesquisa de *Salmonella* spp (EN/ISO 6579-1)

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foram respeitadas as regras dispostas nas Normas EN/ISO 6579-1. (105) Realizou-se inicialmente um pré-enriquecimento em meio não seletivo (água peptonada tamponada) com o objetivo de promover o desenvolvimento das colónias de *Salmonella* e, deste modo, aumentar a sensibilidade do método de deteção. Pesou-se 25 g de cada amostra germinada durante 48 horas para sacos de colheita, adicionou-se 225 mL de água peptonada tamponada (BPW), homogeneizou-se e levou-se a incubar a 37°C durante 18 horas.

Finalizado o período de incubação, transferiu-se 0,1 mL do inóculo para um tubo de amostra contendo 10 mL de meio seletivo Caldo SX2 (BioMérieux), homogeneizou-se e voltou-se a incubar a 41,5°C durante 22 a 26 horas. O Caldo SX2 favorece o crescimento das principais espécies de *Salmonella* spp. ao manter um pH propício à sua multiplicação e ao conter uma mistura de agentes seletivos que garantem seletividade contra outros microrganismos irrelevantes.

No dia seguinte, homogeneizou-se o inóculo previamente incubado e transferiu-se 500µl para o primeiro orifício de uma barrete *SLM*. A barrete foi posteriormente aquecida durante 15 minutos num termobloco (*Dri-Block* DB-3D), arrefecida durante 10 minutos à temperatura ambiente e inserida numa das subdivisões do VIDAS[®]. Inseriu-se o cone *SLM* no equipamento e, com recurso ao computador ligado ao sistema, identificou-se as amostras a ser analisadas e iniciou-se os testes correspondentes. No final, os resultados foram impressos e interpretados.

3.6.3.3 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (EN/ISO 11290-1)

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* seguiu-se as regras descritas na Norma ISO 11290-1. (106) Pesou-se 25 g de cada amostra germinada durante 48 horas para sacos de colheita e procedeu-se ao seu pré-enriquecimento com 225 mL de Caldo Fraser ½ (BioMérieux) e à sua incubação a 30°C durante 24 a 26 horas. Este meio de pré-enriquecimento contribui para o crescimento de *Listeria monocytogenes* ao conter uma concentração pequena de antibióticos e antissépticos na sua formulação que induzem no meio o stress necessário para favorecer a multiplicação deste agente patogénico.

Após a incubação transferiu-se 0,1 mL do inóculo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo Fraser (BioMérieux), homogeneizou-se e incubou-se durante 24h a 37°C. O Caldo

Fraser contém o dobro da concentração de antibióticos e antissépticos em relação ao caldo de pré-enriquecimento, o que permite aumentar a seletividade contra outros contaminantes. No dia seguinte homogeneizou-se novamente a amostra e dispensou-se 500µl para uma barrete *LMO2* que foi aquecida durante 15 minutos no termobloco e arrefecida durante 10 minutos à temperatura ambiente. Inseriu-se a barrete e o cone correspondente no *VIDAS®*, identificou-se as amostras no software e deu-se início ao teste imunoenzimático, tendo-se impresso e interpretado os resultados no final.

Tabela 6 - Resumo dos meios de cultura e métodos utilizados nas análises microbiológicas

Meio de cultura	Método	Microrganismo -alvo	Características/Composição do meio	Tipologia de colônia típica	Norma
PCA	Sementeira por incorporação	Microrganismos aeróbios mesófilos	Meio não seletivo composto por triptona, extrato de levedura e glicose.	Colônias claras	ISO 4833-1
VRBG	Sementeira por incorporação em dupla camada	<i>Enterobacteriaceae</i>	Meio seletivo composto por sais biliares, cristal de violeta, glicose e indicador de pH vermelho neutro.	Colônias violeta/cor-de-rosa	ISO-21528-2
TBX	Sementeira por incorporação	<i>E. coli</i>	Meio seletivo composto por sais biliares e substrato cromogéneo BCIG	Colônias azul-esverdeadas	EN/ISO 16649-2
DRBC	Sementeira por espalhamento à superfície	Fungos	Meio seletivo composto por peptonas e glicose, cloranfenicol, rosa de bengala e sulfatos de zinco e cobre	Leveduras: colônias pequenas, lisas e opacas Bolores: colônias filamentosas	ISO 21527-1
BPW	Inoculação por diluição (1:9)	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	Meio de pré-enriquecimento não seletivo rico em peptonas	-	EN/ISO 6579-1
Caldo SX2	Inoculação por diluição (1:9)	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	Meio de enriquecimento seletivo composto por mistura de agentes seletivos	-	EN/ISO 6579-1
Caldo Fraser ½	Inoculação por diluição (1:9)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)	Meio de pré-enriquecimento seletivo composto por lítio, acriflavina e ácido nalidíxico em concentrações baixas	-	EN/ISO 11290-1
Caldo Fraser	Inoculação por diluição (1:9)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)	Meio de pré-enriquecimento seletivo composto por lítio, acriflavina e ácido nalidíxico em concentrações superiores	-	EN/ISO 11290-1

3.8 Avaliação da qualidade proteica

Para a avaliação da qualidade proteica dos rebentos procedeu-se à germinação das amostras, com base no procedimento descrito no ponto 3.2, e à sua conservação a 18°C até ao momento da preparação da amostra. Durante a preparação, pesou-se os rebentos e as respetivas sementes secas e submeteu-se a uma etapa de secagem a 70°C durante 24 horas numa estufa de vácuo (*Memmert VO*). Após a secagem pesou-se novamente as amostras e procedeu-se à sua moagem com um moinho (*Grindomix GM200*) e um almofariz, tendo-se conservado no fim as amostras trituradas a 4°C. O doseamento de aminoácidos e a determinação do azoto total foram determinados conforme os procedimentos em uso no INSA.

3.8.1. Doseamento de aminoácidos

3.8.1.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é um tipo de reação química que tem como objetivo a libertação de aminoácidos que se encontram unidos através de ligações peptídicas, a partir da utilização de uma variedade de ácidos como o HCl 6 N. (107) A reação destes ácidos com a amostra proteica resulta na clivagem de cada ligação peptídica covalente e conseqüentemente na recuperação da maioria dos aminoácidos individuais. Para o doseamento de aminoácidos das amostras analisadas foi inicialmente realizada uma hidrólise ácida assistida por forno de micro-ondas em sistema fechado (*Milestone ETHOS 1*). Neste método, a digestão é efetuada sob condições de vácuo e altas temperaturas, de modo a agilizar a libertação completa dos aminoácidos da matriz proteica, e sob anaerobiose para evitar a oxidação dos aminoácidos sulfurados. (107) Tendo em conta que o triptofano é um aminoácido extremamente sensível à digestão ácida, acabando por ser destruído, não foi possível realizar o seu doseamento neste trabalho.

Foram pesados cerca de 40 mg de cada amostra desidratada para viais apropriados para hidrólise ácida e adicionados de 200 µL de D-Norvalina (padrão interno) e 1 mL de uma solução de HCl 6 N com 0,5% de fenol. É de enfatizar que o fenol é utilizado neste método para evitar a perda de aminoácidos cíclicos como a tirosina e o padrão interno é adicionado para evitar que eventuais variações nas condições de análise tenham interferência na quantificação dos aminoácidos.

De seguida foram adicionados 30 mL de HCl 6 N ao copo do rotor do micro-ondas (**Figura 3.7**), colocou-se o suporte com os viais dentro do copo e levou-se o rotor ao micro-ondas onde se ligou a bomba de vácuo e iniciou as purgas de azoto. Estas purgas são realizadas

para remover o oxigénio do sistema ao substituí-lo com azoto. Iniciou-se posteriormente o programa de hidrólise lenta (15 minutos até atingir 160°C, 10 minutos a 160°C e 30 minutos de arrefecimento). Finalizada a hidrólise, neutralizou-se cada hidrolisado com 1mL de NaOH 6 N, filtrando-se de seguida para balões volumétricos de 10 mL. Após perfazer o volume com água ultra pura, filtrou-se o conteúdo dos balões para tubos de amostra com o auxílio de papel de filtro, acabando-se por conservar os filtrados em *eppendorfs* as -19°C.

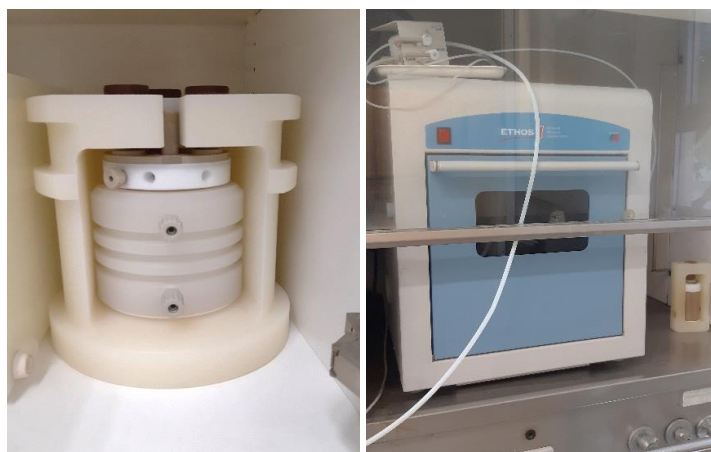


Figura 3.7 - Rotor e forno de micro-ondas de digestão ácida

3.8.1.2. Análise cromatográfica

A cromatografia é um método físico-químico que permite separar compostos presentes numa amostra de acordo com as suas características moleculares, como o seu peso, ou a sua afinidade para um determinado material de retenção (fase estacionária). Inicialmente, a amostra ou mistura é dissolvida num solvente denominado de fase móvel, que transporta os analitos até à fase estacionária. Com base nas suas características moleculares, alguns compostos são retidos por períodos mais prolongados na fase estacionária, fazendo com que se movam de modo significativamente mais lento. Outros são menos quimicamente atraídos pela fase estacionária e rapidamente eluem da coluna cromatográfica até ao detetor. (108)

A diferença entre a velocidade de passagem de cada composto da fase estacionária até ao detetor, que é conhecida como tempo de retenção, permite com que os compostos sejam separados e posteriormente transportados ao detetor. Ao detetar os compostos separados, este dispositivo envia um sinal elétrico para o computador ao qual está acoplado, o qual viabiliza a visualização do sinal na forma de um cromatograma. No final, os compostos detetados podem ser identificados e/ou quantificados por meio da comparação entre o seu cromatograma e o de um padrão de referência correspondente. (108)

No dia da análise foi realizada a derivatização pré coluna das soluções padrão e das amostras. O objetivo deste passo de derivatização é de facilitar a separação cromatográfica e, desta forma, a sensibilidade do método ao alterar as propriedades químicas dos analitos. Para tal adicionou-se para um vial 80 µL do tampão (*AccQ Fluor Borate Buffer, Waters*), 10 µL da solução padrão ou da amostra hidrolisada adicionadas de padrão interno e previamente homogeneizadas e 20 µL do reagente derivatizante (*AccQ Fluor Reagent, Waters*) previamente reconstituído. Homogeneizou-se o produto derivatizado com o vortex e levou-se a aquecer a 55° durante 10 minutos.

A separação de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fotodíodos (UPLD-DAD). O cromatógrafo utilizado foi o *Acquity* da *Waters*®, equipado com uma coluna de alta eficiência BEH C18 (100 mm x 2,1 mm. de diâmetro, 1,6 µm de partícula). Para a análise cromatográfica foi aplicado um fluxo aplicado 0,7 mL/min e uma temperatura constante de 55°C, tendo a detecção sido realizada pelo detetor de fotodíodos a 260 nm. Como fases móveis foram utilizados o *AccQ-Tag Ultra Eluente A* (Solvente A) preparado com 95% de água Milli Q e o *AccQ-Tag Ultra Eluente* (Solvente B) e os solventes de lavagem da agulha forte (*Strong*) constituído por 95% de acetonitrilo e 5% de água Milli Q e o fraco (*Weak*) formulado com 5% de acetonitrilo e 5% de água Milli Q. O gradiente de eluição foi configurado segundo a **Tabela 7**.

Tabela 7 - Gradiente de eluição aplicado na análise cromatográfica.

Tempo (min)	%A	%B
0,00	99,9	0,1
0,54	99,9	0,1
5,74	90,9	9,1
7,74	78,8	21,2
8,04	40,4	59,6
8,64	40,4	59,6
8,73	99,9	0,1
9,50	99,9	0,1

Além da pipetagem das amostras no sistema, foi pipetada uma curva de calibração previamente preparada a partir de uma solução composta por uma concentração conhecida de

cada aminoácido. No final, a identificação e quantificação dos aminoácidos analisados foi efetuada por meio da utilização de uma curva de calibração previamente preparada para cada aminoácido, tendo-se recorrido ao método do padrão interno (D-Norvalina) com vista a assegurar a compensação de potenciais desvios de tempo de retenção que possam ocorrer durante o decorrer da análise. Os dados cromatográficos foram analisados e os resultados calculados a partir do *software Empower®*, sendo expressos no fim, com aproximação às décimas, em g/100g e em mg/g de proteína de parte edível com base no peso seco.

3.8.2. Determinação da proteína total

A proteína total foi determinado a partir do método *Kjeldahl*, o qual se divide em três etapas: (i) a mineralização ou digestão do azoto em bloco digestor por ebulição da amostra com ácido sulfúrico concentrado, na presença de um catalisador; (ii) a destilação do produto anterior arrefecido através da adição de uma base concentrada resultando na conversão do metano (NH_4^+), presente na amostra, em amoníaco (NH_3) que é fervido, condensado e recolhido numa solução de ácido bórico e (iii) a quantificação do amoníaco libertado para a solução de recolha por meio da titulação do borato de amónia com uma solução de HCl 0,1 N. (109)

3.8.2.1. Mineralização

Aproximadamente 750 mg de amostra desidratada foi pesada para um tubo de *Kjeldahl* previamente lavado com água. Adicionou-se a cada tubo duas pastilhas de mistura catalisadora e 15 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e misturou-se ligeiramente. Colocou-se as amostras na Unidade de Digestão (*Foss Tecator 2006 Digestor*), selecionou-se o programa adequado e iniciou-se a sua mineralização até a mistura atingir uma cor azul-clara. Durante a mineralização, ocorre um aumento gradual da temperatura, desde a temperatura ambiente até aos 400°C, durante 4 horas. Os tubos com as amostras são mantidos a esta temperatura durante 1 hora e 30 minutos e são posteriormente retirados do bloco de aquecimento, deixando a unidade de recolha de fumos ligada, até voltar à temperatura ambiente.

3.8.2.2. Destilação

Após o seu arrefecimento, denotou-se a formação de cristais nas amostras mineralizadas. Para dissolver os cristais adicionou-se a cada tubo um pequeno volume de água e procedeu-se à sua agitação e aquecimento num banho de água a 90°C. De seguida ligou-se a Unidade de Destilação (*Foss Tecator 2800 Kjeltac AutoDistillation*) apresentada na **Figura 3.8**, e efetuou-se o ciclo de limpeza. Iniciou-se a destilação do branco, das amostras e do sulfato de amónio. Para a destilação do branco mediu-se 10 ml de H_2SO_4 para um tubo de *Kjeldahl* e 50

mL de solução de recolha (ácido bórico 4%) para um erlenmeyer, colocou-se o tubo e o erlenmeyer no equipamento e destilou-se conforme o ciclo de destilação adequado. Conforme este ciclo, o branco/amostras são destilados durante 5 minutos por adição de 50 mL de solução de hidróxido de sódio 40% e de 50 mL de água, sendo depois o produto destilado (cerca de 150 mL) recolhido para uma solução recetora de 50 mL. Para a destilação das amostras repetiu-se o mesmo procedimento à exceção da adição do H₂SO₄ para o tubo da amostra. Para a destilação da solução de sulfato de amónio mediu-se 10 mL da mesma para um tubo vazio, adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ e seguiu-se o procedimento anterior.

3.8.2.3. Titulação

O branco, as amostras e o sulfato de amónio foram titulados com solução de HCL 0,1 N até ao ponto de pH $4,4 \pm 0,1$ num sistema de titulação automático (*Metrohm Titrando 808* – **Figura 3.8**) de acordo com o programa “Azoto géneros alimentícios”.



Figura 3.8 - Unidade de Destilação e sistema de titulação automático utilizados no método *Kjeldahl*.

3.8.2.4. Teor de proteína total

O teor de proteína total de cada amostra foi obtido através da multiplicação da percentagem de azoto total pelo fator de Jones para a maioria das leguminosas (6,25), de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). (110) O teor de azoto total é calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m}$$

Em que:

V_1 é o volume em mililitros da solução de HCL 0,1 N gasto na titulação da amostra;

V_0 é o volume em mililitros da HCl 0,1 N gasto na titulação do branco;

m é a massa em gramas da toma de amostra.

Os resultados da proteína total foram expressos em g/100g com aproximação às décimas

3.8.3. *Score* de aminoácidos

De modo a prever a qualidade proteica dos germinados de leguminosas recorreu-se ao cálculo do *score* químico de cada AAE segundo a seguinte fórmula:

$$SAA = \frac{\text{mg de aminoácido em 1g de proteína na amostra}}{\text{mg de aminoácido em 1g de proteína de referência}}$$

Como proteína de referência foi empregue o padrão de AAE recomendado pela WHO/FAO/UNU (2002) para humanos adultos, que se encontra presente na **Tabela 8**. Importa mencionar que neste trabalho não foi efetuado o cálculo do *Score* de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Verdadeira Digestibilidade das Proteínas (PDCAAS), nem o do *Score* de Aminoácidos Indispensáveis Digestíveis (DIAAS), uma vez que não foi possível encontrar os dados relativos à digestibilidade fecal ou ileal das proteínas e dos aminoácidos que estão associados às leguminosas que foram analisadas.

Tabela 8 - Estimativa da ingestão adequada de aminoácidos essenciais em adultos

AAE	mg/g proteína
Histidina	15
Triptofano	6.0
Treonina	23
Lisina	45
AAS	22
AAA	38
Valina	39
Ileucina	30
Leucina	59

Legenda: AAS, aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína); AAA, Aminoácidos aromáticos (trionina + fenilalanina).

3.9 Análise estatística

Para realizar a análise estatística dos resultados relativos ao comprimento dos rebentos e ao teor de aminoácidos totais foi utilizado o *software* IBM SPSS *Statistics* v.29. Inicialmente procurou-se efetuar uma análise de variância com um fator a vários níveis (*One-way* ANOVA) para comparar os valores médios obtidos nestas determinações. Contudo, na impossibilidade de validar os pressupostos subjacentes à ANOVA optou-se por recorrer ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar o significado estatístico das diferenças. Consideraram-se as diferenças como significativas quando o valor de $p < 0,05$. Os resultados das restantes determinações realizadas, nomeadamente a análise microbiológica e a quantificação do teor proteico pelo método de *Kjedahl*, não foram analisados estatisticamente por se tratar de medições diretas, e não de médias.

4. Resultados e Discussão

4.1 Medição do comprimento dos rebentos

Na **Tabela 9** e **Gráfico 4.1** figuram as medições do comprimento do hipocótilo de cada tipo de rebento analisado. De acordo com os valores apresentados, as maiores medições foram observadas nos rebentos com 48 horas de germinação à temperatura de 25°C, indicando possivelmente que esta combinação de temperatura e tempo de germinação terá sido a mais adequada para o desenvolvimento dos rebentos estudados neste trabalho. Sob estas condições, os rebentos de feijão mungo apresentaram a média de comprimento mais elevada (4,97 cm), seguindo-se os rebentos de feijão frade (3,13 cm), lentilha (1,52 cm) e grão (0,80 cm).

Tabela 9 - Média e desvio-padrão do comprimento do hipocótilo dos rebentos

		Condições de germinação (tempo e temperatura)			
		24h 18°C	48h 18°C	24h 25°C	48h 25°C
Amostras germinadas	Feijão frade	0,90±0,10	1,47±0,06	1,47±0,15	3,13±0,32
	Feijão mungo	0,97±0,15	3,43±0,12	1,67±0,12	4,97±0,15
	Lentilha	0,18±0,06	1,93±0,12	0,27±0,06	1,57±0,12
	Grão	0,06±0,04	0,23±0,06	0,13±0,06	0,80±0,20
		Comprimento (cm)			

As segundas maiores medições foram obtidas nos rebentos germinados após 48 horas à temperatura de 18°C, seguindo-se os germinados por 24 horas a 25°C e, por último, os germinados por 24 horas a 18°C. Ao visualizar estes resultados tornou-se possível verificar maiores medições de comprimento nos rebentos germinados a 25°C, algo que era expectável visto que, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), os quatro tipos de sementes de leguminosas estudadas conseguem crescer e atingir a maturidade de forma mais rápida em áreas com temperaturas amenas a quentes. (111)

Para todas as amostras germinadas, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os rebentos germinados durante 24 horas a 18°C e os germinados durante 48 horas a 25°C. Conforme estes resultados infere-se que ambos fatores, tempo e temperatura e germinação, poderão ter influência no crescimento e comprimento dos rebentos analisados.

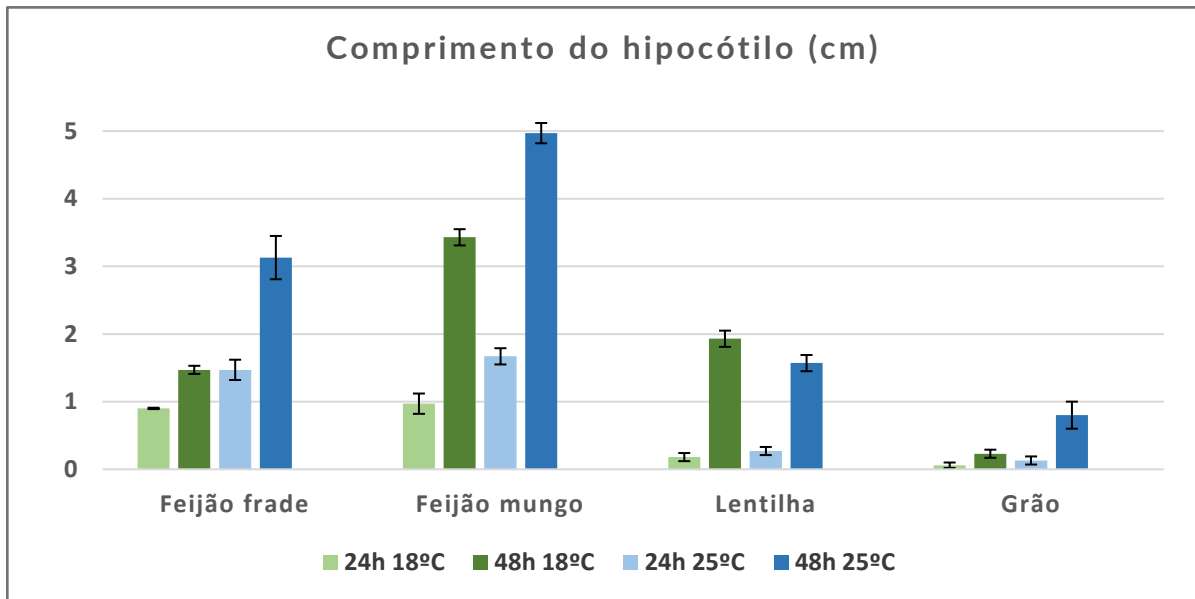


Gráfico 4.1 - Comprimento do hipocótilo de cada rebento conforme as condições de germinação

Como já foi mencionado, não foi possível encontrar estudos na literatura que analisassem as mesmas condições de germinação às aplicadas no presente trabalho. A maioria dos estudos aplicou tempos de germinação mais elevados e analisou a influência de condições adicionais que não foram analisadas neste estudo, tal como o tempo de demolha das sementes, a presença de diversos tipos de luz, o número de irrigações durante a germinação, entre outros. Ainda que existissem dados que possibilitassem a sua comparação com os resultados obtidos, é importante considerar a possibilidade de haver discrepâncias entre os dados desses estudos e os resultados aqui obtidos, uma vez que está comprovado que há diversos fatores antecedentes à germinação que podem afetar negativamente a viabilidade das sementes e, por sua vez, afetar a eficiência da germinação e o comprimento dos rebentos resultantes. (112,113) Exemplos destes fatores incluem: (i) a época de cultivo das sementes; (ii) as condições e tipos de processamento que as sementes sofrem após a sua colheita, como por exemplo a temperatura e tempo de secagem; (iii) o seu teor de humidade pós-processamento e (iv) a duração do seu armazenamento. Não obstante, importa mencionar que a maioria dos estudos analisados demonstrou que o prolongamento do tempo de germinação e a utilização de temperaturas de germinação mais elevadas, até 25°C, levam a um crescimento mais acentuado dos rebentos. (114–119)

4.2. Análise da qualidade microbiológica

4.2.1. Microrganismos aeróbios mesófilos

No **Gráfico 4.2** encontra-se resumida a variação da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (CAM) em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g), conforme o tempo e temperatura de germinação aplicado a cada semente. Nas amostras correspondentes às sementes demolhadas de feijão frade, feijão mungo e grão foram observadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos entre 1×10^4 e 1×10^6 ufc/g. Alguns estudos reportaram contagens semelhantes em sementes demolhadas de feijão preto e branco (entre 1×10^2 e 1×10^5 ufc/g), feijão mungo ($2,5 \times 10^5$, $1,3 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$ e $7,4 \times 10^5$ ufc/g), lentilha ($1,6 \times 10^3$ ufc/g) e grão ($2,8 \times 10^2$ ufc/g). (120–125)

As sementes demolhadas de lentilha, por outro lado, apresentaram níveis abaixo do limite de deteção (<10 ufc/g de amostra). A discrepância entre os resultados obtidos para as sementes demolhadas de lentilha e as restantes sementes pode ser potencialmente justificada por diferenças ao nível da origem das sementes e/ou do modo como são produzidas. De acordo com o National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), as sementes podem ser expostas em maiores ou menores proporções à contaminação microbiana segundo as práticas de manipulação, devidas ou indevidas, que são adotadas durante o seu cultivo e colheita, bem como o tipo de processamento que lhes é aplicado ou as condições sob as quais são armazenadas, acondicionadas e transportadas. Além disso, Rao *et al.* (2017) reportam no seu estudo que a contaminação inicial presente nas sementes e, por sua vez, a sua qualidade microbiológica, pode igualmente depender de fatores inerentes a estas, tais como o seu teor de humidade, pH, morfologia e integridade física. (126)

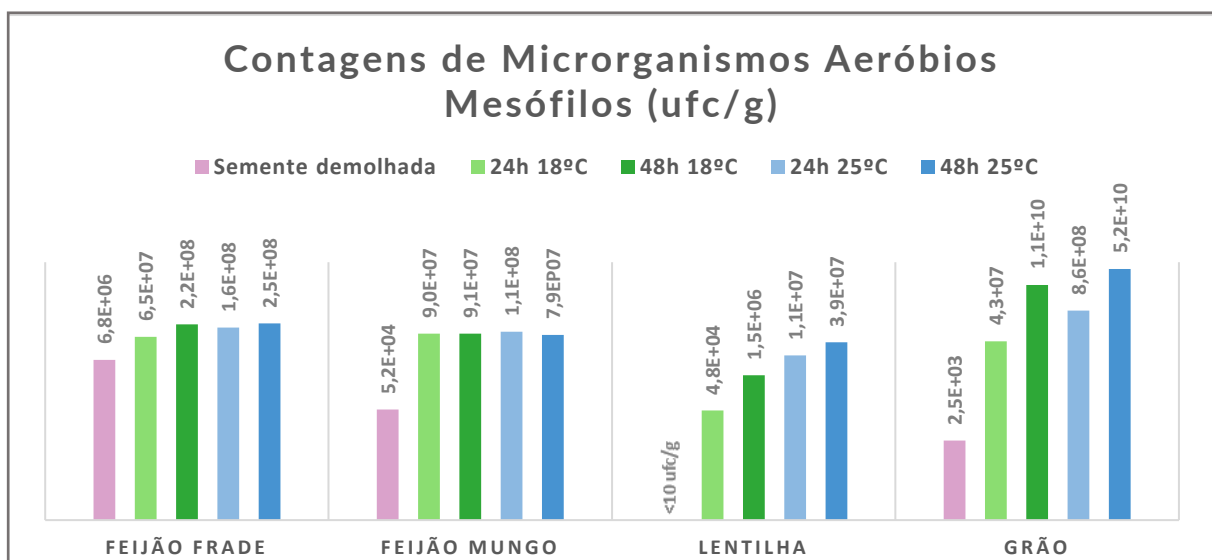


Gráfico 4.2 - Evolução do número de microrganismos aeróbios mesófilos conforme as condições de germinação.

Foi observado um aumento de $9,6 \times 10^0$, $1,7 \times 10^3$, $4,8 \times 10^4$ e $1,7 \times 10^4$ ufc/g na CAM entre as sementes demolhadas de feijão frade, feijão mungo, lentilha e grão, respetivamente, e os correspondentes germinados durante 24 horas a 18°C. Entre as sementes demolhadas e as germinadas a 25°C durante 24 horas foi evidenciada uma variação na CAM equivalente a $2,4 \times 10^1$, $2,1 \times 10^3$, $1,1 \times 10^7$ e $3,5 \times 10^5$ ufc/g, correspondente às amostras de feijão frade, feijão mungo, lentilha e grão. Ao comparar estes resultados é possível verificar que a temperatura mais elevada utilizada no estudo (25°C) levou a um maior aumento na CAM, a respeito das amostras germinadas durante 24 horas. Esta tendência é também observada entre a CAM das amostras demolhadas e as respetivas amostras após 48 horas de germinação. Contudo, seria imperativo efetuar *a priori* uma análise estatística que permitisse entender se a temperatura de 25°C, em comparação com a de 18°C, estimula o aumento significativo do desenvolvimento de microrganismos, durante a germinação das sementes.

Considerando a totalidade das sementes germinadas, isto é, todas as amostras germinadas sem qualquer distinção ao nível das temperaturas de germinação, houve um aumento mínimo de 1×10^0 e máximo de $2,5 \times 10^2$ ufc/g na CAM entre as sementes com 1 dia e 2 dias de germinação. Simon-Sarkadi e Holzapfel (1996) verificaram um aumento semelhante na CAM em sementes de feijão mungo e de lentilha germinadas durante 45 horas ($3,2 \times 10^0$ e $6,3 \times 10^2$ respetivamente).

No final da germinação, as duas amostras de feijão frade e grão germinadas a 25°C apresentaram CAM acima do Valor Máximo Admissível ($>1 \times 10^8$ ufc/g), ou seja, Não Satisfatórios, para alimentos prontos para consumo, verificando-se o mesmo para ambas as amostras de feijão frade e grão germinadas a 18°C durante 48 horas e a amostra de feijão mungo germinada a 25°C durante 24 horas. Apenas uma amostra de lentilha, a germinada a 18°C durante 24 horas, revelou um resultado Satisfatório ($<1 \times 10^6$ ufc/g). As restantes amostras germinadas de feijão frade (1), feijão mungo (3), lentilha (3) e grão (1) demonstraram resultados Questionáveis ($10^6 - \leq 10^8$ ufc/g). De acordo com Yang (2013), a ocorrência de níveis elevados de microrganismos em sementes germinadas deve-se potencialmente às condições de temperatura e humidade que durante a germinação favorecem a rápida reprodução dos microrganismos que se encontram presentes na superfície da semente.

4.2.2. Enterobacteriaceae e Escherichia coli não patogénica

No **Gráfico 4.3** encontra-se resumida a variação das contagens de *Enterobacteriaceae* conforme o tempo e temperatura de germinação aplicado a cada semente de leguminosa, em

ufc/g. Ao comparar a contagem de *Enterobacteriaceae* com a CAM é possível visualizar que a primeira se assemelha às segunda e que a sua variação ao longo da germinação foi paralela. Esta semelhança está em concordância com o observado nos estudos de Simon-Sarkadi e Holzapfel (1996) e Iacumin e Comi (2019). Tendo isto em conta, e considerando que o parâmetro de microrganismos aeróbios mesófilos inclui a totalidade dos microrganismos viáveis numa dada amostra, é possível inferir que as *Enterobacteriaceae* correspondem à flora predominante das amostras de leguminosas analisadas.

Nas amostras correspondentes às sementes demolhadas de feijão frade, feijão mungo e grão foram observadas contagens de *Enterobacteriaceae* entre 1×10^2 e 1×10^6 ufc/g. Um estudo reportou contagens similares (1×10^3) em sementes demolhadas de feijão mungo. (121) Outro denotou contagens ligeiramente inferiores ($9,3 \times 10^1$ ufc/g) em sementes de grão demolhadas. (125) Em concordância com a CAM, as amostras de lentilha demolhadas apresentaram valores de *Enterobacteriaceae* abaixo do limite de detecção (<10 ufc/g de amostra). À semelhança do observado com a CAM, o aumento das contagens de *Enterobacteriaceae* pareceu ser ligeiramente mais pronunciado quando as sementes de leguminosas foram germinadas a 25°C .

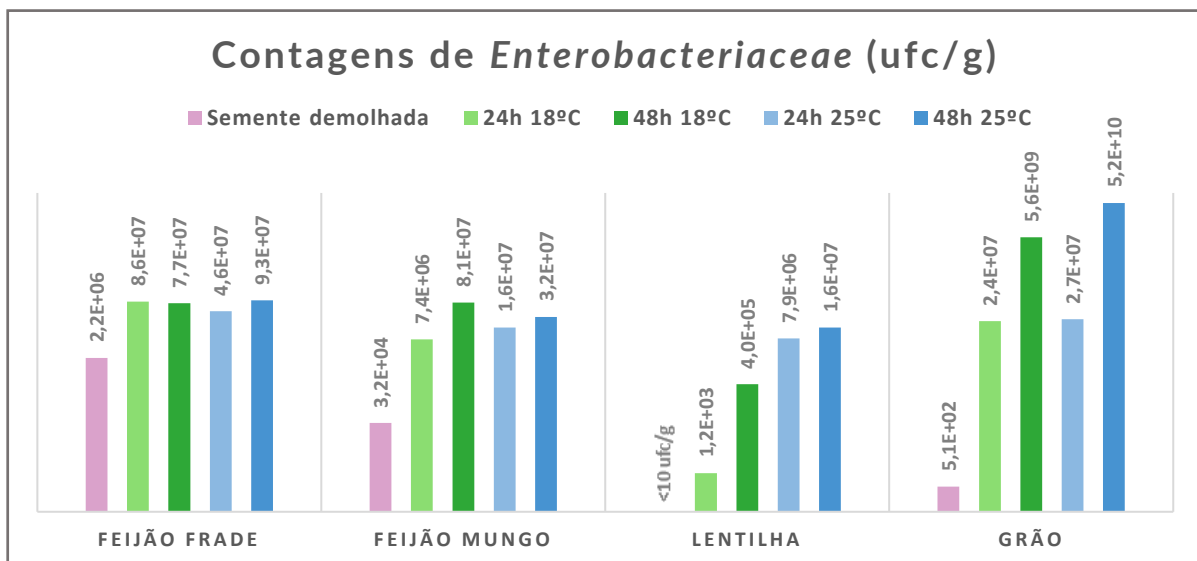


Gráfico 4.3 - Evolução do número de *Enterobacteriaceae* conforme as condições de germinação.

Considerando a totalidade das sementes germinadas, observa-se um aumento mínimo de $1,1 \times 10^0$ e máximo de $1,9 \times 10^3$ ufc/g de *Enterobacteriaceae* entre as sementes com 1 dia e 2 dias de germinação. Simon-Sarkadi e Holzapfel (1996) verificaram um aumento semelhante dos níveis de *Enterobacteriaceae* em sementes de feijão mungo e de lentilha germinadas durante 45 horas ($2,5 \times 10^0$ e $2,0 \times 10^2$ ufc/g respectivamente).

No final da germinação, todas as amostras germinadas de feijão frade, feijão mungo e grão, independentemente das condições de temperatura e tempo aplicadas durante a sua germinação, apresentaram níveis de *Enterobacteriaceae* Não Satisfatórios ($>1 \times 10^6$ ufc/g). Relativamente às amostras de lentilha, ambas as germinadas a 25°C revelaram níveis igualmente Não Satisfatórios, e as restantes germinadas a 18°C durante 24 horas e 48 horas demonstraram respetivamente um resultado Satisfatório ($<1 \times 10^5$ ufc/g) e Questionável ($10^5 - \leq 10^6$ ufc/g). Como já foi mencionado, a presença de níveis de *Enterobacteriaceae* acima do Valor Máximo Admissível nos germinados deve-se ao desenvolvimento elevado dos microrganismos inicialmente presentes na semente durante o processo de germinação.

No presente trabalho não foram encontradas colónias de *E. coli* (<10 ufc/g), tanto ao nível das sementes demolhadas como ao longo do processo de germinação de todos os tipos de leguminosas estudadas. Segundo Cava (2009) a presença de níveis elevados da microbiota acompanhante nas amostras pode dificultar a deteção de *E. coli* quando este microrganismo está presente em níveis baixos.

4.2.3. Fungos totais

No **Gráfico 4.4** é possível visualizar a variação das contagens de leveduras em ufc/g, conforme o tempo e temperatura de germinação aplicado a cada semente.

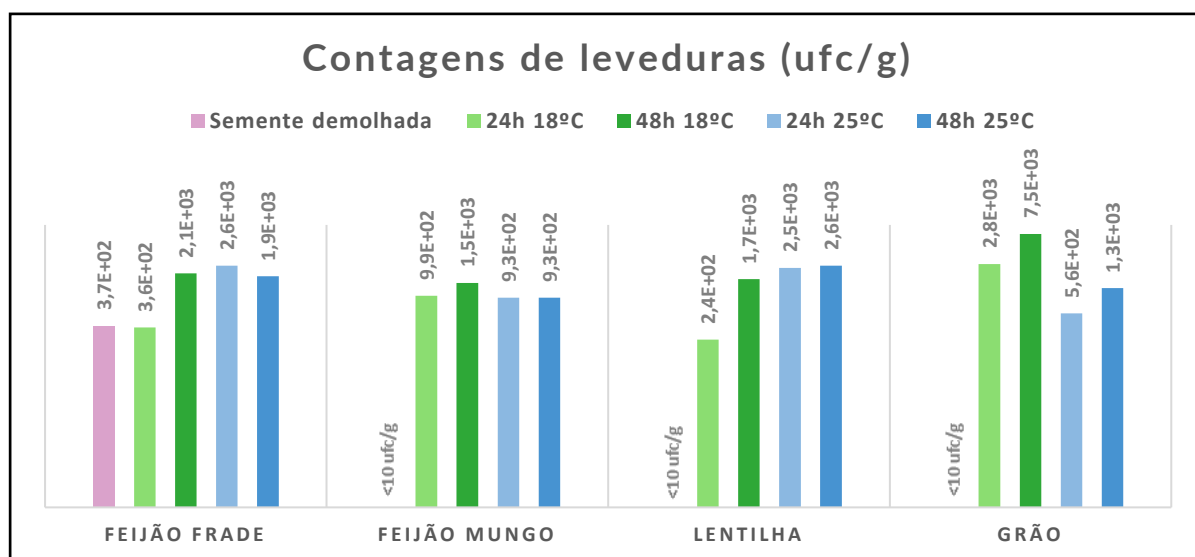


Gráfico 4.4 - Evolução do número de leveduras conforme as condições de germinação.

As amostras correspondentes às sementes de feijão mungo, lentilha e grão revelaram contagens de leveduras inferiores ao limite de deteção (<10 ufc/g). O mesmo foi observado por Alonzo (2005) em sementes de feijão mungo. As sementes de feijão frade, por outro lado,

revelaram níveis superiores a 1×10^2 ufc/g. Importa referir que estas sementes, ao contrário das restantes, provieram de uma horta caseira e foram acondicionadas em sacos comuns de plástico até ao momento da sua análise. As outras sementes, de feijão mungo, lentilha e grão, foram adquiridas em espaços comerciais e em embalagens próprias para o seu acondicionamento. Dito isto, assume-se que a contagem de leveduras nas sementes de feijão frade possa ter-se devido a uma potencial contaminação prévia do saco de plástico onde foram acondicionadas.

Foi observado um aumento de $9,9 \times 10^2$, $2,4 \times 10^2$ e $2,8 \times 10^3$ ufc/g de leveduras entre as sementes demolhadas de feijão mungo, lentilha e grão e os respetivos germinados durante 24 horas a 18°C . Não foi reportado um aumento entre a amostra de feijão mungo demolhada e a mesma germinada sob estas condições. Entre as sementes demolhadas e as respetivas germinadas a 25°C durante 24 horas, observou-se uma variação das contagens equivalente a $7,1 \times 10^0$, $9,3 \times 10^2$, $2,5 \times 10^3$, e $5,6 \times 10^2$ ufc/g, correspondente às amostras de feijão frade, feijão mungo, lentilha e grão. Ao comparar estes resultados com os anteriores, é possível verificar que a variação das contagens de leveduras foi semelhante entre as amostras germinadas a 18°C e a 25°C , o que parece indicar que a temperatura de germinação não teve uma influência relevante na tendência de crescimento destes microrganismos. Quando comparadas as amostras demolhadas com as germinadas durante 48 horas a 18°C e a 25°C é visível a mesma pequena variação dos níveis de leveduras.

Considerando a totalidade das sementes germinadas, houve um aumento mínimo de $1,1 \times 10^0$ e máximo de $7,7 \times 10^0$ ufc/g de leveduras entre as sementes com 1 dia e 2 dias de germinação, sugerindo que a variação foi quase inexistente ao longo da germinação. Simon Sarkadi e Holzapfel (1996) observaram uma variação nula entre sementes de leguminosas com 1 e 2 dias de germinação. Na maioria dos estudos que revelaram variações mais acentuadas entre sementes demolhadas e germinadas, na ordem dos 1×10^1 ufc/g, 1×10^2 ufc/g e 1×10^3 ufc/g, foram aplicados tempos de germinação mais prolongados que os estudados neste trabalho. (120,123,124,127)

Todas as amostras analisadas, tanto as demolhadas como as germinadas, apresentaram níveis de leveduras Satisfatórios ($<10^5$ ufc/g). Quanto aos bolores, apenas foram quantificados nas amostras de grão germinadas durante 48 horas, em níveis também Satisfatórios. Nas restantes amostras as contagens de bolores estiveram consistentemente abaixo do limite de deteção (<10 ufc/g).

4.2.4 *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*

Após a sua pesquisa, não foram detetadas a presença de *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras germinadas analisadas. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), um número elevado de microrganismos não patogénicos em rebentos poderá inibir ou limitar o crescimento de microrganismos patogénicos, como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, por competição por espaço ou nutrientes.

4.2.5 Interpretação da qualidade microbiológica das amostras

De acordo com os critérios de qualidade dispostos na **Tabela 5** do **subcapítulo 3.6.2.2**, que têm em consideração os resultados de todos os parâmetros microbiológicos analisados:

- Todas as amostras de feijão frade apresentaram um nível de qualidade Não Satisfatório;
- Todas as amostras germinadas de feijão mungo e de grão apresentaram um nível de qualidade Não Satisfatório, à exceção da amostra correspondente à semente demolhada, que demonstrou uma qualidade Satisfatória;
- Todas as amostras de lentilha germinadas a 25°C demonstraram um nível de qualidade Não Satisfatório, enquanto que as germinadas a 18°C durante 24 h e 48h revelaram um nível de qualidade Satisfatório e Questionável, respetivamente.

4.3. Tratamento térmico

De acordo com o NACMCF, é recomendado aplicar tratamentos que garantam uma redução mínima de microrganismos patogénicos equivalente a 5 log₁₀ ufc/g (1x10⁵ ufc/g) em sementes antes da sua germinação. Pao *et al.* (2007) aplicaram um tratamento térmico, com o binómio temperatura-tempo de 80°C/20s, a rebentos de feijão mungo e alfafa com cargas iniciais de 7,6 e 6,9 log ufc/g de estirpes de *Salmonella enterica*, respetivamente. Após o tratamento, não foi detetada *Salmonella* spp. nas amostras (<1 célula/25g de amostra), significando que o método de descontaminação provocou uma redução superior a 5 log ufc/g dos níveis deste microrganismo patogénico.

No presente estudo, foi replicado o método de tratamento térmico estudado por Pao *et al.* (2007) com o intuito de verificar a sua eficácia na redução da carga de microrganismos cuja presença é típica em sementes germinadas. A **Tabela 10** resume as contagens de *Enterobacteriaceae*, microrganismos aeróbios mesófilos e leveduras antes e depois da aplicação do tratamento térmico (80°C/20s) às amostras de feijão frade, feijão mungo e lentilha

com 48 horas de germinação. Tendo em conta que não foram detetadas células de *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* e não houve contagem de *E. coli* e bolores nas amostras germinadas não tratadas termicamente, não se achou pertinente realizar a análise destes parâmetros após o tratamento das amostras.

Tabela 10 - Variação das contagens de Enterobacteriaceae, CAM e leveduras antes e após o tratamento térmico húmido dos rebentos.

Amostra	Condições de germinação	Tratamento	Contagens (log ufc/g)					
			Enterobacteriaceae		CAM		Leveduras	
			*	**	*	**	*	**
Feijão frade	48h 18°C	NT	7,9	-0,5	8,4	-0,5	3,3	-0,7
		T	7,4		7,9		2,6	
	48h 25°C	NT	8,0	-0,1	8,4	-0,1	3,3	-0,2
		T	7,9		8,3		3,1	
Feijão mungo	48h 18°C	NT	7,9	-0,5	8,0	-0,1	3,2	-0,3
		T	7,4		7,9		2,9	
	48h 25°C	NT	7,5	+0,2	7,9	+0,1	3,0	-0,3
		T	7,7		8,0		2,7	
Lentilha	48h 18°C	NT	5,6	-0,9	6,2	-0,4	3,2	-0,7
		T	4,7		5,8		2,5	
	48h 25°C	NT	7,2	-0,6	7,6	-0,9	3,4	-0,4
		T	6,6		6,7		3,0	

Legenda: NT, amostra não tratada; T, amostra tratada; *, contagens em log ufc/g; ** variação das contagens em log ufc/g entre a amostra tratada e a não tratada (NT-T).

Atendendo aos resultados obtidos, é possível verificar que o tratamento térmico não provocou, em nenhuma das amostras, reduções da carga de *Enterobacteriaceae*, microrganismos aeróbios mesófilos ou leveduras superiores a 1 log₁₀ ufc/g (1x10¹ ufc/g). A maioria das amostras que apresentavam cargas iniciais de *Enterobacteriaceae* e microrganismos aeróbios mesófilos em níveis Não Satisfatórios ou Questionáveis mantiveram estes níveis após o seu tratamento, à exceção das amostras de lentilha germinadas durante 48h a 18°C nas quais se observou a redução das contagens destes microrganismos de um nível de qualidade Questionável para um nível Satisfatório. Todas as amostras apresentaram contagens satisfatórias de leveduras antes do tratamento, tendo sido mantidos estes níveis aceitáveis após o tratamento. É possível inferir que o tratamento térmico estudado não provou ser eficaz na redução da contaminação da maioria das amostras germinadas analisadas até níveis de qualidade higiénica satisfatórios.

4.4 Análise da qualidade proteica

Durante o processo de pesquisa de informação relevante ao tema da dissertação, não foi possível encontrar dados na literatura técnico-científica que possibilitassem estabelecer comparações diretas com os resultados obtidos para o doseamento de aminoácidos, a quantificação de proteína total, e o cálculo do *score* de aminoácidos essenciais de sementes de leguminosas da mesma proveniência e/ou germinadas sob as mesmas condições de germinação aplicadas no presente trabalho.

Relativamente às amostras de leguminosas secas (não germinadas), optou-se por consultar o Padrão de Referência Nacional da Base de Dados de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) de modo a comparar os dados presentes nesta tabela de composição com os resultados que foram obtidos em sequência da análise da qualidade proteica destas amostras. (128) Foi decido utilizar a base de dados americana, ao invés da portuguesa, uma vez que tabela de composição dos alimentos portuguesa não reúne dados sobre o perfil e o teor de aminoácidos de alimentos.

Os teores obtidos para o conteúdo proteico e o teor de aminoácidos das sementes germinadas foram expressos em peso seco de modo a eliminar a interferência da humidade entre as amostras germinadas. Na **Tabela 14** está expresso o teor de água inicialmente presente em cada amostra, antes da sua secagem. Os resultados relativos às sementes não germinadas foram igualmente expressos em base seco, de modo a poder compará-los diretamente com os dados obtidos para as sementes germinadas e, deste modo, poder avaliar de forma isolada o efeito da germinação nas amostras.

4.4.1 Teor de aminoácidos

Atendendo ao **Gráfico 4.5** e à **Tabela 11**, em todas as amostras de leguminosas analisadas não germinadas e germinadas, os aminoácidos não essenciais que apresentaram concentrações mais elevadas, por ordem decrescente, foram a glutamina e a asparagina, seguindo-se o aminoácido condicionalmente essencial arginina. Estes resultados, por esta mesma ordem, estão de acordo com os dados reportados na tabela de composição da USDA. O aminoácido não essencial menos predominante foi a glicina, seguida dos aminoácidos cisteína e tirosina. A tabela de composição americana coloca a cisteína como o aminoácido não essencial menos predominante nas leguminosas estudadas e os aminoácidos tirosina e a glicina como o segundo e terceiro aminoácidos menos abundantes.

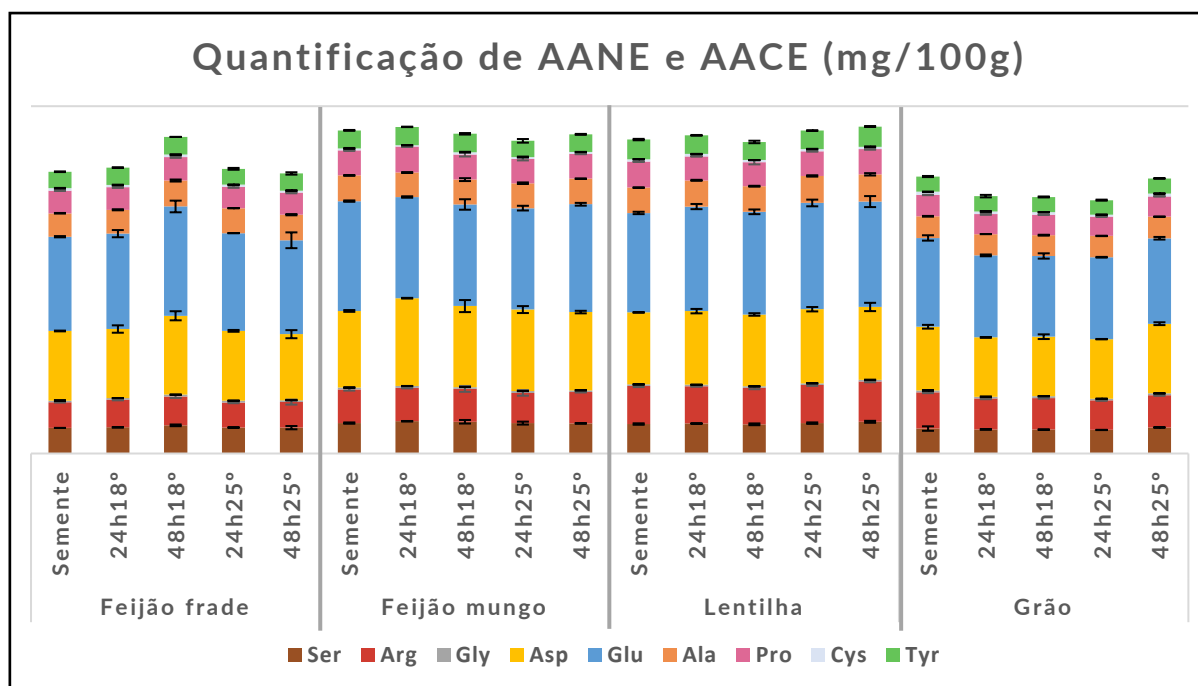


Gráfico 4.5 - Teor de aminoácidos não essenciais (AANE) e condicionalmente essenciais (AACE) em mg/100g de amostra seca.

É de destacar que alguns dos resultados obtidos para os aminoácidos não essenciais diferiram dos dados da USDA em valores superiores a 15%. Em média, os aminoácidos glicina, arginina, e glutamina apresentam teores cerca de 57,7; 30,94 e 18,21 vezes inferiores aos tabelados na base de dados americana. Tais variações nos teores de aminoácidos podem ser explicadas por diferenças ao nível das medidas agronômicas que podem ser adotadas durante o cultivo das leguminosas, tais como a prática de rotação de culturas, a agricultura orgânica e o uso de fertilizantes ricos em azoto e enxofre, ou por fatores climáticos e geográficos. (111,113,129) Adicionalmente, diversos estudos reportam que leguminosas da mesma espécie podem demonstrar variabilidade genética para o teor de proteína total e para a concentração de aminoácidos individuais e totais. (111,130–132)

Em todas as amostras de leguminosas analisadas, os aminoácidos essenciais (**Gráfico 4.6 e Tabela 12**) mais predominantes, por ordem decrescente foram a leucina, a lisina e a fenilalanina. Seguindo a mesma lógica, a metionina, seguida da histidina e da treonina foram os aminoácidos essenciais com os valores mais baixos. No que diz respeito às amostras não germinadas de todos os tipos de leguminosas, os resultados dos teores de aminoácidos essenciais estão de acordo com os dados dispostos na tabela de composição da USDA. As maiores variações de resultados entre os obtidos e os reportados na base de dados foram de 12,18% e 10,96% para os aminoácidos isoleucina e lisina, respetivamente.

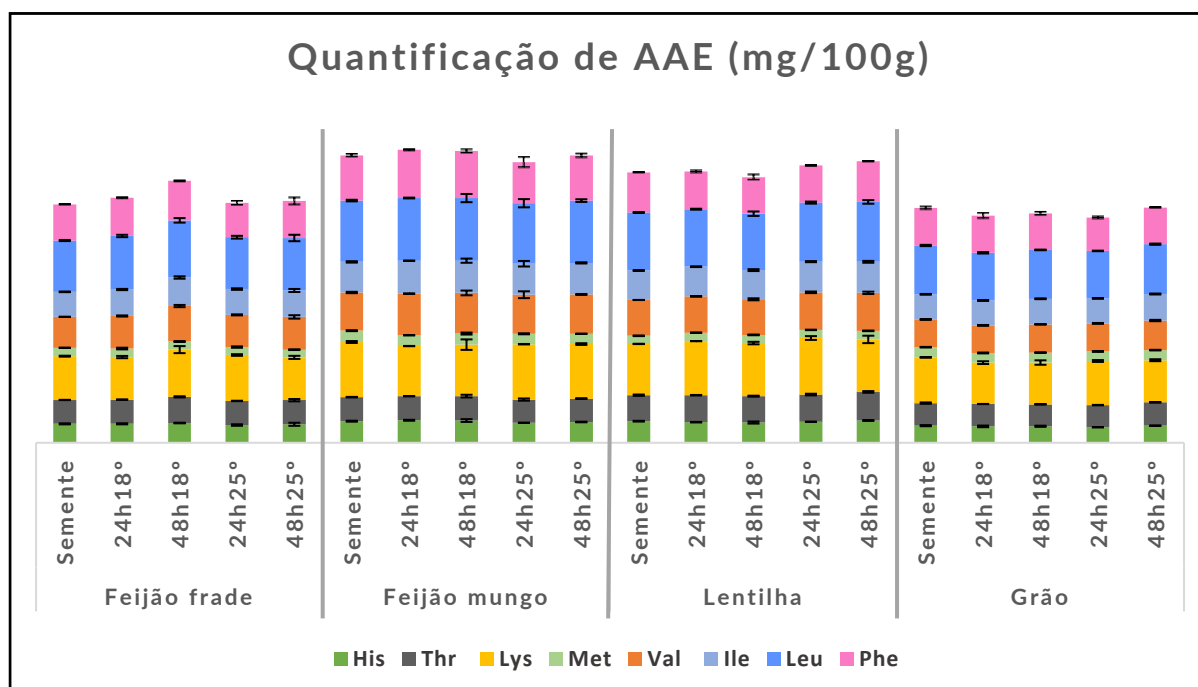


Gráfico 4.6 - Teor de aminoácidos essenciais em mg/100g de amostra seca.

Todos os aminoácidos quantificados nas sementes de feijão frade seca revelaram concentrações inferiores aos determinados nas amostras germinadas. Nas amostras correspondentes às sementes secas de feijão mungo e lentilha, a maioria dos aminoácidos totais demonstrou a mesma tendência, à exceção da arginina, glutamina, alanina e metionina nas amostras de feijão mundo e a glicina e prolina nas amostras de lentilha. Nas sementes secas de grão, por outro lado, a maioria dos aminoácidos totais revelou concentrações superiores às das reportadas nos germinados. Com base numa análise meramente visual, constatou-se que a germinação poderá ter reduzido em maior proporção a qualidade proteica das amostras iniciais de grão.

De entre as amostras germinadas à mesma temperatura, observou-se que a maioria dos aminoácidos (totais) quantificados revelou valores ligeiramente superiores quando a germinação durou 48 horas, excetuando-se as amostras germinadas de feijão mungo, as quais revelaram concentrações de aminoácidos maioritariamente superiores após um dia de germinação. Em relação às amostras com tempos de germinação iguais, verificou-se que a germinação a 18°C provocou concentrações de aminoácidos maioritariamente superiores nas amostras de feijão mungo e do feijão frade, tendo-se observado o oposto para as amostras de grão e de lentilha.

Contudo, após ter sido aplicada uma análise estatística aos dados, foi possível concluir as variações evidenciadas na composição e concentrações de aminoácidos essenciais, não essenciais e condicionalmente essenciais entre as amostras secas e as germinadas, independentemente do tempo e temperatura de germinação, não demonstraram ser estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Teor de aminoácidos não essenciais^(a) e condicionalmente essenciais^(b).

Amostra		Ser ^a	Arg ^b	Gly ^b	Asp ^a	Glu ^a	Ala ^a	Pro ^b	Cys ^b	Tyr ^b
Feijão frade	Semente	1030±0,70	1034±5,11	71,4±1,16	2803±15,6	3800±25,2	945±12,2	916±5,64	94,3±11,9	664±13,9
	24h18°	1053±4,08	1109±19,6	73,9±0,41	2781±149	3845±145	962±21,0	913±32,5	88,6±11,4	699±9,90
	48h18°	<u>1135±34,5</u>	<u>1162±59,9</u>	74,4±0,05	<u>3180±183</u>	<u>4406±235</u>	<u>1046±41,1</u>	<u>950±37,1</u>	<u>94,7±16,4</u>	<u>713±3,30</u>
	24h25°	1047±15,8	1010±29,3	71,7±0,28	2815±36,4	3939±3,51	1006±4,87	864±43,8	82,2±3,62	640±36,8
	48h25°	1041±66,3	1031±101,6	<u>75,0±2,79</u>	2663±163	3785±318	1031±24,4	891±28,5	82,2±5,65	690±48,0
Feijão mungo	Semente	1226±26,3	<u>1361±51,8</u>	70,3±0,01	3089±35,9	<u>4428±27,5</u>	<u>1034±6,5</u>	1007±15,3	82,9±18,0	726±17,5
	24h18°	<u>1299±11,5</u>	1348±22,4	<u>74,3±0,20</u>	<u>3538±14,2</u>	4080±28,4	986±4,55	<u>1048±9,99</u>	53,3±0,05	740±9,19
	48h18°	1279±72,4	1325±118	73,6±1,76	3265±243	4095±211	1002±58,2	1018±85,6	<u>88,2±15,8</u>	<u>741±30,5</u>
	24h25°	1225±59,7	1219±114	71,5±0,64	3286±140	4089±94,8	1005±31,9	978±59,7	78,7±17,1	650,8±73,2
	48h25°	1212±11,9	1264±17,4	71,7±1,32	3153±51,6	4346±55,7	1031±8,35	996±9,08	79,6±4,72	710±19,3
Lentilha	Semente	1187±29,9	1530±40,0	<u>67,8±0,61</u>	2902±12,4	4010±48,0	1021±1,16	<u>1048±13,0</u>	97,8±5,64	791±28,8
	24h18°	1208±7,07	1502±18,8	61,6±7,95	2966±89,3	4216±105	1058±20,5	967±7,95	93,8±6,35	752±15,4
	48h18°	1176±36,1	1464±49,5	66,6±1,63	2898±51,1	4138±94,7	1031±17,7	963±82,9	91,3±0,72	730±50,5
	24h25°	1223±30,0	1540±36,2	67,3±0,76	<u>2986±88,7</u>	<u>4282±135</u>	1090±26,9	991±0,12	94,9±7,10	742±3,29
	48h25°	<u>1277±39,7</u>	<u>1627±33,4</u>	65,5±7,75	2937±167	4248±222	<u>1099±47,8</u>	1013±21,3	<u>101±6,23</u>	<u>813±1,25</u>
Grão	Semente	1005±90,7	<u>1465±37,0</u>	71,0±1,05	2568±75,4	<u>3580±108</u>	<u>873±15,0</u>	<u>859±7,84</u>	<u>128±9,86</u>	<u>616±22,6</u>
	24h18°	970±11,5	1247±29,	<u>72,3±0,79</u>	2389±0,20	3308±36,4	858±3,38	808±31,8	104±5,54	618±50,9
	48h18°	962±0,53	1277±30,7	70,9±1,00	2398±94,4	3254±107	838±17,9	832±11,8	98,4±2,03	611±19,3
	24h25°	949±5,51	1190±7,70	67,3±0,41	2402±7,75	3302±14,4	860±8,47	783±2,28	72,8±12,7	586±21,0
	48h25°	<u>1049±3,77</u>	1304±26,4	71,2±1,54	<u>2808±57,0</u>	3444±52,8	869±12,5	822±10,9	110±0,27	611±11,1

Legenda - Valores apresentados em média±desvio padrão dos duplicados, mg/100g peso seco. Os valores sublinhados representam a maior concentração encontrada para cada aminoácido, dentro da mesma amostra de leguminosa.

Tabela 12 - Teor de aminoácidos essenciais (mg/100g de peso seco).

Amostra		His	Thr	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Phe
Feijão frade	Semente	553±15,2	698±4,51	1280±14,3	245±4,85	905±2,24	730±9,50	1500±16,2	1054±13,9
	24h18°	554±15,7	706±2,36	1245±33,3	<u>249±25,1</u>	951±16,8	774±17,7	1565±34,6	1117±13,6
	48h18°	<u>578±9,98</u>	<u>764±17,5</u>	<u>1381±103</u>	236±3,44	<u>1037±32,9</u>	<u>834±34,3</u>	<u>1670±66,2</u>	<u>1153±11,9</u>
	24h25°	519±22,2	704±6,23	1342±23,6	232±20,1	941±15,1	754±22,1	1515±40,8	1001±58,7
	48h25°	541±44,3	704±34,3	1251±45,5	225±10,9	957±49,4	773±44,7	1534±94,2	1081±103
Feijão mungo	Semente	631±14,4	702±8,75	1612±27,7	<u>331±13,9</u>	1116±19,9	894±20,4	1793±23,4	1321±40,4
	24h18°	<u>658±13,8</u>	703±3,91	1465±4,45	317±4,48	<u>1215±2,77</u>	<u>962±6,32</u>	<u>1833±11,9</u>	<u>1410±15,8</u>
	48h18°	650±40,7	<u>714±40,2</u>	1504±153	324±28,8	1187±69,4	943±61,0	1829±120	1373±51,1
	24h25°	584,3±52,6	679±32,7	<u>1618±6,64</u>	304±14,6	1142±100	906±81,0	1768±120	1200±148
	48h25°	608±9,56	683±5,95	1594±25,0	301±0,87	1149±14,0	922±17,0	1821±38,7	1318±53,3
Lentilha	Semente	631±11,4	760±20,2	1498±5,13	238±9,64	1046±2,10	861±4,77	1696±2,11	1172±11,4
	24h18°	602±8,06	788±7,65	1581±0,39	246±1,16	1061±10,5	868±11,1	1680±14,1	1104±28,8
	48h18°	592±31,0	770±14,5	1552±36,9	239±11,1	1040±29,8	853±27,7	1649±65,1	1068±77,8
	24h25°	614,4±4,79	795±24,2	<u>1652±55,1</u>	238±6,80	1098±23,9	897±16,1	1725±30,3	1085±1,48
	48h25°	<u>652±7,95</u>	<u>834±24,7</u>	1535±109	<u>250±9,65</u>	<u>1111±34,8</u>	<u>907±27,2</u>	<u>1750±52,7</u>	<u>1190±1,96</u>
Grão	Semente	500±16,4	659±20,4	<u>1337±2,95</u>	<u>297±8,98</u>	811±8,72	734±11,3	1428±18,7	<u>1098±38,6</u>
	24h18°	479±24,2	654±2,74	1209±40,4	283±12,9	805±12,9	729±13,3	1393±20,7	1086±74,8
	48h18°	483±17,3	640±2,96	1222±65,0	290±2,57	826±4,65	748±12,0	1427±9,70	1065±45,1
	24h25°	454±3,45	647±6,57	1289±27,5	279±2,22	819±13,3	731±7,89	1388±8,26	978±28,0
	48h25°	<u>500±5,55</u>	<u>682±9,39</u>	1231±28,4	295±9,51	<u>865±19,7</u>	<u>775±14,2</u>	<u>1456±18,5</u>	1072±12,9

Legenda - Valores apresentados em média±desvio padrão dos duplicados, mg/100g peso seco. Os valores sublinhados representam a maior concentração encontrada para cada aminoácido, dentro da mesma amostra de leguminosa.

4.4.2 Score de aminoácidos essenciais

Os resultados obtidos do *score* dos aminoácidos essenciais das sementes e respectivos germinados encontram-se resumidos na **Tabela 13**. Com base nos valores observados para as amostras de feijão mungo é possível observar que a germinação terá levado a uma redução ligeira dos *scores* calculados para todos os aminoácidos. Nas amostras de feijão frade verificou-se o mesmo para a maioria dos aminoácidos, à exceção da valina e da isoleucina. Por outro lado, nas amostras de lentilha houve um aumento ligeiro em todos nos valores dos *scores* de todos os aminoácidos, verificando-se um aumento similar na maioria dos *scores* das amostras de grão à exceção dos *scores* correspondentes à lisina e aos aminoácidos sulfurados e aromáticos. Não obstante, estas variações ligeiras não demonstraram ser estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 13 - Score de aminoácidos essenciais com base nos requerimentos dietéticos em adultos.

		His	Thr	Lys	AAS ^a	AAA ^b	Val	Ile	Leu
Feijão frade	Semente	1,78	1,47	1,37	0,74	2,18	1,12	1,18	1,23
	24h18°	1,66	1,38	1,25	0,69	2,15	1,10	1,16	1,19
	48h18°	1,65	1,42	1,31	0,64	2,10	1,14	1,19	1,21
	24h25°	1,58	1,40	1,36	0,65	1,97	1,10	1,15	1,17
	48h25°	1,55	1,31	1,19	0,60	2,00	1,05	1,11	1,12
Feijão mungo	Semente	1,75	1,27	1,49	0,79	2,24	1,19	1,24	1,27
	24h18°	1,81	1,26	1,34	0,69	2,33	1,28	1,32	1,28
	48h18°	1,74	1,25	1,34	0,75	2,23	1,22	1,26	1,25
	24h25°	1,70	1,29	1,57	0,76	2,13	1,28	1,32	1,31
	48h25°	1,65	1,21	1,45	0,71	2,18	1,20	1,26	1,26
Lentilha	Semente	1,67	1,31	1,32	0,61	2,05	1,06	1,14	1,14
	24h18°	1,59	1,36	1,39	0,61	1,94	1,08	1,15	1,13
	48h18°	1,55	1,32	1,36	0,59	1,51	1,05	1,12	1,10
	24h25°	1,58	1,34	1,42	0,58	1,86	1,09	1,15	1,13
	48h25°	1,72	1,43	1,35	0,63	2,08	1,13	1,19	1,17
Grão	Semente	1,67	1,43	1,49	0,97	2,25	1,04	1,22	1,21
	24h18°	1,69	1,50	1,42	0,93	2,37	1,09	1,29	1,25
	48h18°	1,67	1,44	1,41	0,92	2,29	1,10	1,29	1,25
	24h25°	1,61	1,50	1,52	0,85	2,19	1,12	1,30	1,25
	48h25°	1,69	1,50	1,38	0,93	2,24	1,12	1,30	1,25

Legenda - a, Aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína); b, Aminoácidos aromáticos (tirosina + fenilalanina). Os valores a negrito representam a concentração dos aminoácidos limitantes (*score* < 1) para cada amostra.

Um determinado aminoácido essencial é definido como limitante numa dada fonte de proteína sempre que esteja presente numa concentração inferior ao seu teor correspondente na proteína de referência, ou seja, quando o seu *score* é menor do que 1. Diversos estudos demonstram que vários tipos de leguminosas são principalmente deficientes em aminoácidos sulfurados. (38,113,130,133) Neste trabalho, em todas as amostras, germinadas e não germinadas, os aminoácidos sulfurados demonstraram um *score* inferior a 1, significando isto que todas as amostras analisadas são limitantes nos aminoácidos metionina e cisteína. Após a visualização dos resultados anteriores relativos à quantificação dos aminoácidos essenciais, não essenciais e condicionalmente essenciais, os resultados alusivos ao *score* dos aminoácidos sulfurados estavam dentro do expectável, considerando que a cisteína foi o segundo aminoácido não essencial com o valor mais baixo e a metionina foi o principal aminoácido essencial com o teor mais baixo.

No que toca às amostras de grão, denota-se que os aminoácidos sulfurados apresentaram *scores* mais elevados, indicando que o tipo específico de grão utilizado no estudo revelou potencialmente uma qualidade proteica ligeiramente superior às restantes leguminosas estudadas. Importa salientar ainda o elevado *score* dos aminoácidos aromáticos, tirosina e fenilalanina, bem como a histidina, com *scores* consideravelmente superiores a 1 em todas as amostras.

4.4.3 Teor proteico

Neste trabalho, o teor proteico das amostras foi determinado com recurso a dois métodos, sendo estes a soma dos aminoácidos totais, à exceção do triptofano, quantificados por análise cromatográfica e o teor da proteína total determinada pelo método de *Kjedahl*. Na Tabela 14 encontram-se discriminados os resultados obtidos para a soma dos aminoácidos totais e o teor de proteína total em g/100g de amostra.

Com base nestes resultados é possível observar que, para todas as amostras analisadas, o teor proteína total demonstrado pelo método de *Kjedahl* revelou valores consistentemente mais elevados em comparação com os valores correspondentes à soma de aminoácidos totais, diferindo, em média, cerca de 3,44 g/100g nas amostras de feijão frade, 2,8 g/100g nas amostras de feijão mungo, 4,61 g/100g nas amostras de lentilha e 2 g/100g nas amostras de grão. Similarmente, Motta (2015) observou variações de 3g/100g e de 2g/100g, entre os mesmos métodos, em amostras de amaranto e de quinoa.

A discrepância entre os resultados obtidos por meio destas metodologias distintas estava dentro do expectável pois o método de *Kjedahl* fornece o conteúdo total de azoto presente numa amostra, o que por sua vez pode levar à sobrestimação do teor proteico da amostra já que os fatores de conversão de Jones, que são tipicamente utilizados para calcular o teor de proteína, não foram concebidos para realizarem a distinção entre formas de azoto proteico e não proteico (por exemplo, nucleótidos, ácidos nucleicos e ureia). (109)

Tabela 14 - Teor proteico obtido pela soma dos aminoácidos totais e pelo método *Kjedahl* e teor de água de cada amostra.

Amostra		Soma AA totais g/100g*	Proteína total g/100g*	Teor de água g/100g
Feijão frade	Semente	18,3	20,7	8,22
	24h18°	18,7	22,2	59,2
	48h18°C	20,4	23,4	62,1
	24h25°	18,5	21,9	63,5
	48h25°	18,4	23,3	63,8
Feijão mungo	Semente	21,4	24,0	6,88
	24h18°	21,7	24,3	60,5
	48h18°	21,4	24,9	68,6
	24h25°	20,8	22,9	60,0
	48h25°	21,3	24,5	62,6
Lentilha	Semente	20,6	25,2	6,78
	24h18°	20,8	25,2	65,7
	48h18°	20,3	25,4	59,0
	24h25°	21,1	25,9	63,7
	48h25°	21,4	25,3	60,6
Grão	Semente	18,0	20,0	7,56
	24h18°	17,0	18,9	56,4
	48h18°	17,0	19,3	53,0
	24h25°	16,8	18,8	58,8
	48h25°	18,0	19,8	55,4

Legenda - *valores apresentados em g/100g de peso seco.

A soma dos aminoácidos totais, por outro lado, permite obter o conteúdo proteico real do alimento, sem haver a influência de compostos de azoto não proteico. Adicionalmente, o facto de no presente estudo ter sido necessário utilizar o fator de conversão genérico de Jones de 6,25, devido à impossibilidade de encontrar, até à data atual, fatores de conversão específicos às leguminosas analisadas, pode ter igualmente influenciado e possivelmente sobrestimado a quantificação do teor proteico das amostras.

Comparando o teor de proteína total (obtido pelo método de *Kjedahl*) de cada semente seca com os valores reportados na tabela de composição de dados americana para o mesmo tipo de leguminosa, os quais também foram determinados pelo método de *Kjedahl*, foi possível observar diferenças na ordem dos 3,8 g/100g; 0,1 g/100g, 0,6g/100g e 0,5 g/100g para as amostras de feijão frade, feijão mungo, lentilha e grão. A maior variação entre as amostras de feijão frade pode ser explicada, como já foi mencionado, por diferenças ao nível das condições de crescimento, condições climáticas ou por variabilidades genéticas entre cultivares.

O teor proteico das amostras, obtido pela soma de aminoácidos totais, não demonstrou variar de forma significativa ($p > 0,05$) ao longo da germinação. Se for tido em consideração o teor proteico obtido pelo método de *Kjedahl* é possível, apenas por observação direta, discernir que o tempo de germinação poderá ter influenciado o teor de proteína total das amostras de feijão frade, no sentido em que, quanto mais prolongada fosse a germinação, maior seria o conteúdo proteico destas amostras. Contudo, visto que os resultados obtidos por este método se tratam de medições diretas, e não de médias de réplicas, não é possível realizar testes estatísticos que corroborassem esta observação. Em relação às restantes amostras de feijão mungo, lentilha e grão, observou-se que apresentaram valores relativamente semelhantes ao longo da germinação, independentemente do tempo e temperatura de germinação.

5. Conclusões

A germinação é uma prática conhecida por aprimorar a qualidade nutricional de sementes de leguminosas. Devido aos benefícios nutricionais que podem advir da germinação, tem sido evidenciado um aumento da popularidade da execução desta prática nomeadamente a nível doméstica por parte de públicos conscientes em relação à sua saúde. Contudo, sendo os rebentos consumidos tipicamente na forma crua, podem aportar um elevado risco microbiológico com graves repercussões na saúde humana, para o qual o público que produz rebentos caseiros pode não estar ciente.

O foco ao longo da presente dissertação foi analisar o efeito da germinação ao nível da segurança e qualidade microbiológica e proteica de diversos tipos de leguminosas, para determinar se o risco microbiológico e a qualidade proteica, em simultâneo, são acrescidos ou reduzidos nas amostras de leguminosas estudadas, de acordo com as condições de temperatura e tempo de germinação utilizadas, com o futuro intuito de estabelecer um procedimento guia que pudesse vir a ser recriado pelo público interessado.

De acordo com os resultados, foi possível observar que as condições de germinação aplicadas no presente trabalho não conduziram a diferenças significativas ($p > 0,05$) a respeito do conteúdo de aminoácidos essenciais, não essenciais ou condicionalmente essenciais das sementes de leguminosas estudadas e do teor de proteína total, significando que a germinação não provocou alterações relevantes ao nível da qualidade proteica geral das amostras.

Os fatores de germinação estudados demonstraram provocar diferenças significativas ao nível do comprimento dos rebentos de leguminosas analisados. Contudo, independentemente do tempo e temperatura aplicados, foi demonstrado que a germinação, ainda que realizada sob as condições controladas que foram seguidas neste estudo, levou à produção de rebentos cuja maioria demonstrou níveis de qualidade não satisfatórios. Dito isto, é possível assumir que a germinação, quando praticada em ambiente doméstico, pode resultar na criação de produtos germinados com um risco microbiológico que, no mínimo pode ser igual aos produzidos em ambiente de laboratório, e no máximo pode ser potencialmente patogénico.

Adicionalmente, o tratamento térmico estudado não provou ser eficaz para reduzir a contaminação da maioria das amostras até níveis aceitáveis, o que aponta para a necessidade de mais estudos que investiguem tratamentos mais eficazes que possam ser facilmente recriados pelos consumidores.

Recomendações para trabalhos futuros

A principal limitação experienciada durante a vertente prática do presente trabalho foi a indisponibilidade de recursos materiais para a realização de análises adicionais às amostras, tal como, por exemplo, a deteção de *E. coli* O157:H7 nas sementes e nos rebentos, visto que este patótipo de *E. coli* específico não cresce no mesmo meio que é utilizado para a contagem de colónias de *E. coli* não patogénicas. Ainda no contexto da análise da qualidade microbiológica das amostras, teria sido relevante realizar várias réplicas das amostras germinadas para possibilitar a análise estatística dos resultados obtidos e deste modo chegar a conclusões mais robustas. Em retrospectiva, se o estudo tivesse tido foco em apenas um tipo de leguminosa, ao invés de quatro, teria sido possível realizar várias réplicas dessa única amostra e alocar todos os recursos disponíveis na sua análise.

Adicionalmente, teria sido interessante estudar o efeito de outros binómios de tempo-temperatura durante o tratamento térmico das amostras germinadas e, em paralelo, analisar o efeito desses tratamentos ao nível da qualidade organolética das amostras termicamente tratadas, potencialmente através de análises reológicas e/ou sensoriais.

Por fim, numa perspetiva mais ambiciosa, considerando que o cálculo do *score* de aminoácidos não tem em consideração a verdadeira digestibilidade da proteína, seria interessante avaliar a digestibilidade proteica *in vitro* (IVPD) das amostras antes e após a germinação, considerando a falta de estudos baseados na avaliação da influência da germinação na digestibilidade proteica de leguminosas.

Referências Bibliográficas

1. Sharma A. A review on traditional technology and safety challenges with regard to antinutrients in legume foods. Vol. 58, *Journal of Food Science and Technology*. Springer; 2021. p. 2863–83.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The Global Economy of Pulses*. 2019th ed. Rawal V, Navarro DK, editors. 2019.
3. Semba RD, Ramsing R, Rahman N, Kraemer K, Bloem MW. Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Glob Food Sec*. 2021 Mar 1;28.
4. Szczybyło A, Halicka E, Jackowska M, Rejman K. Analysis of the Global Pulses Market and Programs Encouraging Consumption of This Food. *Zeszyty Naukowe SGGW w Warszawie - Problemy Rolnictwa Światowego*. 2019 Sep 30;19(3):85–96.
5. Instituto Nacional de Estatística. *Estatísticas Agrícolas* [Internet]. 2020th ed. Lisboa; 2020. Available from: www.ine.pt
6. Fernández MEA, Stamford TCM, Viana RD, Santos CAC dos, Costa AF da, Stamford TLM. Efeitos da germinação em leguminosas e cereais: propriedades nutricionais e tecnológicas. In: *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 3*. Editora Científica Digital; 2021. p. 351–66.
7. Wang TL, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? Vol. 131, *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists; 2003. p. 886–91.
8. Motta C, Bento. C., Nascimento AC, Santos M. A importância das leguminosas na alimentação, nutrição e promoção da saúde. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*. 2016;2(8).
9. López-Martínez LX, Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Heredia JB. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. Vol. 38, *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd; 2017. p. 624–34.
10. Pina-Pérez MC, Ferrús Pérez MA. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. Vol. 72, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 114–24.
11. Miyahira RF, De J, Lopes O, Elisabete A, Antunes C. The Use of Sprouts to Improve the Nutritional Value of Food Products: A Brief Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021;76:143–52.
12. Elliott H, Woods P, Green BD, Nugent AP. Can sprouting reduce phytate and improve the nutritional composition and nutrient bioaccessibility in cereals and legumes? *Nutrition Bulletin*. John Wiley and Sons Inc; 2022.

13. Martinez APC, Martinez PCC, Souza MC, Brazaca SGC. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2011;31(1):23–30.
14. Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Jul 20];108(SUPPL. 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23107529/>
15. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. [Internet]. Geneva; 2002 [cited 2023 Jul 20]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43411/WHO_TRS_935_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
16. Adhikari S, Schop M, de Boer IJM, Huppertz T. Protein Quality in Perspective: A Review of Protein Quality Metrics and Their Applications [Internet]. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35267922/>
17. Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition [Internet]. Vol. 37, *Amino Acids*. 2009 [cited 2023 Jul 20]. p. 1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19301095/>
18. National Research Council. Protein and Amino Acids. In: *Recommended Dietary Allowances* [Internet]. 10th ed. Washington (DC): National Academies Press; 1989 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234922/>
19. FAO Expert Consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation. *FAO Food Nutr Pap* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jul 20];(92). Available from: <https://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
20. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. Plano de controlo a estabelecimentos que produzem rebentos [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 20]. Available from: <https://www.dgav.pt/planos-de-controlo/>
21. Morabito S. Developments in improving the safety of sprouts. In: *Advances in Microbial Food Safety*. Elsevier Inc.; 2015. p. 351–78.
22. Rodrigues ASE, Afonso IM. Produção de Rebentos. Um alimento do futuro. *Gazeta das Aldeias* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 20];22–6. Available from: https://www.academia.edu/8085155/Produ%C3%A7%C3%A3o_de_Rebentos_Um_alimento_do_futuro
23. Gabriel AA, Berja MC, Estrada AMP, Lopez MGAA, Nery JGB, Villafior EJB. Microbiology of retail mung bean sprouts vended in public markets of National Capital Region, Philippines. *Food Control*. 2007 Oct;18(10):1307–13.
24. Naik IS, Suresh Naik I, Deshpande VK. Seed coat dormancy: An overview in legumes. *Journal*. 2021;(11):620–4.

25. Ohanenye IC, Tsopmo A, Ejike CECC, Udenigwe CC. Germination as a Bioprocess for Enhancing the Quality and Nutritional Prospects of Legume Proteins. *Trends Food Sci Technol*. 2020;
26. Benincasa P, Falcinelli B, Lutts S, Stagnari F, Galieni A. Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*. 2019 Feb 1;11(2).
27. Szczerba A, Płażek A, Pastuszak J, Kopeć P, Hornyák M, Dubert F. Effect of low temperature on germination, growth, and seed yield of four soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Agronomy*. 2021;11(4).
28. Nonogaki H. Seed Germination and Reserve Mobilization. In: ELS. Wiley; 2008.
29. Hassan S, Hussain MB, Waheed M, Ahmad K, Kassymov S, Shariati MA, et al. Effect of Germination Processing on Bioactive Compounds of Cereals and Legumes. In: *Functional Foods and Nutraceuticals*. Springer International Publishing; 2020. p. 283–306.
30. Ikram A, Saeed F, Afzaal M, Imran A, Niaz B, Tufail T, et al. Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: A comprehensive review. Vol. 9, *Food Science and Nutrition*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 4617–28.
31. Televičiūtė D, Tarasevičienė Ž, Danilčenko H, Barčauskaitė K, Kandaraitė M, Paulauskienė A. Changes in chemical composition of germinated leguminous under abiotic stress conditions. *Food Science and Technology (Brazil)*. 2020;40:415–21.
32. Gu EJ, Kim DW, Jang GJ, Song SH, Lee JI, Lee SB, et al. Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. *Food Chem*. 2017 Feb 15;217:311–9.
33. Tajoddin M, Manohar S, Lalitha J. Effect of soaking and germination on polyphenol content and polyphenol oxidase activity of mung bean (*Phaseolus Aureus* L.) cultivars differing in seed color. *Int J Food Prop*. 2014 Apr 21;17(4):782–90.
34. Baker KA. Microbiological and Quality Characteristics of Alfalfa (*Medicago sativa*) and Mung Bean (*Vigna radiata*) Sprouts Grown Using Different Water Sources and Treated Post-Harvest Recommended Citation. 2016.
35. Stephens JM. Bean Sprouts-*Phaseolus aureus* R. and *Glycine max* (L.) Merr. 1 [Internet]. 1994 Apr. Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu>.
36. Miyahira RF, Antunes AEC. Bacteriological safety of sprouts: A brief review. Vol. 352, *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V.; 2021.
37. Rico D, Peñas E, García MDC, Rai DK, Martínez-villaluenga C, Frias J, et al. Development of antioxidant and nutritious lentil (*Lens culinaris*) flour using controlled optimized germination as a bioprocess. *Foods*. 2021 Dec 1;10(12).
38. Fouad AA, Rehab FMA. Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris medik.*) sprouts. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2015;14(3):233–46.

39. Ghumman A, Kaur A, Singh N. Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (*Lens culinari*) and horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) lines. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;65:137–44.
40. Xu M, Jin Z, Simsek S, Hall C, Rao J, Chen B. Effect of germination on the chemical composition, thermal, pasting, and moisture sorption properties of flours from chickpea, lentil, and yellow pea. *Food Chem*. 2019 Oct 15;295:579–87.
41. Alwis DP, Amarakoon R. Evaluation the Effect of Processing and Storage on Some of the Nutrients of Selected Varieties of Legume Sprouts in Sri Lanka. *International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering*. 2017 Feb 18;4(1).
42. Mubarak AE. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chem*. 2005 Mar;89(4):489–95.
43. Sun WX, Zhang RJ, Fan J, He Y, Mao XH. Comprehensive transformative profiling of nutritional and functional constituents during germination of soybean sprouts. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018 Jun 1;12(2):1295–302.
44. Gu EJ, Kim DW, Jang GJ, Song SH, Lee JI, Lee SB, et al. Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. *Food Chem*. 2017 Feb 15;217:311–9.
45. Winarsi H, Septiana AT, Wulandari SP. Germination improves sensory, phenolic, protein content and anti-inflammatory properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprouts milk. *Food Res*. 2020 Dec 1;4(6):1921–8.
46. Audu SS, Aremu MO. Effect of processing on chemical composition of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2011;10(11):1069–75.
47. Katarzyna Chilomer 2010 aumento EAA.
48. Gulewicz P, Martínez-Villaluenga C, Frias J, Ciesiołka D, Gulewicz K, Vidal-Valverde C. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chem*. 2008 Mar 15;107(2):830–44.
49. Yu W, Zhang G, Wang W, Jiang C, Cao L. Identification and comparison of proteomic and peptide profiles of mung bean seeds and sprouts. *BMC Chem*. 2020 Jul 29;14(1).
50. Nkhata SG, Ayua E, Kamau EH, Shingiro JB. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. Vol. 6, *Food Science and Nutrition*. Wiley-Blackwell; 2018. p. 2446–58.
51. El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawey AA, El-Beltagy AE. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. Vol. 58, *Plant Foods for Human Nutrition*. 2003.
52. Dhull SB, Kinabo J, Uebersax MA. Nutrient profile and effect of processing methods on the composition and functional properties of lentils (*Lens culinaris* Medik): A review. *Legume Science*. 2022 Jun 9;

53. Marengo M, Carpen A, Bonomi F, Casiraghi MC, Meroni E, Quaglia L, et al. Macromolecular and micronutrient profiles of sprouted chickpeas to be used for integrating cereal-based food. *Cereal Chemistry Journal* . 2016;
54. Uppal V, Bains K. Effect of germination periods and hydrothermal treatments on in vitro protein and starch digestibility of germinated legumes. *J Food Sci Technol*. 2012 Apr;49(2):184–91.
55. Khattak AB, Zeb A, Bibi N. Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and in vitro protein digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chem*. 2008 Aug 15;109(4):797–801.
56. Mwikya SM, Camp J van, Rodriguez R, Huyghebaert A, Mbithi S, Camp J van, et al. Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). Vol. 212, *Eur Food Res Technol*. Springer-Verlag; 2001.
57. Mulaosmanovic E, Farkas S, Vågsholm I, Darlison J, Sousa M, Mogren L, et al. Safety risks associated with dispersal of *E. coli* O157:H7 in home sprouting modules. *LWT*. 2019 Mar 1;101:783–8.
58. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal*. 2011 Nov 1;9(11).
59. EFSA. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal*. 2013 Jan 1;11(1).
60. Galieni A, Falcinelli B, Stagnari F, Datti A, Benincasa P. Sprouts and microgreens: Trends, opportunities, and horizons for novel research. *Agronomy*. 2020 Sep 1;10(9).
61. Food and Drugs Administration. Reducing Microbial Food Safety Hazards in the Production of Seed for Sprouting: Guidance for Industry. 2022.
62. Food and Drug Administration. Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. In: *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2^a. 2012.
63. Larry M. Bush, Maria T. Vazquez-Pertejo. Infecções por *Salmonella* não tifoide. 2022 [cited 2023 Jan 6]. MDS Manuals. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilos-gram-negativos/infec%C3%A7%C3%B5es-por-salmonella-n%C3%A3o-tifoide>
64. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Current topics in food microbiology Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 1999;52:123–53. Available from: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
65. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I. Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do

- ambiente de preparação e distribuição alimentar [Internet]. 2019 [cited 2023 Jul 20]. Available from: https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/12/INSA_Valores-guia.pdf
66. Villarreal-Barajas T, Vázquez-Durán A, Méndez-Albores A. Effectiveness of electrolyzed oxidizing water on fungi and mycotoxins in food. Vol. 131, *Food Control*. Elsevier Ltd; 2022.
 67. Graça Campos, Alexandra Salvado, Célia Santos, Cristina Saldanha, Paula Branco, Rita Resende. Riscos e Alimentos nº 17. *Evolução do Controlo de Micotoxinas em Géneros Alimentícios, no âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA)*. 2019;
 68. Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Food Science Australia*. 2000;56(1).
 69. Acuña-Gutiérrez C, Jiménez VM, Müller J. Occurrence of mycotoxins in pulses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
 70. Tournas VH. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *Int J Food Microbiol*. 2005 Mar 1;99(1):71–7.
 71. Tango CN, Wei S, Khan I, Hussain MS, Kounkeu PFN, Park JH, et al. Microbiological Quality and Safety of Fresh Fruits and Vegetables at Retail Levels in Korea. *J Food Sci*. 2018 Feb 1;83(2):386–92.
 72. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2008 Mar 31 [cited 2023 Jul 20];123(1–2):121–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18237811/>
 73. Food and Drug Administration. *Reducing Microbial Food Safety Hazards in the Production of Seed for Sprouting: Guidance for Industry*. 2022.
 74. Yang Y, Meier F, Ann Lo J, Yuan W, Lee Pei Sze V, Chung HJ, et al. Overview of recent events in the microbiological safety of sprouts and new intervention technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013 May;12(3):265–80.
 75. Yang Y, Meier F, Ann Lo J, Yuan W, Lee Pei Sze V, Chung HJ, et al. Overview of recent events in the microbiological safety of sprouts and new intervention technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013 May;12(3):265–80.
 76. Neetoo H, Pizzolato T, Chen H. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds through a combination of high hydrostatic pressure and mild heat. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Apr;75(7):1901–7.
 77. Robertson LJ, Johannessen GS, Gjerde BK, Loncarevic S. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway.
 78. Fett WF. Naturally Occurring Biofilms on Alfalfa and Other Types of Sprouts †. Vol. 63, *Journal of Food Protection*. 2000.

79. Puligundla P, Kim JW, Mok C. Broccoli sprout washing with electrolyzed water: Effects on microbiological and physicochemical characteristics. *LWT* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Jul 20];92:600–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817307193>
80. Jeddi M, Yunesian M, Gorji M, Noori N, Pourmand M, Khaniki G. Jeddi, Maryam 2014. *J Health Popul Nutr* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 20];32(3):391–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221445/>
81. Food and Drugs Administration. Food Facts. Raw Produce Selecting and Serving it Safely. 2021 Mar;
82. Comissão Europeia. Regulamento de Execução (UE) N. o 208/2013 Da Comissão de 11 de março de 2013 relativo aos requisitos de rastreabilidade dos rebentos e das sementes destinadas à produção de rebentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 208/2013 Bélgica; 2013.
83. Comissão Europeia. REGULAMENTO (UE) N. o 209/2013 DA COMISSÃO. Bruxelas: Comissão Europeia; Mar, 2013.
84. European Sprouted Seeds Association. ESSA hygiene guideline for the production of sprouts and seeds for sprouting European Sprouted Seeds Association. Bruxelas; 2016 Dec.
85. Comissão Europeia. REGULAMENTO (CE) N° 2073/2005 DA COMISSÃO. Bruxelas: Comissão Europeia; Nov, 2005.
86. Comissão Europeia. REGULAMENTO (UE) N. o 210/2013 DA COMISSÃO. Bruxelas: Comissão Europeia; Mar, 2013.
87. Comissão Europeia. REGULAMENTO (UE) N. o 211/2013 DA COMISSÃO. Bruxelas: Comissão Europeia; Mar, 2013.
88. Neetoo H, Pizzolato T, Chen H. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds through a combination of high hydrostatic pressure and mild heat. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Apr;75(7):1901–7.
89. Saunders N, Everis L. USE OF TREATMENTS TO PREVENT THE GROWTH OF PATHOGENS ON SPROUTED SEEDS. *Food Standards Scotland* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 20]; Available from: <https://www.foodstandards.gov.scot/publications-and-research/publications/use-of-treatments-to-prevent-the-growth-of-pathogens-on-sprouted-seeds>
90. Kumar S, Gautam S. A combination process to ensure microbiological safety, extend storage life and reduce anti-nutritional factors in legume sprouts. *Food Biosci*. 2019 Feb 1;27:18–29.
91. Liu HK, Li ZH, Zhang XW, Liu YP, Hu JG, Yang CW, et al. The effects of ultrasound on the growth, nutritional quality and microbiological quality of sprouts. Vol. 111, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 292–300.
92. Pao S, Kalantari A, Khalid MF. Eliminating *Salmonella enterica* in alfafa and mung bean sprouts by organic acid and hot water immersions. 2008.

93. Singh BR, Chandra M, Agarwal R, Babu- N. CURING OF SALMONELLA ENTERICA, SEROVAR TYPHIMURIUM-CONTAMINATED COWPEA SEEDS AND SPROUTS WITH VINEGAR AND CHLORINATION. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 4];(29):268–77. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2005.00027.x>
94. Mir SA, Farooq S, Shah MA, Sofi SA, Dar BN, Hamdani AM, et al. An overview of sprouts nutritional properties, pathogens and decontamination technologies. *LWT* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Jul 20];141. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643821000530>
95. Phua LK, Neo SY, Khoo GH, Yuk HG. Comparison of the efficacy of various sanitizers and hot water treatment in inactivating inoculated foodborne pathogens and natural microflora on mung bean sprouts. *Food Control*. 2014;42:270–6.
96. Kyoung-Mo Koo, Hyoun Wook Kim, Dong Sun Lee, Eun Soon Lyu, Hyun-Dong Paik. Quality Changes During Storage of Cook-chilled Soybean Sprouts. *Food Sci Biotechnol*. 2008;17(3).
97. Koo KM, Kim HW, Lee DS, Luy ES, Paik HD. Quality Changes During Storage of Cook-chilled Soybean Sprouts. *Food Sci Biotechnol*. 2008;17(3):540–6.
98. Kim H jung, Lee NK, Lee DS, Hong W, Lee SR, Kim CJ. Improvement of Microbiological Safety of Sous Vide Processed Soybean Sprouts: Nisin and *Bacillus cereus* Challenge. *Food Sci Biotechnol*. 2008;17(1):166–71.
99. ISO 7218 (EN). Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations [Internet]. 2017 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:7218:ed-3:v1:en>
100. ISO 16649-2 (EN). Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations AMENDMENT 1 [Internet]. International Standard. 2001 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/standard/63504.html#:~:text=ISO%2021528-2%3A2017%20Microbiology%20of%20the%20food%20chain%20%E2%80%94,specifies%20a%20method%20for%20the%20enumeration%20of%20Enterobacteriaceae>.
101. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique [Internet]. International Standard. 2013 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/standard/53728.html>
102. ISO 21527-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95 [Internet]. International Standard. 2008 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/standard/38275.html#:~:text=ISO%2021527-1%3A2008%20specifies%20a%20horizontal%20method%20for%20the,at%2025%20%C2%B0C%20plus%20or%20minus%201%20%C2%B0C>.

103. ISO 21528-2. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae Colony-count technique [Internet]. International Standard. 2017 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/standard/63504.html>
104. bioMérieux® SA. VIDAS ® Instrument User's Manual [Internet]. France; 2005. Available from: <http://www.biomerieux.com>
105. ISO 6579-1 (EN). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. [Internet]. International Standard. 2017 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6579:-1:ed-1:v1:en>
106. ISO 11290-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1: Detection method [Internet]. International Standard. 2017 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.iso.org/standard/60313.html>
107. Waters Corporation. Introdução à hidrólise [Internet]. Guia abrangente para hidrólise e análise de aminoácidos. 2023 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/introduction-to-hydrolysis.html>
108. Waters Corporation. Como funciona a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)? [Internet]. Guia para iniciantes em cromatografia líquida. 2023 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/how-does-high-performance-liquid-chromatography-work.html>
109. Tomé D, Cordella C, Dib O, Péron C. Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis [Internet]. 2019. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
110. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food energy - methods of analysis and conversion factors. FAO Food Nutr Pap [Internet]. 2003 [cited 2023 Jul 20];(77). Available from: <https://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e00.htm#Contents>
111. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Global Economy of Pulses [Internet]. Rawal V, Navarro DK, editors. 2019 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.fao.org/documents/card/ru/c/i7108en/>
112. Yadav S S, McNeil D, Stevenson P. Lentil An Ancient Crop for Modern Times [Internet]. Springer; 2007 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-6313-8>
113. By S, Qureshi A. THE EFFECT OF GERMINATION ON THE PHYSICOCHEMICAL, FUNCTIONAL, AND NUTRITIONAL PROPERTIES OF YELLOW PEA, RED LENTIL AND GREEN LENTIL FLOURS [Internet]. A Thesis Submitted to the College of Graduate and Postdoctoral Studies in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in the Department of Food and

- Bioproduct Sciences University of Saskatchewan Saskatoon; 2023 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820317370>
114. Quinhone J, Ida EI. Profile of the contents of different forms of soybean isoflavones and the effect of germination time on these compounds and the physical parameters in soybean sprouts. *Food Chem* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Oct 3];166:173–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25053043/>
 115. Koo SC, Kim SG, Bae DW, Kim HY, Kim HT, Lee YH, et al. Biochemical and proteomic analysis of soybean sprouts at different germination temperatures. *J Korean Soc Appl Biol Chem* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Oct 3];58(3):397–407. Available from: <https://appliedbiolchem.springeropen.com/articles/10.1007/s13765-015-0053-7>
 116. Loures NTP, Nóbrega LHP, Coelho SRM. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de brotos de lentilha da variedade PRECOZ. *Acta Sci Agron* [Internet]. 2009 [cited 2023 Oct 3];31(4):599–606. Available from: <https://www.scielo.br/j/asagr/a/N67YvMssmfd4pyPyMb8Gjcw/abstract/?lang=pt>
 117. Kim HY, Koo SC, Kang BK, Lee YH, Kim HT, Yun HT, et al. Growth Characteristics of Sprouts and Changes of Antioxidant Activities in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with Cultivated Temperature. *Korean Journal of Crop Science* [Internet]. 2014 Jun 30 [cited 2023 Oct 3];59(2):201–7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/272369460_Growth_Characteristics_of_Sprouts_and_Changes_of_Antioxidant_Activities_in_Common_Bean_Phaseolus_vulgaris_L_with_Cultivated_Temperature
 118. Chilomer K, Zaleska K, Ciesiolka D, Gulewicz P, Frankiewicz A, Gulewicz K. Changes in the alkaloid, α -galactoside and protein fractions content during germination of different lupin species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* [Internet]. 2010 [cited 2023 Oct 3];79(1):11–20. Available from: https://www.researchgate.net/publication/269755235_Changes_in_the_alkaloid_alpha-galactoside_and_protein_fractions_content_during_germination_of_different_lupin_species
 119. Islam M, Hassan M, Sarker S, Rahman A, Fakir M. Light and temperature effects on sprout yield and its proximate composition and vitamin C content in Lignosus and Mung beans. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 2017 Dec 29;15(2).
 120. Sangronis E, Colina J, Cava R. Calidad microbiológica de semillas germinadas de *Phaseolus vulgaris* [Internet]. 2009. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/46406416>
 121. Simon-Sarkadi L, Holzappel WH. Biogenic amines and microbial quality of sprouts. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [Internet]. 1995 Jul [cited 2023 Jul 20];200(4):261–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7785356/#:~:text=Changes%20in%20the%20biogenic%20amine%20content%20relative%20to,products.%20Biogenic%20amines%20were%20determined%20by%20ion-exchange%20chromatography.>

122. Iacumin L, Comi G. Microbial quality of raw and ready-to-eat mung bean sprouts produced in Italy. *Food Microbiol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2023 Jul 20];82:371–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027796/#:~:text=The%20study%20covered%20five%20years%20of%20sprout%20production.,Italy%20were%20found%20to%20be%20acceptable%20for%20consumption.>
123. Andrews WH, Mislivec P B, Wilson C R, Bruce V R, Poelma P L, Gibson R, et al. Microbial Hazards Associated with Bean Sprouting. *J ASSOC OFF ANAL CHEM* [Internet]. 1982;65. Available from:
<https://academic.oup.com/jaoac/article/65/2/241/5702736>
124. Gabriel AA. Microbial Quality of Chlorine Soaked Mung Bean Seeds and Sprouts. *Food Sci Technol Res* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jul 20]; Available from:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/11/1/11_1_95/_article#:~:text=The%20effect%20of%2015h%2C%20300ppm%20calcium%20hypochlorite%20soaking,but%20significantly%20reduced%20microbial%20proliferation%20rates%20during%20storage.
125. Rodrigues De Lima T. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESINFECÇÃO NA SEGURANÇA E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SEMENTES GERMINADAS DE GRÃO-DE-BICO. Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada; 2019.
126. Kameswara Rao N, Dulloo ME, Engels JMM. A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. *Genet Resour Crop Evol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Jul 20];64(5):1061–74. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10722-016-0425-9>
127. Soylemez G, Brashears MM, Smith DA, Cuppett SL. OF FOOD SCIENCE 153 Microbial Quality of Alfalfa Seeds and Sprouts after a Chlorine Treatment and Packaging Modifications [Internet]. Vol. 66. 2001 [cited 2023 Jul 20]. Available from:
<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15598.x#:~:text=ABSTRACT%3A%20Alfalfa%20seeds%20were%20treated%20with%20chlorine%20to,on%20the%20seeds%2C%20but%20numbers%20increased%20during%20sprouting.>
128. United States Department Of Agriculture. FoodData Central [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/index.html>
129. Wang ZH, Li SX, Malhi S. Effects of fertilization and other agronomic measures on nutritional quality of crops [Internet]. Vol. 88, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008 [cited 2023 Jul 20]. p. 7–23. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.3084#:~:text=In%20this%20review%20paper%2C%20we%20discussed%20the%20effects,increase%20crop%20yield%20as%20well%20as%20nutritional%20quality.>
130. Jha UC, Nayyar H, Parida SK, Deshmukh R, von Wettberg EJB, Siddique KHM. Ensuring Global Food Security by Improving Protein Content in Major Grain Legumes Using Breeding and ‘Omics’ Tools [Internet]. Vol. 23, *International Journal of*

Molecular Sciences. MDPI; 2022 [cited 2023 Jul 20]. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35887057/#:~:text=Ensuring%20Global%20Food%20Security%20by%20Improving%20Protein%20Content,K%20Parida%2C%20Rupesh%20Deshmukh%204%2C%2035887057%20PMC9325250%2010.3390%2Fijms23147710>

131. Avezum L, Lefevre C, Rondet E, Achir N, Hemery Y. Improving the nutritional quality of pulses via germination. *Food Reviews International* [Internet]. 2023;1–34. Available from: <https://institut-agro-montpellier.hal.science/hal-03892177>
132. Thavarajah D, Lawrence T, Boatwright L, Windsor N, Johnson N, Kay J, et al. Organic dry pea (*Pisum sativum* L.): A sustainable alternative pulse-based protein for human health. *PLoS One* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2023 Jul 20];18(4 April). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37043476/>
133. Nnanna I A, Phillips R D. Amino acid composition protein quality and water-soluble vitamin content of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*) [Internet]. Vol. 39, *Plant Foods for Human Nutrition*. 1989 [cited 2023 Jul 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2762247/>

Anexos

Anexo I – Protocolo experimental para o doseamento de aminoácidos em alimentos

Reagentes

- Kit AccQ-Tag Chemistry Kit que inclui: Waters Amino Acid Hydrolysate standard; Waters AccQ Flúor Borate Buffer; Waters AccQ Flúor Reagent Powder; Waters AccQ Flúor Reagent Diluent; AccQ-Tag Ultra Eluente A; AccQ-Tag Ultra Eluente B.
- D-Norvalina - 99% grau de pureza (CAS N°: 2013-12-9)
- Acetonitrilo para HPLC grau de gradiente, (CAS N°: 75-05-8)
- Ácido clorídrico fumante 37%, (p.a.) (CAS N°: 7647-01-0) - HCL 6N – 501,1mL/1L
- Fenol puro (Cristalino) (CAS N°: 108-95-2)
- Hidróxido de Sódio lentilhas, p.a. (CAS. N°: 1310-73-2) - NaOH 6N – 240 g / 1L
- Água Ultra Pura – Milli-Q (18-megaohm)

Preparação da solução de padrão interno de D-Norvalina para a hidrólise

Preparar uma solução com uma concentração de 25mM.

1. Pesar 29,5 mg de NVal.
2. Pôr a NVal num balão volumétrico certificado de 10 mL e preencher o volume com HCl 0,1 N.
3. Armazenar esta solução em pequenas aliquotas no congelador.

Hidrólise ácida em microondas

Esta foi realizada no microondas, modelo Ethos 1 da marca Milestone.

1. Pesar entre 20 a 50 mg de amostra para um vial de hidrólise.
2. Adicionar 100 µL ou 200 µL de solução de padrão interno de NVal ao vial, se amostra for retomada, respetivamente, para um balão de 5mL ou de 10mL.
3. Adicionar a cada vial 1 mL de uma solução de HCl 6 N com 0,5% de fenol.
4. Colocar 30 mL de HCl 6 N no copo do rotor do microondas e colocar a rack dos vials lá dentro.
5. Colocar o rotor no microondas e selecionar o programa (15 minutos para atingir os 160°C, 10 minutos a 160°C e 30 min. de arrefecimento).
6. Fazer 3 purgas ao rotor do seguinte modo:
 - a) Abrir a válvula de vácuo e a válvula de azoto durante 2 min;

- b) Fechar a válvula de azoto e esperar mais 2 min;
 - c) Repetir os passos a. e b. mais duas vezes.
7. Iniciar o programa do microondas.
 8. Após a conclusão da hidrólise retirar as amostras do microondas e neutralizar a hidrólise com 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 6 N.
 9. Retomar o conteúdo de cada vial para um balão volumétrico. Lavar o vial até completa remoção dos resíduos com a ajuda de um vortex e perfazer o restante volume com água ultra pura.
 10. Filtrar conteúdo do balão para um tudo de vidro com tampa.

Preparação da solução de padrão interno de D-Norvalina para a curva de calibração

Preparar uma solução com uma concentração de 2,5 mM.

1. Pesar 2,95 mg de NVal.
2. Colocar a NVal num balão volumétrico certificado de 10 mL e perfazer o volume com HCl 0,1 N.

Preparação de uma curva de calibração

Preparar soluções de concentrações sucessivas, a partir da solução inicial (Waters Amino Acid Hydrolysate standard), que tem uma concentração de 2,5 mM para todos os AA, tendo em conta as concentrações esperadas em cada uma das matrizes

Preparação das Fases Móveis

- Solvente A – Preparar uma solução com 5% de AccQ-Tag Ultra Eluente A e 95% de água ultra pura. Filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como A. Deve ser preparado diariamente. (Colocar as linhas de solvente A1 e A2).
- Solvente B – O AccQ-Tag Ultra Eluente B está pronto a usar. Colocar as linhas de solvente diretamente no frasco ou transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como B. (Colocar a linha de solvente B1).
- Solvente de lavagem da agulha, fraco (Weak) – Preparar uma solução com 5% de Acetonitrilo e 95% de água ultra pura. Misturar e filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel. Identificar como Weak. (Colocar as linhas de solvente Weak needle wash e seal wash).

- Solvente de lavagem da agulha, forte (Strong) – Preparar uma solução com 95% de Acetonitrilo e 5% de água ultra pura. Misturar e filtrar por uma membrana de 0,22 µm. Transferir para um reservatório de fase móvel e identificar como Strong. (Colocar as linhas de solvente Strong needle wash e B2).

Derivatização das soluções padrão e amostras

Reconstituição do reagente de derivatização (Waters AccQ Flúor Reagent):

1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
2. Lavar a ponta da micropipeta, aspirando e dispensando 1 mL de reagente AccQ Flúor Reagent Diluent.
3. Repetir uma vez o passo 2.
4. Pipetar 1 mL de reagente AccQ Flúor Reagent Diluent para o frasco AccQ Flúor Reagent Powder. Tapar cuidadosamente.
5. Agitar utilizando um vortex durante 10 segundos.
6. Aquecer o frasco reconstituído na estufa a 55°C até o reagente se dissolver. Não aquecer mais do que 10 minutos.

Derivatização das soluções padrão:

1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
2. Pipetar 80 µL do reagente AccQ Flúor Borate Buffer para um vial.
3. Adicionar 10 µL da solução padrão preparada com adição de padrão interno.
4. Adicionar 20 µL do reagente AccQ Flúor Reagent reconstituído.
5. Agitar utilizando um vortex durante 10 segundos.
6. Deixar repousar 1 minuto à temperatura ambiente e colocar na estufa previamente aquecida a 55°C durante 10 minutos.
7. Proceder à análise cromatográfica.

Derivatização das Amostras:

1. Aquecer previamente uma estufa a 55°C.
2. Pipetar 80 µL do reagente AccQ Flúor Borate Buffer para um vial.
3. Adicionar 10 µL da solução da amostra hidrolisada preparada com adição de padrão interno.
4. Adicionar 20 µL do reagente AccQ Flúor Reagent reconstituído.
5. Levar ao vortex durante 10 segundos.
6. Deixar repousar 1 minuto à temperatura ambiente e colocar na estufa previamente aquecida a 55°C durante 10 minutos.

7. Proceder à análise cromatográfica.

Parâmetro a programar para o detetor:

Parâmetros	Valor programado
Modo do comprimento de onda	Comprimento de onda único (<i>Single wavelength</i>)
Comprimento de onda	260 (nm)
Velocidade da amostragem	20 (pontos/seg)
Constante de tempo	0.40 (seg)

Gradiente a programar

	Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	%A	%B	Curva
1	0,00	0,7	99,9	0,1	
2	0,54	0,7	99,9	0,1	6
3	5,74	0,7	90,9	9,1	7
4	7,74	0,7	78,8	21,2	6
5	8,04	0,7	40,4	59,6	6
6	8,64	0,7	40,4	59,6	6
7	8,73	0,7	99,9	0,1	6
8	9,50	0,7	99,9	0,1	6

Anexo II – Determinação da proteína total pelo Método de Kjeldahl

Reagentes

Usar apenas reagentes de qualidade analítica reconhecida. A água deve ser no mínimo de grau 2 ou de qualidade equivalente, de acordo com a Norma ISO 3696.

- Ácido sulfúrico 95-98% concentrado (H_2SO_4 , $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/cm}^3$).
- Mistura catalisadora. Disponível no comércio sob a forma de pastilhas com a seguinte composição: 3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Solução de ácido bórico, a 4% (m/v). Pesar 40 g de ácido bórico, adicionar H_2O e transferir para um balão de 1L. Completar o volume. Medir o pH e registrar.
- Solução de hidróxido de sódio a 40% (m/m ou m/v).
- Solução de HCl 0,1N ou H_2SO_4 0,1N. 5.2.6 Triptofano (98,5%) ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) (PM 204,2 g/mol) ou hidrocloreto de lisina ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$) (PM 182,65 g/mol).
- Sulfato de amônio (99,5%) (NH_4) $_2\text{SO}_4$ (PM 132,13 g/mol).
- Solução de (NH_4) $_2\text{SO}_4$ 1,2% (m/v). Pesar 6,0800 g de (NH_4) $_2\text{SO}_4$ (previamente seco em estufa elétrica a 100°C durante 4 horas), adicionar H_2O e transferir para um balão de 500 mL. Completar o volume. Guardar no frigorífico (2°C - 8°C).
- Soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. 5.3

Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório nomeadamente:

- Balança analítica com resolução de 0,0001 g.
- Equipamento Tecator Kjeltex.
- Balões volumétricos.
- Titulador automático “Titrand 808-Metrohm” ou sistema equivalente.
- Frascos de Erlenmeyer de 300 mL.
- Pipeta de 5 mL, calibrada. 5.3.7 Tubos de digestão de 250 mL. 5.3.8 Estufa elétrica regulada a 102°C \pm 2°C.
- Pipeta de 5 mL calibrada.

Preparação da Amostra

Homogeneizar a amostra, recorrendo ao auxílio de um moinho /homogeneizador, de forma a garantir que não haja separação de nenhum constituinte da amostra. No caso de amostras líquidas gaseificadas, proceder à eliminação do gás em banho de ultrassons.

Toma de amostra

Pesar 0,75g de amostra.

Técnica

As pesagens são efetuadas ao decimilograma. Efetuar duas determinações paralelas.

1. Efetuar um ensaio de recuperação de padrão usando cerca de 0,1 g de triptofano (ou de cloreto de lisina) e cerca de ½ da toma de amostra utilizada no ensaio. Deve recuperar-se pelo menos 95% de azoto.
2. Antes da destilação das amostras efetuar um ensaio em branco da destilação e um ensaio controlo da destilação. O volume de solução de ácido (5.2.5) gasto na titulação do branco não deve ser superior a 0,30 mL e deve recuperar-se pelo menos 98% de azoto no ensaio controlo da destilação.

Mineralização

1. Pesar a amostra (medir o volume quando aplicável) com a precisão de 0,0001 g. - Lavar as paredes dos tubos de Kjeldahl com um pouco de H₂O.
2. Adicionar duas pastilhas de mistura catalisadora
3. Adicionar cuidadosamente, junto às paredes internas do tubo de Kjeldahl, 15mL de H₂SO₄ concentrado e misturar suavemente.
4. Colocar os tubos a mineralizar na Unidade Digestão

Nota 1: Depois de arrefecer, o mineralizado pode apresentar a formação de cristais que devem ser dissolvidos com adição de um pequeno volume de água seguida de agitação e/ou aquecimento.

Destilação

1. Ligar a Unidade de Destilação do Sistema Tecator Kjelttec.
2. Efetuar o ciclo de limpeza diário, selecionando o Programa P2. Este ciclo é repetido pelo menos 3 vezes antes de se iniciar a destilação do branco e das amostras.
3. Iniciar a destilação do branco, das amostras, do padrão e do sulfato de amónio, selecionando o Programa P1.

4. Efetuar a destilação do branco (branco de destilação): medir 10 mL de H₂SO₄ para um tubo de Kjeldahl e destilar conforme Programa 1. Terminada a destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado
5. Efetuar a destilação da solução de sulfato de amónio: medir 10 mL de H₂SO₄ (5.2.1) e 10 mL da solução de sulfato de amónio para um tubo de Kjeldahl e destilar conforme Programa 1. Terminada a destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado.
6. Seguidamente, destilar as amostras conforme Programa 1. Terminada cada destilação, retirar o erlenmeyer com o destilado e lavar com água os tubos que estiveram em contacto com o destilado.

Titulação

Titular o branco, as amostras, o padrão e o sulfato de amónio com solução de ácido 0,1N até ao ponto de pH $4,4 \pm 0,1$, medido por potenciómetro.

Nota: Se o volume da solução de ácido (5.2.5) gasto na titulação do branco de destilação for superior a 0,30 mL, repetir o ciclo de limpeza da unidade de destilação e confirmar o valor da titulação do branco.

Resultados

Teor de azoto expresso em gramas por 100 g ou 100 ml de amostra.

O teor de azoto total da amostra, expresso em percentagem, é:

$$\frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m \text{ ou } V}$$

Sendo:

V_1 o volume, em mililitros, da solução de ácido 0,1 N (5.2.5) gasto na titulação da amostra; V_0 o volume, em mililitros da solução de ácido 0,1 N (5.2.5) gasto na titulação do branco de destilação;

m a massa, em gramas, da toma de amostra;

v o volume, em mililitros, da toma de amostra.

O teor de proteína total obtém-se multiplicando a percentagem de azoto pelo factor 5,7 para cereais, 6,38 para leites e produtos lácteos e 6,25 para os restantes produtos.

Apresentação dos Resultados

Os resultados são apresentados com aproximação às centésimas para o azoto e com aproximação às décimas para a proteína.