

Daniela de Jesus Santos Silva

**Qualidade microbiológica de sementes
edíveis e derivados ao longo do período de
armazenamento**



2018

Daniela de Jesus Santos Silva

**Qualidade microbiológica de sementes
edíveis e derivados ao longo do período de
armazenamento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas



2018

Qualidade microbiológica de sementes edíveis e derivados ao longo do período de armazenamento

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Daniela de Jesus Santos Silva)

©2018 Daniela de Jesus Santos Silva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

No término desta etapa, quero manifestar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que cooperaram, direta ou indiretamente, na sua concretização. O percurso nem sempre foi fácil, mas houve sempre alguém que o tornasse um pouco menos difícil, e essas pessoas merecem umas palavras de agradecimento que aqui registro.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Célia Quintas, por me ter proporcionado a oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação dada, por toda a simpatia, carinho e motivação constante. O meu muito obrigado por todos os conhecimentos transmitidos, não só nesta etapa importante, mas em todo o meu percurso académico. Estou-lhe sinceramente grata por sempre ter acreditado em mim.

À Engenheira Neusa, por todo o apoio, companheirismo, motivação e apoio prestados ao longo de todo o trabalho, muito obrigada por toda a partilha de conhecimentos e técnicas laboratoriais.

Agradeço a todas as Técnicas Superiores do Departamento de Engenharia Alimentar, às Engenheiras Vera Gonçalves, Clarisse Ramalho e Vera Francisco por toda a colaboração e boa disposição diária, proporcionando um bom ambiente de trabalho. Um grande obrigado à Luísa Silva, por todo o apoio dado ao longo deste tempo. A todas, o meu sincero agradecimento.

À Fatma Çelik, à Beatriz Magali, à Chaiane Quevedo, à Doutora Ana Margarida e à Patrícia Cabral, que contribuíram bastante para este trabalho, com toda a entreeajuda e boa disposição demonstradas ao longo do tempo.

A todos os meus amigos, em especial ao Marcelo Gordinho, ao Rui Valero, à Beatriz Silva, à Marta Costa, ao Tiago Candeias e ao Miguel Anjinho, que sempre me apoiaram e motivaram durante o período em que decorreu este trabalho (e não só).

Ao Pedro Conceição agradeço todo o carinho, paciência, compreensão e apoio constantes. Graças a tudo isto, consegui chegar até aqui de uma forma muito mais segura e com um amparo incalculável. Agradeço também aos seus pais, à Filomena e ao Célio Conceição, por todo apoio e motivação.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão por todo o incentivo e amor incondicional que sempre me deram ao longo de toda a minha vida, e nesta fase não foi exceção. Sem eles nada do que alcancei até hoje seria possível. O meu eterno obrigada por me terem transformado no que sou hoje e por me terem ajudado a ser lutadora e persistente.

Sem todos vós nada disto, que tanto significa para mim, seria possível. Um sincero e humilde obrigada!

Resumo

No presente trabalho estudou-se a qualidade microbiológica das sementes de sésamo, de linhaça, de chia, de abóbora, de girassol, de farinha de sementes de linhaça e mistura de sementes, comercializadas no Algarve, através da contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (MAM), fungos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e da pesquisa de *Salmonella* spp.. Estudou-se também as populações de MAM e Fungos Filamentosos e Leveduras (FFL) nas sementes de sésamo e linhaça e na farinha de linhaça, em diversas condições de acondicionamento (embalamento e temperatura), durante 11 meses. As sementes com um nível médio de MAM mais elevado foram as de linhaça ($1,3 \times 10^6$ UFC/g) seguidas da farinha de linhaça ($1,1 \times 10^6$ UFC/g) e as que revelaram um nível mais baixo foram as de chia ($2,9 \times 10^4$ UFC/g). Estas sementes continham valores médios mais baixos de Fungos Filamentosos ($9,8 \times 10^2$ UFC/g) enquanto nas de girassol foram enumerados os níveis mais altos ($1,7 \times 10^5$ UFC/g). A farinha de linhaça apresentou as contagens mais elevadas de leveduras ($1,5 \times 10^4$ UFC/g). As sementes de linhaça biológica apresentaram níveis de MAM e FFL superiores às não biológicas, e o mesmo se verificou com as farinhas destas sementes. O acondicionamento de sésamo, linhaça e farinha de linhaça a 10 e 20 °C resultou em alterações ligeiras dos MAM e FFL. A 40 °C, estas populações microbianas diminuíram nas sementes de sésamo, linhaça e na farinha de linhaça (biológicas e não biológicas) durante os primeiros meses de acondicionamento. Não foram detetados estafilococos, *E. coli* e *Salmonella*, permitindo concluir que as amostras respeitavam os critérios microbiológicos da União Europeia. Algumas amostras apresentaram níveis microbiológicos que justificam a sua classificação como “Não Satisfatórias”, de acordo com os valores guia, alertando para a necessidade de melhorar as práticas agrícolas, de processamento e de armazenamento/distribuição das sementes edíveis e derivados assim como para a necessidade de implementar técnicas adequadas de descontaminação.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica de sementes edíveis, sésamo, linhaça, chia, girassol, abóbora

Abstract

In the present work, the microbiological quality of sesame, flaxseed, chia, pumpkin and sunflower seeds, as well as flaxseed flour and a mix of seeds, marketed in the Algarve, were studied through the counting of aerobic mesophilic microorganisms (MAM), fungi, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positive, and the detection of *Salmonella* spp.. The MAM, filamentous fungi and yeast (FFY) populations were also studied in sesame, flaxseed and flaxseed flour under various conditions (packaging and temperature) for 11 months. The seeds with the highest mean level of MAM was flaxseed ($1,3 \times 10^6$ UFC/g) followed by flaxseed flour ($1,1 \times 10^6$ UFC/g) while the lowest level was found in chia ($2,9 \times 10^4$ UFC/g). These seeds contained also the lowest mean values of filamentous fungi ($9,8 \times 10^2$ CFU/g) whereas those of sunflower had the highest levels ($1,7 \times 10^5$ CFU/g). Flaxseed flour had the highest yeast counts ($1,5 \times 10^4$ UFC/g). The biological flaxseed contained higher levels of MAM and FFY than the non-organic ones, and the same occurred with the flours of these seeds. The storage of sesame, flaxseed and linseed flour at 10 and 20 °C resulted in slight changes of MAM and FFY. At 40 °C, these microbial populations decreased in sesame, flaxseed and flaxseed flour (biological and non-biological) during the first months of packaging. Staphylococci, *E. coli* and *Salmonella* were not detected, allowing to conclude that the samples complied with the microbiological criteria of the European Union. Some samples presented microbiological levels that justify their classification as "Not Satisfactory", according to the guideline values, alerting to the need of improving agricultural practices, processing and storage/distribution of edible seeds and derivatives, as well as the necessity of implementing adequate decontamination techniques.

Keywords:

Microbiological quality of edible seeds, sesame, flax, chia, sunflower, pumpkin

Índices

Índice Geral

1. <i>Introdução</i>	1
1.1. Fontes de contaminação de alimentos de origem vegetal.....	4
1.2. Sementes estudadas	6
1.2.1. Sementes de sésamo.....	6
1.2.2. Sementes de linhaça.....	7
1.2.3. Sementes de chia.....	9
1.2.4. Sementes de abóbora	10
1.2.5. Sementes de girassol.....	11
1.2.6. Valor nutricional das sementes estudadas	12
1.3. Parâmetros microbiológicos	13
1.3.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C).....	13
1.3.2. Fungos Filamentosos e Leveduras	13
1.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.3.4. <i>Escherichia coli</i>	16
1.3.5. <i>Salmonella</i> sp.....	18
1.4. Surtos associados às sementes edíveis	19
2. <i>Metodologia</i>	21
2.1. Amostras.....	23
2.2. Parâmetros microbiológicos	24
2.2.1. Quantificação de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C).....	25
2.2.2. Quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduras.....	25
2.2.3. Quantificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	25
2.2.4. Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	26
2.3. Confirmações bioquímicas	27
2.4. Determinação de atividade de água (aw).....	27
3. <i>Resultados e discussão</i>	29
3.1. Estudo da qualidade de sementes edíveis e derivados comercializados em Faro	31
3.2. Determinação de atividade de água (aw).....	41
3.3. Estudo da qualidade de sementes edíveis e derivados ao longo do tempo de armazenamento.....	43
3.3.1. Sementes de sésamo.....	43
3.3.2. Sementes de linhaça resultantes de agricultura biológica vs. Sementes de linhaça resultantes de agricultura convencional	47
3.3.3. Farinha de sementes de linhaça biológica vs. Farinha de sementes de linhaça não biológica	50
4. <i>Conclusão</i>	55
5. <i>Perspetivas de trabalho futuro</i>	59
6. <i>Referências bibliográficas</i>	63

Índice de Figuras

Figura 1.1. - Principais fontes de microrganismos patogénicos humanos em alimentos de origem vegetal.....	5
Figura 1.2. - Sementes de sésamo.....	6
Figura 1.3. - Sementes de linhaça castanha.....	7
Figura 1.4. - Esquema do crescimento da linhaça até à obtenção da semente.....	8
Figura 1.5. - Sementes de chia.....	9
Figura 1.6. - Mucilagem de sementes de chia.....	10
Figura 1.7. - Sementes de abóbora.....	10
Figura 1.8. - Sementes de girassol.....	11
Figura 2.1. - Esquema de condições de acondicionamento (embalamento e temperatura) das sementes estudadas.....	24
Figura 3.1. – Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 10 °C.....	44
Figura 3.2. - Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 20 °C.....	45
Figura 3.3. - Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 40 °C.....	46
Figura 3.4. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 10 °C.....	47
Figura 3.5. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 20 °C.....	48
Figura 3.6. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 40 °C.....	49
Figura 3.7. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 10 °C.....	50
Figura 3.8. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 20 °C.....	51
Figura 3.9. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 40 °C.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. – Composição nutricional das sementes estudada.....	12
Tabela 1.2. – Fontes de contaminação das diferentes estirpes de <i>E. coli</i> e respectivos grupos vulneráveis a contaminação e sintomas.....	17
Tabela 2.1. – Amostras de sementes edíveis estudadas.....	23
Tabela 2.2. – Testes bioquímicos para os microrganismos patogênicos em estudo.....	27
Tabela 3.1. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.....	31
Tabela 3.2. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.....	32
Tabela 3.3. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.....	32
Tabela 3.4. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.....	33
Tabela 3.5. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.....	34
Tabela 3.6. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.....	34
Tabela 3.7. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.....	35
Tabela 3.8. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.....	35
Tabela 3.9. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.....	36
Tabela 3.10. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) de sementes edíveis e derivados nos três anos de análise.....	37
Tabela 3.11. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes e derivados nos três anos de análise.....	37
Tabela 3.12. – Leveduras (UFC/g) em sementes e derivados nos três anos de análise...38	
Tabela 3.13. - Valores Guia da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo, ao natural, grupo 3: Saladas / vegetais / frutos crus.....	39
Tabela 3.14. - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de MAM.....	39
Tabela 3.15. - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de Fungos Filamentosos.....	40
Tabela 3.16 - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de leveduras.....	41
Tabela 3.17 - Atividade de água (a_w) nas sementes estudadas em 2018.....	41

Lista de Abreviaturas

ATP	Água Peptonada Tamponada (meio líquido de pré-enriquecimento)
aw	Atividade de água
BP	Baird Parker Base Agar + Emulsão de ovo + Solução de Telurito (meio de cultura para contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>)
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chlorofenicol (meio de cultura para contagem de bolores e leveduras)
FFL	Fungos Filamentosos e Leveduras
FSAI	Food Safety Authority of Ireland
ISO	International Organization for Standardization (organização internacional de normalização)
MAM	Microrganismos Aeróbios Mesófilos
PCA	Plate Count Agar (meio de cultura para contagem total de microrganismos)
SR	Solução de Ringer (solução de diluição)
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
TBX	Chromocult Triptone Bile X-glucuronide Agar (meio de cultura para contagem de <i>Escherichia coli</i>)
TSYEA	Tryptone Soya Yeast Extrat Agar
UFC/g	Unidade Formadora de Colónias por grama
XLD	Xylose Lisine Deoxycholate Agar (meio de cultura seletivo para <i>Salmonella</i> spp.)

1. Introdução

1. Introdução

As sementes edíveis, nos dias de hoje, são cada vez mais consumidas devido aos inúmeros benefícios para a saúde que lhes são atribuídos, e também pela conveniência de serem um produto pronto a comer, podendo ser ingeridos como *snack* (Unicomb et al., 2005). São equiparadas aos frutos secos, devido aos processos de produção e composição físico-química serem similares (FSAI, 2012). As sementes trazem cor e sabor, para além de nutrientes essenciais a uma enorme variedade de pratos, que podem incluir os *snacks*, bebidas, pequenos-almoços, saladas, sobremesas, entre outros (Edgson and Thomas, 2017).

As sementes são “embriões de plantas, onde existem óvulos fertilizados, que contêm toda a informação necessária para formar e sustentar uma nova planta dando origem à geração seguinte” (Edgson and Thomas 2017).

Para além do consumo humano tem também surgido um grande interesse no cultivo de algumas sementes oleaginosas (sésamo e linhaça), devido à sua potencial utilização como biocombustíveis, como substitutos de produtos petrolíferos (Morgan et al., 2010).

De acordo com alguns autores (Coates and Ayerza, 1998; Cooney et al., 2001), o aumento do consumo das sementes edíveis está inversamente associado com o surgimento de doenças crónicas, como o cancro e doenças cardíacas. Esta associação tem sido explicada pelo facto de nestes alimentos existirem compostos com atividade hipocolesterolémica, os quais contribuem para a proteção de doenças cardiovasculares. Alguns autores têm também medido níveis elevados de agentes antioxidantes nas sementes (Ganorkar and Jain, 2013). Nutricionalmente são uma ótima fonte de proteínas, fibras e gordura, e estão entre as fontes vegetais mais ricas em ácido α -linoleico, sendo este aproximadamente 60% do teor total de ácidos gordos das sementes (Tamber et al., 2016). As sementes, devido à sua baixa atividade de água (a_w), são consideradas microbiologicamente seguras, apesar de ainda não haver muitos dados publicados sobre a sua qualidade microbiológica (FSAI, 2012).

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da qualidade microbiológica de sementes edíveis e derivados (farinha de linhaça) comercializados no Algarve.

Para concretizar o objetivo geral, foram delineados objetivos específicos, nomeadamente:

- A) Estudar a qualidade microbiológica das sementes edíveis e derivados comercializados nos supermercados e mercados de Faro (sementes de sésamo, de linhaça, de chia, de abóbora, de girassol, mistura de sementes e farinha de sementes de linhaça), através da contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C), de Fungos Filamentosos e Leveduras, de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus* coagulase positiva e da pesquisa de *Salmonella* sp..

- B) Estudar a qualidade microbiológica de sementes de sésamo e de linhaça e de farinha de sementes de linhaça, em diversas condições de acondicionamento (embalamento e temperaturas), através da contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C), de Fungos Filamentosos e Leveduras, ao longo de 11 meses.

1.1. Fontes de contaminação de alimentos de origem vegetal

Existem sementes edíveis de várias espécies, sendo estas cultivadas em todo o mundo, em diferentes condições climáticas e ambientais. Estes produtos alimentares são cultivados, colhidos, limpos e classificados mecanicamente de forma similar aos cereais (Willis et al., 2009). Em algumas situações são submetidos a processos de secagem, tais como as sementes de girassol.

A colonização microbiana nos alimentos de origem vegetal, incluindo as sementes, é afetada pelas práticas e condições que ocorrem durante a pré-colheita, colheita e pós-colheita/processamento. Durante a fase de pré-colheita as plantas em crescimento são suscetíveis a uma ampla gama de fontes de contaminação microbiana, como por exemplo: solo, excrementos de animais e água de irrigação, resumidos na Figura 1.1 (Quintas, 2011).

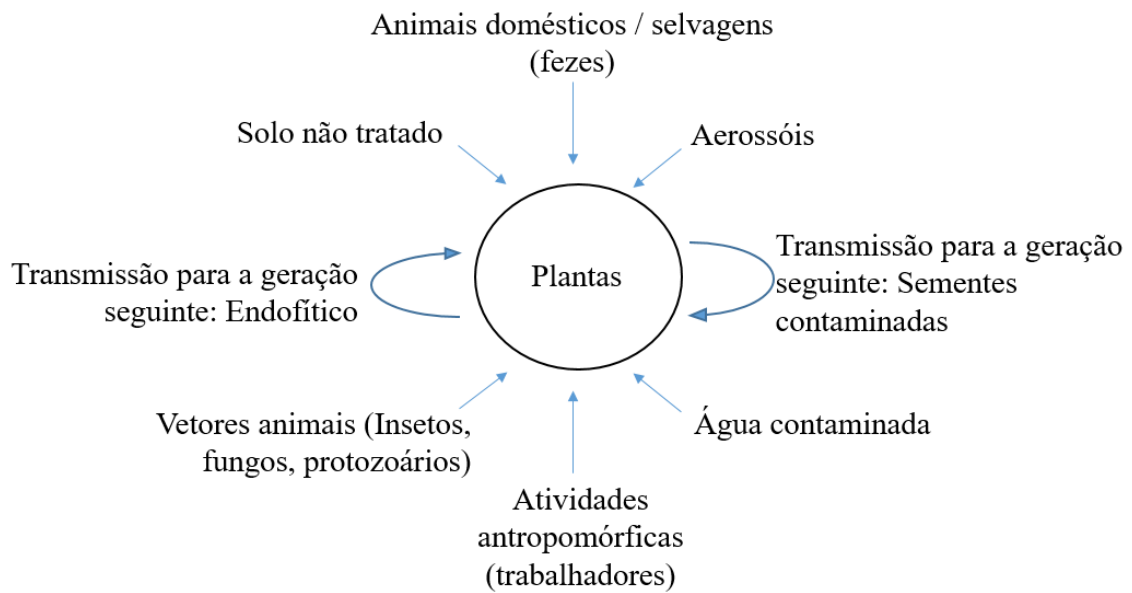


Figura 1.1. - Principais fontes de microrganismos patogênicos humanos em alimentos de origem vegetal (adaptado de Quintas, 2011).

No decorrer da colheita, existem agentes que causam doenças transmitidas por alimentos, que podem contaminar os produtos de origem vegetal. A colheita inclui várias fases, tais como a colheita propriamente dita, a classificação, o acondicionamento e o transporte, e, nestas etapas podem ser introduzidos agentes microbianos contaminantes através de contaminações cruzadas resultantes dos equipamentos de colheita, contentores, veículos de transporte e trabalhadores (Quintas, 2011).

Na fase de pós-colheita, os exemplos de possíveis fontes de contaminação são: a matéria-prima, a falta de higiene nos materiais e equipamentos e ainda a falta de higiene dos manipuladores (Quintas, 2011). As operações de redução de dimensão são também responsáveis pelo aumento da contaminação microbiana nos derivados de sementes, quando submetidos a moagem ou outra operação de redução de dimensão.

1.2. Sementes estudadas

1.2.1. Sementes de sésamo

O sésamo (*Sesamum indicum* L.) é uma planta herbácea cultivada anualmente devido às sementes comestíveis que produz, sendo estas consideradas como a “Rainha das sementes oleaginosas” devido ao seu alto grau de resistência à oxidação e rancidez (Pathak et al., 2014). Esta planta é cultivada em áreas arenosas e profundas, bem drenadas e férteis, com precipitação anual de 625 a 1100 mm, com temperaturas superiores a 27 °C. É uma planta que tolera secas e que não consegue crescer com chuvas abundantes ou regas excessivas (Terefe et al., 2012). É originária da Índia, uma vez que este país possui a variabilidade máxima dos recursos genéticos da semente (Pathak et al., 2014). No entanto, os principais produtores de sésamo são a Índia, Myanmar, China e o Sudão com 68% da produção mundial (Prasad et al., 2012).

As sementes de sésamo (Figura 1.2.) são consumidas de várias formas, ao natural em saladas, na composição de vários alimentos, como por exemplo na pastelaria, prensadas, em pasta e em óleo extraído das mesmas (Prasad et al., 2012)



Figura 1.2. - Sementes de sésamo. (Foto de Daniela Santos Silva)

Estas sementes são uma ótima fonte de compostos nutricionais com vários benefícios, incluindo a promoção da saúde humana (Pathak et al., 2014). Os orientais consideram o sésamo, desde há muitos anos, como um “alimento saudável” que fornece muita energia e previne o envelhecimento. Devido à sua variabilidade genética, as sementes de sésamo apresentam várias cores (castanho claro, castanho escuro, branco, cinzento, preto) (Prasad et al., 2012).

O óleo de sementes de sésamo possui propriedades antibacterianas em relação a microrganismos patogênicos comuns da pele, tais como bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, assim como propriedades antifúngicas contra espécies presentes na pele, como por exemplo os dermatomicetes causadores do “Pé de atleta” (Pathak et al., 2014).

As sementes de sésamo contêm um importante grupo de polifenóis encontrados nas plantas, os linhanos, que possuem uma capacidade antioxidante relevante. A sesamina (0,4 a 1,1%) e a sesamolina (0,3 a 0,6%) são dois exemplos destes compostos (Prasad et

al., 2012). Este grupo de polifenóis contribuem para a prevenção de doenças degenerativas, do cancro, de doenças cardiovasculares, de aterosclerose e ainda do processo de envelhecimento (Pathak et al., 2014).

Já foram reportados alguns casos de surtos relacionados com sementes de sésamo e derivados. Segundo uma investigação de Unicomb et al. (2005) três das amostras de sementes de sésamo recolhidas no Canadá e uma do Reino Unido estavam contaminadas com *Salmonella* sp., o que constitui uma preocupação uma vez que se tratam de produtos com um prazo de validade elevado e cuja distribuição pode ser longa.

1.2.2. Sementes de linhaça

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma planta herbácea cultivada anualmente (Kislev et al., 2011), com floração azul que, após secar, dá origem às sementes de linhaça em forma de cápsulas de forma plana e oval (Figura 1.3.). É uma planta que pode atingir dimensões entre os 40 a 91 cm, dependendo da variedade (Flax Council of Canada, n.d.).

Esta planta é nativa do este da Ásia e do Mediterrâneo. Acredita-se que seja cultivada desde há 5000 a.C. devido à grande concentração de fibras de linho (Ganorkar and Jain, 2013).



Figura 1.3. - Sementes de linhaça castanha
(Foto de Daniela Santos Silva)

Relativamente à cor das sementes de linhaça, esta pode variar entre castanho-escuro a amarelo, dependendo do estado de maturação (Figura 1.4.) (Flax Council of Canada, n.d.) e da quantidade de pigmentos presente, uma característica que pode ser alterada através de práticas normais de reprodução da planta (Ganorkar and Jain, 2013).



Figura 1.4. - Esquema do crescimento da linhaça até à obtenção da semente: 1 – Cotilédone; 2 – Ponto de crescimento emergente; 3 – primeiro par de folhas; 4 – começo das folhas em espiral; 5 – extensão do pedúnculo; 6 – aparecimento dos primeiros botões de flores; 7 – primeira floração com ramificação antecipada; 8 – floração completa com o começo da formação das cápsulas e continuação da ramificação; 9 – floração tardia com a formação das cápsulas completa; 10 – cápsulas verdes com sementes brancas; 11 – cápsulas castanhas com sementes amarelas; 12 – Cápsula totalmente seca com sementes maduras e castanhas. (Adaptado de Flax Council of Canada).

Existe um mercado emergente crescente de sementes de linhaça para consumo humano, uma vez que são uma ótima fonte de ácidos gordos ómega-3 e de linhanos anticancerígenos. Podem ser consumidas inteiras e ao natural, incluindo na panificação. O seu óleo é muito apreciado resultando a sua extração num rendimento de 36 a 41% de óleo baseado em peso seco (Morgan et al., 2010).

As proteínas das sementes de linhaça são relativamente ricas em arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico, sendo estas muito eficazes na redução do colesterol plasmático e dos triglicéridos. Relativamente às fibras presentes nestas sementes, elas contribuem para a redução do risco de doenças cardíacas, diabetes, cancro colorretal, obesidade e inflamações (Ganorkar and Jain, 2013).

Tal como as sementes de sésamo, as sementes de linhaça contêm linhanos. O diglucosido de secoisolariciresinol é o linhano predominante e o pinoresinol e o matairesinol estão presentes em menores quantidades, contribuindo assim, para a atividade antioxidante e anticancerígena das sementes de linhaça (Ganorkar and Jain, 2013).

Estas sementes possuem altas concentrações de dois ácidos gordos polinsaturados essenciais (que não podem ser produzidos pelo corpo humano) ácido linoleico (ómega-6) e ácido α -linolénico (ómega-3) (Kislev et al., 2011). Este último corresponde a 23% da composição nutricional das sementes de linhaça (Ganorkar and Jain, 2013).

Em 2014, a *Health Canada* considerou que existe uma relação entre a ingestão de sementes de linhaça (inteiras ou moídas) com a redução dos níveis de colesterol no sangue, diminuindo assim o risco de doenças cardíacas (Flax Council of Canada, n.d.). Em contrapartida, as sementes de linhaça possuem cianeto de hidrogénio. A dose diária recomendada destas sementes é de 1 a 3 colheres de sopa o que corresponde a, aproximadamente, 5 a 10 mg de cianeto de hidrogénio, quantidade muito abaixo da dose tóxica aguda estimada para um adulto. A torrefação das sementes contribui para diminuir a concentração ou eliminar os glicosídeos cianogénicos (Ganorkar and Jain, 2013).

A farinha de linhaça é um subproduto das sementes, tal como o óleo, tendo esta uma qualidade elevada, sendo usada muitas vezes como suplemento proteico. Este derivado contém aproximadamente 35% de proteínas e 3% de óleo (Morgan et al., 2010) e um valor de a_w aproximado de 0,21 (Tamber et al., 2016).

1.2.3. Sementes de chia

São conhecidas muitas espécies herbáceas produtoras de chia, sendo a mais conhecida a *Salvia hispanica L.* (Ixtaina et al., 2008). As plantas produtoras de chia, no geral, são plantas que precisam de pouca água e que se adaptam muito bem a climas áridos (Weber et al., 1991). Estas plantas produzem sementes pequenas, brancas e pretas, ainda que nos últimos tempos, as sementes de cor branca tenham vindo a escassear (Ixtaina et al., 2008) e são cultivadas anualmente (Coates and Ayerza, 1998). Hoje em dia, os principais países produtores de chia são o México, a Bolívia, a Argentina, o Equador e a Guatemala (Ixtaina et al., 2008).

As sementes de chia (Figura 1.5.), para além de possuírem antioxidantes lipídicos (Taga et al., 1984), têm dois componentes importantes para duas indústrias distintas: o óleo para a indústria cosmética; e o ácido α -linolénico (ómega-3) para a indústria alimentar (Coates and Ayerza, 1998).



Figura 1.5. - Sementes de chia (Foto de Daniela Santos Silva)

As sementes de chia, bem como a sua farinha, são ricas em proteínas e fibras e podem ser usadas tanto para alimentação humana como para alimentação animal (Coates and Ayerza, 1998).

Durante anos, as sementes de chia foram consumidas ao natural ou secadas. No entanto, estas sementes quando embebidas em água formam um gel, rico em polissacarídeos mucilaginosos em volta da semente (Figura 1.6.). As espécies *Salvia caduacea* e



Figura 1.6. - Mucilagem de sementes de chia. (Fonte: <http://falecomanutricionista.com.br/para-que-serve-a-chia/>)

Hyptis suaveolens possuem uma elevada capacidade de produção deste gel, pelo que são potenciais agentes espessantes industriais (Weber et al., 1991).

1.2.4. Sementes de abóbora

A abobreira pertence à família botânica *Cucurbitaceae*. É uma planta herbácea de crescimento rasteiro ou trepador, com ramos que podem crescer até aos 6 metros. Desenvolve-se bem em regiões quentes, secas e não toleram geadas, sendo cultivadas durante todo o ano (Sales et al., 2015).

As abóboras, *Cucurbita* sp., podem variar relativamente à sua forma, coloração (tanto externa como interna), tamanho, firmeza, teor de amido, teor de matéria seca, capacidade de armazenamento e sabor (Sales et al., 2015). Este vegetal é rico em carotenoides, ferro, cálcio, magnésio, potássio, fibras, vitaminas B e C, e bioflavonoides (Lemes et al., 2010), e foi recentemente reconhecido como alimento funcional (Montesano et al., 2018).

As sementes de abóbora (Figura 1.7.), que normalmente seriam consideradas como resíduos agro industriais, são uma fonte muito rica em compostos bioativos com propriedades nutricionais muito interessantes. Vários estudos destacam as características do óleo destas sementes na prevenção de algumas doenças, nomeadamente a hipertensão, diabetes e cancro, tendo capacidades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Montesano et al., 2018).



Figura 1.7. - Sementes de abóbora. (Foto de Daniela Santos Silva)

Podem ser consumidas de várias formas, tendo estas sementes vários derivados: sementes ao natural, torradas, germinadas e fermentadas (El-Soukkary, 2001).

Podem ser utilizadas como fonte de óleos e de concentrados proteicos para consumo humano e também para consumo animal (Lazos, 1986). Estas sementes podem ser usadas como fontes de fibra alimentar, e, devido ao seu alto teor de ácidos gordos insaturados, os óleos extraídos destas podem substituir óleos altamente insaturados como por exemplo, o óleo de milho (Lazos, 1986). Estas sementes são removidas da abóbora com cerca de 38% de humidade, aproximadamente (Willis et al., 2009).

1.2.5. Sementes de girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é a segunda planta oleaginosa mais cultivada no mundo para obtenção de óleo vegetal, imediatamente a seguir à soja (Gupta and Das, 1997). Este óleo tem características físicas, químicas e nutricionais específicas (Cruvinel et al., 2017; Sen and Bhattacharyya, 2000).

As sementes de girassol (Figura 1.8.) são recolhidas diretamente dos campos de cultivo. Devido à altura dos girassóis, estes tendem estar menos contaminados que outras culturas mais baixas e, conseqüentemente, mais próximas do solo (Willis et al., 2009).

Quando são colhidas, as sementes de girassol têm um teor de humidade que pode ir até aos 20%. Posteriormente a humidade é reduzida até, pelo menos, 10%, antes do descasque mecânico (Willis et al., 2009).

Estas sementes são uma fonte de proteínas vegetais, porém a sua utilização para a preparação de concentrados proteicos para produtos alimentares é limitada devido à presença ácido clorogénico e fibras (Sen and Bhattacharyya, 2000).



Figura 1.8. - Sementes de girassol. (Foto de Daniela Santos Silva)

Estas sementes contêm alto teor de fitoesteróis, que estão naturalmente presentes nas plantas. Durante a última década, desenvolveram-se estudos nesta área, devido aos potenciais benefícios dos fitoesteróis para a saúde humana, como a redução do colesterol de baixa densidade (LDL) (Roche et al., 2010).

1.2.6. Valor nutricional das sementes estudadas

A composição nutricional das sementes edíveis pode variar de acordo com as variedades genéticas, o ambiente de crescimento, o tratamento aplicado às sementes e o método de análise utilizado (Ganorkar and Jain, 2013). A energia fornecida pelas sementes também varia conforme a espécie (Weber et al., 1991).

Na Tabela 1.1. são apresentadas as composições nutricionais das cinco sementes estudadas, disponíveis na base americana de dados nutricionais, United States Department of Agriculture (USDA, acessado a 22/11/2018).

Tabela 1.1. – Composição nutricional das sementes estudadas, adaptado da base de dados USDA (acessado a 22/11/2018).

Nutrientes	Valor nutricional das sementes, por 100 g					
	Sésamo	Linhaça	Chia	Abóbora	Girassol	
Água	4,96 g	6,96 g	5,80 g	4,50 g	4,73 g	
Energia	573 kcal	534 kcal	486 kcal	446 kcal	584 kcal	
Proteína	17,73 g	18,29 g	16,54 g	18,55 g	20,78 g	
Lípidos totais	46,67 g	42,16 g	30,74 g	19,40 g	20,78 g	
Hidratos de carbono	23,45 g	28,88 g	42,12 g	53,75 g	51,46 g	
Fibras	11,80 g	27,30 g	34,40 g	18,40 g	20,00 g	
Açúcares totais	0,30 g	1,55 g	*	*	8,6 g	
Lípidos	Ácidos gordos saturados	6,96 g	3,67 g	3,33 g	3,67 g	4,46 g
	Ácidos gordos monoinsaturados	18,76 g	7,53 g	2,31 g	6,03 g	18,23 g
	Ácidos gordos polinsaturados	21,78 g	28,73 g	23,67 g	8,84 g	23,14 g
Minerais	Cálcio	975 mg	255 mg	631 mg	55 mg	78 mg
	Ferro	14,55 mg	5,73 mg	7,72 mg	3,31 mg	5,25 mg
	Magnésio	351 mg	392 mg	335 mg	262 mg	325 mg
	Fósforo	629 mg	642 mg	860 mg	92 mg	660 mg
	Potássio	468 mg	813 mg	407 mg	919 mg	645 mg
	Sódio	11 mg	30 mg	16 mg	2541 mg	9 mg
Vitaminas	Tiamina	0,79 mg	1,64 mg	0,62 mg	0,03 mg	1,48 mg
	Riboflavina	0,25 mg	0,16 mg	0,17 mg	0,05 mg	0,36 mg
	Niacina	4,52 mg	3,08 mg	8,83 mg	0,29 mg	8,34 mg
	Vitamina B6	0,79 mg	0,47 mg	*	0,04 mg	1,35 mg

* - Valores não disponíveis

1.3. Parâmetros microbiológicos

1.3.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C)

Os microrganismos que se multiplicam a 30 °C são denominados de microrganismos mesófilos. Apesar da sua temperatura ótima variar entre os 30 e os 40 °C, eles conseguem crescer bem em temperaturas amenas, com uma amplitude entre os 20 e os 45 °C (Jay et al., 2005; Ferreira et al., 2010). Estes são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos e terrestres de zonas temperadas e tropicais (Ferreira et al., 2010), mas também em humanos e animais. Neste grupo de microrganismos incluem-se muitos dos microrganismos patogênicos alimentares mais comuns como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* (Adams et al., 2016) e *Escherichia coli* (Ferreira et al., 2010).

1.3.2. Fungos Filamentosos e Leveduras

Os fungos são organismos eucariotas, não fotossintéticos, pois não possuem clorofila, e são quimo-heterotróficos que se reproduzem sexuadamente ou assexuadamente. Alguns fungos podem invadir outros organismos, como o ser humano, mantendo uma relação parasitária, em que obtêm os nutrientes que necessitam a partir dos tecidos do hospedeiro. Os fungos podem ser subdivididos em duas grandes categorias: Fungos Filamentosos, popularmente conhecidos como bolores, e leveduras. Estes microrganismos desenvolvem-se bem em meios de pH ácido (Gava et al., 2009) e são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica interferindo com o ciclo do carbono, azoto e outros nutrientes da biosfera. Desde há muito tempo que é conhecido o grande poder patogênico dos fungos sobre os vegetais, sendo uma causa de grandes prejuízos na economia. No entanto, têm também inúmeras aplicações na indústria, nomeadamente nos processos industriais de fermentação (pão, cerveja, vinho e alguns queijos), na produção de ácidos orgânicos, em alguns fármacos como, por exemplo, alguns antibióticos com penicilina (Ferreira et al., 2010).

Os Fungos Filamentosos crescem rapidamente e podem ocupar vários centímetros em 2 ou 3 dias (Jay et al., 2005). Estes organismos são constituídos por hifas, que se ramificam formando o micélio (Jay et al., 2005; Gava et al., 2009), que tem como funções a fixação do fungo ao substrato (como os alimentos) e a reprodução (incluindo a produção

de esporos). Estes microrganismos podem encontrar-se no solo, nos vegetais, nos animais, no ar e na água (Gava et al., 2009).

A maior parte dos bolores são aeróbios, limitando o seu crescimento apenas à superfície dos alimentos. As suas temperaturas ótimas de crescimento rondam os 20 a 30 °C, apesar de muitas espécies se conseguirem adaptar à temperatura de refrigeração e multiplicarem-se em ambientes com um valor de a_w de cerca de 0,8. (Gava et al., 2009).

Um dos maiores problemas dos Fungos Filamentosos nos alimentos é a produção de micotoxinas por parte de muitas das suas espécies. Estas toxinas podem ser mutagénicas, carcinogénicas e podem apresentar toxicidade para órgãos específicos (Jay et al., 2005; Arroyo-Manzanares et al., 2013). Podem causar distúrbios gastrointestinais, renais e, algumas, podem ser imunossupressoras, reduzindo assim a resistência a doenças infecciosas (Arroyo-Manzanares et al., 2013). Estas toxinas são metabolitos secundários, produzidos apenas no final da fase de crescimento exponencial e caso tenha havido acumulação de metabolitos primários, como aminoácidos, acetato e piruvato. Conhecem-se pelo menos 14 micotoxinas caracterizadas como cancerígenas, sendo as aflatoxinas as mais perigosas (Jay et al., 2005). As sementes são bastante suscetíveis ao crescimento de Fungos Filamentosos e, conseqüentemente, de micotoxinas. Nos últimos anos têm havido alguns estudos que revelam alta contaminação de micotoxinas e Fungos Filamentosos nas sementes edíveis (Arroyo-Manzanares et al., 2013). Isto é refletido no elevado número de alertas lançados pelo *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) nos seus relatórios anuais. Entre 2017 e 2018, registaram-se 4 casos de sementes edíveis com valores de aflatoxinas elevados: 2 alertas na Alemanha, sendo um de sementes de chia orgânica com origem na Áustria e outro de sementes de girassol vindas da Turquia; e 2 informações para atenção na Bélgica, uma em março e outra em maio de 2017, ambos sobre sementes de girassol exportadas do Egipto. Em 2012, Portugal fez uma rejeição na fronteira de sementes de girassol importadas do Egipto, pela alta contaminação de aflatoxinas (RASFF, acedido a 23/11/2018). A atual legislação de segurança alimentar da União Europeia (UE) regula a contaminação de micotoxinas em frutos secos e sementes, legislando apenas as aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), através do Regulamento (UE) 165/2010.

Para além do problema da formação de micotoxinas em sementes oleaginosas, várias espécies de fungos têm uma forte atividade lipolítica, levando ao aparecimento de ácidos

gordos livres nos óleos, que podem sofrer oxidação, contribuindo para o aumento da rancidez (Adams et al., 2016).

As leveduras são fungos unicelulares, no entanto, muitas produzem micélios em variados graus, dependendo das condições de crescimento. Tal como os Fungos Filamentosos, as leveduras preferem temperaturas entre os 20 e 30 °C (Gava et al., 2009).

1.3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva, de forma esférica (cocos), que pertence à família *Micrococcaceae* (Fauci et al., 2008). Possui catalases e é considerada aeróbica e anaeróbica facultativa. É uma bactéria patogénica para os humanos, causando várias doenças, como a gastroenterite (Jay et al., 2005; Fauci et al., 2008).

Convencionalmente, no género *Staphylococcus* são considerados dois grupos com base na reação da coagulase: *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo as bactérias muitas vezes patogénicas; e *Staphylococcus* coagulase negativo, que inclui um grupo de bactérias que não apresenta uma reação positiva da coagulase. Estas bactérias são comensais comuns da pele, embora algumas espécies possam causar infeções oportunistas. A coagulase é um marcador enzimático que diferencia as bactérias incluídas na espécie *S. aureus*, ainda que não tenha indicação direta como um fator de virulência (Gandhiraj et al., 2018).

Nos humanos, *S. aureus* tem o seu reservatório na cavidade nasal, e a sua presença não é sinal indicativo de patologia, uma vez que esta bactéria faz parte da microbiota comensal humana (Fauci et al., 2008; Gandhiraj et al., 2018). A partir da cavidade nasal, estes microrganismos conseguem expandir o seu crescimento para a pele e para as feridas, direta ou indiretamente (Jay et al., 2005). Para além da pele e da cavidade nasal, pode-se detetar *S. aureus* nos olhos, garganta e intestino, e é a partir destas fontes que este microrganismo se expande para o ar e para outros meios que podem contaminar os alimentos (Jay et al., 2005). A perigosidade desta bactéria reside no facto de possuir muitas estirpes patogénicas multirresistentes a antibióticos (Ray et al., 2018).

S. aureus consegue crescer a temperaturas entre os 7 e os 47,8 °C, e consegue produzir enterotoxinas entre 10 e 46 °C. Relativamente ao pH, esta bactéria consegue crescer entre os valores 4,0 e 9,8, sendo o seu pH ótimo de crescimentos entre 6 e 7. No que diz respeito

ao a_w , tem a capacidade de crescer em valores mais baixos, quando comparada com outras bactérias não-halofílicas. *S. aureus* consegue multiplicar-se com um a_w mínimo de 0,83 em conjunto com todas as outras condições ótimas, no entanto, o seu a_w mínimo de crescimento não deva ser abaixo dos 0,86 (Jay et al., 2005).

Esta bactéria é responsável pelo desenvolvimento de pneumonias nosocomiais e comunitárias que podem variar entre infeções relativamente pequenas na pele ou nos tecidos moles, até infeções sistémicas, que colocam o doente em risco de vida (Fauci et al., 2008).

De acordo com os Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer (Santos et al., 2005), um alimento é classificado como “Satisfatório” quando *Staphylococcus* coagulase positivo existe numa contaminação inferior a 10^2 UFC/g, “Não Satisfatório” quando o nível de contaminação se situa entre $\geq 10^2 \leq 10^4$ UFC/g e ainda “Inaceitável / Potencialmente Perigoso”, quando os níveis desta bactéria são superiores a 10^4 UFC/g (Santos et al., 2005).

1.3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa, oxidase negativa, em forma de bastonete, da família *Enterobacteriaceae*. É capaz de crescer tanto aerobicamente como anaerobicamente, de preferência a 37 °C e consegue fermentar a lactose (Croxen et al., 2013). Esta bactéria faz parte da microbiota natural de muitos animais, no entanto, as infeções humanas ocorrem, na maior parte das vezes, através do consumo de alimentos contaminados, através do consumo de água contaminada, ou ainda diretamente de pessoa para pessoa (Clements et al., 2012).

Estão descritos seis patotipos de *E.coli* responsáveis por infeções, com base nos seus perfis patogénicos, mais propriamente nos fatores de virulência e na origem da doença provocada: *E. coli* enteropatogénica (EPEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroinvasiva, produtora da toxina Shiga (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC); e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Recentemente foram descobertos mais dois patotipos: *E. coli* invasora aderente, que se pensa estar associada à doença de Crohn, porém não causa infeção diarreogénica (AIEC) e *E. coli* enteroagregativa da toxina Shiga, responsável pelo surto de *E.coli* na Alemanha em 2011 (STEAEC) (Clements et al., 2012; Croxen et al., 2013).

Na Tabela 1.2. estão representados estes grupos, juntamente com as diferentes fontes de contaminação e os sintomas que cada um destes provoca nos humanos.

Tabela 1.2. - Fontes de contaminação das diferentes estirpes de *E. coli* e respetivos grupos vulneráveis a contaminação e sintomas (Adaptado de Fauci et al., 2008; Croxen et al., 2013)

Patotipo	Fonte de contaminação	Grupo vulnerável a contaminação	Sintomas
EPEC	Humanos e animais	Crianças até aos 5 anos Adultos com uma dose infecciosa alta	Diarreia abundante
STEC	Humanos, animais, alimentos e água	Adultos e crianças com dose infecciosa baixa	Diarreia aquosa Colite hemorrágica Síndrome hemolítico urémico
EIEC	Humanos, animais, alimentos e água	Crianças até aos 5 anos, adultos, viajantes, pacientes imunocomprometidos com dose infecciosa baixa ente 10 e 100 UFC	Disenteria Síndrome hemolítico urémico
EAEC	Alimentos, humanos portadores	Adultos e crianças	Diarreia do viajante Síndrome hemolítico urémico Diarreia persistente
ETEC	Alimentos, água, humanos e animais	Crianças até aos 5 anos, viajantes, pacientes imunocomprometidos com dose infecciosa alta ente 10 ⁶ e 10 ⁸ UFC	Diarreia do viajante Diarreia persistente Diarreia aquosa
DAEC	Desconhecido	Adultos e crianças	Diarreia persistente aquosa (crianças) Associada a Doença de Crohn em adultos
AIEC	Desconhecido	Adultos e crianças	Associada a doença de Crohn
EHEC	Alimentos, água e humanos	Adultos e crianças	Colites hemorrágicas Síndrome hemolítico urémico

As principais fontes de contaminação do género *Escherichia* nos alimentos são, o solo, a água, as plantas e seus produtos, os manipuladores de alimentos e o trato gastrointestinal (Jay et al., 2005).

Como já referido anteriormente, a sua temperatura ótima de crescimento é entre os 37 °C, em paralelo com um aw mínimo de 0,96 (Gava et al., 2009). Muitas estirpes conseguem multiplicar-se a temperaturas mais altas, por isso, a ISO 16649-2 de 2001,

normaliza que a temperatura de incubação é a 44°C. No entanto, a estirpe O157:H7 não se consegue desenvolver a temperaturas tão altas (ISO 16649-2 2001).

A presença de *E. coli* num alimento, como as sementes aqui estudadas, é um indicador de higienização deficiente no processamento de alimentos (Wilson et al., 2013) e um indicador de contaminação fecal na água (FSAI, 2012).

De acordo com os Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer (Santos et al., 2005), um alimento é classificado como “Satisfatório” quando *E. coli* existe numa contaminação inferior a 10 UFC/g, “Aceitável” quando o nível de contaminação se encontra entre $>10 <10^2$ e ainda “Não Satisfatório” quando os níveis desta bactéria são superiores a $\geq 10^2$ UFC/g (Santos et al., 2005).

1.3.5. *Salmonella* sp.

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* que integra bactérias Gram-negativas em forma de pequenos bastonetes, que não possuem Citocromo C (oxidase negativa), não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, possuidoras de flagelos (Singleton and Sainsbury, 1987; Fauci et al., 2008). Em geral, não são capazes de fermentar a lactose ou a sacarose, ao contrário da glucose e outros monossacarídeos, produzindo gás (Jay et al., 2005) e ácido. As bactérias deste género são também capazes de reduzir nitratos (Fauci et al., 2008). Atualmente são consideradas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*.

Este género de bactérias apresenta um crescimento adaptado tanto a humanos como a outros animais, causando um amplo espectro de doenças (Fauci et al., 2008). *Salmonella* Thyphi e *Salmonella* Paratyphi são serotipos que afetam apenas os humanos que as hospedarem, causando febre entérica (febre tifóide). Outros serotipos conseguem colonizar o trato gastrointestinal de outros animais (Fauci et al., 2008).

Existem duas fontes de contaminação em alimentos, por *Salmonella*, sendo estes o trato gastrointestinal e a alimentação (Jay et al., 2005; Ferreira et al., 2010).

Salmonella sp. tem uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C e é destruída a temperaturas de pasteurização, o pH ótimo ronda a neutralidade, entre 6,6 e 8,2, sendo o pH máximo de crescimento de 9,0 e o pH mínimo de 4,0 (Jay et al., 2005). O valor mínimo de a_w para o seu crescimento é aproximadamente 0,93 (Adams et al., 2016). Podolak et

al. (2010) reportaram resultados de que a baixa atividade da água e elevadas concentrações lipídicas parecem ter um efeito protetor sobre *Salmonella*. Nascimento et al. (2012) alertaram para o facto de elevadas concentrações de gorduras protegem estas bactérias da acidez gástrica.

As infeções com *Salmonella* começam, em geral, com a ingestão de alimentos ou água contaminada. A dose de infeção é de 10^3 a 10^6 de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), dependendo da virulência da estirpe e do estado imunológico do hospedeiro (Fauci et al., 2008).

De acordo com os critérios microbiológicos da União Europeia (Regulamentos CE 2073/2005 e 1441/2007), *S. enterica* deve estar ausente nas diversas categorias de alimentos (25 g de amostra). No que diz respeito a sementes edíveis, Keller et al. (2018), reportaram algumas situações de salmoneloses.

1.4. Surtos associados às sementes edíveis

Segundo Wilson et al. (2013), nos últimos anos têm sido registados vários surtos de doenças associadas ao consumo de sementes edíveis e seus derivados. Com base nos seus estudos, estes autores observaram a presença de *Salmonella* em sementes, em níveis de contaminação baixos mas preocupantes (Wilson et al., 2013).

Em novembro de 2002, foi identificado, na Austrália e na Nova Zelândia, o primeiro de três surtos de infeção por *Salmonella* associados ao consumo de tahine importado. O tahine é uma pasta/creme obtida a partir de sementes de sésamo moídas. Na sequência desta ocorrência foram lançados alertas sobre o ocorrido e todo o produto contaminado foi retirado do mercado. Entre junho e julho de 2003 foi identificado um segundo surto na Austrália e um terceiro na Nova Zelândia, em agosto do mesmo ano (Unicomb et al., 2005).

Entre 2007 e 2008 foi realizado, no Reino Unido, um estudo para avaliar a segurança microbiológica de sementes edíveis, relativamente a *Salmonella* e *Escherichia coli*. Este estudo, que envolveu 3735 amostras de sementes, permitiu detetar *Salmonella* em 0,6 % das amostras, das quais 57 % foram sementes de sésamo, sendo o resto das amostras contaminadas, mistura de sementes, sementes de girassol, sementes de melão e sementes

de linhaça. No mesmo estudo, detetou-se *Escherichia coli* em 9 % das amostras, sendo que 1,5 % continham valores insatisfatórios ($\geq 10^2$ UFC/g) (Willis et al., 2009; FSAI, 2012).

Em 2009, na Irlanda, foram emitidos dois alertas alimentares, que levaram à recolha de lotes de sementes de sésamo do mercado. Ambos os alertas derivaram da deteção de *Salmonella* sp. em sementes fornecidas pelo Reino Unido. Contudo, não houve relatos de doença. Posteriormente, em 2010, foram lançados novamente mais dois alertas alimentares, resultantes, da deteção de *Salmonella* sp. e de *Salmonella* Anatum em sementes de sésamo (FSAI, 2012).

No ano de 2014, a farinha de sementes de chia foi associado a um surto de *Salmonella*, que envolveu 63 casos registados no Canadá e 31 nos Estados Unidos (Keller et al., 2018).

Nos últimos anos, nos Estados Unidos, várias sementes edíveis, como sementes de chia, de girassol e de abóbora, têm sido sujeitas a múltiplas recolhas do mercado devido à presença de *Salmonella* (Keller et al., 2018).

Devido ao aumento do consumo de sementes edíveis, aos surtos registados nos últimos anos, e aos alertas que levaram à recolha de sementes do mercado em alguns países, torna-se relevante estudar a qualidade microbiológica destes alimentos. De acordo com a FSAI (2012) existem poucos estudos disponíveis sobre a qualidade microbiológica de sementes edíveis. Na verdade, em Portugal, não estão disponíveis estudos de avaliação da qualidade microbiológica de sementes edíveis.

2. Metodologia

2. Metodologia

2.1. Amostras

Numa primeira fase do trabalho estudou-se a qualidade microbiológica de sementes edíveis e derivados em amostras adquiridas em superfícies comerciais do concelho de Faro. Nesta fase, estudaram-se 5 tipos de sementes diferentes: sementes de sésamo (18 amostras); sementes de linhaça (18 amostras); sementes de girassol (18 amostras); sementes de abóbora (18 amostras); e sementes de chia (18 amostras). Estudaram-se ainda 2 derivados: mistura de sementes (18 amostras); e farinha de sementes de linhaça (18 amostras). O número total de amostras estudadas foi de 126 em 3 anos consecutivos (n=42 em 2016, n=42 em 2017 e n=42 em 2018), como se pode observar na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. – Amostras de sementes edíveis estudadas.

Amostra	Número de amostras (n)			
	2016	2017	2018	n TOTAL
Sementes de Sésamo	6	6	6	18
Sementes de Linhaça	6	6	6	18
Sementes de Chia	6	6	6	18
Sementes de Abóbora	6	6	6	18
Sementes de Girassol	6	6	6	18
Farinha de sementes de Linhaça	6	6	6	18
Mistura de Sementes	6	6	6	18
TOTAL	42	42	42	126

O estudo da qualidade microbiológica das sementes em diversas condições de acondicionamento (segunda fase do trabalho), foi realizado em sementes de sésamo, sementes de linhaça (biológica e não biológica) e farinha de sementes de linhaça (biológica e não biológica), por serem as amostras onde se detetou um nível de contaminação microbiológico mais elevado num estudo realizado em 2016 (Silva et al., 2017). As amostras foram adquiridas nas superfícies comerciais de Faro. No caso das sementes de sésamo, selecionaram-se sementes comercializadas embaladas (embalagem industrial) e sementes comercializadas avulso. As embalagens das sementes foram

abertas e acondicionadas em três temperaturas diferentes: 10 °C, 20 °C e 40 °C (Figura 2.1.).

As sementes adquiridas avulso foram acondicionadas em sacos de polietileno e igualmente armazenadas às três temperaturas indicadas.

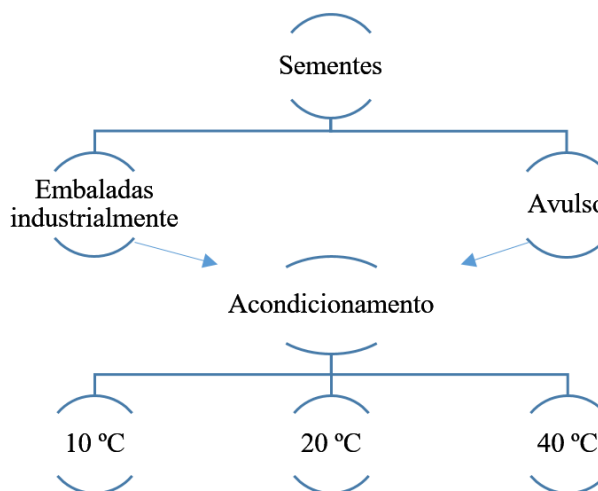


Figura 2.1. - Esquema de condições de acondicionamento (embalamento e temperatura) das sementes estudadas.

As amostras de linhaça resultantes de cultivo convencional, tanto as sementes inteiras como a farinha, foram adquiridas a granel e acondicionadas em sacos de polietileno às três temperaturas indicadas na Figura 2.1. Relativamente às amostras de cultivo biológico, adquiriu-se sementes de linhaça biológica avulso, sendo que metade destas sementes foram trituradas em laboratório, através o utensilio de trituração “1, 2, 3”, higienizado, obtendo-se assim farinha de linhaça biológica.

2.2. Parâmetros microbiológicos

A avaliação da qualidade microbiológica das sementes foi realizada recorrendo à quantificação dos parâmetros microbiológicos Microrganismos Aeróbios Mesófilos (MAM) (30 °C), Fungos Filamentosos e Leveduras (FFL), *Staphylococcus coagulase positiva*, *Escherichia coli* e à pesquisa de *Salmonella* spp..

Para esta avaliação, com exceção da pesquisa de *Salmonella* spp., misturou-se 10 g de amostra com 90 mL de solução de Ringer (Oxoid). Procedeu-se à homogeneização no

Stomaker, durante 1 minuto em sacos estéreis, próprios para o efeito. Efetuou-se, de seguida, uma série de diluições decimais sucessivas em solução de Ringer. Por fim, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

2.2.1. Quantificação de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C)

Para a quantificação dos Microrganismos Aeróbios Mesófilos a 30 °C (MAM) em sementes edíveis, utilizou-se a norma internacional ISO 4833 – “Microbiologia de alimentos e alimentos para animais - Método horizontal para a enumeração de microrganismos - Técnica de contagem de colónias a 30 °C”. Inoculou-se, por incorporação e em duplicado, 1 mL de cada uma das diluições decimais em meio de cultura Plate Count Agar (PCA) (Scharlau). Incubaram-se as placas inoculadas a 30 °C durante 72 horas. Após este período, contaram-se todas as colónias presentes na superfície do meio de cultura.

2.2.2. Quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduras

Para quantificação de Fungos Filamentosos e Leveduras (FFL) em sementes edíveis, utilizou-se a norma internacional ISO 21527 “Microbiologia de alimentos e alimentos para animais - Método horizontal para a enumeração de leveduras e bolores - Parte 1: Técnica de contagem de colónias em produtos com atividade de água superior a 0,95”.

Procedeu-se à inoculação, por espalhamento e em duplicado, de 0,1 mL de cada uma das diluições, sobre o meio de cultura Dichloran Rose Bengal Chlorofenicol (DRBC) (Scharlau). As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias. Após este período, contaram-se todas as colónias de Fungos Filamentosos e Leveduras presentes na superfície do meio de cultura.

2.2.3. Quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva nas sementes estudadas, utilizou-se a Norma Portuguesa 4400 “Microbiologia alimentar, Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies), Parte 1: Técnica com confirmação de colónias Método corrente” de 2002.

Inoculou-se, por espalhamento e em duplicado, 0,1 mL de cada uma das diluições decimais, na superfície do meio de cultura Baird Parker Base Agar (BP) (Oxoid), enriquecido com solução de gema de ovo e com telurito de potássio. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas.

Após o tempo referido, precedeu-se à contagem de colónias características, sendo estas negras ou cinzentas, brilhantes e convexas, rodeadas por dois halos: um mais interno e outro mais externo (NP 4400-1, 2002).

2.2.4. Quantificação de *Escherichia coli*

Para quantificação de *E. coli* nas sementes estudadas utilizou-se a norma ISO 16649 – “Microbiologia de alimentos e alimentação animal - Método horizontal para a enumeração de *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva - Parte 2: Técnica de contagem de colónias a 44 °C com 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronídeo”.

Procedeu-se à inoculação, por espalhamento e em duplicado, de 0,1 mL de cada uma das diluições, sobre o meio de cultura Chromocult Triptone Bile X-glucuronide Agar (TBX) (Merk). Incubou-se durante 24 horas a 44 °C. Após o tempo de incubação, observou-se se havia presença de colónias típicas, sendo estas azuis-esverdeadas.

2.2.5. Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para deteção de *Salmonella* spp. nas sementes utilizou-se a norma internacional ISO 6579:2002 – Método horizontal para a deteção de *Salmonella* spp..

Esta pesquisa subdivide-se em quatro momentos distintos: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, inoculação em meios seletivos e interpretação dos resultados.

Pré-enriquecimento: pesou-se 25 g de amostra, juntou-se 225 mL de Água Peptonada Tamponada (ATP) (Scharlau) e homogeneizou-se. Incubou-se durante 24 horas a 37 °C.

Enriquecimento seletivo: depois do tempo de incubação, pipetou-se 0,1 mL, do pré-enriquecimento, para o meio de cultura Rapaport-Vassiliadis (Oxoid); e 1 ml para o meio de cultura Muller Kauffmann Tetrathionate – Novobiocin broth (Oxoid). Incubou-se, durante 24 horas, o Rapaport-Vassiliadis inoculado a 41,5 °C e a 37 °C o Muller Kauffmann Tetrathionate.

Inoculação em meios seletivos: procedeu-se à inoculação de uma ansada dos meios de enriquecimento seletivo para a superfície de placas com os meios de cultura Brilliance *Salmonella* Agar (Oxoid), e Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (Scharlau). Incubou-se as placas durante 24 horas a 37 °C.

Interpretação dos resultados: pesquisou-se a presença de colónias típicas, após o período de incubação, sendo que no meio de cultura Brilliance são roxas e no meio XLD são vermelhas com centros negros. O aparecimento de colónias típicas implicaria a sua confirmação através de testes bioquímicos adequados, tais como coloração de Gram, galerias API e o teste da oxidase.

2.3. Confirmações bioquímicas

Após a identificação das colónias características de bactérias de cada género/espécie nos diferentes meios de cultura, selecionaram-se colónias isoladas e repicaram-se para placas com o meio de cultura Tryptone Soy Yeast Extract Agar (TSYEA). Sempre que necessário repicou-se novamente para assegurar a pureza das culturas. Após 24 horas de incubação a 37 °C, realizaram-se os testes de catalase, oxidase e colorações de Gram. No caso de colónias típicas de estafilococos procedeu-se à realização do teste da coagulase. Na Tabela 2.2., pode-se observar quais os testes bioquímicos realizados para cada isolado bacteriano potencialmente patogénico.

Tabela 2.2. - Testes bioquímicos para os microrganismos patogénicos em estudo.

Microrganismo	Testes Bioquímicos			
	Gram	Oxidase	API E20	Coagulase
<i>Salmonella</i> sp.	(-)	(-)	✓	
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)		
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	(+)	(-)		✓

2.4. Determinação de atividade de água (aw)

A atividade da água das sementes estudadas, foi medida, em duplicado, aproximadamente a 25 °C, num sensor de humidade de cloreto de lítio (Rotronic DT Hygroskop, DMS-100H).

3. Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Estudo da qualidade de sementes edíveis e derivados comercializados em Faro

Os resultados da qualidade microbiológica das sementes edíveis comercializadas no concelho de Faro, estudada no âmbito deste trabalho, encontram-se resumidos nas Tabelas 3.1., 3.2., 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8., 3.9., 3.10., 3.11. e 3.12.

As contagens de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (MAM) (30 °C) (valores médios), das sementes analisadas em 2016 (Tabela 3.1.), variaram entre $2,5 \times 10^1$ e $8,0 \times 10^6$ UFC/g. Cerca de 47,62 % das amostras estudadas, no ano referido, continham valores inferiores ou iguais a 10^4 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de chia ($6,6 \times 10^2$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de sésamo ($1,4 \times 10^6$ UFC/g), seguidas da farinha de sementes de linhaça ($5,3 \times 10^5$ UFC/g).

Tabela 3.1. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.

Amostras	n	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6		1			5	$2,5 \times 10^1$	$8,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Sementes de Linhaça	6				3	3	$1,3 \times 10^3$	$9,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
Sementes de Abóbora	6				2	4	$3,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$
Sementes de Girassol	6			1	4	1	$7,7 \times 10^2$	$6,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Sementes de Chia	6			5	1		$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$6,6 \times 10^2$
Mistura de Sementes	6			1	1	4	$5,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$
Farinha de linhaça	6				1	5	$4,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$
Total	42	0	1	7	12	22	$2,5 \times 10^1$	$8,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$

n: número de amostras

a: UFC/g

No que diz respeito às contagens de MAM, das sementes analisadas em 2017, estas variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10^1$ e $5,6 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 3.2.). Cerca de 47,62 % das amostras estudadas, no ano referido, continham valores inferiores ou iguais a 10^4 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de

microbiota foram, as sementes de girassol ($2,4 \times 10^3$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de linhaça ($1,2 \times 10^6$ UFC/g), seguidas da farinha de sementes de linhaça ($4,1 \times 10^5$ UFC/g).

Tabela 3.2. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	1		2		3	<1,0x10	1,7x10 ⁶	3,2x10 ⁵
Sementes de Linhaça	6			1	1	4	7,9x10 ²	5,6x10 ⁶	1,2x10 ⁶
Sementes de Abóbora	6				2	4	4,7x10 ³	6,8x10 ⁵	2,0x10 ⁵
Sementes de Girassol	6		1	2	3		1,0x10 ²	6,4x10 ³	2,4x10 ³
Sementes de Chia	6			2	2	2	3,4x10 ²	2,3x10 ⁵	6,6x10 ⁴
Mistura de Sementes	6		1		2	3	2,5x10 ¹	1,1x10 ⁶	2,0x10 ⁵
Farinha de linhaça	6					6	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁶	4,1x10 ⁵
Total	42	1	2	7	10	22	<1,0x10	5,6x10 ⁶	3,4x10 ⁵

n: número de amostras
a: UFC/g

Relativamente às contagens de MAM, das sementes analisadas em 2018, estas variaram entre $8,0 \times 10$ e $9,4 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 3.3.). Cerca de 33,33 % das amostras estudadas, neste ano, continham valores inferiores ou iguais a 10^4 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram, mais uma vez, as sementes de girassol ($1,4 \times 10^3$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de linhaça e a farinha de sementes de linhaça ($2,5 \times 10^6$ UFC/g), seguidas das amostras de mistura de sementes ($2,0 \times 10^5$ UFC/g).

Tabela 3.3. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6			1	2	3	3,2x10 ²	1,7x10 ⁵	4,1x10 ⁴
Sementes de Linhaça	6					6	4,5x10 ⁴	9,4x10 ⁶	2,5x10 ⁶
Sementes de Abóbora	6					6	1,2x10 ⁴	3,5x10 ⁵	1,2x10 ⁵
Sementes de Girassol	6			3	3		1,4x10 ²	3,6x10 ³	1,4x10 ³
Sementes de Chia	6		1	4		1	8,0x10 ¹	1,2x10 ⁵	2,1x10 ⁴
Mistura de Sementes	6					6	5,2x10 ⁴	7,1x10 ⁵	2,0x10 ⁵
Farinha de linhaça	6					6	1,3x10 ⁵	4,1x10 ⁶	2,5x10 ⁶
Total	42	0	1	8	5	28	8,0x10 ¹	9,4x10 ⁶	7,6x10 ⁵

n: número de amostras
a: UFC/g

As contagens de Fungos Filamentosos (bolores) nas sementes estudadas em 2016, variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10^1$ e $3,1 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 3.4.). Cerca de 33,33 % das amostras estudadas, no ano referido, continham níveis inferiores ou iguais a 10^2 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de chia ($2,4 \times 10^2$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de girassol ($5,2 \times 10^5$ UFC/g), seguidas das sementes de abóbora ($2,9 \times 10^4$ UFC/g).

Tabela 3.4. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.

Amostras	<i>n</i>	$<10^1$	$10^1 - 10^2$	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$>10^4$	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	1		2	3		$<1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$
Sementes de Linhaça	6	2		2	2		$<1,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
Sementes de Abóbora	6	2		2		2	$<1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$
Sementes de Girassol	6		1	3		2	$1,0 \times 10^2$	$3,1 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$
Sementes de Chia	6	2	2	2			$<1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
Mistura de Sementes	6	1		2	2	1	$<1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$
Farinha de linhaça	6	3		2	1		$<1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^2$
Total	42	11	3	15	8	5	$<1,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$

n: número de amostras

a: UFC/g

No que diz respeito às contagens de Fungos Filamentosos nas sementes analisadas em 2017, estas variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10^1$ e $1,4 \times 10^4$ UFC/g (Tabela 3.5.). Cerca de 30,95 % das amostras estudadas, no ano referido, continham valores inferiores ou iguais a 10^2 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de abóbora ($2,1 \times 10^2$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de sésamo ($5,9 \times 10^3$ UFC/g), seguidas das sementes de girassol ($3,5 \times 10^3$ UFC/g).

Tabela 3.5. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	3			1	2	<1,0x10	1,4x10 ⁴	5,9x10 ³
Sementes de Linhaça	6	1		2	3		<1,0x10	8,5x10 ³	2,4x10 ³
Sementes de Abóbora	6	3	1	2			<1,0x10	1,0x10 ³	2,1x10 ²
Sementes de Girassol	6	1		1	3	1	<1,0x10	1,2x10 ⁴	3,6x10 ³
Sementes de Chia	6	2	1	1	2		<1,0x10	1,6x10 ³	6,4x10 ²
Mistura de Sementes	6	1		4	1		<1,0x10	2,5x10 ³	7,0x10 ²
Farinha de linhaça	6			2	3	1	2,5x10 ²	1,4x10 ⁴	3,5x10 ³
Total	42	11	2	12	13	4	<1,0x10	1,4x10 ⁴	2,4x10 ³

n: número de amostras

a: UFC/g

Relativamente às contagens de Fungos Filamentosos nas sementes analisadas em 2018, estas variaram entre valores inferiores a 1,0x10 e 1,1x10⁴ UFC/g (Tabela 3.6.). Apenas 19,05 % das amostras estudadas, no ano referido, foram enumerados valores inferiores ou iguais a 10² UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram a mistura de sementes (4,0x10² UFC/g). As amostras que apresentaram um nível médio mais elevado foram as de farinha de sementes de linhaça (2,8x10³ UFC/g), seguida das sementes de chia (2,0x10³ UFC/g).

Tabela 3.6. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	2		3	1		<1,0x10	2,4x10 ³	5,8x10 ²
Sementes de Linhaça	6		1	3	2		1,0x10 ²	3,0x10 ³	9,0x10 ²
Sementes de Abóbora	6		2	3	1		5,0x10 ¹	1,6x10 ³	5,3x10 ²
Sementes de Girassol	6		2	2	2		1,0x10 ²	1,5x10 ³	6,7x10 ²
Sementes de Chia	6	1		4		1	<1,0x10	1,1x10 ⁴	2,0x10 ³
Mistura de Sementes	6			6			2,0x10 ²	6,5x10 ²	4,0x10 ²
Farinha de linhaça	6				6		1,5x10 ³	4,5x10 ³	2,8x10 ³
Total	42	3	5	21	12	1	<1,0x10	1,1x10 ⁴	1,1x10 ³

n: número de amostras

a: UFC/g

As contagens de leveduras nas sementes analisadas em 2016, variaram entre valores inferiores a 1,0x10 e 8,5x10⁴ UFC/g (Tabela 3.7.). Cerca de 73,81 % das amostras estudadas, no ano referido, continham valores inferiores ou iguais a 10² UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de girassol, sementes de chia e a mistura de sementes (< 10¹ UFC/g). As que

apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de abóbora ($1,5 \times 10^4$ UFC/g), seguidas das sementes de linhaça ($7,5 \times 10^3$ UFC/g).

Tabela 3.7. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2016.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	5		1			<1,0x10	3,1x10 ²	5,2x10 ¹
Sementes de Linhaça	6			2	2	2	7,0E+02	2,0x10 ⁴	7,5x10 ³
Sementes de Abóbora	6	4			1	1	<1,0x10	8,5x10 ⁴	1,5x10 ⁴
Sementes de Girassol	6	6					<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10
Sementes de Chia	6	6					<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10
Mistura de Sementes	6	6					<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10
Farinha de linhaça	6	4		1	1		<1,0x10	4,5x10 ³	8,3x10 ²
Total	42	31	0	4	4	3	<1,0x10	8,5x10 ⁴	3,3x10 ³

n: número de amostras
a: UFC/g

No que diz respeito às contagens de leveduras nas sementes analisadas em 2017, estas variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10$ e $9,6 \times 10^4$ UFC/g (Tabela 3.8.). Cerca de 47,62 % das amostras estudadas, no ano referido, continham valores inferiores ou iguais a 10^2 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de girassol ($4,2 \times 10$ UFC/g). As amostras que apresentaram um nível médio mais elevado foram as de farinha de sementes de linhaça ($1,8 \times 10^4$ UFC/g), seguidas das de mistura de sementes ($4,3 \times 10^3$ UFC/g).

Tabela 3.8. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2017.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	4		1	1		<1,0x10	1,0x10 ⁴	1,7x10 ³
Sementes de Linhaça	6	1	2	1	2		<1,0x10	2,4x10 ³	9,1x10 ²
Sementes de Abóbora	6	2		1	2	1	<1,0x10	1,7x10 ⁴	4,1x10 ³
Sementes de Girassol	6	4	1	1			<1,0x10	1,5x10 ²	4,2x10 ¹
Sementes de Chia	6	1		3	2		<1,0x10	3,0x10 ³	1,3x10 ³
Mistura de Sementes	6	2	2		1	1	<1,0x10	2,4x10 ⁴	4,3x10 ³
Farinha de linhaça	6	1		1	3	1	<1,0x10	9,6x10 ⁴	1,8x10 ⁴
Total	42	15	5	8	11	3	<1,0x10	9,6x10 ⁴	4,4x10 ³

n: número de amostras
a: UFC/g

Relativamente às contagens de leveduras nas sementes analisadas em 2018, estas variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10$ e $8,5 \times 10^4$ UFC/g (Tabela 3.9.). Cerca de 54,76 % das amostras estudadas, neste ano, continham valores inferiores ou iguais a 10^2

UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de girassol ($< 10^1$ UFC/g). As amostras que apresentaram um nível médio mais elevado foram, mais uma vez, as de farinha de sementes de linhaça ($2,7 \times 10^4$ UFC/g), seguida das sementes de linhaça ($1,3 \times 10^4$ UFC/g).

Tabela 3.9. – Leveduras (UFC/g) em sementes edíveis e derivados em 2018.

Amostras	n	$<10^1$	$10^1 - 10^2$	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$>10^4$	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	6	5			1		$<1,0 \times 10$	$1,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
Sementes de Linhaça	6			1	2	3	$4,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Sementes de Abóbora	6	1	3	2			$<1,0 \times 10$	$7,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
Sementes de Girassol	6	6					$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
Sementes de Chia	6	5			1		$<1,0 \times 10$	$8,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
Mistura de Sementes	6	1	1	3	1		$<1,0 \times 10$	$1,4 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$
Farinha de linhaça	6	1			2	3	$<1,0 \times 10$	$8,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$
Total	42	19	4	6	7	6	$<1,0 \times 10$	$8,5 \times 10^4$	$6,1 \times 10^3$

n: número de amostras

a: UFC/g

Em termos gerais e juntando os resultados obtidos dos três momentos de análise nos diferentes anos, as contagens de microrganismos totais a 30 °C variaram entre valores inferiores a $1,0 \times 10$ e $9,4 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 3.10.). Cerca de 42,86 % das amostras estudadas, nos três anos, continham valores inferiores ou iguais a 10^4 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de chia ($2,9 \times 10^4$ UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de linhaça ($1,3 \times 10^6$ UFC/g), seguidas da farinha de sementes de linhaça ($1,1 \times 10^6$ UFC/g). No trabalho de Shah et al. (2018) foram reportados valores, entre 10^4 e 10^5 UFC/g de MAM para sementes de linhaça e correspondente farinha, respetivamente. Estes valores são inferiores aos obtidos no presente trabalho. Os resultados de Al-Bachir et al. (2016), quanto às sementes de sésamo, também são inferiores aos obtidos no presente estudo. O referido autor enumerou 3,16 Log UFC/g, enquanto no atual trabalho foi contabilizado um valor médio de MAM de $6,0 \times 10^5$ UFC/g.

Tabela 3.10. – Microrganismos Aeróbios Mesófilos (UFC/g) de sementes edíveis e derivados nos três anos de análise.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	18	1	1	3	2	11	<1,0x10	8,0x10 ⁶	6,0x10 ⁵
Sementes de Linhaça	18			1	4	13	7,9x10 ²	9,4x10 ⁶	1,3x10 ⁶
Sementes de Abóbora	18				4	14	3,6x10 ²	6,8x10 ⁵	1,2x10 ⁵
Sementes de Girassol	18		1	6	10	1	1,0x10 ²	6,9x10 ⁵	4,0x10 ⁴
Sementes de Chia	18		1	11	3	3	8,0x10 ¹	2,3x10 ⁵	2,9x10 ⁴
Mistura de Sementes	18		1	1	3	13	2,5x10 ¹	2,5x10 ⁶	2,8x10 ⁵
Farinha de linhaça	18				1	17	4,3x10 ³	4,1x10 ⁶	1,1x10 ⁶
Total	126	1	4	22	27	72	<1,0x10	9,4x10 ⁶	5,0x10 ⁵

n: número de amostras
a: UFC/g

No que diz respeito aos resultados dos diferentes momentos de análise, a contagem de Fungos Filamentosos variou entre valores inferiores a 1,0x10 e 3,1x10⁶ UFC/g (Tabela 3.11.). Cerca de 27,78 % das amostras estudadas, nos três anos, continham valores inferiores ou iguais a 10² UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de chia (9,8x10² UFC/g). As que apresentaram o nível médio mais elevado foram as sementes de girassol (1,7x10⁵ UFC/g), seguidas das sementes de abóbora (9,8x10³ UFC/g). Robertson et al. (1984) enumeraram Fungos Filamentosos em sementes de girassol, tendo reportado valores de 4,11 Log UFC/g, inferiores à média das contagens enumeradas nas amostras analisadas no atual trabalho. Relativamente às contagens de Fungos Filamentosos em sementes de sésamo, Al-Bachir (2016) reportou 2,28 Log UFC/g, valor inferior à média encontrada no presente estudo (3,3x10³ UFC/g).

Tabela 3.11. – Fungos Filamentosos (UFC/g) em sementes e derivados nos três anos de análise.

Amostras	<i>n</i>	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	18	6		5	5	2	<1,0x10	1,4x10 ⁴	3,3x10 ³
Sementes de Linhaça	18	3	1	7	7		<1,0x10	8,5x10 ³	1,7x10 ³
Sementes de Abóbora	18	5	3	7	1	2	<1,0x10	1,5x10 ⁵	9,8x10 ³
Sementes de Girassol	18	1	3	6	5	3	<1,0x10	3,1x10 ⁶	1,7x10 ⁵
Sementes de Chia	18	5	3	7	2	1	<1,0x10	1,1x10 ⁴	9,8x10 ²
Mistura de Sementes	18	2		12	3	1	<1,0x10	2,0x10 ⁴	1,8x10 ³
Farinha de linhaça	18	3		4	10	1	<1,0x10	1,4x10 ⁴	2,3x10 ³
Total	126	25	10	48	33	10	<1,0x10	3,1x10 ⁶	2,8x10 ⁴

n: número de amostras
a: UFC/g

A contagem de leveduras, dos três anos, variou entre valores inferiores a $1,0 \times 10^6$ e $9,6 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 3.12.). Cerca de 58,73 % das amostras estudadas, nos três anos, continham valores inferiores ou iguais a 10^2 UFC/g. As sementes que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foram as sementes de girassol ($1,4 \times 10^1$ UFC/g). As amostras que apresentaram o nível médio mais elevado foram as de farinha de sementes de linhaça ($1,5 \times 10^4$ UFC/g), seguidas das sementes de linhaça ($7,3 \times 10^3$ UFC/g).

Tabela 3.12. – Leveduras (UFC/g) em sementes e derivados nos três anos de análise.

Amostras	n	<10 ¹	10 ¹ – 10 ²	10 ² – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁴	Mínimo ^a	Máximo ^a	Média ^a
Sementes de Sésamo	18	14		2	2		<1,0x10	1,0x10 ⁴	6,7x10 ²
Sementes de Linhaça	18	1	2	4	6	5	<1,0x10	3,2x10 ⁴	7,3x10 ³
Sementes de Abóbora	18	7	3	3	3	2	<1,0x10	8,5x10 ⁴	6,3x10 ³
Sementes de Girassol	18	16	1	1			<1,0x10	1,5x10 ²	1,4x10 ¹
Sementes de Chia	18	12		3	3		<1,0x10	8,5x10 ³	9,0x10 ²
Mistura de Sementes	18	9	3	3	2	1	<1,0x10	2,4x10 ⁴	1,6x10 ³
Farinha de linhaça	18	6		2	6	4	<1,0x10	9,6x10 ⁴	1,5x10 ⁴
Total	126	65	9	18	22	12	<1,0x10	9,6x10 ⁴	4,6x10 ³

n: número de amostras

a: UFC/g

Um dos objetivos deste trabalho foi estudar a qualidade microbiológica de sementes edíveis e alguns derivados, através da enumeração de Microrganismos Aeróbios Mesófilos (30 °C) (MAM), de Fungos Filamentosos e de Leveduras, contagem de *E. coli* e de *S. aureus*, e pesquisa de *Salmonella* sp.. Os três últimos grupos microbianos não foram encontrados em nenhuma das amostras de sementes estudadas. Contudo, Willis et al. (2009) detetaram *Salmonella* spp. em 0,6% das 3735 amostras que estudaram, das quais cerca de metade eram sementes de sésamo. Detetaram também 9% das amostras estudadas contaminadas com *E. coli*.

Para analisar os resultados obtidos relativamente à qualidade microbiológica das sementes edíveis, compararam-se as contagens obtidas, com os “Valores Guia para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer”, admitindo que as sementes edíveis se enquadram no grupo 3 (saladas / vegetais / frutos crus) (Santos et al., 2005). Os valores guia, apresentam-se na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. - Valores Guia da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo, ao natural, grupo 3: Saladas / vegetais / frutos crus (adaptado de Santos et al. 2005).

Parâmetro	Satisfatório ^a	Aceitável ^a	Não Satisfatório ^a	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microrganismos a 30 °C	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Bolores	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	#
Leveduras	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
<i>E. coli</i>	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>S. aureus</i>	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Salmonella</i>	Ausente em 25 g*	-	-	Presente em 25 g *

NA: Não Aplicável;

#: Equacionado caso a caso;

*: 25 g de amostra analisada (Regulamento 2073/2005)

a: UFC/g

A comparação dos resultados obtidos, referentes aos MAM, com os mencionados nos Valores Guia (Santos et al., 2005) permitiu classificar as sementes edíveis em “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” (Tabela 3.14.).

Tabela 3.14. - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de MAM.

Amostras	<i>n</i>	Satisfatório $\leq 10^4$	Aceitável $>10^4 \leq 10^6$	Não Satisfatório $> 10^6$
Sementes de Sésamo	18	7	9	2
Sementes de Linhaça	18	5	10	3
Sementes de Abóbora	18	4	14	0
Sementes de Girassol	18	17	1	0
Sementes de Chia	18	15	3	0
Mistura de Sementes	18	5	11	2
Farinha de linhaça	18	1	9	8
Total	126	54	57	15

Assim, pode afirmar-se que, das 18 amostras de sementes de sésamo estudadas, 2 foram classificadas de “Não satisfatórias”, 9 de “Aceitáveis” e 7 de “Satisfatórias”. No que diz respeito à farinha de linhaça, 8 das amostras estudadas revelaram níveis de MAM “Não satisfatórios”, 9 apresentaram valores “Aceitáveis” e apenas 1 se apresentou como “Satisfatória”. As sementes de girassol e de chia foram aquelas em que se encontrou um maior número de amostras “Satisfatórias”.

Considerando a população de Fungos Filamentosos, as amostras de sementes estudadas foram classificadas de acordo com a Tabela 3.15.

Tabela 3.15. - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de Fungos Filamentosos.

Amostras	<i>n</i>	Satisfatório $\leq 10^2$	Aceitável $>10^2 \leq 10^3$	Não Satisfatório $> 10^3$
Sementes de Sésamo	18	6	5	7
Sementes de Linhaça	18	4	7	7
Sementes de Abóbora	18	8	8	2
Sementes de Girassol	18	4	6	8
Sementes de Chia	18	8	7	3
Mistura de Sementes	18	2	12	4
Farinha de linhaça	18	3	4	11
Total	126	35	49	42

Os dados da Tabela 3.15. permitem constatar que o número de amostras de sementes edíveis estudadas classificadas com “Não satisfatórias” aumentou quando se considera a população de Fungos Filamentosos como referência. Assim, 7 amostras de sésamo, 7 de linhaça, 2 de abóbora, 8 de girassol, 3 de chia, 4 de mistura de sementes e 11 de farinha de sementes de linhaça foram classificadas de “Não Satisfatórias”. Por outro lado, 6 amostras de sésamo, 4 de linhaça, 8 de abóbora, 4 de girassol, 8 de chia, 2 de mistura de sementes e 3 de farinha de sementes de linhaça, foram classificadas de “Satisfatórias”. Um dos problemas possíveis das sementes edíveis é a elevada contaminação por micotoxinas, resultantes da presença de certas espécies de Fungos Filamentosos. Arroyo-Manzanares et al. (2013) detetaram sementes de girassol contaminadas com várias micotoxinas e no presente trabalho, 8 amostras destas sementes estudadas continham níveis não satisfatórios de Fungos Filamentosos.

Considerando a população de leveduras, todas as amostras de sementes estudadas foram classificadas como “Satisfatórias” ou “Aceitáveis” (Tabela 3.16.).

Tabela 3.16 - Número de amostras “Satisfatórias”, “Aceitáveis” e “Não Satisfatórias” de acordo com as contagens de leveduras.

Amostras	<i>n</i>	Satisfatório $\leq 10^2$	Aceitável $>10^2 \leq 10^5$	Não Satisfatório $> 10^5$
Sementes de Sésamo	18	14	4	0
Sementes de Linhaça	18	3	15	0
Sementes de Abóbora	18	10	8	0
Sementes de Girassol	18	17	1	0
Sementes de Chia	18	12	6	0
Mistura de Sementes	18	12	6	0
Farinha de linhaça	18	6	12	0
Total	126	74	52	0

Das 18 amostras de sementes de girassol, 17 foram “Satisfatórias” e apenas 1 foi “Aceitável”. Ao contrário destas, o grupo das sementes de linhaça foi o que reuniu menor número de amostras classificadas com “Satisfatório”, das 18 amostras, 15 foram “Aceitáveis” e 3 foram “Satisfatórias”. No que diz respeito à farinha de linhaça, apenas 6 amostras foram classificadas com “Satisfatório” tendo em conta o número de leveduras contabilizado.

3.2. Determinação de atividade de água (a_w)

Apresentam-se, na Tabela 3.17., os valores de a_w determinados nas amostras estudadas em 2018. Esta determinação foi realizada em dois momentos, o primeiro em junho e o segundo em setembro.

Tabela 3.17 - Atividade de água (a_w) nas sementes estudadas em 2018.

Amostras	<i>n</i>	Junho de 2018			Setembro de 2018		
		Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
Sementes de Sésamo	6	0,303	0,629	0,467	0,401	0,581	0,476
Sementes de Linhaça	6	0,538	0,652	0,593	0,472	0,612	0,547
Sementes de Abóbora	6	0,568	0,660	0,610	0,500	0,590	0,557
Sementes de Girassol	6	0,509	0,634	0,555	0,492	0,563	0,520
Sementes de Chia	6	0,464	0,615	0,566	0,457	0,576	0,519
Mistura de Sementes	6	0,518	0,587	0,551	0,492	0,555	0,521
Farinha de linhaça	6	0,507	0,655	0,581	0,487	0,620	0,547
Total	42	0,303	0,660	0,560	0,401	0,620	0,527

n: número de amostras

Como se pode observar na Tabela 3.17., e relativamente ao primeiro momento de determinação (junho de 2018), as sementes de sésamo foram o grupo de amostras com um valor de a_w mínimo mais baixo, com a_w de 0,303, enquanto as sementes de abóbora foram o grupo de sementes com um valor de a_w máximo maior, com a_w de 0,660. No que diz respeito aos valores de a_w médios obtidos, as sementes de sésamo foram as sementes com menor valor de a_w médio, com a_w de 0,467, ao contrário das sementes de abóbora, que apresentaram um valor de a_w médio superior às restantes sementes estudadas, com a_w de 0,610.

Quanto ao segundo momento de determinação de a_w (setembro de 2018), tal como no primeiro momento, as sementes de sésamo foram o grupo de amostras com um valor de a_w mínimo mais baixo, com a_w de 0,401, enquanto o grupo de amostras de farinha de sementes de linhaça obtiveram um valor de a_w máximo mais elevado, com a_w de 0,620. No que diz respeito aos valores de a_w médios obtidos, tal como anteriormente, as sementes de sésamo foram as sementes com menor valor de a_w médio, com a_w de 0,476 e as sementes de abóbora apresentaram um valor de a_w médio superior, com a_w de 0,557.

Comparando os valores de a_w médios dos dois momentos de análise, observa-se que, em todas as amostras, à exceção do grupo de sementes de sésamo, se observou uma diminuição dos seus valores de junho para setembro. Tal poderá ter acontecido devido ao período entre determinações ter sido o verão e, conseqüentemente, a temperatura ambiente mais alta. Isto não se verificou nas amostras de sementes de sésamo.

Os valores de a_w medidos nas sementes do presente estudo encontram-se ligeiramente abaixo da gama referida por Adams et al. (2016) para sementes oleaginosas (0,65 e 0,70, a 25 °C).

3.3. Estudo da qualidade de sementes edíveis e derivados ao longo do tempo de armazenamento

Um dos objetivos do presente trabalho foi estudar a qualidade microbiológica de sementes de sésamo e linhaça e farinha de linhaça disponíveis no mercado, pré-embaladas e vendidas a granel (avulso), ao longo do período de acondicionamento. No caso da linhaça, fez-se a comparação de sementes resultantes de agricultura convencional e agricultura biológica. As amostras foram adquiridas nos supermercados locais e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve. As sementes adquiridas previamente embaladas foram abertas e as sementes disponíveis a granel foram acondicionadas em embalagens de polietileno.

Posteriormente, as amostras foram colocadas a três temperaturas diferentes (10 °C, 20 °C e 40 °C), ao longo de um período de cerca de 11 meses durante o qual foram enumerados os Microrganismos Aeróbios Mesófilos (MAM) e a população de Fungos Filamentosos e Leveduras (FFL). No início, a meio e no fim do período de acondicionamento, foram também pesquisadas as bactérias *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positivos e *Escherichia coli* (no dia 0, no dia 97 e no dia 328).

3.3.1. Sementes de sésamo

A variação das populações microbianas estudadas (MAM e FFL) nas sementes de sésamo acondicionadas a 10 °C, 20 °C e 40 °C está representada nas Figuras 3.1., 3.2. e 3.3., respetivamente.

As sementes de sésamo adquiridas embaladas possuíam uma população média de MAM de 2,15 Log UFC/g e de FFL de 2,0 Log UFC/g. Estes valores são inferiores aos obtidos nas sementes comercializadas avulso que possuíam níveis médios de MAM de 6,15 Log UFC/g e de FFL de 3,71 Log UFC/g. Provavelmente as sementes embaladas foram submetidas a algum tipo de tratamento que permitiu baixar a microbiota.

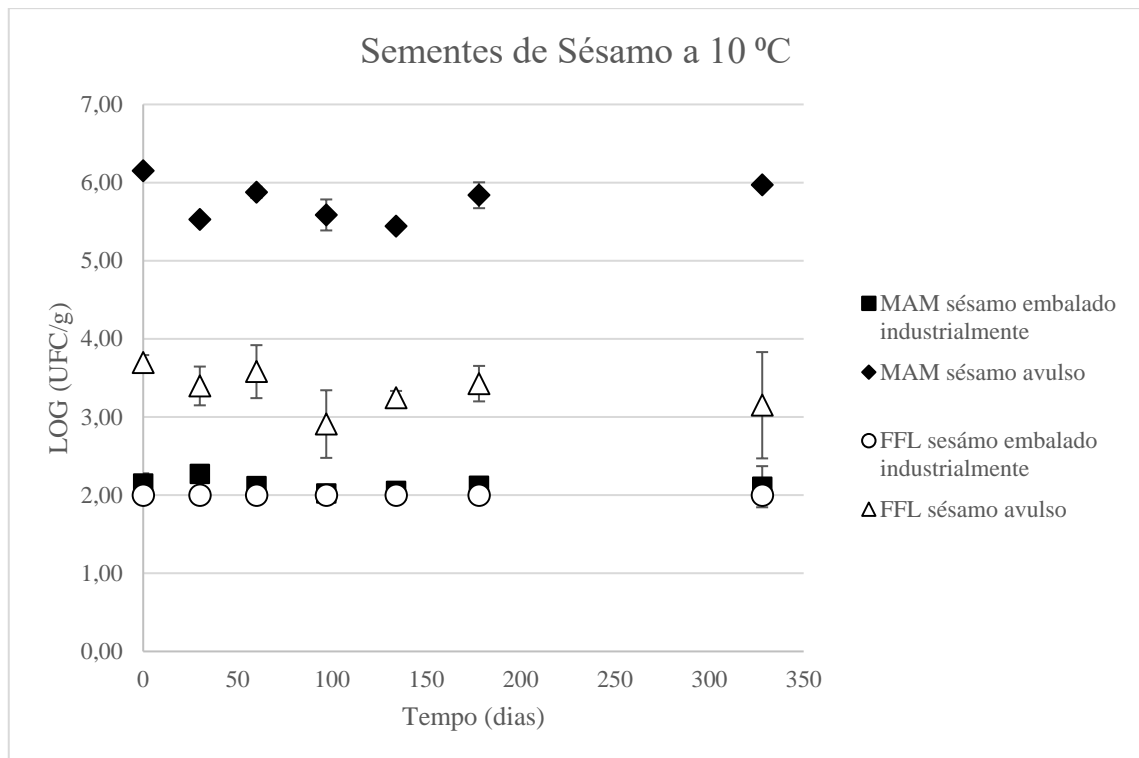


Figura 3.1. – Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 10 °C.

À temperatura de 10 °C (Figura 3.1.) não houve grandes variações nas duas populações microbianas estudadas, nas sementes adquiridas embaladas avulso, ao longo do tempo. Os níveis dos microrganismos obtidos no final do estudo foram semelhantes aos valores encontrados no início quando as amostras foram adquiridas.

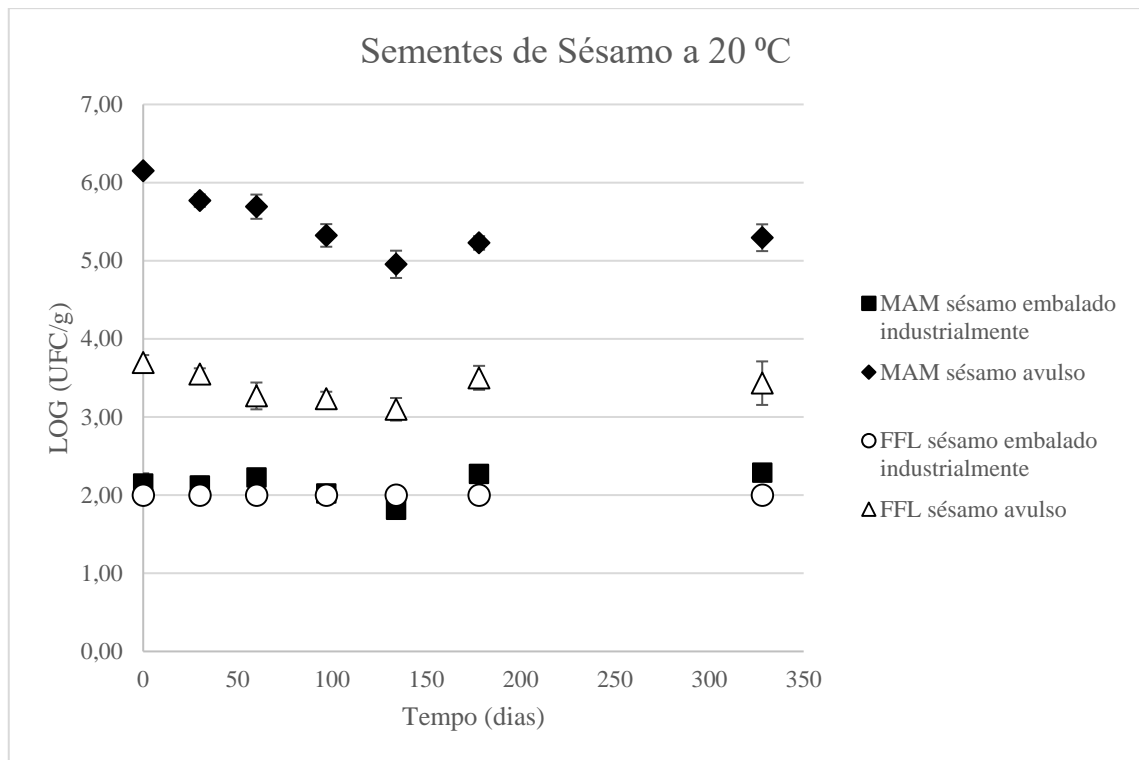


Figura 3.2. - Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 20 °C.

À temperatura de 20 °C (Figura 3.2.) observou-se uma redução das populações de MAM das sementes de sésamos adquiridas avulso, durante os primeiros 134 dias de armazenamento, altura a partir da qual se registou uma estabilização dos níveis daqueles microrganismos. Os MAM diminuíram de 6,15 Log UFC/g para 4,95 Log UFC/g, tendo-se atingido níveis de 5,29 Log UFC/g no final do estudo, nas sementes de sésamo adquiridas avulso.

No que diz respeito à população de FFL, observou-se também uma diminuição ligeira dos seus níveis nas sementes adquiridas avulso, durante o mesmo período, tendo-se posteriormente detetado um ligeiro aumento até ao final do estudo (dia 328) altura em que se enumeraram 3,43 Log UFC/g.

Nas sementes adquiridas previamente embaladas, não se observaram alterações nas populações microbianas estudadas ao longo do tempo.

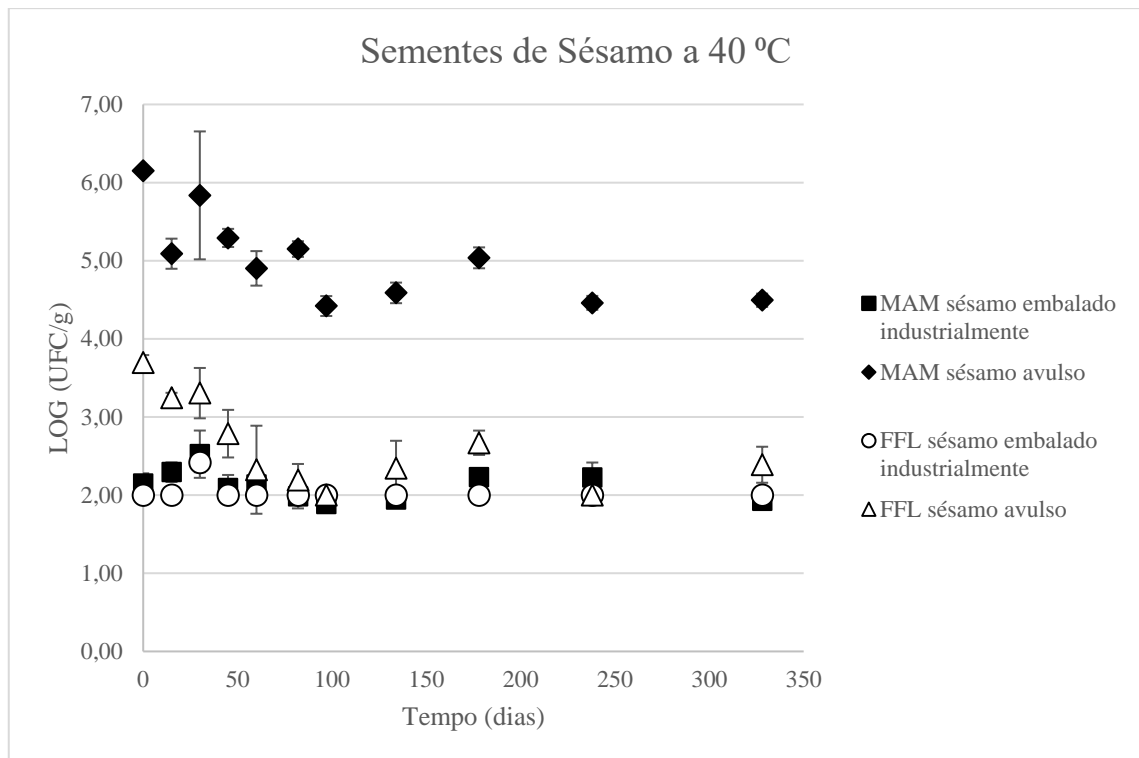


Figura 3.3. - Qualidade microbiológica das sementes de sésamo, ao longo do tempo, a 40 °C.

À temperatura de 40 °C (Figura 3.3.) observou-se uma redução mais acentuada do que a observada a 20 °C, das populações de MAM nas sementes de sésamo adquiridas avulso, durante os primeiros 97 dias de armazenamento, altura a partir da qual se registou uma estabilização dos níveis daqueles microrganismos. Os MAM diminuíram de 6,15 Log UFC/g para 4,42 Log UFC/g, tendo atingido níveis de 4,49 Log UFC/g no final do estudo.

No que diz respeito à população de FFL, observou-se também uma redução mais acentuada dos seus níveis durante o mesmo período. Os FFL diminuíram de 3,71 Log UFC/g, para 2,00 Log UFC/g, tendo-se enumerado no final do estudo 2,39 Log UFC/g, nas sementes de sésamo adquiridas avulso.

As sementes adquiridas previamente embaladas, não apresentaram variações do nível dos grupos microbianos estudados ao longo do tempo quando foram acondicionadas a 40 °C, tal como registado a 10 °C e a 20 °C (Figuras 3.1. e 3.2.). Estas sementes foram, provavelmente, submetidas a algum processo de tratamento (físico ou químico) antes do embalamento, o que permitiu a redução da microbiota inicial e justifica os níveis das populações microbianas estudadas ao longo do período de acondicionamento em que se realizou o estudo. Al-Bachir (2016) observou que o nível de MAM e fungos em amostras

de sésamo da Síria eram de 3,16 e 2,28 UFC/g, respetivamente e após 12 meses de armazenamento, à temperatura ambiente, os valores aumentaram para 4,17 e 2,81 UFC/g, respetivamente. O tratamento das sementes de sésamo por irradiação (gama) com doses de 9 kGy causou uma redução significativa da microbiota para valores abaixo do limite de deteção, durante 12 meses (Al-Bachir, 2016).

3.3.2. Sementes de linhaça resultantes de agricultura biológica vs. Sementes de linhaça resultantes de agricultura convencional

Compararam-se os níveis de MAM e de FFL em sementes de linhaça resultantes de agricultura biológica e de agricultura convencional (não biológica) disponíveis no mercado. Estudou-se também a variação dessas populações nas sementes acondicionadas a 10 °C, durante cerca de 11 meses (Figuras 3.4., 3.5. e 3.6.).

Inicialmente, as sementes biológicas possuíam uma população média de MAM de 5,74 Log UFC/g e de FFL de 4,61 Log UFC/g, enquanto as sementes de linhaça não biológica apresentaram níveis médios de MAM de 5,01 Log UFC/g e de FFL de 3,14 Log UFC/g.

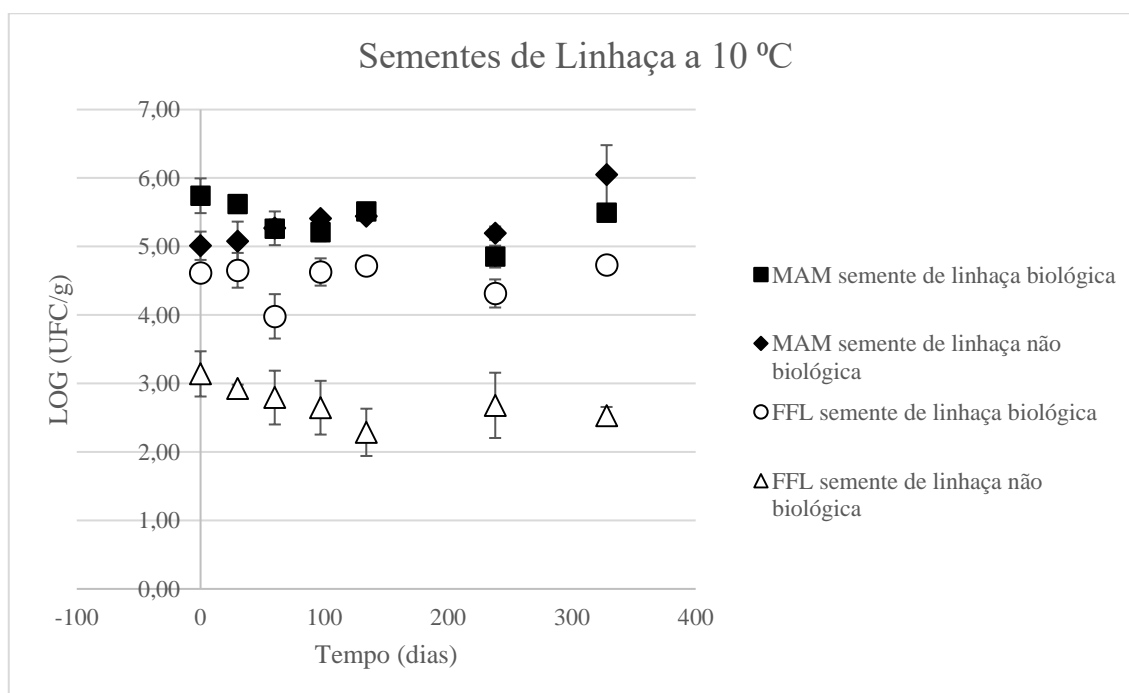


Figura 3.4. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 10 °C.

À temperatura de 10 °C (Figura 3.4.), a população de MAM variou ligeiramente nas duas amostras. No final do estudo, as sementes biológicas possuíam 5,49 Log UFC/g de MMA, enquanto as sementes não biológicas 6,05 Log UFC/g.

No que diz respeito à população de FFL, as sementes biológicas apresentaram no final do período de armazenamento um valor médio de 4,73 Log UFC/g e as não biológicas 2,53 Log UFC/g, tendo esta população apresentado, nestas sementes, uma tendência decrescente.

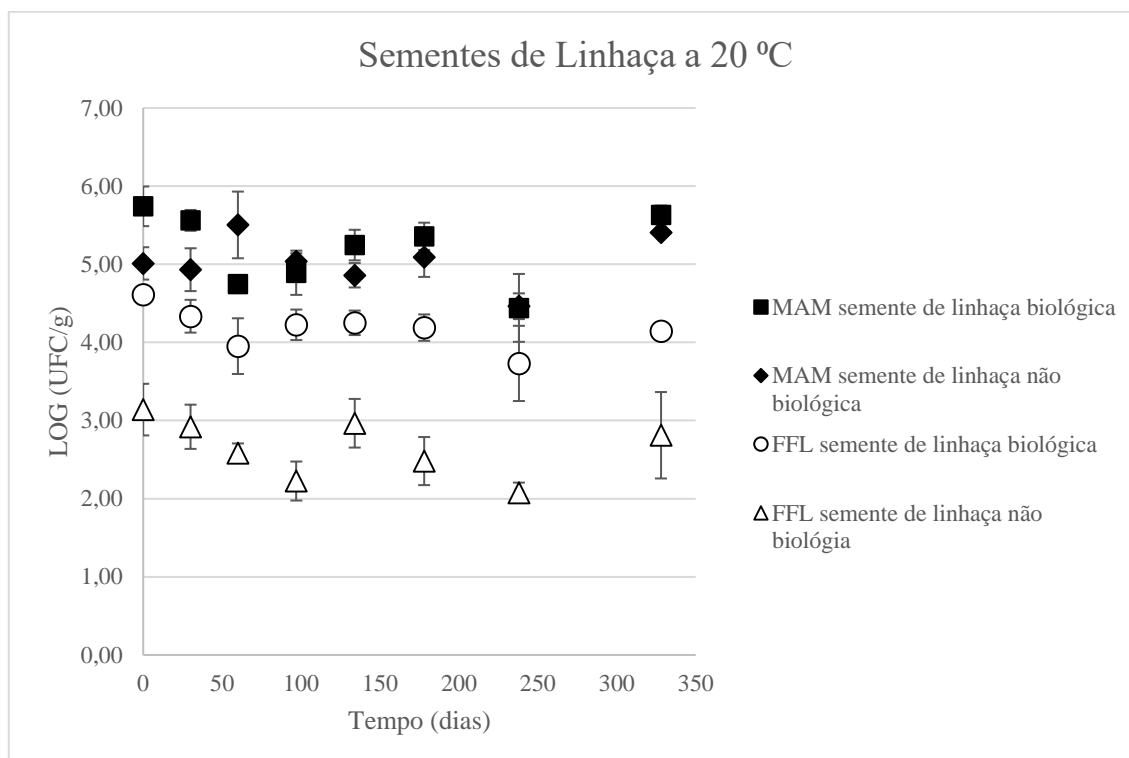


Figura 3.5. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 20 °C

À temperatura de 20 °C (Figura 3.5.), a população de MMA apresentou ligeiras variações ao longo do tempo, nas duas amostras, tal como a 10 °C. No final do período de acondicionamento, os MMA foram contabilizados em níveis médios de 5,63 Log UFC/g nas sementes biológicas, e em 5,41 Log UFC/g nas sementes não biológicas.

Quanto à população de FFL, tal como a 10 °C (Figura 3.4.), as sementes não biológicas mantiveram ao longo do tempo níveis de contaminação fúngica inferiores aos das sementes biológicas tendo sido registado no final do estudo valores médios de 2,81 Log UFC/g e 4,14 Log UFC/g, respetivamente.

Nos estudos de Shah et al. (2018) observou-se que a população de MAM se manteve praticamente inalterada ao longo de um período de armazenamento, durante 36 semanas.

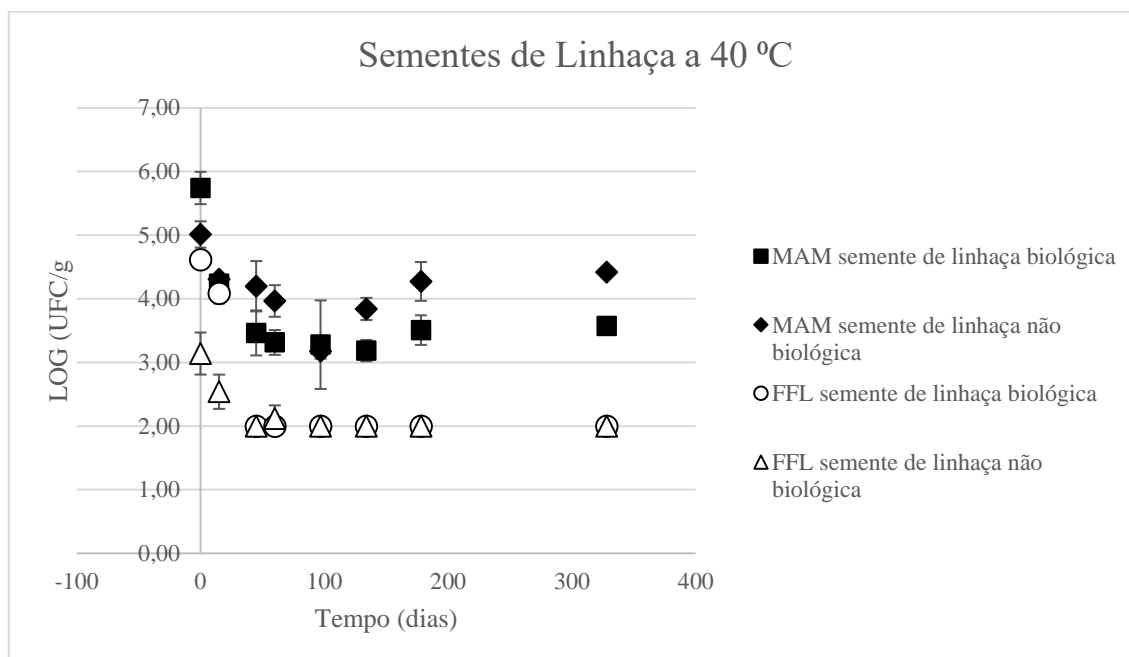


Figura 3.6. - Qualidade microbiológica das sementes de linhaça biológica e sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 40 °C

À temperatura de 40 °C (Figura 3.6.) a população de MAM sofreu uma redução acentuada em ambas as amostras, durante cerca de três meses, tendo-se registado nesta altura, valores médios de 3,28 Log UFC/g e 3,18 Log UFC/g, nas sementes biológicas e não biológicas, respetivamente. Seguidamente, observou-se um ligeiro aumento seguido de estabilização, e, no final do estudo enumerou-se 3,57 Log UFC/g e 4,42 Log UFC/g de MAM, nas sementes biológicas e não biológicas, respetivamente.

Relativamente à população de FFL, ambas as amostras apresentaram uma redução das populações deste grupo microbiano, durante os primeiros 45 dias. No caso das sementes de linhaça biológica a redução ultrapassou os dois ciclos logarítmicos e no caso das sementes obtidas por agricultura convencional, a redução correspondeu a cerca de um ciclo logarítmico. A partir desta altura, observou-se uma estabilização dos níveis médios de FFL, tendo-se enumerado no final do estudo valores médios de 2,00 Log UFC/g, para ambas as amostras.

3.3.3. Farinha de sementes de linhaça biológica vs. Farinha de sementes de linhaça não biológica

Com o mesmo objetivo do ponto 3.2.4., fez-se a mesma comparação entre as sementes de linhaça biológica moídas e a farinha de sementes de linhaça não biológica (ponto 3.2.3., farinha de sementes de linhaça avulso) a 10 °C, 20 °C e 40 °C, representadas nas Figuras 3.7., 3.8. e 3.9.

Inicialmente, a farinha biológica possuía uma população de MAM de 6,07 Log UFC/g e de FFL de 5,14 Log UFC/g, enquanto a farinha não biológica possuía níveis de MAM de 5,40 Log UFC/g e de fungos de 4,54 Log UFC/g.

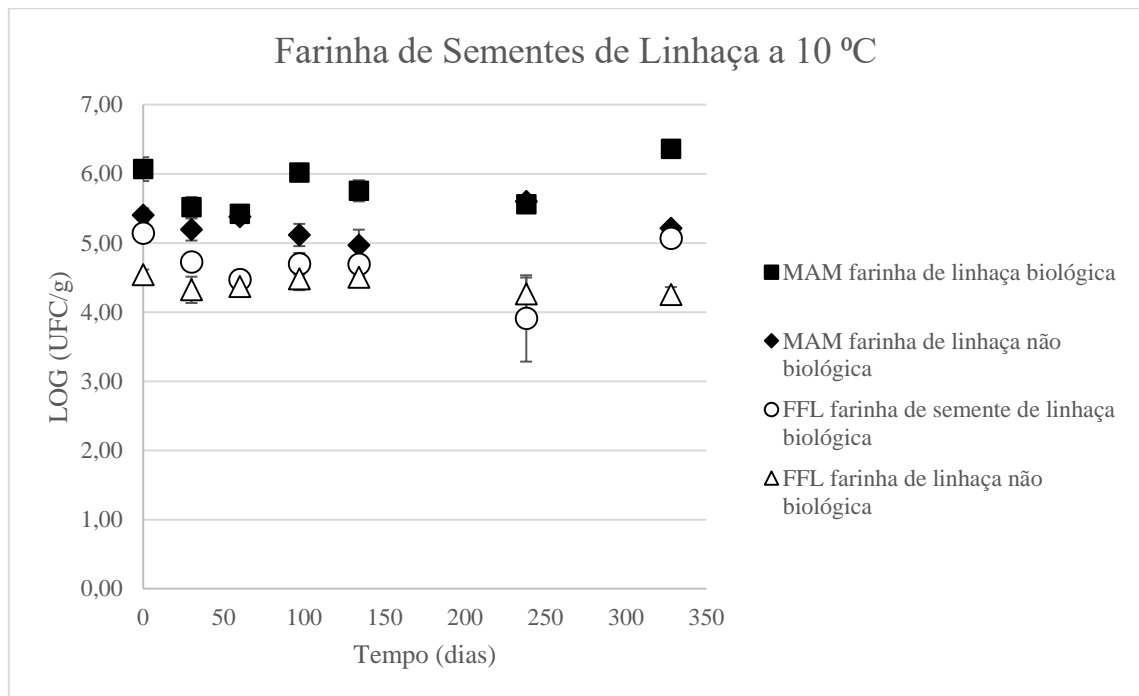


Figura 3.7. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 10 °C.

À temperatura de 10 °C (Figura 3.7.), a população de MAM variou ligeiramente nas duas amostras. No final do estudo a farinha obtida de sementes biológicas possuía 6,36 Log UFC/g de MMA, enquanto a farinha obtida de sementes não biológicas 5,21 Log UFC/g.

A população de FFL variou ligeiramente nas duas farinhas, tendo a farinha não biológica apresentado valores abaixo da farinha biológica. Nesta última, foram

enumerados no final do estudo 5,07 Log UFC/g de FFL. Na farinha não biológica foram enumerados no final do estudo 4,25 Log UFC/g de FFL, e no início 4,54 Log UFC/g.

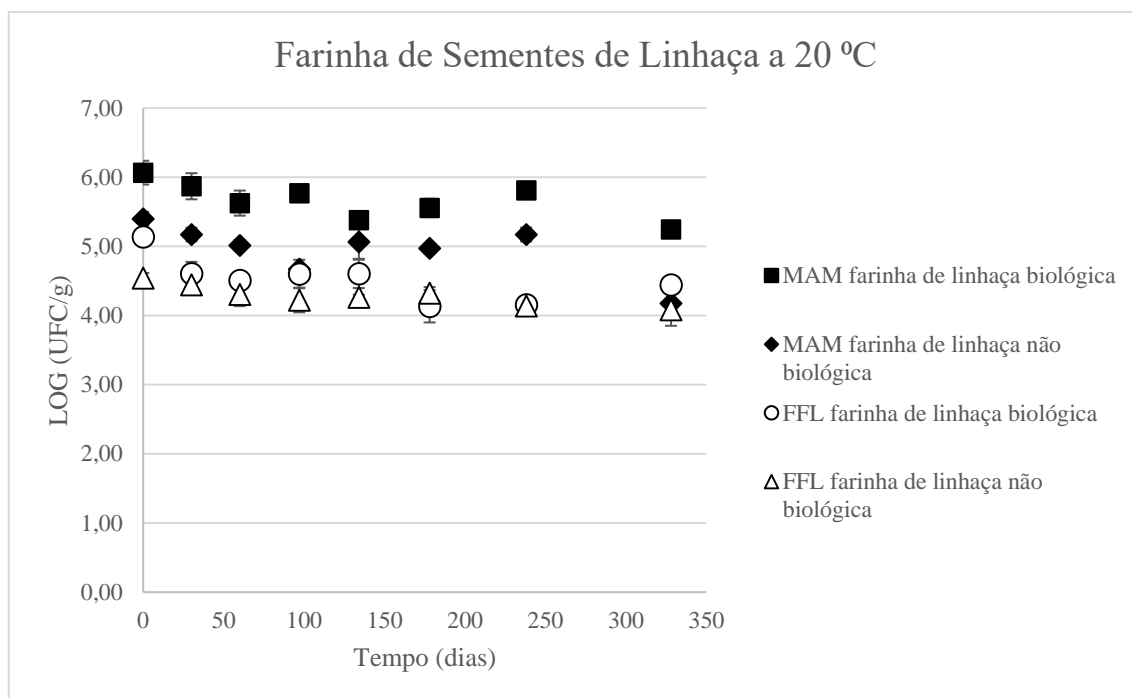


Figura 3.8. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 20 °C.

À temperatura de 20 °C (Figura 3.8.), pode observar-se que a população de MAM da farinha biológica foi sempre superior à da farinha não biológica. A farinha biológica possuía no início 6,07 Log UFC/g e no final 5,25 Log UFC/g, enquanto a não biológica tinha inicialmente 5,40 Log UFC/g e no fim do estudo apresentava 4,17 Log UFC/g.

No que diz respeito aos FFL, os valores enumerados nas duas farinhas ao longo do tempo foram semelhantes. A população de FFL na farinha biológica era de 5,14 Log UFC/g, e no final do estudo 4,45 Log UFC/g. A farinha não biológica tinha inicialmente 4,54 Log UFC/g de FFL e, no fim do estudo apresentava 4,09 Log UFC/g.

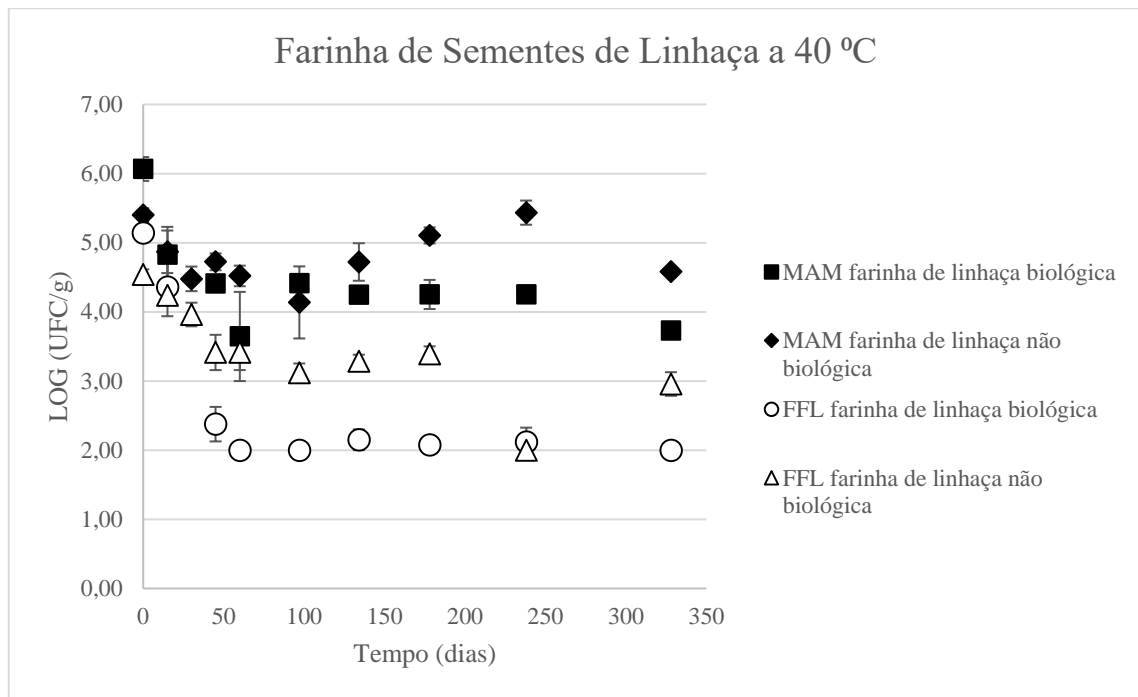


Figura 3.9. - Qualidade microbiológica da farinha de sementes de linhaça biológica e da farinha de sementes de linhaça não biológica, ao longo do tempo, a 40 °C.

À temperatura de 40 °C (Figura 3.9.) a população de MAM sofreu uma redução acentuada durante cerca de dois meses, no caso da farinha de linhaça biológica, e de três meses, no caso da farinha de linhaça não biológica. Assim, a farinha de linhaça biológica apresentou ao fim de dois meses uma redução de MAM superior a dois ciclos logarítmicos, tendo-se seguido um ligeiro aumento, uma estabilização e, no final do estudo, enumeraram-se 3,73 Log UFC/g. Os MAM sofreram uma redução superior a um ciclo logarítmico na farinha de linhaça não biológica tendo-se registado, nesta altura, valores médios de 4,14 Log UFC/g. Posteriormente, registou-se um novo aumento, e, quando o estudo terminou, enumerou-se uma população média de MAM de 4,58 Log UFC/g, nas sementes não biológicas.

Relativamente à população de FFL, ambas as amostras apresentaram uma redução das populações deste grupo microbiano, durante os primeiros sessenta dias. No caso da farinha de sementes de linhaça biológica a redução ultrapassou os três ciclos logarítmicos, tendo atingido valores de 2,00 Log UFC/g, valor que se manteve até ao final do estudo. No caso da farinha das sementes obtidas por agricultura convencional, a redução foi superior a um ciclo logarítmico, tendo-se atingido nesta altura 3,41 Log UFC/g. A partir

desta altura, observou-se uma ligeira subida dos níveis médios de FFL, tendo-se enumerado no final do estudo valores médios de 2,96 Log UFC/g.

As sementes estudadas neste trabalho foram obtidas de várias marcas comerciais, as quais eram originárias de países diferentes, pelo que os resultados obtidos na avaliação da qualidade microbiológica estão relacionados com fatores intrínsecos, mas também resultam das condições de produção e processamento nos diferentes produtores nas várias regiões do mundo. As sementes estão expostas a uma grande variedade de contaminantes, nomeadamente fungos. Este problema torna-se mais sério em alguns países onde as características do clima, as práticas agrícolas e as condições de armazenamento são propícias à proliferação fúngica e consequentemente à produção de toxinas (Aziz et al., (2007).

Os resultados obtidos alertam para a importância de melhorar as práticas de fabrico e higiene em todos os níveis da cadeia de produção para diminuir a contaminação do produto final. Deverão ser identificados os pontos críticos de controlo ao longo das várias operações de produção das sementes edíveis. Willis et al. (2009) alertam para a operação de secagem como uma etapa crítica a qual deveria incluir um tratamento adequado, por calor, para reduzir a microbiota indesejável. Outros autores (Torlak et al. 2013) referem que a torrefação das sementes, operação aplicada em algumas situações, contribui para o controlo de contaminações neste tipo de alimentos. Contudo, temperaturas muito altas podem afetar negativamente a qualidade nutricional das sementes edíveis. Em todas as situações em que são aplicados tratamentos de descontaminação devem ser acauteladas medidas para evitar as contaminações cruzadas posteriores.

4. Conclusão

4. Conclusão

No presente trabalho estudou-se a qualidade microbiológica de sementes edíveis e farinha de linhaça comercializadas no Algarve, no distrito Faro. Os resultados obtidos revelaram que, considerando os Microrganismos Aeróbios Mesófilos (MAM) (30 °C), 11,9 % das sementes foram classificadas de “Não satisfatórias” e 88,1 % “Satisfatórias” e “Aceitáveis”. Foram enumerados níveis relativamente elevados de Fungos Filamentosos o que permitiu classificar 33,3 % das amostras como “Não satisfatórias”, 38,89 % como “Aceitáveis” e 27,78 % como “Satisfatórias”. A farinha de linhaça foi o produto em que se encontrou um número maior de amostras classificadas como “Não satisfatórias”, seguida das sementes de girassol, sésamo e linhaça, tendo em conta o número de Fungos Filamentosos enumerados. As sementes de linhaça obtidas de agricultura biológica apresentaram populações médias de MAM e FFL superiores às resultantes de agricultura convencional. Esta situação também se observou no caso da farinha resultante destas sementes.

O número relativamente elevado de Fungos Filamentosos alerta o potencial destes alimentos como veículo de micotoxinas. Ao contrário dos Fungos Filamentosos, foram enumerados níveis relativamente baixos de leveduras, pelo que 58,73 % das amostras foram classificadas como “Satisfatórias” e as restantes como “Aceitáveis”. Contudo, não foram detetados *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. o que permite concluir que as amostras de sementes edíveis estudadas respeitam os critérios microbiológicos de higiene e segurança subjacentes aos regulamentos europeus.

O acondicionamento das embalagens de sementes de sésamo, linhaça e farinha de linhaça a 10 °C e 20 °C resultou em alterações ligeiras das populações de MAM e FFL estudados. Nos primeiros três meses de acondicionamento a 40 °C as populações microbianas de MAM e FFL enumeradas no sésamo, nas sementes de linhaça (biológica e não biológica) e na farinha de linhaça diminuiram.

A presença de Fungos Filamentosos em níveis que resultam numa classificação de “Não satisfatório” num elevado número de sementes edíveis estudadas, indica a importância de aumentar o controlo microbiológico em determinados pontos do processo de produção/processamento/armazenamento de sementes edíveis e a necessidade de melhorar as medidas de higiene a adotar durante todas as fases da cadeia incluindo a

distribuição e a venda deste tipo de alimentos. As indústrias de produção destes alimentos devem adotar as melhores práticas de fabrico de forma a baixar os números das diferentes populações microbianas existentes com o objetivo de diminuir o risco de degradação dos alimentos e os perigos para a saúde pública dos consumidores. Este estudo alerta ainda para a necessidade de estudar técnicas de descontaminação adequadas a este tipo de alimentos.

***5. Perspetivas
de trabalho
futuro***

5. Perspetivas de trabalho futuro

Após a realização do trabalho experimental e analisados os resultados, há alguns aspetos que merecem um estudo mais aprofundado tendo em conta as características destas matrizes alimentares que poderiam ser estudadas em trabalhos futuros, tais como:

- Estudar técnicas de descontaminação com o objetivo de diminuir as populações de fungos nas sementes edíveis (temperaturas elevadas, ozono, micro-ondas, irradiação gama);
- Identificar as espécies fúngicas que existem nas sementes e estudar a sua capacidade de produzir micotoxinas nestas matrizes alimentares;
- Comparar as espécies de fungos em sementes biológicas e não biológicas;
- Avaliar a presença de micotoxinas nas sementes edíveis comercializadas em Portugal;
- Avaliar as características nutricionais ao longo do período de armazenamento.

6. Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- Adams, M. R., Moss, M. O., McClure, P. J. (2016). *Food Microbiology*. 4th ed. Guildford, Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Al-Bachir, M. (2016). "Some microbial, chemical and sensorial properties of gamma irradiated sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds". *Food Chemistry* 197: 191-197.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M. (2013). "A New Approach in Sample Treatment Combined with UHPLC-MS/MS for the Determination of Multiclass Mycotoxins in Edible Nuts and Seeds." *Talanta* 115: 61-67.
- Aziz, N. H., El-Far, F. M., Shahin, A. A. M., Roushy, S. M. (2007). "Control of Fusarium moulds and fumonisin B1 in seeds by gamma-irradiation". *Food Control* 18: 1337-1342
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., Frankel, G. (2012). "Infection Strategies of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*." *Gut Microbes* 3: 71-87.
- Coates, W., Ayerza, R. (1998). "Commercial Production of Chia in Northwestern Argentina." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 1417-1420
- Cooney, R. V., Custer, L. J., Okinaka, L., Franke A. A. (2001). "Effects of Dietary Sesame Seeds on Plasma Tocopherol Levels." *Nutrition and Cancer* 39: 66–71
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., Finlay, B. B. (2013). "Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*." *Clinical Microbiology Reviews* 26: 822-880.
- Cruvinel, W. S., Costa, K. A. P., Teixeira, D. A. A., Da Silva, J. T., Epifanio, P.S., Costa, P. H. C. P., Fernandes, P. B. (2017). "Fermentation Profile and Nutritional Value of Sunflower Silage with Urochloa Brizantha Cultivars in the Off-Season." *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 18: 249-259.
- Edgson, V., Thomas, H. (2017). "Amazing Edible Seeds: Health-Boosting and Delicious Recipes Using Nature's Nutricional Power House". Londres: Jacqui Small.
- El-Soukkary, F. A. H. (2001). "Evaluation of Pumpkin Seed Products for Bread Fortification." *Plant Foods for Human Nutrition* 56: 365–384
- Fauci, A., Braunwald E., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J. L., Loscalzo. J. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. McGraw-hill education
- Ferreira, W. F. C., De Sousa, J. C. F., Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lisboa: LIDEL.
- Flax Council of Canada. n.d. "Growing Flax: Production, Management & Diagnostic Guide." Relatório
- FSAI (2012). "Bacteriological and Chemical Safety of Ready-to-Eat Dried Seeds and Ready-to-Eat Nuts (10NS1)," Relatório disponível em: www.fsai.ie/nutsandseedssurvey.html.
- Gandhiraj, D., Wesely, G., Palanisamy, A., Sahanapriya, S. (2018). "Prevalence of Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat." *International Journal of Food Microbiology* 8: 31-38

- Ganorkar, P. M., Jain, R. K. (2013). "Flaxseed - A Nutritional Punch." *International Food Research Journal* 20: 519-525.
- Gava, A. J., Da Silva, C. A. B., Frias, J. F. G. (2009). *Tecnologia de Alimentos - Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel Franquias S. A.
- Gupta, R.K., Das, S.K. (1997). "Physical Properties of Sunflower Seeds." *Journal of Agricultural Engineering Research* 66: 1-8.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., Tomás, M. C. (2008). "Physical Properties of Chia (*Salvia Hispanica* L.) Seeds." *Industrial Crops and Products* 28: 286-293.
- ISO 4833 – "Microbiologia de alimentos e alimentos para animais - Método horizontal para a enumeração de microrganismos - Técnica de contagem de colônias a 30 °C".
- ISO 21527 "Microbiologia de alimentos e alimentos para animais - Método horizontal para a enumeração de leveduras e bolores - Parte 1: Técnica de contagem de colônias em produtos com atividade de água superior a 0,95".
- ISO 16649 – "Microbiologia de alimentos e alimentação animal - Método horizontal para a enumeração de *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva - Parte 2: Técnica de contagem de colônias a 44 °C com 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronídeo".
- ISO 6579:2002 – Método horizontal para a detecção de *Salmonella* sp..
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). "Modern Food Microbiology. Food Science Text Series". 7th ed. New York: Springer.
- Keller, S. E., Anderson, N. M., Wang, C., Burbick, S. J., Hildebrandt, I. M., Gonsalves, L. J., Suehr, Q. J., Farakos, S. M. S. (2018). "Survival of *Salmonella* during Production of Partially Sprouted Pumpkin, Sunflower, and Chia Seeds Dried for Direct Consumption." *Journal of Food Protection* 81: 520-527.
- Kislev, M. E., Simchoni, O., Melamed, Y. Maroz, L. (2011). "Flax Seed Production: Evidence from the Early Iron Age Site of Tel Beth-Shean, Israel and from Written Sources." *Vegetation History and Archaeobotany* 20: 579-584.
- Lazos, E. S. (1986). "Nutritional, Fatty Acid, and Oil Characteristics of Pumpkin and Melon Seeds." *Journal of Food Science* 51: 1382-1283.
- Lemes, E. S., Almeida, A. S., Meneghello, G. E., De Tunes, L. M., Villela, F. A. (2010). "Germinação e Vigor de Sementes de Abóbora Tratadas Com Tiametoxam." *Pesquisa Agropecuária Tropical* 34: 122-127.
- Montesano, D., Blasi, F., Simonetti, M., Santini, A., Cossignani, L. (2018). "Chemical and Nutritional Characterization of Seed Oil from *Cucurbita maxima* L. (Var. Berrettina) Pumpkin." *Foods* 7: 1-14.
- Morgan, G., Isakeit, T., Falconer, L. (2010). "Profitable Flax Production Keys to in Texas Uses of Flax," *Agrilife Extension*, Texas A&M System
- Nascimento, M. S., Brum, D. M., Pena, P. O., Berto, M. I., Efraim, P. (2012). "Inactivation of *Salmonella* during cocoa roasting and chocolate conching." *International Journal of Food Microbiology* 159: 225-229.
- Norma Portuguesa 4400 "Microbiologia alimentar, Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies), Parte 1: Técnica com confirmação de colônias Método corrente" de 2002.

- Pathak, N., Bhat, K. V., Kumari, R., Rai, A. K. (2014). "Value Addition in Sesame: A Perspective on Bioactive Components for Enhancing Utility and Profitability." *Pharmacognosy Reviews* 8: 147-155.
- Prasad, M. N., Sanjay, K. R., Prasad, D. S., Vijay, N., Kothari, R., Swamy, S. N. (2012). "A Review on Nutritional and Nutraceutical Properties of Sesame." *Journal of Nutrition & Food Sciences* 2: 1-6.
- Podolak, R., Enache, H., Stone, W., Black, D. G., Elliot, P. (2010). "Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in lowmoisture foods". *Journal of Food Protection* 73: 1919-1936.
- Quintas, C. (2011) Fruit and Vegetables: Microorganisms and Safety. In Cruz, R. (ed) *Practical Food and Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc. 67-88.
- RASSF - Rapid Alert System for Food and Feed. Portal disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>, acessado a 23/11/2018
- Ray, S. K., Dhakal, D., Regmi, C., Yamaguchi, T., Lee, S. L. (2018). "Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Visible Light by Morphology Tuned α -NiMoO₄." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 350: 59-68.
- Regulamento CE, 15/11/2005. Regulamento 2073/2005. European Union Office Journal Legislation. 338, 1-26.
- Regulamento CE, 5/12/2007. Regulamento 1441/2007. European Union Office Journal Legislation. 322, 1-12.
- Robertson, J. A., Chapman, G.W., Wilson, R. L., Russel, R. B., (1984). "Effect of moisture content of oil type sunflower seed on fungal growth and seed quality during storage". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 768-771.
- Roche, J., Alignan, M., Bouniols, A., Cerny, M., Mouloungui, Z., Vear, F., Merah, O. (2010). "Sterol Content in Sunflower Seeds (*Helianthus Annuus* L.) as Affected by Genotypes and Environmental Conditions." *Food Chemistry* 121: 990-995.
- Sales, M. A. L., Moreira, F. J. C., Ribeiro, A. A., Monteiro, R. N. F., Sales, F. A. L. (2015). "Potencial Das Sementes de Abóbora Submetidas a Diferentes Períodos de Embebição." *Brazilian Journal of Biosystems Engineering* 9: 289-297.
- Santos, M., Correia, C., Cunha, M., Saraiva, M., Novais, M. (2005). "Valores Guia Para Avaliação Da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados Em Estabelecimentos de Restauração." *Revista Da Ordem Dos Farmacêuticos* 64: 66-68.
- Sen, M., Bhattacharyya, D. K. (2000). "Nutritional Quality of Sunflower Seed Protein Fraction Extracted with Isopropanol." *Plant Foods for Human Nutrition* 55: 265-278.
- Shah, M., Eklund, B., Conde Lima, L. G., Bergholz, T., Hall, C. (2018) "Microbial and Chemical Shelf-Life of Vacuum Steam-Pasteurized Whole Flaxseed and Milled Flaxseed." *Journal of Food Science* 83: 300-308.
- Silva, D., Oliveira, M. Quintas, C. (2017). "Microbiological quality of seeds sold at supermarkets in Southern Portugal". In International Congress on Engineering and Sustainability in the XXI Century -INCREaSE 2017.

- Singleton, P., Sainsbury, D. (1987). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. Chichester: John Wiley and Sons. 2nd ed. New York: Wiley.
- Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt., D. E. (1984). "Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 928-931.
- Tamber, S., Swist, E., Oudit, D. (2016). "Physicochemical and Bacteriological Characteristics of Organic Sprouted Chia and Flax Seed Powders Implicated in a Foodborne Salmonellosis Outbreak." *Journal of Food Protection* 79: 703-709.
- Terefe, G., Wakjira, A., Berhe, M., Tadesse, H. (2012). "Sesame Production Manual." *Ethiopian Institute of Agricultural Research, Embassy of the Kingdom of the Netherlands*.
- Torlak, E., Sert, D., Serin, P. (2013). "Fate of *Salmonella* during sesame seeds roasting and storage of tahini" *International Journal of Food Microbiology* 163: 214-217.
- Unicomb, L. E., Simmons, G., Merritt, T., Gregory, J., Nicol, C., Jelfs, P., Kirk, M., Kirk, M., Tan, A., Thomson, R., Adamopoulos, J., Little, C. L., Currie, A., Dalton, C. B. (2005). "Sesame Seed Products Contaminated with *Salmonella*: Three Outbreaks Associated with Tahini." *Epidemiology and Infection* 133: 1065-1072.
- USDA - United States Department of Agriculture, disponível em: <https://www.usda.gov/>, acessado a 22/11/2018.
- Weber, C. W., Gentry, H. S., Kohlhepp, E. A., Mccrohan, P. R. (1991). "The Nutritional and Chemical Evaluation of Chia Seeds." *Ecology of Food and Nutrition* 26: 119-125.
- Willis, C., Little, C. L., Sagoo, S., De Pinna, E., Threlfall, J. (2009). "Assessment of the Microbiological Safety of Edible Dried Seeds from Retail Premises in the United Kingdom with a Focus on *Salmonella* spp." *Food Microbiology* 26: 847-852.
- Wilson, M., Lindsay, J. Grounds, P. (2013). "Survey of Dried and Edible Nuts , Seeds and Nut and Seed Products Available in New Zealand" Relatório do Governo da Nova Zelândia.