

FICOGASTRONOMIA

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO CONVENCIONAIS
E INOVADORAS EM ALGAS MARINHAS DA COSTA PORTUGUESA

BRUNO SOUZA MOREIRA LEITE

Mestre em Ciências Gastronómicas

DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Universidade NOVA de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Setembro, 2023

FICOGASTRONOMIA

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO CONVENCIONAIS E
INOVADORAS EM ALGAS MARINHAS DA COSTA PORTUGUESA

BRUNO SOUZA MOREIRA LEITE

Mestre em Ciências Gastronómicas

Orientadora: Maria Paulina Estorninho Neves da Mata,
Professora Auxiliar Aposentada, FCT-NOVA

Coorientadores: Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz,
Professor Associado, FCT-NOVA
João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, FCT-NOVA

Júri:

Presidente: Eurico José da Silva Cabrita,
Professor Catedrático, FCT-NOVA

Arguentes: Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira,
Professor Associado com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Margarida Gomes Moldão Martins,
Professora Associada com Agregação, Instituto Superior de Agronomia
da Universidade de Lisboa

Orientador: Maria Paulina Estorninho Neves da Mata,
Professora Auxiliar Aposentada, FCT-NOVA

Membros: Maria João Cabrita,
Professora Associada com Agregação, Escola de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Évora

António Manuel Barros Marques,
Investigador Principal, Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA)

Eurico José da Silva Cabrita,
Professor Catedrático, FCT-NOVA

Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço,
Professora Auxiliar, FCT-NOVA

DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Universidade NOVA de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Setembro, 2023

FICOGASTRONOMIA: Aplicação de Técnicas de Conservação Convencionais e Inovadoras em Algas Marinhas da Costa Portuguesa

Copyright © Bruno Souza Moreira Leite, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a 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.



*Ao meu avô:
não necessariamente um homem das “letras”,
embora soubesse governar como ninguém
o silêncio e o uso das palavras certas.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus orientadores Paulina Mata, Mário Diniz e João Paulo Noronha, pelas palavras de apoio, atenção e recursos (não necessariamente monetários) despendidos no presente trabalho.

Meu especial obrigado a Paulina que tem sido uma grande fonte de inspiração ao longo dos últimos anos. Com ela aprendi, entre muitas coisas, que o talento se manifesta de diversas formas e que é preciso ter um olhar aguçado (ou seria edulcorado?), pelo tempo e sabedoria, de maneira a conseguir extrair o melhor das pessoas, em particular, que fazem do Mestrado em Ciências Gastronómicas (MCG) parte de sua trajetória.

Não poderia deixar de agradecer aos centros de investigação LAQV e UCBIO pelo apoio logístico que foi necessário durante o trabalho experimental desta tese de doutorado. Tampouco poderia deixar de fora a NOVA.ID que me agraciou com uma bolsa de investigação, ajuda necessária para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao aprendizado e à docência, sem ter outras distrações pelo percurso.

Ao Departamento de Química e todas as pessoas que colaboraram com o presente trabalho, especialmente a nossa presidente Ana Aguiar Ricardo, a minha coordenadora no MCG Ana Lourenço, ao meu coordenador do programa doutoral Marco Silva e ao Nuno Costa que esteve sempre disponível para me ajudar, com um sorriso estampado, nos momentos em que precisei de alguma coisa. Aos investigadores dos laboratórios Biotox (Inês Ferreira e Edgar Ramalho), SPQ (Flávia Freitas) e MEtRICS (Ana Luísa Fernandes e Carolina Rodrigues). Àqueles não mencionados aqui, mas que colaboraram de alguma forma, o meu eterno agradecimento.

Sou igualmente grato ao Fundo Europeu de Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas (FEAMP) e ao MAR2020 por terem tornado possível o projeto Alga4Food, que me permitiu ir muito além do esperado no trabalho de investigação das algas marinhas portuguesas.

Ao Rafael Antunes, que além de orientando, foi um grande assistente nas tarefas desempenhadas durante o trabalho experimental. Aos colegas de projeto e amigos pessoais, Abigail Salgado, Bruno Campos e Patrícia Gabriel. Aos ex-colegas de mestrado, que ainda compartilham comigo o prazer do convívio (sempre em torno da boa mesa), Sónia Oliveira, Glória Rabanée, Miriam Santos, Teresa Pinto e Maria José.

Meu especial agradecimento à Maria João Cabrita e ao Nuno Martins do Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (MED) da Universidade de Évora que foram fundamentais para o trabalho de cromatografia que perfaz grande parte da presente tese. Além disso, não poderia deixar de agradecer a todos os professores do Programa Doutoral de Química dos Alimentos, com destaque para o professor Paulo Infante que tanto se disponibilizou para ajudar com as dúvidas relativas aos tratamentos estatísticos.

Agradeço também às demais pessoas e instituições que colaboraram de alguma forma com o presente trabalho: ao Leonel Pereira e ao João Cotas da Universidade de Coimbra, ao Manuel Malfeito e à Ana Carla Silva do Instituto Superior de Agronomia, ao Jorge Saraiva e à Jéssica Tavares da Universidade de Aveiro, à Isabel Braga (Air Liquide), ao Benjamim Abecasis e ao Sérgio Fernandes (Vitacress) e ao Tiago Morais (Lusalgae).

À minha família, sempre presente nos momentos difíceis e de celebração. Em particular, à minha mãe pelo seu amor incondicional e suporte a todo momento. À minha avó pelos ensinamentos de vida que permitiram gerir as dificuldades de maneira mais leve e com sabedoria. Ao meu irmão, ao meu pai, à dinda Rosinha e aos primos Tommy & Alan que são parte integrante e irrestrita da minha família nuclear.

Ao meu companheiro Ranieri Marinho Paes pelo apoio, afeto e gentileza; aos meus filhos de quatro patas, Saldanha e Bebel, pela companhia e festinhas (mesmo que pagos em comida húmida), ao meu “psicanalista selvagem” e *roommate* Bruno Zorek e a minha terapeuta “de facto” Adriana.

A todos os amigos que torceram por mim durante esta jornada: Patrícia Gomensoro, Gisela Abrantes, Miguel Jesus, António Quaresma, Jéssica Torres, Ana Salles, Bárbara Cassará, Whalton Hippertt, Nicolás Bobzin, Alexandre Hudson, Jeferson Malachini Barroso, Luís da Silva, Ciça Roxo, Miram Chaachaat, Teresa Corção ... (espero não ter me esquecido de mais ninguém)

Por fim, gostaria de agradecer, com açúcar e com afeto, à vida... grande dádiva e beleza que nem sempre é doce, mas que nunca deixa de proporcionar momentos inesquecíveis!

Resumo

As algas são uma relevante fonte de recursos biológicos, explorados em diversas áreas de pesquisa. No ocidente, o aumento no interesse pelas algas marinhas enquanto alimento pode ser explicado por uma crescente percepção dos consumidores relativamente aos seus possíveis benefícios para a saúde. A grande maioria dos trabalhos académicos busca algum benefício, nutricional ou económico, que as algas marinhas possam promover nas formulações alimentares, não sendo destacado o seu valor enquanto elemento de sabor, textura e cor. Além disso, as técnicas de conservação atualmente usadas não preservam os principais aspetos organoléticos das mesmas.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o impacto de diversas técnicas de processamento e conservação sobre as características intrínsecas de algumas algas marinhas, tirando proveito dos resultados obtidos para o desenvolvimento de novos produtos que ajudem a promover as macroalgas portuguesas enquanto recurso alimentar.

Para tal, inicialmente, o perfil nutricional (proteínas, lípidos e minerais) e de voláteis, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), das macroalgas estudadas foram avaliados: *Codium tomentosum* e *Ulva* spp. (Chlorophyta); *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Chondrus crispus*, *Gracilaria gracilis* e *Porphyra* spp. (Rhodophyta); *Fucus vesiculosus*, *Saccorhiza polyschides* e *Undaria pinnatifida*. (Phaeophyceae).

Prosseguiu-se com a caracterização dos produtos resultantes de diferentes técnicas de processamento e conservação (congelamento, salga, secagem e liofilização), em termos de voláteis. Posteriormente, realizaram-se dois ensaios destinados a investigar o impacto de técnicas de processamento mínimo nas amostras tratadas – em particular, o tratamento por altas pressões (HPP) e o embalamento em atmosferas protetoras, incluindo vácuo e atmosferas modificadas (MAP). Adicionalmente, avaliou-se o efeito do armazenamento refrigerado pelo período de 15 e 90 dias (MAP e HPP, respetivamente), através de análises microbiológicas e relacionadas com as principais mudanças físico-químicas.

Foi constatado que as algas marinhas estudadas apresentam uma composição nutricional semelhante àquela descrita na literatura, caracterizando-se por serem ricas em proteínas (30,33% DW em *P. umbilicalis*) e minerais (55,93% DW em *C. tomentosum* e 44,34% DW em *S. polyschides*),

enquanto apresentam baixo teor lipídico (de 1 a 2% DW para a maioria das algas marinhas).

A análise dos perfis de voláteis por meio de GC-MS revelou uma notável diversidade de compostos, totalizando 124 VOCs distintos, com destaque para as macroalgas vermelhas *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus* e *P. umbilicalis*. Adicionalmente, observou-se que um conjunto reduzido de VOCs, pertencentes às categorias de aldeídos, álcoois e cetonas, parece desempenhar um papel significativo nas notas aromáticas associadas às algas marinhas examinadas.

A principal conclusão extraída dos resultados foi que as algas são organismos de grande complexidade e que não existe um método de preservação universalmente superior para todas as espécies de macroalgas. A liofilização demonstrou ser mais eficaz na conservação dos perfis de aroma de *U. pinnatifida*, *C. teedei* var. *lusitanicus* e *G. gracilis*, a salga revelou-se eficaz em *C. tomentosum*, enquanto a secagem destacou-se na preservação de *F. vesiculosus*.

O HPP mostrou-se particularmente eficaz em estender a vida de prateleira, em termos de segurança alimentar, de *O. pinnatifida* pelo período de pelo menos 90 dias, ao mesmo tempo em que conservou melhor as características de cor e aroma de *C. tomentosum*. O MAP, revelou-se superior ao envasamento a vácuo e em atmosfera ambiente (controlo), em particular de *U. lactuca* que respondeu melhor ao tratamento em termos de preservação das propriedades sensoriais. Por outro lado, *P. umbilicalis* apresentou contagens microbianas abaixo do limite de quantificação no término do período de armazenagem de 15 dias.

Palavras-chave: Algas marinhas; Processamento e conservação de alimentos; Análise instrumental e sensorial; Propriedades organoléticas; Novos produtos alimentares

Abstract

Seaweeds are a significant source of biological resources, which are studied in several areas of research. In the West, the growing interest in seaweeds as food can be attributed to an increasing consumer awareness about their potential health benefits. Most of the academic studies focus on the nutritional or economic benefits that seaweeds can deliver to food formulations, however their value as components of flavor, texture, and color is not highlighted. Furthermore, the preservation techniques currently in use do not maintain their main organoleptic characteristics.

The objective of this work was to study the impact of various processing and preservation techniques on the fundamental characteristics of some seaweeds, leveraging the results obtained for the development of new products that help promote Portuguese macroalgae as a food resource.

To this end, initially, the nutritional (proteins, lipids, and minerals) and volatiles, through gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), of the studied macroalgae were evaluated: *Codium tomentosum* e *Ulva* spp. (Chlorophyta); *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Chondrus crispus*, *Gracilaria gracilis* e *Porphyra* spp. (Rhodophyta); *Fucus vesiculosus*, *Saccorhiza polyschides* e *Undaria pinnatifida*. (Phaeophyceae).

This was followed by the characterization of the products resulting from different processing and conservation techniques (freezing, salting, drying, and freeze-drying), in terms of volatile components. Subsequently, two trials were carried out to investigate the impact of minimal processing techniques on the treated samples – particularly, high-pressure processing (HPP) and packaging in protective atmospheres, including vacuum and modified atmospheres (MAP). Additionally, the effects of refrigerated storage over a period of 15 and 90 days (MAP and HPP, respectively), were evaluated through microbiological analyses and the main physicochemical changes.

It was found that the seaweed studied had a nutritional composition similar to that described in the literature, characterized by being rich in proteins (30.33% DW in *P. umbilicalis*) and minerals (55.93% DW in *C. tomentosum* and 44.34% DW in *S. polyschides*), while they have low lipids content (from 1 to 2% DW for most seaweeds).

The analysis of volatile profiles by GC-MS revealed a remarkable diversity of compounds, comprising 124 distinct VOCs, with emphasis on the

red macroalgae *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus* and *P. umbilicalis*. Additionally, it was observed that a reduced set of VOCs, belonging to the categories of aldehydes, alcohols and ketones, appear to play a significant role in the aromatic notes associated with the seaweed examined.

The main conclusion drawn from the results was that seaweeds are organisms of great complexity and that there is no single treatment that proves to be superior for all macroalgae species. Freeze-drying proved to be more effective in maintaining the aroma profiles of *U. pinnatifida*, *C. teedei* var. *lusitanicus* and *G. gracilis*, salting displayed superior efficacy for *C. tomentosum*; while drying excelled in preserving *F. vesiculosus*.

HPP was particularly effective in extending the shelf life, in terms of food safety, of *O. pinnatifida* for at least 90 days, while also better preserving the color and aroma characteristics of *C. tomentosum*. MAP proved to be superior to vacuum packaging and ambient atmosphere (control), particularly for *U. lactuca*, by better preserving its sensory properties. On the other hand, *P. umbilicalis* showed microbial counts below the quantification limit at the end of the 15-day storage period.

Keywords: Seaweeds; Food processing and conservation; Instrumental and sensory Analysis; Organoleptic properties; New food products

Publicações, Capítulos de Livros, Comunicações Orais e Pósteres

Artigos Científicos em Revistas Internacionais Indexadas

- Bruno Moreira-Leite; Rafael Antunes; João Cotas; Nuno Martins; Nuno Costa; João P. Noronha; Paulina Mata; Mário Diniz. "Modified Atmosphere Packaging (MAP) for Seaweed Conservation: Impact on Physicochemical Characteristics and Microbiological Activity". *Foods* (2023): <https://doi.org/10.3390/foods12142736>.
- Abigail Salgado; Bruno Moreira-Leite; Anabela Afonso; Paulo Infante; Paulina Mata. "Chocolates enriched with seaweed: Sensory profiling and consumer segmentation". *International Journal of Gastronomy and Food Science* (2023): <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100747>.

Artigos Científicos em Revistas Internacionais

- Milinovic, Jelena; Fernando, Ana Luísa; Campos, Bruno; Moreira Leite, Bruno; Mata, Paulina; Diniz, Mário; Sardinha, José A.; Noronha, João Paulo. "Nutritional Benefits of Edible Macroalgae from the Central Portuguese Coast: Inclusion of Low-Calorie Sea Vegetables in Human Diet". *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* 28 5 (2021): <http://doi.org/10.19080/ijesnr.2021.28.556250>.

Artigos / Resumos em Anais de Conferências Revisados por Pares

- Moreira Leite, Bruno; Campos, Bruno; Mata, Paulina; Noronha, João Paulo; Diniz, Mário. "Are seaweeds the food of the future? Challenges for its conservation and introduction in the Portuguese diet". Trabalho apresentado em 3º Congresso Internacional do CiiEM: Research and Innovation in Human & Health Sciences, Caparica, 2019. Resumo publicado em: *J. Ann. Med.* 2019, 169, (Sup. 1). <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1562018>.

Capítulos de Livro

- Moreira-Leite, Bruno; Noronha, João Paulo; Mata, Paulina. "Introduction of seaweeds in desserts: The design of a sea lettuce ice cream". In *Experiencing Food, Designing Sustainable and Social Practices*, 73-79. Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRC Press, 2020. <https://doi.org/10.1201/9781003046097-12>.

Outras Publicações

- Moreira Leite, Bruno; Campos, Bruno; Gabriel, Patrícia; Diniz, Mário; Noronha, João Paulo; Mata, Paulina. "Introducing macroalgae from the Portuguese Coast in the diet of consumers: Challenges and strategies". Trabalho apresentado em *3rd Cook and Health Conference, Lisboa*, 2019. Resumo publicado em *MENU Journal 8th edition (December 2019) – Special Issue: 3rd Cook and Health Conference*. Disponível em: http://recherche.institutpaulbocuse.com/medias/fichier/menu-8-special-issue-cook-and-health-conference_1579273717885-pdf.

Comunicações Orais

- Moreira-Leite, Bruno. "Response Surface Methodology as an Optimization Tool in the Analysis of Seaweeds Volatile Organic Compounds". IV *Encontro de Estudantes de Doutorado em Ambiente e Agricultura (EEDAA), Universidade de Évora (Évora, Portugal)*, 2019.

Pósteres em Conferências

- Moreira-Leite, Bruno; Campos, Bruno; Noronha, João Paulo; Mata, Paulina; Diniz, Mário. "Strategies to solve challenges in seaweeds conservation and its introduction into the Portuguese diet". Trabalho apresentado em *Ciência 2023 - Encontro com a Ciência e Tecnologia em Portugal - Ciência e oceano para além do horizonte*, 2023.
- Moreira-Leite, Bruno; João Paulo Noronha; Paulina Mata. "The Impact of High-Pressure Processing on the Volatile Organic Compounds Profile of '*Codium tomentosum*' Seaweed". Trabalho apresentado em *11o Encontro Nacional de Cromatografia (11ENC)*, 2019.
- Abigail Salgado; Bruno Moreira-Leite; João Paulo Noronha; Paulina Mata. "Seaweed Bonbons: Science-based food product development". Trabalho apresentado em *2nd International Food Design and Food Studies Conference*, 2019.

- Abigail Salgado; Moreira-Leite, Bruno; João Paulo Noronha; Paulina Mata. "Novel Sweet Food Products with Sea Lettuce (*Ulva* spp.): A science-based food product development". Trabalho apresentado em Workshop "*Macroalgas da Costa Portuguesa: Uma abordagem económica e nutricional*", 2019.
-

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXVII
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	XXIX
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XXXI
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ORGANOLÉTICA DAS ALGAS MARINHAS ESTUDADAS.....	9
2.1 Revisão Bibliográfica.....	9
2.1.1 Classificação das Algas	9
2.1.1.1 Tamanho	9
2.1.1.2 Pigmentos Fotossintéticos	10
2.1.2 Composição Nutricional das Algas Marinhas.....	10
2.1.2.1 Proteínas e Aminoácidos.....	10
2.1.2.2 Hidratos de Carbono	13
2.1.2.3 Lípidos	19
2.1.2.4 Vitaminas, Minerais e Oligoelementos	19
2.1.2.5 Compostos Bioativos	21
2.1.3 Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)	23
2.2 Materiais e Métodos	27
2.2.1 Matérias-Primas	27
2.2.1.1 Coleta	28
2.2.1.2 Cultivo.....	29
2.2.2 Composição Nutricional das Algas Marinhas.....	30
2.2.2.1 Determinação da Umidade e das Cinzas	30
2.2.2.2 Quantificação das Proteínas Totais (Kjeldahl)	31
2.2.2.3 Quantificação dos Lípidos Totais (Gravimetria)	32
2.2.3 Perfil de VOCs das Algas Marinhas (GC-TOF-MS).....	33
2.2.4 Análise Estatística	35
2.3 Apresentação e Discussão dos Resultados	35
2.3.1 Composição Nutricional das Algas Marinhas.....	35
2.3.2 Perfil de VOCs das Algas Marinhas	39
2.3.3 Considerações Finais.....	58

3 O IMPACTO DAS TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO “CONVENCIONAIS” EM ALGAS MARINHAS.....59

3.1	Revisão Bibliográfica.....	59
3.1.1	Tipos de Deterioração Alimentar	59
3.1.1.1	Decomposição Microbiológica	61
3.1.2	Vida de Prateleira	63
3.1.3	Técnicas de Conservação “Convencionais”	64
3.1.3.1	Primeiras Técnicas de Conservação: uma retrospectiva histórica	65
3.1.3.2	As Contribuições do Século das Luzes.....	67
3.1.3.3	O Panorama Atual.....	67
3.1.4	Tratamentos Térmicos.....	69
3.1.4.1	Conservação pelo Calor.....	69
3.1.4.2	Conservação pelo Frio	74
3.1.5	Tratamentos Não-Térmicos.....	80
3.1.5.1	Tratamentos Químicos.....	80
3.2	Ensaio de Conservação Materiais e Métodos	88
3.2.1	Ensaio de Conservação Processamento das Matérias-primas	88
3.2.1.1	Congelamento (Controlos).....	88
3.2.1.2	Salga	88
3.2.1.3	Secagem	89
3.2.1.4	Liofilização	89
3.2.2	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS)	89
3.2.3	Análise Estatística	89
3.3	Apresentação e Discussão dos Resultados	90
3.3.1	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis	90
3.3.1.1	<i>Undaria pinnatifida</i> (Phaeophyceae)	92
3.3.1.2	<i>Fucus vesiculosus</i> (Phaeophyceae).....	96
3.3.1.3	<i>Codium tomentosum</i> (Chlorophyta).....	100
3.3.1.4	<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (Rhodophyta).....	104
3.3.1.5	<i>Gracilaria gracilis</i> (Rhodophyta).....	107
3.3.1.6	Discussão dos Resultados	110
3.3.2	Considerações Finais.....	118

4 ALIMENTOS MINIMAMENTE PROCESSADOS E O USO DE ALTAS PRESSÕES (HPP) EM ALGAS MARINHAS.....121

Revisão Bibliográfica	121
4.1.1 Alimentos Minimamente Processados	121
4.1.2 Higienização e Porcionamento de Alimentos Frescos	122
4.1.3 Técnicas de Conservação Modernas	124
4.1.3.1 Processamento por Altas Pressões (HPP)	124
4.1.3.2 Outras Técnicas de Conservação Modernas.....	129
4.1.3.3 Tratamentos Mistos e Tecnologia dos Obstáculos.....	132
4.1.4 O HPP em Algas Marinhas	134

4.2	Ensaio HPP Materiais e Métodos.....	136
4.2.1	Processamento das Matérias-primas	137
4.2.1.1	Controlo	138
4.2.1.2	HPP.....	138
4.2.2	Caracterização Física	138
4.2.2.1	Colorimetria	138
4.2.3	Caracterização Biológica.....	139
4.2.3.1	Análise Microbiológica.....	139
4.2.4	Caracterização Química.....	140
4.2.4.1	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS).....	140
4.2.5	Análise Estatística	140
4.3	Ensaio HPP Apresentação e Discussão dos Resultados	141
4.3.1	Caracterização Física	141
4.3.1.1	Colorimetria	141
4.3.2	Caracterização Biológica.....	149
4.3.2.1	Análise Microbiológica.....	149
4.3.3	Caracterização Química.....	157
4.3.3.1	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis.....	157
4.3.4	Considerações Finais.....	177
5	O USO DE EMBALAGENS COM ATMOSFERAS PROTETORAS PARA CONSERVAÇÃO DE ALGAS MARINHAS.....	181
	Revisão Bibliográfica	181
5.1.1	Embalamento (<i>Packaging</i>)	181
5.1.1.1	Embalamento em Vácuo.....	182
5.1.1.2	Embalamento em Atmosfera Modificada.....	183
5.1.1.3	Embalagens Passivas, Ativas e Inteligentes	185
5.1.2	Embalagens com Atmosferas Protetoras para Conservação de Algas Marinhas.....	186
5.2	Ensaio MAP Materiais e Métodos	187
5.2.1	Processamento das Matérias-Primas	187
5.2.2	Caracterização Física	189
5.2.2.1	Colorimetria	189
5.2.2.2	Análise de Textura	189
5.2.3	Caracterização Biológica.....	189
5.2.3.1	Composição dos Gases do <i>Headspace</i> das Embalagens.....	189
5.2.3.2	Análise Microbiológica.....	190
5.2.4	Caracterização Química.....	191
5.2.4.1	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS).....	191
5.2.5	Análise Estatística	191
5.3	Ensaio MAP Apresentação e Discussão dos Resultados.....	192
5.3.1	Caracterização Física	192
5.3.1.1	Colorimetria	192
5.3.1.2	Análise de Textura	197
5.3.2	Caracterização Biológica.....	200

5.3.2.1	Composição dos Gases no Headspace das Embalagens.....	200
5.3.2.2	Análise Microbiológica.....	202
5.3.3	Caracterização Química.....	206
5.3.3.1	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis.....	206
5.3.4	Considerações Finais.....	219
6	CONCLUSÃO	221
	BIBLIOGRAFIA	227
	ANEXOS.....	259

Índice de Figuras

Figura 1.1 Cultivo <i>on-shore</i> e <i>off-shore</i> de algas marinhas em diferentes localidades: [A]Aquicultura terrestre (<i>on-shore</i>) de <i>Chondrus crispus</i> na Acadian Seaplants em Nova Escócia, Canadá; [B] Mulheres cultivam <i>Eucheuma denticulatum</i> no litoral (<i>off-shore</i>) de Zanzibar, Tanzânia; [C] Produção de macroalgas em sistema de IMTA pela Alga+ em Ílhavo, Portugal.	4
Figura 2.1 Exemplos de algas marinhas verdes (<i>Ulva</i> sp., esquerda), vermelhas (<i>Palmaria palmata</i> , superior; <i>Chondrus crispus</i> , inferior) e castanhas (<i>Laminaria</i> sp., direita)	10
Figura 2.2 Quantidade de ácido glutâmico livre nos extratos aquosos de algumas macroalgas marinhas.....	12
Figura 2.3 Estrutura da agarose e da agarpectina.....	15
Figura 2.4 Fórmula estrutural das carragenanas kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ)	16
Figura 2.5 [A] Ácido alginico com seus respectivos monómeros de ácido gulurónico (G) e manurónico (M); [B] Estrutura das cadeias poliméricas composta por blocos MM, GG e MG; [C] Mecanismo de gelificação do alginato usando catiões divalentes (modelo “caixa de ovo”).....	18
Figura 2.6 Estrutura de alguns dos compostos antioxidantes presentes em algas marinhas: [A] fucofloreto A (florotanino de <i>Fucus</i> spp.), [B] ficoeritrobilina (pigmento das rodófitas) e [C] fucoxantina (pigmento das feofíceas).....	23
Figura 2.7 “Roda de aromas” para análise sensorial de algas marinhas.....	26

Figura 2.8 Algas marinhas <i>Ulva</i> spp. (verde vivo), <i>Porphyra</i> spp. (roxo acastanhado) e <i>Fucus vesiculosus</i> (verde oliva), expostas durante a maré baixa	28
Figura 2.9 [A] Local de cultivo: Ilha da Morraceira (41°57'56'' N, 8°44'30'' W), Figueira da Foz, Portugal; [B] Espécimes de <i>Ulva</i> sp. cultivados em condições controladas.....	29
Figura 2.10 Humidade (%FW) das algas estudadas pelo método da AOAC .	36
Figura 2.11 Cinzas (%DW) das algas estudadas pelo método da AOAC	37
Figura 2.12 Proteína total % (DW) das algas estudadas pelo método de Kjeldahl.....	38
Figura 2.13 Lípido total (%DW) das algas estudadas pelo método gravimétrico	39
Figura 2.14 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização das algas marinhas em termos de VOCs.....	41
Figura 2.15 Mecanismo proposto para a biossíntese a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA) de alguns compostos de sabor presentes em alimentos do mar frescos	42
Figura 2.16 Caracterização dos VOCs das algas marinhas por grupos funcionais	44
Figura 3.1 Cronograma da invenção das principais técnicas de conservação de alimentos	65
Figura 3.2 Principais estratégias para conservação de alimentos de acordo com o objetivo pretendido: inibição, inativação ou prevenir a recontaminação por microrganismos.....	68
Figura 3.3 Gráfico de scores da PCA dos VOCs de todas as macroalgas analisadas por GC-TOF-MS (frescas e conservadas por secagem, liofilização e salga).....	91
Figura 3.4 PCA da alga <i>U. pinnatifida</i> : [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).	92
Figura 3.5 PCA da alga <i>F. vesiculosus</i> : [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).	96
Figura 3.6 PCA da alga <i>C. tomentosum</i> : [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).	100

Figura 3.7 PCA da alga <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).	104
Figura 3.8 PCA da alga para <i>G. gracilis</i> : [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).	107
Figura 3.9 Esquema sobre a possível origem e alguns compostos em alimentos do mar.....	115
Figura 4.1 Etapas do porcionamento de alimentos frescos prontos para o consumo	123
Figura 4.2 Equipamento de Altas Pressões (Hiperbaric) da Universidade de Aveiro	125
Figura 4.3 Algas marinhas frescas logo após serem colhidas em seu habitat natural:.....	137
Figura 4.4 Valores das coordenadas CIELAB para <i>C. tomentosum</i> e <i>O. pinnatifida</i> preservadas por HPP e o seu Controlo ao longo dos dias de armazenamento.....	142
Figura 4.5 Contagens de microrganismos nas amostras do CTRL e HPP de <i>C. tomentosum</i> ao longo dos 90 dias de armazenamento: [A] “mesófilos aeróbios totais” (TAM), [B] “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB), [C] Enterobacteriaceae (ENT) e [D] “leveduras e bolores” (YM).....	150
Figura 4.6 Contagens de microrganismos nas amostras do CTRL e HPP de <i>O. pinnatifida</i> ao longo dos 90 dias de armazenamento: [A] “mesófilos aeróbios totais” (TAM), [B] “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB), [C] Enterobacteriaceae (ENT) e [D] “leveduras e bolores” (YM).....	152
Figura 4.7 Categorias de grupos funcionais e número de VOCs identificados por GC-TOF-MS para as algas marinhas: [A] <i>C. tomentosum</i> e [B] <i>O. pinnatifida</i>	158
Figura 4.8 Grupos funcionais em <i>C. tomentosum</i> : [A] Número total no CTRL; [B] Participação relativa (%) no CTRL; [C] Número total em HPP; Participação relativa (%) em HPP [D].....	159
Figura 4.9 Grupos funcionais em <i>O. pinnatifida</i> : [A] Número total no CTRL; [B] Participação relativa (%) no CTRL; [C] Número total em HPP; Participação relativa (%) em HPP [D].....	160

Figura 4.10 <i>Heatmap</i> da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de <i>C. tomentosum</i> no controlo e no tratamento por HPP ao longo do tempo de armazenagem de 90 dias.....	162
Figura 4.11 <i>Heatmap</i> da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de <i>O. pinnatifida</i> no controlo e no tratamento por HPP ao longo do tempo de armazenagem de 90 dias.....	163
Figura 4.12 Gráficos da PCA contendo os scores das amostras de PC-1 vs. PC-2 para: [A] <i>C. tomentosum</i> e [B] <i>O. pinnatifida</i>	164
Figura 4.13 Gráficos bi-plot da PCA contendo <i>scores</i> (amostras) e <i>loadings</i> (VOCs) de: [A] PC-1 vs. PC-2 para <i>C. tomentosum</i> , [B] PC-1 vs. PC-2 para <i>O. pinnatifida</i>	166
Figura 4.14 Compostos retornados pela biblioteca NIST de espectros de massa, [A] Viridiflorol e [C] 5 β ,7 β H,10 α -Eudesm-11-en-1 α -ol, além dos possíveis candidatos para os respetivos compostos não identificados [B] Viridianol e [D] Cicloeudesmol.....	176
Figura 5.1 Algas marinhas após processamento: controlos e amostras conservadas com MAP.....	188
Figura 5.2 Mudanças de cor ao longo dos dias de armazenamento para <i>P. umbilicalis</i> e <i>U. lactuca</i> preservadas por diferentes tratamentos	193
Figura 5.3 [A] Diferenças de cor para <i>U. lactuca</i> entre tratamentos no Dia 9: Controlo (esquerda), MAP (centro) e Vácuo (direita); [B] Cor das algas <i>U. lactuca</i> (esquerda) e <i>P. umbilicalis</i> (direita) no Dia 0.	197
Figura 5.4 Dureza medida, ao longo dos dias de armazenamento, para <i>P. umbilicalis</i> e <i>U. lactuca</i> , preservadas por diferentes tratamentos	198
Figura 5.5 Composição dos gases <i>headspace</i> : concentração de O ₂ e CO ₂ ao longo dos dias de armazenamento para <i>P. umbilicalis</i> [A , C] (coluna da esquerda) e <i>U. lactuca</i> [B , D] (coluna da direita), Controlos [A , B] (linha superior) e algas tratadas com MAP [C , D] (linha inferior)	200
Figura 5.6 Contagens de bactérias marinhas heterotróficas ao longo dos dias de armazenamento para [A] <i>P. umbilicalis</i> e [B] <i>U. lactuca</i> , preservadas por diferentes tratamentos.....	203
Figura 5.7 Número de VOCs por categorias de grupos funcionais identificados por GC-TOF-MS para as algas marinhas: [A] <i>P. umbilicalis</i> e [B] <i>U. lactuca</i>	207

Figura 5.8 <i>Heatmap</i> da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de <i>P. umbilicalis</i> no controlo e nos tratamentos MAP e VAC ao longo do tempo de armazenagem de 15 dias.....	208
Figura 5.9 <i>Heatmap</i> da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de <i>U. lactuca</i> no controlo e nos tratamentos MAP e VAC ao longo do tempo de armazenagem de 15 dias.....	209
Figura 5.10 Gráficos da PCA contendo os scores de PC-1 vs. PC-2 para [A] <i>P. umbilicalis</i> e [B] <i>U. lactuca</i>	210
Figura 5.11 Gráficos bi-plot da PCA contendo as pontuações (<i>scores</i>) e cargas (<i>loadings</i>) de: [A] PC-1 vs. PC-2 para <i>P. umbilicalis</i> , [B] PC-1 vs. PC-2 para <i>U. lactuca</i> , [C] PC-1 vs. PC-3 para <i>U. lactuca</i> , e [D] PC-2 vs. PC-3 para <i>U. lactuca</i>	211
Figura A.1 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização de <i>U. pinnatifida</i> (UP) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga	260
Figura A.2 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização de <i>F. vesiculosus</i> (FV) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga	261
Figura A.3 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização de <i>C. tomentosum</i> (CT) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga	262
Figura A.4 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (LU) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga.....	263
Figura A.5 <i>Heatmap</i> da análise GC-MS para caracterização de <i>G. gracilis</i> (GG) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga.....	264

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Principais polissacarídeos presentes nas macroalgas marinhas e suas respectivas funções	14
Tabela 2.2 VOCs presentes em maior concentração nas algas marinhas estudadas	47
Tabela 2.3 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas verdes (Chlorophyta)	51
Tabela 2.4 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas vermelhas (Rhodophyta)	53
Tabela 2.5 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas castanhas (Phaeophyceae)	56
Tabela 3.1 Principais tipos de deterioração alimentar	60
Tabela 3.2 Vantagens e desvantagens do tratamento térmico (calor) de alimentos	69
Tabela 3.3 Principais características dos métodos de congelamento lento e rápido.....	76
Tabela 3.4 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de <i>U. pinnatifida</i> de acordo com a PCA	94
Tabela 3.5 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de <i>F. vesiculosus</i> de acordo com a PCA.....	98
Tabela 3.6 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de <i>C. tomentosum</i> de acordo com a PCA.....	102
Tabela 3.7 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> de acordo com a PCA.....	106

Tabela 3.8 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de <i>G. gracilis</i> de acordo com a PCA.....	108
Tabela 3.9 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de todas as algas estudadas de acordo com a PCA.....	111
Tabela 3.10 Principais reagentes e catalisadores de alguns VOCs presentes em macroalgas	116
Tabela 4.1 Princípios, vantagens e desvantagens das mais importantes técnicas de conservação modernas.....	130
Tabela 4.2 Mudanças de cor ao longo dos dias de armazenamento para as algas marinhas <i>C. tomentosum</i> e <i>O. pinnatifida</i> tratadas (HPP) e não-tratadas (Controlo).....	148
Tabela 4.3 Classificação taxonómica das principais bactérias presentes no controlo de <i>Codium fragile</i> ao início e ao fim do período de armazenagem de 30 dias	154
Tabela 4.4 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de <i>C. tomentosum</i> de acordo com a PCA.	167
Tabela 4.5 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de <i>O. pinnatifida</i> de acordo com o PC- 1 da PCA.....	169
Tabela 4.6 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de <i>O. pinnatifida</i> de acordo com o PC- 2 da PCA.....	172
Tabela 5.1 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de <i>P. umbilicalis</i> de acordo com a PCA.....	212
Tabela 5.2 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de <i>U. lactuca</i> de acordo com a PCA.	214
Tabela A.1 Presença ou ausência em 25g de amostra dos microrganismos patogénicos: <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> em <i>O. pinnatifida</i> e <i>C. tomentosum</i>	265
Tabela A.2 Contagens microbianas para Coliformes, <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva, <i>Vibrio</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., e <i>L. monocytogenes</i> nos dias 0 e 15 de armazenamento para <i>P. umbilicalis</i> e <i>U. lactuca</i> preservadas por diferentes tratamentos.....	265
Tabela A.3 Diretrizes francesas que se aplicam aos produtos contendo algas secas e diretrizes portuguesas que se aplicam a produtos alimentares "minimamente processados" [290], [334].....	266

Índice de Equações

Equação 2.1 Cálculo da humidade pelo método da AOAC	30
Equação 2.2 Cálculo do peso seco pelo método da AOAC	30
Equação 2.3 Cálculo do azoto total pelo método de Kjeldahl.....	32
Equação 2.4 Cálculo da área relativa (%) dos VOCs identificados por GC-MS	34
Equação 2.5 Cálculo da razão de impacto do odor (OIR) dos principais VOCs identificados	35
Equação 4.1 Cálculo do desvio de cor em relação ao controlo (ΔE)	139

Lista de Símbolos e Abreviaturas

$\varnothing$	Diâmetro
3,6-AG	3,6-anidro-D-galactose
AA	Ácido Araquidónico
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> (enzima conversora de angiotensina)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALDH	Aldeído Desidrogenase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (análise de variância)
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i> (Associação de Químicos Agrícolas Oficiais)
A_p	Área (integrada) do pico
ART	<i>Aligned Rank Transformation</i> (transformação de <i>rank</i> alinhado)
ASLT	<i>Accelerated Shelf-life Tests</i> (ensaios acelerados de armazenamento)
a_w	<i>Water activity</i> (atividade da água)
CAP	<i>Controlled Atmosphere Packaging</i> (embalamento em atmosfera controlada)
CAR	Carboxen [®]
CC	<i>Chondrus crispus</i>
CCA	<i>Chromogenic Coliform Agar</i> (ágar cromogénico para coliforme)
CCD	<i>Carotenoid Cleavage Dioxygenase</i> (dioxigenase de clivagem de carotenoides)
CG-O	<i>Gas Chromatography Olfactometry</i> (cromatografia gasosa olfatométrica)
CT	<i>Codium tomentosum</i>
CTRL	Controlo

d_f	Espessura do filme
DHA	<i>Docosahexenoic Acid</i> (ácido docosahexenóico)
DMPT	Dimetil- β -Propiotetina
DMS	<i>Dimethyl Sulfide</i> (sulfureto de dimetilo)
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
DMSP	<i>Dimethylsulfonium Propionate</i> (propionato de dimetilsulfónio)
DVB	Divinilbenzeno
DW	<i>Dry Weight</i> (peso seco)
EFA	<i>Essential Fatty Acid</i> (ácido gordo essencial)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)
E_h	Potencial de oxidação / redução
EI	<i>Electron Impact Ionization</i> (ionização de impacto eletrónico)
ENT	<i>Enterobacteriaceae</i> (enterobactérias)
EPA	<i>Eicosapentaenoic Acid</i> (ácido eicosapentaenóico)
EU	<i>European Union</i> (União Europeia)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para a Alimentação e a Agricultura)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (poder antioxidante redutor férrico)
FV	<i>Fucus vesiculosus</i>
FW	<i>Fresh Weight</i> (peso fresco)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografia gasosa)
GG	<i>Gracilaria gracilis</i>
GLV	<i>Green Leaf Volatiles</i> (voláteis das folhas verdes)
GMP	<i>Guanosine Monophosphate</i> (monofosfato de guanosina)
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> (geralmente reconhecidos como seguros)
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> (análise de perigos e controlo de pontos críticos)
HETE	<i>Hydroxyeicosatetraenoic Acid</i> (ácido hidroxieicosatetraenóico)
HMB	<i>Heterotrophic Marine Bacteria</i> (bactérias marinhas heterotróficas)
HPP	<i>High-Pressure Processing</i> (processamento por alta pressão)
HPTP	<i>High-Pressure Thermal Processing</i> (processamento térmico de alta pressão)
HS	<i>Headspace</i> (espaço à cabeça)
HSD	<i>Honest Significant Difference</i> (diferença significativa honesta)

HTST	<i>High Temperature, Short Time “Pasteurization”</i> (pasteurização rápida à altas temperaturas)
ID	<i>Internal Diameter</i> (diâmetro interno)
IMP	<i>Inosine Monophosphate</i> (monofosfato de inosina)
IMTA	<i>Integrated Multi-Trophic Aquaculture</i> (aquicultura multitrófica integrada)
IQF	<i>Individually Quick Frozen</i> (congelamento rápido individual)
IQR	<i>Inter-Quartile Range</i> (intervalo interquartil)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organização Internacional para Normalização)
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i> (bactérias ácido-lácticas)
LAFE	<i>Long-chain Aldehyde Forming Enzyme</i> (enzima formadora de aldeído de cadeia-longa)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (limite de detecção)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (limite de quantificação)
LOX	Lipoxigenase
LRI	<i>Linear Retention Index</i> (índice de retenção linear)
LTLT	<i>Low Temperature, Long Time “Pasteurization”</i> (pasteurização lenta a baixa temperatura)
LU	<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>
M	Ácido β -D-Manurónico
MAP	<i>Modified Atmosphere Packaging</i> (embalamento em atmosfera modificada)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrometria de massa)
MSG	<i>Monosodium Glutamate</i> (glutamato monossódico)
MSM	Metilsulfonilmetano
MVP	<i>Moderate Vacuum Packaging</i> (embalamento em vácuo moderado)
N/A	<i>Not Available</i> (não disponível)
N/D	Não Detetado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OAV	<i>Odor Activity Value</i> (valor da atividade de odor)
OIR	<i>Odor Impact Ratio</i> (razão de impacto de odor)
OP	<i>Osmundea pinnatifida</i>
OTV	<i>Odor Threshold Value</i> (valor de limiar de odor)
P.A.	Para Análise
PA	Poliamida (<i>nylon</i> ou náilon)
PAD	<i>Pulsed Amperometric Detection</i> (detecção amperométrica pulsada)
PAL	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase</i> (fenilalanina amónia liase)

PC	<i>Principal Component</i> (componente principal)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (análise de componentes principais)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Poliétileno
PEF	<i>Pulsed Electric Fields</i> (campos elétricos pulsados)
PEG	Poliétilenoglicol
PGA	<i>Propylene Glycol Alginate</i> (alginato de propilenoglicol)
PL	<i>Pulsed Light</i> (luz pulsada)
PME	Pectinametilesterase
POD	Peroxidase
PPO	<i>Polyphenol Oxidase</i> (polifenol oxidase)
PTFE	Politetrafluoretileno (ou Teflon [®])
PU	<i>Porphyra umbilicalis</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> (ácido gordo polinsaturado)
Q ₂	Segundo Quartil ou Mediana
RA	<i>Relative Area</i> (área relativa / do composto)
RBCA	<i>Rose-Bengal Chloramphenicol Agar</i> (ágar rosa-bengala com cloranfenicol)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigénio)
RQ	<i>Respiration Quotient</i> (quociente de respiração)
RT	<i>Retention Time</i> (tempo de retenção)
s	Desvio-padrão
SBD	<i>Spouted Bed Drying</i> (secagem em leito fluidizado)
SFA	<i>Saturated Fatty Acid</i> (ácido gordo saturado)
SMA	<i>Standard Method Agar</i> (ágar para método padrão)
SP	<i>Saccorhiza polyschides</i>
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (microextração em fase sólida)
SRM	<i>Standard Reference Material</i> (material de referência padrão)
TAC	<i>Total Aerobic Count</i> (contagem aeróbica total)
TAM	<i>Total Aerobic Mesophiles</i> (bactérias mesófilas aeróbicas totais)
TA _p	<i>Total Area of the peaks</i> (área total dos picos / do cromatograma)
T _g	Temperatura de transição vítrea
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (tempo de voo)
TPA	<i>Texture Profile Analysis</i> (análise do perfil de textura)
TPC	<i>Total Phenolic Content</i> (conteúdo fenólico total)
UFC	Unidade Formadora de Colónia

UHT	<i>Ultra High Temperature "Pasteurization"</i> (ultrapasteurização ou pasteurização a temperaturas ultra altas)
UL	<i>Ulva lactuca</i>
UN	<i>United Nations</i> (Nações Unidas)
UP	<i>Undaria pinnatifida</i>
VAC	<i>Vacuum-packaging</i> (embalamento em vácuo)
VOC	<i>Volatile Organic Compound</i> (composto orgânico volátil)
VOSC	<i>Volatile Organic Sulfur Compound</i> (composto orgânico de enxofre volátil)
VRBDA	<i>Violet Red Bile Dextrose Agar</i> (ágar dextrose de bile vermelho-violeta)
VSP	<i>Vacuum Skin Packaging</i> (embalamento por película em vácuo)
WHC	<i>Water Holding Capacity</i> (capacidade de retenção da água)
$\bar{x}$	Média
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate modified agar</i> (ágar modificado com xilose lisina desoxicolato)
YM	<i>Yeasts and Molds</i> (leveduras e bolores)
ZMA	<i>Zobell Marine Agar</i> (ágar marinho Zobell)
α	Nível de significância estatística

Introdução Geral

Diversas espécies de algas marinhas, mesmo que numa escala inferior, se comparadas às plantas terrestres, têm sido coletadas desde há milênios por comunidades costeiras ao redor do mundo, como no Chile (14.000 aC), Japão (13.000 aC), China (2.700 aC), Egito (1.550 aC) e Índia (300 aC). Esses organismos marinhos desempenhavam um papel fundamental em terapias tradicionais, bem como em remédios caseiros, sendo utilizados no tratamento de diversas enfermidades e doenças comuns [1].

Antigamente, era ainda comum a prática de colher as algas marinhas para diversos fins, incluindo consumo humano, fertilização de lavouras e como ração animal [2], [3]. Elas também foram um alimento extremamente importante durante os períodos de fome, guerra e surto de doenças [4].

Atualmente, a maior parte da produção global de plantas aquáticas, com predomínio das macroalgas, provém de aquicultura, representando 96,5% de seu total. A China e a Indonésia destacam-se como os principais produtores, enquanto Coreia do Sul e Japão se distinguem como sendo os seus maiores consumidores de algas marinhas *in natura* – respectivamente, cerca de 3,060 kg/ano *per capita* e de 1,440 a 2,160 kg/ano *per capita* [5]. Além disso, das 10 espécies mais cultivadas, a maioria é destinada à produção de hidrocoloides, sendo ainda uma parcela significativa utilizada diretamente na alimentação, principalmente no Extremo Oriente [6], [7].

Além disso, as macroalgas marinhas são uma importante fonte de recursos biológicos e têm sido exploradas em diversas áreas de pesquisa (biocombustíveis, ciência dos materiais, farmacologia, alimentação e nutrição, etc.) [8]. Ultimamente, tem havido um interesse crescente nestas macroalgas, especialmente devido à sua importância como fonte de novos compostos bioativos e funcionais [9]. A maioria das pesquisas publicadas trata dos

benefícios nutricionais ou para a saúde, que as algas comestíveis podem promover nas formulações de alimentos, não sendo, contudo, valorizadas como um ingrediente com potencial gastronómico [10].

As algas marinhas possuem alto teor de proteínas e fibras alimentares, são uma excelente fonte de vitaminas, oligoelementos e minerais, sendo ainda pobres em açúcares simples e lípidos – apresentando, porém, em sua predominância de ácidos gordos polinsaturados, ω -3 (EPA e DHA) e ω -6 (AA), em proporções equilibradas. Estas características nutricionais tornam as algas ingredientes saudáveis e com poucas calorias [6].

Existe também uma grande variação na composição química não só de algas de diferentes géneros, como também das algas da mesma espécie, resultando em diferentes teores dos principais macro e micronutrientes, dependendo das condições sazonais, climáticas e geográficas [11]. No entanto, no caso da alga *Codium tomentosum* (Chlorophyta), espécimes provenientes de aquicultura exibiram uma menor variabilidade sazonal em relação aos seus perfis lipídico e de pigmentos, o que pode ser atribuído ao cultivo em condições controladas desde as fases iniciais [12].

Apesar dos inúmeros benefícios, nutricionais e para saúde humana, das algas marinhas, o seu papel na dieta do mundo ocidental permanece insignificante. Curiosamente, enquanto no Oriente as algas marinhas são altamente valorizadas por seus benefícios e propriedades gastronómicas, na Europa, infelizmente, elas acabaram por ser associadas à pobreza e à escassez de alimentos [4]. Porém, este panorama parece estar mudando nos últimos tempos: no continente europeu, já é observada a presença de algas marinhas enquanto matéria-prima em restaurantes de alta-cozinha e até mesmo nos casuais de médio porte; enquanto, nos EUA, as algas vêm ganhando gradual popularidade, com um crescimento no consumo estimado em 7% ao ano [13]. Esse crescente interesse pode ser explicado por uma maior consciencialização do público sobre seus possíveis benefícios para a saúde [14], [15].

As algas marinhas secas, diferentemente das frescas, tornaram-se simples de obter e incorporar em diversas receitas do dia a dia. Essa tendência gastronómica ainda carece de um processo de adoção nos lares tanto europeus, como norte-americanos [13]. No entanto, desenvolver novos produtos e receitas em parceria com chefs talentosos, ou adaptados à culinária local, pode aumentar o seu consumo no contexto doméstico [16].

Há cerca de 10.000 espécies de macroalgas marinhas catalogadas (cerca de 1.500 espécies de algas "verdes", de 6.500 espécies de algas "vermelhas" e de 1.800 espécies de algas "castanhas"), porém, apenas uma ínfima parte é usada na

alimentação. Considerando-se também as microalgas, que somam cerca de 65.000 espécies, é possível perceber o quão vasto e diverso é o universo das algas.

Contudo, a grande maioria das espécies de algas marinhas continua inexplorada já que apenas 150-200 das espécies (1,5-2% do total) são frequentemente usadas na culinária dos países asiáticos, que possuem uma fértil tradição no seu uso. No contexto ocidental, esse número é ainda menor, chegando a pouco mais de uma dúzia de espécies (0,12% do total) [13].

As Nações Unidas (UN) estimam que a população se aproxime de 9,7 mil milhões em 2050. Em um planeta cada vez mais populoso, surge a preocupação com a sustentabilidade dos meios de produção e recursos alimentares existentes [17]. Diante do exposto, as algas marinhas com potencial de utilização na alimentação surgem como uma estratégia viável para fazer face ao aumento da demanda de alimentos, nomeadamente, com elevado teor proteico e baixa pegada de carbono [18].

Algumas das vantagens das algas marinhas em relação a outras possíveis fontes alimentares incluem os elevados teores de proteína por peso seco, o rápido crescimento, aliado à alta produtividade, e a capacidade de cultivo tanto em terra (*on-shore*, **Figuras 1.1A e C**) quanto no próprio oceano (*off-shore*, **Figura 1.1B**), que abrange cerca de 70% da superfície terrestre. Elas podem ser cultivadas de forma isolada ou em conjunto com outros organismos marinhos em sistemas de aquicultura multitrófica integrada (IMTA).

Ao contrário da pecuária, uma das principais fontes de emissão de gases de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global, a aquicultura de macroalgas é capaz de converter dióxido de carbono em biomassa através da fotossíntese, libertando oxigénio para a atmosfera. Além disto, o seu cultivo não compete com outras culturas alimentares por terra arável ou recursos hídricos potáveis [19], [20]. Verifica-se que a agricultura é responsável por 40% do uso de terras, 30% das emissões de gases de efeito estufa e consome 70% da água potável; ao passo que a pesca já explorou 60% dos estoques de peixes selvagens e a sobrepesca afetou mais de 30% desses estoques, levando a uma redução na captura global ao longo dos anos [4]. Assim, torna-se evidente que os sistemas alimentares atuais no mundo não são nem sustentáveis, nem benéficos para a saúde humana e do planeta. Portanto, é inegável a necessidade de consumirmos mais alimentos predominantemente vegetais (particularmente, as verduras) e produzidos de maneira sustentável.

Entre vários motivos, há dois principais que nos podem fazer resistir a uma dieta mais baseada em verduras: o primeiro refere-se à biologia das plantas e o segundo está ligado à nossa evolução enquanto seres humanos. As verduras, em

sua maioria, tendem a ter um sabor amargo, e não apresentam os gostos doces e umami que, historicamente, os humanos foram condicionados a preferir.



[A]

[B]



[C]

Figura 1.1 Cultivo *on-shore* e *off-shore* de algas marinhas em diferentes localidades: [A] Aquicultura terrestre (*on-shore*) de *Chondrus crispus* na Acadian Seaplants em Nova Escócia, Canadá; [B] Mulheres cultivam *Eucheuma denticulatum* no litoral (*off-shore*) de Zanzibar, Tanzânia; [C] Produção de macroalgas em sistema de IMTA pela Alga+ em Ílhavo, Portugal.

Fontes: [A] Canada Agriculture and Food Museum; [B] Mouritsen *et al.* [4]; [C] Alga+.

As algas marinhas podem ser consideradas como uma solução, encaixando-se simultaneamente na categoria de "alimentos vegetais sustentáveis" e possuindo ainda a capacidade de tornar mais palatáveis outros alimentos pouco consumidos já que algumas espécies possuem um forte gosto umami e ainda conferem um gosto adocicado [21].

O desperdício alimentar representa um desafio significativo que impacta na saúde pública, no meio ambiente e na economia, especialmente diante de um cenário de crescimento populacional e de escassez dos recursos naturais. O desperdício manifesta-se em todas as etapas da cadeia alimentar, desde a produção até o consumo final, exigindo que se estudem métodos conservação mais eficazes. Além disso, a demanda dos consumidores por produtos frescos, saudáveis e ricos em nutrientes é crescente. Entretanto, apesar da produção atual de alimentos ser suficiente para suprir as necessidades globais, as barreiras tecnológicas e logísticas impedem que estes alcancem as populações mais carentes [22].

As técnicas de conservação têm a função de preservar a qualidade dos alimentos, desde o momento da produção até o seu consumo. Previnem o crescimento microbiano e as alterações físico-químicas, permitindo assim a manutenção das qualidades organoléticas e aumentando o prazo de validade [23]. Os métodos de processamento também podem ser usados para outros fins, como transformar o sabor por meio de salga, cura ou defumação, ou mesmo tornar os alimentos mais nutritivos e digeríveis por fermentação ou cozimento [24]. Estas técnicas também ajudam a ultrapassar a questão da sazonalidade de determinados alimentos, permitindo o seu consumo ao longo do ano, bem como manter uma alimentação mais diversificada [23].

As macroalgas são ingredientes perecíveis que sofrem muitas alterações físico-químicas assim que são removidas do seu habitat natural. Além disso, de acordo com os métodos de conservação aplicados, as alterações podem ser ainda mais perceptíveis devido à ação de agentes físicos (por exemplo, calor ou radiação solar ultravioleta), químicos (por exemplo, alteração do pH ou adição de sal) e/ou biológicos (por exemplo, ação de enzimas e/ou microrganismos) [25]. As técnicas de preservação aplicadas até agora no processamento de algas marinhas (como a secagem ou a salga) não permitem ter ingredientes frescos e, tampouco, conseguem manter inalteradas suas propriedades organoléticas e nutricionais [26], [27].

A secagem pode levar à perda de compostos orgânicos voláteis (VOCs) e ao surgimento de sabores desagradáveis devido às reações enzimáticas que podem ser promovidas pelo calor [28], [29]. Além disso, durante todo o processo, o

produto é submetido a temperaturas superiores à de transição vítrea, o que resulta na deformação dos tecidos [30].

A salga tem efeitos menos pronunciados nos VOCs devido à sua capacidade de inibir as reações de oxidação ao aplicar baixas temperaturas de processamento e promover a desidratação osmótica. No entanto, o efeito "*salting out*" também pode levar à perda de voláteis e alteração de propriedades sensoriais como, por exemplo, de firmeza [31]–[33]. Ambas as técnicas, secagem ou salga, são baseadas na redução da atividade de água (a_w).

A principal desvantagem do congelamento é a perda de textura (diminuição da dureza), devido à formação de cristais de gelo que danificam os tecidos das algas marinhas [34], [35]. O tipo e o conteúdo de hidrocoloides presentes nas algas também afetarão a perda de água – e consequentemente a composição fitoquímica – durante o congelamento de longo prazo [36]. Um estudo revelou que algas congeladas tendem a desenvolver aromas verdes provavelmente como consequência da autooxidação e da conversão enzimática de aldeídos a partir de ácidos gordos polinsaturados, via ação de lipoxigenases (LOX) [33], [37], [38].

Além disto, a perda de valor nutricional, a alteração da capacidade de retenção de água (WHC) e mudanças significativa da cor (alterações nos principais pigmentos presentes) são também algumas das transformações mais comumente produzidas pelo uso de técnicas de conservação mais convencionais, como secagem, salga ou congelamento [26], [39].

A técnica de liofilização pode superar alguns dos problemas mencionados, mas apresenta as desvantagens de custos altos e longos tempos de processamento, sendo usada apenas para produtos com alto valor agregado [40]–[42]. Técnicas mais modernas como o processamento por altas pressões hidrostáticas (HPP) ainda apresentam elevados custos operacionais, sendo aplicadas às algas marinhas apenas em ensaios científicos.

Nos estudos já realizados, o HPP mostrou ser uma tecnologia de processamento válida para prolongar a vida útil de algas comestíveis sob armazenamento refrigerado, embora os atributos físico-químicos (a_w , pH, textura, cor, etc.), microbiológicos e bioquímicos (por exemplo, atividade enzimática), tenham variado significativamente entre os tratamentos e o tempo de armazenamento [43], [44].

O embalamento em atmosfera modificada (MAP) é uma técnica utilizada para aumentar a vida útil de alimentos *in natura* ou minimamente processados. No levantamento realizado, não foi possível encontrar nenhum trabalho fazendo uso desta tecnologia em algas marinhas frescas. No MAP, o ar que envolve o

alimento na embalagem é suprimido e substituído por um outro gás (ou mistura de gases). Essa nova atmosfera atua, principalmente, modulando a respiração de produtos frescos e inibindo a atividade microbiana e a oxidação. A mistura de gases usada no embalamento depende do tipo de produto, materiais da embalagem e temperatura de armazenamento. O MAP permite que as características originais dos produtos sejam mantidas por um tempo superior àquele onde não houve quaisquer tratamentos [45].

Com o presente trabalho, objetiva-se caracterizar nutricionalmente as algas marinhas estudadas (*Codium tomentosum*, *Ulva lactuca* e *U. rigida*, Chlorophyta; *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Gracilaria gracilis*, *Osmundea pinnatifida* e *Porphyra umbilicalis*, Rhodophyta; *Fucus vesiculosus*, *Saccorhiza polyschides* e *Undaria pinnatifida*, Phaeophyceae) verificar o impacto das técnicas convencionais de conservação (congelamento, salga, secagem em estufa e liofilização) sobre alguns compostos voláteis de algumas espécies, assim como o efeito das novas técnicas de processamento mínimo e *packaging* (HPP e MAP) sobre as propriedades organoléticas (textura, cor, perfil de aroma, etc.) ao longo do tempo. Para atingir o objetivo pretendido, foram aplicadas as técnicas analíticas listadas a seguir:

1. Determinação do peso seco e das cinzas, além da composição nutricional de todas as algas estudadas. Para caracterização nutricional, foram determinadas: proteínas totais pelo método de Kjeldahl e lípidos por gravimetria.
2. Caracterização ao nível dos VOCs para as algas marinhas estudadas, empregando microextração em fase sólida no “headspace” (HS-SPME) e análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (GC-TOF-MS).
3. Avaliação de como as algas marinhas (*Codium tomentosum*, *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Gracilaria gracilis*, *Fucus vesiculosus* e *Undaria pinnatifida*) se comportam consoante o emprego das técnicas de conservação convencionais, através de análises para aferir as alterações dos compostos voláteis por GC-TOF-MS.
4. Aferição das alterações organoléticas ao nível da cor (colorimetria), textura (texturometria) e voláteis (GC-TOF-MS), resultantes dos tratamentos e do tempo de armazenagem usados nos ensaios de processamento mínimo (90 dias) e *packaging* (15 dias) para as algas *Codium tomentosum* e *Osmundea pinnatifida* (HPP), e *Porphyra umbilicalis* e *Ulva lactuca* (MAP).
5. Realização de um estudo microbiológico detalhado de forma a conhecer melhor o comportamento dos principais grupos de microrganismos deteriorantes (mesófilos aeróbios totais, bactérias marinhas heterotróficas,

leveduras e bolores, coliformes ou Enterobacteriaceae) e patogénicos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase-positiva*, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) presentes, assim como a vida de prateleira das algas estudadas nos ensaios HPP e MAP, em termos de segurança alimentar.

Em resumo, o objetivo principal deste trabalho é o de avaliar algumas espécies de algas marinhas enquanto alimento, assim como o de estudar o impacto de novas técnicas de conservação sobre o seu perfil organolético. Estes resultados poderão ser de grande valia para o desenvolvimento de novos produtos alimentares num futuro próximo.

É importante destacar alguns aspetos inovadores da presente tese: técnicas de conservação baseadas no uso MAP nunca haviam sido exploradas em algas marinhas, assim como muito pouco foi produzido em termos HPP. Além disso, algumas das algas frescas nunca haviam sido analisadas por GS-MS, em particular, sob condições de armazenagem prolongada.

Através desta iniciativa, almeja-se proporcionar uma modesta contribuição para o campo da ciência dos alimentos e da ficogastronomia – isto é, a arte de preparar as algas marinhas tirando proveito não somente das suas propriedades nutricionais, como também das suas mais-valias organoléticas. Além disso, espera-se que o presente trabalho represente um avanço na conscientização sobre a relevância das algas marinhas como recurso nutricional e gastronómico, especialmente em um mundo que busca e precisa de novas alternativas alimentares.

Caracterização Nutricional e Organolética das Algas Marinhas Estudadas

2.1 Revisão Bibliográfica

As algas são organismos fotoautotróficos uni ou multicelulares que vivem em ambientes aquáticos ou húmidos, tendo a clorofila "a" como pigmento fotossintético primário. Ao contrário das plantas, as células reprodutivas não possuem uma cobertura estéril [46]. As macroalgas formam um grupo diverso de organismos macroscópicos que se distinguem pelo seu tamanho, cor e morfologia [6].

2.1.1 Classificação das Algas

2.1.1.1 Tamanho

A classificação mais elementar das algas é feita com base no tamanho. São chamadas de "microalgas" aquelas que, como o próprio nome indica, são organismos de pequena dimensão, frequentemente unicelulares e microscópicos. Por outro lado, as "macroalgas" são organismos de maior porte, visíveis a olho nu, podendo medir desde alguns milímetros até mais de 50 metros de comprimento [47].

2.1.1.2 Pigmentos Fotossintéticos

Tanto as macroalgas quanto as microalgas podem ser agrupadas com base nos pigmentos fotossintéticos que possuem, sendo geralmente classificadas como algas verdes, vermelhas e castanhas (**Figura 2.1**) [3].

As algas verdes, também conhecidas como "clorófitas", pertencem ao Reino Plantae, sendo predominantemente do filo Chlorophyta. Elas têm uma proximidade genética com as plantas terrestres e possuem clorofilas do tipo "a" e "b", além de outros pigmentos acessórios como carotenoides [2].

As algas vermelhas, ou "rodófitas", também fazem parte do Reino Plantae e são classificadas no filo Rhodophyta. Seus pigmentos fotossintéticos incluem a clorofila "a" e "d", juntamente com ficobiliproteínas, carotenoides e xantofilas [2].

Por fim, as algas castanhas, ou "feofíceas", pertencem ao Reino Chromista, sendo classificadas no filo Ochrophyta e na classe Phaeophyceae. Seus pigmentos fotossintéticos são a clorofila "a" e "c", além da fucoxantina que confere a sua cor castanha característica [2].



Figura 2.1 Exemplos de algas marinhas verdes (*Ulva* sp., esquerda), vermelhas (*Palmaria palmata*, superior; *Chondrus crispus*, inferior) e castanhas (*Laminaria* sp., direita)

Fonte: RISE Research Institutes of Sweden

2.1.2 Composição Nutricional das Algas Marinhas

2.1.2.1 Proteínas e Aminoácidos

As macroalgas marinhas, assim como as microalgas, são notavelmente ricas em proteínas, com uma concentração média desses macronutrientes variando de

10 a 30% do seu peso seco. Em certas espécies de macroalgas como a “ervapatinha” ou “nori” (*Porphyra* spp., *Pyropia* spp. e *Neopyropia* spp., Rhodophyta) e a “dulse” (*Palmaria palmata*, Rhodophyta), esses valores podem chegar a 35% e a 47% do peso seco, respetivamente. Devido à presença de compostos azotados não-proteicos, o fator médio de conversão de “azoto para proteína”¹ difere do usado para a maioria das proteínas de origem animal ou vegetal (o valor padrão é o de 6,25). Para referência, são utilizados os seguintes valores: 5,13 para algas verdes, 4,92 para algas vermelhas e 5,38 para algas castanhas. Esses valores são ligeiramente menores porque as algas marinhas possuem em sua composição compostos azotados não-protéicos [11].

É importante destacar que as proteínas encontradas nas algas marinhas frequentemente contêm todos os aminoácidos essenciais. Algumas algas, como “dulse” e “wakame” (*Undaria pinnatifida*, Phaeophyceae), são especialmente ricas em proteínas de alto valor nutricional. No entanto, de maneira geral, algumas dessas algas marinhas possuem quantidades relativamente baixas de certos aminoácidos. O triptofano, a lisina e a metionina são os principais aminoácidos limitantes nas algas marinhas, ou seja, são os que apresentam a maior diferença de concentração em relação aos valores de referência estabelecidos² [11].

O estudo realizado por Vieira *et al.* [18] investigou a composição proteica de diversas algas marinhas encontradas na costa portuguesa, bem como de algumas algas europeias disponíveis comercialmente. Os resultados revelaram que todas elas são fontes abundantes de proteínas e confirmaram que contêm todos os aminoácidos essenciais, embora com algumas variações de acordo com as espécies estudadas.

No que diz respeito aos teores de proteínas e aminoácidos, destaca-se a alga “cabelo-de-velha” (*Gracilaria gracilis*, Rhodophyta) que apresentou quase 50% de aminoácidos essenciais em sua composição, sendo a metionina o aminoácido limitante, tanto nesta alga quanto nas demais. Contudo, a histidina estava presente em quase cinco vezes o valor de referência. Quando analisados os aminoácidos livres, a alga “limo-corriola” (*Saccorhiza polyschides*, Phaeophyceae) apresentou um teor baixo de ácido glutâmico e uma composição em aminoácidos essenciais livres em torno de 70% do total. No caso das algas europeias comercializadas, observou-se um perfil semelhante de aminoácidos essenciais (cerca de 45%), com destaque para a alga “alface-do-mar” (*Ulva* spp.,

¹ Geralmente, o conteúdo proteico dos alimentos é calculado multiplicando a quantidade determinada de azoto, aferida pelo método “Kjeldahl”, pelo fator de conversão de “azoto para proteína” do alimento em questão.

² Normalmente, usa-se como referência para o cálculo do “índice de aminoácidos essenciais” o padrão de exigência para aminoácidos definido pela Organização Mundial de Saúde [380].

Chlorophyta) que apresentou valores de 55% tanto para os aminoácidos essenciais totais quanto para os livres. É importante ressaltar que os valores para os aminoácidos livres e totais das espécies portuguesas apresentaram alguma variação em relação às demais algas comercializadas [18].

Alguns aminoácidos livres, tais como a asparagina, o ácido glutâmico, a glicina e a alanina, têm a capacidade de conferir gosto às algas e, por isso, merecem atenção especial. No estudo mencionado anteriormente, as algas "erva-patinha" (*Porphyra* spp., Rhodophyta), "bodelho" (*Fucus spiralis*, Phaeophyceae) e "esparguete-do-mar" (*Himanthalia elongata*, Phaeophyceae) distinguem-se por conterem uma maior quantidade desses aminoácidos que conferem sabor [18]. Deve-se destacar que o glutamato monossódico (MSG), um sal do ácido glutâmico, assim como os nucleosídeos sinérgicos monofosfato de inosina (IMP) e monofosfato de guanosina (GMP), são responsáveis por proporcionar o gosto umami³ aos alimentos [48].



Figura 2.2 Quantidade de ácido glutâmico livre nos extratos aquosos de algumas macroalgas marinhas

Fonte: Adaptado pelo autor de Mouritsen *et al.* [48]

Geralmente, a formação do glutamato e dos nucleotídeos sinérgicos ocorre devido à degradação das proteínas e da matéria celular. No entanto, nas algas, especialmente nas laminárias, o ácido glutâmico se acumula de forma incomum em seus organismos, de forma idêntica ao que ocorre com o iodo. Até ao momento, não foi encontrado nenhum alimento com uma quantidade maior de ácido glutâmico livre⁴ do que a alga "kombu japonesa" (*Saccharina japonica*,

³ A palavra *umami* vem do japonês "*umai*" (旨), delicioso, e "*mi*" (味), essência, significando "a essência daquilo que é delicioso" ou saboroso [381].

⁴ Embora o ácido glutâmico livre e o MSG tenham gosto "umami", o ácido glutâmico nas cadeias proteicas não tem gosto. As ligações peptídicas do ácido glutâmico não são facilmente quebradas por aquecimento e, por conseguinte, esse composto é bastante estável durante os processos de

Phaeophyceae) [49]. Outras algas como *Porphyra* spp. e *P. palmata* também são bastante ricas em ácido glutâmico livre, como pode ser visto na **Figura 2.2**.

O ácido glutâmico na forma do sal MSG parece desempenhar um papel na regulação do apetite, uma vez que foram identificados recetores para ele no estômago que parecem estar relacionados com a sensação de saciedade. A perda de paladar (hipogeusia) e a condição severa de boca seca (xerostomia), que afetam principalmente os idosos, podem ser compensadas pela inclusão de alimentos ricos em umami na dieta. Algumas análises sugerem que ao adicionar de 0,1% a 0,8% de MSG a uma preparação, pode-se reduzir o sal de cozinha (cloreto de sódio ou NaCl) em 30% a 40% na formulação do alimento. A possibilidade de redução do açúcar se dá por um mecanismo indireto, uma vez que o glutamato tem a capacidade de suprimir os sabores ácido e amargo em alimentos, embora não tenha o efeito de realçar a doçura em frutas [48].

2.1.2.2 Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono típicos das algas edíveis, geralmente, não são digeríveis pelo trato gastrointestinal humano e, por esta razão, são referidos como sendo fibras dietéticas. O conteúdo total de fibras (solúveis e insolúveis) nas macroalgas varia de 33% a 50% do peso seco [50]. Nas macroalgas, os hidratos de carbono possuem propriedades estruturais e de reserva de energia, conforme pode ser visto na **Tabela 2.1**. Entre aqueles com função estrutural, destacam-se os polissacarídeos (fibras solúveis), capazes de formar soluções coloidais [11].

Os hidrocoloides são um grupo variado de polímeros de cadeias longas que são solúveis em água ou têm a tendência de inchar na presença dela. Eles alteram as propriedades físicas de uma solução devido à formação de géis, ou facilitando o espessamento, emulsificação e estabilização. A presença de muitos grupos hidroxilo aumenta significativamente a sua afinidade com a água, tornando-os hidrofílicos. Além disso, os hidrocoloides resultam numa dispersão que se situa entre uma solução verdadeira e uma suspensão, exibindo as características de um coloide. É por essa razão que recebem o nome de "hidrocoloides" [51]. Quando extraídos de algas, são também chamados de "ficocoloides", o que inclui polissacarídeos como ágar, alginato e carragenanas, entre outros.

cozedura. Entretanto, as proteólises durante a fermentação de alguns alimentos produzem grande quantidade de ácido glutâmico livre e, dessa maneira, alimentos fermentados e curados costumam ser bastante ricos nesse composto, assim como, nos nucleotídeos sinérgicos [49].

Tabela 2.1 Principais polissacarídeos presentes nas macroalgas marinhas e suas respectivas funções

Função	Macroalga	Polissacarídeos	Unidades Principais
Reserva	Verdes	Amido	α -D-glicose ($\pm 20\%$ de amilose e $\pm 80\%$ de amilopectina)
	Vermelhas	Amido Florídeo	α -D-glicose (molécula ramificada $\approx$ amilopectina)
	Castanhas	Laminarina	$\beta(1,3)$ -D-glicose e $\beta(1,6)$ -D-glicose
		Manitol	monossacarídeo D-manitol
Estrutural	Verdes	Ulvana (sulfatado)	β -D-glucuronosil e $\alpha(1,4)$ -L-ramnose-3-sulfato
		Xilano	$\beta(1,4)$ -D-xilose
		Manana	manose (epímero C-2 de glicose)
	Vermelhas	Carragenana (sulfatado)	$\alpha(1,3)$ -galactose e $\beta(1,4)$ -3,6-anidro-D-galactose (ambas as moléculas podem ser sulfatadas ou não)
		Ágar (sulfatado)	$\beta(1,4)$ -D-galactose e $\alpha(1,3)$ -3,6-anidro-L-galactose (grupos sulfato removidos por extração alcalina)
		Xilano	$\beta(1,4)$ -D-xilose
		Manana	manose (epímero C-2 de glicose)
	Castanhas	Alginato	ácidos $\beta(1,4)$ -D-manurónico e $\alpha(1,4)$ -L-gulurónico $\alpha(1,2)$ -L-fucose-1-sulfato ácido $\beta(1,4)$ -D-manurónico e 3-D-xilosil-L-fucose-4-sulfato (1,4)-D-galactose e L-fucosil-3-sulfato (unidades ramificadas de D-xilose, D-galactose e D-manose)
		Fucoidana (sulfatado)	
	Todas	Celulose	$\beta(1,4)$ -glicose

Fonte: Adaptado de Mišurcová [11]

2.1.2.2.1 Ágar

O ágar é um ficocoloide com alto poder gelificante extraído de diversas algas vermelhas (Rhodophyta) das ordens das Gelidiales (gêneros *Gelidium* spp., *Pterocladia* spp. e *Gelidiella* spp.), Gracilariales (gênero *Gracilaria* spp.) e Ahnfeltiales (gênero *Ahnfeltia* spp.). Estas algas são também denominadas “agarófitas” [2], [52].

O ágar é composto por duas frações diferentes [53]:

- Agarose: é um polímero linear de D-galactose com uma ligação glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) a 3,6-anidro-L-galactose que, por sua vez, está ligada na forma α (1 $\rightarrow$ 3) à próxima unidade de D-galactose, como pode ser visualizado na **Figura 2.3**. É a fração gelificante do ágar.
- Agarpectina: fração minoritária e não gelificante do ágar, que é uma mistura heterogênea de moléculas de menor peso molecular (14.000 Da), possuindo ramificações e grupos sulfato (5% a 8%).

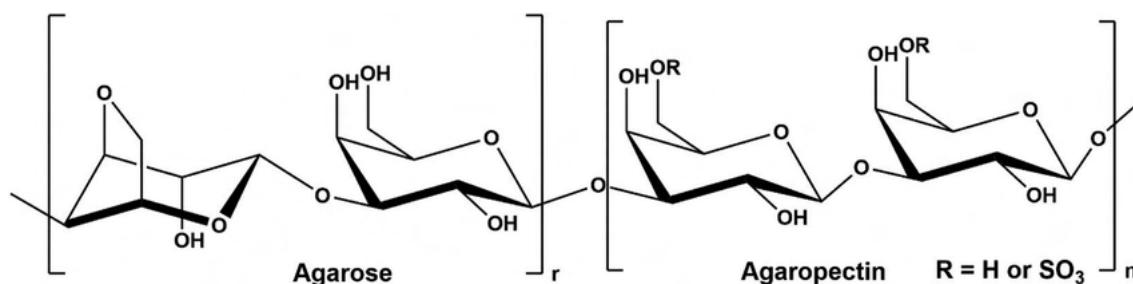


Figura 2.3 Estrutura da agarose e da agarpectina

Fonte: Yashaswini, Venkatesan & Anil [54]

2.1.2.2.2 Carragenanas

As carragenanas são ficocoloides com propriedades bastante diversas, sendo extraídos de algas vermelhas (filo Rhodophyta) da ordem das Gigartinales – gêneros *Chondracanthus* spp., *Chondrus* spp., *Eucheuma* spp., *Gigartina* spp., *Kappaphycus* spp. e *Mastocarpus* spp.

Deve-se ter em consideração que diferentes algas dão origem a diferentes carragenanas [2]. A aquicultura das espécies *Eucheuma denticulatum* e *Kappaphycus alvarezii* representa a quase totalidade das algas destinadas para produção de carragenanas. A fonte original desses hidrocoloides era a alga “musgo irlandês” (*Chondrus crispus*) e a sua apanha ainda é feita para extração de carragenanas com propriedades especiais [52]. Estas algas são, por vezes, denominadas “carragenófitas”.

As carragenanas são um grupo diverso de polissacarídeos lineares constituídos por unidades repetidas de galactose e 3,6-anidro-D-galactose (3,6-AG), ambas sulfatadas ou não, unidas por ligações glicosídicas alternadas na forma α (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 4), como pode ser visto na **Figura 2.4**. Entre os vários tipos de precursores e carragenanas com propriedades diferentes, podem destacar-se [53]:

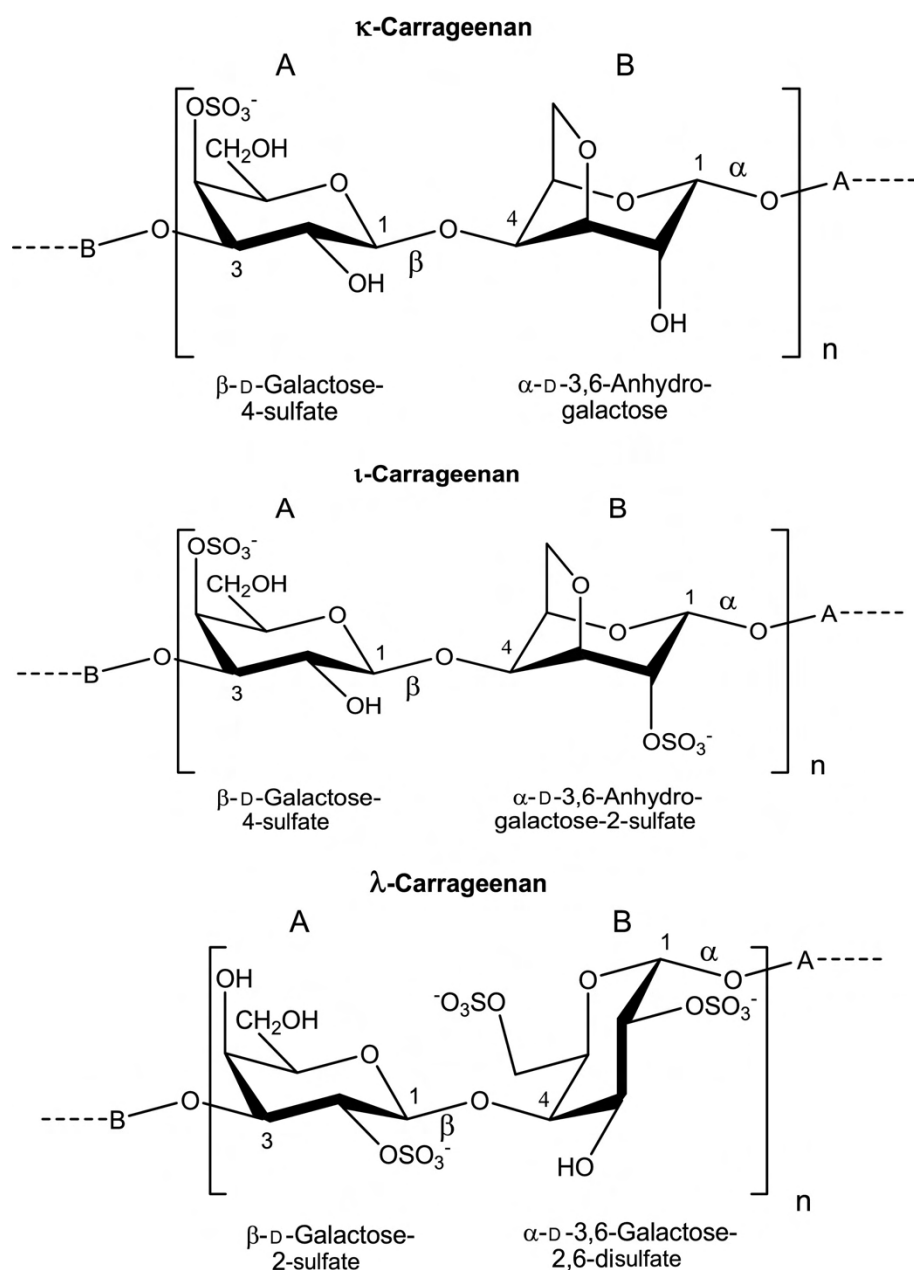


Figura 2.4 Fórmula estrutural das carragenanas kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ)

Fonte: EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food [55]

- Carragenana "iota" (ι): forma géis brandos, elásticos, lípidos e com baixo grau de sinérese. Quando em baixa concentração apresentam comportamento tixotrópico⁵. É constituída por cerca de 32% de grupos sulfato e 26% de 3,6-AG.

⁵ Isto é, os géis fragmentados conseguem regenerar-se sem a necessidade de aquecimento.

- Carragenana "kappa" (κ): forma géis fortes, quebradiços, ligeiramente opacos e com alto grau de sinérese. Possui cerca de 22% de grupos sulfato e 33% de 3,6-AG.
- Carragenana "lambda" (λ): atua como espessante e emulsificante, quando associada com proteínas. A quantidade de grupos sulfato ($\pm 35\%$) vai definir o seu poder espessante. Não contém quase nenhuma 3,6-AG, sendo menos afetada por catiões.

De uma maneira geral a concentração de 3,6-AG vai influenciar na formação e dureza dos géis, enquanto os grupos sulfato possuem um impacto na elasticidade dos géis e viscosidade de soluções. As características dos géis dependem, ainda, da concentração de catiões Ca^{2+} e K^+ . Algumas das vantagens no uso das carragenanas são as suas propriedades reológicas bastante versáteis, que permitem uma grande gama de aplicações [53].

2.1.2.2.3 Alginato

O alginato é um sal de ácido algínico extraído de diversas algas castanhas (classe Phaeophyceae) das ordens das Laminariales (*Ecklonia* spp., *Laminaria* spp., *Lessonia* spp., *Macrocystis* spp. e *Saccharina* spp.) e Fucales (géneros *Ascophyllum* spp., *Durvillaea* spp. e *Sargassum* spp.). O alginato é dos polímeros mais abundantes na natureza, em seguida à celulose, perfazendo cerca de 40% da matéria seca das algas castanhas. O termo "alginato" é frequentemente usado de maneira bastante ampla: às vezes, ele se refere especificamente ao alginato de sódio, enquanto em outros casos, é utilizado como um sinónimo para todos os compostos algínicos, isto é, ácido, sais solúveis e insolúveis, além de derivados (alginato de propilenoglicol ou PGA). A sua concentração nas algas depende de vários fatores (por exemplo, espécie e idade), devendo-se destacar que, devido a sua função estrutural que confere resistência e flexibilidade, quanto maior for a força das correntes e agitação do mar, maior deverá ser o teor de alginato. A alga *Laminaria hyperborea* (Phaeophyceae) é a fonte mais abundante deste ficocoloide, sendo também rica em ácido gulurónico, o constituinte da fração gelificante do alginato [52], [56].

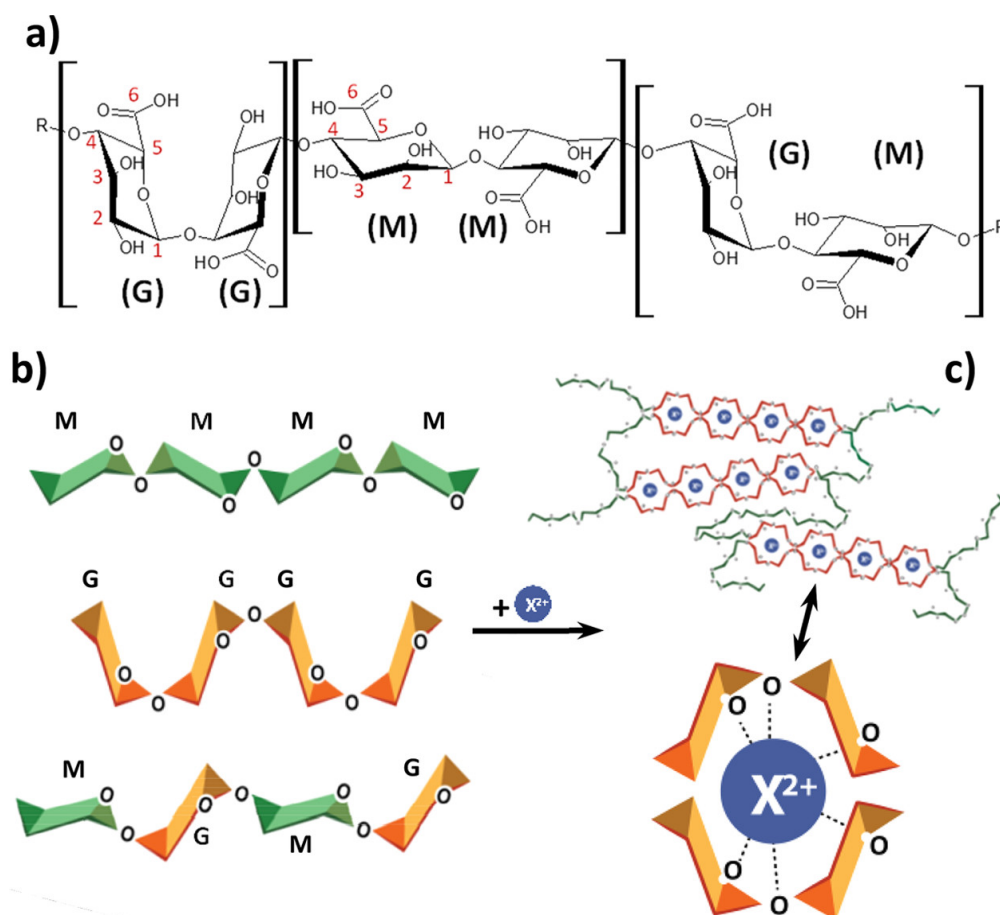


Figura 2.5 [A] Ácido algínico com seus respectivos monómeros de ácido gulurónico (G) e manurónico (M); [B] Estrutura das cadeias poliméricas composta por blocos MM, GG e MG; [C] Mecanismo de gelificação do alginato usando cátions divalentes (modelo “caixa de ovo”)

Fonte: Urbanova *et al.* [57]

Conforme pode ser visto na **Figura 2.5**, os alginatos são polímeros lineares, compostos por duas unidades monoméricas: ácidos “β-D-manurónico” (M) e “α-L-gulurónico” (G). Essas unidades elementares, encontram-se sequenciadas em blocos (MM ou GG) ou alternadas (MG ou GM). As ligações glicosídicas são do tipo β (1→4) para os blocos MM e α (1→4) para os blocos GG. O processo de gelificação ocorre através da formação zonas de junção, constituídas pelos blocos GG das moléculas, resultantes de ligações iônicas com o cálcio (ou com outros cátions divalentes), numa conformação conhecida por “caixa de ovo”. Dessa maneira é formada uma rede tridimensional, constituída por longas cadeias de alginato que aprisionam a fase líquida seu interior. Consequentemente, quanto maior o comprimento dos blocos GG, mais firme será o gel de alginato [53].

2.1.2.3 Lípidos

Os lípidos estão presentes em baixa concentração nas macroalgas marinhas, variando em média entre 1% e 6% do peso seco. A grande vantagem é que grande parte dos lípidos presentes são do tipo ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), em particular, dos tipos ômega-3 (ω -3, por exemplo, os ácidos eicosapentaenóico ou EPA e docosahexenóico ou DHA) e ômega-6 (ω -6, AA ou ácido araquidónico). A maioria dos ω -3 não é produzida pelo corpo humano⁶, sendo denominados ácidos gordos essenciais (EFA). Por essa razão, é preciso adquiri-los através da alimentação [58].

Estudos comprovam que uma dieta balanceada e saudável deve contemplar um consumo maior de PUFAs em detrimento dos ácidos gordos saturados, além de possuírem uma razão ω -3/ ω -6 equilibrada. Especula-se que um consumo excessivo de ω -6 (presentes na maioria dos óleos vegetais), sem uma compensação em termos de ω -3, pode levar ao aparecimento de enfermidades, tais como problemas cardiovasculares, processos inflamatórios, doenças autoimunes e até mesmo cancro [11].

Algas vermelhas e castanhas contém, maioritariamente, PUFAs com 20 carbonos, nomeadamente EPA e AA. As algas verdes parecem possuir ácidos gordos insaturados em maior quantidade que as demais. O ácido palmítico é o ácido gordo saturado (SFA) predominante na maioria das macroalgas.

Deve-se lembrar, mais uma vez, que diversos fatores podem influenciar a composição de ácidos gordos, como, por exemplo, salinidade e incidência solar [11]. Um estudo conduzido por Rodrigues *et al.* [59], com diversas algas coletadas na praia de Buarcos (Figueira da Foz), mostra que estes espécimes da costa portuguesa parecem confirmar a generalização feita anteriormente.

Pode-se ainda acrescentar que, à exceção da alga *G. gracilis*, todas as demais algas apresentam uma excelente razão ω -3/ ω -6, destacando as algas *C. tomentosum* com 0,35, “ratanho” (*Grateloupia turuturu*, Rhodophyta) com 0,46 e *O. pinnatifida* com 0,42. *C. tomentosum* foi a alga com maior teor de ácidos gordos totais e ω -3, e *G. turuturu* aquela com maior concentração de PUFAs e EPA [59].

2.1.2.4 Vitaminas, Minerais e Oligoelementos

Todos os minerais essenciais estão presentes nas macroalgas marinhas, para muito além do que as plantas terrestres oferecem. As algas possuem um

⁶ De facto, apenas as algas, e não animais, fungos ou plantas, têm os sistemas enzimáticos exclusivos para produzir grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados [4].

conteúdo de minerais que varia de 8% a 40% do peso seco. Neste grupo de micronutrientes, destaca-se o cálcio, que pode chegar a 7% do peso seco e, no caso das algas calcárias – constituídas sobretudo de carbonato de cálcio – o seu conteúdo pode variar de 25% a 34% do peso seco. Um aspeto relevante são os sais de potássio, em muitos casos presentes em quantidades bem maiores do que o cloreto de sódio, que podem conferir gosto salgado às preparações culinárias, sem impactar na pressão arterial⁷ [50].

Considerando o significativo teor de minerais nas algas, o seu consumo pode desempenhar um papel importante em termos de nutrição, já que elementos como o iodo, o ferro, o magnésio, o zinco e o manganês possuem papel fundamental na produção de enzimas e na regulação do metabolismo humano [60]. A carência de iodo, elemento importante ao funcionamento da glândula tireoide, pode causar bócio e, em crianças, prejudicar o crescimento e a formação do cérebro⁸. Da mesma maneira, o ferro em quantidades insuficientes pode levar a quadros de anemia. Há ainda o bromo que foi reconhecido recentemente como um micronutriente vital para os humanos [4].

As algas castanhas são geralmente as mais ricas em potássio e iodo, destacando-se a *Laminaria digitata* e demais algas laminárias. *U. lactuca* é das que mais possuem magnésio, ferro e manganésio, enquanto *C. crispus* se sobressai pelo teor em fósforo e zinco [50].

Outro grupo importante de micronutrientes é o das vitaminas. Embora algumas algas contenham tanto vitaminas hidrossolúveis como lipossolúveis, essa composição pode variar, dependendo de vários aspetos. No caso das vitaminas lipossolúveis, pode-se referir: a vitamina A (retinol) que está associada à visão; a vitamina D (colecalfiferol) que regula o metabolismo do cálcio, com um papel relevante no crescimento e manutenção dos ossos; a vitamina E (tocoferol) que possui ação antioxidante, protegendo o organismo dos radicais livres, e a vitamina K que se relaciona com a coagulação do sangue [50].

O grupo das vitaminas hidrossolúveis inclui as vitaminas do “complexo B”, que são o maior grupo vitamínico – e têm um papel associado com o metabolismo, o tónus muscular, o crescimento celular e o sistema nervoso – e,

⁷ Os sais de potássio como, por exemplo, o cloreto de potássio, conferem sabor amargo e metálico, sendo desagradáveis em quantidades muito altas.

⁸ A glândula tireoide de um adulto saudável armazena cerca de 8 mg de iodo, dos quais aproximadamente 2 µg por quilograma de peso corporal são consumidos diariamente. Para alguém que pese 75 kg, isso implica uma necessidade diária de 150 µg de iodo, que deve ser obtido através da alimentação e bebidas. Esta demanda pode aumentar se o iodo for consumido conjuntamente com outros elementos como o cloro, que é frequentemente adicionado à água potável em certos lugares. No contexto global, a carência de iodo é a principal causa tratável de déficit intelectual [4].

ainda, a vitamina C (ácido ascórbico), que se relaciona com a absorção do ferro pelo organismo e com o sistema imunitário. Esta última, quando não consumida nas quantidades recomendadas, pode levar ao quadro de escorbuto, distúrbio caracterizado por manifestações hemorrágicas e anemia [50].

P. palmata é a que possui mais vitamina A e uma maior variedade de vitaminas do complexo B, com destaque para a B₁ e a B₆. *H. elongata* é uma fonte abundante de vitamina B₁₂ – uma porção de 10 g de alga seca, possui cerca de 3-6 mg deste nutriente – que é fundamental para a síntese do ADN, desempenhando um papel crucial em vários processos metabólicos no organismo humano.

Como a carência de vitamina B₁₂ é um problema recorrente em dietas vegetarianas, pode-se facilmente contornar essa situação através da introdução desta alga marinha nas formulações alimentares.

É importante mencionar ainda que *U. rigida* possui os maiores teores de vitamina D, enquanto *C. crispus* é rico em vitamina E [50]. Dessa forma, a possibilidade de enriquecer as dietas cotidianas com determinadas algas marinhas poderia trazer significativos benefícios à saúde da população mundial.

2.1.2.5 Compostos Bioativos

Conforme discutido anteriormente, alguns dos nutrientes essenciais presentes nas algas podem proporcionar benefícios para a saúde humana. Além disso, outros nutrientes não essenciais também podem ajudar a prevenir ou regular as consequências de algumas enfermidades. Como exemplo, há os polissacarídeos tipo alginato – que ajudam no tratamento de obesidade, diabetes, infecções, gastrites e ulcerações, dentre outros efeitos benéficos – e os polissacarídeos sulfatados (carragenanas, fucoïdanas, porfiranas, ulvianas, etc.), que potencialmente possuem efeitos anticoagulante e antitrombótico, antilipêmico, antitumoral, antiviral, modulador do sistema imunitário, protetor contra doenças neurodegenerativas e redutor do processo de envelhecimento [50], [61].

Algumas proteínas conhecidas por serem compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde foram extraídas de diferentes espécies de algas marinhas (*U. pinnatifida*, *P. yezoensis*, etc.). Samarakoon e Jeon [62] em um artigo de revisão discutem sobre estes compostos e suas alegadas atividades, incluindo propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, anticoagulantes, antitumorais e imunoestimulantes.

Deve-se destacar que alguma pesquisa relevante vem sendo feita sobre os novos peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE), provenientes de algas marinhas, como alternativa para as drogas sintéticas.

Acredita-se que esses peptídeos bioativos de macro e microalgas marinhas possam constituir uma nova fonte para tratamentos da hipertensão com menos ou nenhum efeito colateral [60].

Diversos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, assim como pesquisas clínicas, confirmaram que alguns componentes químicos presentes nas algas marinhas, especialmente certos peptídeos, possuem propriedades biológicas em relação à sua capacidade antimicrobiana e antiviral.

Em destaque, pesquisas mostraram a eficácia da proteína antiviral “griffithsina” (originária da alga vermelha *Griffithsia* sp.) contra vírus da família Coronaviridae, que engloba o vírus da covid-19 [60].

Observando que os benefícios antioxidantes de vários alimentos vegetais terrestres (por exemplo, frutos vermelhos) estão estabelecidos, muito pouco se sabe sobre os benefícios das algas. Ao invés de atuarem sobre o controlo de espécies reativas de oxigénio, alguns de seus componentes parecem inibir a sua produção. Contudo, a maioria dos estudos não consegue distinguir adequadamente entre a diminuição da produção e o aumento na remoção de radicais livres. Neste quesito, uma classe de compostos que vem atraindo cada vez maior a atenção de cientistas são os polifenóis do tipo florotaninos em algas castanhas, que possuem uma extraordinária atividade antioxidante, apesar dos resultados inconsistentes em alguns estudos [63].

A R-ficoeritrina também possui atividade antioxidante, além de ter demonstrado ser uma boa alternativa para aumentar a seletividade da fototerapia no tratamento dos cânceros. Outros efeitos relatados pela literatura incluem atividades antidiabéticas, antitumorais, imunossupressoras e anti-hipertensivas [64].

Inúmeras pesquisas relatam o potencial dos carotenoides sobre várias patologias, tais como: inflamações, cardiopatias, cancro (próstata e fígado), danos na pele provocados pelos raios UV e problemas de visão [65]. A fucoxantina, um carotenoide extraído das algas castanhas, possui efeitos contra dislipidemia (através da promoção da síntese de DHA no fígado), melhora a resistência à insulina e diminui a glicose no sangue, além de ter atividade contra uma gama de células tumorais [50].

Estes compostos com atividade antioxidante são também cromóforos, isto é, absorvem comprimentos de onda da luz visível, conferindo cores aos alimentos. As ligações duplas conjugadas são responsáveis pela capacidade das moléculas de neutralizarem radicais livres (**Figura 2.6**). Muitos dos estudos sobre a biodisponibilidade de extratos antioxidantes de algas ainda se encontra em fase inicial em relação aos efeitos em humanos, isto é, testes *in vitro* da bioatividade

em linhagens celulares [63]. O mesmo acontece com vários dos demais compostos discutidos anteriormente.

Boa parte dos dados disponíveis sobre o consumo de algas e a suplementação de alimentos carece, contudo, até ao presente momento, de resultados quantitativos e qualitativos de eficiência comprovada [66].

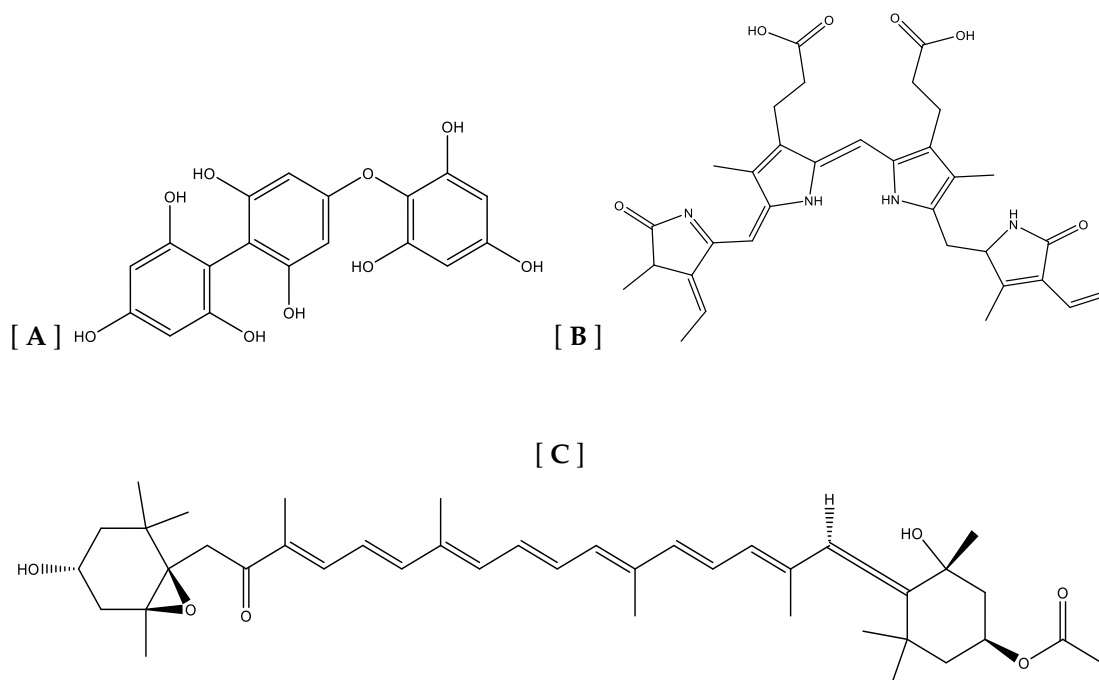


Figura 2.6 Estrutura de alguns dos compostos antioxidantes presentes em algas marinhas: [**A**] fucofloreto A (florotanino de *Fucus* spp.), [**B**] ficeeritobilina (pigmento das rodófitas) e [**C**] fucoxantina (pigmento das feofíceas)

Fonte: Criado pelo autor em ChemDraw 22.2.0

2.1.3 Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)

As características organoléticas dos alimentos oriundos do mar decorrem tanto dos seus componentes voláteis, quanto dos seus constituintes não-voláteis. Os últimos, como já foram discutidos, são representados maioritariamente por nucleotídeos, aminoácidos livres e sais inorgânicos. Como seria de esperar, nem todos os compostos voláteis presentes nas algas são igualmente importantes. O grau em que contribuem para o sabor depende da sua concentração e do valor do seu limiar de deteção (OTV, do inglês “*Odor Threshold Value*”) [25].

Hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, compostos halogenados, substâncias sulfuradas, furanos, pirazinas, piridinas, aminas, entre outros compostos voláteis, integram o amplo espectro de metabólitos voláteis encontrados em algas marinhas. Há variações notáveis nos

compostos voláteis de uma espécie de alga para outra. Fatores como a espécie da alga, sua procedência geográfica e os métodos de processamento influenciam diretamente no seu perfil de VOCs [67].

Observa-se uma maior abundância de aldeídos em detrimento de ésteres, relativamente às plantas terrestres, em especial no caso das frutas. A maior parte dos compostos responsáveis pelas características de aroma das algas deriva de PUFA's que são transformados em VOCs através de processos enzimáticos e, em menor escala, de autooxidação.

Os mecanismos da gênese destes compostos em algas podem ser divididos em quatro categorias principais [25].

Primeiramente, há a conversão de lípidos em compostos responsáveis pelo aroma mediados por enzimas, tais como a “enzima formadora de aldeído de cadeia longa” (LAFE) e a “lipoxigenase” (LOX), dando origem a compostos com aromas verdes e gordurosos, que lembram a relva cortada ou pepino.

De facto, quase todos os compostos de aroma encontrados nas algas também foram identificados nas plantas terrestres, excetuando-se os compostos halogenados contendo bromo e iodo [37].

Enquanto as enzimas tipo LAFE catalisam a formação de aldeídos (C_nCHO) a partir de PUFA's ($C_{n+1}COOH$), as enzimas tipo LOX parecem atacar a cadeia lateral destes ácidos gordos, dando origem a compostos de menor peso molecular (aldeídos de cadeia curta). Vale lembrar que os aldeídos são compostos, quimicamente instáveis, que existem em quantidades vestigiais nos alimentos. Porém, não se deve esquecer que, devido ao seu baixo limiar de detecção, estes compostos são bastante relevantes para a caracterização organolética das algas marinhas [37].

Em segundo lugar, existem os subprodutos da autooxidação de ácidos gordos livres dando origem a compostos carbonílicos voláteis (por exemplo, aldeídos e cetonas), ácidos e álcoois. Da mesma forma, há VOCs que são subprodutos de degradação oxidativa dos carotenoides (por exemplo, apocarotenoides tipo iononas) [25], [37].

O terceiro processo implica na conversão enzimática de precursores voláteis que contêm azoto e enxofre. É importante destacar que os compostos sulfurados, que geralmente apresentam aromas associados ao mar e à maresia, são produzidos em sua maioria por enzimas endógenas, ao passo que os compostos azotados, como a trimetilamina que possui um odor forte de peixe, parecem ser subprodutos das enzimas resultantes da deterioração causada por microrganismos [25].

Por fim, há que considerar os compostos resultantes das reações entre componentes não-voláteis das algas marinhas quando estas são submetidas a técnicas de conservação por tratamento térmico (por exemplo, subprodutos das reações de Maillard) [25].

Alguns mecanismos de formação de VOCs ainda não estão bem elucidados, como é o caso dos sesquiterpenos, diterpenos e acetilenos halogenados das algas vermelhas e as feromonas sexuais das algas castanhas [37].

Os compostos voláteis desempenham um papel crucial na percepção do sabor. De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO), o sabor é descrito como o “conjunto complexo de sensações olfativas, gustativas e trigeminais percebidas durante a degustação; o sabor pode ser influenciado por estímulos táteis, térmicos, de dor e/ou sinestésicos” [68]. É importante salientar, no entanto, que cerca de 80% daquilo que percebemos como sabor é, na verdade, resultado das interações no sistema olfativo [69]. Assim sendo, a análise dos compostos voláteis por meio de cromatografia gasosa (GC) – acoplada à espectrometria de massas (MS), nariz eletrónico ou olfatometria (GC-O), juntamente com a análise sensorial – continua sendo a abordagem analítica mais eficaz para a criação de um perfil sensorial. Além disso, essas técnicas representam uma ferramenta importante no processo de desenvolvimento de novos produtos alimentares que atendam ao paladar do mercado consumidor [70], [71].

As algas marinhas são conhecidas por suas propriedades sensoriais únicas, e certos termos são comumente usados para descrever seus sabores e aromas distintos. Algumas descrições frequentemente associadas às algas marinhas estudadas são:

- “Alface-do-mar” (*Ulva* spp.): quando fresca, é ligeiramente amarga com um sabor que remete a berbigões; possui aroma verde e gorduroso e algumas notas de ervas silvestres (azedas) [72]; quando seca, o aroma lembra ao ambiente marinho, com notas de relva cortada e chá-verde (*matcha*) [73].
- “Bodelho” (*Fucus vesiculosus*): sabor umami suave, amargo e adstringente, com notas tostadas [74].
- “Cabelo-de-velha” (*Gracilaria gracilis*): quando fresca, possui um aroma marinho e notas terrosas que lembram a cogumelos (champignon de Paris frescos); quando seca, o aroma a cogumelos torna-se mais intenso (shitake desidratado) e com notas fermentadas [75].
- “Chorão-do-mar” (*Codium tomentosum*): aroma marcante a maresia e mariscos [75];sabor intenso a percebes com notas frutadas (pêssego) [19].

- “Erva-patinha” (*Porphyra* spp.): sabor distinto a mar, evocando a essência do oceano quando fresca; a forma seca exhibe aromas semelhantes a cogumelos e frutas desidratadas (passas) [73]; quando torrada ou cozida, assume um perfil mais de peixe, sugestivo de sardinhas assadas [72].
- “Limo-corriola” (*Saccorhiza polyschides*): aroma marcante a pepino ou melão e ostras [75]; na boca é ligeiramente adocicada e traz algo de fruta verde (kiwi).
- “Musgo Irlandês” (*Chondrus crispus*): possui aroma suave e sabor levemente adocicado, que lembra a crustáceos [19]; quando seca apresenta um aroma que lembra a peixe (atum ou cavala) em conserva.
- “Musgos” (*Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*): Sabor fresco a mar com uma fragrância subtil terrosa, com notas de cogumelos e crustáceos [76].
- “Wakame” (*Undaria pinnatifida*): aroma iodado e verde que remete a couve-galega ou relva cortada [75]; sabor suave a mar e ostras [19]; quando cozida exala um aroma sulfuroso (ovos cozidos), possuindo sabor que lembra a leguminosas (grão de bico) e textura semelhante à de cefalópodes (nervura central).



Figura 2.7 “Roda de aromas” para análise sensorial de algas marinhas

Fonte: Francezon *et al.* [77]

Para auxiliar no treino de um painel para provas sensoriais com algas marinhas, Francezon *et al.* [77] desenvolveu uma “roda de aromas” (do inglês, “*aroma wheel*”) baseado nos principais descritores encontrados em estudos de caracterização realizados com algas (**Figura 2.7**). Esta ferramenta é interessante pois permite – além de estabelecer conexões entre os VOCs presentes nas amostras e as suas características sensoriais – padronizar os descritores utilizados pelos participantes, enquanto estabelece um vocabulário que pode ser utilizado pelos produtores para se comunicar com o mercado consumidor [78].

Normalmente, ao estudar a química do sabor de um ingrediente, busca-se quantificar a influência de cada VOC no perfil de aroma global do mesmo. Os limiares de detecção são fundamentais, pois mesmo compostos em baixa concentração na amostra podem impactar significativamente no aroma. Em contrapartida, substâncias em maior quantidade podem ter pouco efeito se estiverem abaixo do OTV [79].

Assim, adotou-se uma abordagem para determinar os compostos mais influentes no aroma, utilizando o conceito de “valor do impacto de odor” (OIR, do inglês “*Odor Impact Ratio*”) [80]. O OIR possui a limitação de somente permitir comparar os compostos de um mesmo cromatograma (já que calcula o “impacto relativo”), diferentemente do “valor do impacto de odor” (OAV, do inglês “*Odor Activity Value*”) [81]. Vale ressaltar que para calcular os OAVs é necessário proceder com a análise quantitativa para determinar a concentração dos compostos ($\mu\text{g/kg}$) através de padrões analíticos e uma curva de calibração, metodologia que não foi abordada neste estudo [82].

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Matérias-Primas

Para o trabalho descrito, foram colhidas as seguintes algas marinhas:

- Algas verdes (Chlorophyta): “alface-do-mar” (*Ulva rigida* e *U. lactuca*) e “chorão-do-mar” (*Codium tomentosum*);
- Algas vermelhas (Rhodophyta): “cabelo-de-velha” (*Gracilaria gracilis*), “erva-patinha” (*Porphyra umbilicalis*), “musgo irlandês” (*Chondrus crispus*) e musgos (*Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*);
- Algas castanhas (Phaeophyceae): “bodelho” (*Fucus vesiculosus*), “limo-corriola” (*Saccorhiza polyschides*) e “wakame” (*Undaria pinnatifida*).

2.2.1.1 Coleta

As algas marinhas foram colhidas na Praia da Tamargueira, Buarcos, Figueira da Foz (40°10'18,6" N, 8°53'44,4" W), Portugal. As amostras foram coletadas em áreas com populações de macroalgas bem estabelecidas e sem epífitas ou deterioração evidentes, durante a maré baixa da manhã (**Figura 2.8**), sendo acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixas térmicas. Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Algas Marinhas (Dep. Ciências da Vida) da Universidade de Coimbra, onde foram lavados com água do mar filtrada (colhida no mesmo local) para remoção de areia e epífitas macroscópicas. As amostras foram selecionadas manualmente, descartando-se os exemplares não padronizados, e foram colocadas em peneiras para drenagem do excesso de humidade. Em seguida, as algas marinhas foram pesadas (300 g), armazenadas em sacos plásticos sob vácuo parcial (~80%) e mantidas sob refrigeração (8 °C). Após 24 h, as amostras foram transportadas em caixas térmicas para a Faculdade de Ciências e Tecnologia (NOVA FCT), onde foram processadas.



Figura 2.8 Algas marinhas *Ulva* spp. (verde vivo), *Porphyra* spp. (roxo acastanhado) e *Fucus vesiculosus* (verde oliva), expostas durante a maré baixa

Fonte: Bruno Campos

2.2.1.2 Cultivo

Por ser a *Ulva lactuca* uma macroalga estuarina, esta foi cultivada num sistema protótipo desenvolvido pela Lusalgae Lda. (Figueira da Foz, Portugal) e o Laboratório de Algas Marinhas (Dep. Ciências da Vida) da Universidade de Coimbra.

O método foi baseado em Araujo *et al.* [83] sendo a *U. lactuca* cultivada em tanque de água exposto à luz solar direta com aeração durante o dia (normalmente 14 h) com o objetivo de obter biomassa suficiente para os ensaios.

Para minimizar as diferenças na composição bioquímica causadas pela condições de crescimento das macroalgas, as espécies cultivadas foram idênticas às da cultura *indoor* descrita por García-Poza *et al.* [84], ou seja, coletadas na mesma data e no mesmo local, possuindo comprimento inferior a 5 cm (**Figura 2.9A**). Como resultado, a técnica de cultura foi o principal fator que afetou o perfil bioquímico.

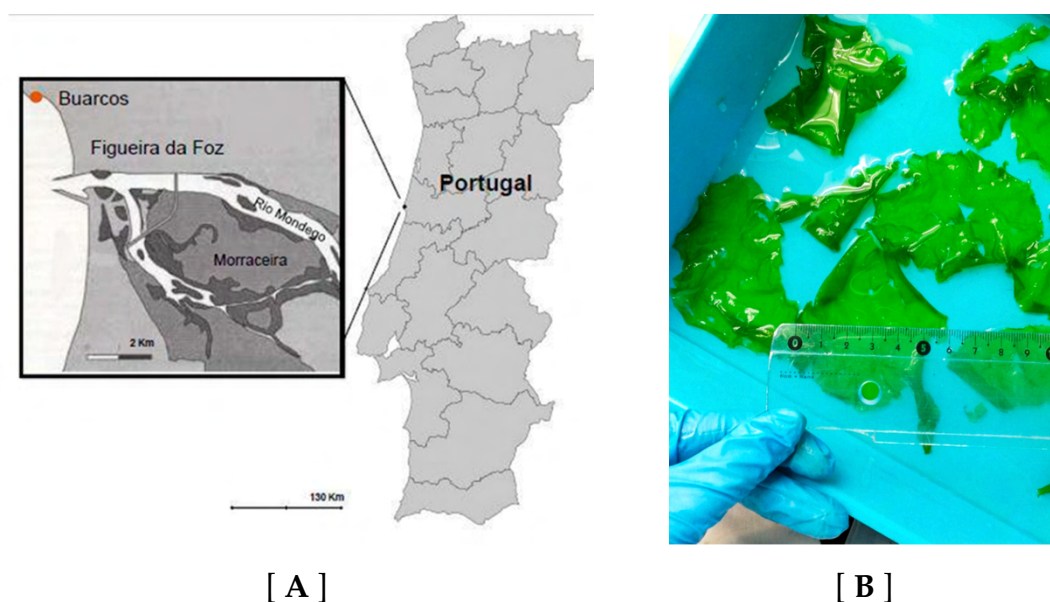


Figura 2.9 [A] Local de cultivo: Ilha da Morraceira (41°57'56'' N, 8°44'30'' W), Figueira da Foz, Portugal; [B] Espécimes de *Ulva* sp. cultivados em condições controladas

Fonte: García-Poza *et al.* [84]

O meio de cultura foi água salgada estuarina (23-34 PSU) retirada do estuário do rio Mondego, na Figueira da Foz (**Figura 2.9B**), sem adição de fertilizantes. O tanque de cultura tinha 1000 L de volume e continha 800 L de água do mar estuarina filtrada mecanicamente [83].

O cultivo iniciou-se com uma quantidade inicial de 600 g de biomassa húmida em um único tanque. Três vezes por semana, cerca de 75% da água do tanque era trocada e, após três semanas, toda a biomassa foi coletada para

posterior exame [83] e processamento conforme mencionado na subsecção anterior (2.2.1.1).

2.2.2 Composição Nutricional das Algas Marinhas

2.2.2.1 Determinação da Humidade e das Cinzas

Para a análise de humidade, em cadinhos de cerâmica previamente secos em estufa até se obter peso constante, depois de auferida a tara, pesou-se 3 g de cada uma das algas marinhas frescas acima listadas, em triplicado, usando-se uma balança analítica [Modelo BCE124-1S, Sartorius, Alemanha].

As amostras foram secas em estufa [Modelo TS 9135, Termaks / Nordic Labtech, Suécia] a 105 °C até se obter peso constante (cerca de 12 h). Após a secagem, os cadinhos foram parcialmente cobertos com uma tampa e transferidos para um exsicador até que o peso final fosse auferido. A humidade foi determinada através da **Equação 2.1**:

$$\text{Humidade (\% FW)} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100, \quad \text{Equação 2.1}$$

onde: P_1 é o peso da amostra antes da secagem (peso fresco) e P_2 é o peso da amostra após a secagem (peso seco) [85].

O princípio da análise das cinzas é o de incinerar a matéria orgânica para que se possa determinar a matéria inorgânica restante [85]. Para tal, primeiramente, o cadinho e a tampa foram colocados numa mufla [Heraeus Electronics, Alemanha] a 550 °C durante a noite para garantir que todas as impurezas fossem removidas. Depois de descansarem por 30 min no exsicador para arrefecerem, o peso dos mesmos, com 3 casas decimais, foi auferido usando uma balança analítica [Modelo BCE124-1S, Sartorius, Alemanha]. Na mesma balança, foram pesados nos cadinhos 5 g de cada alga fresca, em triplicado. Os cadinhos com as amostras foram postos (sem a tampa) na mufla a 550 °C para incinerar durante a noite. De seguida, cobriu-se cada cadinho para evitar a perda das cinzas, arrefeceram-se as amostras num exsicador por, pelo menos, 30 min e pesaram-se os cadinhos contendo as cinzas obtidas na balança analítica. O teor de cinzas das cinzas nas algas frescas foi determinado através da **Equação 2.2**:

$$\text{Cinzas (\% FW)} = \frac{\text{Peso das Cinzas}}{\text{Peso da Amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 2.2}$$

Os valores foram depois convertidos para peso seco, com base nos valores auferidos para a humidade, de maneira a poder confrontar os resultados com os valores disponíveis na literatura.

2.2.2.2 Quantificação das Proteínas Totais (Kjeldahl)

Para quantificação das proteínas totais pelo método Kjeldahl [86], pesou-se 1 g de cada amostra das algas secas, em triplicado, numa balança analítica [Modelo AB204, Mettler Toledo, Estados Unidos], usando um tubo para digestão. Adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico (96%) [Honeywell, Alemanha] e uma porção (15 mL) de “mistura catalisadora”, composta por selénio e sulfato de potássio, assim como reguladores de ebulição. Levou-se o tubo de digestão para ebulir numa placa de aquecimento a 360 °C até a amostra ficar transparente, o que levou cerca de 24 h. Transferiu-se a amostra digerida para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se com a água milli-Q. Filtrou-se o conteúdo, usando filtros de papel Whatman nº 1, o conteúdo para um frasco, removeram-se os reguladores de ebulição e reservaram-se as amostras.

Depois de digeridas todas as amostras num tubo de reação, colocou-se 10 mL do conteúdo de cada frasco, juntamente com 90 mL de água deionizada, sendo ainda adicionadas 3 gotas (0,15 mL) de fenolftaleína. De seguida, procedeu-se à alcalinização do meio, adicionando uma solução de hidróxido de sódio (6 M), até a solução adquirir uma coloração rosa. Colocou-se, num erlenmeyer de 250 mL, 50 mL de ácido bórico (20 g/L) e 0,5 mL de “solução indicadora” de ácido bórico (0,2 g de vermelho de metilo em 100 mL de etanol 95% mais 0,1 g de azul de metileno em 50 mL de etanol 95%). Efetuou-se de imediato a destilação da solução em análise, por cerca de 5 min, numa unidade destiladora Kjeldahl [Modelo KT 200 Kjeltec™, FOSS, Dinamarca], sendo recolhido o destilado na solução de ácido bórico.

Nesta etapa, verificou-se ainda se o destilado mudou a solução de ácido bórico de cor (de roxo para verde) e passou a marca dos 200 mL para garantir a destilação de todo o azoto da amostra. Após a destilação, efetuou-se uma titulação da solução com ácido clorídrico (HCL, 0,02 N) até a cor mudar novamente do verde para o roxo. Registou-se o volume de HCl empregado na titulação, tendo em consideração o volume inicial e final da pipeta. Por fim, o

azoto total foi determinado através **Equação 2.3**, sendo aplicado o fator de conversão azoto-proteína⁹.

$$\text{Azoto Total (g/100g)} = \frac{V_{\text{titulante}} \times N \times 14 \times V_{\text{balão}} \times 100}{V_{\text{amostra}} \times 1000 \times m_{\text{amostra}}}, \quad \text{Equação 2.3}$$

Em que:

- $V_{\text{titulante}}$ é o volume de titulante, isto é, o HCl gasto na titulação (mL);
- N é a normalidade do titulante (0,020718232 N);
- $V_{\text{balão}}$ é o volume do balão onde se armazenou o digerido (250 mL);
- V_{amostra} é o volume de amostra utilizada na destilação (mL);
- m_{amostra} é a massa de amostra utilizada na digestão ($1 \pm 0,1$ g).

2.2.2.3 Quantificação dos Lípidos Totais (Gravimetria)

Para quantificação dos lípidos totais por gravimetria, foi usado um processo de lavagem eficiente com solventes, onde todos os lípidos são separados e dissolvidos em clorofórmio e metanol [87], [88].

Uma adaptação e otimização do método original, proposta por Kumari *et al.* para o contexto das macroalgas, foi utilizada para uma maior recuperação da fase lipídica [89]. No caso das algas vermelhas e verdes, para 500 mg de algas marinhas liofilizadas trituradas, 3 mL de uma mistura contendo clorofórmio/metanol/tampão fosfato 50 mM [HoneyWell, Alemanha; Fisher Scientific, Reino Unido] nas proporções de 2/1/0,8, (v/v/v), foi adicionada e a mistura agitada em vortex por 1 min, sendo depois a amostra centrifugada [Centric 150, Domel, Eslovénia] à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) por 15 min a $2.057 \times g$.

Em seguida, o sobrenadante foi coletado e os resíduos foram extraídos novamente por três vezes com 2 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol/tampão nas proporções de 1/1/0,8 (v/v/v), sendo centrifugados novamente conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram combinados, filtrados e lavados com 2 mL de tampão fosfato e depois centrifugados a $2.057 \times g$ por 5 min. Finalmente, o sobrenadante foi coletado e seco sob um fluxo suave de azoto e o teor de lípidos totais foi determinado

⁹ Apesar de terem sido referidos os fatores de conversão azoto-proteína de 5,13 para algas verdes, 4,92 para algas vermelhas e 5,38 para algas castanhas na revisão bibliográfica, acabou-se por empregar o fator universal de 6,25 para que os resultados pudessem ser confrontados com aqueles disponíveis na literatura.

gravimetricamente e expresso em grama por cem gramas de peso seco (g/100 g DW). Para as algas castanhas, foi realizado o mesmo procedimento, exceto que nos primeiros 3 mL de mistura adicionados, as proporções foram de 1/2/0,8 (v/v/v).

Uma alga laminária em pó – referida como sendo *Thallus laminariae*, porém, possivelmente *Saccharina japonica*, Phaeophyta [90] – foi utilizada como material de referência padrão (SRM) [SRM 3232 Kelp Powder, NIST, Estados Unidos] para validar a metodologia e os resultados [91].

2.2.3 Perfil de VOCs das Algas Marinhas (GC-TOF-MS)

Uma fibra de trifásica de carboxeno/divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS) para amostradores automáticos (1 cm, 50/30 μm d_f) [Supelco, EUA], foi usada para as extrações por HS-SPME. Corridas com os brancos da fibra foram executadas periodicamente para garantir a ausência de contaminantes ou *carryover*.

A extração por HS-SPME foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: 3 g de cada amostra fresca ou processada das algas marinhas, previamente congeladas em azoto líquido e trituradas usando um moinho elétrico, foram introduzidas em um *headspace vial* de 20 mL, sendo este selado com um septo de politetrafluoretileno (PTFE)/silicone e uma tampa de rosca magnética [Supelco, EUA]. O frasco foi equilibrado por 10 min a 50 °C e depois extraído por 30 min na mesma temperatura, sendo realizada a dessorção térmica dos analitos por exposição da fibra na porta de injeção do GC a 260 °C, por 3 min, em modo *splitless*.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa por “tempo de voo” (GC-TOF-MS) composto por um GC 8890 System [Agilent Technologies, EUA] e um detetor BenchTOF-Select [Markes International, Reino Unido]. Um amostrador automático, CTC Analysis Autosampler PAL-System [SepSolve Analytical, UK], foi usado e os dados foram adquiridos e analisados com o programa TOF-DS 4.1 [Markes International, UK].

A separação cromatográfica foi obtida numa coluna capilar DB-WAX de polietilenoglicol (PEG) com as seguintes dimensões: 60 m de comprimento, ID 0,25 mm e d_f 0,25 μm [Agilent Technologies, EUA].

O programa de temperatura do forno começou a 50 °C, foi mantida por 2,5 min, aumentada em 3 °C.min⁻¹ até 90 °C, em 6 °C.min⁻¹ até 140 °C, 2 °C.min⁻¹ até 180 °C e, finalmente, 20 °C.min⁻¹ até atingir 240 °C, sendo mantida esta temperatura por 20 min para garantir a limpeza da coluna [33]. A temperatura

da linha de transferência e da fonte do detetor de massas foram fixadas em 280 °C. O hélio (99.9%) [Air Liquide, França] foi usado como gás de arraste num fluxo inicial de 1,0 mL/min.

Os espectros de massa foram analisados com o programa TOF-DS 4.1 [Markes International, UK]. e comparados com as bibliotecas do programa NIST MS Search, versão 2020. Para determinar os tempos de retenção e fragmentos de massa característicos, foi utilizada ionização eletrónica (EI) a 70 eV e os espectros de massa dos analitos foram registados em modo de varredura completa, de 30 a 400 Da. Os valores do índice de retenção linear (LRI) foram calculados através da análise de uma solução padrão de alcanos (C8–C24) [Supelco, EUA], usando as mesmas condições cromatográficas [92].

Os compostos voláteis foram primeiramente identificados comparando os espectros de massa obtidos com os espectros de compostos de referência da biblioteca NIST – também levando em consideração estrutura, iões mais abundantes e peso molecular – e, de seguida, os LRIs calculados foram confrontados com aqueles descritos na literatura.

Além disso, 37 padrões analíticos [Sigma-Aldrich/Merck, Alemanha] foram diluídos a 100 ppm em hexano P.A. e 1 µL foi injetado, usando uma razão de separação (*split ratio*) de 1:20 e o mesmo programa cromatográfico, de modo a fazer uma identificação mais precisa dos principais compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes.

As áreas dos picos dos VOCs individuais detetados nas duas réplicas foram usadas para calcular as concentrações médias em cada alga marinha. A área relativa (RA) de cada composto foi calculada como a razão da respetiva área integrada do pico (A_p) em relação à área total dos picos cromatograma (TA_p), excluindo-se o ruído de base e os contaminantes, sendo expressa como percentagem, através da **Equação 2.4**:

$$RA (\%) = \frac{A_p}{TA_p} \times \frac{3 \text{ g}}{\text{Peso da Amostra (g)}} \times 100, \quad \text{Equação 2.4}$$

A intensidade do odor dos diferentes compostos voláteis identificados foi estimada por meio da razão de impacto do odor (OIR). Resumidamente, os valores do limiar de odor (OTV) disponíveis – medidos em água, exceto quando especificado outro meio – foram compilados de Gemert [93] e o OIR para os compostos voláteis individuais foi calculado da seguinte forma (**Equação 2.5**) [80]:

$$\text{OIR} = \frac{\text{RA Médio}}{\text{OTV } (\mu\text{g/kg})} \quad \text{Equação 2.5}$$

Foram considerados para efeitos de discussão os dez compostos com maior OIR, agrupados nas 3 categorias de macroalgas (verdes, vermelhas e castanhas). De seguida, os valores foram normalizados para uma escala de 0 a 100% e registados em um gráfico de radar. Adicionalmente, as descrições de odor para alguns dos VOCs foram extraídas do banco de dados da The Good Scents Company [94] ou, quando ausentes, da literatura existente.

2.2.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa RStudio, versão 2022.2.1.461 [95], usando análise de variância (ANOVA) de um fator (tratamento) totalmente causalizado, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey das diferenças significativamente honestas (HSD). Todos os resíduos das séries de dados foram testados para normalidade (teste de Shapiro-Wilk), simetria (teste de D'Agostino), curtose (teste de Anscombe-Glynn) e homocedasticidade (teste de Levene). Os resultados foram expressos como média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (s). A referência para o nível de significância estatística (α) dos testes foi $\alpha = 5\%$.

2.3 Apresentação e Discussão dos Resultados

2.3.1 Composição Nutricional das Algas Marinhas

Segundo a **Figura 2.10**, a alga com o menor teor de humidade foi *Chondrus crispus* (CC) com 75,10% e aquela com o maior foi *Codium tomentosum* (CT) com 93,43%. Era expectável que fossem encontrado valores altos de humidade para CT uma vez que a sua morfologia esponjosa faz com esta alga se destaque pelo elevado teor de água [96], [97]. Todas as algas exibiram valores bastante próximos daqueles compilados da literatura, porém as algas *Undaria pinnatifida* (UP), *Fucus vesiculosus* (FV) e *Gracilaria gracilis* (GG) apresentaram valores de 88,24%, 88,30% e 84,99%, ligeiramente acima da média das referências.

Ainda assim, estes valores não estão muito distante daqueles encontrados por Pacheco *et al.* [98] para UP (93,52%), por Herbreteau *et al.* [99] para FV (84,10%) e por Silva *et al.* [100] para GG (83,18%). De uma forma geral, maioria das algas tem uma humidade média acima de 80%, o que implica que elas tendem

a reter uma quantidade significativa de água e são bastante suscetíveis a deterioração por microrganismos [43].

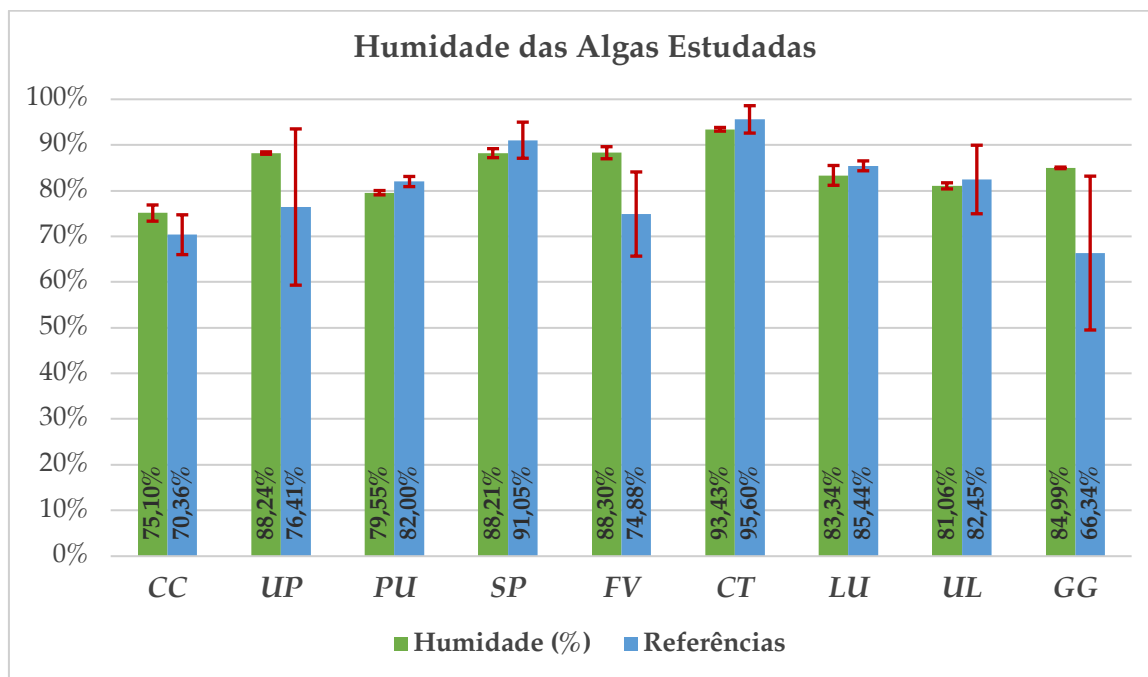


Figura 2.10 Humidade (%FW) das algas estudadas pelo método da AOAC

Referências: CC [18], [101]; UP [98], [102]; PU [103]; SP [18], [98]; FV [99], [104]; CT [97], [105]; LU [106], [107]; [108], [109]; GG [100], [106].

Notas: Os valores de humidade para as algas marinhas estão apresentados como a média e a barra de erros como o desvio-padrão, enquanto os valores para as referências estão apresentados como a média dos valores compilados e a barra de erros como os valores mínimos e máximos encontrados na literatura.

Em relação às cinzas (**Figura 2.11**), a alga que se destaca com a maior média é CT com 55,93%, enquanto PU é aquela com menor concentração (21,65%). Não se pode ignorar que CT é ainda a alga com o maior desvio padrão (variação em suas amostras), com um valor de 4,78%. CC, UP, PU, UL e GG possuem resultados consistentes com a literatura, enquanto em SP, FV e CT os valores parecem exceder os resultados para o teor de cinzas. Isto pode ter sucedido por conta da presença de contaminantes inorgânicos nas amostras, tais como grãos de areia, ou até mesmo de pequenos organismos marinhos, conchas e outras algas epífitas. Em relação a LU, por se tratar de uma alga ainda pouco pesquisada, só há uma referência bibliográfica disponível, o que torna mais difícil a comparação dos resultados [107].

Deve-se ainda ter em consideração que as algas apresentam uma grande variabilidade no teor de minerais de acordo com o local, a estação do ano e a presença de determinados elementos químicos na água do mar [110]–[112].

A generalidade das algas tem uma quantidade significativa de cinzas que representa em média cerca de 30% do seu peso seco, indicando a presença de

minerais e outros compostos inorgânicos. A quantidade de cinzas vai influenciar sobretudo o valor nutricional, tornando-as alimentos indicados para o consumo humano e para suplementação de preparações alimentares [113].

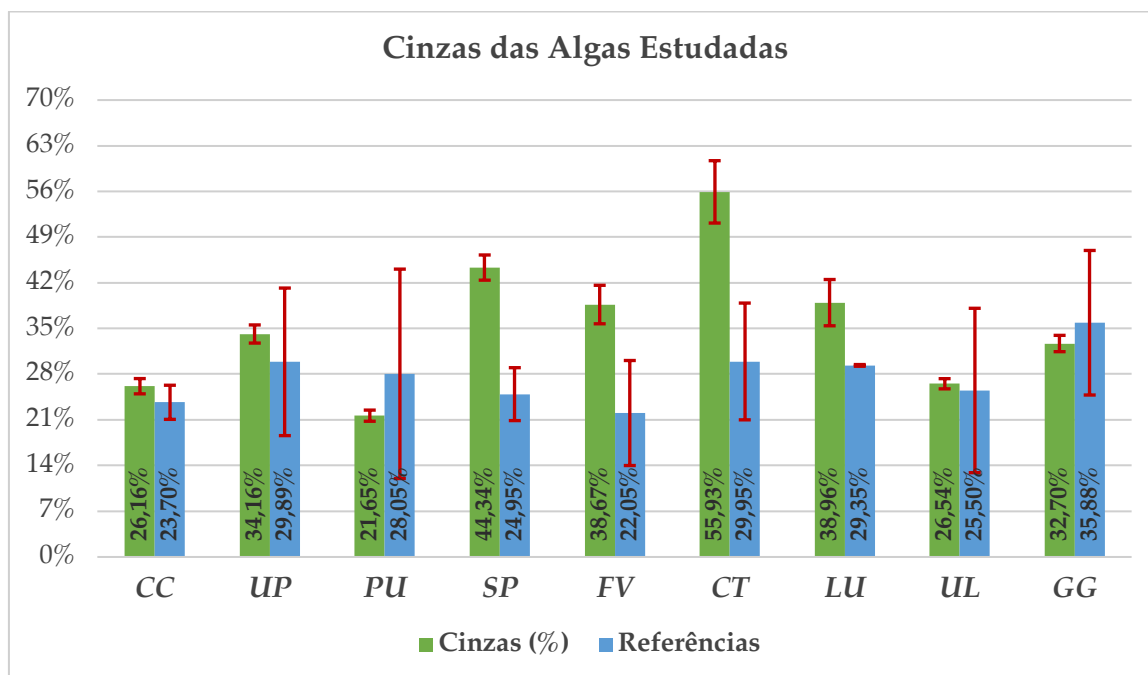


Figura 2.11 Cinzas (%DW) das algas estudadas pelo método da AOAC

Referências: CC [50], [114]; UP [50], [98]; PU [50], [115]; SP [98], [116]; FV [50], [113]; CT [116], [117]; LU [107]; UL [50], [115]; GG [59], [118].

Notas: Os valores de humidade para as algas marinhas estão apresentados como a média e a barra de erros como o desvio-padrão, enquanto os valores para as referências estão apresentados como a média dos valores compilados e a barra de erros como os valores mínimos e máximos encontrados na literatura.

O conteúdo proteico das algas marinhas (**Figura 2.12**) mostra uma grande variação, oscilando entre 10 a 30% do peso seco em algas vermelhas, de 5 a 15% em algas castanhas e de 3 a 47% em algas verdes [18].

Se, por um lado, UL é a alga marinha com o menor teor proteico (3,87%), por outro lado, PU revelou-se como a alga com o maior teor, possuindo cerca de um terço do seu peso seco (30,33%) em proteínas, seguida por GG com 22,96%. Não surpreende que duas algas vermelhas tenham se sobressaído pelo seu alto conteúdo proteico, assim como PU seja a alga que encabeça a lista, já que espécies como *Porphyra* spp. e *Pyropia* spp. costumam ser distinguidas por esta mais-valia [14].

A maioria dos resultados está em conformidade com a bibliografia disponível, exceto por UL que possui uma concentração inferior ao valor encontrado por De Bhowmick & Hayes [119] de $5,37\% \pm 0,74$ (referência para o valor mínimo). Uma razão razoável para o baixo valor auferido é que UL foi colhida numa altura em que estava a iniciar o seu ciclo reprodutivo,

apresentando as amostras uma considerável perda de biomassa. Além disso, é possível que tenha havido algum déficit de nitrato no meio de cultura, o que pode impactar negativamente no teor de proteínas [120].

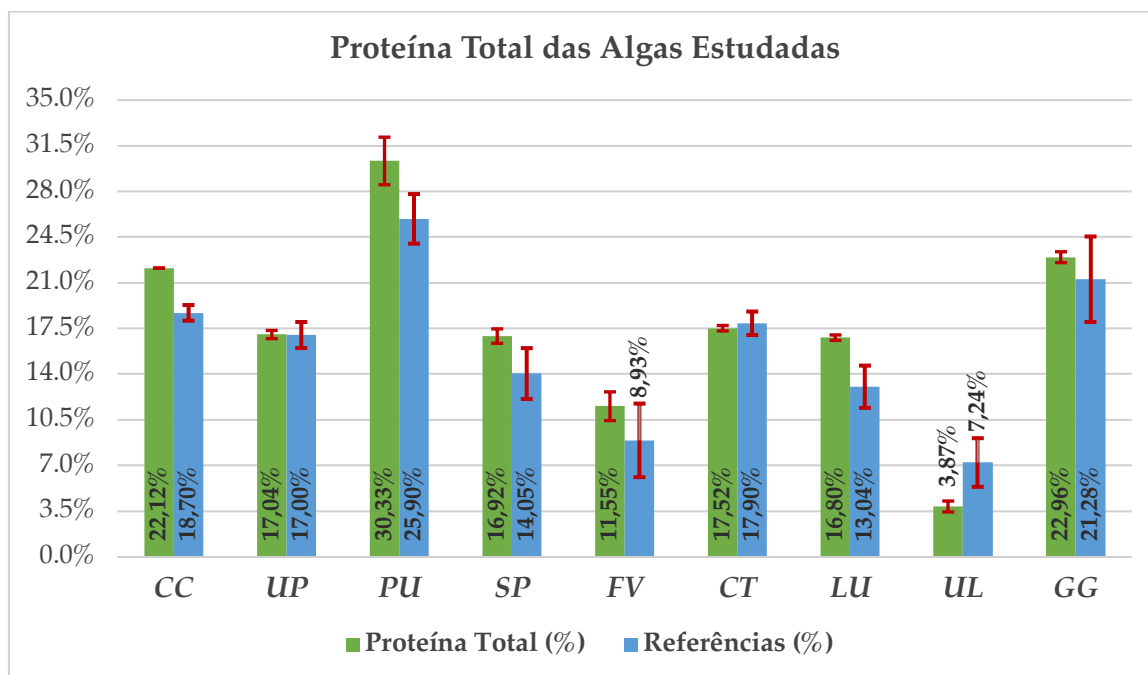


Figura 2.12 Proteína total % (DW) das algas estudadas pelo método de Kjeldahl

Referências: UP, PU, SP, FV, CT & GG [18], [59], [104], [116]; CC [121]; LU [107]; UL [119].

Notas: Os valores de humidade para as algas marinhas estão apresentados como a média e a barra de erros como o desvio-padrão, enquanto os valores para as referências estão apresentados como a média dos valores compilados e a barra de erros como os valores mínimos e máximos encontrados na literatura.

O conteúdo de proteínas é um indicador importante do valor nutricional das algas, especialmente se forem destinadas ao consumo humano ou animal. Algumas indústrias ou consumidores podem buscar algas com alto teor proteico para atender a necessidades dietéticas específicas (por exemplo, dietas isentas de produtos de origem animal) já que as mesmas contêm todos os aminoácidos essenciais em quantidades variáveis conforme a espécie [122], [123]. Adicionalmente, em um contexto em que há uma necessidade urgente de se produzir alimentos proteicos de forma sustentável, as algas marinhas emergem como uma alternativa viável à pecuária [4].

No geral, o conteúdo de lípidos nas algas (**Figura 2.13**) variou de aproximadamente 1% a 7%, situando-se a maioria das algas na faixa inferior desse intervalo (1%–2%). A alga com a menor teor de lípidos foi LU com apenas 1,02% e aquela com maior teor foi UP com 7,17%, sendo sucedida por CT com 5,60%. Todos os valores se encontram alinhados com aqueles disponíveis na literatura. Apesar de CT e FV aparentemente terem apresentado valores ligeiramente superiores, segundo Rey *et al.* [12], CT pode atingir até 10% de

lípidos (DW), enquanto Costa *et al.* [124] indicam que FV pode alcançar até 4% de lipídios (DW). O conteúdo de lípidos, apesar de relativamente baixo, distingue-se por ser de excelente qualidade, sendo as algas marinhas uma fonte de ácidos gordos essenciais, em particular, do tipo ω -3 conforme apontam diversos estudos [125].

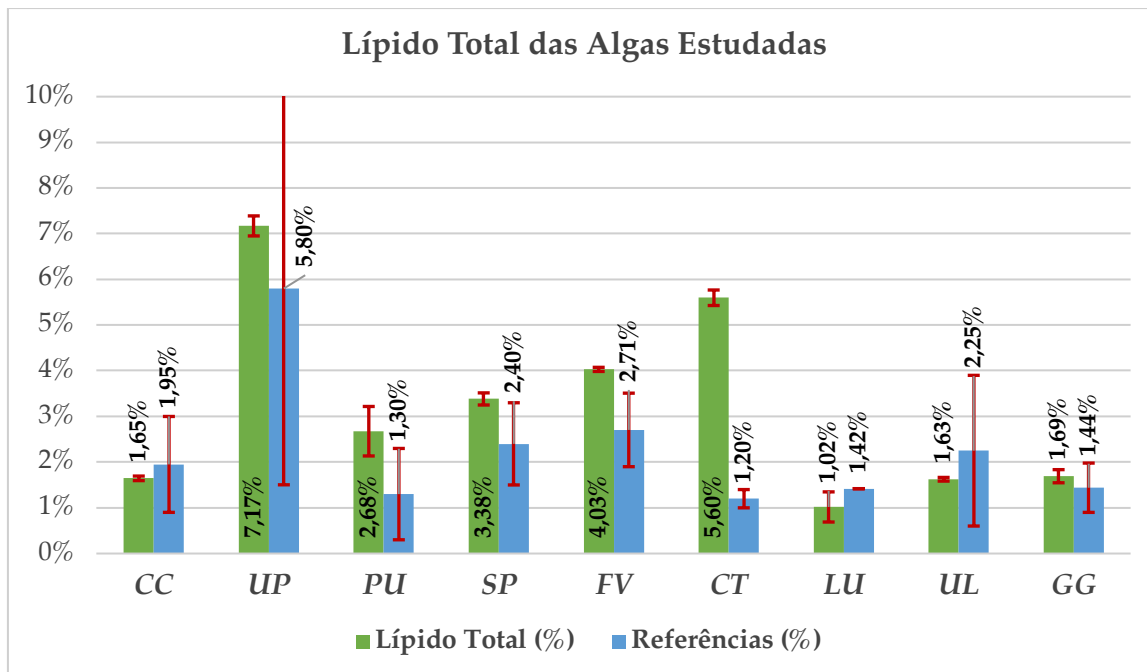


Figura 2.13 Lípido total (%DW) das algas estudadas pelo método gravimétrico

Referências: CC, UP, PU, CT & UL [50], [116]; SP [98]; FV [104]; LU [107]; GG [126].

Notas: Os valores de humidade para as algas marinhas estão apresentados como a média e a barra de erros como o desvio-padrão, enquanto os valores para as referências estão apresentados como a média dos valores compilados e a barra de erros como os valores mínimos e máximos encontrados na literatura.

Por fim, pode-se afirmar com base no que foi discutido que as algas marinhas estudadas possuem uma composição interessante sob a ótica nutricional, isto é, possuem elevados teores de humidade, proteínas e minerais em conjunto com um teor lipídico baixo, o que faz com que elas possuam um baixo aporte calórico. Por esta razão, torna-se essencial estudá-las e buscar novas formas de incorporá-las na alimentação.

2.3.2 Perfil de VOCs das Algas Marinhas

Através da análise GC-MS foi possível identificar um total de 544 compostos orgânicos voláteis nas 9 algas analisadas (**Figura 2.14**), mais especificamente: foram identificados 80 VOCs em “musgo irlandês” (*Chondrus crispus*), 63 em “wakame” (*Undaria pinnatifida*), 72 em “erva-patinha” (*Porphyra umbilicalis*), 44 em “limo-corriola” (*Saccorhiza polyschides*), 16 em “bodelho” (*Fucus*

vesiculosus), 58 em “chorão-do-mar” (*Codium tomentosum*), 85 em “musgos” (*Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*), 66 em “alface-do-mar” (*Ulva lactuca*) e 60 em “cabelo-de-velha” (*Gracilaria gracilis*).

Percebe-se claramente uma maior riqueza em termos de VOCs nas algas vermelhas, sendo *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus* e *P. umbilicalis*, respetivamente, as três primeiras colocadas no ranking. Em contrapartida, *F. vesiculosus* apresentou poucos VOCs.

Dentre os VOCs identificados, 124 eram diferentes entre si: 36 aldeídos (20 insaturados, 10 saturados, 4 aromáticos e 2 terpenóides), 22 álcoois (10 insaturados, 5 saturados, 2 ramificados, 2 aromáticos e 2 cíclicos), 20 hidrocarbonetos (10 alcenos, 5 alcanos, 3 ramificados e 2 terpenos), 18 cetonas (8 insaturadas, 4 saturadas, 4 terpenóides, 1 ramificada e 1 cíclica), 8 ésteres, 4 ácidos carboxílicos, 2 éteres e 14 compostos com grupos funcionais diversos (3 VOCs halogenados, sendo 2 bromados e 1 clorado, 2 azotados, 2 sulfurados, 5 furanos, 1 fenol e 1 epóxido).

Os aldeídos são caracterizados principalmente por seus aromas verdes e gordurosos [127], [128]. O comprimento da cadeia de carbono em aldeídos influencia principalmente seus limiares e características de odor. Aldeídos com pesos moleculares mais baixos, normalmente menos de 150 Daltons (Da) – usualmente, com menos de 10 carbonos – são frequentemente associados a odores desagradáveis, enquanto aqueles com pesos moleculares mais altos tendem a exibir aromas doces e frutados [67].

Os aldeídos são produzidos em algas marinhas de diversas formas, destacando-se a atividade enzimática resultante do metabolismo das algas e outros organismos marinhos que ataca as cadeias de ácidos gordos (polinsaturados, como o EPA) gerando estes VOCs (**Figura 2.15**). Há ainda a oxidação lipídica pela via de agentes endógenos (por exemplo, “espécies reativas de oxigénio” ou ROS) ou exógenos (luz e oxigénio) e pela oxidação de álcoois primários ou redução de ácidos carboxílicos, o que normalmente ocorre também por via enzimática [25], [129].

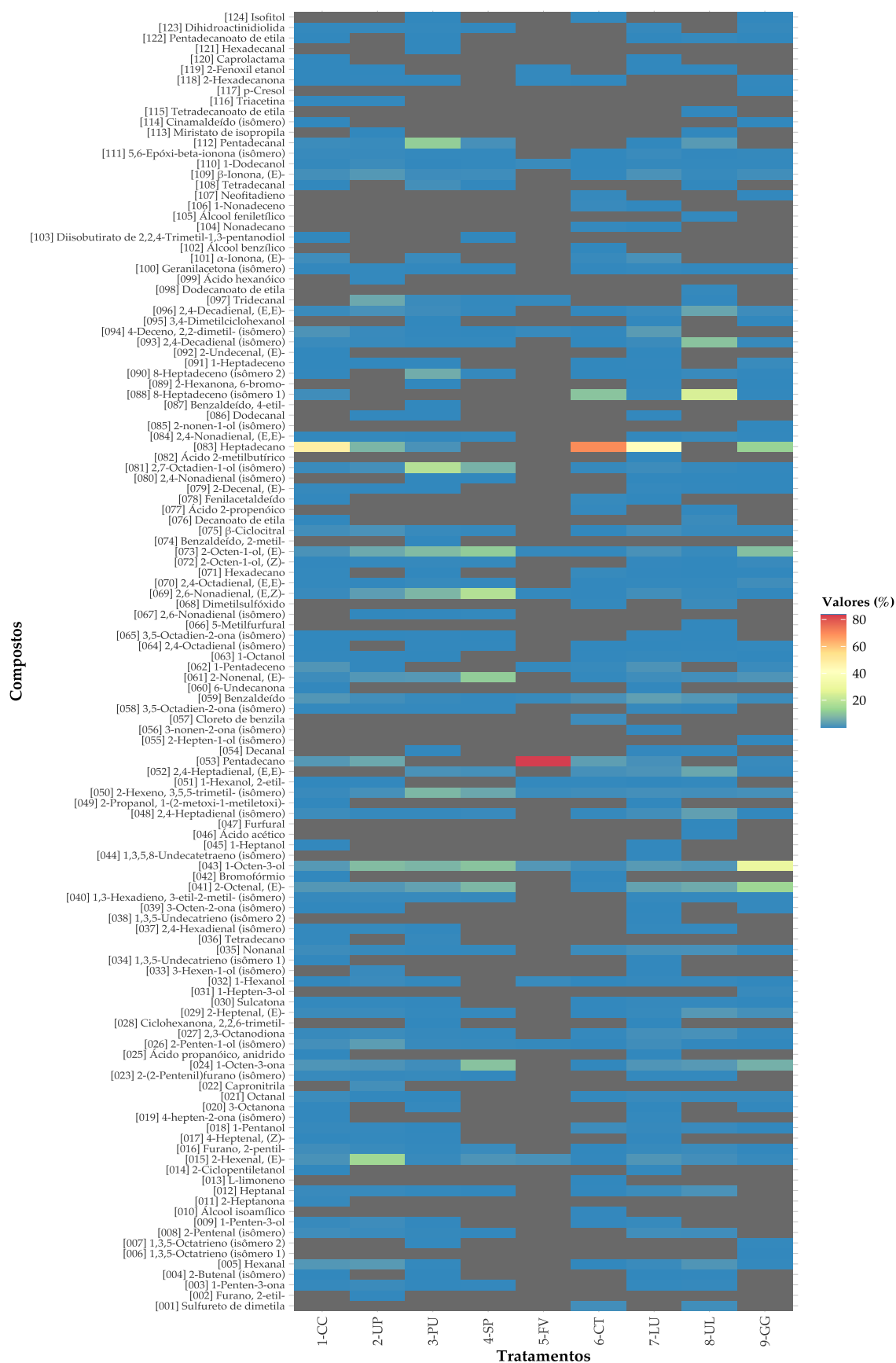


Figura 2.14 *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização das algas marinhas em termos de VOCs

Para visualizar o *heatmap* em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clcando aqui!](#)

Os aldeídos, conforme pode ser visto na **Figura 2.16**, além de ser o grupo funcional predominante nas algas estudadas (excetuando-se *F. vesiculosus*, onde dominam os álcoois), costuma possuir baixos limiares de detecção contribuindo, dessa forma, em grande parte para o perfil de aroma das algas marinhas [25], [37].

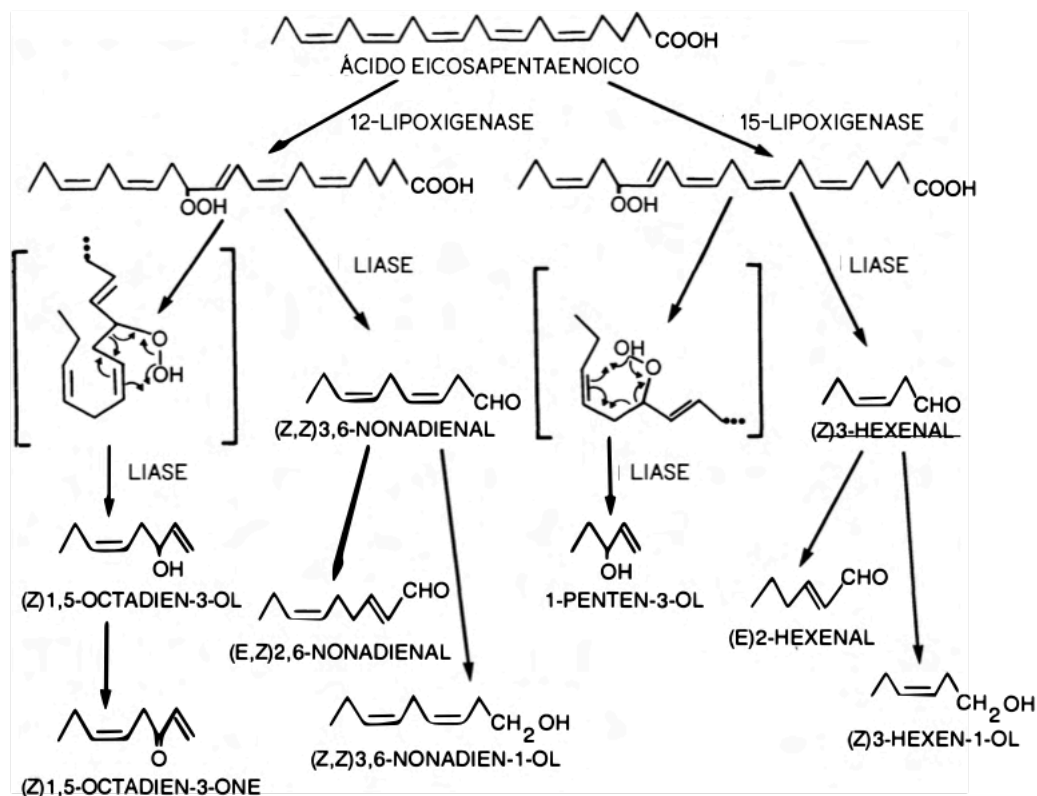


Figura 2.15 Mecanismo proposto para a biossíntese a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA) de alguns compostos de sabor presentes em alimentos do mar frescos

Fonte: Adaptado pelo autor de Maarse [25]

O aroma dos álcoois pode variar dependendo do tipo específico de álcool e sua estrutura química. Geralmente, os álcoois conferem um sabor doce e um cheiro característico e pungente, embora a intensidade e o caráter do aroma possam diferir [130].

A formação de álcoois em algas marinhas pode ocorrer por vários processos, sendo que a maioria dos álcoois encontrados são gerados como produtos de peroxidação de ácidos gordos insaturados [67], [131]. Além disso, a formação de álcoois pode resultar da glicólise de polissacarídeos abundantes nas algas marinhas, por enzimas endógenas ou exógenas de origem microbiológica, ou ainda de aminoácidos pela via de Ehrlich [67]. Outra via envolve a conversão de compostos específicos em álcoois, facilitada por enzimas como a álcool desidrogenase (ADH) [131].

Ao observar a **Figura 2.16**, percebe-se que os álcoois são os compostos mais abundantes em *F. vesiculosus*, e o segundo grupo funcional mais presente em *U. pinnatifida*, *C. tomentosum* (juntamente com os hidrocarbonetos), *U. lactuca* e *G. gracilis* [132].

O aroma específico de uma cetona pode variar, dependendo de sua estrutura química e da presença de outros grupos funcionais, com uma ampla gama de aromas relatados: frutado (butanona), amanteigado (diacetil), mentolado (ciclohexanona), floral (β -ionona), etc. [94].

As cetonas alifáticas são tipicamente formadas como resultado de processos de oxidação ou degradação lipídica [131]. As metilcetonas, por outro lado, podem ser geradas através da β -oxidação de cadeias de carbono presentes em lípidos, seguida de descarboxilação [67].

Dioxigenases de clivagem de carotenoides (CCDs) também desempenham um papel fundamental na fragmentação de carotenoides e apocarotenoides não-voláteis de cadeia longa. Estas enzimas, que podem estar presentes nas algas, têm a capacidade de utilizar esses compostos como substratos, resultando na formação de cetonas como a β -ionona, considerada uma das mais potentes moléculas de aroma¹⁰ (amadeirado, bagas e floral) que contribui significativamente para o aroma de algas e ambientes marinhos. Além disso, voláteis derivados de carotenoides funcionam como metabólitos ou moléculas de sinalização que são produzidos como resultado do metabolismo de carotenoides e estão associados a componentes reguladores do crescimento [133].

¹⁰ Já foi comprovado que os humanos podem ter uma predisposição genética para detetar β -ionona em maior ou menor grau. Enquanto pessoas que possuem pelo menos um alelo G são bastante sensíveis à β -ionona, experimentando um agradável aroma floral; aquelas que possuem um par de alelos AA (homozigotos) são cerca de 100 vezes menos sensíveis e, em concentrações mais elevadas deste composto, percebem um odor pungente semelhante a ácido ou vinagre [382]. Estas variações genéticas esclarecem porque alguns panelistas conseguem detetar o composto mesmo em concentrações residuais enquanto outros são incapazes de fazê-lo, o que explica a grande variação nos limiares de detecção listados pela literatura [383].

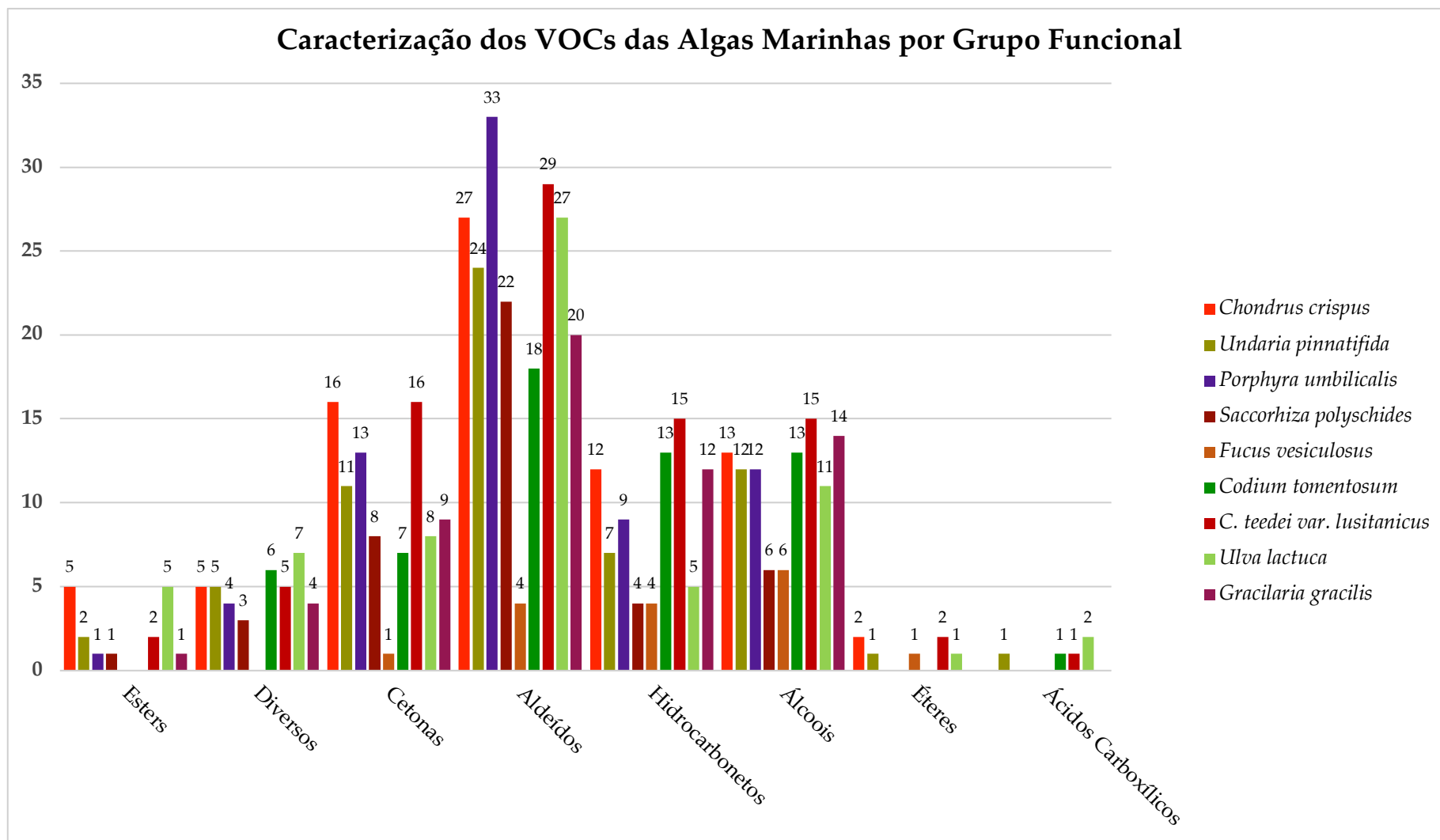


Figura 2.16 Caracterização dos VOCs das algas marinhas por grupos funcionais

De acordo com os resultados representados na **Figura 2.16**, as algas vermelhas *C. crispus*, *P. umbilicalis* e *C. teedei* var. *lusitanicus* (excetuando-se *G. gracilis*) possuem como segundo grupo funcional dominante o das cetonas, diferentemente das algas verdes e castanhas (excetuando-se *S. polyschides*) que parecem ser caracterizadas pela predominância aldeídos e de álcoois [134]–[137].

Alcanos e outros os hidrocarbonetos alifáticos são geralmente inodoros ou possuem um aroma fraco, quase indetetável, geralmente descrito como aroma “gasoso” ou “semelhante à gasolina”. No entanto, a exceção são certos alcanos cíclicos com cadeia lateral insaturada que podem ter odores característicos que lembram, por exemplo, ao de frutas tropicais [138].

Em relação aos alcenos, também existem alguns compostos classificados como terpenos, que são compostos por unidades repetidas de isopreno $(C_5H_8)_n$, onde $n \geq 2$. Estes compostos são conhecidos pelos seus aromas distintos e encontram-se em numerosos produtos naturais: citrinos (limoneno), pinheiros (α -pineno), lúpulo (humuleno), etc. [139].

Hidrocarbonetos, como octano e decano, podem ser sintetizados a partir de ácidos gordos insaturados C_{20} por meio de um processo envolvendo 9-hidroperóxidos, clivagem enzimática e rearranjo [140]. Os hidrocarbonetos de cadeia longa normalmente possuem limiares de detecção significativamente altos [93]. No entanto, quando compostos com alto limiar de odor estão presentes em altas concentrações, eles ainda podem contribuir significativamente para o aroma geral dos alimentos [67]. Os hidrocarbonetos parecem desenvolver-se nas algas marinhas de um modo geral, não somente em termos qualitativos, como também em termos quantitativos.

Qualitativamente, é possível notar na **Figura 2.16** que este é o segundo grupo funcional (juntamente com os aldeídos) mais presente em *F. vesiculosus* e o terceiro grupo funcional (juntamente com os álcoois) mais presente em *C. tomentosum* e *C. teedei* var. *lusitanicus*.

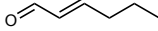
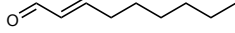
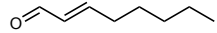
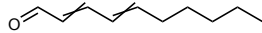
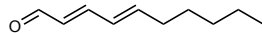
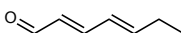
Quantitativamente, ao olhar a **Tabela 2.2**, nota-se que pentadecano, heptadecano e 8-heptadeceno (isómero 1) representaram, respetivamente, 83,586%, 69,925% e 25,186% da área total do cromatograma.

Os ésteres são os principais responsáveis por conferir notas frutadas ao perfil de aromas, sendo notável que os ésteres insaturados tendem a ter limiares de detecção de odor mais baixos em comparação com os ésteres saturados [67]. Estudos sugerem que a extração de ésteres voláteis depende do método de extração utilizado e que diferentes espécies de algas possuem diferentes ésteres predominantes em seu perfil de VOCs [141].

Destacam-se ainda as enzimas esterases, presentes em algas e bactérias marinhas, que representam um grupo diverso de hidrolases que catalisam a clivagem e formação de grupos funcionais tipo éster [142]. Em bactérias marinhas, estas desempenham um papel importante nos processos metabólicos, como a quebra de fosfodiésteres exógenos e intracelulares através de fosfodiesterases, por exemplo [143]. Dois tipos de esterases foram isolados de *Bacillus licheniformis*, que habitam algas do género *Ulva* spp. [144], [145].

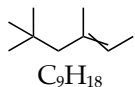
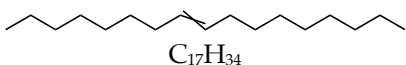
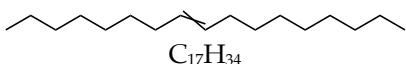
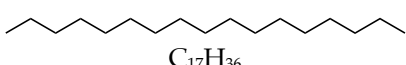
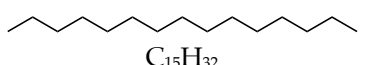
Em algas, também foi observada a existência de reações induzidas por feridas, como a transformação da toxina caulerpenina facilitada por esterases na alga verde *Caulerpa* spp. [146]. Os ésteres, juntamente com os ácidos carboxílicos e éteres, parecem desempenhar um papel secundário no perfil de aroma das algas marinhas estudadas uma vez que, quando presentes, foram identificados em concentrações vestigiais.

Tabela 2.2 VOCs presentes em maior concentração nas algas marinhas estudadas

Grupo Funcional	Compostos	Estrutura *	Concentração **	Descritores ***	Presente em
Aldeídos ¹¹	2-Hexenal, (E)- Aldeído da folha [CAS# 6728-26-3]	 C ₆ H ₁₀ O	0,078% – 15,235%	Pungente, verde, folhoso, fresco, limpo, frutado com nuances herbais e picantes.	Todas, com maior concentração em <i>U. pinnatifida</i>
	2-Nonenal, (E)- [CAS# 18829-56-6]	 C ₉ H ₁₆ O	0,158% – 12,509%	Verde, pepino, aldeídico, gorduroso com uma nuance cítrica.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>S. polyschides</i>
	2-Octenal, (E)- [CAS# 2548-87-0]	 C ₈ H ₁₄ O	0,172% – 14,862%	Fresco, pepino, gorduroso, verde, herbal, banana, ceroso, folhoso.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>G. gracilis</i>
	2,4-Decadienal (isômero) [CAS# 2363-88-4]	 C ₁₀ H ₁₆ O	0,012% – 10,885%	Gorduroso, oleoso, verde, semelhante à pele de frango.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>U. lactuca</i>
	2,4-Decadienal (E,E)- [CAS# 25152-84-5]	 C ₁₀ H ₁₆ O	0,045% – 5,525%	Gorduroso, frango, fritura, cítrico, coentros, caldo culinário.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>U. lactuca</i>
	2,4-Heptadienal, (E,E)- [CAS# 4313-03-5]	 C ₇ H ₁₀ O	0,236% – 5,810%	Gorduroso, verde, oleoso, aldeídico com uma nuance vegetal.	PU, SP, CT, LU, UL e GG, com maior concentração em <i>U. lactuca</i>
	2,6-Nonadienal, (E,Z)- Aldeído do pepino [CAS# 557-48-2]	 C ₉ H ₁₄ O	0,055% – 18,515%	Verde, pepino, melão, gorduroso e vegetal.	Todas, com maior concentração em <i>S. polyschides</i>

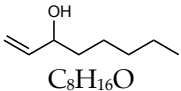
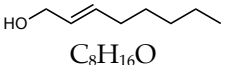
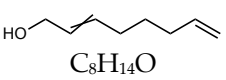
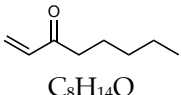
¹¹ Os outros aldeídos (por ordem de eluição) identificados em concentrações menores nas algas marinhas estudadas foram: 2-butenal (isômero); hexanal; 2-pentenal (isômero); heptanal; (4Z)-heptenal; octanal; (2E)-heptenal; nonanal; 2,4-hexadienal (isômero); 2,4-heptadienal (isômero); decanal; benzaldeído; 2,4-octadienal (isômero); 2,6-nonadienal (isômero); (2E,4E)-octadienal; 2-metil-benzaldeído; β-ciclocitral; fenilacetaldéido; (2E)-decenal; 2,4-nonadienal (isômero); (2E,4E)-nonadienal; dodecanal; 4-etil-benzaldeído; (2E)-undecenal; tridecanal; tetradecanal; pentadecanal; cinamalaldeído (isômero); hexadecanal.

Tabela 2.2 VOCs presentes em maior concentração nas algas marinhas estudadas (continuação)

Grupo Funcional	Compostos	Estrutura *	Concentração **	Descritores ***	Presente em
Hidrocarbonetos ¹²	2-Hexeno, 3,5,5-trimetil- (isômero) [CAS# 26456-76-8]	 C ₉ H ₁₈	0,444% – 8,68%	N/D	Todas, com maior concentração em <i>P. umbilicalis</i>
	8-Heptadeceno (isômero 1) [CID# 5352243]	 C ₁₇ H ₃₄	0,088% – 25,186%	Terroso, musgo.	CC, CT, LU, UL e GG, com maior concentração em <i>U. lactuca</i>
	8-Heptadeceno (isômero 2) [CID# 5364555]	 C ₁₇ H ₃₄	0,008% – 6,770%	Terroso, musgo.	CC, PU, SP, CT, LU, UL e GG, com maior concentração em <i>P. umbilicalis</i>
	Heptadecano [CAS# 629-78-7]	 C ₁₇ H ₃₆	1,924% – 69,925%	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível.	CC, UP, PU, CT, LU e GG, com maior concentração em <i>C. tomentosum</i>
	Pentadecano [CAS# 629-62-9]	 C ₁₅ H ₃₂	0,405% – 83,586%	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível.	CC, UP, FV, CT, LU e GG, com maior concentração em <i>F. vesiculosus</i>

¹² Os outros hidrocarbonetos (por ordem de eluição) identificados em concentrações menores nas algas marinhas estudadas foram: 1,3,5-octatrieno (isômero 1); 1,3,5-octatrieno (isômero 2); L-limoneno; 1,3,5-undecatrieno (isômero 1); tetradecano; 1,3,5-undecatrieno (isômero 2); 3-etil-2-metil-1,3-hexadieno (isômero); 1,3,5,8-undecatetraeno (isômero); 1-pentadeceno; hexadecano; 1-heptadeceno; 2,2-dimetil-4-deceno (isômero); nonadecano; 1-nonadeceno; neofitadieno.

Tabela 2.2 VOCs presentes em maior concentração nas algas marinhas estudadas (continuação)

Grupo Funcional	Compostos	Estrutura *	Concentração **	Descritores ***	Presente em
Álcoois ¹³	1-Octen-3-ol Álcool do matsutake [CAS# 3391-86-4]	 C ₈ H ₁₆ O	1,040% – 30,806%	Cogumelos, terroso, verde, oleoso, vegetal e fúngico.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>G. gracilis</i>
	2-Octen-1-ol, (E)- [CAS# 18409-17-1]	 C ₈ H ₁₆ O	0,1347% – 12,428%	Verde, cítrico, vegetal, gorduroso.	Todas, com maior concentração em <i>S. polyschides</i>
	2,7-Octadien-1-ol (isômero) [CAS# 23578-51-0]	 C ₈ H ₁₄ O	0,082% – 18,827%	N/D	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>P. umbilicalis</i>
Cetonas ¹⁴	1-Octen-3-ona [CAS# 4312-99-6]	 C ₈ H ₁₄ O	0,015% – 10,561%	Terroso intenso, metálico, com aroma de cogumelos e nuances vegetais de repolho e brócolos.	Todas, exceto FV, com maior concentração em <i>S. polyschides</i> , seguido de <i>G. gracilis</i> (7,390%).

Notas: (*) Criado em ChemDraw 22.2.0; (**) Valores mínimo e máximo para a RA; (***) Referências: The Good Scents Company [94]; Selli *et al.* [147] para “8-heptadeceno”; Anselmi *et al.* [51] para os hidrocarbonetos saturados de cadeia longa.

¹³ Os outros álcoois (por ordem de eluição) identificados em concentrações menores nas algas marinhas estudadas foram: 1-penten-3-ol; álcool isoamílico; 2-ciclopentiletanol; 1-pentanol; 2-penten-1-ol (isômero); 1-hepten-3-ol; 1-hexanol; 3-hexen-1-ol (isômero); 1-heptanol; 2-etil-1-hexanol; 2-hepten-1-ol (isômero); 1-octanol; (2Z)-octen-1-ol; 2-nonen-1-ol (isômero); 3,4-dimetilciclohexanol; álcool benzílico; álcool feniletílico; 1-dodecanol; isofitol.

¹⁴ As outras cetonas (por ordem de eluição) identificadas em concentrações menores nas algas marinhas estudadas foram: 1-penten-3-ona; 2-heptanona; 4-hepten-2-ona (isômero); 3-octanona; 2,3-octanodiona; 2,2,6-trimetil-ciclohexanona; sulcatona; 3-octen-2-ona (isômero); 3-nonen-2-ona (isômero); 3,5-octadieno-2-ona (isômero); 6-undecanona; 3,5-octadieno-2-ona (isômero); geranilacetona (isômero); (E)- α -Ionona; (E)- β -Ionona; 2-hexadecanona; dihidroactinidiolida.

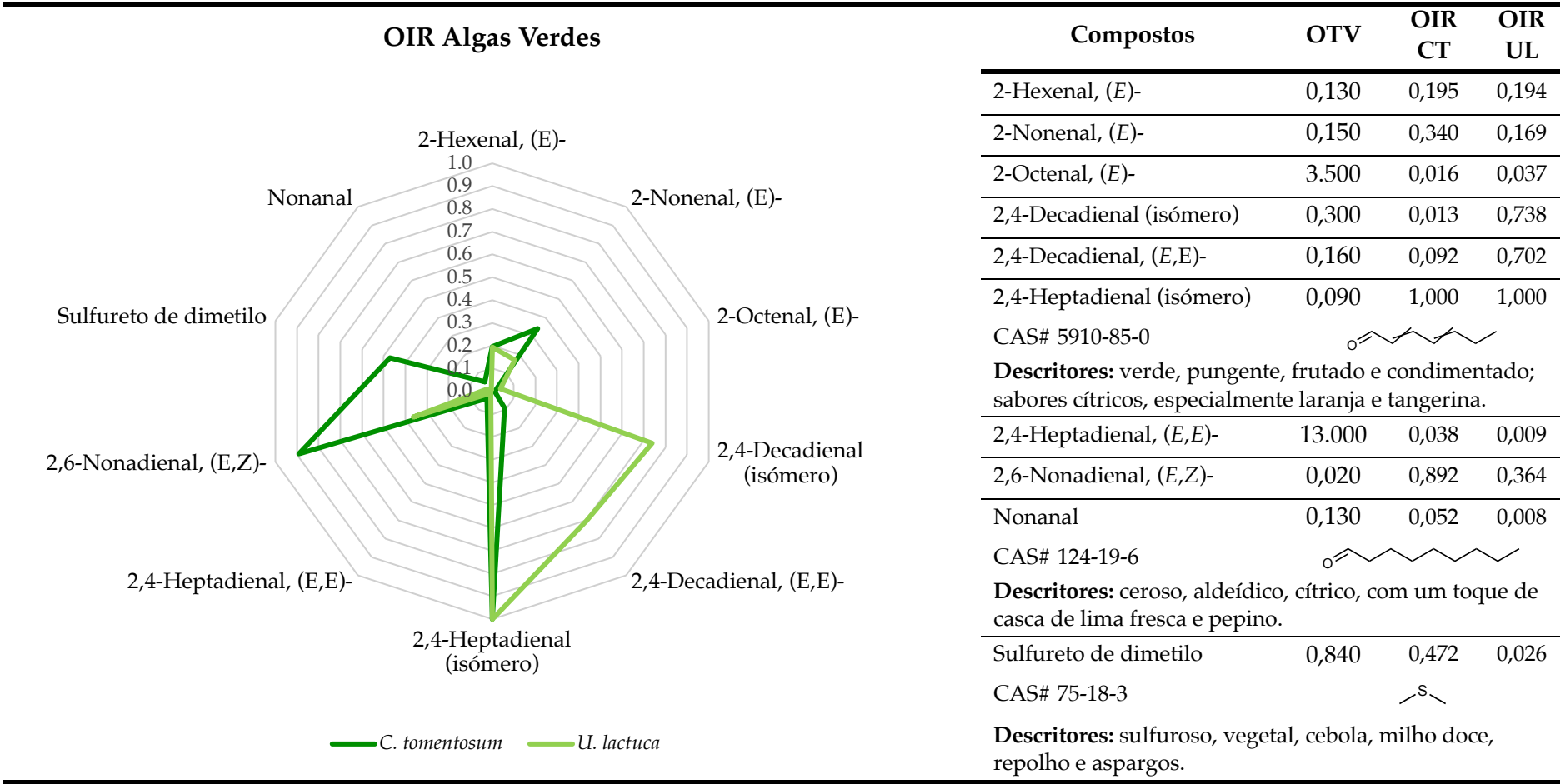
Conforme pode ser visto na **Tabela 2.3**, tanto *C. tomentosum* quanto *U. lactuca* parecem ser dominadas pela presença do 2,4-heptadienal (isômero) que impacta no perfil de aroma trazendo notas verdes e pungentes. Talvez seja também por esta razão que o aroma das algas verdes seja muitas vezes associado a alimentos como ervas silvestres, a exemplo do descritor “azedas” para *U. lactuca*, e frutas pouco maduras, como é o caso do descritor “pêssego” para *C. tomentosum* [19].

O (2*E*,6*Z*)-nonadienal destaca-se como o segundo composto mais relevante na caracterização de *C. tomentosum*, trazendo notas verdes e gordurosas que evocam a casca de pepino e de outras cucurbitáceas. Em seguida, há o sulfureto de dimetilo (DMS), que proporciona às algas um aroma remanescente da brisa do mar. O (2*E*)-nonenal apresenta características olfativas similares ao (2*E*,6*Z*)-nonadienal, porém com um toque mais cítrico. Por último, o (2*E*)-hexenal, assim como o 2,4-heptadienal (isômero), exala um aroma verde, intenso e folhoso.

A respeito dos VOCs presentes em maior concentração nas algas marinhas analisadas (**Tabela 2.2**), observa-se que *U. pinnatifida* possui a mais elevada concentração de (2*E*)-hexenal, frequentemente chamado de “aldeído da folha” por seu aroma que remete à relva recém cortada, representando 15,235% da área do cromatograma. *S. polyschides* é notável por sua concentração de (2*E*)-nonenal (12,509%), (2*E*,6*Z*)-nonadienal ou “aldeído do pepino” (18,515%), (2*E*)-octen-1-ol (12,428%) e 1-octen-3-ona (10,561%). *G. gracilis* é marcada pela presença de (2*E*)-octenal (14,862%) e 1-octen-3-ol ou “álcool do *matsutake*” (30,806%), um álcool encontrado no cogumelo japonês homônimo com aroma marcante.

Em *U. lactuca*, destacam-se os aldeídos, em especial 2,4-decadial (isômero) com 10,885%, (2*E*,4*E*)-decadienal com 5,525% e (2*E*,4*E*)-heptadienal com 5,810%, além de 8-heptadeceno (isômero 1) compreendendo 25,186% da área cromatográfica total. Por último, *P. umbilicalis* apresenta 8,68% de 3,5,5-trimetil-2-hexeno (isômero) e 6,770% de 8-heptadeceno (isômero 2), ambos hidrocarbonetos característicos deste gênero de alga vermelha [148]. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a abundância relativa de um determinado VOC não significa necessariamente que este composto tenha presença marcante no perfil de aroma de um determinado alimento. Para saber quais os VOCs que impactam em maior grau nas algas marinhas estudadas, foram calculados os OIR para cada amostra, sendo os mesmos agrupados pela classificação taxonômica das macroalgas, isto é, divisões Chlorophyta e Rhodophyta (algas verdes e vermelhas, respectivamente) e classe Phaeophyceae (algas castanhas).

Tabela 2.3 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas verdes (Chlorophyta)



(*) Valores normalizados (entre 0–1) usando como referência o composto de maior OIR.

No caso de *U. lactuca*, é importante referir que em segunda e terceira posição, com OIRs muito próximos, encontram-se o 2,4-decadienal (isómero) e o (2*E*,4*E*)-decadienal. Os isómeros de 2,4-decadienal, em concentrações reduzidas, apresentam um aroma refrescante (coentros) e cítrico. No entanto, quando em quantidades mais elevadas, incorpora um aroma gorduroso aos alimentos, lembrando frango frito com um leve toque de ranço [149]. Outros aldeídos adicionais, como (2*E*)-nonenal e (2*E*)-hexenal, parecem influenciar o aroma de *Ulva* spp., ainda que de forma mais sutil segundo Sugisawa *et al.* 1990 [135].

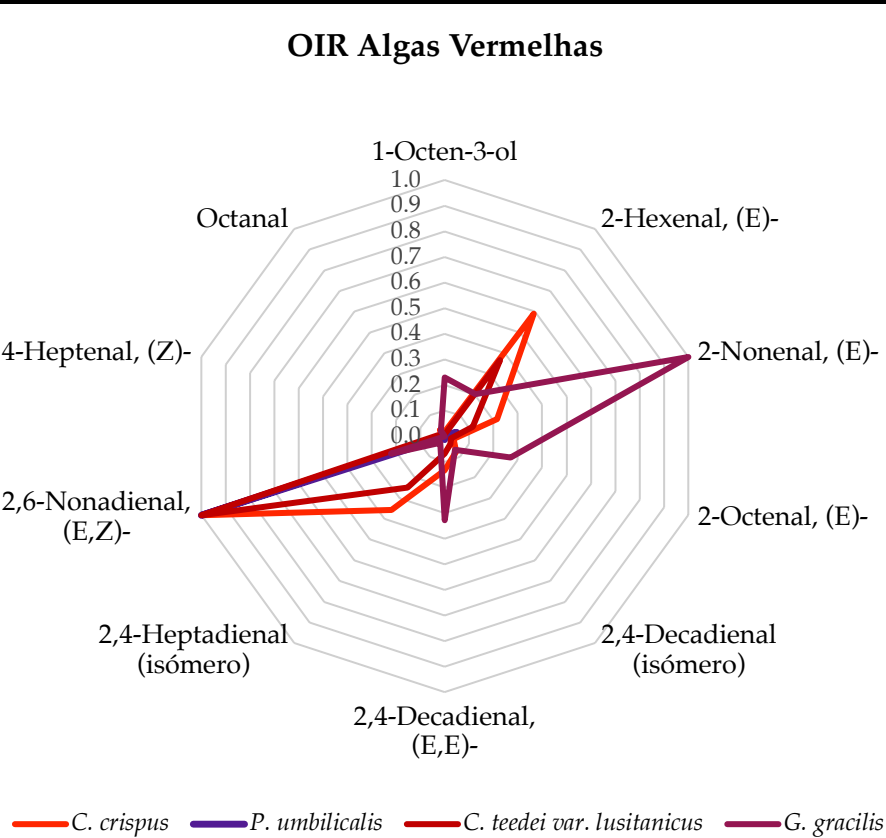
É possível observar ainda um impacto do sulfureto de dimetilo inferior ao esperado para *U. lactuca*. As algas pertencentes ao género *Ulva* spp., juntamente com diversos organismos do fitoplâncton, possuem uma quantidade expressiva de dimetilsulfoniopropionato (DMSP), que pode representar até 2% de seu peso seco. No verão, sob exposição solar e em temperaturas elevadas, as algas desse género têm potencial para liberar grandes volumes de DMS na atmosfera de áreas litorâneas [150].

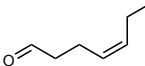
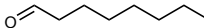
O DMS¹⁵ é um composto abundante que normalmente desempenha um papel significativo no aroma de macroalgas marinhas verdes (Chlorophyta), além de outros tipos de macroalgas marinhas (por exemplo, *Porphyra* spp. e *Pyropia* spp., Rhodophyta) [37]. A variação no teor de DMS entre as espécies, particularmente as de *Ulva* spp., provavelmente está ligada a uma reação catalisada por enzima envolvendo a conversão de DMSP em DMS pela “dimetilpropiotetina detiometilase” [37].

Outra explicação razoável para a variação dos compostos de enxofre entre diversos estudos é que, durante o armazenamento das amostras, existe o risco de perda substancial de compostos orgânicos voláteis de enxofre (VOSCs). VOSCs de baixo peso molecular, como metilsulfonilmetano (MSM) e DMS, também são particularmente suscetíveis à oxidação térmica, levando à formação de dimetil dissulfeto (DMDS) ou outros compostos de enxofre, especialmente em portas de injeção aquecidas de cromatógrafos a gás e colunas de transferência MS [151].

¹⁵ Além do DMS, também é comum identificar outros compostos contendo enxofre, como dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil sulfona e dimetil trissulfeto. O DMSO exhibe estabilidade contra a fotoxidação subsequente em dimetilsulfona, o que poderia explicar sua presença em águas superficiais em níveis mais altos em comparação com as concentrações de metilsulfonilmetano (MSM). Compostos como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) podem oxidar dialquilsulfetos em sulfóxidos, que são posteriormente oxidados a sulfonas. Além disso, vários sistemas enzimáticos bacterianos são responsáveis pela geração de DMS a partir de DMSP ou DMSO, bem como pela oxidação de DMS a compostos como DMSO. A conversão entre DMS e DMSO é facilitada por metaloenzimas contendo molibdénio presentes, por exemplo, em algumas cepas de *Acinetobacter* que são relacionados com a microbiota de *U. lactuca* [151], [367], [384].

Tabela 2.4 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas vermelhas (Rhodophyta)



Compostos	OTV	OIR CC	OIR PU	OIR LU	OIR GG
1-Octen-3-ol	8.500	0,016	0,002	0,007	0,230
2-Hexenal, (E)-	0,130	0,591	0,008	0,367	0,202
2-Nonenal, (E)-	0,150	0,215	0,049	0,116	1,000
2-Octenal, (E)-	3.500	0,035	0,003	0,026	0,269
2,4-Decadienal (isómero)	0,300	0,074	0,001	0,038	0,065
2,4-Decadienal, (E,E)-	0,160	0,134	0,012	0,068	0,328
2,4-Heptadienal (isómero)	0,090	0,356	0,006	0,249	0,032
2,6-Nonadienal, (E,Z)-	0,020	1,000	1,000	1,000	0,222
4-Heptenal, (Z)-	0,050	0,009	0,002	0,020	0,000
CAS# 6728-31-0					
Descritores: oleoso, gorduroso, verde, lácteo com notas de leite e natas frescas.					
Octanal	0,980	0,030	0,000	0,009	0,026
CAS# 124-13-0					
Descritores: aldeídico, ceroso, cítrico, casca de laranja, verde, herbal, fresco e gorduroso.					

(*) Valores normalizados (entre 0–1) usando como referência o composto de maior OIR.

No caso das algas vermelhas (**Tabela 2.4**), *C. crispus* e *C. teedei* var. *lusitanicus* destacam-se pela influência dos VOCs, de maior para menor OIR, (2*E*,6*Z*)-nonadienal, (2*E*)-hexenal e 2,4-heptadienal (isômero). Portanto, ambas as algas parecem possuir perfis de aroma relativamente semelhantes, com uma maior prevalência desses compostos sobre a primeira alga. Adicionalmente, foi detetada a presença de bromofórmio em quantidades vestigiais (vide **Anexo.A1.1**) em *C. crispus* e há ainda indícios da presença do mesmo VOC em *C. teedei* var. *lusitanicus* [76].

É corrente que os compostos halogenados contribuem para o aroma característico das algas marinhas, particularmente, com odores como “marinho” e semelhantes ao de “crustáceos”, além de conferir notas adocicadas, especialmente nas algas vermelhas.

A variedade de compostos encontrados em *C. crispus* e *C. teedei* var. *lusitanicus* foi surpreendente, a julgar pelo aroma e sabor relativamente brandos [75]. Um explicação plausível para o “sabor suave” deve-se a presença de ficocolóides tipo carragenanas que conferem às mesmas uma textura mais firme e pode acabar por retardar a liberação de aromas quando estas estão frescas e inteiras [76], [152]–[154].

Em *G. gracilis*, percebe-se o predomínio de (2*E*)-nonenal e, em menor escala, dos aldeídos (2*E*,4*E*)-decadienal, (2*E*)-octenal, (2*E*,6*Z*)-nonadienal e (2*E*)-hexenal. É importante destacar que os três primeiros VOCs mencionados são frequentemente associados ao aroma de “peixe” em algas marinhas e podem estar relacionados com o descritor “marinho” [155], [156]. Além disso, os compostos “1-octen-3-ol” e “1-octen-3-ona” são aqueles que se relacionam mais diretamente com o perfil de odor de *G. gracilis* devido aos descritores relacionados com “um aroma terroso, que remete a fungos e cogumelos”, com destaque para o primeiro composto [75].

Em *P. umbilicalis*, uma alga famosa pela riqueza de aromas, surpreende o domínio do (2*E*,6*Z*)-nonadienal e o baixo impacto dos demais compostos. Contudo, não se deve negligenciar a presença de outros VOCs abundantes nessa alga e que parecem ter algum papel no seu perfil de aromas, mais especificamente, 3,5,5-trimetil-2-hexeno, 8-heptadeceno (isômero 2) e 2,7-octadien-1-ol.

O 3,5,5-trimetil-2-hexeno foi detetado em dois estudos com algas marinhas, sendo que em um deles sua presença deu-se exclusivamente em algas marinhas vermelhas [157], [158]. Devido a ser um hidrocarboneto saturado (alceno) com ramificações, é possível que esse composto tenha alguma relevância em termos de odor, a exemplo do que ocorre com os terpenos.

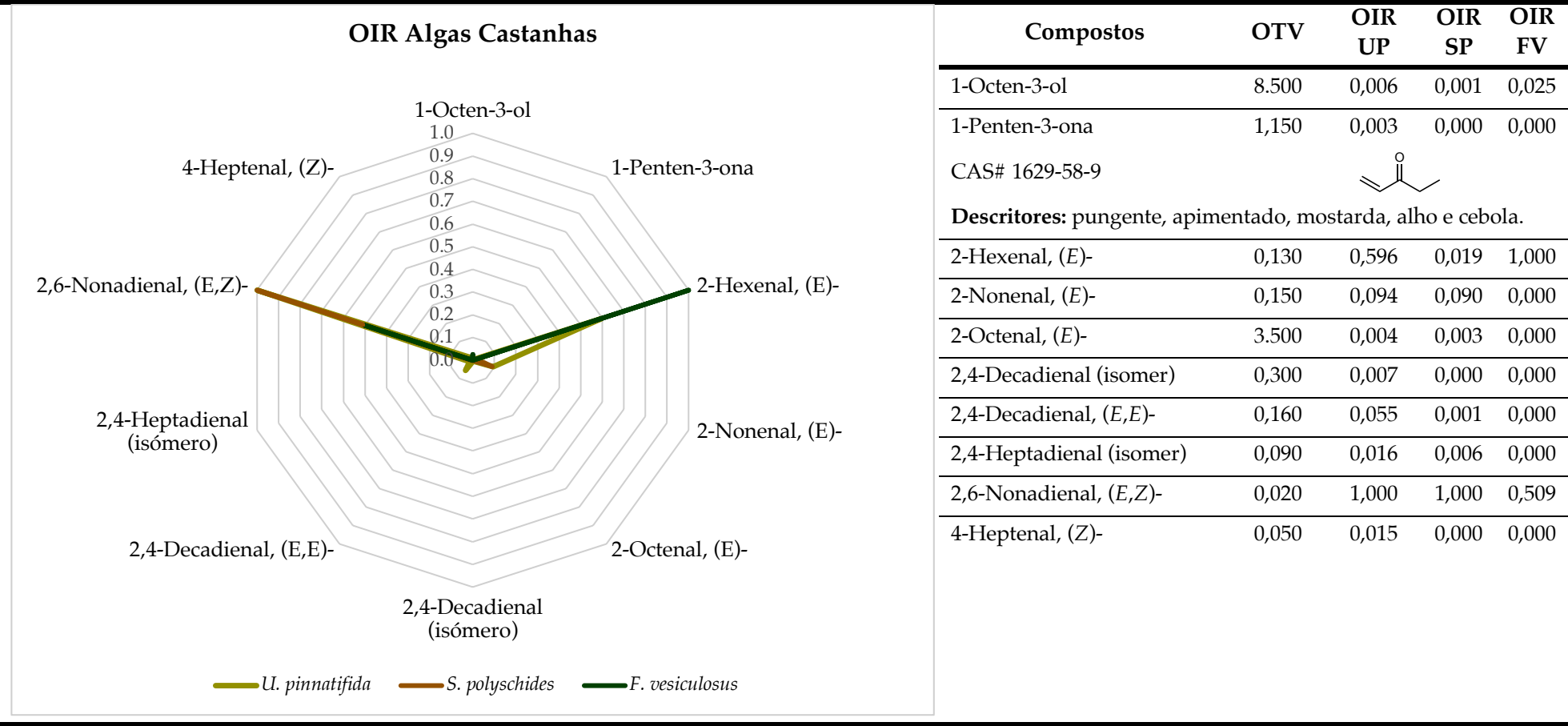
O 8-heptadeceno, composto relativamente recorrente em algas *Pyropia* spp. [148] e *Ulva* spp. [159], foi reportado por Selli *et al.* [147] como sendo responsável por provocar um “sabor desagradável” (*off-flavor*) na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e por possuir ainda um aroma “terroso, que remete a musgos”. Este descritor parece relacionar-se com uma das características de aroma associadas a *P. umbilicalis*.

O 2,7-octadien-1-ol foi igualmente reportado em algumas espécies de algas marinhas, incluindo vermelhas, mas até onde se tenha conhecimento, nunca houve algum estudo direcionado às suas características de odor [157], [160]. Considerando que o composto 2,5-octadien-1-ol foi relatado como sendo um dos contribuintes para o aroma verde e forte das ostras do Pacífico e do Atlântico (*Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica*, respetivamente), é de se esperar que 2,7-octadien-1-ol tenha alguma participação na caracterização de *P. umbilicalis* [161]. Por último, convém mencionar a ausência de DMS na amostra fresca dessa macroalga, um importante composto para determinação de aromas marinhos.

Em relação às algas castanhas (**Tabela 2.5**), o (2*E*,6*Z*)-nonadienal parece mais uma vez ter um papel central na sua caracterização, em particular de *S. polyschides* onde o seu impacto parece encobrir a presença dos demais VOCs – exceto o (2*E*)-nonenal - que possui uma participação secundária e também está presente nos “pepinos” (*Cucumis sativus*), no “melão” (*Cucumis melo*), nas “ostras” (*Crassostrea virginica*, entre outras espécies), nas “folhas de ostra” (*Mertensia maritima*), etc. [161]–[164]. Estes compostos, além de possuir um limiar de deteção relativamente baixos, o que explica sua dominância nas algas estudadas, parecem de facto explicar as notas a “pepino, melão e ostras” associadas a *S. polyschides* [75].

Em *U. pinnatifida*, após o (2*E*,6*Z*)-nonadienal, sobressai-se o (2*E*)-hexenal. Este composto não é apenas encontrado nas algas “wakame” [157], [165] como também é o aldeído predominante (e o segundo composto em abundância) nas folhas de “couve-galega” (*Brassica oleracea* var. *acephala*), exibindo um aroma fresco similar ao de folhas recém cortadas [166]. Estes resultados estão em conformidade com o que foi verificado por Kajiwara *et al.* para várias algas castanhas japonesas [136]. Além disso, nota-se que os compostos 1-penten-3-ona e (4*Z*)-heptenal parecem relacionar-se exclusivamente com o perfil de *U. pinnatifida*, sendo que o primeiro possui os descritores “pungente, apimentado, mostarda, alho e cebola”. Curiosamente um nome comum para *U. pinnatifida* em inglês é “mostarda do mar” (*sea mustard*), talvez mais pela morfologia (os talos são ondulados nas extremidades) do que pelo sabor em si, embora os aromas sulfurosos associados a este composto parecem enquadrar-se na descrição de “ovos ou leguminosas cozidas” [6].

Tabela 2.5 10 VOCs com maior impacto no perfil de aroma das algas marinhas castanhas (Phaeophyceae)



(*) Valores normalizados (entre 0–1) usando como referência o composto de maior OIR.

Em *F. vesiculosus*, há dominância do (2*E*,6*Z*)-nonadienal e, por não haver valores de OTV para pentadecano, não se sabe até que ponto este hidrocarboneto pode ser relevante para a caracterização organolética da alga marinha. As notas “tostadas” parecem relacionar-se com a presença de furanos e pirazinas, não detetados na corrente análise, porém, compostos relativamente comuns em algas marinhas e responsáveis pelo aroma tostado do cacau, café, pão torrado e alimentos grelhados, dentre outros [67], [167], [168]. O gosto “amargo” e sabor “adstringente” relacionam-se com compostos não-voláteis, em particular, polifenóis tipo florotaninos que são bastante abundantes nessa espécie (até 12% do peso seco) conforme veremos mais adiante [74], [169].

Um dos grandes problemas associados ao OAV (no presente caso OIR) é que os pesos dos compostos no perfil da amostra são atribuídos de acordo com os OTV, contudo, esses valores variam enormemente na literatura (consoante a metodologia adotada, composição do painel, solvente empregado na diluição, etc.), havendo uma falta de padronização e levando muitas vezes à conclusões que divergem dos descritores associados às amostras por análise sensorial [170]. De forma a minimizar esta variação, recorreu-se o maior compêndio de OTVs existente [93] e, depois de compilados todos os valores, utilizou-se como referência o valor da mediana para evitar viés dos valores.

Por fim, reforça-se, que o perfil de aroma de um alimento é formado por uma combinação complexa de compostos, tornando o conjunto coletivo de compostos mais relevante para caracterização, ao invés de basear-se apenas em VOCs individuais [171].

Por exemplo, aldeídos como hexenal e hexanal, comumente referidos como “voláteis da folha verde” (GLVs, do inglês “*Green Leaf Volatiles*”), individualmente podem contribuir para aromas desejáveis em alimentos, evocando descritores à semelhança de folhas maceradas, frutas e vegetais verdes ou pouco maduros [129].

Por outro lado, quando certos aldeídos de peso molecular relativamente baixo, como o próprio hexanal, (2*E*,4*E*)-decadienal, (2*E*,4*E*)-heptadienal, heptanal e outros são combinados, eles criam um forte e penetrante odor a peixe, associado às algas marinhas no geral [159], [172].

Ao longo desta análise, observou-se que muitos desses compostos não estão somente presentes em todas as algas marinhas examinadas, como também desempenham um papel significativo na formação de seu perfil de aromas. Assim, a falta de compostos com descritores associados diretamente a peixes e outros alimentos marinhos (como trimetilamina, piridinas, compostos halogenados contendo bromo, etc.) não implica a ausência dessas notas olfativas.

Deve-se considerar que é a combinação de compostos, suas respectivas concentrações e interações que vão definir a presença de descritores específicos, tais como “percebes” em *C. tomentosum*, “berbigões” em *U. lactuca* e “sardinhas assadas” em *P. umbilicalis* tostada [19], [25], [37], [171].

2.3.3 Considerações Finais

Em termos gerais, a maioria das algas apresenta um teor médio de humidade superior a 80%, o que as torna suscetíveis à deterioração causada por microrganismos. No que diz respeito ao conteúdo de cinzas, enquanto *P. umbilicalis* apresentou o menor teor (21,65%), *C. tomentosum* destacou-se das demais algas, revelando um valor médio de 55,93%. *P. umbilicalis* foi a alga com maior conteúdo proteico (30,33%), ao passo que *U. lactuca* apresentou o menor teor (3,87%). Quanto aos lípidos, o conteúdo nas algas variou de cerca de 1% a 7%, com a maioria situando-se na extremidade inferior dessa faixa (1%–2%). *C. teedei* var. *lusitanicus* registou o menor teor de lípidos com apenas 1,02%, enquanto que *U. pinnatifida* apresentou o maior, com 7,17%, seguida de perto por *C. tomentosum* com 5,60%. A presença elevada de proteínas e cinzas (minerais) influencia positivamente o valor nutricional, além de caracterizar as algas enquanto alimento de baixo aporte calórico, fazendo com que as mesmas sejam forte candidatas para consumo humano e para incorporação em suplementos alimentares.

Foi observada ainda uma maior abundância de VOCs nas algas vermelhas, com *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus* e *P. umbilicalis* liderando o ranking. Em contraste, *F. vesiculosus* apresentou uma quantidade menor de voláteis. Os aldeídos, álcoois e cetonas predominaram nas amostras analisadas, sendo também aqueles compostos que mais pareceram influenciar no perfil de aroma das algas marinhas estudadas.

Por fim, é importante notar que o perfil de aroma de um alimento é determinado por uma combinação complexa de compostos voláteis, sendo a avaliação coletiva desses compostos mais relevante para a sua caracterização do que a análise de VOCs individuais. Devido às restrições impostas pela pandemia, a investigação no contexto da análise sensorial precisou ser cancelada. No entanto, através da análise por GC-MS, foi possível observar que alguns dos compostos, identificados nas algas examinadas, parecem desempenhar um papel importante na caracterização das mesmas.

3

O Impacto das Técnicas de Conservação “Convencionais” em Algas Marinhas

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.1 Tipos de Deterioração Alimentar

As formas de deterioração às quais os alimentos são vulneráveis não podem ser completamente interrompidas, sendo portanto, preciso diminuir a deterioração ao máximo através de estratégias transversais à formulação, processamento, embalagem, armazenamento e manuseamento [173].

Os alimentos podem alterar-se de diversas formas, sendo os tipos de deterioração mais comuns: a instabilidade ou “alteração física”, a degradação ou “alteração química” e a decomposição ou “alteração biológica”. A deterioração resultante de atividade microbiana afeta não somente a qualidade, como também a segurança alimentar. Algumas técnicas podem até manter os alimentos seguros após o momento em que a validade expira, porém, com o passar do tempo, as alterações de um determinado produto podem gerar rejeição pelo público consumidor porque as propriedades organoléticas encontram-se muito distantes das características originais [28].

Na **Tabela 3.1** encontram-se resumidas as formas mais comuns de deterioração alimentar [23], [173]–[178]:

Tabela 3.1 Principais tipos de deterioração alimentar

Tipo	Agente	Fenómeno	Soluções
Alteração Física		O impacto pode promover a rutura da matriz alimentar, desencadeando mudanças de cor, sabor ou perda de conteúdo intracelular;	Paletização, embalamento apropriado
	Força	Forças externas podem promover a emulsificação e também a separação de fases em produtos através de fenómenos físicos tais como floculação, coalescência, cremado e inversão de fases.	Uso de aditivos e controlo da temperatura
	Temperatura	O congelamento promove a formação de cristais de gelo que danificam a estrutura, a recristalização da água e a dessecação pela sublimação da água a baixas temperaturas.	Uso de aditivos, água de vidragem, controlo da temperatura, etc.
	Humidade	Hidratação ou amolecimento em alimentos crocantes (algas marinhas secas ou batatas chips); Dessecação (algas marinhas ou verduras frescas) ou endurecimento em alimentos húmidos (pães).	Embalamento apropriado, controlo da humidade
Alteração Química	Oxigénio	Oxidação lipídica ou proteica (por exemplo, formação de metmioglobina).	Exclusão do oxigénio (atmosfera modificadas) ou uso de antioxidantes
	Temperatura	Escurecimento não-enzimático através das reações de glicação (Maillard) ou caramelização;	Controlo da temperatura e/ou do pH, exclusão de catalizadores (iões metálicos)
		Reações de gelatinização e retrogradação em amidos.	Controlo da temperatura
	Humidade	Hidrólise de compostos químicos, tais como hidratos de carbono.	Exclusão da água, controlo do pH e/ou da temperatura
	Luz	Fotodegradação dos pigmentos ou oxidação lipídica, fenómeno relativamente comum em algas marinhas.	Controlo da iluminação, uso de antioxidantes ou de barreiras físicas (embalagens)
Alteração Biológica	Microbiota	Pode provocar alterações, desejáveis ou não, tais como fermentação, decomposição, contaminação por patógenos, surgimento de mofo e fungos, alterações das propriedades dos alimentos (por enzimas exógenas), etc.	Aplicando técnicas de preservação, conservantes e/ou controlando as variáveis que permitem o seu crescimento (temperatura, a_w , pH, etc.)
	Temperatura	Cada cultura tem sua taxa inerente de respiração que está relacionada com o amadurecimento e a senescência.	Controlo da temperatura
	Enzimas endógenas	Podem promover a síntese do etileno, o escurecimento enzimático (pela PPO ou polifenoloxidase), além da alteração das características organoléticas e nutricionais (lipases, proteases, etc.).	Emprego de compostos antagonistas (antioxidantes) e/ou exclusão do etileno e do oxigénio, além do controlo da temperatura

Tabela 3.1 Principais tipos de deterioração alimentar (continuação)

Tipo	Agente	Fenómeno	Soluções
Outras Alterações	Parasitas ¹⁶	Contaminação ou infecção dos tecidos.	Conservantes naturais (biológicos) ou sintéticos (químicos)
	Insetos e outros animais	Danos físicos provocados por estes vetores (por exemplo, gafanhotos, roedores ou pássaros).	Uso de pesticidas, cultivo, transporte e armazenagem adequados

Métodos de preservação como refrigeração, congelamento, desidratação e outros tratamentos térmicos, emprego de técnicas culinárias (cozedura, branqueamento, etc.), uso de conservantes químicos, processamento por altas pressões (HPP), embalagens com atmosferas protetoras (MAP ou vácuo) são utilizados para controlar ou prevenir essas alterações [179].

Note-se que, enquanto os aspetos referentes à segurança são regulados por lei, o mesmo não ocorre com a qualidade alimentar, exceto quando os produtos precisam atender a certos requisitos relativos à composição e/ou padrões alimentares para poderem ser rotulados em determinada categoria, tal como é o caso de muitos laticínios [180].

3.1.1.1 Decomposição Microbiológica

A atividade microbiana é uma forma comum de deterioração dos alimentos e a causa mais comum das intoxicações alimentares. Assim sendo, a decomposição é uma das maiores preocupações relativas aos alimentos ditos perecíveis. O crescimento da maioria dos microrganismos pode ser prevenido ou retardado ajustando-se a carga microbiana inicial, a temperatura de armazenamento, reduzindo a a_w , baixando o pH, fazendo uso de conservantes e empregando embalagens adequadas.

Alguns microrganismos causam apenas deterioração dos alimentos, enquanto outros se consumidos podem causar doenças, intoxicação ou até mesmo morte. Entretanto, nem todo o crescimento microbiano é indesejável: há aqueles

¹⁶ Não confundir parasitismo com epifitismo. Uma epífita é uma forma de vida vegetal que ocorre quando uma planta cresce sobre outra sem ser parasitária, ou seja, sem retirar nutrientes do hospedeiro, mas utilizando-a apenas como suporte. Algumas algas são epífitas, o que significa que crescem na superfície de outras algas ou plantas aquáticas sem causar danos ao organismo hospedeiro. Este modo de vida permite que as algas epífitas aproveitem as áreas de crescimento disponíveis em ambientes aquáticos, onde o espaço no substrato pode ser limitado. Embora o epifitismo não seja parasitismo, a presença de algas epífitas em grande número pode às vezes prejudicar o organismo hospedeiro ao obstruir a luz solar necessária para a fotossíntese [385].

microrganismos que são utilizados na produção dos produtos alimentícios fermentados [173].

Existem inúmeros tipos de microrganismos que podem crescer e causar deterioração nos alimentos, nomeadamente: bactérias, leveduras, mofo ou bolores e vírus. Algumas bactérias são capazes de formar esporos como um mecanismo de proteção quando sujeitas a condições extremas [173]. Para que os microrganismos causem a deterioração dos alimentos, eles devem estar primeiramente presentes no alimento, em menor ou maior grau, e o seu crescimento dependerá das características intrínsecas do alimento, de fatores ambientais (extrínsecos), da técnica de processamento ou conservação aplicada, do tipo de metabolismo desses organismos, assim como as interações entre os mesmos [180].

Como mencionado acima, a a_w (e não a humidade) é um dos fatores mais importantes que determinam o crescimento microbiano. Registe-se que, como as algas são alimentos com alto a_w e ricos em nutrientes, elas acabam por ser um substrato propício para o desenvolvimento microbiano [43]. Mais recentemente, especulou-se que a temperatura de transição vítrea talvez seja um fator mais importante para a proliferação dos microrganismos. Contudo, deve-se destacar que não existe um consenso e, muito provavelmente, ambos são importantes, embora a a_w seja a mais geralmente usada e aceite como fator crítico. Os lípidos são mais difíceis de serem decompostos por microrganismos, podendo igualmente atuar como uma espécie de barreira ou proteção [173].

Outros fatores que afetam muito o crescimento de microrganismos incluem o pH e o potencial de oxidação-redução. A maioria dos microrganismos cresce melhor a um pH próximo de 7, enquanto em produtos que têm pH muito baixo (<3,7), apenas bactérias ácido-láticas e certas leveduras ou bolores conseguem crescer. O potencial de oxidação-redução, normalmente expresso como um “valor E_h ”, determina se os microrganismos que crescem em determinada solução são aeróbios (+) ou anaeróbios (-). Aqueles microrganismos, ditos aeróbios facultativos, podem crescer tanto sob “valores E_h ” positivos quanto negativos [173].

Outro fator que afeta o crescimento dos microrganismos é a temperatura. Dependendo da temperatura de armazenamento, os microrganismos podem crescer rapidamente, crescer lentamente, parar de crescer, ou até mesmo morrer. Há três classes principais de microrganismos, dependendo da temperatura em que eles se desenvolvem melhor: “psicrotróficos” que crescem em temperaturas mais frias (abaixo de 7 °C), “mesófilos” que crescem em temperaturas amenas (10 °C – 45 °C) e os “termófilos” que preferem temperaturas mais altas (45 °C – 65 °C) [23], [173].

O conteúdo de nutrientes dos alimentos também afeta o crescimento microbiano: para crescer, os microrganismos necessitam de água, uma fonte de carbono para energia, uma fonte de azoto e certas vitaminas e minerais. Há ainda compostos presentes nos alimentos que agem em sentido contrário, isto é, que podem realmente ter um impacto negativo sobre os microrganismos, agindo como conservantes. É notório que algumas algas marinhas são ricas em compostos com atividade antimicrobiana, tais como as algas vermelhas que possuem um verdadeiro arsenal químico que controla a microbiota presente, o ataque por organismos herbívoros, o crescimento de outras algas epífitas, dentre vários mecanismos existentes [181]. A composição dos gases no ambiente ao redor do alimento também pode ter um efeito na desaceleração do crescimento microbiano [173].

Os microrganismos que produzem proteases conseguem degradar as proteínas dos alimentos. As reações de desaminação que podem ocorrer produzem tipicamente amônia, enquanto as reações de descarboxilação produzem aminas biogénicas. As aminas biogénicas são formadas a partir dos respetivos aminoácidos precursores livres, através da ação catalítica das descarboxilases microbianas específicas do substrato, que removem o grupo α -carboxilo de aminoácidos para originar as aminas correspondentes. Outros produtos das reações de degradação de proteínas podem incluir ácidos orgânicos, sulfureto de hidrogénio, mercaptanos e outros compostos indesejáveis [173], [182].

O processamento térmico é um dos métodos mais comuns para limitar a presença de microrganismos em alimentos. Muitas vezes a cinética de morte térmica para um determinado micróbio é quantificada usando valores “D” e “z”. O “valor D” é o tempo necessário, a uma determinada temperatura constante, para alcançar uma redução de 1 log na população microbiana, enquanto o “valor z” dá a mudança de temperatura necessária para alcançar uma mudança de 90% no “valor D” [173].

3.1.2 Vida de Prateleira

O tempo ou “vida de prateleira” relaciona-se com o período no qual o produto se encontra isento de quaisquer tipos de deterioração que o tornem impróprio para o consumo. Ele pode ser entendido como sendo o período no qual o alimento se apresenta seguro para o consumo, além de conservar as propriedades organoléticas que o caracterizam (ou seja, aspetos relacionados com a qualidade), permanecendo aceite pelo consumidor [183].

A maneira mais usual e objetiva de determinar o prazo de validade de um alimento é através de experiências de armazenamento do produto em questão sob

condições que simulem aquelas que esse provavelmente encontrará ao longo de toda cadeia de suprimentos. Os ensaios mais comumente utilizados são [183], [184]:

- O “*challenge testing*” (literalmente, “teste do desafio”) onde o produto é exposto a diferentes tipos de microrganismos em condições controladas em laboratório de maneira a verificar a capacidade de um alimento de suportar o crescimento de patógenos ou microrganismos deteriorantes.
- Ensaios de qualidade e “vida de prateleira” onde se testam diversas características do produto ao longo do tempo, com destaque para: análises microbiológicas (incluindo os *challenge testing*), análises químicas, testes físicos e outras medições (por exemplo, medições reológicas ou exame microscópico) e avaliação sensorial por um painel treinado de provadores (testes discriminativos, descritivos ou de aceitação).
- Modelos cinéticos usados em “ensaios acelerados de armazenamento” (ASLT) quando os produtos possuem vida útil demasiado alargada e outros modelos estatísticos de previsão.

3.1.3 Técnicas de Conservação “Convencionais”

As técnicas de conservação têm como função preservar, de uma maneira geral, a qualidade do alimento, desde o momento da produção até o seu consumo, considerando que os alimentos são constituídos por matérias-primas de origem biológica que, naturalmente, se alteram (ou degradam) ao longo do tempo.

Dessa forma, as técnicas de conservação atuam sobre os alimentos de maneira prevenir as possíveis fontes de degradação, permitindo assim a manutenção das qualidades organoléticas e aumentando o tempo de prateleira [28]. Deve-se lembrar que a segurança alimentar é o primeiro fator que deve ser levado em consideração, sendo seguido dos aspetos relacionados com a qualidade [23].

As técnicas de processamento e conservação podem ser utilizadas também com outros propósitos como, por exemplo, transformar o sabor através da salga, cura ou fumagem, ou, até mesmo, tornar os alimentos mais nutritivos e digeríveis por via da fermentação ou cozedura [24]. Elas ajudam igualmente a contornar a questão da sazonalidade de certos alimentos, permitindo o seu consumo ao longo de todo ano, assim como a manutenção de uma dieta mais variada [23].

Na conservação de alimentos, os pontos importantes que devem ser considerados são: o nível de qualidade desejado, a duração da conservação e o público-alvo para o qual os produtos são conservados [23]. A metodologia ideal deve primar pela segurança alimentar, minimizar o impacto sobre as propriedade organoléticas e

nutricionais, ser isenta de resíduos, não deve ter efeitos sobre a saúde dos consumidores ou ser passível de objeções por parte dos legisladores [184].

A escolha de quais os métodos de preservação empregar recai sobre uma análise completa e compreensão de toda a cadeia alimentar, incluindo cultivo, colheita, processamento, embalagem, distribuição e mercado consumidor, sendo fundamental aplicar uma abordagem integrada [23]. Além disto, os tipos de ingredientes utilizados na formulação alimentar também vão determinar quais as técnicas mais apropriadas para a sua conservação [173].

3.1.3.1 Primeiras Técnicas de Conservação: uma retrospectiva histórica

Os alimentos, de uma maneira geral, começam a se deteriorar quando são colhidos e, ainda mais rapidamente, quando são manipulados. A preservação dos alimentos, juntamente com a agricultura e pecuária, permitiu ao homem primitivo se fixar numa região, estabelecer comunidades e abandonar o modo de vida nómada. Ele não precisava mais consumir o animal abatido ou a colheita imediatamente, mas poderia preservar uma parte dos víveres para uso posterior [185].

Evidências demonstram que as culturas do Médio Oriente e Ásia secavam regularmente os alimentos ao sol já em 12.000 a.C. (**Figura 3.1**). Já nas áreas geográficas em que se atingissem temperaturas de congelamento, o clima era um aliado natural na preservação dos alimentos, podendo serem construídas cavernas, caves ou abrigos para os congelar [185], [186].

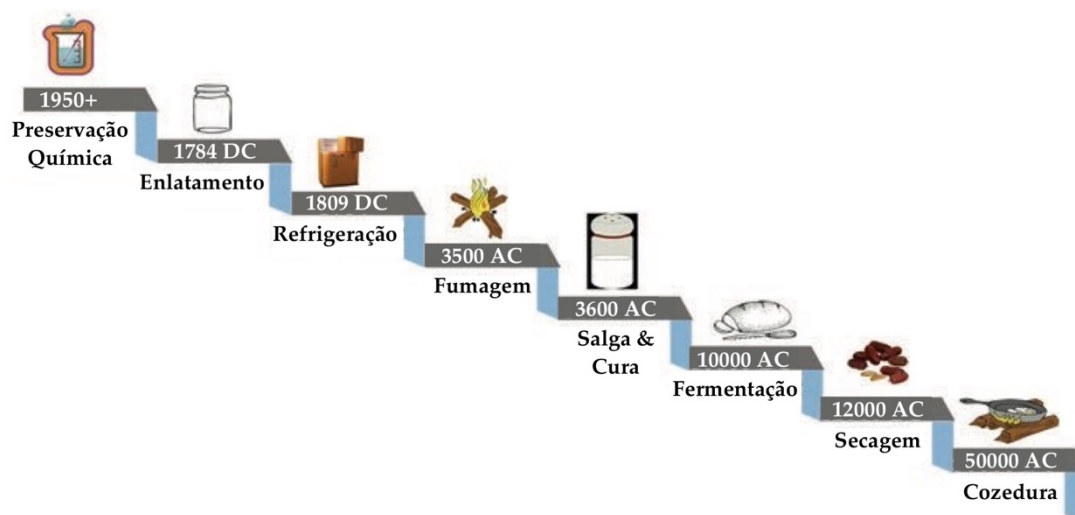


Figura 3.1 Cronograma da invenção das principais técnicas de conservação de alimentos

Fonte: Extraído de Joardder & Masud [187]

Outro recurso utilizado pelo homem primitivo era o uso de fumo, um método de preservação essencialmente químico. Ao cozinhar carne em fogo de lenha – o que é considerada a primeira técnica de conservação usada pela humanidade – possivelmente perceberam que, para além de um sabor desejável, o fumo em si tinha propriedades conservantes que ajudavam a manter os alimentos próprios para consumo por períodos alargados de tempo [188].

Alguns estudos antropológicos indicam 10.000 a.C. (**Figura 3.1**) como sendo a época em que algumas civilizações mesopotâmicas se fixaram na zona do crescente fértil, passando a cultivar a cevada e fermentar os grãos para produção de cerveja [189]. A fermentação era um método valioso de preservação de alimentos porque não apenas os conservava, como também removia os sabores indesejáveis (muitas vezes toxinas) e criava alimentos mais nutritivos [185].

As primeiras culturas primitivas usavam sal para ajudar a dessecar os alimentos, assim como o mel era usado para conservar frutas. Contudo, desde as primeiras civilizações, já era comum o uso de aditivos como o vinagre, as ervas e especiarias e o álcool com propósitos de preservação [188].

Na história da humanidade, a preservação de alimentos possui papel fundamental na prevenção da fome e escassez. Curiosamente, diversas culturas ao redor do planeta preservaram os seus alimentos usando os mesmos métodos básicos, mesmo em situações onde não havia trocas, tendo como base o conhecimento empírico [185]. Até o presente, os cinco métodos históricos básicos de conservação de alimentos que incluem secagem, aquecimento, congelamento, fermentação e preservação química continuam a ser aplicados [190]. Os progressos na conservação e processamento de alimentos possibilitaram um salto na qualidade de vida e garantiram o provimento regular de mantimentos [191].

Alguns historiadores acreditam, ainda, que a preservação dos alimentos não era apenas para o sustento, possuindo também um aspeto cultural. Gostava-se desses alimentos em seu estado “alterado”, simplesmente porque o processo em si proporciona um novo sabor. Observa-se isso, principalmente, nos dias atuais quando alimentos frescos de qualquer lugar do mundo estão disponíveis para a maioria dos consumidores nos países desenvolvidos, porém, mesmo assim verifica-se uma grande oferta de alimentos que foram transformados por técnicas tradicionais de preservação – por exemplo, peixes salgados como o bacalhau ou fumados como o salmão, pickles e outros fermentados, conservas e alimentos enlatados, etc. Ou seja, a preservação de alimentos deixou de ser uma questão de vida ou morte e os esforços concentram-se em superar as estações do ano, produzindo e distribuindo todos os tipos de comida fresca ou preservada industrialmente por uma questão de conveniência e preferência [188].

3.1.3.2 As Contribuições do Século das Luzes

No final do século XVIII, Napoleão Bonaparte, sentindo a necessidade de alimentar suas tropas, oferece um prêmio para aquele que desenvolvesse um método de preservação de alimentos capaz de suportar longas viagens. Em 1804, Nicolas Appert cria um processo de conservação de alimentos usando recipientes de vidro hermeticamente fechados e fervendo os mesmos em água por um tempo prolongado, sendo esses de seguida resfriados. Desta maneira, Appert fica conhecido como sendo o padrinho da indústria de conservas e a técnica desenvolvida por si é batizada com o nome de “apertização” [186].

Em 1810, Peter Durand registra a patente de um processo parecido com o de Nicolas Appert, porém ele substitui os recipientes de vidro por latas de metal. Posteriormente, o mesmo vende a patente para uma empresa, a Donkin & Hall, que começa o processo de produção industrial de alimentos enlatados para o exército britânico [186].

Cerca de 50 anos mais tarde, em 1864, Louis Pasteur chega à conclusão de que a fermentação resultava da ação de microrganismos, afirmando que ela ocorria por causa da contaminação do ar ou do próprio alimento e negando que esses surgissem “espontaneamente” nas substâncias fermentescíveis. Na mesma época, Pasteur desenvolve um processo que destrói, por aquecimento brando em recipiente hermético, a maior parte dos microrganismos presentes nos alimentos, técnica viria a ser batizada pelo nome de “pasteurização”. Pode-se dizer que Pasteur estabelece os alicerces para as técnicas de conservação modernas, incluindo-se aí os alimentos minimamente processados [186].

Pasteur colaborou com diversos cientistas da sua época, dentre eles Louis Tyndall que concluiu que havia esporos bacterianos viáveis (endósporos) que sobreviviam até mesmo após levar os caldos alimentares à temperatura de ebulição. Percebendo que, em certos estágios do desenvolvimento, os germes são mais facilmente destruídos pelo calor, ele concebeu o método de esterilização por aquecimento repetido – posteriormente batizado pelo nome de “tindalização” – capaz de erradicar os esporos bacterianos [192].

3.1.3.3 O Panorama Atual

Segundo a Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO) [193], aproximadamente um terço da produção mundial de alimentos é perdida ou desperdiçada. Grande parte da perda ou do desperdício alimentar ocorre ainda na

lavou, sobretudo nos países em desenvolvimento, devido a falta de infraestruturas, e durante o consumo, como é no caso dos países desenvolvidos. A indústria e os pontos de venda são os agentes, na cadeia de suprimentos, mais eficientes na gestão dos produtos alimentares.

Para atender à demanda crescente por alimentos, em um mundo onde parte da população continua a sofrer de fome e desnutrição, é preciso buscar novas fontes alimentares e desenvolver estratégias para uma melhor conservação desses recursos [194].

Nos últimos 50 anos, surgiu uma gama de novas tecnologias que permitem estender a vida útil dos alimentos. Os avanços nos tratamentos térmicos ocorreram, sobretudo, pelas aplicações com microondas e aquecimento “óhmico”; enquanto no contexto dos tratamentos não-térmicos, surgiram técnicas tais como: plasma frio, radiação ionizante, campos elétricos pulsados, ultrassons, altas pressões hidrostáticas, etc. Muitas destas técnicas, por interferirem pouco nas características organolépticas e nutricionais dos alimentos, são denominadas por “tecnologias de processamento mínimo” [186].



Figura 3.2 Principais estratégias para conservação de alimentos de acordo com o objetivo pretendido: inibição, inativação ou prevenir a recontaminação por microrganismos

Fonte: Adaptado de Rahman [23]

A maioria das estratégias de conservação podem ser agrupadas em três diferentes categorias de acordo com o seu objetivo principal (**Figura 3.2**) [23]:

- Retardar ou inibir a deterioração química e o crescimento microbiano;
- Inativar diretamente microrganismos ou enzimas;
- Evitar a recontaminação antes e depois do processamento.

Em muitos casos, a preservação de um alimento específico pode ocorrer por conta de inúmeros mecanismos que são conjugados para se obter o grau desejado de proteção. Apesar deste ser um conceito antigo, recentemente ele ganhou destaque na literatura científica sob a rubrica de “teoria dos obstáculos” ou “*hurdle effect*” [195].

3.1.4 Tratamentos Térmicos

3.1.4.1 Conservação pelo Calor

O calor possui a capacidade de inativar enzimas e destruir microrganismos, quando obedece o binômio tempo-temperatura apropriado. A história dos tratamentos térmicos na indústria moderna remonta ao princípio do século XVIII, quando começam a surgir técnicas como a apertização, pasteurização e esterilização. Mais ou menos no mesmo período, com o advento do frio artificial, foi possível também conservar alimentos por remoção do calor: a refrigeração e o congelamento têm a propriedade de diminuir a proliferação microbiana e a velocidade das reações enzimáticas [186].

Tabela 3.2 Vantagens e desvantagens do tratamento térmico (calor) de alimentos

Vantagens	Desvantagens
O calor é seguro e livre de produtos químicos.	O cozimento excessivo pode levar à perda de sabor, aroma e textura dos produtos. A deterioração nutricional que resulta do processamento a altas temperaturas ou em tempo demasiadamente prolongado.
A maioria dos microrganismos são sensíveis ao calor.	
Alimentos processados termicamente, quando embalados em recipientes assépticos e herméticos, têm uma vida útil longa.	
Aumento da biodisponibilidade de algas nutrientes.	

Apesar dos tratamentos térmicos permitirem a obtenção de alimentos quimicamente estáveis e microbiologicamente seguros, em muitos casos, algumas das

propriedades intrínsecas (nutrientes, perfil organolético, etc.) acabam por serem afetadas [23] (**Tabela 3.2**).

Num passado recente, os processos térmicos foram as tecnologias mais dominantes e, apesar dos avanços da ciência, estas técnicas continuam sendo as mais usadas até o presente momento [186].

3.1.4.1.1 Branqueamento

O aquecimento pode ser feito de maneira mais subtil e rápida ou de forma intensa e prolongada, consoante os objetivos que se pretende atingir. O branqueamento – que consiste em mergulhar os alimentos rapidamente em água fervente e, de seguida, resfriá-los em água com gelo – possui como objetivo principal a inativação de enzimas que poderiam deteriorar o produto durante o processamento ou até mesmo durante o período em que este for conservado resfriado ou congelado. Esta técnica pode igualmente ser aplicada com o propósito de melhorar a taxa de secagem e a qualidade do produto, removendo resíduos de pesticidas e constituintes tóxicos, expelindo o ar nos tecidos das plantas e diminuindo a carga microbiana [196].

3.1.4.1.2 Concentração e Secagem

A concentração é um processo que remove parcialmente a água dos alimentos (redução da a_w), sendo frequentemente utilizada na produção de sumos concentrados, massa de tomate, leite (evaporado ou condensado), geleias e doces em pasta. Para esse fim, a concentração por evaporação é o método mais comum. Entretanto, muitos esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de métodos melhorados como a evaporação a vácuo em estágios múltiplos ou até mesmo processos não-térmicos, tais como filtração por membranas (incluindo microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa), além de concentração por congelamento [197], [198].

O tratamento térmico de um produto influencia tanto a cor quanto o odor e, por tal razão, os avanços tecnológicos relacionados ao desenvolvimento de novas membranas e melhorias na engenharia de processos têm sido acaçados para superar esta limitação.

A concentração, normalmente, é um método usado em conjunto com outras técnicas (apertização, pasteurização, etc.) ou com posterior ajuste de alguns parâmetros (por exemplo, redução do pH ou adição de açúcares) para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos [23], [197].

A secagem é um método que envolve a remoção da água de uma matéria-prima induzindo mudanças de fase da água, de líquido para uma fase de vapor (evaporação), através do uso de calor. A secagem é, na maioria dos casos, um processo intensivo em energia, o que geralmente leva a alterações pronunciadas nos atributos de qualidade do produto. Na secagem de alimentos, um grande desafio é remover a água do material da maneira mais eficiente, buscando obter um produto com melhor qualidade possível, com o mínimo impacto sobre o meio ambiente e com os menores custos de capital e operacionais do processo [199].

A secagem resulta numa redução da a_w nos produtos a níveis que os principais microrganismos deteriorantes – como as bactérias ácido-lácticas (LAB), fungos e leveduras – não tenham condição de se desenvolver. O tratamento pode se dar de forma natural ao expor o produto ao calor ambiente, à radiação solar e/ou ao vento – que são os métodos mais económicos e comuns – ou, artificialmente, empregando-se uma fonte de calor e convecção forçada de ar, controlando-se a humidade ou fazendo uso de agentes de secagem [199], [200].

Há ainda diversos outros métodos térmicos de secagem tais como: secagem a vácuo, por atomização (*spray-drying*¹⁷), por microondas, em leito fluidizado (SBD), em tambores (rotativos ou não), por bomba de calor, etc. Vale destacar que ambas as técnicas de concentração e secagem acabam por reduzir consideravelmente o volume e o peso dos alimentos processados, implicando em menores custos de transporte [199], [201].

Outros métodos de secagem tradicionais se baseiam similarmente na redução do teor de humidade (e, por conseguinte, da a_w) dos produtos por osmose, processo através do qual a água é removida sem mudança de fase pela sua difusão dos alimentos sólidos para uma solução osmótica (rica em solutos como sal ou açúcar). Na desidratação osmótica, em alguns casos, aplica-se ainda calor (com temperaturas mais moderadas) como forma de aumentar a eficiência do processo [202].

¹⁷ O processo de “*spray drying*” é uma técnica de secagem que transforma um líquido em um pó por meio da dispersão de pequenas gotículas do líquido (atomização) num ambiente quente. Esse método permite um controlo preciso da temperatura e da velocidade de secagem, além de ser amplamente utilizado na indústria devido à sua versatilidade, capacidade de operar em larga escala (processo contínuo) e de preservar as características originais dos produtos, como sabor e aroma, em comparação com outros métodos de secagem. Ele é frequentemente utilizado para produzir pós solúveis, como leite em pó ou café solúvel [386].

3.1.4.1.3 Pasteurização

A pasteurização é um tratamento recomendado para eliminar agentes patogênicos e/ou reduzir a população de microrganismos, suscetíveis ao calor moderado, presentes nos alimentos. Normalmente, é aplicada em produtos que possuem características organoléticas, químicas e nutricionais altamente suscetíveis a altas temperaturas como, por exemplo, sucos de frutas, leite e ovos. Este tratamento deve ser associado ao emprego de outras técnicas de conservação tais como refrigeração, embalagens herméticas e, até mesmo, uso de aditivos [203].

No caso do processamento de leite pode-se empregar: a pasteurização rápida (HTST) em que o produto é aquecido a 71,7°C, por 15 s, ou a pasteurização lenta (LTLT) na qual o leite é exposto à temperatura de 62,8°C, por cerca de 30 min [203].

Esse processo elimina os patogênicos não esporulados, mas não elimina esporos e alguns microrganismos deteriorantes; por esse motivo, os alimentos pasteurizados não são microbiologicamente estáveis. Às vezes a pasteurização também pode ser aplicada com a finalidade de inativar as enzimas presentes nos alimentos [204].

Na ultrapasteurização, normalmente, são usadas temperaturas (de esterilização) superiores às utilizadas na pasteurização e o produto tratado deve ser acondicionado em embalagens assépticas que evitem novas contaminações. Também deve ser dada atenção aos períodos de aquecimento e resfriamento, pois estes podem contribuir substancialmente tanto para a inativação microbiana, quanto para as reações químicas. A grande vantagem desse processo é que, após envasado, o produto possui grande estabilidade (por pelo menos 6 meses) e pode ser conservado à temperatura ambiente, apesar de que quanto menor a temperatura de armazenagem, maior a vida útil do produto [205], [206].

Para o caso do leite, o tratamento a “temperaturas ultra altas” (UHT), também conhecido como “ultrapasteurização”, consiste em submeter o produto a 140°C por cerca de 2 s, sendo este posteriormente acondicionado em embalagens tipo TetraPak®.

3.1.4.1.4 Esterilização

Há basicamente 2 tipos de esterilização comercial: o processamento de retorta ou de esterilização “dentro do recipiente” e o processamento asséptico ou esterilização “fora do recipiente”. Cada um desses métodos possui suas especificidades, sendo utilizados consoante o tipo de alimento que se trabalha. Como o processamento asséptico envolve o bombeamento dos alimentos por tubagens e a sua passagem por permutadores de calor, esse só pode ser aplicado em alimentos líquidos ou pastosos [204].

O processo de esterilização de retorta consiste em aquecer um alimento de dentro um recipiente selado (processo conhecido também por apertização¹⁸). A meta é inativar todos os microrganismos viáveis e garantir que a embalagem permaneça hermética após o processamento. O principal objetivo de segurança é garantir um mínimo de 12 reduções no logaritmo (log) dos organismos viáveis (incluindo esporos) de *Clostridium botulinum*. Ela é alcançada ao atingir 121 °C durante cerca de 3 min no centro do alimento, ou seja, na zona de aquecimento mais lento. [206].

A esterilização comercial objetiva igualmente obter alimentos microbiologicamente estáveis à temperatura ambiente através da destruição de todos os microrganismos que possam crescer nos alimentos processados. O grau de destruição de microrganismos atingido pelo processamento térmico varia, dependendo esse da temperatura e do tempo específicos ao tratamento térmico aplicado [198], [204].

3.1.4.1.5 Microondas

Os curtos tempos de aquecimento do processamento HTST dependem de mecanismos de transferência rápida de calor, o que não pode ser alcançado pela condução convencional de calor, especialmente para os alimentos sólidos ou com pedaços. De maneira a suplantiar as limitações dos mecanismos tradicionais de transmissão de calor por condução, novas técnicas de aquecimento alternativas emergiram, dentre as quais o aquecimento por microondas. A principal diferença entre o aquecimento ôhmico, por radiofrequência, infravermelho e por microondas é a frequência do campo eletromagnético utilizada: as ondas de frequências entre 300 MHz e 300 GHz são chamadas microondas, mas, em termos práticos, apenas algumas bandas de frequência são utilizadas para o aquecimento por microondas [207].

Uma vasta literatura sobre o valor nutricional dos alimentos processados por microondas conclui que não existem diferenças nutricionais significativas entre alimentos preparados por métodos convencionais e por microondas [208], [209].

¹⁸ Nicolas Appert, um inventor francês considerado o pai das conservas alimentares, desenvolveu uma técnica de preservação de alimentos em recipientes selados, conhecida como "apertização". Esse método envolvia o acondicionamento de alimentos dentro de frascos hermeticamente selados de maneira a evitar a entrada de ar e bactérias. Posteriormente, os frascos eram aquecidos para matar quaisquer microrganismos presentes e prevenir a deterioração dos alimentos. Essa técnica foi uma precursora importante para os métodos modernos de enlatamento e preservação de alimentos em frascos de vidro. Deve-se lembrar que, dependendo da temperatura e do tempo ao qual as embalagens são submetidas, pode-se ter tratamentos de pasteurização (compotas ou outras conservas de frutas) ou esterilização (alimentos enlatados de uma maneira geral) [387].

Alguns aspetos das microondas serão discutidos em maiores detalhes na **Seção 4.1.3.2** sobre novas técnicas de conservação.

3.1.4.2 Conservação pelo Frio

Carl von Linde foi reconhecido como sendo o primeiro a desenvolver um refrigerador compacto e portátil, tendo registado numa patente alemã desde 1877. Entretanto, foram alguns engenheiros americanos que adaptaram esse sistema para uso doméstico [186].

O transporte de alimentos a nível mundial mudou drasticamente com o apogeu da refrigeração artificial. Tudo isto começou como resultado do mercado criado para o comércio de carne congelada: o primeiro carregamento com sucesso de carcaças congeladas de ovinos, provenientes da Nova Zelândia e com destino a Londres, ocorreu no ano de 1882, sendo esse o marco da fundação da indústria da carne refrigerada [210].

A partir da década de 1940 nos EUA, surgem os primeiros veículos refrigerados, que fazem com que a cadeia de frio possa ser mantida, da produção ao ponto de venda, melhorando a qualidade e aumentando ainda mais a vida útil de alguns alimentos [187].

É geralmente aceite que o arrefecimento e o congelamento são as técnicas de conservação que preservam melhor as características sensoriais. O resfriamento proporciona um tempo de conservação relativamente curto, conseguindo manter a aparência e a textura do produto fresco, porém, esse procedimento não inibe a degradação parcial de alguns componentes do alimento, enquanto o congelamento proporciona um longo período de conservação com quase nenhuma perda de componentes relevantes [211]. No entanto, a formação de cristais de gelo pelo congelamento, sobretudo no período de armazenagem, pode ter efeitos significativos, em especial, sobre a textura e aparência [212].

Devido à redução da temperatura, todos os processos de deterioração, como reações químicas e enzimáticas, bem como a reprodução microbiana, são abrandados. A reprodução de microrganismos mensuráveis nos alimentos é suprimida na faixa de temperatura entre -10 e -15 °C. O crescimento de microrganismos patogénicos é evitado nas temperaturas de congelamento, assim como a formação de micotoxinas é interrompida para quase todos os fungos [211].

Para o sucesso da conservação pelo frio é necessário utilizar apenas matérias-primas frescas de alta qualidade e com baixa carga microbiana, não se esquecendo de

que a cadeia de frio deve ser eficiente e integrada, ou seja, isenta de grandes oscilações de temperatura ao longo da cadeia de suprimentos.

3.1.4.2.1 Arrefecimento e *Super-chilling*

O arrefecimento consiste em manter os produtos a temperaturas na faixa de 0 °C a 7 °C de maneira a estender a vida de prateleira. Essa técnica possui como objetivo a inibição do crescimento microbiano através da supressão de reações metabólicas que são catalisadas por enzimas, cuja atividade depende da temperatura. Além disso, as baixas temperaturas reduzem ainda a taxa de respiração, transpiração e a atividade enzimática em frutas e legumes não processados e, conseqüentemente, a velocidade dos diversos processos bioquímicos deteriorantes. Para alimentos altamente perecíveis, como peixes, carnes e alguns vegetais, é recomendado que o tratamento seja iniciado tão logo a matéria-prima seja extraída ou processada [198], [213].

O arrefecimento consegue manter alimentos perecíveis por dias ou semanas, dependendo do gênero. Deve-se ter em consideração que a refrigeração precisa se adequar às especificidades dos alimentos que se pretende preservar, por exemplo: frutas e outros vegetais provenientes de climas quentes podem sofrer degradação (queimaduras e escurecimento) caso sejam submetidos a temperaturas muito frias [187].

Este método de conservação tem efeitos muito suaves sobre os atributos sensoriais e nutricionais dos produtos e dos alimentos tratados com temperaturas de refrigeração que podem ser classificados como sendo “produtos minimamente processados”¹⁹, assunto que será abordado de maneira mais aprofundada no **Capítulo 5** [213].

Na “refrigeração crítica” (*super-chilling*) a temperatura é reduzida de 1 a 2 °C abaixo do ponto de congelação do produto. Isto resulta numa chamada “congelação superficial”, onde uma fina camada de gelo é produzida no exterior do produto durante o processamento [214].

A ideia principal é que a formação de gelo deve ser evitada no interior do produto, a fim de manter as suas características originais. As temperaturas de “refrigeração crítica” são suficientemente baixas para suprimir a atividade microbiana, mas outras alterações físicas e químicas podem ainda ter lugar [215].

¹⁹ Entenda-se “produtos minimamente processados” como sendo aqueles prontos a consumir que foram pré-embalados e refrigerados, de maneira a manter as células dos ingredientes alimentares vivas.

A principal vantagem deste método é uma extensão do prazo de validade dos produtos (cerca do dobro), em comparação ao resfriamento tradicional. Outras virtudes dessa técnica incluem: alta qualidade do produto, maior rendimento e o potencial de redução do impacto ambiental (aproximadamente 30%) ao se mudar de cadeias de suprimento refrigeradas para as de *super-chilling* [214].

3.1.4.2.2 Congelamento, Congelamento Rápido Individual (IQF) e Criopreservação

O congelamento proporciona um tempo de prateleira significativamente prolongado e tem sido utilizado com sucesso para a conservação de muitos alimentos a longo prazo, contudo novos processos de congelação continuam a emergir. Normalmente, as temperaturas de armazenamento situam-se entre os -18 °C e -24 °C [178]. Os diferentes métodos aplicados na indústria alimentar podem também ser agrupados como sendo de congelação lenta ou de congelação rápida, cujas principais características podem ser vistas na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 Principais características dos métodos de congelamento lento e rápido

Características do Processo	Congelamento Lento	Congelamento Rápido
Temperatura decrescente	< 2 °C/min	> 10 °C/min
Tamanho dos cristais de gelo	Tamanho superior	Tamanho inferior
Água removida (perdida)	Maior perda	Menor perda
Gotejamento de água	Maior gotejamento	Menor gotejamento
Desnaturação de proteínas	Maior desnaturação	Menor desnaturação
Danos nos tecidos celulares	Maior dano	Menor dano
Integridade da estrutura	Menor integridade	Maior integridade
Capacidade de retenção de água (WHC)	WHC inferior	WHC superior

Em termos físicos, quando uma grande proporção da água no alimento é congelada, a concentração dos solutos na água não congelada igualmente aumenta, diminuindo dessa forma a atividade da água. Em termos microbiológicos, o congelamento geralmente impede o crescimento microbiano, porém, não destrói bactérias e bolores. Por fim, em termos químicos, tem-se uma diminuição significativa da taxa das reações ocorridas nos alimentos [213].

Atualmente, caso se adotem as melhores práticas de manipulação e processamento, o congelamento tem um baixo impacto na qualidade nutritiva dos alimentos, as principais perdas de qualidade estão associadas às alterações de textura (por exemplo, amolecimento) e perdas por gotejamento. A cristalização do gelo e a sua recristalização são os dois principais fatores relacionados com essas perdas. A sublimação da água sob temperaturas negativas pode promover uma desidratação superficial e queimaduras por congelamento. Para contornar esse inconveniente, especial atenção deve ser dada às embalagens usadas em alimentos congelados, assim como devem ser aplicadas, por vezes, técnicas como a da “vidragem com gelo” (*ice glazing*). Outras alterações de ordem física podem ainda ocorrer, tais como a retrogradação dos amidos e desnaturação de proteínas [211].

Para o congelamento industrial, muitas vezes é utilizado o ultra-congelamento, que envolve temperaturas inferiores aos $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, muitas vezes menores que $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; ou o congelamento criogénico (criopreservação), realizado através do uso de gases comprimidos ou liquefeitos, tais como o dióxido de carbono ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou o azoto líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Se por um lado, o congelamento criogénico produz produtos de alta qualidade devido à formação de cristais de gelo de tamanho reduzido, à baixa perda de humidade ou gotejamento e à maior integridade da estrutura celular e dos seus constituintes, por outro lado, essa técnica envolve custos comparativamente elevados e, por conseguinte, só é usada em produtos sensíveis e/ou de alto valor agregado. É preciso recordar ainda que a implementação dessas técnicas possuem como requisito o estabelecimento de uma cadeia de frio ao longo de toda rede de suprimento [213].

Enquanto pequenos alimentos – tais como camarão ou bivalves, bagas, vegetais em cortados ou picados – podem ser congelados rapidamente, em contrapartida há outros produtos com dimensões maiores (por exemplo, carcaças de animais) que não permitem o congelamento rápido nas porções centrais dos mesmos.

O congelamento de peças grandes ocorre normalmente sob gradientes térmicos internos com elevadas taxas de congelamento nas regiões externas em contato com o meio refrigerante e taxas decrescentes em direção ao centro térmico da matéria-prima. Essa diferença de taxas de congelamento, frequentemente, induz tensões mecânicas nas camadas externas do produto congelado que levam à fissuração da superfície [216]. Nesse caso, deve-se optar por um congelamento lento como forma de evitar danos maiores à estrutura do alimento. Logo, pode-se concluir que é a dimensão do alimento o principal fator determinante da velocidade de congelamento a ser utilizada.

Um processo caracterizado pelo congelamento rápido de pequenos alimentos (ou fragmentos desses) em unidades distintas é denominado por “congelamento rápido

individual” (IQF). O IQF é possível quando não há barreira à transferência de calor entre o refrigerante e o produto e, devido a sua pequena dimensão, a taxa de congelamento não é limitada pela transferência interna de calor [216].

Os refrigerantes utilizados nestes sistemas podem ser ar a baixa temperatura (normalmente em torno dos $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$) e em altas velocidades, bem como líquidos criogénicos que sofrem uma mudança de fase em contacto com a superfície do produto, removendo o calor do mesmo. A técnica usual nesse processo é a do congelamento em leito fluidizado, onde os alimentos são colocados numa esteira sendo movidos através de uma zona de congelamento na qual o ar frio é dirigido para cima e as partículas dos alimentos começam a flutuar e a cair. Este movimento expõe todos os lados do alimento ao ar frio, minimizando a resistência à transferência de calor na superfície dos mesmos [216], [217].

Um foco da investigação científica atual reside no estudo da morfologia do gelo, tendo como premissa o controlo da cristalização através, por exemplo, do emprego de agentes de nucleação, ou ainda na inibição da recristalização, que pode ser amenizada através do uso de aditivos alimentares tais como hidrocolóides e proteínas anticongelantes [216].

De uma maneira resumida, pode-se referir que a qualidade dos alimentos congelados depende de uma série de fatores: da qualidade dos alimentos frescos, da aplicação de pré-tratamentos, da seleção do melhor método de congelamento, das condições higiénicas do processo, da velocidade de congelamento correta, do uso adequado de embalagens e, por fim, de um descongelamento adequado [217].

3.1.4.2.3 Liofilização

Ao longo do tempo, algumas técnicas de secagem tiveram de evoluir devido à necessidade de produzir produtos secos de alta qualidade, em particular, a partir de matérias-primas que são ultrasensíveis ao calor (por exemplo, leveduras ou ervas). Tais sistemas de secagem incluem, por exemplo, a utilização de temperaturas abaixo do ponto de congelamento e em condições de vácuo, como é o caso da liofilização [199].

A liofilização (ou secagem por congelamento) é um método que promove a desidratação dos alimentos através da sublimação da água. De maneira a acelerar o processo, que é normalmente lento, o produto pode ser gradualmente aquecido por condução, se o contacto com a prateleira aquecida for apropriado, e também por radiação das prateleiras superiores e dos arredores. A liofilização é geralmente considerada como o melhor método para a produção de produtos secos de alta qualidade, gerando alimentos com atributos sensoriais e nutritivos muito próximos ao

alimento original. Isto acontece porque a maioria das reações de deterioração são abrandadas ou praticamente interrompidas [199], [213].

O processo de liofilização envolve três fases: a fase de congelação, a de secagem primária e a de secagem secundária. Na fase de congelação, o alimento a ser processado é arrefecido até uma temperatura em que todo o material se encontra congelado. Na fase primária de secagem, o solvente congelado, maioritariamente água, é removido por sublimação. Isso exige que a pressão do sistema onde o produto é seco seja inferior ou próxima da pressão de vapor de equilíbrio do solvente congelado. Por essa razão, durante a fase de secagem primária, a temperatura da camada congelada está frequentemente em torno dos $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou menos e a pressão absoluta é de cerca de 2 mmHg ou menos. À medida que o gelo sublima, a interface de sublimação, que se inicia na camada exterior do alimento, recua abrindo espaço para um envoltório poroso constituído de material seco. A fase de secagem secundária envolve a remoção de água que não congelou, a que se chama de “água sorvida ou ligada”. Após o término da secagem primária, a fase de secagem secundária começa fazendo com que o vapor de água dessorvido seja transportado através dos poros do material seco [218].

Um aspeto muito importante do processo de liofilização relaciona-se com a temperatura de transição vítrea (T_g). Essa pode ser definida como a temperatura pela qual um sistema amorfo muda do estado vítreo para um estado mole (ou de ultra viscosidade).

No caso da secagem por calor, a temperatura do produto é superior a T_g durante todo o processo, o que faz com que o colapso das matrizes alimentares seja esperado. Por outro lado, as temperaturas de liofilização do produto são inferiores a T_g durante a maior parte do processo, ultrapassando o ponto de transição apenas no final desse. A quebra da estrutura acima da T_g durante a liofilização é considerada como um contributo importante para a deterioração da qualidade do produto, levando à deformação do alimento, por exemplo, através de uma retração da geometria. Esse contratempo pode ser evitado através do controlo adequado das pressões e temperaturas operacionais ao longo de todo o processo [218].

Até agora, não há nenhum método alternativo, utilizado à escala industrial, para reduzir drasticamente o consumo de energia durante o processo liofilização. Embora novas melhorias como a adsorção, a fluidificação, o uso de pressão atmosférica ou aquecimento por microondas tenham sido pesquisadas na última década, a liofilização em vácuo é, até agora, a única tecnologia utilizada em escala industrial para muitos ingredientes alimentares sensíveis ou de alto valor agregado [218], [219].

A principal vantagem da técnica que se pode enumerar é que a liofilização leva a uma menor deterioração dos aspetos organoléticos (aparência, cor, sabor, etc.) em comparação com outros métodos de secagem. Além disso, a taxa de reidratação dos alimentos liofilizados é, no geral, de quatro a seis vezes superior à dos alimentos secos ao ar. Enquanto que as principais desvantagens existentes estão relacionadas com os altos custos de produção, elevados consumos de energia (cerca de 2 vezes mais alto) e baixos rendimentos [218], [220].

3.1.5 Tratamentos Não-Térmicos

Existe um conjunto de tratamentos que buscam preservar os alimentos através de alterações químicas e bioquímicas, muitas vezes de ordem microbiológica, sem fazer uso do frio ou calor. Nele residem a maior parte das técnicas convencionais de conservação, tais como salga ou adição de açúcar, cura ou maturação, fumagem e fermentação, etc. [221]. Uma grande desvantagem desses procedimentos é o facto, em muitos casos, deles alterarem significativamente as características originais, organoléticas e nutricionais dos alimentos, porém, elas acabam por conferir sabores já assimilados por certas culturas alimentares.

Atualmente, novos processos “não-térmicos” – que fazem uso de altas pressões, ultrassons, campos magnéticos, radiação, correntes elétricas e, até mesmo, luz – foram sendo desenvolvidos, embora os princípios básicos em que se baseiam sejam conhecidos há muito tempo. Alguns possuem ainda uma aplicação industrial mais ou menos limitada, enquanto outros ainda se encontram na fase experimental ou enfrentam problemas de engenharia que dificultam a sua aplicação prática [222].

3.1.5.1 Tratamentos Químicos

No seu sentido mais amplo, a conservação química pode ser definida como a ação de prevenir ou retardar a deterioração dos alimentos de qualquer tipo, alterando a sua composição química, quer pela adição de substâncias conhecidas como conservantes e antioxidantes, quer pela promoção de certos processos bioquímicos (por exemplo, fermentações) que resultam na produção *in situ* de substâncias com a função de preservar os alimentos. Há ainda técnicas que combinam ambos os aspetos num mesmo processo, como é o caso da cura e da maturação. Os processos químicos e bioquímicos têm sido praticados pelo homem desde tempos muito antigos [221].

3.1.5.1.1 Salga ou Adição de Açúcar

A adição de grandes quantidades de sal ou açúcar aos alimentos é um método antigo de conservação de alimentos. O sal foi e continua a ser usado para conservar alimentos, sobretudo, peixes, carnes e laticínios (manteiga, queijo, requeijão, etc.). As geleias, compotas, frutas em calda ou cristalizadas são os produtos mais comumente conservados por adição de açúcar. Quando se adiciona sal ou açúcar, a água desloca-se do interior das células para o exterior por osmose, causando uma desidratação parcial da célula, conhecida como plasmólise, que diminui a atividade da água e interfere na multiplicação de microrganismos. [213].

A diminuição da a_w por si só não explica a ação antimicrobiana do sal que, mesmo em baixas concentrações, constitui um obstáculo significativo ao crescimento microbiano quando em combinação com outros meios de conservação. Assume-se geralmente que o sal exerce uma toxicidade específica para alguns microrganismos, porém, esse mecanismo ainda não é completamente conhecido. De acordo com a sua sensibilidade ao sal, os microrganismos são classificados como ligeiramente, moderadamente e extremamente halofílicos [221].

A salga dos alimentos é feita espalhando-se sal à superfície do alimento (salga em pilha), por imersão em salmoura, por impregnação a vácuo ou por injeção. Com a crescente preocupação em relação ao consumo excessivo de sal e açúcares, assim como por seus impactos negativos sobre a pressão arterial e glicose sanguínea, o emprego desses ingredientes como ferramenta de conservação tem se tornado uma prática cada vez menos recorrente.

3.1.5.1.2 Fumagem

A fumagem é um método antigo de conservação de alimentos e continua a ser utilizado atualmente predominantemente para peixes, carnes e alguns queijos, sendo atualmente utilizada mais pelas suas propriedades de sabor características do que pela sua ação conservante [213].

O fumo é obtido pela queima de madeiras, preferencialmente não resinosas, e contém compostos que têm propriedades antimicrobianas [213].

Há basicamente 2 tipos de fumagem, isto é., a frio e a quente. Enquanto a fumagem a frio é realizada em temperatura ambiente (até um máximo de 35 °C), normalmente numa câmara separada daquela onde é feita a queima da madeira, a fumagem a quente pode decorrer no mesmo ambiente onde se realiza a combustão, devendo o alimento ser submetido a temperaturas acima dos 60 °C por um período

mínimo. No entanto, em unidades fabris o fumo costuma ser passado sobre a água para remover alcatrão e partículas sólidas [201], [221].

A fumagem é um processo lento e difícil de controlar, devido à complexidade das reações químicas e à composição variável das madeiras utilizadas. O fumo contém mais de 400 substâncias, das quais se destacam compostos fenólicos, ácidos e carbonilos. O sabor fumado é conferido, em especial, pelos compostos fenólicos voláteis, enquanto os óxidos de azoto são responsáveis pela cor característica. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, produtos da pirólise de matéria orgânica, são onnipresentes no ambiente, atingindo níveis perigosos para a saúde humana – devido a natureza carcinogénica de alguns deles, como é o caso do benzopireno –, especialmente quando o procedimento de fumagem é realizado em condições não controladas [201].

O efeito conservador da fumagem dá-se principalmente na superfície dos alimentos através do depósito de compostos com atividade antimicrobiana. Adicionalmente, no método a quente, o calor gerado seca os alimentos, além de promover uma inativação térmica dos microrganismos presentes. Há ainda a fumagem artificial onde se realiza a aplicação de "fumo líquido" (um condensado líquido purificado de fumo de madeira) à superfície dos alimentos que confere um sabor fumado e tem algum ou nenhum efeito antimicrobiano [221].

Acredita-se que o fumo iniba as bactérias aeróbicas devido à redução do teor de oxigénio da atmosfera na sala de fumo. Além disso, a presença de monóxido e dióxido de carbono no fumo pode contribuir para a ação inibitória, tendo em conta que foi comprovado que esses gases são capazes de inativar uma vasta gama de bactérias, leveduras e bolores. O sal é comumente utilizado no pré-tratamento de alimentos para a fumagem, propiciando um efeito combinado de conservação quando em concentrações, na fase aquosa, de pelo menos 3,5%. Por fim, é preciso ressaltar que os alimentos, em particular os fumados a frio, devem ser acondicionados em embalagens apropriadas (sob vácuo ou em atmosferas modificadas) e mantidos sob refrigeração [201], [221].

3.1.5.1.3 Uso de Aditivos

Os aditivos alimentares são classificados em categorias de acordo com a sua função: corantes, aromatizantes, conservantes, antioxidantes, estabilizantes, gelificantes, espessantes, edulcorantes, umectantes, agentes antiaglomerantes, acidulantes, dentre outros. O uso destes aditivos está legalizado na União Europeia (EU) pelo Regulamento Europeu 1333/2008 [223].

Nesta secção, em particular, são relevantes os aditivos com as funções de conservar e evitar a oxidação dos alimentos, tendo em conta que os primeiros inibem o desenvolvimento microbiano, enquanto os demais aumentam a vida de prateleira por inibir as reações de oxidação através da estabilização de radicais livres. Os acidulantes possuem especial interesse por reduzirem o pH e, consequentemente, afetarem as atividades enzimáticas extracelulares e o metabolismo microbiano. Por fim, os gelificantes, espessantes e edulcorantes têm capacidade de alterar a a_w dos alimentos, interferindo também de forma moderada no desenvolvimento microbiano [224].

No geral, o pH de um alimento pode ser um indicativo da sua perecibilidade. Alimentos como frutas, alguns vegetais, laticínios e outros produtos fermentados costumam ter o pH baixo o suficiente ($\text{pH} < 4,6$) para evitar a contaminação pela maioria das bactérias. A maioria das carnes, frutos do mar, ovos e leites crus possuem um pH mais para próximo do neutro ($\text{pH} > 5,6$), tornando-os especialmente suscetíveis ao desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogénicas. Os vegetais têm valores de pH intermediários e, em alguns casos, também elevados, sendo mais propensos à deterioração bacteriana [224].

Em geral, as bactérias heterotróficas tendem a ser menos tolerantes a ácidos em comparação com os demais microrganismos alimentares comuns. Um pH de 4,5 é especialmente importante porque esse valor é abaixo do qual *Clostridium botulinum* deverá ter o seu crescimento inibido. Por essa razão, muitos alimentos tratados termicamente em recipientes herméticos precisam ter o seu pH corrigido para evitar a proliferação de esporos botulínicos. Abaixo de um pH de 4,2, a maioria dos outros microrganismos alimentares produtores de toxinas são bem controlados, excetuando-se as bactérias ácido-lácticas e várias espécies de leveduras e bolores [224].

Muitos ácidos orgânicos lipofílicos fracos atuam sinergicamente com valores baixos de pH na inibição do crescimento microbiano. Assim, ácidos como o propiónico, o sórbico e o benzoico são particularmente úteis enquanto conservantes alimentares. Enquanto os ácidos inorgânicos são usados em quantidades discretas, os ácidos orgânicos são utilizados em maior concentração, principalmente como acidulantes (ácido cítrico, málico, tartárico, láctico, acético, etc.). Os efeitos inibidores combinados do pH e da a_w na sobrevivência dos microrganismos são notoriamente aditivos [224].

O modo de ação dos principais grupos de ácidos pode ser resumido como: ácidos fortes, que baixam o pH externo, mas não conseguem penetrar a membrana celular; ácidos fracos, que são lipofílicos e conseguem atravessar as membranas; iões

potenciados por ácidos, tais como carbonato, sulfato e nitrato, que são potentes inibidores em pH baixo [224].

Enquanto o pH interno do microrganismo permanecer estável, o efeito do pH externo na taxa de crescimento deve ser devido à inativação de uma ou mais atividades enzimáticas essenciais presentes nas camadas externas da célula, ou ainda à redução dos sistemas de transporte de íons e nutrientes essenciais. Na maioria dos microrganismos, um pH citoplasmático próximo da neutralidade é essencial para o seu crescimento. Ao nível intracelular, alguns ácidos em altas concentrações (abaixo do ponto isoelétrico) podem promover a desnaturação de proteínas e danificar o código genético (ácido desoxirribonucleico ou ADN) [224].

Determinadas das enzimas degradadoras dos alimentos podem ser inibidas ou inativadas, muitas vezes em conjunto com tratamentos térmicos, através da redução do pH: por exemplo, a lipoxigenase que catalisa a oxidação dos ácidos gordos insaturados, gerando compostos de aroma responsáveis por alguns *off-flavors* ou as polifenoloxidasas (PPO) que provocam o escurecimento enzimático em alimentos processados [224].

O pH também pode afetar muitas propriedades organoléticas, tais como cor, sabor e textura dos alimentos.

Por fim, o pH de alguns alimentos pode ser controlado através da incubação com bactérias ácido-láticas e bactérias acéticas que produzem através da fermentação, respetivamente, ácido láctico e acético [224].

3.1.5.1.3.1 Outros Conservantes Químicos

Além da adição de sal, açúcar e do fumo, preservativos “tradicionais” anteriormente mencionados, existe uma lista extensa de outros adjuvantes químicos que podem ser aplicados na preservação de alimentos, dos quais se destacam: [221]

- Dióxido de enxofre e sulfitos: apenas o dióxido de enxofre livre é ativo, podendo facilmente ser removido por fervura. O dióxido de enxofre é eficaz contra bactérias, leveduras e bolores. Em pH muito elevado ele perde a atividade antimicrobiana. O dióxido de enxofre e os sulfitos são utilizados como antimicrobianos, principalmente no vinho, sumos, concentrados e polpas de fruta, mas são também utilizados pelos seus efeitos antioxidantes e de prevenção das reações de escurecimento numa variedade de outros alimentos.
- Nitratos e nitritos: Os nitratos vêm sendo utilizados em produtos de carne, peixe e nos queijos durante muitos séculos. Nos queijos duros, têm sido utilizados para evitar o inchaço desses pela ação de bactérias formadoras de gás. A principal razão para a sua inclusão em enchidos e outros produtos de charcutaria foi a sua

capacidade de fixar a cor vermelha da carne (reage com a mioglobina), embora ao mesmo tempo exercessem uma valiosa atividade antimicrobiana contra o *Clostridium botulinum*. As propriedades, de preservação e fixação da cor, devem-se aos nitritos formados pela redução dos nitratos e não aos nitratos propriamente ditos. A eficácia antimicrobiana dos nitritos é mais forte a um pH baixo e é, aparentemente, devida à formação de ácido nitroso. Suspeita-se que os nitritos reajam com aminas secundárias e terciárias, nos alimentos ou no trato gastrointestinal, para formar nitrosaminas, compostos altamente carcinogénicos.

- Dióxido de carbono (CO₂): estudos confirmam que o dióxido de carbono atua sobre uma vasta gama de bactérias, leveduras e bolores. O CO₂ parece inativar os microrganismos direta e indiretamente – através da privação das células de um fornecimento adequado de oxigénio – uma vez que os microrganismos anaeróbicos são também afetados pelo dióxido de carbono.
- Etanol: em concentrações suficientemente elevadas (60 – 70%), o etanol é utilizado como desinfetante e mata microrganismos de todos os tipos, desnaturando as suas proteínas chave. No entanto, verificou-se que tem efeitos antimicrobianos também em concentrações mais baixas na faixa dos 5% a 20%. Diferentemente do que ocorreu no passado, atualmente, a utilização de etanol no processamento de alimentos como conservante é extremamente limitada, estando relegada aos produtos alimentares de cariz mais tradicional.

3.1.5.1.3.2 Antioxidantes

Existem vários tipos de ranço associados a gorduras, óleos e alimentos gordurosos, nem sempre relacionados com reações de oxidação. Os tipos de ranço mais importantes são: lipolítico devido principalmente às lipases; oxidativo devido à autooxidação e oxidação enzimática; “reversão do sabor” devido à oxidação, clivagem e rearranjo; cetónico devido à beta-oxidação e descarboxilação enzimática. A perceção sensorial do ranço deve-se à presença de substâncias voláteis com 3 a 12 átomos de carbono; várias classes de compostos são ativas na rancificação, tais como aldeídos, cetonas, álcoois ou até mesmo hidrocarbonetos [226].

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) são os componentes menos estáveis dos alimentos, sendo facilmente atacados pelo oxigénio do ar. A temperaturas mais elevadas, os ácidos gordos saturados, como a gordura do leite e os óleos de palma, também são oxidados. A suscetibilidade de outras substâncias contendo uma cadeia de hidrocarbonetos – por exemplo, terpenos superiores como carotenoides, esteróis e terpenos menores presentes nos óleos essenciais – são frequentemente subestimadas na sua contribuição para o ranço total [226].

Os hidroperóxidos, que são os produtos de reação primária mais importantes, podem decompor-se, mesmo à temperatura ambiente, formando radicais livres que iniciam uma nova cadeia de reações oxidativas. Por conseguinte, é aconselhável adicionar substâncias que estabilizem os hidroperóxidos na matriz alimentar. Os hidroperóxidos de PUFA não têm odor ou sabor particular, mas são facilmente clivados na ligação dupla adjacente ao grupo hidroperoxídico, resultando na formação de vários compostos voláteis de baixo peso molecular. Apenas os produtos de oxidação secundária conferem o sabor rançoso às gorduras e aos óleos oxidados. O ranço pode ser limitado diminuindo a temperatura de armazenamento, o acesso ao oxigênio e o grau de insaturação da fração lipídica. Quando a aplicação de nenhum dos métodos acima referidos é possível ou satisfatória, a melhor forma de controlar o ranço é através da adição de antioxidantes. Os antioxidantes formam ligações químicas com os hidroperóxidos lipídicos, inibindo assim a sua decomposição em radicais livres [226].

Muitos derivados de compostos fenólicos, de síntese química, são ativos enquanto antioxidantes. Contudo, apenas alguns, são aprovados para a estabilização alimentar. Os antioxidantes sintéticos mais importantes são: hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *Butylated hydroxytoluene*), hidroxianisol butilado (BHA, do inglês *Butylated hydroxyanisole*), butilhidroquinona terciária (DBHQ, do inglês *Tertiary butylhydroquinone*), galato de propilo (PG, do inglês *Propyl gallate*), galato de octilo (OG, do inglês *Octyl gallate*) e galato de dodecila (DG, do inglês *Dodecyl gallate*) [226].

A maioria dos antioxidantes naturais são também compostos fenólicos presentes em muitos produtos alimentares. Os tocoferóis (vitamina E) são os antioxidantes mais comuns, uma vez que estão presentes, pelo menos em vestígios, em quase todos as matérias-primas. [226].

Muitos compostos derivados de aminoácidos podem também suprimir a atividade dos radicais livres. Já os compostos sinérgicos aos antioxidantes são substâncias que não têm atividade própria, mas que podem aumentar a atividade de um antioxidante. Os sinérgicos mais frequentemente utilizados são os ácidos inorgânicos polivalentes (por exemplo, ácido fosfórico) ou ácidos orgânicos. [226].

Os íons metálicos de valência transitória, tais como cobre, ferro, cobalto, cromo ou manganês são pró-oxidantes muito ativos. Quantidades vestigiais de metais livres são suficientes, em alguns casos, para promover eficazmente a autooxidação. Muitas substâncias que se encontram presentes nos alimentos enquanto componentes naturais – especialmente em matérias vegetais, tais como fitatos, fosfolípidos e oxalatos – são capazes de se ligar a metais e inibir a degradação, mas não de evitá-la

completamente. A atividade quelante depende do valor do pH, da a_w e de outros fatores do meio [226].

3.1.5.1.4 Conservantes Naturais

Para satisfazer os critérios dos consumidores – que, de uma maneira geral, possuem aversão aos conservantes químicos – a indústria alimentar pôs-se a procura de novas alternativas mais naturais, muitos dos quais desempenham um papel importante nos sistemas de defesa natural ou de competição dos organismos vivos, que garantam a segurança dos seus produtos ao longo de toda cadeia de fornecimento. Em geral, as ervas e especiarias e seus vários constituintes antimicrobianos são “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) [225].

Os conservantes naturais podem ser agrupados em categorias consoante a sua origem, porém, aqueles provenientes de plantas ou de microrganismos são os que possuem maior aplicação prática no contexto atual. No caso das plantas, para além de alguns ácidos orgânicos cuja função é a de regular o pH dos alimentos, existem ainda fitoalexinas, compostos fenólicos, terpenos e alguns componentes dos óleos essenciais que têm funções antimicrobianas. No caso dos compostos microbianos, destacam-se as bactérias ácido-láticas (LAB) que são capazes de não somente acidificar o meio, como também de produzir biopreservativos como as bacteriocinas [225].

As LAB podem produzir tanto compostos antimicrobianos com um espectro de inibição relativamente amplo (isto é, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio) como compostos com um espectro antimicrobiano bastante estreito, chamados de bacteriocinas. A utilização das LAB é possível através da aplicação do organismo produtor como uma cultura protetora, confiando na sua proliferação e consequente competição com os demais microrganismos. De qualquer maneira, as LAB podem ser aplicadas, em conjunto com outros obstáculos, para suprimir o crescimento de patógenos Gram-positivos importantes [225].

Os óleos essenciais consistem genericamente de uma misturas de ésteres, aldeídos, cetonas e terpenos. Compostos como os monoterpenos voláteis e aldeídos podem ser utilizados como conservantes alimentares, deixando uma quantidade insignificante de resíduos. Em alguns estudos, foram obtidos resultados contraditórios devido a componentes específicos da matriz alimentar, tais como proteínas e gorduras, que imobilizam e antagonizam com os componentes do óleo essencial. Considerando qualquer aplicação dos óleos essenciais, é preciso salientar que podem ocorrer grandes variações no rendimento e na composição das substâncias ativas. Uma solução para esta questão é a de aplicar métodos de refinação a fim de padronizar as concentrações de compostos, embora isso possa envolver barreiras regulamentares [225].

3.2 Ensaio de Conservação | Materiais e Métodos

3.2.1 Ensaio de Conservação | Processamento das Matérias-primas

As matérias-primas usadas no ensaio foram preparadas consoante o protocolo descrito na **Secção 2.2.1**, sendo seleccionadas para o presente ensaio as algas: “alfacedo-mar” (*Ulva lactuca*; Chlorophyta), “erva-patinha” (*Porphyra umbilicalis*; Rhodophyta), e as algas castanhas (Phaeophyceae) “wakame” (*Undaria pinnatifida*), “limo corriola” (*Saccorhiza polyschides*) e “bodelha” (*Fucus vesiculosus*).

Todas as algas foram processadas pelas seguintes técnicas de conservação: congelamento, salga, secagem e liofilização. Após o fim do processamento e armazenagem, o peso seco das amostras foi auferido de acordo com a metodologia descrita na **Secção 2.1.2**. No dia anterior às análises, as amostras foram novamente congeladas em azoto líquido, trituradas imediatamente em um moinho para grãos, sendo de seguida transferidas para sacos de vácuo e armazenadas numa arca congeladora (-45 °C).

3.2.1.1 Congelamento (Controlos)

Assim que chegaram a FCT NOVA, as algas marinhas foram pesadas (100 ± 1 g) e envasadas em sacos de poliamida/polietileno (PA/PE, dimensões 300 x 400 mm, 90 µm de espessura) [Sammic, Espanha] com 99% de vácuo. Em seguida, as mesmas foram congeladas em azoto líquido e conservadas a -45 °C até posterior análise.

3.2.1.2 Salga

As algas marinhas foram pesadas (100 ± 1 g) em duplicado e misturadas com 40% de cloreto de sódio (NaCl) [sal marinho rústico, Vatel, Portugal]. Em seguida, as mesmas foram envasadas em sacos de PA/PE (300 x 400 mm x 90 µm) com 95% de vácuo, sendo armazenadas a 4 °C por 30 dias. Após esse período, as amostras foram dessalgadas (100 g/L de água ultrapura) por 4 min, secas numa centrifugadora para saladas por 60 s e postas entre duas folhas de papel filtro (tamanho A4) por cerca de 10 min para remover o excesso de humidade. Por fim, as amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido, sendo as mesmas conservadas em sacos com 99% de vácuo dentro de uma arca congeladora (-45 °C) até posterior análise.

3.2.1.3 Secagem

As algas marinhas foram pesadas (200 ± 1 g) e transferidas para tabuleiros tipo GastroNorm (GN $\frac{1}{1}$) forrados com papel-filtro. Em seguida, as mesmas foram secas numa estufa [Modelo TS 9135, Termaks / Nordic Labtech, Suécia] com convecção a 60°C por 12 h. Depois de arrefecerem, as algas secas foram envasadas em sacos de PA/PE (300×400 mm x $90\ \mu\text{m}$), sendo armazenadas por 30 dias à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e sob o abrigo da luz. Após esse período, as amostras foram reidratadas (15 g/L de água ultrapura) por 8 min, secas em uma centrifugadora para saladas por 60 s e postas entre duas folhas de papel filtro (tamanho A4) por cerca de 10 min para remover o excesso de humidade. Por fim, as amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido, sendo as mesmas conservadas em sacos com 99% de vácuo dentro de uma arca congeladora (-45°C) até posterior análise.

3.2.1.4 Liofilização

As algas marinhas foram pesadas (200 ± 1 g) e transferidas para bandejas forradas com papel-filtro. Em seguida, as mesmas foram congeladas e secas em um liofilizador de bancada [Modelo CoolSafe Basic 4L, LaboGene, Dinamarca] acoplado a uma bomba de vácuo [Modelo Ilmvac P4Z, WELCH, Alemanha] por 48 h. Terminado o processo de liofilização, as algas secas foram envasadas em sacos de PA/PE (300×400 mm x $90\ \mu\text{m}$), sendo armazenadas por 30 dias à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e sob o abrigo da luz. Após esse período, as amostras foram reidratadas (15 g/L de água ultrapura) por 8 min, secas numa centrifugadora para saladas por 60 s e postas entre duas folhas de papel filtro (tamanho A4) por cerca de 10 min para remover o excesso de humidade. Por fim, as amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido, sendo as mesmas conservadas em sacos com 99% de vácuo dentro de uma arca congeladora (-45°C) até posterior análise.

3.2.2 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS)

A preparação das amostras e análises foram realizadas usando o mesmo protocolo descrito na **Secção 2.2.3**, excetuando-se o cálculo da razão de impacto do odor (OIR) que não foi realizado para o presente ensaio.

3.2.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa RStudio, versão 2022.2.1.461 [95], usando ANOVA de 1 fator (para os tratamentos) totalmente

causalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD. Todos os resíduos das séries de dados foram testados para normalidade, simetria, curtose e homocedasticidade. A referência para o nível de significância estatística dos testes foi $\alpha = 5\%$. Para identificar quais VOCs contribuíram mais significativamente para a caracterização das amostras em termos de voláteis, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) usando o software estatístico The Unscrambler® X, versão 10.5.46461.632 [228].

3.3 Apresentação e Discussão dos Resultados

3.3.1 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis

O gráfico de *scores* (pontuação) da Análise de Componentes Principais (PCA) para as cinco algas tratadas por secagem, liofilização e salga, além do controlo (alga fresca), está apresentado na **Figura 3.3**. Neste, observa-se que o primeiro componente principal (PC-1), ao longo do eixo de X (horizontal), explica 74% da variação nos dados, enquanto o segundo componente principal (PC-2), ao longo do eixo de Y (vertical), representa 20% da variação. Conjuntamente, ambos os PCs explicam 94% da variação total nos dados, o que é bastante expressivo.

Note-se que foi possível reunir as diferentes algas marinhas em grupos distintos, o que sugere que os perfis de VOCs são mais semelhantes dentro da mesma espécie de alga. No entanto, em algumas algas marinhas houve uma dispersão de alguns tratamentos, o que pode indicar que ocorreu um impacto significativo sobre os VOCs de acordo com as técnicas de conservação aplicadas.

Em relação aos tratamentos, é possível generalizar que as amostras secas tendem a estar mais afastadas das frescas, ao passo que, em muitos casos, a salga, seguida da liofilização, agrupam-se mais próximas dos controlos. Dessa maneira, pode-se concluir que o tratamento térmico é aquele que mais promove mudanças mais acentuadas no perfil de aroma das algas marinhas.

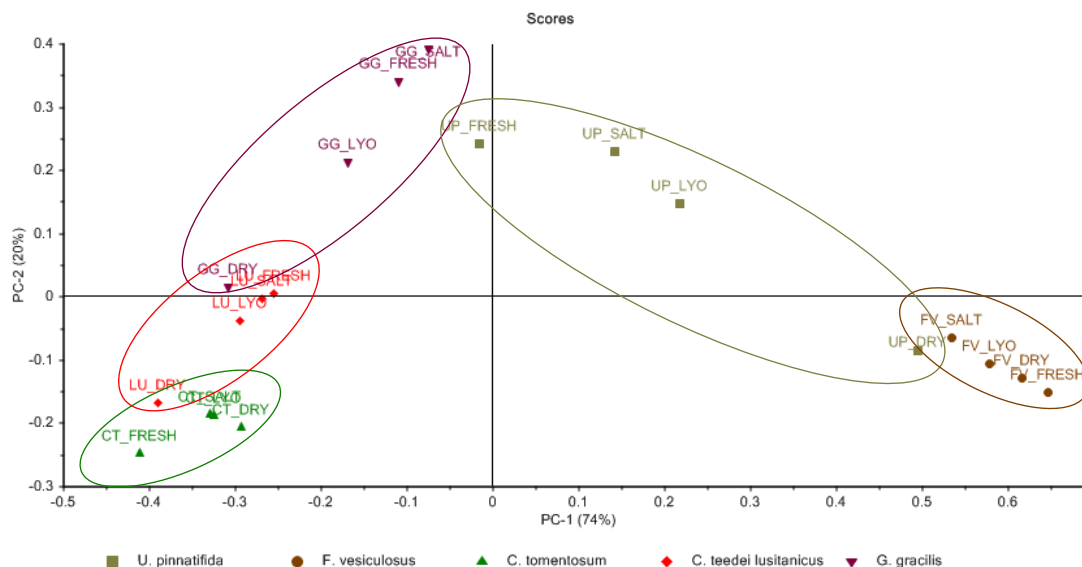


Figura 3.3 Gráfico de scores da PCA dos VOCs de todas as macroalgas analisadas por GC-TOF-MS (frescas e conservadas por secagem, liofilização e salga)

O sufixo **FRESH** representa as amostras frescas (controlo), **DRY** as amostras secas, **LYO** as amostras liofilizadas e **SALT** as amostras salgadas.

Em *Undaria pinnatifida* (UP), percebe-se que as amostras variaram bastante com o tratamento, com a amostra fresca (UP_FRESH) situando-se distante das demais, indicando um perfil de VOCs distinto para cada tratamento. Além disso, o tratamento que pareceu ter modificado com mais intensidade o perfil de aroma foi a secagem em estufa (UP_DRY). Em *Gracilaria gracilis* (GG), as amostras igualmente apresentaram alguma dispersão, o que sugere que o perfil de VOCs também mudou consideravelmente com cada tratamento, excetuando-se a salga (GG_SALT) que situou-se próxima da alga fresca (GG_FRESH). Mais uma vez, o processo de secagem mostrou ser o que mais influenciou o perfil aromático, desta vez de *G. gracilis*.

Já em *Fucus vesiculosus* (FV), os tratamentos não pareceram afetar de maneira tão significativa os VOCs, sendo que o mesmo ocorreu para *Codium tomentosum* (CT) e *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (LU). Enquanto a amostra salgada de *F. vesiculosus* (FV_SALT) foi aquela que mais se distanciou do controlo (FV_FRESH), em *C. tomentosum* os três tratamentos (DRY, LYO e SALT) pareceram afastar-se de forma equidistante da alga fresca (CT_FRESH), havendo ainda uma sobreposição desses tratamentos. Finalmente, em *C. teedei* var. *lusitanicus*, a amostra seca (LU_DRY) destacou-se não somente do controlo (LU_FRESH), como também dos tratamentos de salga (LU_SALT) e liofilização (LU_LYO), sendo que estas duas últimas técnicas de conservação estavam muito próximas da alga fresca, com destaque para a amostra salgada.

3.3.1.1 *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae)

[illegible]

92

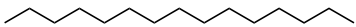
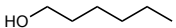
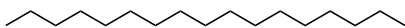
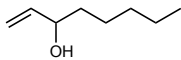
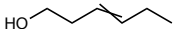
Na **Figura 3.4A**, as variáveis (VOCs), mostradas a vermelho, estão concentradas perto do ponto de origem de PC-1, com uma dispersão significativa ao longo do eixo PC-2. Isto pode indicar que a maioria dos VOCs apresentou um padrão consistente entre as diferentes amostras, com algumas variações mais acentuadas em função do tratamento aplicado, o que foi capturado pelo PC-2.

As variáveis que estão próximas de UP_SALT podem ser VOCs que são influenciados pela salinidade ou desidratação osmótica; aquelas próximas de UP_DRY devem ser as mais afetadas pelo calor e consequente diminuição do teor de água; os VOCs relacionados com UP_LYO podem ter sofrido alterações pela atmosfera em vácuo (diminuição) ou até mesmo pela concentração dos analitos (aumento), enquanto aqueles que estão próximos de UP_FRESH podem ser VOCs que são predominantes ou exclusivos da alga em seu estado fresco. O pentadecano (código 629629), localizou-se distante do cluster central, situando-se mais próximo de UP_DRY e UP_LYO, o que deve indicar que este composto é excecionalmente afetado por estas técnicas de conservação.

De facto, ao observar-se a **Tabela 3.4**, é possível notar que a secagem, seguida da liofilização, são os tratamentos que mais aumentaram a concentração de pentadecano em relação ao controlo, possivelmente por concentração. Em sentido oposto, há o heptadecano (código 629787) que diminuiu com os 3 tratamentos e com mais intensidade em UP_SALT e UP_LYO. Apesar da grande variação desses hidrocarbonetos, especialmente do pentadecano, com odor suave e quase inodoro, o seu impacto no perfil de aroma de *U. pinnatifida* parece ser negligenciável devido a sua baixa volatilidade e aos elevados limiares de odor dos hidrocarbonetos saturados de cadeia longa, conforme foi discutido no **Capítulo 2**.

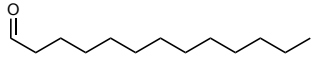
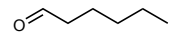
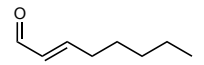
Os álcoois 1-hexanol (código 111273) e um dos isómeros de 3-hexen-1-ol (código 544127) apresentaram comportamentos semelhantes com pouca variação observada de UP_DRY e UP_LYO e um aumento considerável de UP_SALT em relação a UP_FRESH. Em contrapartida, o 1-octen-3-ol (código 3391864), um álcool que possui aroma semelhante ao de cogumelos, não pareceu alterar-se muito com a salga, enquanto UP_DRY e UP_LYO apresentaram uma redução considerável. Além disso, 1-hexanol e 3-hexen-1-ol apresentam limiares de odor relativamente altos (1.410 e 850 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respetivamente), enquanto 1-octen-3-ol possui um limiar de 8,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e parece contribuir de maneira mais relevante para o perfil de aroma de *U. pinnatifida*.

Tabela 3.4 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de *U. pinnatifida* de acordo com a PCA

Compostos	Estrutura ²⁰	Descritores ²¹	Fresca	Seca	Liofilizada	Salgada
Pentadecano CAS# 629-62-9 Limiar de odor: N/A	 $C_{15}H_{32}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).*	5,98%	66,94%	29,40%	20,07%
1-Hexanol CAS# 111-27-3 Limiar de odor: 1.410 µg/kg	 $C_6H_{14}O$	Pungente, etéreo, óleo fusel, frutado e alcoólico, doce com uma nota de topo verde.	0,58%	0,32%	1,76%	7,81%
Heptadecano CAS# 629-78-7 Limiar de odor: N/A	 $C_{17}H_{36}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).*	8,44%	3,35%	0,60%	0,32%
1-Octen-3-ol CAS# 3391-86-4 Limiar de odor: 8,5 µg/kg	 $C_8H_{16}O$	Cogumelos, terroso, verde, oleoso, vegetal e fúngico.	9,67%	2,45%	4,50%	11,30%
3-Hexen-1-ol (isômero) CAS# 544-12-7 Limiar de odor: 850 µg/kg	 $C_6H_{12}O$	Verde, folhoso.	0,45%	0,05%	0,30%	3,25%

²⁰ Criado em ChemDraw 22.2.0.

²¹ Referências: The Good Scents Company [94]; Anselmi *et al.* [138] para os hidrocarbonetos saturados.

Tridecanal CAS# 10486-19-8 Limiar de odor: 40 µg/kg	 $C_{13}H_{26}O$	Fresco, limpo, aldeídico, ceroso, com notas que lembram a sabão, flor de citrinos e casca de toranja.	6,07%	0,15%	6,70%	1,62%
Hexanal CAS# 66-25-1 Limiar de odor: 30 µg/kg	 $C_6H_{12}O$	Verde, gorduroso, folhoso, vegetal, frutado e limpo com nuances amadeiradas.	3,35%	0,84%	5,48%	0,61%
(2E)- Octenal CAS# 2548-87-0 Limiar de odor: 3,5 µg/kg	 $C_8H_{14}O$	Fresco, pepino, gorduroso, verde, herbal, banana, ceroso, folhoso.	2,85%	0,48%	1,19%	3,77%

Em relação aos aldeídos, a PCA destacou os VOCs tridecanal (código 10486198), hexanal (código 66251) e (2E)-octenal (código 2548870), todos com limiares de odor baixos, em particular, no caso deste último composto. Destaca-se ainda UP_DRY que parece perder (por evaporação) grande parte desses VOCs, enquanto os demais tratamentos possuem efeitos ambíguos.

Essas informações são úteis para compreender como diferentes métodos de processamento podem afetar o perfil de compostos voláteis em algas, o que por sua vez pode influenciar o sabor, o aroma e, potencialmente, as propriedades nutricionais do produto final.

Nota-se que o processamento por secagem tende a concentrar o pentadecano significativamente, enquanto o processamento por salga parece concentrar o 1-hexanol e o 3-hexen-1-ol (isômero). A liofilização, por outro lado, parece preservar uma variedade mais ampla de compostos em comparação com os demais tratamentos, seguida da salga.

3.3.1.2 *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae)

Para *F. vesiculosus*, os VOCs que parecem explicar melhor as variações no perfil de aroma foram evidenciados pela PCA (**Figura 3.5A e B**) e estão listados na **Tabela 3.5**. Na **Figura 3.5A**, é possível observar que o eixo horizontal (PC-1) captura 84% da variação nos dados, o que indica que a maior parte das diferenças entre as amostras é explicada por este componente. O eixo vertical (PC-2) representa apenas 11% da variação, fazendo com que ambas as componentes da PCA consigam explicar conjuntamente 95% da variação total nos VOCs.

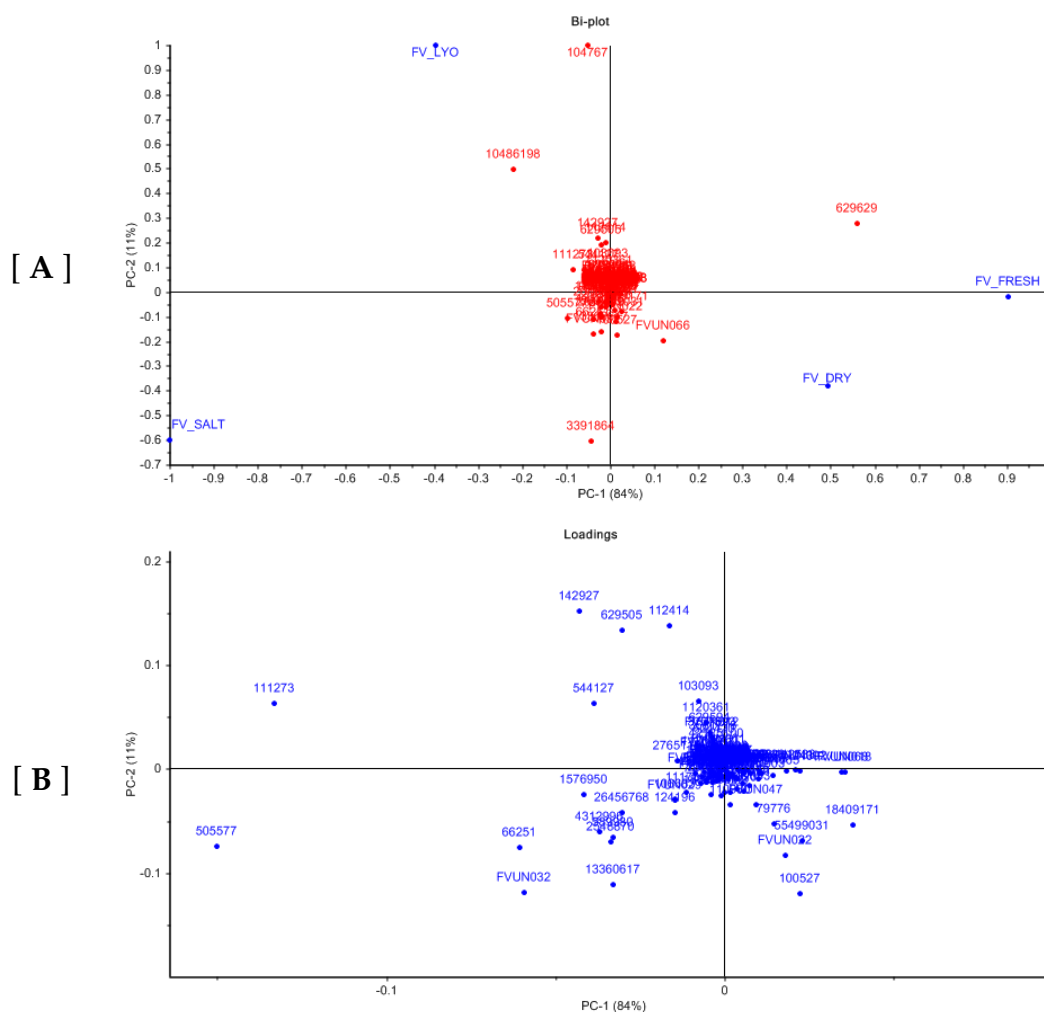


Figura 3.5 PCA da alga *F. vesiculosus*: [**A**] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [**B**] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).

O distanciamento dos 3 tratamentos em quadrantes distintos parece implicar uma alteração importante ao nível dos VOCs, com a secagem sendo o processamento que menos impactou no perfil de aroma em relação ao controlo. Há alguns pontos dispersos (variáveis) mais afastados, como aqueles codificados com 629629, 104767, 3391864 e 1048618, que representam pentadecano, 2-etil-1-hexanol, 1-octen-3-ol e

tridecanal, respetivamente, e são altamente influenciados por um ou mais métodos de tratamento.

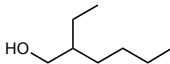
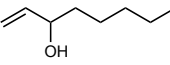
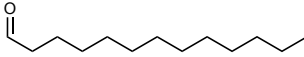
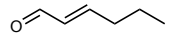
Ao olhar para **Tabela 3.5**, nota-se que o pentadecano se destaca como o composto presente em maior abundância, com uma ampla margem frente aos demais. Além disso, salienta-se que na PCA quanto mais distante os tratamentos se encontram do pentadecano, maior é a diminuição observada na concentração: de 83,586% para 80,094% em FV_DRY, para 74,691% em FV_LYO e para 69,230% em FV_SALT. Quanto aos demais hidrocarbonetos destacados, 1-dodeceno e tridecano, ambos foram identificados somente nas amostras liofilizadas, sendo que o hidrocarboneto saturado também foi encontrado em baixa concentração (0,215%) na amostra salgada e não foi detetado em FV_FRESH e FV_DRY.

O 2-etil-1-hexanol teve sua maior presença na amostra liofilizada (4,036%) e foi notado na amostra salgada (0,142%) numa concentração próxima à do controlo (0,160%), ao passo que o 1-octen-3-ol apresentou o comportamento oposto, isto é, foi mais abundante na amostra salgada (4,933%) e menos na liofilizada (2,228%). O 1-hexanol, também presente em *U. pinnatifida*, apresentou o mesmo comportamento observado anteriormente, não sendo detetado em FV_DRY.

Relativamente aos aldeídos tridecanal e (2E)-hexenal, ambos seguiram a mesma tendência de diminuir para cerca da metade nas amostras secas, possivelmente por evaporação, e de aumentar consideravelmente nas algas liofilizadas e salgadas, especialmente no caso do tridecanal (de 0,258% em FV_FRESH para 4,816% e 4,757%, respetivamente).

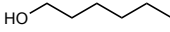
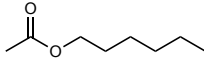
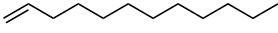
O acetato de hexilo só foi detetado nas amostras liofilizada (1,066%) e salgada (0,367%). Este éster de aroma verde, frutado e doce, com notas de banana, maçã e pera, possui um limiar de odor bastante baixo (0,08 µg/kg), o que leva a crer que este pode ter alguma participação no perfil das amostras onde foi detetado, especialmente no caso da alga liofilizada.

Tabela 3.5 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de *F. vesiculosus* de acordo com a PCA

Compostos	Estrutura ²²	Descritores ²³	Fresca	Seca	Liofilizada	Salgada
Pentadecano CAS# 629-62-9 Limiar de odor: N/A	 $C_{15}H_{32}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	83,586%	80,094%	74,691%	69,230%
1-Hexanol, 2-etil CAS# 104-76-7 Limiar de odor: 732,5 µg/kg	 $C_8H_{18}O$	Cítrico, fresco, floral, oleoso e doce.	0,160%	0,302%	4,036%	0,142%
1-Octen-3-ol CAS# 3391-86-4 Limiar de odor: 8,5 µg/kg	 $C_8H_{16}O$	Cogumelos, terroso, verde, oleoso, vegetal e fúngico.	2,866%	3,987%	2,228%	4,933%
Tridecanal CAS# 10486-19-8 Limiar de odor: 40 µg/kg	 $C_{13}H_{26}O$	Fresco, limpo, aldeídico, ceroso, com notas que lembram a sabão, flor de citrinos e casca de toranja.	0,258%	0,112%	4,816%	4,757%
(2E)- Hexenal CAS# 6728-26-3 Limiar de odor: 88,7 µg/kg	 $C_6H_{10}O$	Pungente e penetrante, verde, folhoso, fresco, limpo, frutado com nuances herbais e picantes.	1,772%	0,815%	2,261%	3,875%

²² Criado em ChemDraw 22.2.0.

²³ Referências: The Good Scents Company [94]; Yeh *et al.* [388] para “1-Dodeceno”; Anselmi *et al.* [138] para os hidrocarbonetos saturados.

1-Hexanol CAS# 111-27-3 Limiar de odor: 1.410 µg/kg	 $C_6H_{14}O$	Pungente, etéreo, óleo fusel, frutado e alcoólico, doce com uma nota de topo verde.	0,487%	N/D	1,699%	2,223%
Acetato de hexilo CAS# 142-92-7 Limiar de odor: 0,08 µg/kg	 $C_8H_{16}O_2$	Verde, frutado, doce, gorduroso, fresco, com notas de banana, maçã e pera.	N/D	N/D	1,066%	0,367%
1-Dodeceno CAS# 112-41-4 Limiar de odor: N/A	 $C_{12}H_{24}$	Aroma suave e agradável que lembra a plástico.	N/D	N/D	0,766%	N/D
Tridecano CAS# 629-50-5 Limiar de odor: 42 µg/kg	 $C_{13}H_{28}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	N/D	N/D	0,870%	0,215%

Através desses dados, é possível notar que a salga parece concentrar uma gama mais diversa de compostos – com aromas mais intensos, tais como 1-octen-3-ol, tridecanal e (2E)-hexenal – seguida da liofilização que foi responsável ainda pelo aparecimento de três compostos não detectados no controlo (talvez pela sua baixa concentração inicial). Isso pode ser devido à remoção de água por osmose ou a sua sublimação em condições de vácuo e baixa temperatura, o que pode preservar ou até mesmo concentrar certos compostos voláteis. Pelo resultado da PCA a técnica de secagem parece ser a que melhor preserva as características originais de *F. vesiculosus*, mesmo que, em alguns casos, certos compostos aumentem por concentração, enquanto, em outros casos, estes reduzam para cerca de metade do valor inicial, possivelmente devido à natureza térmica do processamento.

3.3.1.3 *Codium tomentosum* (Chlorophyta)

Para *C. tomentosum*, os VOCs que parecem explicar melhor as variações no perfil de aroma foram destacados pela PCA (**Figura 3.6A e B**) e estão listados na **Tabela 3.6**. Analisando-se a **Figura 3.6A**, pode-se perceber que o PC-1 representa 82% da variação dos dados, enquanto o PC-2 representa apenas 16%, fazendo com que o modelo, no total, explique 98% da variação identificada.

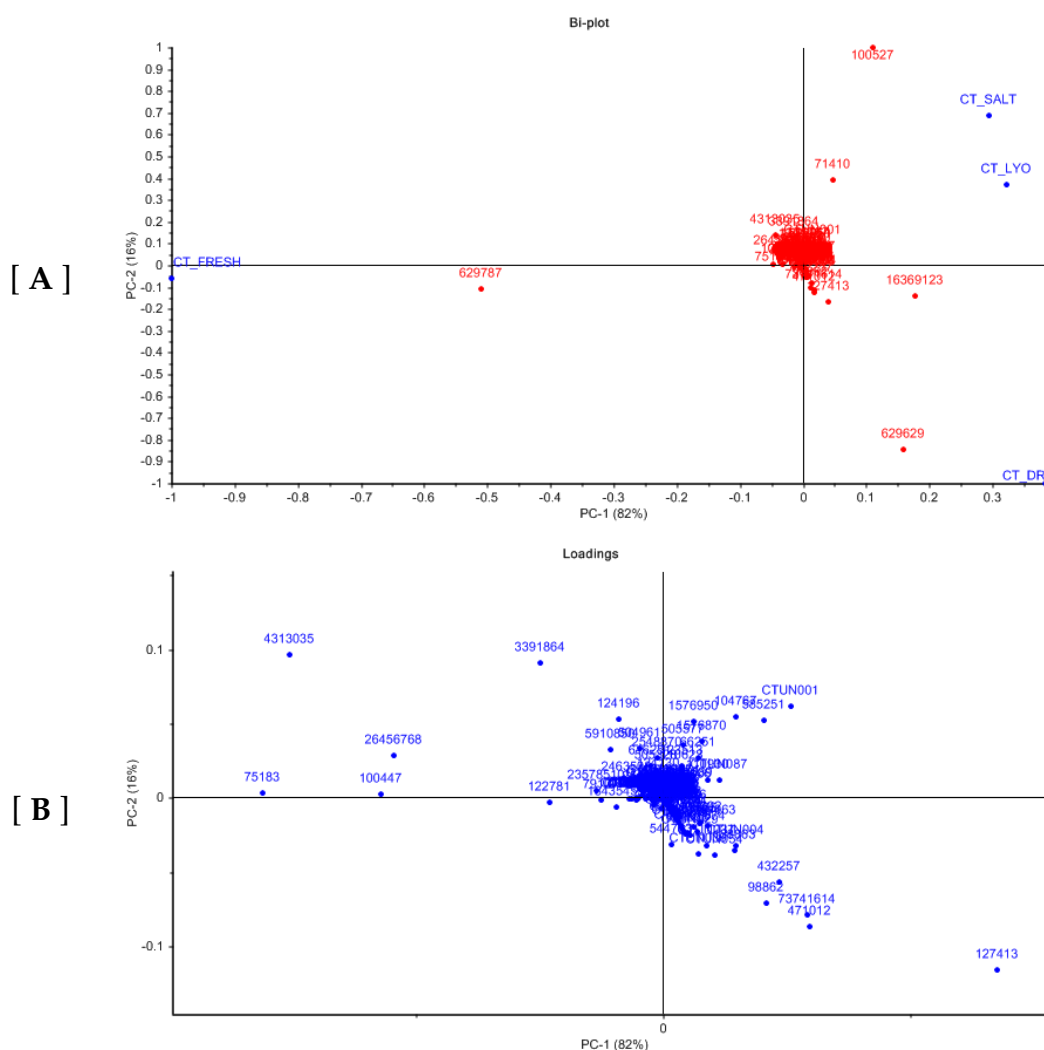


Figura 3.6 PCA da alga *C. tomentosum*: [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).

Na mesma figura é ainda possível notar que a amostra CT_FRESH aparece isoladamente no canto esquerdo, entre os 3º e 4º quadrantes, o que implica que grande parte da variação capturada pelo PC-1 parece advir das diferenças entre o controle e os demais tratamentos, indiscriminadamente. Além disso, tanto o heptadecano (código 629787) quanto o isômero de 8-heptadeceno (código 16369123) parecem ser os compostos responsáveis por tais modificações detetadas. O PC-2 parece ter

desempenhado um papel na discriminação do impacto das três diferentes técnicas de conservação ao longo do eixo de Y, sendo que os compostos benzaldeído (código 100527), 1-pentanol (código 71410) e pentadecano (código 629629) parecem relacionar-se com os tratamentos CT_SALT, CT_LYO e CT_DRY, respetivamente.

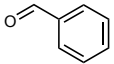
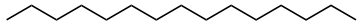
Observando-se a **Tabela 3.6**, no grupo dos hidrocarbonetos, destacam-se os compostos heptadecano, pentadecano e 8-heptadeceno (isómero 1). À medida que o heptadecano diminuiu a sua concentração nas amostras tratadas com técnicas de conservação, o pentadecano e o 8-heptadeceno moveram-se em sentido contrário, crescendo nas amostras tratadas. Salienta-se ainda que as concentrações de hidrocarbonetos nas amostras processadas assemelha-se para o heptadecano e o 8-heptadeceno, enquanto o pentadecano mostrou um crescimento ligeiramente mais expressivo em CT_DRY, o que deve explicar o facto do PC-2 ter associado este tratamento ao composto. Assim sendo, apesar da variação nesses compostos explicar as diferenças notadas na PCA, na prática parece que esses compostos mais uma vez não devem ter impactado de forma tão categórica no perfil de aroma de *C. tomentosum* dado que eles possuem odores suaves que mais se assemelham a *off-flavors* [147].

Em relação aos álcoois, enquanto o 1-pentanol aumentou nas amostras processadas, 1-octen-3-ol diminuiu em CT_DRY e CT_LYO, crescendo moderadamente em CT_SALT apenas. O posicionamento de 1-pentanol, próximo aos tratamentos de secagem e liofilização, deve ter ocorrido pelo facto deste ter aumentado com mais intensidade nessas amostras.

Em relação aos aldeídos, observou-se que o benzaldeído se manteve estável em CT_DRY, enquanto cresceu substancialmente nas demais amostras (CT_LYO e CT_SALT). Já o (2*E*,4*E*)-heptadienal decresceu em concentração em todas as amostras processadas, com menor intensidade em CT_SALT (de 1,516% para 1,210%) e com maior expressão em CT_DRY (0,159%) e CT_LYO (0,179%). Conforme foi visto no **Capítulo 2**, os isómeros de 2,4-heptadienal, devido ao seu baixo limiar de odor (de 56 µg/kg para o caso de (2*E*,4*E*)-heptadienal), parecem ser os compostos que mais contribuem para o aroma das algas verdes estudadas, com suas notas verdes, frutadas, pungentes e condimentadas.

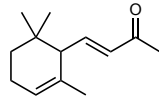
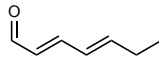
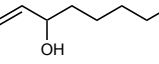
Por fim, a α -ionona, que é um composto característico das algas marinhas, cresceu consideravelmente nas amostras secas e liofilizadas. Sabe-se que é normal encontrar concentrações mais altas de algumas iononas em alimentos processados, devido à degradação sofrida pelos carotenoides que dá origem a este e outros compostos tais como β -ionona, dihidroactinidiolida, sulcatona, etc. [25], [229]. A α -ionona, devido ao seu baixo limiar de odor (4,64 µg/kg), deve contribuir de maneira significativa para o aroma da alga *C. tomentosum* processada.

Tabela 3.6 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de *C. tomentosum* de acordo com a PCA

Compostos	Estrutura ²⁴	Descritores ²⁵	Fresca	Seca	Liofilizada	Salgada
Heptadecano CAS# 629-78-7 Limiar de odor: N/A	 $C_{17}H_{36}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	69,925%	57,793%	57,899%	58,086%
Benzaldeído CAS# 100-52-7 Limiar de odor: 550 µg/kg	 C_8H_8O	Forte, pungente, doce, amêndoa amarga, cereja.	1,758%	1,721%	5,525%	6,435%
Pentadecano CAS# 629-62-9 Limiar de odor: N/A	 $C_{15}H_{32}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	4,081%	10,290%	6,523%	6,064%
8-Heptadeceno (isômero 1) CAS# 16369-12-3 Limiar de odor: N/A	 $C_{17}H_{34}$	Terroso, musgo.	10,924%	15,648%	14,764%	14,766%
1-Pentanol CAS# 71-41-0 Limiar de odor: 2.850 µg/kg	 $C_5H_{12}O$	Pungente, fermentado, com notas que lembram a pão, levedura, fusel e vinho, semelhante a solvente.	0,794%	0,891%	2,265%	2,786%

²⁴ Criado em ChemDraw 22.2.0.

²⁵ Referências: The Good Scents Company [94]; Selli *et al.* [147] para “8-heptadeceno”; Anselmi *et al.* [138] para os hidrocarbonetos saturados.

α-Ionona CAS# 127-41-3 Limiar de odor: 4,64 $\mu\text{g/kg}$	 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}$	Doce, amadeirado, floral, violeta, orris ou lírio, tropical, frutado com notas de framboesa, amora, mirtilo, etc.	0,379%	1,725%	1,419%	0,643%
(2E,4E)- Heptadienal CAS# 4313-03-5 Limiar de odor: 56 $\mu\text{g/kg}$	 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}$	Gorduroso, verde, oleoso, aldeídico com uma nuance vegetativa e notas de especiarias.	1,516%	0,159%	0,179%	1,210%
1-Octen-3-ol CAS# 3391-86-4 Limiar de odor: 8,5 $\mu\text{g/kg}$	 $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$	Cogumelos, terroso, verde, oleoso, vegetal e fúngico.	1,040%	0,386%	0,597%	1,216%

Com base no que foi apresentado na **Figura 3.3**, a alga *C. tomentosum* pareceu ser uma das algas marinhas menos afetadas pelos tratamentos aplicados. No entanto, ao analisar com maior detalhe o PCA da alga em separado (**Figura 3.6A e B**) percebe-se que em muitos casos a liofilização e a salga tendem a mover-se na mesma direção e a aumentar a participação, em concentrações equivalentes, de compostos com aromas mais suaves tais como o pentadecano, o 8-heptadeceno (isômero 1), o 1-pentanol e o benzaldeído. No entanto, a secagem parece ser menos discriminatória, possuindo efeitos diversos consoantes os VOCs investigados. Naqueles compostos com aromas mais fortes e distintos (menor limiar de odor), tais como α -ionona, (2E,4E)-heptadienal e 1-octen-3-ol, foi observado que a técnica de salga parece ser a que melhor preserva esses VOCs num patamar relativamente próximo da alga fresca. Dessa forma, a salga acaba por de destacar como sendo a melhor técnica para conservação de *C. tomentosum*.

3.3.1.4 *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Rhodophyta)

Para *C. teedei* var. *lusitanicus*, os VOCs que parecem explicar melhor as variações no perfil de aroma foram salientados pela PCA (**Figura 3.7A e B**) e estão listados na **Tabela 3.8**. Examinando-se a **Figura 3.7A**, é evidente que o PC-1 explica uma grande parcela da variação, com 88%, enquanto o PC-2 explica 11% da variação. Somados, ambos os componentes descrevem 99% da variação total dos dados.

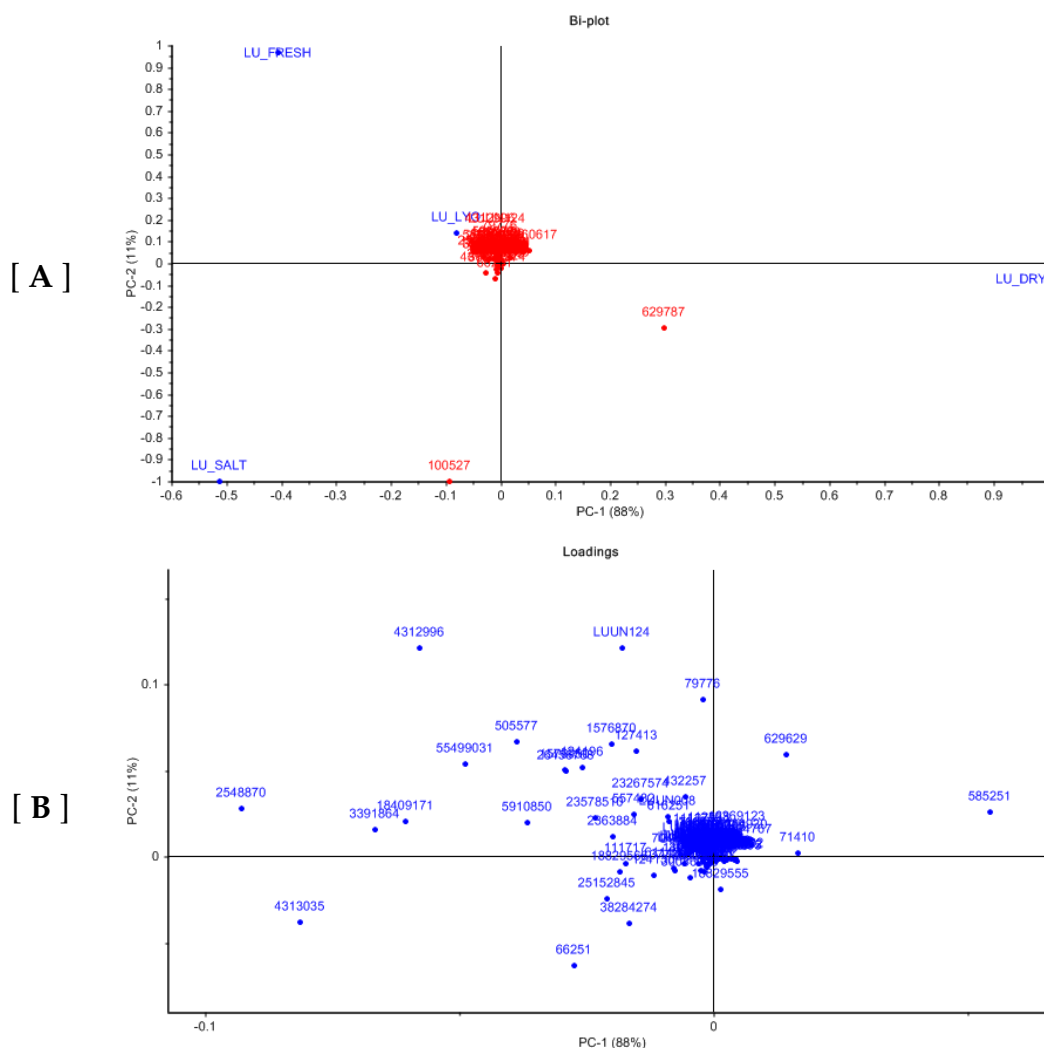


Figura 3.7 PCA da alga *C. teedei* var. *lusitanicus*: [**A**] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [**B**] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).

No gráfico *bi-plot* da PCA, também se pode observar que LU_FRESH e LU_SALT estão em extremos opostos no eixo PC-1, em relação a LU_DRY, enquanto LU_LYO localiza-se no centro do gráfico, bastante próxima da origem do plano cartesiano. O PC-1 parece explicar a variação entre o controlo e as amostras seca e liofilizada, ao passo que o PC-2 consegue discriminar as diferenças entre as amostras fresca e

salgada. Adicionalmente, parece que o heptadecano (código 629787) e o benzaldeído (código 100527) são os principais compostos responsáveis pelas alterações evidenciadas.

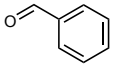
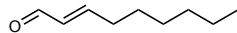
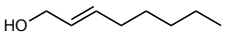
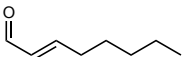
Ao mesmo tempo em que o heptadecano aumentou em todas as amostras tratadas, o 1-pentadeceno diminuiu em LU_SALT e aumentou em LU_DRY e LU_LYO. Além disso, ambos os hidrocarbonetos cresceram de maneira mais intensa nas amostras desidratadas.

Em relação aos aldeídos, o benzaldeído mais uma vez aumentou na amostra liofilizada (em cerca de 50%) e, com maior intensidade, na amostra salgada (em mais de 3 vezes o valor inicial). Desta vez, porém, na amostra seca ele diminuiu de concentração em cerca de 40% (de 4,291% para 2,509%). O (2E)-octenal manteve-se relativamente estável em LU_SALT, aumentou ligeiramente em LU_LYO, ao mesmo tempo em que diminuiu em quase 50% em LU_DRY. Este último composto, dado o seu baixo limiar de odor (3,5 µg/kg), parece impactar com mais intensidade no perfil de VOCs da amostra desidratada.

A cetona 1-octen-3-ona possui um limiar de odor muito baixo (0,05 µg/kg), tendo atributos aromáticos que remetem a cogumelos e vegetais. Este composto diminuiu ligeiramente em todas as amostras processadas, com maior extensão em LU_DRY e menor em LU_LYO. Portanto, mais uma vez se percebe uma alteração importante nos VOCs que impactam no perfil de aroma de *C. teedei* var. *lusitanicus*, com predominância para o tratamento de secagem.

Os dados analisados indicam que os diferentes métodos de processamento parecem influenciar, significativamente, o perfil de compostos voláteis da alga marinha *C. teedei* var. *lusitanicus*. A secagem parece favorecer a concentração de compostos com aromas menos intensos como o heptadecano e o 1-pentadeceno, enquanto a salga e a liofilização aparentam intensificar compostos com aromas mais marcantes como o benzaldeído e o (2E)-octenal. Adicionalmente, outro composto relevante, a 1-octen-3-ona, diminuiu em todos os processamentos estudados. Dentre as técnicas de conservação avaliadas, a liofilização parece ser a que melhor conserva as propriedades de *C. teedei* var. *lusitanicus*, seguida da salga.

Tabela 3.7 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de *C. teedei* var. *lusitanicus* de acordo com a PCA

Compostos	Estrutura ²⁶	Descritores ²⁷	Fresca	Seca	Liofilizada	Salgada
Heptadecano CAS# 629-78-7 Limiar de odor: N/A	 $C_{17}H_{36}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	40,965%	63,925%	46,983%	41,969%
Benzaldeído CAS# 100-52-7 Limiar de odor: 550 µg/kg	 C_8H_8O	Forte, pungente, doce, amêndoa amarga, cereja.	4,291%	2,509%	6,568%	13,740%
1-Pentadeceno CAS# 13360-61-7 Limiar de odor: 3.600 µg/kg	 $C_{15}H_{30}$	Fraco, ligeiramente gorduroso e floral.	2,161%	5,833%	3,778%	1,445%
1-Octen-3-ona CAS# 4312-99-6 Limiar de odor: 0,05 µg/kg	 $C_8H_{14}O$	Terroso intenso, metálico, com aroma de cogumelos e nuances vegetais de repolho e brócolos.	2,464%	0,504%	1,928%	1,416%
(2E)-Octenal CAS# 2548-87-0 Limiar de odor: 3,5 µg/kg	 $C_8H_{14}O$	Fresco, pepino, gorduroso, verde, herbal, banana, ceroso, folhoso.	4,878%	2,754%	5,638%	4,939%

²⁶ Criado em ChemDraw 22.2.0.

²⁷ Referências: The Good Scents Company [94]; Jirovetz *et al.* [389] para “1-Pentadeceno”; Anselmi *et al.* [138] para os hidrocarbonetos saturados.

3.3.1.5 *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta)

Os VOCs, destacados pela PCA, que parecem explicar melhor as variações no perfil de aroma de *G. Gracilis*, encontram-se representados nas **Figuras 3.8A e B**, sendo também listados na **Tabela 3.9**. O gráfico *bi-plot* (**Figura 3.8A**) evidenciou que o PC-1 responde por 87% da variação nos dados, à medida que o PC-2 foi responsável por apenas 11% dessa variação. Conjuntamente, ambas as componentes principais, explicaram 98% da variabilidade observada.

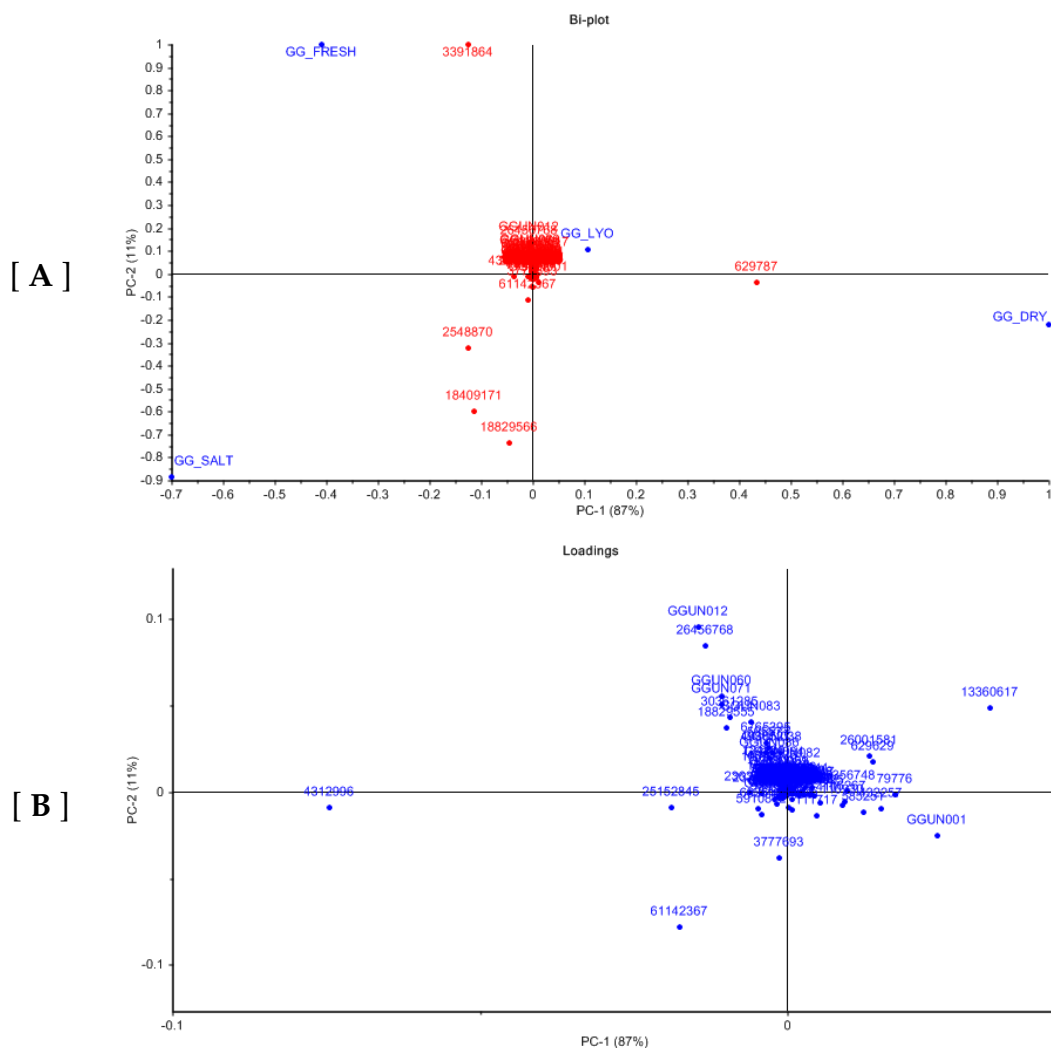
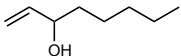
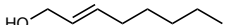
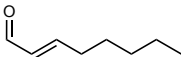


Figura 3.8 PCA da alga para *G. gracilis*: [A] Gráfico bi-plot de PC-1 vs. PC-2 contendo os scores e loadings; [B] Gráfico de loadings das variáveis de PC-1 vs. PC-2 (zoom).

Tabela 3.8 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de *G. gracilis* de acordo com a PCA

Compostos	Estrutura ²⁸	Descritores ²⁹	Fresca	Seca	Liofilizada	Salgada
Heptadecano CAS# 629-78-7 Limiar de odor: N/A	 $C_{17}H_{36}$	Aroma suave, quase inodoro, que lembra a combustível (gasolina, querosene, etc.).	13,632%	48,358%	25,098%	6,774%
1-Octen-3-ol CAS# 3391-86-4 Limiar de odor: 8,5 µg/kg	 $C_8H_{16}O$	Cogumelos, terroso, verde, oleoso, vegetal e fúngico.	30,806%	13,093%	20,917%	20,779%
(2E)-Nonenal CAS# 18829-56-6 Limiar de odor: 0,15 µg/kg	 $C_9H_{16}O$	Verde, pepino, aldeídico, gorduroso com uma nuance cítrica.	2,365%	4,478%	5,479%	11,994%
(2E)-Octen-1-ol CAS# 18409-17-1 Limiar de odor: 40 µg/kg	 $C_8H_{16}O$	Verde, cítrico, vegetal, gorduroso.	10,112%	5,724%	11,801%	19,338%
(2E)-Octenal CAS# 2548-87-0 Limiar de odor: 3,5 µg/kg	 $C_8H_{14}O$	Fresco, pepino, gorduroso, verde, herbal, banana, ceroso, folhoso.	14,862%	7,608%	8,501%	20,227%

²⁸ Criado em ChemDraw 22.2.0.

²⁹ Referências: The Good Scents Company [94]; Anselmi *et al.* [138] para os hidrocarbonetos saturados.

A disposição do controlo, em relação aos tratamentos, é muito parecida com aquela observada em *C. teedei* var. *lusitanicus*. Em relação aos principais compostos responsáveis pelas variações observadas, destacam-se mais uma vez o heptadecano (código 629787) no eixo de X (PC-1), o 1-octen-3-ol (código 3391864), o (2E)-nonenal (código 18829566), o (2E)-octen-1-ol (código 18409171) e o (2E)-octenal (código 2548870) na direção do eixo de Y (PC-2).

Surpreendentemente, o heptadecano presente em *G. gracilis* comportou-se de maneira menos previsível, conforme as técnicas de conservação aplicadas: a sua concentração aumentou cerca de 3,5 vezes em GG_DRY, quase que dobrou em GG_LYO e caiu praticamente pela metade GG_SALT, comparativamente ao controlo (GG_FRESH).

Em relação aos álcoois, o 1-octen-3-ol possuiu uma maior concentração na amostra fresca (30,806%), indicando que esse composto é bastante volátil e pode ser reduzido, de forma mais acentuada, durante o processo de secagem (13,093%) e, de maneira menos pronunciada, através dos processamentos por liofilização (20,917%) e salga (20,779%). O (2E)-octen-1-ol manteve-se relativamente estável em GG_LYO (11,801%), o que parece explicar a sua proximidade com este tratamento no gráfico *bi-plot*, ao passo que caiu quase pela metade em GG_DRY (5,724%) e, praticamente, dobrou de concentração em GG_SALT (19,338%).

A respeito dos aldeídos, por um lado, o (2E)-nonenal aumentou consideravelmente com todos os processamentos (de 2,365% no controlo, para 4,478%, 5,479% e 11,994% nos tratamentos GG_DRY, GG_LYO e GG_SALT, respetivamente). Por outro lado, o (2E)-octenal aumentou somente na amostra salgada, de 14,862% na alga fresca para 20,227%, enquanto a secagem reduziu sua concentração em aproximadamente 50% e a liofilização em cerca de 40%.

Com base nesses dados, pode-se notar que o processamento por secagem tende a concentrar compostos, com aromas mais suaves e menos voláteis, como o heptadecano. No entanto, compostos com aromas mais fortes e distintos, como o (2E)-nonenal, o (2E)-octenal e o (2E)-octen-1-ol, são mais concentrados nos processos de liofilização e salga, com destaque para esta última técnica de conservação. Por fim, a presença maior de 1-octen-3-ol na amostra fresca sugere que o composto – característico das algas vermelhas e que contribui com um aroma terroso e de cogumelos – é mais sensível aos processamentos do que os outros VOCs mencionados.

3.3.1.6 Discussão dos Resultados

A **Tabela 3.9** resume os resultados dos principais VOCs, agrupados por grupos funcionais, responsáveis pela variação nas amostras processadas por técnicas convencionais de conservação para todas as algas estudadas.

Se, por um lado, o acréscimo na concentração de alguns compostos pode ser explicada pela remoção de parte da humidade, pelas técnicas de conservação, já que, mesmo que as amostras tenham sido reidratadas para o ensaio, a capacidade de retenção de água (WHC) acaba por diminuir com os processamentos devido às alterações que ocorrem na sua estrutura celular [39], por outro lado, a diminuição nas concentrações parece advir de perdas de voláteis pelo calor nas algas desidratadas, da sublimação de compostos voláteis por vácuo na liofilização e, em menor escala, pelo efeito *salting-out* da salga que diminui a solubilidade dos compostos voláteis, que são naturalmente pouco polares [32], [230], [231]. Dessa forma, os efeitos dos tratamentos sobre alguns VOCs acabam por ser ambíguos como podemos perceber em compostos como o tridecanal ou o (2E)-octenal.

No entanto, muitas das alterações parecem ter a sua origem também em fenómenos bioquímicos, ao invés de meramente físicos. Mirzayeva *et al.* [232], em seu estudo realizado em 31 amostras de algas marinhas analisadas por GC-MS, revelaram que quatro fatores principais – época de coleta, localização geográfica, espécie e método de pré-tratamento – influenciam os perfis de VOCs em algas marinhas. Dentre esses fatores, a época de coleta emergiu como o mais significativo, com a primavera e a região sul de Espanha apresentando as menores concentrações desses compostos. Análises de PCA identificaram que a β -ionona, a 6-metil-5-hepten-2-ona, o benzaldeído, e certos ácidos variaram consideravelmente em função da temporada, sendo mais abundantes em amostras colhidas no outono. Entre os fatores analisados por estes autores, o método de pré-tratamento das amostras (frescas, salgadas ou desidratadas) mostrou-se como o de menor impacto nos perfis de compostos voláteis das macroalgas.

Provavelmente, não é por acaso que a β -ionona, a 6-metil-5-hepten-2-ona e o benzaldeído tenham sido os VOCs mais afetados, considerando que, com o passar das estações, uma série de mudanças ocorrem nos fatores abióticos (radiação solar, temperatura, nutrientes, salinidade, etc.) [233]. Estes, por sua vez, acabam por afetar os organismos vivos que existem naquele ecossistema, o que inclui as macroalgas e a sua microbiota [234].

Tabela 3.9 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de todas as algas estudadas de acordo com a PCA

Grupo Funcional	Composto	CAS#	Algas	Fresca (CTRL)	Seca (DRY)	Δ DRY, CTRL	Liofilizada (LYO)	Δ LYO, CTRL	Salgada (SALT)	Δ SALT, CTRL
Hidrocarbonetos	Heptadecano	629-78-7	UP, CT, LU, GG	8,443% – 69,925%	3,346% – 63,925%	<, <, >, >	0,602% – 57,899%	<, <, >, >	0,316% – 58,086%	<, <, >, <
	8-Heptadeceno (isômero 1)	16369-12-3	CT	10,924%	15,648%	>	14,764%	>	14,766%	>
	Pentadecano	629-62-9	UP, FV, CT	4,081% – 83,586%	10,290% – 80,094%	>, <, >	6,523% – 74,691%	>, <, >	6,064% – 69,230%	>, <, >
	1-Pentadeceno	13360-61-7	LU	2,161%	5,833%	>	3,778%	>	1,445%	<
	Tridecano	629-50-5	FV	N/D	N/D	N/D	0,870%	>	0,215%	>
	1-Dodeceno	112-41-4	FV	N/D	N/D	N/D	0,766%	>	N/D	N/D
Álcoois	1-Pentanol	71-41-0	CT	0,794%	0,891%	>	2,265%	>	2,786%	>
	1-Octen-3-ol	3391-86-4	UP, FV, CT, GG	1,040% – 30,806%	0,386% – 13,093%	<, >, <, <	0,597% – 20,917%	<, <, <, <	1,216% – 20,779%	>, >, =, <
	2-Octen-1-ol, (E)-	18409-17-1	GG	10,112%	5,724%	<	11,801%	>	19,338%	>
	1-Hexanol	111-27-3	UP, FV	0,487% – 0,584%	0,000% – 0,320%	<, <	1,699% – 1,763%	>, >	2,223% – 7,813%	>, >
	1-Hexanol, 2-etil	104-76-7	FV	0,160%	0,302%	>	4,036%	>	0,142%	=
	3-Hexen-1-ol (isômero)	544-12-7	UP	0,447%	0,049%	<	0,295%	<	3,248%	>

Tabela 3.9 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras processadas de todas as algas estudadas de acordo com a PCA (continuação)

Grupo Funcional	Composto	CAS#	Algas	Fresca (CTRL)	Seca (DRY)	Δ DRY, CTRL	Liofilizada (LYO)	Δ LYO, CTRL	Salgada (SALT)	Δ SALT, CTRL
Aldeídos	Tridecanal	10486-19-8	UP, FV	0,258% – 6,066%	0,112% – 0,151%	<, =	4,816% – 6,701%	>, >	1,618% – 4,757%	<, >
	2-Nonenal, (E)-	18829-56-6	GG	2,365%	4,478%	>	5,479%	>	11,994%	>
	2-Octenal, (E)-	2548-87-0	UP, LU, GG	2,852% – 14,862%	0,484% – 7,608%	<, <, <	1,194% – 8,501%	<, >, <	3,773% – 20,227%	>, >, >
	Hexanal	66-25-1	UP	3,347%	0,845%	<	5,476%	>	0,612%	<
	2-Hexenal, (E)-	6728-26-3	FV	1,772%	0,815%	<	2,261%	>	3,875%	>
	2,4-Heptadienal, (E,E)-	4313-03-5	CT	1,516%	0,159%	<	0,179%	<	1,210%	<
	Benzaldeído	100-52-7	CT, LU	1,758% – 4,291%	1,721% – 2,509%	=, <	5,525% – 6,568%	>, >	6,435% – 13,740%	>, >
Cetonas	1-Octen-3-ona	4312-99-6	LU	2,464%	0,504%	<	1,928%	<	1,416%	<
	α -Ionona	127-41-3	CT	0,379%	1,725%	>	1,419%	>	0,643%	>
Ésteres	Acetato de hexilo	142-92-7	FV	N/D	N/D	N/D	1,066%	>	0,367%	>

Notas: $\Delta_{X, CTRL}$ é a variação de X em relação à alga fresca ou controlo (CTRL), onde X corresponde aos tratamentos de secagem (DRY), liofilização (LYO) ou salga (SALT) e os sinais >, < ou =, significam que as concentrações aumentaram, diminuíram ou permaneceram aproximadamente iguais, respetivamente. Estes sinais estão listados na mesma sequência das algas marinhas referenciadas na coluna “Algas”, onde foram usadas as abreviaturas: *U. pinnatifida* (UP), *F. vesiculosus* (FV), *C. tomentosum* (CT), *C. teedei* var. *lusitanicus* e *G. gracilis* (GG). As concentrações listadas representam o intervalo dos valores mínimos e máximos encontrados para o compostos em questão.

As α - e β -iononas, assim como a 6-metil-5-hepten-2-ona, são apocarotenoides, uma classe de produtos derivados da oxidação de carotenoides com alta diversidade estrutural e funcional. É comum que com a mudança de fatores, tais como um aumento da temperatura, haja reações de oxidação induzidas pelo calor ou stress abiótico. Consequentemente, esses VOCs são formados, se acumulando nos tecidos das algas, o que explica a sua mudança tanto nas algas coletadas no estudo supramencionado, como naquelas processadas no presente ensaio. Adicionalmente, em virtude dos tratamentos, danos podem ocorrer ao nível celular, promovendo a formação de ROS e libertando enzimas, que acabam por degradar carotenoides e promover o surgimento e acúmulo de alguns desses VOCs [133], [229].

Diferentemente da α -ionona que aumentou com os processamentos, uma outra cetona, a 1-octen-3-ona, apresentou redução nas amostras. Este composto ocorre com alguma frequência em algas vermelhas e castanhas, sendo também detetada em 4 das 5 algas estudadas (UP, CT, LU e GG) [67], [159], [165]. No entanto, a PCA detetou variações importantes para apenas LU_DRY, sendo o mais provável que a 1-octen-3-ona tenha sofrido perda exclusivamente por evaporação, já que não foram encontradas evidências metabólicas que justifiquem a sua alteração. Convém destacar que esta cetona deriva do ácido gordo eicosatetraenóico, da mesma forma que outras cetonas de cadeia alifática derivam de ácidos gordos PUFA's (por exemplo, a 1-penten-3-ona que resulta do ácido octadecatrienóico) [235].

Quanto ao benzaldeído, os efeitos das técnicas de secagem e liofilização variam conforme os estudos. Na alga vermelha *Bangia fuscopurpurea* (Rhodophyta), observa-se uma redução deste composto nas amostras secas, sendo a queda ainda mais acentuada nas liofilizadas [155]. Já na alga castanha *Alaria esculenta* (Phaeophyceae), há um aumento na presença do composto na amostra desidratada, comparativamente com aquela que foi liofilizada (não foi utilizado controlo) [29]. Por último, na microalga *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae), parece ocorrer o inverso, observando-se um acréscimo de 20% na concentração de benzaldeído na alga liofilizada e quase o triplo na alga seca, comparativamente com a alga fresca [236]. Nenhum desses resultados está totalmente em conformidade com as nossas descobertas.

Sánchez-García *et al.* [237] estudaram o efeito de diferentes métodos de cozimento sobre os compostos voláteis e as propriedades sensoriais de *Ulva rigida* (Chlorophyta) e seus achados revelam um aspeto interessante relativamente ao benzaldeído: tanto o tempo quanto a temperatura parecem afetar negativamente a concentração desse composto na alga marinha até certo ponto. Cozeduras mais curtas (até 10 min) e temperaturas mais amenas (até 70 °C) favoreceram a perda de

benzaldeído, entretanto, ao aumentar ainda mais o tempo (15 min) e a temperatura (100 °C), foi observado um aumento na concentração do composto.

Dentre os prováveis caminhos biossintéticos para formação de benzaldeído, aquele que parece ser mais consensual envolve a degradação de Strecker do aminoácido fenilalanina em fenilacetaldeído, que por sua vez é oxidado, formando este composto [238]. Conforme visto acima, a temperatura parece desempenhar um papel fundamental na degradação dos aminoácidos e na formação de benzaldeído. No entanto, mesmo na ausência de calor, outros fatores podem contribuir com essa degradação como, por exemplo, a atividade proteolítica, a presença de hidroperóxidos lipídicos e até mesmo uma fonte de stress mecânico [238]–[240]. Essa é uma justificativa razoável para o aumento da concentração de benzaldeído nas amostras liofilizadas e, em maior grau, nas salgadas, enquanto a sua redução nas algas secas possivelmente ocorreu como resultado da evaporação pelo calor.

Grande parte dos VOCs formados em algas marinhas e outros alimentos deriva da transformação de macronutrientes, conforme pode ser visualizado na **Figura 3.9**. Além disso, em alimentos oriundos do mar, é frequente que os compostos voláteis resultem da degradação de ácidos gordos, maioritariamente insaturados [25].

Os hidrocarbonetos podem ser produzidos a partir de ácidos gordos insaturados C_{20} , utilizando um caminho biossintético que inclui 9-hidroperóxidos, clivagem enzimática e rearranjo molecular [140]. Além disso, há estudos que destacam uma grande produção de 8-heptadeceno por algas verdes (*Bryopsis maxima*, Chlorophyta) e vermelhas (*Pyropia* sp., Rhodophyta); diferentemente de *Pyropia* sp. que produz normalmente esse composto, a alga *Bryopsis maxima* parece produzi-lo em situações em que sofre danos nos tecidos [140], [148]. Foi ainda constatado que, na alga vermelha, o 8-heptadeceno é um metabólito do ácido eicosapentaenóico e pode ser catalisado por enzimas tipo lipoxigenase, incluindo uma semelhante às enzimas heme, que são igualmente resistentes ao calor e podem manter 50% de atividade na faixa entre os 60 e 100 °C [148].

A **Tabela 3.9** mostra claramente a presença de hidrocarbonetos de cadeias mais longas ($\geq C_{12}$), que são menos voláteis e parecem se acumular na maioria das amostras processadas, excetuando-se situações onde eles se encontram presentes em altas concentrações no controle. O aumento desses compostos deve estar relacionado com a destruição de tecidos e um aumento na atividade enzimática durante o processamento, conforme foi discutido acima.

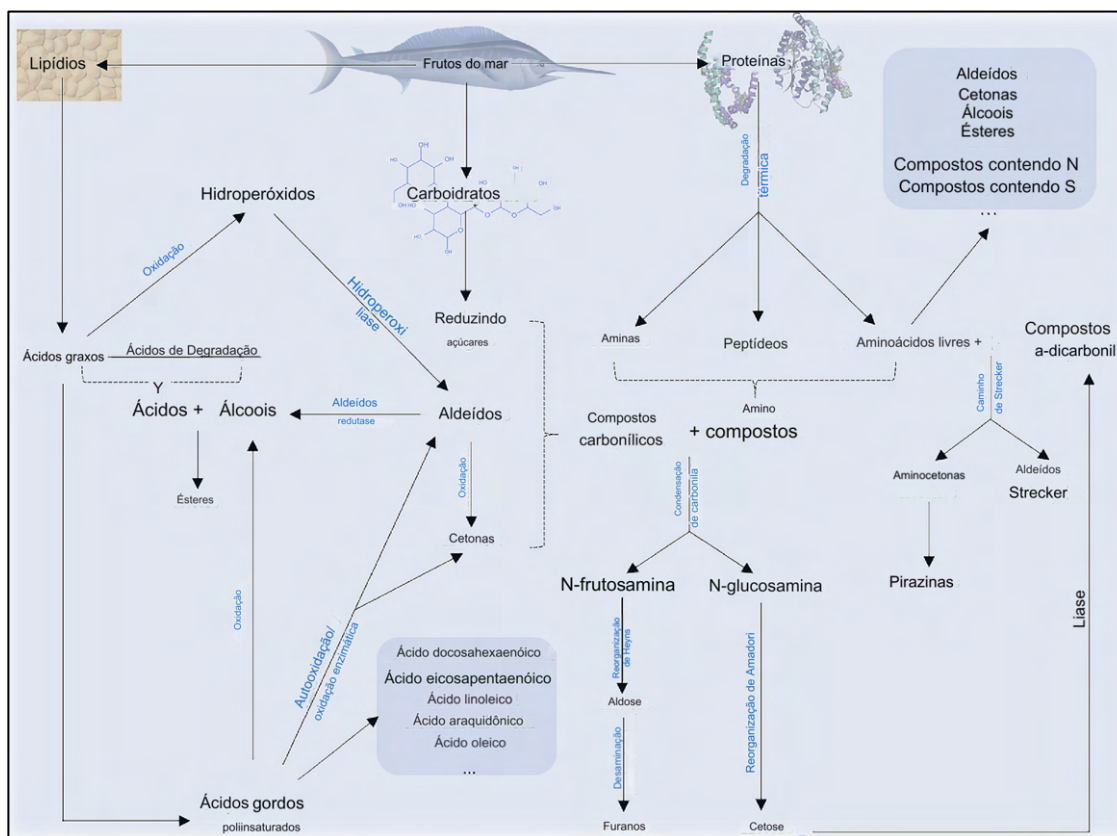


Figura 3.9 Esquema sobre a possível origem e alguns compostos em alimentos do mar
 Fonte: Adaptado de Tian, Huang & Qin [241]

Uma outra hipótese razoável, no que diz respeito à diminuição de alguns hidrocarbonetos, é a de que houve perda desses compostos com o processamento das algas marinhas. Além disso, algumas inconsistências nos resultados podem estar associadas às características do método de extração, usando fibras de HS-SPME. A adsorção na fibra ocorre de forma competitiva, onde moléculas, que possuem maior afinidade pelo polímero, podem deslocar aquelas com menor afinidade. Assim, a composição da amostra influencia, consideravelmente, a quantidade de compostos que são extraídos pela fibra [242].

Mirzayeva *et al.* [232], no seu estudo sobre a caracterização e diferenciação de algas marinhas com base na sua composição volátil, também verificaram que o heptadecano é o hidrocarboneto mais abundante na alga *Codium* sp., mas não exibiu os resultados relativos às técnicas de conservação aplicadas. O pentadecano também já foi detectado como sendo o hidrocarboneto prevalente em *U. pinnatifida* desidratada [165]. Ambos os resultados estão alinhados com as nossas descobertas. Wu *et al.* [243] fizeram uma avaliação comparativa dos VOCs de *Bangia fuscopurpurea* submetida à secagem com ar quente e liofilização, chegando a resultados diferentes daqueles observados no presente estudo: a quantidade de heptadecano diminui com os

tratamentos de secagem e liofilização, enquanto a de tridecano aumentou, com efeitos mais intensos sobre a alga desidratada. No nosso caso, foi notado um aumento do heptadecano nas algas vermelhas (LU e GG) e uma redução nas algas CT e FV, o que leva a crer que os efeitos dos tratamentos devem ser dependentes das espécies de algas marinhas estudadas.

Outros estudos destacam a ainda presença de 1-pentadeceno em três algas marinhas vermelhas: *Chondrus crispus*, *Osmundea pinnatifida* e *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) [75], [244], [245]. Relativamente ao composto 1-dodeceno, não foi possível encontrar estudos onde este foi detetado em algas marinhas, o que leva a crer que ele pode advir de uma potencial fonte de contaminação, seja ela microbiológica ou química, através da migração de compostos do polímero utilizado nas embalagens plásticas [246], [247].

Tabela 3.10 Principais reagentes e catalisadores de alguns VOCs presentes em macroalgas

Produtos	Reagentes	Catalisadores
1-Octen-3-ol CAS# 3391-86-4	Ácido araquidónico, ácido linoleico / PUFA's ω -6	12-Lipoxigenase
3-Hexen-1-ol (isómero) CAS# 544-12-7	Ácido eicosapentaenóico	15-Lipoxigenase
2-Hexenal, (E)- CAS# 6728-26-3	Ácido linoleico / PUFA's ω -3	15-Lipoxigenase
2-Nonenal, (E)- CAS# 18829-56-6	Ácido linoleico, ácido araquidónico	12-Lipoxigenase
2,4-Heptadienal, (E,E)- CAS# 4313-03-5	Ácido linoleico / PUFA's ω -3	12-Lipoxigenase / Autoxidação
Hexanal CAS# 66-25-1	Ácido linoleico / PUFA's ω -6	15-Lipoxigenase / Autoxidação

Fonte: Adaptado de Wu *et al.* [172]

Tanto os álcoois como os aldeídos costumam ser metabolizados em algas a partir de ácidos gordos insaturados, através de oxidação enzimática ou autoxidação [172]. No entanto, alguns álcoois também podem derivar de carboidratos, via glicólise, ou de aminoácidos através, da via de Ehrlich [165]. Na **Tabela 3.10**, é possível ver os principais reagentes e catalisadores das reações que formam alguns dos compostos destacados pela PCA:

Nos dois artigos de revisão mais recentes sobre VOCs em algas marinhas, foram listados todos os álcoois e aldeídos discutidos na presente secção, excetuando-se o tridecanal [67], [159]. Apesar disso, outros artigos destacam a presença de tridecanal em *Grateloupia filicina* (Rhodophyta) [158], além de no óleo essencial de duas algas verdes, *Ulva australis* e *Ulva* sp. (anteriormente, *Ulva pertusa* e *Enteromorpha* sp., Chlorophyta) [248].

No caso dos álcoois, de uma maneira geral, foi observado um crescimento nas amostras salgadas, excetuando-se 1-octen-3-ol em GG. O mesmo se passou com os aldeídos, salvo para os compostos (2*E*,4*E*)-heptadienal em CT, hexanal e tridecanal em UP. Esses resultados estão em conformidade com o que foi reportado por López-Pérez *et al.*, onde a salga e armazenagem refrigerado de longo prazo da alga *Laminaria ochroleuca* (Phaeophyceae) resultou em níveis mais elevados de álcoois e aldeídos, dentre outros grupos funcionais [33].

Quanto aos VOCs que se comportaram de maneira diferente, era de se esperar que a génese de álcoois e aldeídos nas amostras salgadas pudesse superar a perda por *salting-out*, considerando que o sal presente nas amostras não parece inibir a atividade das lipoxigenases (LOX), muito pelo contrário [249]. Porém, uma possível hipótese para o seu comportamento invulgar relaciona-se com o tipo de LOX que pode ser ativado em condições de stress, e que parece depender da espécie. Contreras *et al.* [250] detetaram em duas algas castanhas chilenas (*Lessonia nigrescens* e *Scytosiphon lomentaria*, Phaeophyceae) a ativação de uma LOX específica, que somente utiliza o ácido araquidónico como substrato e que parece ter sido induzida por excesso de cobre. Além disso, foi observado que as duas espécies reagiram de maneira distinta ao stress. Dessa forma, é possível que com o stress salino tenham sido ativadas lipoperoxidases que atuam em substratos diferentes, o que explicaria as mudanças em diferentes direções para alguns VOCs.

Nos álcoois e aldeídos, foi possível perceber um aumento nas concentrações para a maioria dos VOCs nas amostras liofilizadas (excluindo-se o composto 1-octen-3-ol), enquanto na desidratação o oposto parece acontecer. Considerando as características térmicas distintas dos dois métodos, é plausível afirmar que a desidratação, ao utilizar temperaturas de 40°C, pode levar à perda de compostos mais sensíveis, devido à evaporação ou degradação, enquanto a liofilização, ao remover a água por sublimação em temperaturas extremamente baixas, evita a criação de artefactos [28], [29].

Chen *et al.* [235] descobriram que o 1-octen-3-ol parece possuir um papel importante de mensageiro da defesa das algas, em particular de *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta). Em reação a estímulos externos, a produção de 1-octen-3-ol se intensificou rapidamente, através de um mecanismo de retroalimentação positiva no

ciclo metabólico ácido gordo-oxilipina. Esse processo facilitou a produção contínua do composto, gerando assim um sinal rápido, eficaz e altamente difusível, capaz de transmitir mensagens para células vizinhas ou partes distantes da planta em concentrações consideráveis. Além disso, o 1-octen-3-ol pôs *P. haitanensis* em “estado de alerta”, desencadeando uma série de respostas metabólicas e o crescimento celular, o que culminou na ativação da resposta defensiva.

Curiosamente, muitas das oxilipinas voláteis, que foram destacadas pela PCA, parecem ter a sua produção aumentada pelo mecanismo supracitado, tais como 2,4-heptadienal, 2-octen-1-ol, 1-octen-3-ona e 2-octenal [235]. É mais provável que este mecanismo somente atue em algas da mesma espécie ou gênero, porém, deve-se destacar que, ao se observar as principais variações *G. gracilis*, verifica-se um aumento considerável de (2*E*)-octen-1-ol e (2*E*)-octenal na amostra salgada da alga. Além disso, as reações ocorrem muito rapidamente e consomem grandes quantidades de 1-octen-3-ol, o que, hipoteticamente, poderia explicar as variações do composto em sentido antagônico aos demais álcoois.

Lu *et al.* [244] ainda descreveram um mecanismo de resposta ao stress por choque térmico, que se revelou uma estratégia de adaptação heteromórfica de *Pyropia haitanensis*. No seu trabalho, destaca-se a produção significativa de 2-etil-1-hexanol, antes indetetável nas amostras que não foram submetidas ao aquecimento.

O acetato de hexilo é comumente formado através da esterificação do hexanol com ácido acético, processo que pode ocorrer naturalmente nos alimentos, ser induzido pela fermentação ou através de técnicas de processamento, o que parece ser o caso [251]. Porém, em *F. vesiculosus*, é mais provável que esta reação tenha ocorrido a partir da reação do ácido hexanóico com ácidos gordos, uma vez que este ácido carboxílico só foi encontrado na alga liofilizada e salgada e que o ácido acético não foi detetado em nenhuma das amostras [252]. O acetato de hexilo é um éster relativamente comum em *Ulva rigida* (Chlorophyta), que foi identificado como sendo o mais abundante na fração volátil da alga *Plocamium cartilagineum* (Rhodophyta) [230], [232], [237].

3.3.2 Considerações Finais

As técnicas de conservação convencionais mostraram um impacto relevante no perfil de voláteis das algas marinhas analisadas por GC-MS, o que explica as diferenças evidentes, ao nível sensorial, entre as algas colhidas frescas e aquelas que passaram por algum tipo de processamento.

De um modo geral, observou-se um aumento nas concentrações para a maioria dos VOCs, destacados pela PCA nas algas liofilizadas e salgadas. A desidratação, usando estufa com convecção, pareceu reduzir uma ampla gama de compostos voláteis que aparentam evaporar ou sofrer alterações devido à natureza térmica do procedimento. Nenhum método específico pareceu ser unânime na sua capacidade de preservação dos VOCs, assim como as respostas das diferentes algas e seus respectivos compostos voláteis tampouco foram lineares.

Os métodos que se destacaram por preservar melhor as características das algas marinhas estudadas foram:

1. Liofilização: *U. pinnatifida*, *C. teedei* var. *lusitanicus* e *G. gracilis*;
2. Salga: *C. tomentosum*;
3. Secagem: *F. vesiculosus*.

A discussão mostrou a complexidade dos mecanismos que afetam as concentrações de voláteis em algas marinhas que não estão ainda completamente esclarecidos. Para além das justificativas mais evidentes – relacionadas com a perda de voláteis (por evaporação, sublimação ou efeito *salting-out*) e com a concentração por desidratação ou osmose – parece haver uma série de mecanismos bioquímicos que regem a produção de compostos voláteis de sabor em algas marinhas.

Outras análises físico-químicas e microbiológicas, não realizadas no presente estudo, poderiam ajudar na melhor caracterização das algas marinhas trabalhadas, além de fornecer pistas para entender melhor os mecanismos subjacentes (metabólicos) que se expressam nesses organismos. Evitou-se fazer uma caracterização ao nível nutricional, devido à existência de uma literatura mais robusta a este respeito, preferindo-se utilizar a ferramenta de cromatografia gasosa (GC-MS), por conta da sua relação direta com a análise sensorial e a ficogastronomia.

Essas informações são importantes para entender as mudanças organoléticas que ocorrem durante o processamento das algas e que podem influenciar nas escolhas de processamento para fins culinários ou de conservação.

4

Alimentos Minimamente Processados e o Uso de Altas Pressões (HPP) em Algas Marinhas

Revisão Bibliográfica

4.1.1 Alimentos Minimamente Processados

O termo “processamento mínimo” foi definido de várias formas: desde enunciados muito amplos, como “o menor tratamento possível para alcançar um objetivo”, até uma definição mais precisa, que diz que são os tratamentos que “influenciam minimamente as características de qualidade de um alimento, enquanto, ao mesmo tempo, lhe dão tempo de prateleira suficiente durante o armazenamento e distribuição”. Uma definição ainda mais específica descreve o processamento mínimo como um conjunto de técnicas que “preservam os alimentos, mas também retêm a maior parte da sua qualidade nutricional e características sensoriais, reduzindo a dependência do calor como principal conservante” [253].

As “tecnologias de processamento mínimo” costumam ser implementadas por empresas inovadoras e que buscam novas formas de conservar os alimentos sem recorrer ao calor. Por essa razão, costumam ser tratamentos tecnicamente mais eficientes e menos dependentes de energia. Porém, muitas vezes, os gastos com equipamento e manutenção fazem com que o produto final possua um custo de produção muitas vezes bem superior aos das técnicas convencionais, sendo estas tecnologias somente viáveis para produtos com alto valor agregado. Em outros casos,

encontram-se limitações técnicas para a sua aplicação em grandes volumes de produção, o que impede as economias de escala [253].

Os produtos transformados com essas tecnologias são também denominados por “alimentos minimamente processados”. Estes são associados à frescura dos alimentos *in natura*, sendo embalados e processados em temperaturas suaves (sempre abaixo das temperaturas de pasteurização), e ,imediatamente, refrigerados ou congelados. Podem, inclusive, sofrer etapas de remoção das partes não comestíveis e porcionamento de maneira a proporcionar uma maior conveniência ao consumidor final [254].

As embalagens possuem funções, tais como acondicionar, proteger e preservar, propiciar conveniência para o consumo e estabelecer uma comunicação com o cliente. A principal função da embalagem é a de criar uma barreira física entre o alimento e o ambiente circundante, evitando a contaminação por microrganismos, controlando a troca de substâncias com o exterior, protegendo da luz e contra impactos. Olhando sob essa perspectiva, pode considerar-se que as embalagens são cruciais para preservação dos alimentos processados. Além disso, os tipos de embalagem utilizadas vão ditar quais as técnicas de conservação podem ser utilizadas, e vice-versa [28], [255].

4.1.2 Higienização e Porcionamento de Alimentos Frescos

A origem do produto, assim como os processamentos pós colheita, são de extrema importância na conservação dos produtos alimentares. Nos produtos minimamente processados, pretende-se manter o produto fresco pelo máximo de tempo possível, sem perda das qualidades nutricionais. Contudo, apesar do prolongamento da vida de prateleira não ser a maior preocupação dos produtos minimamente processados, o prazo de validade do produto deve ser suficiente para tornar a distribuição viável dentro de uma região de consumo [256].

Processos relacionados com o porcionamento de alimentos frescos (vide etapas de preparo na (**Figura 4.1**) são realizados em produtos, cujo objetivo principal é a conveniência e a praticidade no consumo, em detrimento da vida de prateleira [257]. No caso das carnes e, particularmente, dos peixes muitas vezes o processamento torna-se necessário, devido à presença de microrganismos deteriorantes no trato digestivo, assim como de enzimas proteolíticas que se encontram nos músculos e, em maior quantidade, nas vísceras [176]. Porém, em qualquer um dos casos citados, é fundamental o estrito controle da higiene e dos protocolos de segurança alimentar nas instalações onde os alimentos são processados [257].

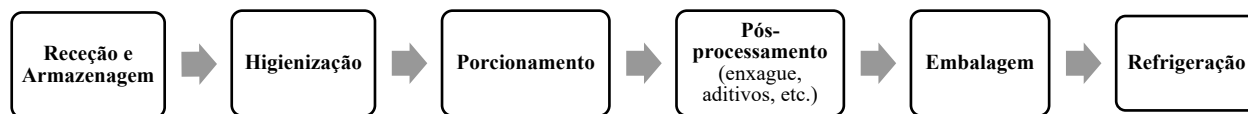


Figura 4.1 Etapas do porcionamento de alimentos frescos prontos para o consumo

Fonte: Adaptado de Zeuthen [257]

É importante realçar que não somente o asseio das instalações é necessário; uma etapa crucial do preparo de produtos minimamente processados frescos e prontos para o consumo é o da higienização da matéria-prima, com o objetivo remover as sujidades, resíduos de pesticidas e microrganismos deteriorantes [258]. Deve-se ter especial cuidado com a pureza da água utilizada na lavagem, além dos agentes higienizantes usados para manter a qualidade dessa. Frutas e vegetais, particularmente verduras (por exemplo, saladas prontas), são regularmente consumidos crus, tendo grande potencial para a transmissão de agentes patogénicos [259].

Ao longo dos últimos anos, muitos produtos químicos alternativos e tratamentos de desinfecção física têm sido avaliados quanto à sua eficácia para reduzir a população de agentes patogénicos e prolongar a validade dos produtos frescos, incluindo o seu impacto na aparência, textura, sabor e valor nutricional. Para além do método corrente de desinfecção por hipocloritos, tratamentos químicos por ácidos orgânicos, ozono, peróxido de hidrogénio ou água eletrolisada (com características ácidas ou alcalinas), dentre outros, vêm sendo experimentados. Esses tratamentos podem conseguir uma redução de microrganismos semelhante à do cloro, sem a produção de compostos nocivos – tais como os trihalometanos, que são carcinogénicos [258].

Uma vez feita a desinfecção, os alimentos seguem para o descasque e porcionamento. O descasque pode ser feito manualmente, de forma mecânica, usando agentes alcalinos, enzimas, calor ou, ainda, ondas do espectro infravermelho. O corte e o retalhamento são operações alimentares não térmicas para redução de tamanho. Esse procedimento remove porções não comestíveis dos alimentos, reduzindo o tempo de preparação por parte dos consumidores [259].

Com o processamento, a atividade respiratória dos produtos pode aumentar de 20% até 700%, ou mais, dependendo do produto, do grau de corte e da temperatura. Se as condições de embalagem forem de supressão do oxigénio, isso levará a uma respiração anaeróbia, que provocará a formação de etanol, cetonas e aldeídos que podem levar à formação de *off-flavors* indesejáveis [256].

Em vegetais minimamente processados, a exposição ao ar ambiente pode promover a contaminação e o crescimento de bactérias, leveduras e bolores, tendo em

conta que maioria desses se enquadra na categoria de alimentos de baixa acidez (pH 5,8-6,0) com alto teor de humidade e, ainda, o grande número de superfícies cortadas podem criar as condições ideais para a proliferação microbiana.

As frutas minimamente processadas são relativamente seguras quando comparadas com outros alimentos, uma vez que são geralmente ácidas o suficiente para evitar o crescimento de agentes patogénicos. Os organismos deteriorantes em produtos refrigerados são normalmente psicotróficos e, por conseguinte, têm uma vantagem competitiva sobre a maioria dos agentes patogénicos. Contudo, diferentes produtos de fruta e vegetais minimamente processados parecem possuir padrões de deterioração divergentes, em relação às respetivas matérias-primas [258].

O corte em alguns vegetais e frutas pode induzir a atividade de enzimas como, por exemplo, a fenilalanina amónia liase (PAL). Essa enzima é produzida por biossíntese dos compostos fenólicos durante o stress, acumulando-se e sendo utilizados como substratos pela PPO, que provoca reações de escurecimento. Outra enzima envolvida no processo de acastanhamento é a peroxidase (POD), que acelera o escurecimento de vegetais e frutos frescos cortados [258].

A PPO pode ser evitada através da inativação por calor da enzima, exclusão ou remoção de um ou ambos os substratos (O_2 e fenóis), diminuição do pH, adicionando compostos antagónicos ou que previnam a formação de melanina. Provavelmente, a alternativa utilizada com mais frequência é a do uso de sulfitos e/ou ácido ascórbico. As três principais proteases vegetais – isto é, a ficina dos figos, a papaína dos mamões e a bromelaína do abacaxi e do ananás – também provaram ser eficazes [256].

Uma operação crucial na produção de frutas e vegetais minimamente processados é a embalagem: o método mais estudado é o do embalamento em atmosfera modificada. O resfriamento também é um importante fator de conservação, tal como o controlo da humidade. A “tecnologia dos obstáculos” pode ser utilizada, através do uso adicional de técnicas de biocontrolo (como as bactérias ácido-lácticas) ou conservantes naturais. Sistemas de embalamento ativos e filmes comestíveis, bem como filmes plásticos mais permeáveis, que compensem a respiração de frutas e vegetais, são áreas particularmente interessantes para o desenvolvimento de novas aplicações, que permitam aumentar a vida de prateleira desses alimentos [256].

4.1.3 Técnicas de Conservação Modernas

4.1.3.1 Processamento por Altas Pressões (HPP)

O “processamento por altas pressões” (HPP) é uma técnica de conservação sem tratamento térmico, através da qual os produtos, já acondicionados na sua embalagem

final, são submetidos a um alto nível de pressão isostática (normalmente, entre 100 – 600 MPa) transmitida por um líquido, geralmente água (pressões hidrostáticas), usando temperatura ambiente ou controlada inferior aos 45 °C (**Figura 4.2**). As altas pressões são capazes de eliminar a maioria dos microrganismos presente nos alimentos, estendendo a vida útil dos produtos e garantindo segurança alimentar. O HPP respeita as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos que podem ser mantidas durante todo o período de conservação, diferentemente do que ocorre nos processos térmicos de pasteurização, tornando-o uma “tecnologia de processamento mínimo” (assunto que será discutido mais adiante) [213], [260].



Figura 4.2 Equipamento de Altas Pressões (Hiperbaric) da Universidade de Aveiro

Fonte: Bruno Moreira-Leite

Os parâmetros a serem levados em consideração durante o processamento por HPP são: pressão máxima atingida, tempo de retenção (isobárico), velocidade de compressão/descompressão e variações na temperatura. Diferentemente das outras técnicas de conservação, em especial das de natureza térmica, o efeito das altas pressões é quase instantâneo e uniforme, tendo em conta que a transmissão da pressão não é dependente do tempo ou massa [261].

O grau de pasteurização não é afetado pelo formato ou tamanho da embalagem, fazendo com que diferentes produtos possam ser processados ao mesmo tempo. Essa

pode ser uma vantagem competitiva para empresas que operam com uma linha extensa de produtos e formatos ou que estejam constantemente desenvolvendo novos produtos ou mudando as embalagens. Entretanto, o facto de o equipamento de HPP operar em lotes ao invés de usar processamento contínuo – como ocorre na maioria dos alimentos líquidos pasteurizados –, acaba por diminuir a produtividade e aumentar os custos relacionados com a mão de obra. O facto do processamento ser feito no produto após o envase inibe problemas relacionados com a recontaminação [260].

Se por um lado, a tecnologia do HPP se adapta muito bem a alimentos líquidos e sólidos com alto teor de humidade que são comprimidos de maneira uniforme – em até 15% do volume inicial para um tratamento a 600 MPa – sem que haja deformação. Por outro, ela não é viável para alimentos secos ou pouco húmidos já que a pressão é transmitida pelos líquidos presentes no alimento. Na mesma situação estão os alimentos que contenham gases dispersos na fase contínua (esponjosos) uma vez que esses sofrerão maior compressão e serão deformados pelo processamento [260].

O aquecimento adiabático promovido pela compressão pode aumentar a temperatura nos líquidos, cuja temperatura inicial é de 5 °C a 25 °C, em cerca de 3 °C para cada 100 MPa de pressão [262]. Em gorduras, sob as mesmas condições, o aumento situa-se entre 8 °C e 9 °C, enquanto os hidratos de carbono e proteínas possuem valores intermediários de aquecimento adiabático [263]. Para minimizar esse efeito, da pressão sobre as forças intramoleculares, o alimento pode ser previamente resfriado, assim como os fluidos usados na compressão. Uma vez removida a pressão, a temperatura deverá retornar ao seu nível inicial [262].

Em sistemas biológicos, as principais alterações que podem ser promovidas pelo HPP são: desnaturação de proteínas, gelatinização de hidratos de carbono, mudança de fase em lípidos (por conseguinte, nas membranas celulares), dentre outras. É importante ressaltar que as altas pressões não alteram as ligações covalentes nos compostos químicos, somente forças “van der Waals”, interações eletrostáticas e pontes de hidrogénio, o que explica o seu o efeito mínimo sobre as moléculas pequenas. Por conseguinte, o efeito sobre as vitaminas, compostos aromáticos e pigmentos é desprezável, retendo-se assim as propriedades organoléticas e nutricionais [262], [263].

O HPP permite inativar algumas enzimas alimentares, reduzindo a degradação da qualidade e do valor nutricional dos alimentos. No entanto, os efeitos da pressão variam muito consoante o tipo de enzima, os parâmetros seleccionados e também o pH, o teor de humidade e outras características das matrizes alimentares. De uma maneira geral, uma pressão relativamente baixa (~100 – 200 MPa) pode tornar algumas

enzimas mais ativas, enquanto uma pressão elevada (400 – 1000 MPa) pode induzir a sua inativação. Um meio eficaz para acelerar a inativação das enzimas é o aumento da temperatura, porém, existem poucos estudos para o efeito. A maior contribuição da pressão para a inativação enzimática decorre de rearranjos estruturais nas proteínas (estruturas terciárias e quaternárias) [261].

Enzimas encontradas em frutas, vegetais, leite, peixe e produtos cárneos incluem PPO, LOX, POD, pectinametilesterase (PME), lipases e proteases. Enzimas como PPO e LOX são inativadas a 300 MPa, enquanto outras como a PME e POD são muito difíceis de inativar dentro das gamas de pressão atualmente disponíveis nas instalações industriais [261]. Portanto, pode-se concluir que o efeito do HPP sobre a atividade enzimática é, em muitos casos, incerto.

O HPP inativa os microrganismos, interrompendo as funções celulares responsáveis pela reprodução e sobrevivência. O processamento pode danificar as membranas microbianas interferindo na absorção de nutrientes e na excreção de resíduos celulares. Outros eventos adversos incluem perda extensiva de conteúdo intracelular durante a pressurização, desnaturação de proteínas e inativação de enzimas chave para a atividade metabólica dos microrganismos. As bactérias Gram-positivas são inativadas a pressões mais elevadas do que as Gram-negativas. A condição fisiológica (isto é, se estiverem numa fase estacionária ou exponencial) e até estirpes de um mesmo microrganismo também podem afetar o seu comportamento e a sua resistência às altas pressões [261].

Uma primeira abordagem consiste em baixar a temperatura do processo, o que geralmente aumenta a taxa de inativação microbiana e melhora a qualidade geral do produto. Embora os níveis de pressão na gama de 400 – 800 MPa reduzam as formas vegetativas de bactérias patogénicas e de deterioração, a inativação de esporos bacterianos apenas por pressão não é viável porque requer valores fora dos parâmetros comerciais, além de um tempo demasiado longo. Muitos estudos demonstraram ainda que não é possível presumir que os esporos mais resistentes ao calor sejam também os mais estáveis às altas pressões. Outra alternativa para reduzir o tempo ou aumentar a eficácia do de tratamento seria uma estratégia de “tecnologia dos obstáculos” ou um “processamento térmico de alta pressão” (HPTP) [261].

As altas pressões mostram-se igualmente eficazes na inibição leveduras e bolores (300 – 400 MPa), requerendo pressões mais elevadas para inativar ascósporos. Os vírus apresentam sensibilidade variável de acordo com as espécies. Já no caso dos parasitas, há muito pouca informação na literatura disponível, mas as evidências parecem apontar na mesma direção das células bacterianas vegetativas. Como alguns microrganismos são capazes de sobreviver, em particular o *Clostridium botulinum*, o

HPP é classificado como uma técnica de pasteurização e não de esterilização. Um aspecto importante a ser levado em consideração é que a eliminação de algumas bactérias em um contexto de alimentos envasados a vácuo, pode gerar um desequilíbrio na competição entre a flora microbiana e levar ao desenvolvimento de espécies mais prejudiciais à saúde, o que é sempre algo preocupante sob a ótica da segurança alimentar [262], [263].

De modo geral, como os microrganismos podem responder de maneira diferente às altas pressões conforme as características do meio (pH, a_w , micronutrientes, etc.), a complexa composição dos alimentos é outro fator que pode dificultar a previsão da resposta dos patógenos ao tratamento [262].

Na prática, há muitos casos de sucesso envolvendo os tratamentos por altas pressões, dos quais se destacam [262]:

- Moluscos bivalves e outros alimentos do mar que são consumidos pouco cozidos (ou até mesmo crus) onde se pode obter uma redução expressiva da carga microbiana;
- Crustáceos (por exemplo, lagostas) podem ser removidos facilmente da casca obtendo-se alto rendimento, diminuindo os custos e combatendo o desperdício alimentar;
- Em certos produtos, como carnes cozidas e curadas, pode-se reduzir a quantidade de sal e outros aditivos alimentares;
- Consegue-se uma redução de *Listeria monocytogenes* em refeições prontas, aumentando a vida de prateleira e a qualidade nutricional das mesmas;
- Pode-se prevenir surtos de intoxicação alimentar devido à presença de estirpes de *E. coli* e *Salmonella* sp., organismos resistentes a acidez em alimentos pasteurizados (por exemplo, sumos de fruta);
- Evita-se o escurecimento enzimático (PPO) em produtos como o *guacamole*;
- A confeção de queijos de leite cru microbiologicamente seguros foi viabilizada.

Os produtos atualmente conservados por HPP requerem refrigeração, acidificação ou redução da a_w para evitar a germinação de esporos bacterianos. Alternativamente, pode-se limitar a vida de prateleira. Dessa forma, o próximo grande passo para a tecnologia será a capacidade de produzir alimentos com baixa acidez, estáveis em frio discreto ou até mesmo à temperatura ambiente, através da utilização combinada de calor moderado e alta pressão. Isso inclui a necessidade da investigação na área da engenharia alimentar de forma a permitir a produção em escala comercial do HPTP, além da produção de dados experimentais suficientes para validar a segurança microbiológica dos alimentos produzidos desta forma [261], [262].

4.1.3.2 Outras Técnicas de Conservação Modernas

Conforme foi dito acima, são consideradas técnicas de processamento mínimo o uso de embalagens que permitam manter as propriedades organoléticas e estender a vida de prateleira de produtos alimentares. Tecnologias relacionadas com o *packaging* e as “atmosferas protetoras”, tais como o embalamento em atmosfera modificada (MAP) e sob vácuo, serão discutidas em maior detalhe no **Capítulo 5**.

As novas técnicas de conservação de alimentos concentram-se em métodos não térmicos que visam manter a qualidade, a segurança e o valor nutricional dos alimentos. Essas técnicas oferecem vantagens significativas sobre os métodos tradicionais, como menor dependência de aditivos químicos, menor impacto nas propriedades organolépticas dos alimentos e uma abordagem mais sustentável e amiga do ambiente [264].

Elas podem ser divididas em métodos baseados em princípios físicos ou químicos, ou ainda, em tratamentos térmicos e não térmicos. Os tratamentos térmicos possuem como vantagem a eficiência em termos de tempo e energia e a capacidade de eliminar eficazmente vários microrganismos e desnaturar enzimas, porém, uma grande desvantagem que se observa neste tipo de técnica deve-se ao facto dela destruir compostos termolábeis, o que acaba por impactar nas propriedades nutricionais e organoléticas dos alimentos [241].

Os tratamentos não térmicos, por outro lado, caracterizam-se como sendo capazes de reter melhor os nutrientes, proteger os compostos termolábeis e impactar minimamente na qualidade sensorial dos alimentos [241]. Na **Tabela 4.1**, é possível observar as principais técnicas de conservação que ocupam uma posição de destaque na atualidade, os princípios que as regem, assim como as suas principais vantagens e desvantagens:

Tabela 4.1 Princípios, vantagens e desvantagens das mais importantes técnicas de conservação modernas

Técnicas de Conservação Modernas	Tratamentos Químicos		Tratamentos Físicos Térmicos		
	Ozonização	Plasma Frio	Microondas	Aquecimento Óhmico	Radiação Ultravioleta
Princípios	O ozono (O ₃) decompõe-se rapidamente em moléculas de oxigênio e apresenta um alto potencial de oxidação (2,07 V).	O plasma frio é criado quando um gás é ionizado a uma temperatura relativamente baixa, permitindo reações químicas sem um aumento significativo da temperatura.	Baseia-se no princípio de que as ondas de microondas agitam as moléculas de água nos alimentos, através da inversão das suas polaridades, gerando calor por meio da fricção molecular.	O aquecimento óhmico em conservação de alimentos envolve a passagem de uma corrente elétrica através do alimento, aquecendo-o uniformemente e rapidamente devido à resistência elétrica interna dos próprios alimentos.	Baseia-se na capacidade da luz UV de danificar o ADN e as estruturas celulares de microrganismos, inibindo seu crescimento e reprodução.
Vantagens	Eficiente na redução de pesticidas; Agente antimicrobiano e antiviral.	Temperatura baixa; Elimina vários microrganismos.	Alta eficiência de transferência de calor.	Aquecimento uniforme.	Alta transferência de massa.
Desvantagens	Possível deterioração da qualidade de certos alimentos Capacidade de penetração limitada.	Baixa penetração; Possíveis resíduos nos alimentos.	Baixa penetração em certos tipos de equipamentos; Sobreaquecimento nas bordas; Equipamentos mais eficientes na transmissão do calor possuem custos elevados.	Iões indesejados podem entrar nos alimentos.	Baixa capacidade de penetração.

Tabela 4.1 Princípios, vantagens e desvantagens das mais importantes técnicas de conservação modernas (continuação)

Técnicas de Conservação Modernas	Tratamentos Físicos Não-Térmicos			
	Campo Elétrico Pulsado	Luz Pulsada	Radiações Ionizantes	Ultrassons
Princípios	Baseia-se na aplicação de pulsos de alta tensão de curta duração para perfurar as membranas celulares dos microrganismos, inativando-os sem elevar significativamente a temperatura do alimento.	Os alimentos são posicionados entre dois eletrodos e, em seguida, é aplicado um pulso elétrico de alta tensão (50 kV/cm) por breves períodos. É regido por uma combinação de eletroporação e eletropermeabilização.	Direto: danifica o ADN dos microrganismos alvo. Indireto: durante a radiólise da água são gerados compostos com poderes tanto redutores como oxidantes.	A radiação ultrassônica agita as partículas sólidas presentes na solução, causando sua fragmentação por cavitação e dispersão no solvente.
Vantagens	Sabores e aromas frescos; Preserva nutrientes; Processamento rápido.	Eficaz contra uma ampla gama de microrganismos; Processamento rápido e sem resíduos químicos; Aquecimento mínimo.	Propicia a destruição de microrganismos; Produz alterações mínimas nos constituintes dos alimentos; Efeitos mínimos sobre outras moléculas que não as da água.	Simple operação; Não gera poluentes, sendo favorável ao meio ambiente; Eficaz na extração de compostos bioativos.
Desvantagens	Efeito limitado sobre esporos e vírus; Baixa capacidade de penetração.	Penetração limitada; Sensibilidade a cor e transparência; Custo dos equipamentos,	Pode destruir vitaminas; É fraco sobre a atividade enzimática	Baixa capacidade de desinfecção e penetração; Intensidade e tempo excessivos levam à oxidação e a formação de sabores desagradáveis.

Fonte: Adaptado de Tian, Huang & Qin [241]; Chacha *et al.* 2021 [264]; Sridhar *et al.* 2021 [22].

4.1.3.3 Tratamentos Mistos e Tecnologia dos Obstáculos

Com o avanço tecnológico e a mudança dos hábitos de consumo – de uma alimentação mais processada para uma com aspecto mais fresco e saudável – a indústria passou a fazer uso de técnicas de conservação mais brandas. Porém, para a suplantarmos a curta vida útil dos alimentos menos processados e obter produtos que sejam seguros, estáveis e que possuam as características desejadas, empresas do setor alimentar passaram a adotar com mais frequência a “tecnologia dos obstáculos”, onde não apenas um, mas um conjunto de métodos de conservação são usados muitas vezes de maneira sinérgica [195].

A “tecnologia dos obstáculos” (em inglês, *hurdle technology*) baseia-se na utilização inteligente de diferentes fatores ou técnicas de preservação (obstáculos) com múltiplos objetivos. Homeostasia é a tendência constante do microrganismo de manter a sua estabilidade e de se adaptar ao ambiente. Os obstáculos buscam perturbar um ou vários mecanismos homeostáticos do microrganismo. A recuperação de uma homeostasia perturbada exige muita energia e, sendo assim, a restrição do fornecimento de energia às células microbianas inibe os mecanismos de reparação e promove um efeito amplificado dos obstáculos. Como resultado, temos que os microrganismos não se multiplicam, permanecendo estáveis ou até, eventualmente, sendo eliminados. A interferência com a homeostasia traduz-se num foco atrativo e lógico para melhorias nas técnicas de conservação de alimentos [195], [265].

Outro fenómeno de importância prática é a exaustão metabólica dos microrganismos, que poderia levar a uma “auto-esterilização” dos alimentos. Aparentemente, os microrganismos, diante das perturbações impostas pela conjunção de técnicas de preservação, fazem uso de todos os mecanismos de reparação possíveis para a sua homeostasia a fim de superar o ambiente hostil. Ao fazê-lo, consomem completamente a sua energia e podem vir a morrer, caso se esgotem metabolicamente. Isso conduz, eventualmente, a uma auto-esterilização, fazendo com que certos alimentos se tornem ainda mais seguros durante a sua armazenagem [265].

Uma limitação para o sucesso da “tecnologia dos obstáculos” poderiam ser as reações de stress dos microrganismos. Algumas bactérias tornam-se ainda mais resistentes ou, até mesmo, mais agressivas sob stress, uma vez que geram proteínas de choque do stress. Se por um lado, essas reações dos microrganismos podem dificultar a preservação de alimentos e tornar problemática a aplicação da “tecnologia dos obstáculos”; por outro lado, a ativação de genes para a síntese das proteínas de choque tornar-se-á mais difícil, se forem provocadas diferentes reações simultâneas de stress. Para lutar contra as diferentes perturbações, a célula necessita da síntese de várias proteínas protetoras que os microrganismos não conseguem fornecer, uma vez que

esses se encontram metabolicamente esgotados. Por conseguinte, uma conservação dos alimentos que induza a múltiplas fontes de stress poderia ser a resposta para evitar a síntese de tais proteínas de choque que, de outra forma, poderiam pôr em risco a estabilidade microbiana e a segurança de certos alimentos [265].

A conservação de alimentos fazendo uso de “múltiplos alvos” deve ser o objetivo final para uma conservação suave, porém, mais eficaz dos alimentos. Há algum tempo que se supõe que diferentes fatores de preservação num mesmo alimento poderiam, não somente ter um efeito aditivo, mas também sinérgico. Para que se atinja tal objetivo, é preciso realizar uma seleção inteligente e uma combinação de fatores de conservação de classes diferentes e com distintas finalidades [265], [266].

Há inúmeros obstáculos que podem ser implementados em um processo de preservação, no entanto, os mais comumente utilizados são: temperaturas altas ou baixas, diminuição da a_w , baixo potencial redox (E_h), competição microbiana (por exemplo, LAB) e conservantes (naturais ou artificiais). Atualmente, com o surgimento e o aperfeiçoamento das tecnologias de processamento mínimo e dos tratamentos não-térmicos, novas combinações de tecnologias emergentes com técnicas tradicionais de conservação vêm sendo testadas [195].

As novas tecnologias de processamento alimentar, tais como microondas e radiofrequência, aquecimento ôhmico, campos elétricos pulsados, irradiação, altas pressões, dentre outras, podem ser utilizadas para melhorar a segurança e a vida útil dos ingredientes alimentares. Contudo, algumas dessas técnicas afetam negativamente as propriedades organolépticas dos alimentos e reduzem a sua aceitabilidade por parte dos consumidores, efeito adverso que poderia ser ultrapassado através da utilização da “tecnologia dos obstáculos”. As estratégias de combinação de diferentes fatores de preservação são capazes de melhorar as características organolépticas e sensoriais e garantir, ao mesmo tempo, a segurança microbiana dos alimentos e diminuir o consumo energético [266].

Khan *et al.* em um artigo de revisão sobre o assunto, destacam que: [266]

- A irradiação quando utilizada em combinação com outras tecnologias de conservação, tais como o tratamento térmico, reduz as doses de radiação necessárias, sem afetar a qualidade dos alimentos;
- A conservação eficaz utilizando HPP pode ser conseguida fazendo uso de pressões moderadas em combinação com outras tecnologias (por exemplo, atmosferas modificadas) reduzindo os efeitos negativos sobre o frescor dos alimentos;
- O ozono pode ser corrosivo em doses elevadas, mas degrada-se rapidamente através da aplicação de calor e, assim, a introdução sequencial de ozono e calor

moderado nos produtos alimentares pode ultrapassar as questões associadas ao aquecimento e ao ozono individualmente;

- Os microrganismos resistentes ao tratamento com campos elétricos pulsados poderiam ser eliminados, se essa técnica for combinada com outras de baixa intensidade.

4.1.4 O HPP em Algas Marinhas

Diferentemente dos métodos convencionais de conservação, para os quais existe uma ampla literatura sobre seus efeitos nas propriedades organoléticas das algas marinhas, há escassa publicação a respeito da aplicação de HPP. No levantamento efetuado, foram encontrados apenas 7 referências de 3 países diferentes (Espanha, Chile e Irlanda), dentre as quais, 5 delas estão vinculadas a apenas 2 ensaios feitos por um grupo de investigadores espanhóis. É de destacar que na altura da elaboração do projeto de doutoramento descrito na presente tese e, durante a fase inicial do trabalho experimental, não havia ainda nenhuma publicação sobre o assunto.

Del Olmo *et al.* [44], primeiramente, investigaram os efeitos do HPP sobre a alga *Laminaria ochroleuca* (Phaeophyceae), juntamente com as técnicas de salga e congelamento, examinando parâmetros microbiológicos, físico-químicos (peso seco, pH e a_w), de cor e textura, além de realizar análises dos polifenóis totais (TPC), da capacidade antioxidante (FRAP e TEAC/ABTS⁺) e da atividade enzimática (proteolítica e da aminopeptidase). A principal descoberta foi a de que o processamento HPP melhorou a qualidade microbiológica de *L. ochroleuca*, mostrando-se eficiente até o término do período de armazenamento de 180 dias a 4 °C.

As diversas técnicas de conservação afetaram de maneira significativa, em maior ou menor grau, os principais parâmetros físico-químicos. Notavelmente, no que concerne à textura, o HPP diminuiu a dureza da alga marinha, enquanto a salga as tornou mais rígidas. A cor da alga marinha processada por HPP tornou-se mais avermelhada, enquanto o congelamento e a salga resultaram numa tonalidade mais azulada. Durante o armazenamento, o TPC e a atividade antioxidante decresceram, sendo que a redução foi menos acentuada na alga *L. ochroleuca* congelada, comparativamente às demais amostras. A atividade enzimática, embora inicialmente suprimida pelos diferentes tratamentos, apresentou valores próximas ao controlo no dia 0 em todas as amostras no final do armazenamento [44].

Além disso, López-Pérez *et al.* [33] publicaram um artigo sobre o mesmo ensaio, onde foi dada ênfase aos compostos voláteis e às características de odor de *L. ochroleuca*, durante a armazenagem de longo-prazo. A conclusão principal foi que o HPP resultou, segundo o painel de análise sensorial recrutado para o estudo, em

melhores atributos de odor e uma avaliação global superior, comparativamente às demais técnicas de salga e congelamento.

Em um outro ensaio, Del Olmo *et al.* [43] estudaram a conservação de cinco algas comestíveis – *Codium fragile* e *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Chondrus crispus* (Rhodophyta), *Himanthalia elongata* e *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) – por HPP, sendo analisados basicamente os mesmos parâmetros do estudo anterior [44]. A análise revelou que o uso de HPP a 600 MPa incrementou a qualidade microbiológica das algas marinhas e estendeu significativamente sua durabilidade, enquanto o processamento a 400 MPa teve efeitos menos acentuados. Originalmente, a vida de prateleira variava, de 3 dias para *U. lactuca* a 60 dias para *H. Elongata*, nas amostras do controlo. Com o tratamento HPP, essa vida-útil foi ampliada para 180 dias em todas as espécies de macroalgas analisadas, mantendo em grande parte suas características nutricionais, como a concentração de polifenóis e a atividade antioxidante.

López-Pérez *et al.* [245] estudaram o impacto do HPP sobre os compostos voláteis e características de odor das cinco algas marinhas do ensaio anterior. Da mesma forma, o tratamento HPP resultou numa extensão significativa da vida de prateleira das algas para consumo, chegando a 180 dias, especialmente em termos das suas características de odor. É importante ressaltar que o comportamento das algas marinhas ao tratamento HPP e à armazenagem refrigerada apresentou diferenças notáveis entre as cinco espécies estudadas, tanto no que diz respeito aos parâmetros físico-químicos avaliados, quanto ao nível dos VOCs [43], [245].

Complementarmente, Picon *et al.* [145] avaliaram a diversidade bacteriana em seis espécies de macroalgas frescas comestíveis (*L. ochroleuca* do primeiro ensaio, mais as 5 macroalgas do segundo ensaio) submetidas ao HPP e ao armazenamento por 180 dias a 4 °C [43], [44]. A análise identificou uma vasta diversidade bacteriana entre os 1.029 isolados, provenientes de todas as algas marinhas avaliadas. O HPP resultou em uma diminuição significativa dessa diversidade bacteriana, imediatamente após o tratamento, reduzindo o número de ordens, famílias, géneros e espécies identificados. Adicionalmente, o armazenamento refrigerado, tanto do controlo como das algas tratadas por HPP, resultou em uma redução da diversidade bacteriana em todos os níveis taxonómicos anteriormente mencionados.

O propósito da pesquisa de Mateluna *et al.* [267] foi o de analisar o impacto de diferentes métodos de processamento, térmicos e não-térmicos, sobre as características texturais da alga chilena *Durvillaea antarctica* (Phaeophyceae), levando em conta certos componentes químicos cruciais e sua microestrutura. Foi observado que tanto os métodos tradicionais de processamento, como o tratamento térmico e os ciclos de congelamento e descongelamento, quanto os métodos inovadores, como o uso de

ultrassom e o HPP, têm a capacidade de amaciar a textura da alga marinha em graus variados, que são influenciados pelos valores e parâmetros de processamento escolhidos. Especificamente, a aplicação do HPP a 600 MPa por um período que variou de 1 a 3 min, induziu mudanças texturais significativas. Esses resultados foram consistentemente corroborados por mudanças microestruturais, que foram detetadas através de análises com microscopia eletrônica de varredura, mostrando evidências de danos ao nível celular de *D. antarctica*.

Por fim, Zhu *et al.* [268] em seu estudo exploraram vários métodos de processamento, incluindo o HPP, a salga e o branqueamento, de maneira a examinar os efeitos destes tratamentos pós-colheita na durabilidade e preservação das espécies de algas castanhas *Ascophyllum nodosum* e *Alaria esculenta* (Phaeophyceae). Além disso, foi adotada a técnica de sequenciamento genético 16S RNA, para caracterizar o microbioma presente na superfície dessas algas coletadas na costa irlandesa. Com relação às condições de armazenamento, foi sugerido que uma temperatura reduzida (4 °C) seria o ideal.

Observou-se que, apesar de os diferentes métodos de tratamento não terem exercido grande influência na diversidade microbiológica das algas, o tratamento por alta pressão (HPP) mostrou-se particularmente eficaz. Isto foi evidenciado pelo facto de que as contagens de microrganismos viáveis permaneceram em níveis aceitáveis após 30 dias de armazenamento, sugerindo que o HPP é uma técnica promissora para a conservação das algas marinhas.

4.2 Ensaio HPP | Materiais e Métodos

Este trabalho visa avaliar como o processamento por altas pressões hidrostáticas afeta a conservação das qualidades físico-químicas e de segurança alimentar de duas variedades de algas marinhas, notadamente “chorão-do-mar” (*Codium tomentosum*, Chlorophyta) e “erva-malagueta” (*Osmundea pinnatifida*, Rhodophyta). Utilizando-se das instalações da Universidade de Aveiro, as algas foram submetidas ao tratamento por HPP a 600 MPa por 5 minutos e armazenadas sob refrigeração (4 °C) por um período de 15 dias. A investigação incluiu análises colorimétricas, microbiológicas (contagem de microrganismos como mesófilos totais, bactérias heterotróficas marinhas, enterobactérias, fungos e leveduras), além da análise de compostos orgânicos voláteis, por meio de GC-TOF-MS, para entender as principais alterações provocadas pelo tratamento no perfil de aroma das algas estudadas.

4.2.1 Processamento das Matérias-primas

As matérias-primas usadas no ensaio foram processadas consoante o protocolo descrito na **Secção 2.2.1**, sendo seleccionadas para o presente ensaio as algas apresentadas nas **Figuras 4.3A e B**: “chorão-do-mar” (*C. tomentosum*) e “erva-malagueta” (*O. pinnatifida*), respetivamente. Depois de recolhidas (Buarcos, Figueira da Foz) e tratadas (Universidade de Coimbra), no dia posterior, as algas marinhas transportadas para a Universidade de Aveiro, onde foram processadas por altas pressões. Metade as amostras ficaram armazenadas no local, para que fossem realizadas as análises microbiológicas, e o restante das amostras foi transportado para o laboratório da FCT NOVA onde foram realizadas as demais análises.



Figura 4.3 Algas marinhas frescas logo após serem colhidas em seu habitat natural:

[A] *Codium tomentosum*; [B] *Osmundea pinnatifida*; [C] Cabo do Mondego, Figueira da Foz.
Fontes: [A] Patrícia Gabriel; [B] Bruno Moreira-Leite; [C] Vítor Junqueira.

4.2.1.1 Controlo

Assim que chegaram a Universidade de Aveiro, metade das algas marinhas foi pesada (100 ± 1 g) e envasada em 6 sacos de poliamida/polietileno (PA/PE, dimensões 300 x 400 mm, 90 μ m de espessura) [Sammic, Espanha] com ar atmosférico (0,1 MPa). Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C), sendo metade na FCT NOVA e o restante na Universidade de Aveiro, por períodos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. No final de cada um destes períodos, as amostras para análise foram congeladas em azoto líquido, envasadas em vácuo (99%) e conservadas a -45 °C até posterior análise.

4.2.1.2 HPP

Assim que chegaram a Universidade de Aveiro, metade das algas marinhas foi pesada (100 ± 1 g) e envasada em 6 sacos de poliamida/polietileno (PA/PE, dimensões 300 x 400 mm, 90 μ m de espessura) [Sammic, Espanha] com ar atmosférico (0,1 MPa). As amostras foram imediatamente processadas a 600 MPa durante 5 min à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) no equipamento de altas pressões [Modelo 55, Hiperbaric, Espanha] da Universidade de Aveiro, realizando-se a descompressão imediata. As amostras foram então mantidas sob refrigeração (4 °C) por 24h, de maneira a reduzir a carga microbiana, assim como induzir a germinação de esporos fúngicos e bacterianos. No dia seguinte, as amostras sofreram um segundo ciclo de processamento, com as mesmas condições anteriormente utilizadas, com o intuito de inativar os esporos que eventualmente germinaram e passaram a estar em sua forma vegetativa (mais vulnerável ao HPP). Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C), sendo metade na FCT NOVA e o restante na Universidade de Aveiro, por períodos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. No final de cada um destes períodos, as amostras para análise foram congeladas em azoto líquido, envasadas em vácuo (99%) e conservadas a -45 °C até posterior análise.

4.2.2 Caracterização Física

4.2.2.1 Colorimetria

Um colorímetro modelo CSM-4 [PCE Instruments, Espanha] foi usado para medir as coordenadas de cor $CIEL^*a^*b^*$. Os parâmetros para a leitura das amostras foram: abertura de 20 mm, iluminante D₆₅ e geometria 45°/0° (iluminação/ângulo de visão). O equipamento foi calibrado para branco antes da coleta dos dados, e as leituras foram feitas logo após a retirada das algas das embalagens. Em cada amostra, 10 réplicas foram medidas contra um fundo branco, e as médias para cada coordenada foram calculadas.

O desvio de cor em relação ao controle (ΔE) foi calculado usando a **Equação 4.1**:

$$\Delta E_{t,d} = \sqrt{\Delta L_{t,d}^2 + \Delta a_{t,d}^2 + \Delta b_{t,d}^2} \text{ ou}$$

$$\Delta E_{t,d} = \sqrt{(L_{t,d} - L_0)^2 + (a_{t,d} - a_0)^2 + (b_{t,d} - b_0)^2},$$

Equação 4.1

onde: L_0 , a_0 e b_0 é a média das leituras das coordenadas (L^* , a^* , b^*) feitas no tempo zero para o controle, ou seja, antes das algas passarem por qualquer tratamento ou armazenamento; $L_{t,d}$, $a_{t,d}$ e $b_{t,d}$ são as leituras feitas após o processamento (t = CTRL ou HPP) e armazenagem das amostras (d = 7, 15, 30, 60 ou 90 dias) [269].

4.2.3 Caracterização Biológica

4.2.3.1 Análise Microbiológica

Os microrganismos “bactérias mesófilas aeróbicas totais” (TAM), “enterobactérias” (ENT) e “leveduras e bolores” (YM) foram quantificados de acordo com as metodologias descritas na ISO 4833-1, ISO 21528-1 e ISO 21527-2, respetivamente [270]–[272]. As “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB) foram quantificadas de acordo com as instruções do meio de cultura (Marine Agar 2216) [273]. Os patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* tentaram ser detetados com base nas metodologias descritas na ISO 9308-1, ISO 6579-1 e ISO 11290-1, respetivamente [274]–[276].

4.2.3.1.1 Quantificação: bactérias mesófilas aeróbicas, enterobactérias, bactérias marinhas heterotróficas e leveduras e bolores

Para evitar contaminação, as amostras foram preparadas numa cabine de fluxo laminar horizontal. Foram usadas 10 g de cada amostra para as análises, sendo estas colocadas assepticamente em um saco misturador estéril e homogeneizadas à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) com 90 mL de solução de Ringer. Após 120 s no aparato *stomacher*, diluições decimais seriadas foram feitas, sendo uma alíquota destas espalhadas ou dispersas pelo método de *pour plate*, de acordo com o protocolo, em placas de Petri de $\varnothing$ 90 mm.

As placas de Petri foram incubadas com os meios *Standard Method Agar* (SMA, ou PCA Agar) a 30 ± 1 °C durante 72 h para TAM, *Violet Red Bile Dextrose Agar* (VRBDA), a 37 ± 1 °C durante 24 h para ENT, *Zobell Marine Agar* (ZMA, ou Marine Agar 2216), a

25 ± 1 °C durante 72 h para HMB e *Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (RBCA) a 25 ± 1 °C durante 120 h para YM.

Apenas as placas contendo, no mínimo, 10 unidades formadoras de colônia (UFCs) e, no máximo, até 300 UFCs, características e não-características foram consideradas para cada diluição, sendo os resultados expressos como log UFC.g⁻¹. O limite de quantificação (LOQ) para o ensaio foi de 2 log UFC.g⁻¹ e o limite de detecção (LOD) foi de 1 log UFC.g⁻¹. O limite máximo para a carga microbiológica considerada no presente estudo foi de 6,48 log UFC.g⁻¹.

4.2.3.1.2 Detecção: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*

Foram usadas 25 g de cada amostra de algas para as análises que detetam a presença ou ausência dos microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A estas amostras foram adicionados 225 mL de *Buffered Peptone Water* ISO, sendo realizada uma incubação a 37 ± 1 °C durante 24 h. Em seguida, inocularam-se placas de Petri com os meios *Chromogenic Coliform Agar* (CCA) a 37 ± 1 °C durante 24 h para *Escherichia coli*, *Xylose Lysine Deoxycholate modified agar* (XLD), a 37 ± 1 °C durante 24 h para *Salmonella* spp. e *PALCAM* (do inglês, *Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Esculin Mannitol*) *Listeria Agar* a 37 ± 1 °C durante 48 h para *Listeria monocytogenes*. Caso fosse detetada a presença ou ausência de alguma UFC específica destes microrganismos, os resultados seriam expressos como sendo “detetado” ou “não detetado”, respetivamente.

4.2.4 Caracterização Química

4.2.4.1 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS)

A preparação das amostras e análises foram realizadas usando o mesmo protocolo descrito na **Secção 3.2.2**.

4.2.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa RStudio, versão 2022.2.1.461 [95], usando ANOVA de dois fatores (tratamento e tempo) totalmente causalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD. Todos os resíduos das séries de dados foram testados para normalidade, simetria, curtose e homocedasticidade. Os resultados foram expressos como média ($\bar{x}$) ± desvio-padrão (s), exceto para a análise de cor em que os resultados são expressos como mediana (Q_2) ± intervalo interquartil (IQR). Dada à natureza dos dados, os parâmetros de cor foram analisados por meio de

testes não paramétricos, de acordo com a metodologia proposta por Elkin *et al.* [277]: ANOVA com a transformação em rankings, alinhados (ART) para verificar as diferenças significativas, seguida da comparação pareada utilizando os contrastes de ART (ART-C), ambos disponíveis no pacote "ARTool" para RStudio. A referência para o nível de significância estatística dos testes foi $\alpha = 5\%$.

Para identificar quais VOCs contribuíram mais significativamente para a caracterização das amostras em termos de voláteis, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), usando o software estatístico The Unscrambler® X, versão 10.5.46461.632 [228]. Os compostos do PCA foram posteriormente analisados usando ANOVA de um fator (período de armazenagem) totalmente causalizado, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD

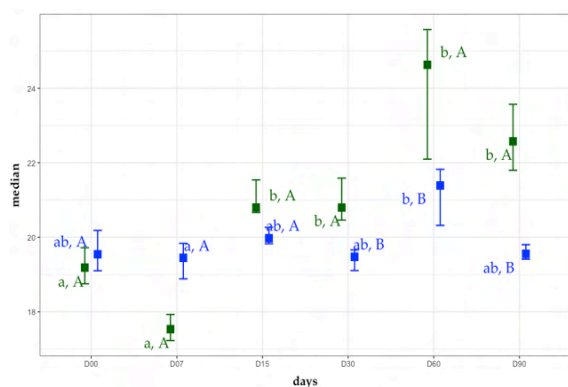
4.3 Ensaio HPP | Apresentação e Discussão dos Resultados

4.3.1 Caracterização Física

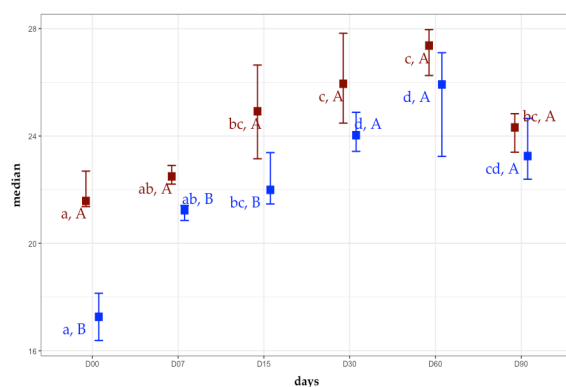
4.3.1.1 Colorimetria

Os resultados referentes à análise colorimétrica no espaço de cores CIELAB encontram-se organizados na **Figura 4.4**. A coordenada L^* é uma medida da luminosidade ou clareza de uma cor, onde L^* varia de 0 a 100, representando, respetivamente, os valores menores as tonalidades mais escuras (preto = 0) e os valores maiores as tonalidades mais claras (branco = 100). A coordenada a^* representa o componente de cor verde-vermelho, onde valores positivos indicam tons de vermelho, e valores negativos indicam tons de verde. A coordenada b^* representa o componente de cor azul-amarelo, onde os valores positivos indicam tons de amarelo e os valores negativos indicam tons de azul. A coordenada ΔE representa a diferença total de cor entre duas medições (no presente estudo, o controlo no dia 0) e, quanto maior o valor de ΔE , maior a diferença percebida entre as cores.

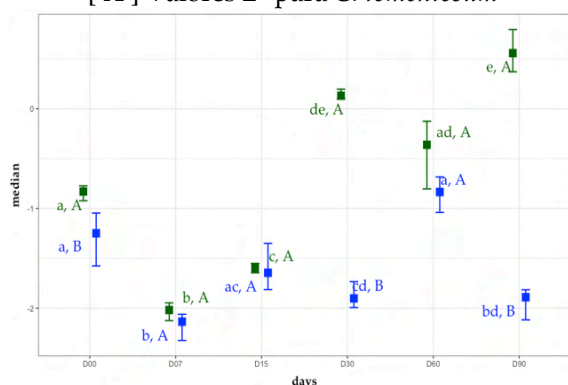
Para a coordenada L^* da alga *C. tomentosum* (**Figura 4.4A**), os grupos CTRL e HPP mantiveram-se sem diferenças significativas nos primeiros 15 dias. No entanto, a partir do dia 30, observam-se diferenças significativas entre as algas tratadas (HPP) e não-tratadas (CTRL). O grupo CTRL, após uma diminuição inicial na luminosidade não significativo, exibe um aumento ligeiro e progressivo, apontando para uma evolução em direção às tonalidades mais claras. Por outro lado, no tratamento HPP, não há diferenças significativas entre os valores de L^* , excetuando-se os dias 7 e 60.



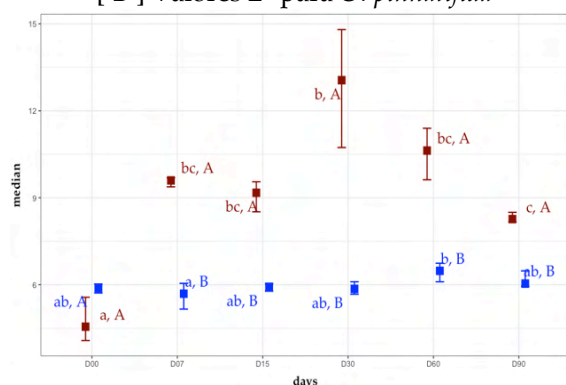
[A] Valores L^* para *C. tomentosum*



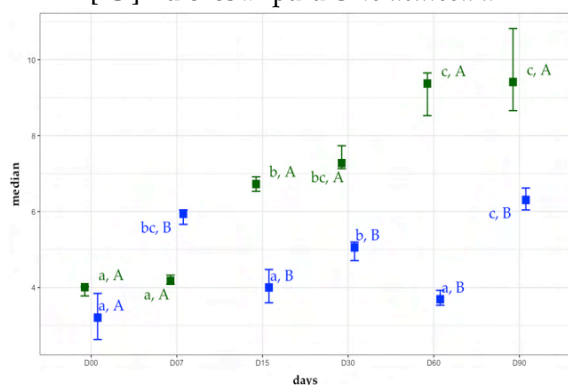
[B] Valores L^* para *O. pinnatifida*



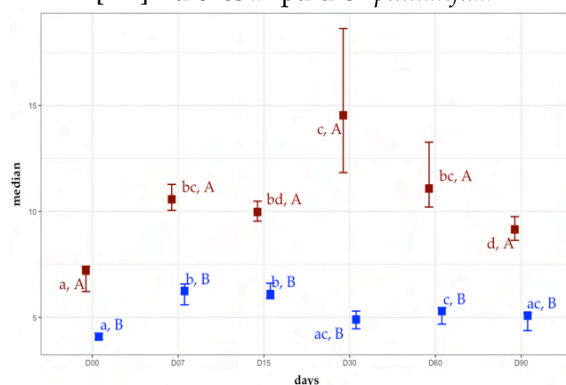
[C] Valores a^* para *C. tomentosum*



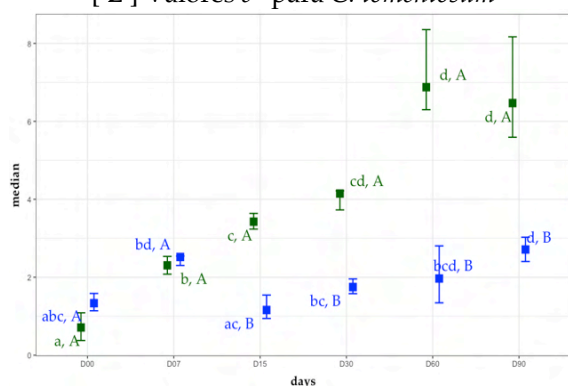
[D] Valores a^* para *O. pinnatifida*



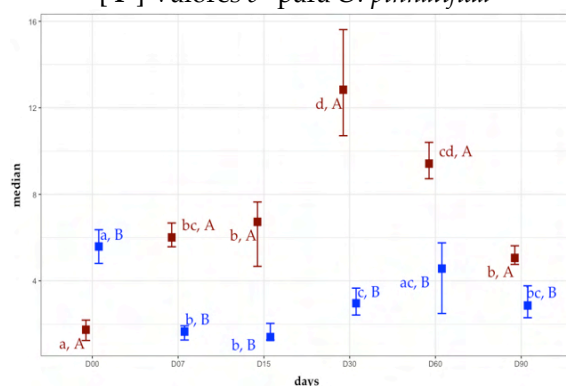
[E] Valores b^* para *C. tomentosum*



[F] Valores b^* para *O. pinnatifida*



[G] Desvio da cor (ΔE) de *C. tomentosum*



[H] Desvio da cor (ΔE) de *O. pinnatifida*

Figura 4.4 Valores das coordenadas CIELAB para *C. tomentosum* e *O. pinnatifida* preservadas por HPP e o seu Controlo ao longo dos dias de armazenamento

Os valores para o controle de *C. tomentosum* CT-CTRL estão em verde, os do controle de *O. pinnatifida* OP-CTRL estão em vermelho e os das algas tratadas por HPP estão em azul.

Os resultados são expressos como as coordenadas CIELAB para L^* , a^* , b^* e ΔE .

Notas: Medianas (Q_2) e intervalo interquartil (IQR) das determinações do duodécuplo em cada experimento. Medianas seguidas por letra minúscula diferente são significativamente diferentes ($P < 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento. Medianas seguidas por letra maiúscula diferente são significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Relativamente à coordenada a^* (**Figura 4.4C**), percebe-se um aumento gradual dos valores com o passar dos dias, sugerindo uma redução do verde em favor de mais vermelho no CTRL. Já no tratamento HPP, o comportamento de a^* é irregular, oscilando entre -2,135 e -0,835, uma variação que parece derivar da heterogeneidade das amostras. Há ainda alguma inconsistência quanto aos valores de a^* para os tratamentos, observando-se uma alternância entre períodos em que há diferenças significativas (dias 0, 30 e 90), e outros onde não houve diferenças entre os tratamentos (dias 7, 15 e 60).

No que se refere à coordenada b^* (**Figura 4.4E**), a diferença entre os tratamentos torna-se significativa a partir do dia 7. O CTRL revela um incremento contínuo dos valores de b^* ao longo do armazenamento, passando de 4,009 para 9,412, que é o indicativo de uma intensificação dos tons amarelos; enquanto em HPP, os valores de b^* não apresentaram uma tendência clara, oscilando entre 3,208 e 6,307. No entanto, no dia 90, foi observado um valor estatisticamente diferente, que também aponta na direção de uma coloração mais amarelada.

Quanto à coordenada ΔE (**Figura 4.4G**), no geral, verifica-se um aumento na diferença de cor ao longo do tempo em ambos os grupos, porém, com muito mais intensidade nas amostras do CTRL (6,469 vs. 2,712 em HPP). A partir do dia 15, a diferença na coordenada ΔE entre os tratamentos torna-se estatisticamente significativa. Enquanto a aplicação de HPP parece ter um impacto nas coordenadas de cor mais acentuada perto do final do período de armazenagem, em CTRL, nota-se um afastamento gradual e significativo do perfil de cores a partir da primeira semana de armazenagem. As amostras sujeitas ao tratamento HPP exibem cores mais claras, tons mais verdes e menos amarelados em comparação com o CTRL. Além disso, verifica-se um alargamento dos valores de ΔE à medida que o tempo avança, evidenciando uma alteração cromática mais pronunciada no grupo CTRL. Esses resultados indicam que a aplicação do HPP permite preservar melhor as cores, comparativamente às algas não-tratadas (CTRL).

Para *Osmundea pinnatifida*, os valores L^* (**Figura 4.4B**) aumentam com o tempo de armazenagem até o dia 60, quando parecem começar a declinar, apesar da diferença não ser significativa deste para o último período de amostragem (dia 90). Após o

tratamento HPP, o valor de L^* sofre uma diminuição (ou escurecimento, representando pela mudança de 1,323 para 1,762), mas esta diferença entre os tratamentos só é significativa até o dia 15, a partir do qual os valores parecem convergir. Assim sendo, pode-se observar um clareamento para ambas as algas tratadas (HPP) e não-tratadas (CTRL), com maior ênfase no segundo grupo. No caso da coordenada a^* (**Figura 4.4D**), a partir do dia 7 nota-se diferenças significativas entre o CTRL e HPP. Enquanto os valores para HPP permanecem relativamente estáveis – não há diferenças significativas entre os dias, exceto pelo dia 60 em relação ao dia 7 – os valores de a^* para o CTRL aumentam até o dia 30 (de 4,550 para 13,057), quando começam a declinar até o fim do período de armazenagem (8,265). Para b^* (**Figura 4.4F**) nota-se um comportamento muito semelhante, com valores que crescem no CTRL até o dia 30 (de 7,203 para 14,539) e depois começam a declinar até atingir 9,149 no dia 90 de armazenagem. Em termos das cores, pode-se deduzir que houve um aumento nos tons de vermelho e amarelo, em particular, nas amostras do CTRL.

Por último, ao observar os valores para ΔE (**Figura 4.4H**) de *O. pinnatifida*, percebe-se que as amostras sujeitas ao tratamento HPP possuem diferenças significativas, em relação ao CTRL, desde o início do período de armazenagem. Inicialmente, este tratamento parece impactar minimamente na cor e, nos dias 7 e 15, a alga parece recuperar o seu perfil cromático (valores de 1,654 e 1,402, respectivamente), já que valores inferiores a 2 são considerados como uma diferença perceptível muito pequena. Apesar de ser observado um valor mais alto de 4,566 para o ΔE no dia 60, deve-se lembrar que houve também um maior desvio (IQR de 3,264) nas amostras. Ainda assim, no final do período de armazenagem (que não é estatisticamente diferente dos dias 30 e 60), o valor para o ΔE possuía uma mediana de 2,860, o que implica em pequenas diferenças perceptíveis. O HPP claramente preserva melhor as cores, em comparação com as amostras não-tratadas (CTRL). Esse efeito de preservação parece ainda ser mais evidente em *C. tomentosum* relativamente a *O. pinnatifida*.

Del Olmo *et al.* [43] em seu estudo sobre a conservação por altas pressões de *Codium fragile*, igualmente não encontrou diferenças significativas para a luminosidade (L^*) entre controle e o tratamento por HPP a 600 MPa nos primeiros dias de armazenagem, havendo somente diferenças significativas após 30 dias. Tampouco houve diferenças significativas ao longo do tempo, excetuando-se o tratamento a 600 MPa após 180 dias de armazenagem. Relativamente à coordenada a^* , só houve diferenças significativas entre o controle e HPP após 120 dias de armazenagem, não havendo ainda diferenças significativas entre os dias de armazenagem para ambos o controle e o tratamento a 600 MPa. Em relação à coordenada b^* , houve diferenças relevantes entre o controle e HPP desde o primeiro dia de processamento, havendo

uma diminuição de $0,53 \pm 0,16$ para $-3,61 \pm 0,66$ nos valores deste parâmetro, o que implica num aumento das tonalidades azuladas na alga processada. Além disso, apesar de não ter havido diferenças entre os dias de armazenagem para o controlo, a partir do dia 30 foi notada uma diferença significativa no valor de b^* para *C. fragile* com uma tendência na direção das tonalidades mais amareladas.

Estes mesmos autores não estudaram o efeito das altas pressões e do armazenamento de longo-prazo sobre a alga *O. pinnatifida*, porém, avaliaram o seu efeito sobre a macroalga vermelha *Chondrus crispus* (Rhodophyta). Os resultados de Del Olmo *et al.* [43] apontam que não há diferenças significativas entre os tratamentos e o tempo de armazenagem para os valores da coordenada L^* de *C. crispus*. Em relação ao parâmetro a^* , foram observadas diferenças significativas, a partir do dia 15, entre o tratamento HPP a 600 MPa e o controlo, refletido em um aumento nos valores desse parâmetro, enquanto o tempo de armazenagem pareceu influenciar as amostras a partir do dia 30. Notou-se um aumento substancial dos valores de a^* , a partir do dia 15, que atingiu quase o triplo ($7,71 \pm 1,15$) para o último dia de armazenagem, relativamente ao valor inicial de $2,68 \pm 0,83$. Finalmente, para os valores da coordenada b^* , foram detetado um aumento significativo nos valores do tratamento HPP a 600 Mpa, em relação ao controlo logo após o processamento, não havendo alterações consideráveis durante o tempo de armazenagem.

Estes resultados estão parcialmente em acordo com os obtidos no nosso estudo. É preciso destacar que o comportamento das algas marinhas parece variar bastante, consoante o género e até mesmo as espécies, dentre outros critérios, o que poderia explicar algumas diferenças percebidas entre *C. fragile* vs. *C. tomentosum* e *C. crispus* vs. *O. pinnatifida*. Da mesma forma, os próprios autores afirmaram que houve muita variabilidade nos dados, o que acabou por diminuir o poder estatístico de discriminação entre as diferentes amostras [43].

No que diz respeito ao efeito do HPP nos parâmetros de cor, espera-se que as clorofilas e os carotenoides presentes nas algas sejam mantidos, considerando a semelhança estrutural destes pigmentos com os encontrados em vegetais, os quais já demonstraram resistência às condições extremas de pressão. Quanto às variações dos parâmetros de cor durante o armazenamento, essas podem ser parcialmente atribuídas à aclimação dos pigmentos em ambientes com pouca luz, dado que a composição pigmentar das algas marinhas se ajusta conforme a exposição luminosa, o que poderia explicar a tendência em formato de parábola para os parâmetros L^* , a^* , b^* [43].

Não foi possível encontrar muitas referências sobre a conservação refrigerada de algas frescas e o impacto do tempo de armazenagem sobre os parâmetros de cor.

Tampouco há na literatura dados sobre as espécies de algas estudadas. Contudo, alguns artigos podem fornecer algumas informações para auxiliar na compreensão do que ocorreu com os pigmentos no decorrer do tempo.

Ray *et al.* [12] estudaram a composição dos pigmentos (sifonaxantina, trans e cis-neoxantina, violaxantina, dodecenoato de sifonaxantina, β - e ϵ -carotenos e as clorofilas *a* e *b*) de *C. tomentosum* na primavera e no outono, concluindo que os extratos lipídicos totais das amostras selvagens da macroalga apresentaram quantidade significativamente maior de pigmentos totais no outono, quando comparado à primavera. Isso significa que esses pigmentos também se devem alterar consoante as estações do ano, que influenciam diretamente na irradiação solar e na quantidade de nutrientes disponíveis.

Pinheiro *et al.* [31] estudaram o impacto da conservação de *Ulva rigida* – pela secagem ao ar (25 °C), adição de salmoura a 25% e salga seca a 28% e 40% – sobre a qualidade e os parâmetros nutricionais, sendo estes avaliados ao longo de 6 meses de armazenamento. O incremento no valor de a^* pode ser atribuído ao aumento da concentração de carotenoides, enquanto que o valor de b^* é influenciado pela redução ou degradação das clorofilas e, por fim, o aumento em L^* está associado ao clareamento decorrente da perda de pigmentação. A alteração nos níveis de clorofilas pode resultar da perda de água durante a armazenagem, bem como da sua subsequente degradação, levando à formação de compostos como feofitina ou feoforbídeo, de tonalidade entre o verde-oliva e o marrom, acarretando um aumento em a^* . O impacto sobre a coordenada L^* é ambíguo, dado que a perda de clorofilas ocasionaria um aumento desses valores, enquanto a degradação destas em feofitina ou feoforbídeo poderia ter um impacto negativo. Originalmente, a cor verde das algas do filo Chlorophyta ocorre predominantemente pela alta concentração de clorofilas, que mascara a tonalidade amarela dos carotenoides. No entanto, à medida que a clorofila se degrada, a cor amarela dos carotenoides se torna mais evidente, intensificando a coloração amarelada da alga, o que explicaria o aumento em b^* .

A maior coloração avermelhada (aumento em b^*) observada em *C. tomentosum*, parece advir ainda de um aumento nos níveis de certos carotenoides. Tem-se conhecimento de que, sob certas condições, como alta salinidade ou o stress nutricional, algumas algas verdes podem produzir carotenoides avermelhados (astaxantina), como é o caso da microalga *Haematococcus lacustris* (anteriormente *H. pluvialis*) e da macroalga *Ulva* spp. [278], [279]. Não existe referência sobre a extração de astaxantina de *Codium* spp., embora estas algas estejam frequentemente recobertas por epífitas do filo Rhodophyta (por exemplo, *Plocamium cartilagineum*), que tem como pigmento principal a ficoeritrina de coloração avermelhada, além de possuírem uma microbiota abundante em cianobactérias, que também produzem

ficobiliproteínas, que as quais poderiam ser libertadas durante o período de armazenagem [96], [280].

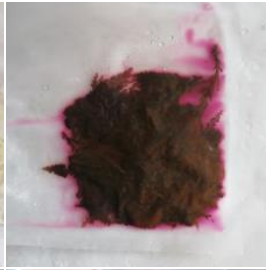
Em relação aos pigmentos de *O. pinnatifida*, constituídos basicamente por ficoeritrina, carotenoides e também pequenas quantidades de ficocianina e clorofila *a*, nota-se que esta alga marinha varia muito em termos de coloração, dependendo de sua localização na costa. As plantas da costa localizadas na parte mais alta são geralmente menores e de cor amarelo-esverdeada, devido à menor presença/necessidade dos pigmentos do complexo antena, em face das melhores condições de iluminação [103], [281].

De forma equivalente a esta análise, Nayyar & Skonberg [282] notaram um aumento nos valores de a^* , que assinala uma intensificação da tonalidade vermelha de *Palmaria palmata* (Rhodophyta). Foi discutido que esta observação não estava alinhada com o esmaecimento da cor vermelha, notado pelo grupo de avaliação sensorial, mas que o enrugamento da alga em conjunto com uma perda de conteúdo intracelular parece explicar o resultado observado.

Liot, Colin & Mabeau [283] também assinalaram uma textura suave e pegajosa, simultaneamente com a presença de um exsudado líquido, rosado e homogêneo de *P. palmata* no sétimo dia de armazenagem refrigerada (2 °C e 7 °C, por 2 semanas) da alga submetida à lavagem com água da torneira. Quanto às algas que não foram lavadas ou que foram lavadas com água do mar, não se registou qualquer alteração relevante durante as duas semanas de armazenagem. Essas alterações de textura e cor são consistentes com o que ocorreu na alga *O. pinnatifida*. Ao se examinar a **Tabela 4.2**, a qual apresenta fotografias de todas as amostras ao longo do período de armazenamento, observa-se, a partir do dia 7, a presença de um exsudado rosado na alga do controlo, que se intensifica ainda mais entre os dias 30 e 60. Talvez essa perda de conteúdo intracelular, rico em ficoeritrina, possa explicar o porquê dos dias assinalados serem aqueles onde se registou os maiores valores para a coordenada a^* .

Paull & Chen [284] também notaram a formação de um exsudado vermelho em *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) no decorrer do armazenamento refrigerado (10 °C, 12,5 °C, 15 °C e 20 °C, por 6 dias), que se tornou visível entre o terceiro e quarto dias, ressaltando que temperaturas inferiores a 15 °C tendem a causar alterações fisiológicas nas membranas e danos mais severos por frio (*chilling injury*).

Tabela 4.2 Mudanças de cor ao longo dos dias de armazenamento para as algas marinhas *C. tomentosum* e *O. pinnatifida* tratadas (HPP) e não-tratadas (Controlo)

	<i>Codium tomentosum</i>		<i>Osmundea pinnatifida</i>	
	CTRL	HPP	CTRL	HPP
Dia 0				
Dia 7				
Dia 15				
Dia 30				
Dia 60				
Dia 90				

Fonte: Jéssica Tavares (Universidade de Aveiro)

Em relação aos danos causados por frio, foi descoberto por Takahashi *et al.* [285] um mecanismo inédito de descoloração em *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). Constatou-se um vínculo direto entre a redução da captação de azoto e o declínio dos níveis de nutrientes intracelulares em *P. yezoensis*, em circunstância de frio intenso, o que pode promover a quebra das ficobiliproteínas. Contudo, os mecanismos exatos de como ocorre essa degradação de ficobiliproteínas ainda permanecem pouco compreendidos.

Lee *et al.* [286] também estudaram o impacto das temperaturas sobre a conservação de *P. yezoensis* e concluíram que temperaturas baixas, porém mais amenas (-5 °C), são capazes de causar danos ainda maiores nos tecidos da alga, comparativamente com temperaturas de super-arrefecimento (-2 °C) e congelamento (-18 °C). A explicação para tal comportamento foi a que, em condições de armazenamento onde as fontes de nutrientes de azoto são limitadas, presume-se que temperaturas reduzidas reprimam o metabolismo e posterguem o consumo das reservas de nutrientes, mitigando, assim, o processo de descoloração. Neste estudo foi ainda registado um aumento dos valores para todos os parâmetros CIELAB durante os 15 dias de armazenagem, de maneira análoga ao que aconteceu com *O. pinnatifida*.

Por fim, deve-se lembrar que os mecanismos que impediram que *C. tomentosum* e *O. pinnatifida* preservadas por altas pressões mantivessem melhor as características cromáticas permanecem desconhecidos, uma vez que os padrões de iluminação, temperatura e disponibilidade de nutrientes foi exatamente o mesmo para ambas as amostras do CTRL e do tratamento HPP. É possível que a inibição de algumas atividades metabólicas pelas altas pressões hidrostáticas ou até mesmo pela redução dos microrganismos presentes, assunto da secção que segue, tenham desempenhado um papel crucial nesta diferença de comportamento entre os tratamentos.

4.3.2 Caracterização Biológica

4.3.2.1 Análise Microbiológica

A literatura científica indica que a eficácia da pressão aplicada durante o HPP varia entre os diferentes tipos de microrganismos presentes em algas (bactérias, fungos e leveduras). A sensibilidade desses microrganismos à pressão, do mais ao menos suscetível, pode ser hierarquizada da seguinte forma: leveduras > fungos (ou bolores) > bactérias Gram-negativas > bactérias Gram-positivas > esporos fúngicos > esporos bacterianos [287].

Esporos são formas de resistência de alguns microrganismos que apresentam uma capacidade notável de sobrevivência, mantendo-se viáveis mesmo após

processos de pasteurização, tanto térmicos como não-térmicos. Alguns esporos bacterianos são conhecidos por suportar pressões hidrostáticas extremamente altas, excedendo os 1.200 MPa à temperatura ambiente [288].

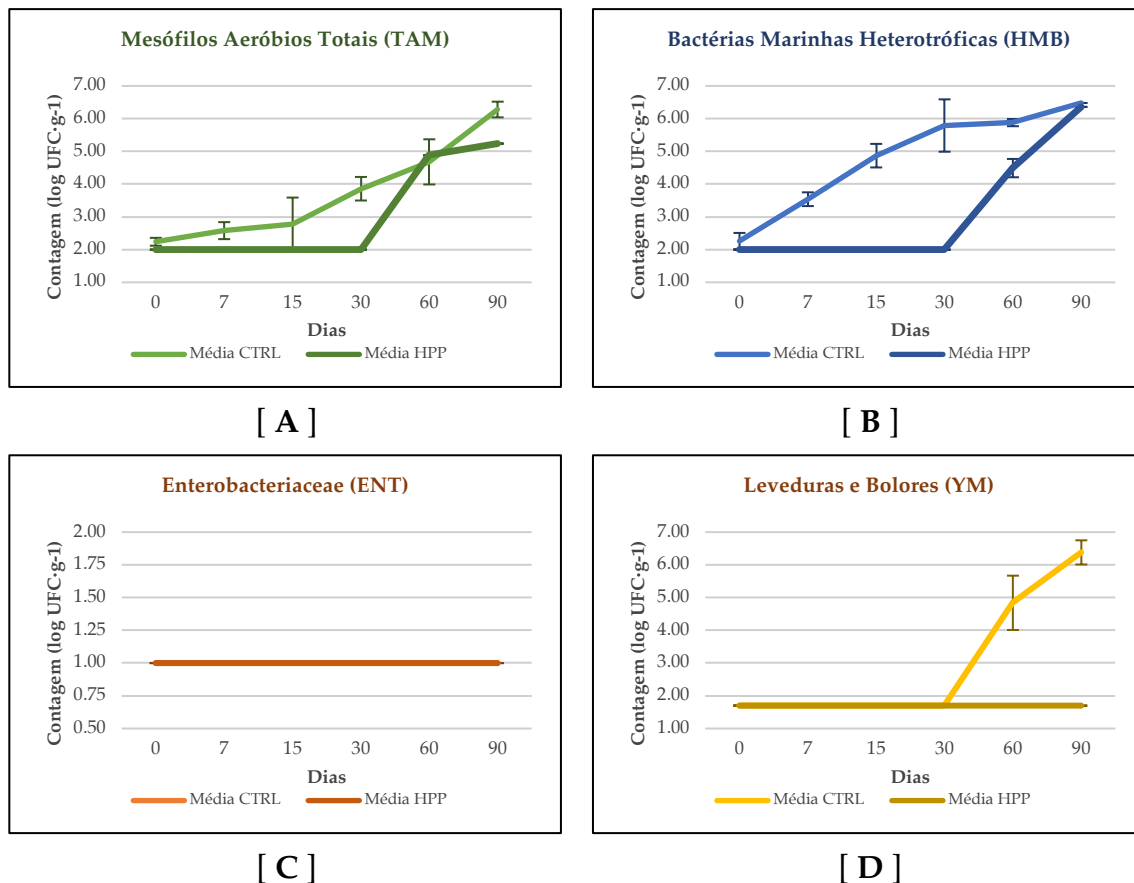


Figura 4.5 Contagens de microrganismos nas amostras do CTRL e HPP de *C. tomentosum* ao longo dos 90 dias de armazenamento: [A] “mesófilos aeróbios totais” (TAM), [B] “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB), [C] Enterobacteriaceae (ENT) e [D] “leveduras e bolores” (YM)

Os resultados estão expressos em log UFC·g⁻¹ ($\bar{x} \pm s$).

A **Figura 4.5** apresenta os dados obtidos, a partir das amostras do CTRL e HPP de *C. tomentosum* para os grupos de microrganismos TAM, HMB, ENT e YM. Na **Figura 4.5A**, nota-se uma diferença expressiva na contagem TAM entre as amostras não tratadas (CTRL) e aquelas tratadas por HPP para os primeiros 30 dias de armazenagem. As amostras CTRL iniciaram com uma contagem microbiana de 2,24 log UFC·g⁻¹, que com o tempo de armazenagem, progrediu até ultrapassar o limite aceitável para consumo, atingindo 6,28 log UFC·g⁻¹ no final do período de armazenagem. Em contraste, as amostras HPP mostraram contagens abaixo do LOQ até o dia 30. No intervalo entre o 30º e o 60º dia de armazenagem, registrou-se um aumento para 4,88 log UFC·g⁻¹, com a contagem continuando a crescer até o dia 90,

onde alcançou $5,24 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$. Este aumento tardio na contagem de TAM nas amostras HPP pode ser atribuído à sobrevivência da microflora bacteriana endêmica de *C. tomentosum*, que possivelmente resistiu à aplicação de dupla pressurização, devido à resiliência dos esporos bacterianos.

As HMB (**Figura 4.5B**) apresentaram um comportamento semelhante ao dos TAM. No entanto, o crescimento das HMB em CTRL foi consistentemente superior em todos os dias de armazenamento em comparação com TAM, atingindo $6,48 \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 90. Quanto às amostras HPP, o crescimento iniciou-se igualmente no dia 30, atingindo uma carga microbiana final de $6,36 \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$. Em relação às ENT (**Figura 4.5C**), observa-se que as contagens permaneceram continuamente abaixo do LOD durante os 90 dias de armazenamento, tanto para as amostras HPP quanto para as amostras CTRL, a exemplo do que aconteceu nas amostras de *O. pinnatifida*. No decorrer dos 90 dias, a proliferação de YM nas amostras HPP manteve-se abaixo do LOQ, estabelecido em $1,70 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, conforme ilustrado na **Figura 4.5D**. Em oposição, nas amostras do CTRL, a proliferação de YM foi notada a partir do dia 30, culminando numa contagem de $6,38 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ dos 90 dias de armazenamento. Este crescimento atrasado nas amostras do CTRL pode ser devido à presença de esporos de fungos, que possuem um desenvolvimento mais lento e que podem ser favorecidos por um pH mais ácido [289]. Esta tendência é corroborada pelos dados de TAM e HMB para as amostras CTRL, indicando que os meios de cultivo utilizados, não sendo seletivos, permitem a detecção de uma gama diversificada de microrganismos, o que inclui os fungos.

Registe-se que, ao término do período de armazenamento, entre os dias 60 e 90, as contagens microbiológicas TAM e HMB ultrapassaram o limite de segurança alimentar³⁰ de $6,00 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ [290] em ambos os grupos, com o tratamento HPP apresentando, contudo, menores contagens em relação ao CTRL. Assim sendo, pode-se estimar³¹ a vida de prateleira para o CTRL em 81 dias e HPP em 82 dias, em termos de integridade alimentar, tendo como referência as contagens para HMB.

A **Figura 4.6** exibe os resultados correspondentes às amostras do CTRL e HPP de *O. pinnatifida* para os grupos de microrganismos “mesófilos aeróbios totais” (TAM), “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB), Enterobacteriaceae (ENT) e “leveduras e bolores” (YM) ao longo dos dias de amostragem. Em relação ao TAM, apresentado na

³⁰ De acordo com o que a legislação portuguesa estabelece como limite para produtos frescos “minimamente processados”.

³¹ Segundo as regressões polinomiais de 3º grau, onde x = dias e y_n = contagens microbianas, para:

CTRL(y_1) = $2,24234679 + 0,22656139 \cdot x - 0,00432111 \cdot x^2 + 0,00002586 \cdot x^3$ ($R^2 = 0,9981$)

HPP(y_2) = $2,14108544 - 0,05439495 \cdot x + 0,00234513 \cdot x^2 - 0,00001353 \cdot x^3$ ($R^2 = 0,9915$)

Figura 4.6A, houve uma estabilização nas amostras HPP, permanecendo as contagens sempre abaixo do limite de quantificação ($2,00 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$), enquanto nas amostras do CTRL observou-se flutuações moderadas. Levando em consideração o desvio-padrão, podemos deduzir que os valores não se encontraram muito diferentes daqueles auferidos para o HPP.

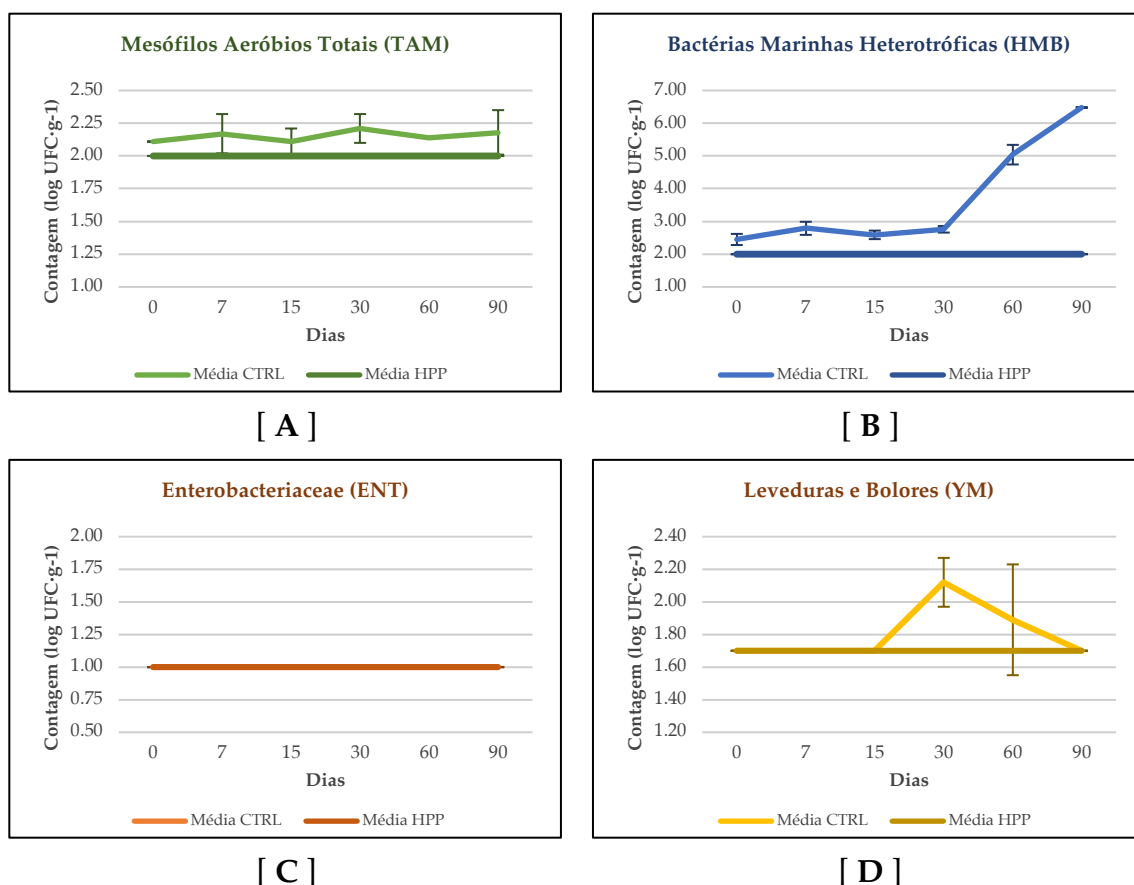


Figura 4.6 Contagens de microrganismos nas amostras do CTRL e HPP de *O. pinnatifida* ao longo dos 90 dias de armazenamento: [A] “mesófilos aeróbios totais” (TAM), [B] “bactérias marinhas heterotróficas” (HMB), [C] Enterobacteriaceae (ENT) e [D] “leveduras e bolores” (YM)

Os resultados estão expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} (\bar{x} \pm s)$.

Porém, para as HMB (**Figura 4.6B**), apesar das contagens no CTRL permanecerem relativamente baixas até o dia 30 de armazenamento, notou-se um aumento notável a partir deste período, fazendo com que as contagens dobrassem de valor do dia 30 para o dia 60 (de 2,76 para 5,04 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) e atingissem 6,48 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 90. Em contraste, as amostras HPP permaneceram continuamente abaixo do LOQ até o final do período de armazenamento de 90 dias.

Pode-se ainda estimar³² a vida de prateleira para o CTRL em 74 dias e HPP em mais de 90 dias, em termos de integridade alimentar, tendo como referência as contagens para HMB. Dessa forma, esses resultados ressaltam o impacto positivo do tratamento HPP sobre *O. pinnatifida*, que inibiu a proliferação de HMB, quando comparado às amostras do CTRL.

Ambas as amostras do CTRL e HPP apresentaram contagens estáveis para o grupo ENT, que se situou sempre abaixo do limite de detecção ($1,00 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$), conforme ilustrado na **Figura 4.6C**. O padrão para YM (**Figura 4.6D**) foi similar ao observado para o TAM e, apesar de um ligeiro crescimento do dia 15 para o dia 30 (de $1,70$ para $2,12 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$), esses valores voltaram a cair até atingirem valores novamente abaixo do LOQ.

Picon *et al.* [145] avaliaram a diversidade bacteriana em seis espécies de macroalgas frescas comestíveis (*C. fragile*, *U. lactuca*, *C. crispus*, *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*) submetidas ao HPP e armazenamento por 180 dias a 4°C [43], [44]. A análise identificou uma vasta diversidade bacteriana entre os 1.029 isolados provenientes de todas as algas marinhas avaliadas. As amostras do controle incluíam uma gama ampla de bactérias, pertencentes a 18 ordens, 35 famílias, 71 gêneros e 135 espécies diferentes. Notavelmente, várias dessas espécies bacterianas nunca haviam sido previamente documentadas, como parte da microbiota associada às algas marinhas. Contudo, o HPP resultou numa diminuição significativa dessa diversidade bacteriana, reduzindo o número de ordens, famílias, gêneros e espécies identificados. Adicionalmente, o armazenamento refrigerado, tanto do controle como das algas tratadas por HPP, resultou numa redução da diversidade bacteriana em todos os níveis taxonômicos mencionados.

Ainda no estudo de Picon *et al.* [145], relativamente à macroalga *C. fragile*, foi estimada uma vida de prateleira, em termos de segurança alimentar, de 30 dias para o controle e de 180 dias para as amostras tratadas com HPP a 600 MPa. Esses valores que são ligeiramente diferentes do que foi encontrado para *C. tomentosum* no presente estudo, mesmo com *C. fragile* possuindo uma carga microbiana ($2,24 \pm 0,12 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) superior à alga *C. tomentosum* ($5,290 \pm 0,62 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) [145]. Assim sendo, a maior vida útil, em termos de segurança alimentar de CT-CTRL parece resultar da menor carga microbiana inicial e do embalamento em vácuo destas amostras que, no estudo citado, não foram seladas. Por fim, deve-se lembrar que se tratam de diferentes espécies e locais de colheita, o que deve ter influenciado a

³² Segundo a regressão polinomial de 3º grau, onde x = dias e y = contagens microbianas, para: CTRL(y) = $2,66001408 - 0,03699456.x + 0,00198068x^2 - 0,00001217.x^3$ ($R^2 = 0,9852$)

composição da microbiota presente em ambas as algas. Consequentemente, a menor vida útil, observada na amostra CT-HPP deve estar relacionada com a alteração da diversidade microbiana promovida pelas altas pressões [145].

Picon *et al.* [145], em relação à diversidade bacteriana de *Codium fragile*, identificaram no início da armazenagem do CTRL 62 isolados bacterianos de 10 famílias diferentes, enquanto, ao final desse período (dia 30), foram contabilizados 34 isolados bacterianos de 6 famílias diferentes. As classes mais abundantes foram γ -Proteobacteria, com 26 isolados e α -Proteobacteria com 24 isolados, ambas do filo Proteobacteria, e Flavobacteria do filo Bacteroidetes, com 9 isolados. As espécies que prevaleceram nas amostras, podem ser visualizadas na **Tabela 4.3** [145]:

Tabela 4.3 Classificação taxonômica das principais bactérias presentes no controle de *Codium fragile* ao início e ao fim do período de armazenagem de 30 dias

Filo	Classe	Ordem	Família	Microrganismos	Isolados	
					Início	Fim
Proteobacteria	α -Proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus homiensis</i>	5	0
				<i>Sulfitobacter litoralis</i>	4	0
				<i>Erythrobacter longus</i>	3	0
	γ -Proteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Cobetia litoralis</i> / <i>amphilecti</i>	16	4
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	8	3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Nonlabens ulvanivorans</i>	5	1
Actinomycetota	Actinomycetia	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Salinibacterium amurskyense</i>	0	7

Fonte: Adaptado de Picon *et al.* [145]

Já para o tratamento HPP, os autores identificaram inicialmente 38 isolados bacterianos de 7 famílias diferentes, enquanto, ao final do período de armazenagem (dia 180), também foram contabilizados 34 isolados bacterianos de 6 famílias diferentes. As classes predominantes identificadas foram Bacilli, do filo Firmicutes, com 26 isolados, e γ -Proteobacteria, com 10 isolados. As famílias e espécies mais frequentes nas amostras foram: Bacillaceae (classe Bacilli), com 23 isolados ao início e 9 ao fim da armazenagem, onde se destacam as espécies *Bacillus licheniformis* (5/4 isolados ao início/final), *Bacillus altitudinis* (4/0) e *Bacillus cereus* (3/3); Pseudoalteromonadaceae (classe γ -Proteobacteria), com 4 isolados ao início e 0 ao fim da armazenagem, onde se destacou a espécie *Pseudoalteromonas distincta* (3/0). Por último, não se pode deixar de mencionar a família Enterococcaceae (classe

Lactobacillales, filo Firmicutes), que apesar de não apresentarem isolados no início, dominaram as amostras ao final da armazenagem com 17 isolados da espécie *Enterococcus faecium* [145]. Esta última espécie é relativamente inócua para o ser humano, sendo utilizada como pré-biótico na ração animal. Entretanto, algumas estirpes resistentes à vancomicina podem provocar surtos de infecção hospitalar [291].

Conforme discutido acima, *Bacillus cereus* foi detetado apenas nas amostras de *C. fragile* submetidas ao tratamento HPP, tanto no início quanto no final do período de armazenamento. Essa bactéria é amplamente encontrada na natureza e pode causar intoxicações alimentares, tanto eméticas quanto diarreicas, sendo classificada como um patógeno de origem alimentar. Já *Bacillus licheniformis*, conhecido por produzir uma gama de enzimas extracelulares que auxiliam na reciclagem de nutrientes no meio-ambiente, foi principalmente isolado das amostras de *C. fragile* tratadas com HPP. Algumas estirpes de *B. licheniformis* são capazes de produzir uma toxina resistente ao calor, o que sugere que esta espécie também possa ser um patógeno alimentar [145]. Por tal razão, é preciso estudar melhor o impacto dos diferentes tratamentos sobre o microbioma das algas marinhas e, desde já, uma redução no tempo de prateleira poderia ajudar na minimização de possíveis fontes de intoxicação alimentar.

No estudo conduzido por Le Pennec & Gall [292], foram identificados doze filos bacterianos associados a *Codium tomentosum*, ordenados por sua prevalência: Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Chlamydiae, Plantomycetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria, Fibrobacteres e Verrucomicrobia. Proteobacteria constituiu 94,6% das bactérias presentes na alga marinha e, dentro deste filo, a classe γ -Proteobactérias foi a mais comum, com 57,9% de incidência, seguida pelas classes α -Proteobactérias (31,0%) e β -Proteobactérias (4,8%), sendo que γ -Proteobacteria também é o filo mais abundante nas macroalgas de uma maneira geral. Bacteroidetes, o segundo filo mais abundante em *C. tomentosum*, foi caracterizado unicamente pela classe Cytophaga, a ordem Cytophagales e a família Cytophagaceae.

A adição de cobre no meio de cultura de *C. tomentosum* favoreceu o florescimento dos gêneros *Pseudoalteromonas* spp. e *Clostridium* spp. Este último, devido à sua toxicidade, representa um risco considerável para a segurança alimentar, especialmente em alimentos frescos destinados ao consumo humano e embalados em condições anaeróbias [292]. Portanto, é fundamental ter uma atenção especial ao local de coleta dessas algas marinhas, para evitar a presença de metais pesados entre outros contaminantes.

Adicionalmente, embora *C. tomentosum* contenha metabólitos com propriedades antimicrobianas [293], a eficácia desses compostos não parece ser tão alta quanto à dos encontrados em *O. pinnatifida*, o que também poderia contribuir para esclarecer as diferenças observadas no controle para o comportamento das duas espécies de algas analisadas.

Não foi possível encontrar uma análise detalhada da microbiota de *O. pinnatifida* e, como alternativa, optou-se por avaliar alguma alga do género *Laurencia* spp., que é geneticamente muito próxima dela [294]. Oliveira *et al.* [295] em sua análise transcritômica da alga *Laurencia dendroidea* (Rhodophyta), detetou que, dentre os isolados microbiológicos obtidos, 17,26% pertenciam ao domínio Bacteria. Nestes, os transcritos bacterianos mais prevalentes foram identificados no filo Cyanobacteria, correspondendo a 35,97%, com destaque para as ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales. Proteobacteria emergiu como o segundo filo mais abundante, representando 32,86% do total, com as classes γ -Proteobacteria e α -Proteobacteria sendo as mais proeminentes. A análise detalhada indicou que a maioria dos transcritos bacterianos está associada a grupos aeróbicos (62,30%) ou aeróbicos facultativos (14,00%). Dessa forma, pode-se deduzir que, para além das altas pressões, o ambiente anaeróbio, no qual as amostras foram armazenadas deve ter colaborado para manter reduzida a carga microbiológica de *O. pinnatifida* durante a armazenagem.

Deve-se salientar que o género *Osmundea* spp. é conhecido pelos seus diversos metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, o que também pode ter contribuído para as baixas contagens registadas ao longo do período de armazenagem. Silva & Pereira [281], em sua revisão da macroalga *Osmundea pinnatifida*, relatam diversos estudos sobre a bioatividade dos extratos desta alga, enfatizando suas propriedades antitumorais, antivirais, anti-protozoárias, antibacterianas, anti-incrustantes e antifúngicas. Ressalta-se também um estudo específico que demonstrou a capacidade de *O. pinnatifida* de produzir substâncias inibidoras das cianobactérias (Cyanophyta), um grupo muito presente no microbioma de várias algas marinhas, incluindo espécies de *Laurencia* spp. Isso indica seu potencial como agente de biorremediação em eventos de proliferação excessiva de algas (*algal blooms*).

No estudo conduzido por Silva *et al.* [296], identificou-se a *Osmundea pinnatifida* como uma fonte potencial de compostos ativos que suprimem o crescimento e a conidiação³³ fúngica, mecanismo chave de disseminação em fungos filamentosos,

³³ Conidiação é o processo pelo qual alguns fungos produzem conídios, que são esporos assexuados. Os conídios são unidades de propagação que se formam na extremidade ou lateralmente em estruturas especializadas chamadas conidióforos. Este processo é uma forma comum de reprodução assexuada em muitos fungos filamentosos, permitindo-lhes dispersar e colonizar novos ambientes [390].

como *Aspergillus fumigatus* (Eurotiomycetes) e *Alternaria alternata* (Dothideomycetes). Esta descoberta ressalta a aplicabilidade da espécie tanto no combate a doenças fúngicas no ambiente quanto como agente conservante em alimentos, prevenindo a contaminação fúngica pós-colheita. Considerando que o trabalho experimental foi iniciado com esporos ainda não germinados, os autores concluíram que o extrato analisado interferiu na esporulação de *Alternaria infectoria* e *A. fumigatus*, embora não tenha afetado o seu processo de germinação. A evidência de um forte atividade antifúngica consegue explicar a diferença no comportamento entre as algas *C. tomentosum* e *O. pinnatifida* em relação aos fungos e bolores, isto é, enquanto na primeira observa-se um crescimento rápido desses microrganismos, possivelmente devido a presença de ascósporos a partir do dia 30 de armazenagem, na segunda, nota-se um crescimento a partir do dia 15, mas que decaí nos períodos de amostragem seguintes, até que as contagens se situem abaixo do LOQ no dia 90.

Os resultados do presente estudo estão alinhados com os dados existentes na literatura, que destacam a diversificada e frutífera composição microbiana inerente às algas marinhas. Essa diversidade e abundância do microbioma são afetadas não somente por flutuações temporais, assim como pelas condições ambientais e pelas características fisiológicas específicas de cada espécie [145], [292]. A detecção de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras (**vide Anexo.A2**), mesmo após o processamento de alta pressão, sugere que o local de coleta das algas pode estar exposto a uma fonte significativa de poluição [297]. Outra hipótese que não deve ser descartada é a de que houve alguma fonte de contaminação durante a manipulação das amostras, tendo em vista que as algas usadas no ensaio do **Capítulo 5** (MAP) foram colhidas no mesmo local e na mesma altura, apresentando contudo, resultados negativos para os mesmos patógenos.

4.3.3 Caracterização Química

4.3.3.1 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis

A análise detalhada dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) identificados revelou uma diversidade significativa, totalizando 102 VOCs únicos para *C. tomentosum*, enquanto para *O. pinnatifida* o número foi maior, com 134 compostos exclusivos.

Conforme pode ser observado na **Figura 4.7**, os aldeídos representaram uma grande parte desses compostos, com 31 VOCs identificados (17 insaturados, 7 saturados, 5 aromáticos e 2 terpenóides) em *C. tomentosum* e 43 VOCs (26 insaturados, 9 saturados, 6 aromáticos e 2 terpenóides) em *O. pinnatifida*. Os álcoois reuniram 21

VOCs identificados (7 saturados, 5 insaturados, 5 ramificados, 2 aromáticos e 2 terpenóides) em *C. tomentosum* e 27 VOCs (7 insaturados, 8 saturados, 4 ramificados, 4 terpenóides, 2 aromáticos e 2 cíclicos) em *O. pinnatifida*. Seguem-se os hidrocarbonetos, que totalizaram 20 VOCs (7 alcenos, 5 alcanos, 3 ramificados, 3 terpenos e 2 cíclicos) para *C. tomentosum* e 26 VOCs (10 alcenos, 5 alcanos, 4 terpenos, 3 aromáticos, 2 ramificados, 2 cíclicos) para *O. pinnatifida*. As cetonas foram representadas por 13 VOCs (5 terpenóides, 3 insaturadas, 2 saturadas, 2 ramificadas e 1 aromática) em *C. tomentosum* e 16 VOCs (5 terpenóides, 4 insaturadas, 3 saturadas, 2 ramificadas, 1 aromática e 1 aciloína) em *O. pinnatifida*. Adicionalmente, 3 e 7 ésteres, foram identificados em *C. tomentosum* e *O. pinnatifida*, respectivamente.

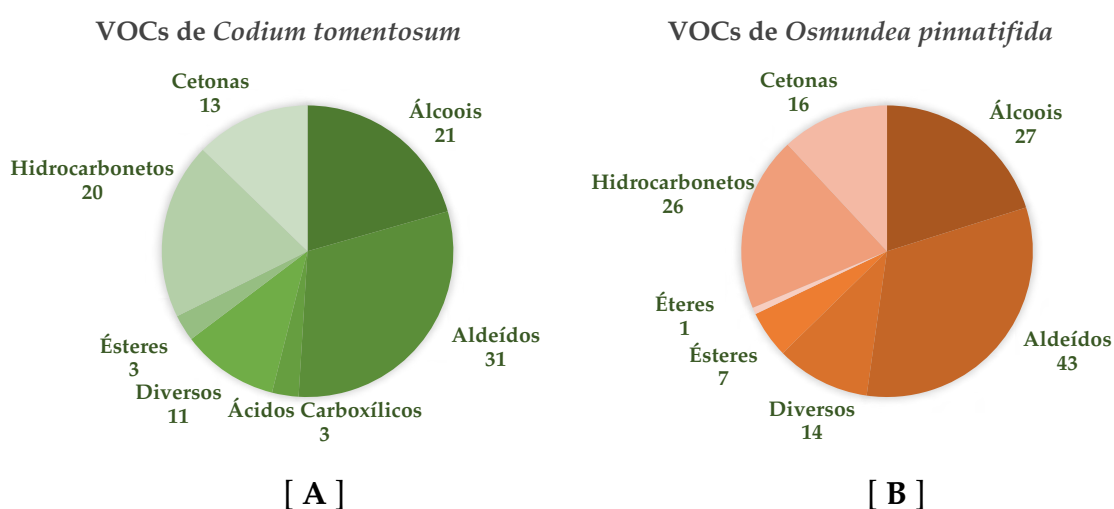
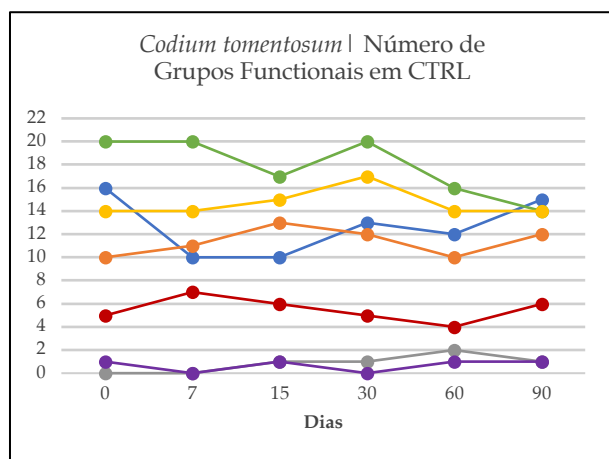
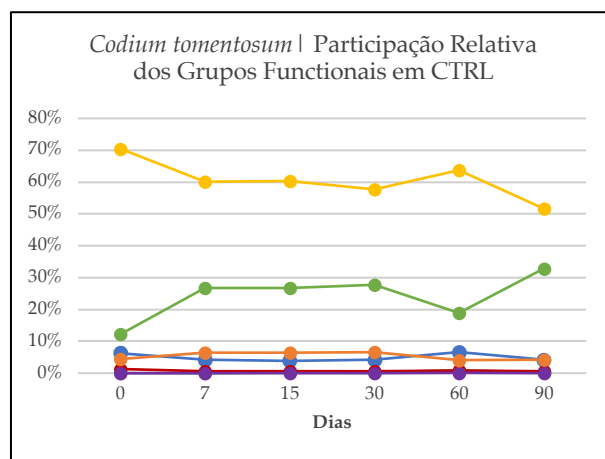


Figura 4.7 Categorias de grupos funcionais e número de VOCs identificados por GC-TOF-MS para as algas marinhas: [A] *C. tomentosum* e [B] *O. pinnatifida*

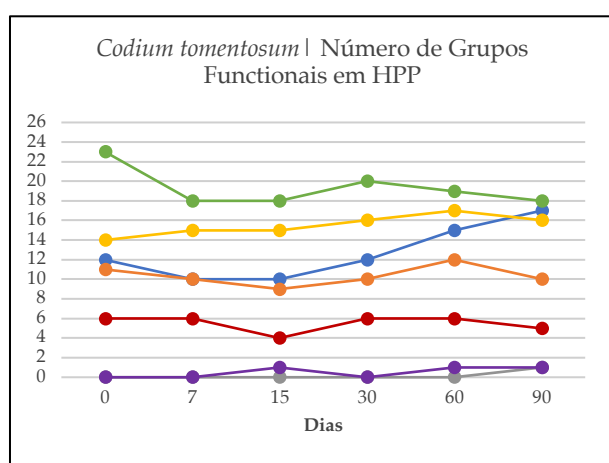
Os grupos funcionais menos representados foram os ácidos carboxílicos, com 3 VOCs em *C. tomentosum*, e éteres com apenas 1 VOC identificado em *O. pinnatifida*. Além desses grupos principais, uma categoria adicional denominada “diversos” foi criada para agrupar os compostos que não se encaixavam nas categorias principais, devido à sua menor frequência ou particularidade, sendo 11 desses VOCs identificados em *C. tomentosum* (3 VOCs halogenados, sendo 2 clorados e 1 bromados, 2 sulfurados, 1 azotado, 2 epóxidos, 1 fenol, 1 furano e 1 pirazol) e 14 VOCs em *O. pinnatifida* (2 VOCs halogenados, sendo 1 bromado e 1 clorado, 2 azotados, 1 sulfurado, 4 furanos, 2 piridinas, 1 fenol, 1 epóxido e 1 indano).



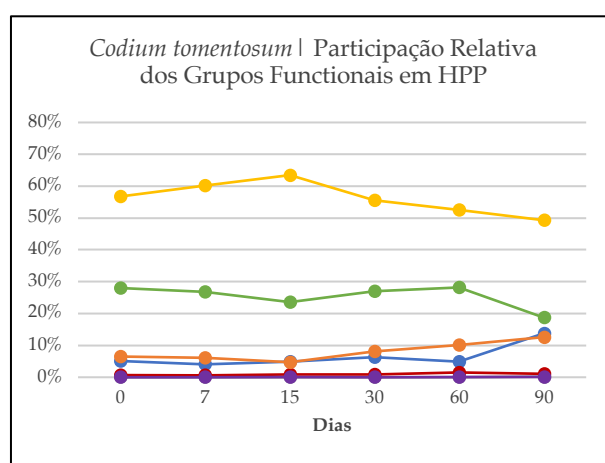
[A]



[B]



[C]



[D]

Figura 4.8 Grupos funcionais em *C. tomentosum*: [A] Número total no CTRL; [B] Participação relativa (%) no CTRL; [C] Número total em HPP; Participação relativa (%) em HPP [D].

As linhas do gráfico para os aldeídos estão em — verde, para os hidrocarbonetos em — amarelo, para os álcoois em — azul, para as cetonas em — laranja, para o grupo diversos em — vermelho, para os ésteres em — roxo e para os ácidos carboxílicos em — cinza.

Em relação ao período de armazenagem (**Figuras 4.8 e 4.9**), observou-se no CTRL de *C. tomentosum* (CT-CTRL) uma maior variação na quantidade dos grupos funcionais ao longo do tempo, comparativamente com o HPP (CT-HPP), enquanto que em *O. pinnatifida* o oposto pareceu ocorrer, isto é, observou-se uma maior variação do tratamento HPP (OP-HPP) em relação ao controlo (OP-CTRL). Em CT-CTRL (**Figuras 4.8A e B**), observou-se que os aldeídos começaram a diminuir em número após 30 dias de armazenamento, mesmo com um aumento expressivo na sua área relativa de 20,6%. Em contraste, os hidrocarbonetos reduziram a sua área em 18,8%, apesar de não se alterarem em termos de número. Os álcoois ainda tiveram uma queda acentuada entre os dias 0 e 7, seguida por um aumento a partir do dia 30, porém, sem mudanças

relevantes em sua participação relativa. Em CT-HPP (**Figuras 4.8C e D**), as alterações mais notáveis foram nos aldeídos, que reduziram em número no início do armazenamento (dia 0).

A área relativa desses compostos só apresentou uma queda acentuada, de aproximadamente 10%, entre os dias 60 e 90. Já os álcoois mostraram um incremento, tanto em número, quanto em participação relativa (aumento de 8,6%) a partir do dia 15. Note-se que a área relativa dos hidrocarbonetos pareceu variar de forma inversamente proporcional à dos aldeídos, tanto em CTRL quanto no tratamento HPP (excetuando-se os dias 60 e 90 de HPP, onde os aldeídos acompanharam inversamente a variação nos álcoois).

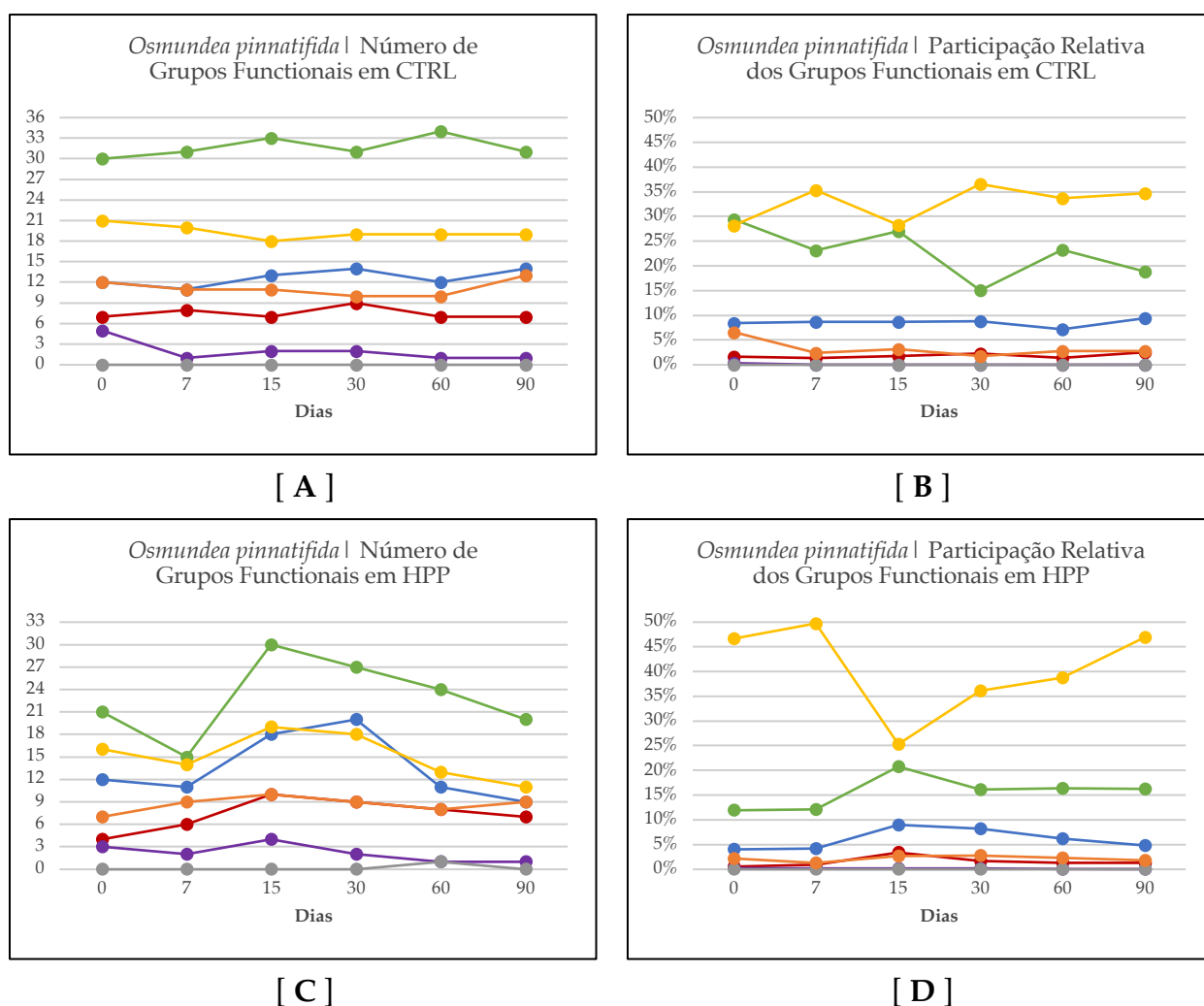


Figura 4.9 Grupos funcionais em *O. pinnatifida*: [A] Número total no CTRL; [B] Participação relativa (%) no CTRL; [C] Número total em HPP; Participação relativa (%) em HPP [D].

As linhas do gráfico para os aldeídos estão em — verde, para os hidrocarbonetos em — amarelo, para os álcoois em — azul, para as cetonas em — laranja, para o grupo diversos em — vermelho, para os ésteres em — roxo e para os ésteres em — cinza.

Em OP-CTRL (**Figuras 4.9A e B**), os principais grupos funcionais mantiveram-se relativamente estáveis em número ao longo do tempo, exceto os ésteres, que diminuíram a partir do início do armazenamento. Em termos de área relativa dos compostos, verificou-se uma queda aproximadamente de 10,5% para os aldeídos e de cerca de 4% para as cetonas, enquanto os hidrocarbonetos aumentaram mais de 6%. Em OP-HPP (**Figuras 4.9C e D**), após uma abrupta queda inicial, o número de aldeídos subiu acentuadamente entre os dias 7 e 15, voltando a decair até ao final da armazenagem, em que o valor atingido foi próximo do número inicial. Um movimento semelhante, porém em menor intensidade, foi observado também para os grupos dos hidrocarbonetos e álcoois.

Quanto à participação relativa desses compostos, observou-se uma queda considerável dos hidrocarbonetos entre os dias 7 e 15, a partir do qual a participação volta a aumentar até atingir, no dia 90, um nível muito próximo ao do dia 0 (46,70% e 46,96%, respetivamente). Registe-se mais uma vez que a participação relativa dos hidrocarbonetos tende a variar de maneira inversa à dos aldeídos, principalmente no CTRL até o dia 30. Já no tratamento HPP, os hidrocarbonetos mostram uma variação inversamente proporcional à soma dos aldeídos e dos álcoois ao longo de todo período de armazenagem. Percebe-se, ainda, que as variações na quantidade de VOCs, pertencentes a cada grupo funcional, não acompanha necessariamente a variação da participação relativa dos grupos funcionais.

Os principais VOCs para *C. tomentosum* (**Figura 4.10**), em termos de abundância, foram principalmente o heptadecano, seguido de benzaldeído, pentadecano, 8-heptadeceno (isómero 1) e α -ionona (nas amostras do HPP). Já em *O. pinnatifida* (**Figura 4.11**), observou-se, mais uma vez, uma maior concentração do heptadecano, seguido de 1-pentadeceno e benzaldeído, com destaque para as amostras tratadas por HPP. Nas amostras do CTRL, distinguiram-se 3,5,5-trimetil-2-hexeno, 2,4,6-octatrieno (isómero 3), 1-octen-3-ol, (2*E*)-octenal, (2*E*,6*Z*)-nonadienal, (2*E*)-nonenal, pentadecanal, tridecanal, (2*E*)-octen-1-ol e 1-octen-3-ona. É oportuno, ainda, mencionar a participação do pentadecano e do ciclopentadecano nas amostras tratadas por HPP.

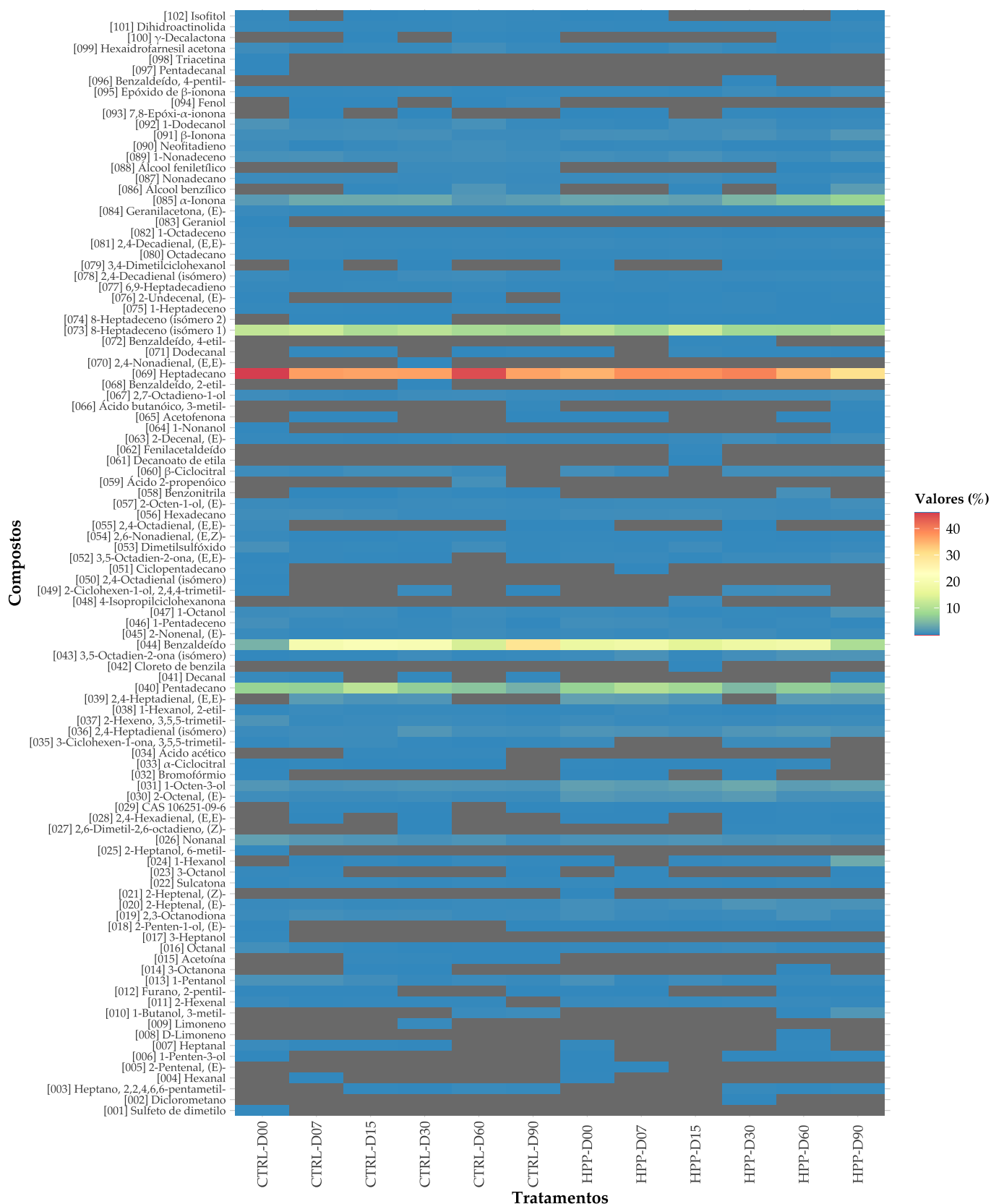


Figura 4.10 Heatmap da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de *C. tomentosum* no controlo e no tratamento por HPP ao longo do tempo de armazenagem de 90 dias

As áreas em cinza referem-se aos compostos não identificados nas respetivas amostras.

Para visualizar o heatmap em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

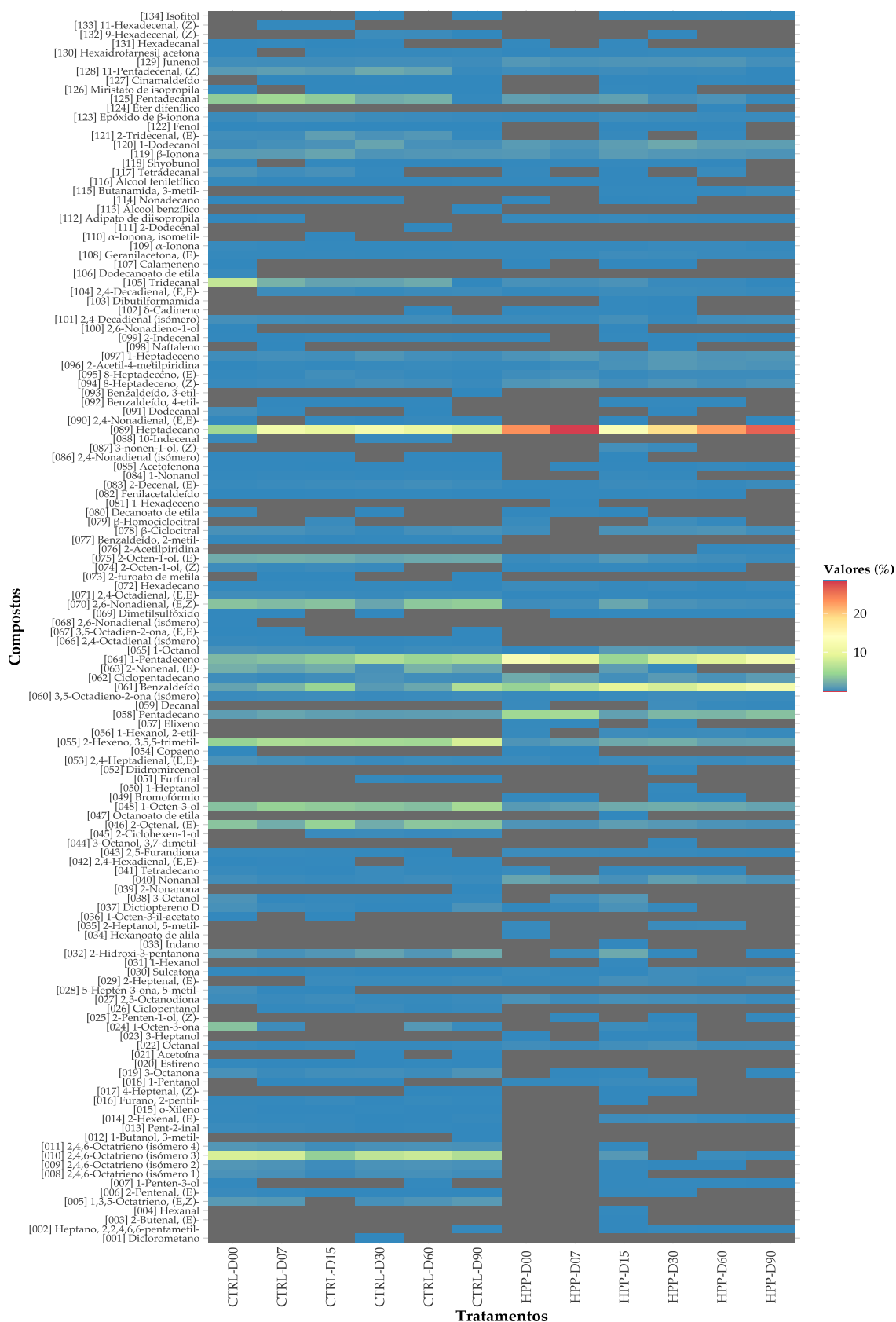


Figura 4.11 Heatmap da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de *O. pinnaefida* no controlo e no tratamento por HPP ao longo do tempo de armazenagem de 90 dias

As áreas em cinza referem-se aos compostos não identificados nas respetivas amostras.

Para visualizar o heatmap em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

Os gráficos da Análise de Componentes Principais (PCA) estão ilustrados nas **Figuras 4.12** (pontuação ou *scores*) e **4.13** (cargas ou *loadings*). No gráfico de *scores* dos componentes principais (PCs) para *C. tomentosum* (**Figura 4.12A**), o eixo de X (horizontal) é o primeiro componente principal (PC-1), que explica 60% da variação nos dados, enquanto o eixo Y (vertical) é o segundo componente principal (PC-2), que esclarece 25% da variação. Juntos, ambos os PCs explicam 85% da variação total nos dados, o que é relevante sob o ponto de vista estatístico. Percebe-se que há uma leve sobreposição entre os grupos CTRL e HPP ao redor do centro do gráfico, o que pode indicar algumas semelhanças entre as amostras, ou uma variação dentro dos grupos que não é completamente explicada pelos PC-1 e PC-2.

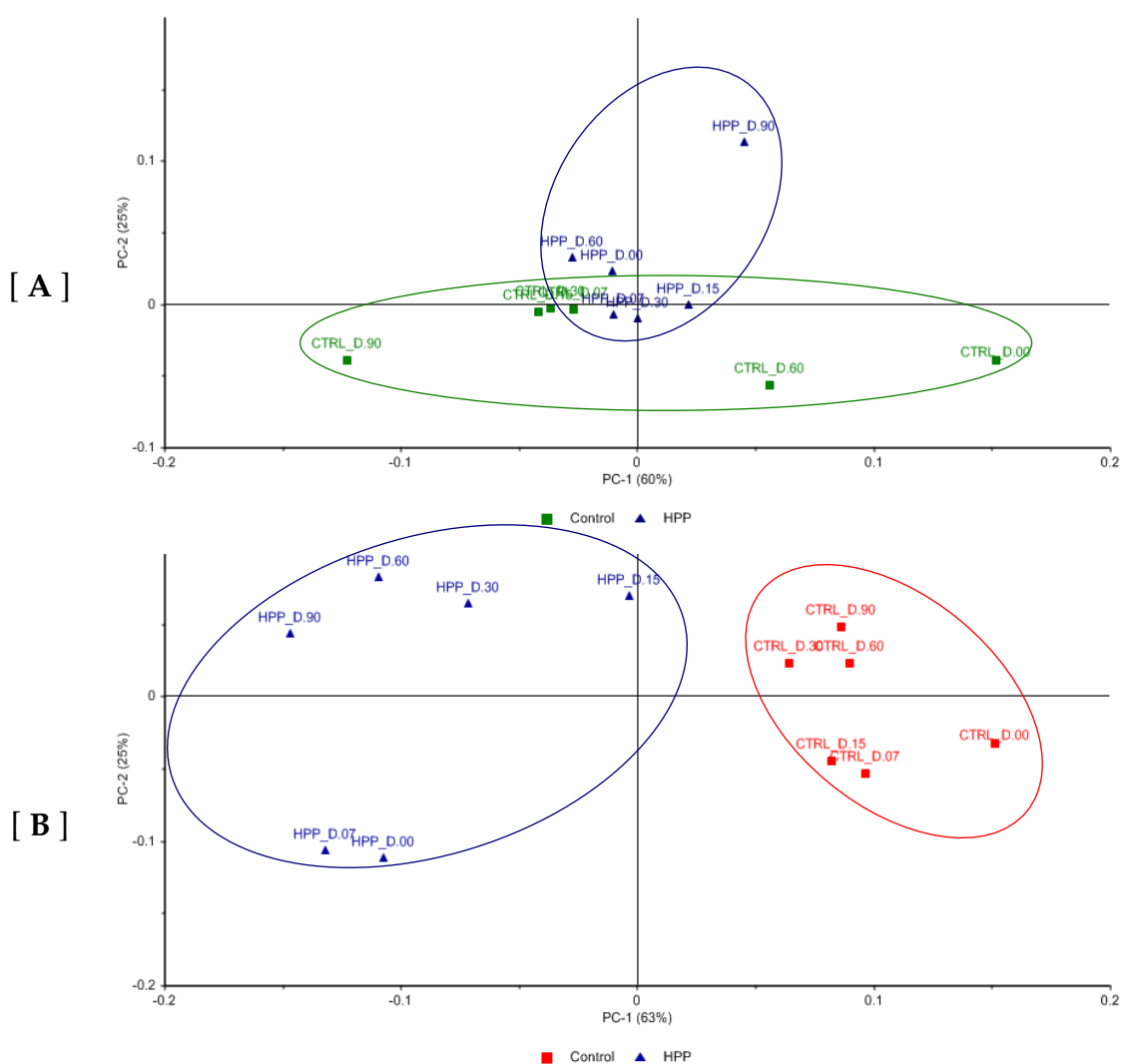


Figura 4.12 Gráficos da PCA contendo os scores das amostras de PC-1 vs. PC-2 para:
[A] *C. tomentosum* e [B] *O. pinнатifida*

Ao avaliar o PC-1, é possível identificar uma separação com relação ao tempo para o CTRL, nomeadamente no que diz respeito aos dias 0 e 90, o que sugere que

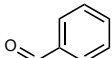
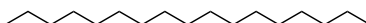
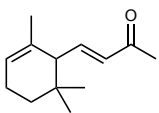
houve alguma modificação durante o período de armazenagem. O PC-2 consegue captar melhor as diferenças entre os tratamentos com o HPP, situado mais no eixo positivo de Y e o CTRL mais no eixo negativo, porém, sem fazer uma separação evidente dentro destes dois grupos (exceto para o HPP no dia 90). Destaca-se que o valor dos *scores* é relativamente baixo – na maioria dos casos entre $\pm 0,1$ – para a PCA, o que pode indicar que a variação captada pode não ser tão relevante.

Olhando para a **Figura 4.12B**, relativa a PCA de *O. pinnatifida*, percebe-se que o PC-1 explica 63% da variação nos dados, o que é bastante significativo, enquanto o PC-2 exprime 25% da variação. Somados, eles explicam 88% da variação total, o que indica que a maioria dos padrões subjacentes aos dados podem ser resumidos nas duas dimensões da PCA. Se, por um lado, não parece haver um padrão claro de como o armazenamento afeta os VOCs dentro dos grupos CTRL e HPP, pois os pontos não seguem uma trajetória linear ou previsível, sugerindo que a alteração dos VOCs ao longo do tempo não é a principal fonte de variação capturada por PC-1, por outro lado, as amostras do grupo CTRL estão localizadas principalmente no lado direito do gráfico e as do HPP estão no lado esquerdo, sugerindo que o PC-1 consegue expressar uma diferença quantificável entre os dois grupos, isto é, que o tratamento HPP impacta no perfil de VOCs. Em relação ao PC-2, a principal informação que a PCA parece transmitir é a de que as amostras, nos primeiros dias do ensaio, tanto para o CTRL (dias 0 a 15) quanto para o HPP (dias 0 e 7) parecem possuir perfil diferentes em relação aos demais dias de armazenagem, isto é, dias 30 a 90 para o CTRL e dias 15 a 90 para o HPP.

O PCA é uma técnica estatística multivariada, é utilizada para examinar as relações entre inúmeras variáveis (neste caso, os VOCs detetados por GC-TOF-MS) e para reduzir a dimensionalidade dos dados mantendo a maior parte da variabilidade original. Ao olhar para o gráfico dos *loadings* (**Figuras 4.13A e B**), percebe-se que apenas alguns dos VOCs parecem distanciar-se da origem e, dessa forma, optou-se por avaliar a variação desses compostos, assim como a relevância deles na caracterização de aroma das algas marinhas *C. tomentosum* (**Tabela 4.4**) e *O. pinnatifida* (**Tabela 4.5**).

de armazenagem, indicando que o tratamento afeta a concentração do benzaldeído de maneira diferente em comparação com as amostras do CTRL.

Tabela 4.4 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de *C. tomentosum* de acordo com a PCA.

VOCs	Dias	<i>Codium tomentosum</i>	
		CTRL	HPP
Benzaldeído CAS# 100-52-7  Limiar: 550 µg/kg	Dia 0	3,874% ± 0,696% ^a	19,042% ± 2,431% ^a
	Dia 7	21,842% ± 2,655% ^{bc}	18,611% ± 0,341% ^a
	Dia 15	20,256% ± 1,426% ^b	15,53% ± 0,341% ^a
	Dia 30	20,085% ± 0,861% ^b	16,99% ± 0,924% ^a
	Dia 60	12,322% ± 2,099% ^d	19,341% ± 0,920% ^a
	Dia 90	28,055% ± 2,120% ^c	7,987% ± 2,163% ^b
Heptadecano CAS# 629-78-7  Limiar: N/D	Dia 0	44,528% ± 2,100% ^a	35,623% ± 0,922% ^a
	Dia 7	36,795% ± 0,115% ^b	37,018% ± 1,578% ^a
	Dia 15	36,578% ± 0,310% ^b	41,832% ± 5,275% ^a
	Dia 30	36,389% ± 0,278% ^b	35,733% ± 5,187% ^a
	Dia 60	44,471% ± 0,346% ^a	35,849% ± 1,713% ^a
	Dia 90	37,399% ± 1,323% ^b	38,064% ± 10,982% ^a
α-Ionona CAS# CAS 127-41-3  Limiar: 4,64 µg/kg	Dia 0	1,655% ± 0,439% ^a	2,807% ± 0,469% ^a
	Dia 7	3,493% ± 0,004% ^b	3,155% ± 0,149% ^{ab}
	Dia 15	3,569% ± 0,164% ^b	2,317% ± 0,352% ^a
	Dia 30	3,448% ± 0,170% ^b	5,407% ± 0,974% ^{bc}
	Dia 60	1,658% ± 0,140% ^a	6,510% ± 0,722% ^c
	Dia 90	2,421% ± 0,343% ^a	7,284% ± 0,694% ^c

Os resultados são expressos como a percentagem (%) da respetiva área do pico em relação à área total do pico. Os limiares de odor na água foram calculados usando a mediana dos valores compilados por Gemert [93].

Para o heptadecano, no controlo, foi observada uma queda inicial, de 44,528% para 36,795%, entre os dias 0 e 7. A presença deste composto permaneceu relativamente estável (média de 36,587%) ao longo do período de armazenagem e retornou ao nível inicial no dia 60. Porém, entre os dias 60 e 90, foi novamente verificada uma queda significativa, de 44,471% para 37,399%. Essa flutuação parece decorrer da atividade microbiana do CTRL e de pequenas perdas durante o armazenamento. Nas amostras tratadas por HPP, o heptadecano também mostra alguma estabilidade (média de 37,353%), com pequenas flutuações ao longo do tempo, mas sem uma tendência clara de aumento ou diminuição, não havendo diferenças

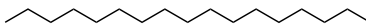
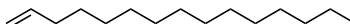
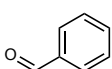
significativas entre os dias 0 e 90. Ressalta-se que foi observado um alto desvio-padrão nas amostras dos dias 15, 30 e 90 ($\pm 5,275\%$, $5,187\%$ e $10,982\%$, respectivamente), o que diminui a capacidade do teste de Tukey em discriminar as diferenças significativas, e sugere alguma inconsistência na medição dos dados.

Para α -Ionona, no controle, foi detetado um aumento do dia 0 ($1,655\%$) para o dia 7 ($3,493\%$), que depois permaneceu estável nos dias 15 e 30 (média de $3,503\%$), voltando a diminuir no dia 60 ($1,658\%$), com um ligeiro aumento não significativo no dia 90. Isso sugere que o composto atinge um equilíbrio em sua concentração em alguma etapa do armazenamento no tratamento do CTRL, mas que há, em dois momentos (dias 7 e 60), algum fator que parece influenciar na concentração desse composto. Já nas amostras tratadas por HPP, foi identificado um aumento significativo da α -ionona entre os dias 30 e 60, que continuou até o dia 90, embora sem diferenças significativas para o último dia de armazenagem. Este aumento progressivo indica que o tratamento HPP pode induzir condições que favoreceram a liberação ou formação de α -ionona ao longo do tempo, eventualmente como consequência de modificações estruturais na matriz celular.

Resumindo, o benzaldeído e a α -ionona são mais voláteis e parecem ser mais reativos sob tratamento HPP, sugerindo que este método pode influenciar a degradação ou a liberação destes compostos. O heptadecano apresentou estabilidade em ambas as condições, indicando ser estável sob as condições de armazenamento ou tratamento (HPP). A variação dos VOCs ao longo do tempo sugere que o HPP pode alterar, mesmo que de maneira limitada, a qualidade sensorial da alga, afetando possivelmente seu sabor e aroma.

Em *O. pinnatifida* (**Tabela 4.5**), no controle (OP-CTRL), as concentrações de heptadecano aumentaram significativamente do dia 0 para o dia 7 (de $6,352\%$ para $12,492\%$) e permaneceram relativamente constantes até o fim do período de armazenagem, com algumas flutuações menores. Há ainda um aumento considerável nos níveis de heptadecano após o tratamento com HPP, a exemplo do que se passou com *C. tomentosum*. Para as amostras HPP (OP-HPP), as concentrações que apresentavam uma tendência de crescimento, diminuem significativamente no dia 15 e voltam a aumentar nos dias 30 e 60, quando os níveis se estabilizam até o final da armazenagem em um patamar próximo ao do CTRL no dia 0. Isso pode indicar uma resposta inicial do metabolismo de *O. pinnatifida* ao stress do tratamento HPP, seguido por uma recuperação e estabilização. Deve-se sublinhar ainda que, apesar das variações observadas, os níveis no tratamento HPP permanecem mais altos do que no CTRL ao longo do tempo.

Tabela 4.5 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de *O. pinnatifida* de acordo com o PC- 1 da PCA.

VOCs	Dias	<i>Osmundea pinnatifida</i>	
		CTRL	HPP
Heptadecano CAS# 62978-7  Limiar: N/D	Dia 0	6,352% ± 1,686% ^a	23,451% ± 0,204% ^{ab}
	Dia 7	12,492% ± 1,247% ^b	29,036% ± 1,196% ^a
	Dia 15	9,349% ± 1,141% ^{ab}	13,135% ± 0,132% ^c
	Dia 30	11,639% ± 0,523% ^{ab}	20,329% ± 2,187% ^{bc}
	Dia 60	11,127% ± 0,974% ^{ab}	24,876% ± 3,374% ^{ab}
	Dia 90	10,181% ± 2,191% ^{ab}	24,226% ± 2,795% ^{ab}
2,4,6-Octatrieno (isómero 3) CAS# 5192-80-0  Limiar: N/D	Dia 0	8,930% ± 0,586% ^a	-
	Dia 7	7,955% ± 0,354% ^a	-
	Dia 15	4,522% ± 0,155% ^b	1,348% ± 0,418% ^a
	Dia 30	7,102% ± 0,305% ^a	-
	Dia 60	8,129% ± 0,788% ^a	0,126% ± 0,178% ^b
	Dia 90	6,684% ± 0,866% ^{ab}	0,072% ± 0,102% ^b
1-Pentadeceno CAS# 13360-61-7  Limiar: 3,600 µg/kg	Dia 0	3,116% ± 0,093% ^a	12,852% ± 0,105% ^a
	Dia 7	3,535% ± 0,008% ^a	10,343% ± 0,45% ^a
	Dia 15	3,635% ± 0,764% ^{ab}	4,539% ± 0,375% ^b
	Dia 30	5,714% ± 0,363% ^c	9,16% ± 1,545% ^{ab}
	Dia 60	4,985% ± 0,218% ^{bc}	9,778% ± 0,917% ^a
	Dia 90	5,535% ± 0,083% ^c	10,345% ± 2,416% ^a
Benzaldeído CAS# 100-52-7  Limiar: 550 µg/kg	Dia 0	1,703% ± 0,007% ^a	4,196% ± 0,537% ^a
	Dia 7	2,886% ± 0,030% ^b	6,085% ± 1,412% ^a
	Dia 15	5,025% ± 0,426% ^c	9,629% ± 0,19% ^{ab}
	Dia 30	1,256% ± 0,131% ^a	7,555% ± 1,105% ^a
	Dia 60	1,809% ± 0,19% ^a	9,422% ± 0,939% ^{ab}
	Dia 90	6,138% ± 0,111% ^d	14,384% ± 3,496% ^b

Os resultados são expressos como a percentagem (%) da respetiva área do pico em relação à área total do pico. Os limiares de odor na água foram calculados usando a mediana dos valores compilados por Gemert [93].

Para o 2,4,6-octatrieno (isómero 3), as concentrações no CTRL diminuíram significativamente no dia 15 em relação ao dia 0 (de 8,930% para 4,522%), porém, no período a seguir (dia 30), os níveis retornaram ao patamar inicial e mantiveram-se relativamente estáveis até o final do período de armazenagem, com uma ligeira tendência para o decrescimento. Em HPP, o 2,4,6-octatrieno, que não foi detetado nos

dias 0 e 7, apareceu no dia 15, voltando a desaparecer no dia 30. Nos dias 60 e 90, o composto foi detetado em concentrações muito baixas e significativamente inferiores àquela verificada para o dia 15. O desaparecimento do composto deve estar relacionado com uma baixíssima concentração nesses períodos de coleta dos dados, o que fez com que o equipamento não conseguisse detetar a sua presença. Além disso, parece haver algum fator, biótico ou abiótico, que fez com que o composto diminuísse no CTRL e surgisse em HPP no dia 30.

O 1-pentadeceno aumentou gradualmente ao longo do tempo em OP-CTRL, apresentando, no dia 30, uma diferença significativa de concentração em relação ao dia 0 (5,714% e 3,116%, respetivamente). Nos dias 30, 60 e 90 foram observadas flutuações menos acentuadas, com um tendência para estabilização da sua concentração em 5% aproximadamente. No caso do tratamento por HPP, observa-se uma concentração inicial de 1-pentadeceno (12,852%), cerca de quatro vezes superior ao CTRL. No dia 15, foi verificada uma redução significativa desse composto (4,539%), que, de seguida, retorna ao patamar anterior, mantendo-se estável numa concentração em torno de 10%. Portanto, após as alterações examinadas, foi registado um valor de equilíbrio nas amostras de OP-HPP (10%), que é cerca do dobro do valor detetado para OP-CTRL (5%).

Por último, o benzaldeído apresentou um aumento gradual até o dia 15 para o CTRL, quando voltou a cair e manteve-se próximo ao patamar inicial nos dias 30 e 60 (média de 1,533%). No último dia de armazenagem, foi detetado novamente um outro pico da concentração, que subiu para 6,138%. Este composto, no início do período de armazenagem para OP-HPP, apresentou um valor cerca de três vezes superior ao do CTRL no dia 0. A sua concentração continuou a crescer ao longo do tempo até atingir o patamar de 14,384% no dia 90. Os valores significativamente mais altos para o benzaldeído, no final do período de armazenagem, para ambos o CTRL e o tratamento HPP, reflete a possível existência de processos metabólicos, internos e/ou ao nível da microbiota, que acabaram por afetar a concentração desse composto.

De forma resumida, o heptadecano apresentou variações significativas ao longo do tempo, tanto no tratamento por HPP quanto no CTRL, com destaque para um pico no dia 7 em ambas as amostras. O 2,4,6-octatrieno (isómero 3), mostrou uma redução significativa no dia 15 no controlo, enquanto que, no tratamento por HPP, esse composto permaneceu em níveis muito baixos, não sendo detetado em diversos dias de amostragem. A presença desse composto foi inconsistente no tratamento HPP, o que é um indício de sua degradação ou alteração química, devido às altas pressões hidrostáticas. Em relação ao 1-pentadeceno, além de um valor quatro vezes superior para a amostra após o tratamento HPP, foram observadas variações parecidas, para este processamento e o controlo, entre os dias 15 e 30 de armazenagem, que

decorreram de alguma atividade que impactou de maneira negativa na concentração do 1-pentadeceno. Por fim, o benzaldeído mostrou um comportamento inconsistente no controlo com dois picos registados nos dias 15 e 90, enquanto as amostras processadas com altas pressões apresentaram um crescimento contínuo ao longo de todo o período de armazenagem.

O PC-2 para *O. pinnatifida* (**Tabela 4.6**) revelou, ainda, a participação de 4 VOCs importantes para se entender uma parte das variações observadas nas amostras da alga. No entanto, esses VOCs (rotulados como compostos “desconhecidos” nº 417, 420, 429 e 433) não puderam ser identificados através da comparação dos espectros de massa com as bibliotecas de voláteis disponíveis. Excetuando-se o facto desses VOCs aparecerem e desaparecerem em momentos diferentes da armazenagem, no momento em que eles eram detetados, a sua concentração pareceu variar pouco ao longo do tempo, sobretudo nas amostras do CTRL. Além disso, a sua presença nas amostras tratadas por HPP foi superior àquela observada para as do CTRL, sendo duas vezes maior, em média. Coincidentemente, no período em que houve deteção de um desses VOCs, verifica-se a ausência de deteção do outro (ou concentrações muito baixas), numa espécie de alternância temporal, mais especificamente para os compostos desconhecidos nº 417 *vs.* nº 420 e para os compostos desconhecidos nº 429 *vs.* nº 433. Esta constatação sugere que se tratam de compostos químicos instáveis e potencialmente menos voláteis – dado que suas concentrações variam minimamente e eles apresentam tempos de retenção elevados – os quais podem degradar-se e resultar na formação de novos VOCs, incluindo estereoisómeros.

López-Pérez *et al.* [33] publicaram um artigo sobre os compostos voláteis e as características de odor de *L. ochroleuca*, processada por HPP, durante a armazenagem de longo-prazo. Ao submeter a alga marinha a HPP de 400 ou 600 MPa por 5 minutos, observou-se uma redução na formação de certos VOCs ao longo dos 180 dias de armazenamento refrigerado. López-Pérez *et al.* [245] estudaram, ainda, o impacto do HPP sobre os compostos voláteis e características de odor de cinco algas marinhas, incluindo *C. fragile* [43]. Segundo os autores, o tratamento HPP a 400 ou 600 MPa impactou, de maneira mais direta, nos compostos voláteis de *C. crispus*, *C. fragile* e *U. lactuca* do que nos de *H. elongata* e *U. pinnatifida*.

O tratamento HPP resultou numa extensão significativa da vida de prateleira das algas para consumo, chegando a 180 dias, especialmente em termos das suas características de odor [245]. Apesar de não estender a vida de prateleira de *C. tomentosum*, o impacto do HPP sobre os voláteis foi bastante limitado, ficando restrito apenas aos VOCs benzaldeído e α -ionona. Uma degustação das algas processadas, num contexto informal, mostrou um impacto quase impercetível sobre o sabor da alga marinha.

Tabela 4.6 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de *O. pinnatifida* de acordo com o PC- 2 da PCA.

VOCs	Dias	<i>Osmundea pinnatifida</i>	
		CTRL	HPP
Desconhecido_417	Dia 0	0,011% ± 0,016%	-
	Dia 7	4,033% ± 0,208%	-
	Dia 15	4,291% ± 0,008%	6,36% ± 0,367%
	Dia 30	4,586% ± 0,829%	7,816% ± 0,147%
	Dia 60	4,362% ± 0,16%	9,231% ± 0,802%
	Dia 90	3,635% ± 1,754%	6,84% ± 0,76%
Desconhecido_420	Dia 0	3,457% ± 0,567%	8,262% ± 0,448%
	Dia 7	-	7,934% ± 0,606%
	Dia 15	0,023% ± 0,033%	-
	Dia 30	0,034% ± 0,048%	-
	Dia 60	-	-
	Dia 90	-	-
Desconhecido_429	Dia 0	-	-
	Dia 7	3,945% ± 0,218%	-
	Dia 15	4,479% ± 0,041%	6,586% ± 0,423%
	Dia 30	4,848% ± 1,182%	8,259% ± 0,287%
	Dia 60	4,83% ± 0,209%	9,685% ± 0,981%
	Dia 90		7,607% ± 0,714%
Desconhecido_433	Dia 0	3,437% ± 1,834%	8,64% ± 0,689%
	Dia 7	3,804% ± 0,478%	8,405% ± 1,069%
	Dia 15	-	-
	Dia 30	-	-
	Dia 60	-	-
	Dia 90	-	-

Os resultados são expressos como a percentagem (%) da respetiva área do pico em relação à área total do pico. Os limiares de odor na água foram calculados usando a mediana dos valores compilados por Gemert [93].

No estudo de López-Pérez *et al.* referido,, ao longo do armazenamento refrigerado das algas submetidas ao HPP, houve um aumento nos níveis de álcoois, ácidos e compostos azotados, enquanto os níveis de aldeídos, cetonas e furanos apresentaram uma diminuição. Uma análise mais detalhada do trabalho, com

destaque para a alga *C. fragile*, revelou uma série de resultados semelhantes ao que foi observado nas amostras de *C. tomentosum* do presente estudo:

- De uma forma geral, os VOCs mais abundantes para as algas estudadas foram os hidrocarbonetos pentadecano, 8-heptadeceno e heptadecano, o aldeído 2-octenal (entre outros) e o benzaldeído, na categoria dos compostos aromáticos, a cetona 1-octen-ona (entre outras), α -ionona juntamente com a β -ionona no contexto das iononas, além do sulfureto de dimetilo e do sulfóxido de dimetilo no grupo dos compostos sulfurados.
- Em termos de número de compostos por grupos funcionais, destaca-se uma diminuição nos aldeídos para o controlo e nas amostras tratadas por HPP de *C. fragile*; enquanto os hidrocarbonetos não se alteraram, os álcoois e os compostos sulfurados diminuíram no controlo ao longo do tempo de armazenagem.
- Em termos de participação relativa, os álcoois mantiveram-se relativamente constantes no controlo e aumentaram, juntamente com os ácidos, nas amostras tratadas por HPP de *C. fragile*.
- Verificou-se, ainda, uma aumento da participação de compostos aromáticos (por exemplo, benzaldeído) imediatamente após o tratamento por HPP e ao longo do período de armazenagem do controlo.

O aumento de muitos compostos, imediatamente após o processamento, parece relacionar-se com a rutura da estrutura celular das algas devido às altas pressões, considerando que na literatura há muitas referências ao aumento na biodisponibilidade de nutrientes e na eficácia da extração de compostos bioativos, mediante tratamentos que envolvem o uso de pressão [267], [298].

O benzaldeído é um composto comumente associado a aromas a de amêndoas amargas e é amplamente utilizado em indústrias de aromas e fragrâncias. Conforme foi discutido no **Capítulo 3**, o processo mais comum para a sua produção em alimentos parece ser a degradação de Strecker do aminoácido fenilalanina [238]. Um aspeto notável, para este composto em *C. tomentosum*, foi a variação significativa, em direções contrárias, na sua concentração ao longo do tempo para as amostras do CTRL (aumento) e tratadas com HPP (diminuição), ao passo que em *O. pinnatifida* foi observado um aumento para ambas as amostras, tratadas e não-tradas. Para as algas do CTRL, o comportamento consistente pode ser relacionado com uma evolução da carga microbiana, que muitas vezes é provida de enzimas proteolíticas capazes de degradar proteínas e aumentar a quantidade de aminoácidos livres, fornecendo, assim substrato para produção de benzaldeído [299]. No entanto, o comportamento

inconsistente do tratamento por HPP em *C. tomentosum* permanece uma questão em aberto.

O heptadecano é um hidrocarboneto saturado, com uma estrutura química bastante estável, devido à presença de ligações simples entre os átomos de carbono, que, apesar de abundante, não parece impactar significativamente no perfil sensorial das algas marinhas [93]. As variações deste composto nas amostras parecem relacionar-se com mudanças no metabolismo da alga, devido ao tratamento ou condições de armazenagem. Está estabelecido que os hidrocarbonetos possuem funções nas algas marinhas de componente estrutural, mecanismo defensivo (contra microrganismos, parasitas, herbívoros, etc.), flutuabilidade e proteção (contra raios UV e o stress oxidativo), comunicações químicas (por exemplo, através de feromonas sexuais), armazenamento de energia e adaptação ao meio ambiente [140], [300], [301].

A α -ionona, um composto volátil frequentemente presente em algas marinhas, tem origem na clivagem oxidativa de pigmentos carotenoides. Por essa razão, elevados níveis de carotenoides geralmente correlacionam-se com uma alta presença de iononas, que se formam em resposta às reações envolvendo a instável estrutura de ligações duplas alternadas característica dos carotenoides. Este composto caracteriza-se por seu aroma adocicado, floral e frutado, sendo reconhecido como um elemento significativo no perfil de sabor das algas marinhas devido ao seu baixo limiar de odor [128], [302]. Na literatura, é possível encontrar referências à capacidade do HPP em promover a ruptura de células, cromoplastos e do complexo carotenoide-proteína em alimentos, aumentando a liberação e extração desses compostos [303]. Somado a isso, têm-se ainda a formação de ROS nas algas em condições de stress (mecânico, no caso do HPP), que são capazes de degradar carotenoides e, por conseguinte, formar VOCs como a α -ionona [304]. Apesar de haver enzimas capazes de converter os carotenoides em outros compostos, tal como a oxigenase de clivagem de carotenoides (CCO), não se sabe ao certo o impacto do HPP sobre elas, levando em consideração que o efeito das altas pressões sobre as enzimas é bastante variável [305].

Kajiwara, Kodama & Hatanaka [306] identificaram que os compostos 1,3,5- e 2,4,6-octatrienos desempenham um papel de hormona sexual, que atrai gametas do sexo masculino para os receptáculos femininos contendo ovos de *Sargassum horneri* (Phaeophyceae). O 2,4,6-octatrieno sintético provocou o mesmo comportamento verificado para os espermatozoides na presença de ovos maduros e do fucosserratenol – sendo o (1,3E,5Z)-octatrieno uma hormona sexual importante para as algas do género *Fucus* sp. Aparentemente, os estereoisómeros desse composto são produzidos a partir da autometátese de 2,4-hexadieno e da isomerização térmica do octatrieno [307], [308].

O 1-pentadeceno é um alceno relativamente comum em algumas espécies de algas marinhas, inclusivamente em *O. pinnatifida*, e que, devido ao seu alto limiar de odor, não parece impactar significativamente no aroma da macroalga [75], [244], [245]. No entanto, não foi encontrada nenhuma referência que explicasse o seu aumento em algas marinhas submetidas a armazenagem refrigerada e, muito menos, tratadas por HPP. Amostras congeladas de peixe branco (*Coregonus clupeaformis*, Actinopterygii), espécie da família do salmão, igualmente rica em gorduras, foram mantidas por um ano a aproximadamente -10 °C, de maneira que houvesse uma considerável degradação dos lipídios presentes. Os resultados desse estudo indicam que o 1-pentadeceno é um dos subprodutos da oxidação de ácidos gordos no peixe branco, considerando que ele não foi detetado nas amostras frescas. No entanto, a origem exata desse composto não foi completamente determinada [309]. Tendo em vista que o 1-pentadeceno demonstrou uma tendência para aumentar nas amostras não tratadas do controlo de *O. pinnatifida*, pode-se considerar que o seu crescimento pode estar relacionado com a sua libertação gradual da matriz celular, além de que não se pode descartar a ocorrência de reações de oxidação lipídica.

De igual modo, verificou-se ainda um grande crescimento do 1-pentadeceno nas amostras, imediatamente após o tratamento por HPP, mas os seus níveis permaneceram relativamente estáveis ao longo do período de armazenagem. Sabe-se que a técnica de HPP é capaz de acelerar a cinética das reações de oxidação lipídica, mas não necessariamente causá-las, o que permite descartar esta possibilidade [310]. O aparecimento de 1-pentadeceno em alimentos já foi identificado como sendo resultante da degradação de embalagens contendo polietileno, dentre outros polímeros [311]–[313]. Assim sendo, uma hipótese mais provável é a de que as altas pressões influenciaram não somente na libertação do composto, como também podem ter ajudado na migração dele do material plástico usado na embalagem das amostras.

Devido à escassez de estudos sobre *O. pinnatifida*, a informação que se encontra disponível é bastante limitada. Sabe-se que as algas do “complexo” *Laurencia* (género ao qual esta alga pertenceu, antes de ser reclassificada) são capazes de produzir uma grande variedade de VOCs, em particular, halogenados [314], [315]. Até recentemente, mais de 5.000 produtos naturais contendo halogênios foram identificados, e cerca de 10% deles são derivados das espécies de *Laurencia* spp. A maioria dos compostos halogenados deste género são caracterizados como acetogeninas C₁₅, sesquiterpenos e diterpenos. No entanto, muitas outras classes estruturais contendo halogênios também foram documentadas na literatura científica [316]. No caso de *O. pinnatifida* (anteriormente *Laurencia pinnatifida*), a situação é semelhante. Uma análise no banco de dados japonês “Laurencia Database” revelou 25 registos de metabólitos secundários associados a esta espécie, dos quais 24 são halogenados [317].

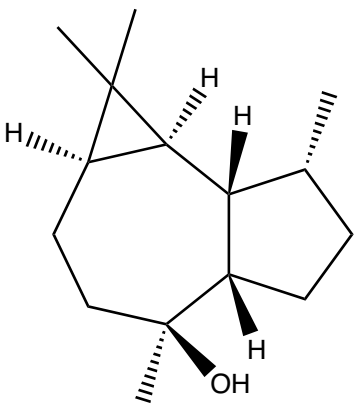
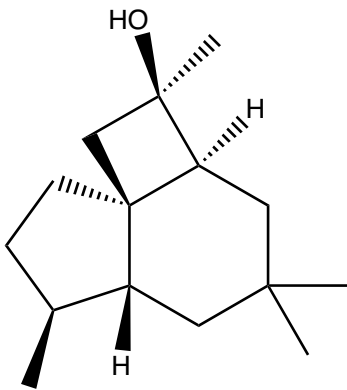
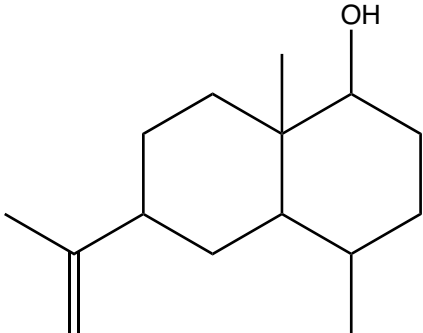
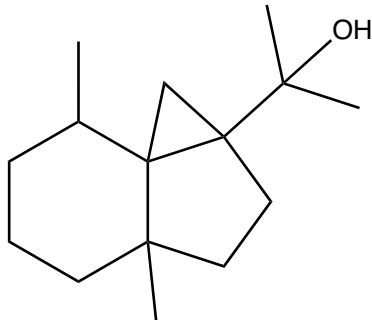
	
[A] Viridiflorol (CAS# 552-02-3) Nome IUPAC: (2R,2aS,5aR,6S,8aR)-2,4,4,6-tetramethyldecahydrocyclobuta[d]inden-2-ol Formula: C₁₅H₂₆O / MW: 222,37	[B] Viridianol (CAS# 158204-40-1) Nome IUPAC: (1aR,4S,4aS,7R,7aS,7bS)-1,1,4,7-tetramethyldecahydro-1H-cyclopropa[e]azulen-4-ol Formula: C₁₅H₂₆O / MW: 222,37
	
[C] 5β,7βH,10α-Eudesm-11-en-1α-ol (CAS# 25826-85-1) Nome IUPAC: 4,8a-dimethyl-6-(prop-1-en-2-yl)decahydronaphthalen-1-ol Formula: C₁₅H₂₆O / MW: 222,37	[D] Cicloeudesmol Nome IUPAC: 2-(3a,7-dimethylhexahydro-1H-cyclopropa[c]inden-1a(2H)-yl)propan-2-ol Formula: C₁₅H₂₆O / MW: 222,37

Figura 4.14 Compostos retornados pela biblioteca NIST de espectros de massa, [A] Viridiflorol e [C] 5β,7βH,10α-Eudesm-11-en-1α-ol, além dos possíveis candidatos para os respectivos compostos não identificados [B] Viridianol e [D] Cicloeudesmol

Não foi possível comparar com espectros obtidos com os dos compostos identificados em *Laurencia* sp., já que os poucos espectros de massa disponíveis foram obtidos por ionização por electrospray (ESI) ao invés de ionização eletrônica (EI) a 70 eV. Na pesquisa realizada usando a biblioteca da NIST, os espectros de massa mais próximos dos compostos não identificados nº 417 e nº 413 eram os do Viridiflorol e do

5 β ,7 β H,10 α -Eudesm-11-en-1 α -ol (**Figuras 4.14A e C**), respetivamente. O viridianol (**Figura 4.14B**) é um forte candidato, visto que possui a mesma massa molecular e fragmentos em comum com o VOC desconhecido n° 417, juntamente com cicloeudesmol (**Figura 4.14D**) para o VOC desconhecido n° 433. Dessa forma, fica para um trabalho futuro a purificação e identificação desses compostos por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H ou ¹³C), espectroscopia de infravermelho (IR) e/ou cristalografia por difração de raios-X (XRD).

4.3.4 Considerações Finais

Nas duas espécies de algas estudadas, as evidências sugerem que o tratamento HPP é superior na preservação dos parâmetros de cor, quando comparado ao CTRL. Contudo, para a alga *O. pinnatifida*, nota-se uma variação mais expressiva nas amostras submetidas ao HPP, isto é, estas apresentam valores mais altos para ΔE , comparativamente com o que se verifica em *C. tomentosum*. Como resultado, observam-se tonalidades mais claras em ambas as algas, mais esverdeadas em CT-HPP, mais avermelhadas em OP-CTRL e mais amareladas para ambas as algas, sobretudo nos controlos (excetuando-se OP-HPP que não possui diferenças estatisticamente significativas relativamente ao CTRL). No caso específico de CT-CTRL, a combinação de cores mais pálidas com um incremento do amarelo e a transição do verde para tons mais vermelhos resultam numa coloração mais alaranjada após os 90 dias de armazenagem. As principais alterações observadas decorrem da alteração nos pigmentos presentes, devido às condições de processamento e armazenagem, com destaque para a iluminação e temperatura, além da ausência de nutrientes.

As análises microbiológicas comprovaram a eficácia da pasteurização por HPP como método de conservação não térmico em macroalgas com fins alimentícios. Observou-se uma diferença significativa na resposta microbiológica entre as macroalgas *O. pinnatifida* e *C. tomentosum*. Nas amostras de *O. pinnatifida* tratadas com altas pressões, houve um controlo eficiente dos microrganismos, mantendo as contagens próximas ao limite de deteção de 2,00 log UFC·g⁻¹. Contudo, nas amostras de *C. tomentosum*, tanto tratadas (HPP) quanto não tratadas (CTRL), registou-se uma maior presença microbiana após os 60 dias de armazenamento, especialmente nos grupos TAM, HMB e YM, embora o tratamento HPP, em geral, tenha apresentado menores contagens microbianas.

É importante salientar que o tratamento HPP parece alterar de maneira expressiva a composição bacteriana e mais estudos são necessários, para identificar se há presença de microrganismos que possam representar um risco à saúde dos

consumidores. Além disso, foram detetados agentes patógenos nas amostras antes e depois do processamento, algo que acende o “sinal de alerta”. Consequentemente, algumas profilaxias podem ser usadas, de maneira a minimizar os possíveis riscos, sendo essas: métodos de preservação que combinem altas pressões e temperaturas (ou outra estratégia dos “obstáculos”) para a eliminação de esporos bacterianos e fúngicos; redução do tempo de prateleira de forma a garantir uma carga bacteriana baixa; monitorização das condições da água no local de colheita, com destaque para o cultivo em IMTA, onde a exposição aos agentes de contaminação pode ser limitada; controlo da higiene e dos procedimentos de manipulação no local de processamento (por exemplo, através da implementação de protocolos do tipo HACCP³⁴).

Para a alga *C. tomentosum*, a análise dos voláteis mostrou que o tratamento HPP influencia a evolução dos VOCs de maneira diferente da do CTRL, com o benzaldeído e a α -ionona apresentando as mudanças mais significativas. Enquanto o benzaldeído diminui no tratamento HPP, a α -ionona aumenta com o tempo, o que deve ocorrer devido às diferenças na estabilidade dos compostos ou nas vias de degradação induzidas pelo tempo de armazenagem e/ou pelo tratamento de alta pressão. No entanto, foram também observadas variações significativas e em sentidos opostos, para ambos os compostos, nas amostras do controlo, devido a agentes que, possivelmente, relacionam-se com a atividade microbiana. O heptadecano, por outro lado, permaneceu relativamente estável em ambos os tratamentos, indicando que sua presença não é tão afetada pelo tratamento HPP ou pelo tempo de armazenagem, comparativamente aos outros dois compostos examinados.

Para *O. pinnatifida*, parece que o tratamento por HPP inicialmente induziu a um aumento na concentração de alguns VOCs, provavelmente como consequência de danos na estrutura celular, que liberaram mais destes compostos ou forneceram o substrato para que eles pudessem ser sintetizados. No entanto, esse efeito não foi consistente ao longo do tempo para todos os compostos, com alguns VOCs apresentando diminuição significativa após o tratamento HPP. Além disso, não se pode negligenciar as respostas da alga marinha às condições de stress abiótico (iluminação, temperatura, pressão, etc.), ao qual ela foi submetida, bem como o comportamento da microbiota presente. O benzaldeído, em particular, mostra um aumento constante da concentração nas amostras HPP, o que pode afetar positivamente a perceção sensorial da alga. A variabilidade das respostas ao HPP

³⁴ Do inglês, *Hazard Analysis and Critical Control Point* ou “Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos”. Ele é um sistema preventivo de gestão da segurança alimentar que identifica, avalia e controla perigos significativos para a segurança dos alimentos em todas as etapas de produção, processamento, embalagem e distribuição. O objetivo é minimizar riscos de contaminação, garantindo assim a segurança dos alimentos para os consumidores [391].

sugere que este tratamento pode ter impactos complexos na composição de VOCs da alga, afetando potencialmente seu aroma e sabor.

Para a alga *Codium tomentosum*, foi constatada uma melhor preservação das características de cor e organoléticas (menor variação nos VOCs em número e concentração), enquanto que, para *Osmundea pinnatifida*, o tratamento foi mais eficaz ao manter a carga microbiana baixa, resultando numa maior vida de prateleira em termos de segurança alimentar.

Com base no que foi discutido, pode-se concluir que o processamento por altas pressões hidrostáticas afeta de maneira distinta algas marinhas de géneros e espécies diferentes, sendo necessários mais estudos para elucidar melhor os seus mecanismos complexos de ação, além de examinar os seus potenciais benefícios sobre outras algas marinhas.

5

O uso de Embalagens com Atmosferas Protetoras para Conservação de Algas Marinhas

Revisão Bibliográfica

5.1.1 Embalamento (*Packaging*)

Evidências de cerâmica ou vidro, usados para armazenamento de alimentos, podem ser rastreadas até cerca de 3.000 a.C., durante a época do antigo Egito. Os egípcios também aprenderam a selar recipientes, usando cera de abelha ou piche, protegendo assim os alimentos de vetores, bactérias e ar. Por volta de 600 a.C., romanos e gregos já usavam cortiça para fechar recipientes contendo vinho ou alimentos [318].

Melhorias na fabricação de madeira, papel, metal, cerâmica e vidro facilitaram o uso desses materiais no embalamento e na conservação de alimentos. Por exemplo, a folha de flandres foi inventada por volta de 1200 e ainda é usada hoje para preservação de alimentos em latas (apertização). Nos anos 50, com o advento da indústria petrolífera, polímeros laminados começaram a ganhar espaço como materiais para embalamento de alimentos [318].

A embalagem dos alimentos possui 4 funções essenciais: contenção, proteção, conveniência e comunicação. Entre essas funções, pode dizer-se que, no caso dos alimentos, se destaca a função de proteção contra danos e contaminação exterior

(físicos, químicos, microbianos, etc.), e preservação das propriedades organoléticas e nutricionais, de maneira a aumentar a vida de prateleira dos mesmos [319].

Os materiais das embalagens devem ser compatíveis com o tipo de processamento aplicado. Metais e vidro são as embalagens mais comuns em alimentos que sofrem tratamento térmico, sendo materiais resistentes e rígidos. Porém, metais podem sofrer corrosão ou oxidação com tempo, e o vidro possui a desvantagem de ser pesado e frágil. O papel possui a vantagem de ser barato e leve, e a desvantagem de absorver humidade e não proteger tão bem contra o meio exterior. A maior vantagem do uso dos polímeros em embalagens deriva da sua permeabilidade a moléculas pequenas (por exemplo, gases e vapor de água) em maior ou menor grau. Os materiais poliméricos são bastante variados e versáteis, podendo ser usados numa grande gama de aplicações [319].

Nos últimos anos, o surgimento de polímeros com propriedades de permeabilidade específicas e misturas de gases que permitem aumentar a vida de prateleira de determinados alimentos, deram origem a um novo método de preservação de alimento minimamente processados conhecido “embalamento em atmosfera modificada”. Por fim, foram desenvolvidos materiais para a embalagem contendo substâncias conservantes, dando origem a uma nova e promissora área conhecida como “embalagem ativa” [319].

5.1.1.1 Embalamento em Vácuo

O embalamento em vácuo consiste numa técnica de processamento mínimo onde o ar de dentro de uma embalagem é removido, antes da vedação hermética, de maneira a preservar melhor os alimentos. O seu principal objetivo é o de eliminar o oxigénio, fazendo com que o material da embalagem adira ao produto. Essa técnica permite prevenir reações de oxidação (por exemplo, oxidação lipídica), escurecimento enzimático oxidativo (por exemplo, pela PPO), perda de certas vitaminas e pigmentos, etc. [319], [320].

O vácuo também previne a deterioração por microrganismos aeróbicos e, particularmente, por mofo. Contudo, muitos organismos patogénicos, como *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* são anaeróbios ou anaeróbios facultativos e, portanto, o embalamento em vácuo fornece defesa insuficiente, sendo preciso usar outros recursos [320].

Os materiais de embalagem típicos para vácuo consistem em filmes co-extrudados ou laminados com baixa permeabilidade ao oxigénio e à humidade. Uma vantagem significativa da embalagem para vácuo é que o volume é praticamente o mesmo que o do produto, sem “espaço à cabeça” (*headspace*) dentro da embalagem. No

entanto, a remoção total do oxigénio pode ter efeitos indesejados, como é o caso das carnes vermelhas, que adquirem uma coloração púrpura devido a transformação das mioglobinas na sua forma reduzida (desoximioglobina). Além disso, alguns produtos muito frágeis, macios ou quebradiços, não são adequados para a aplicação deste tipo de técnica devido à compressão realizada pela embalagem. Por fim, produtos grandes e irregulares vão ocasionar embalagens com tamanhos desiguais, sendo comum colocá-los numa embalagem secundária como, por exemplo, caixas de papelão [320], [321].

A “embalamento em vácuo moderado” (MVP) é uma variação do embalamento em vácuo “tradicional”, aplicada em produtos com alta taxa de respiração como frutas e vegetais. A técnica consiste em embalar o produto num recipiente rígido e hermético, ou numa bolsa, onde este permanece cercado por ar ambiente, mas a uma pressão reduzida de cerca de um terço da pressão atmosférica normal (1 atm). Esse procedimento retarda o metabolismo do produto e ainda previne o crescimento de organismos deteriorantes [320].

O conceito de “embalamento por película a vácuo” (VSP) baseia-se na aplicação de laminado plástico altamente dúctil, que é suavemente colocado sobre um produto alimentício e, de seguida, submetido ao vácuo, moldando-se assim à forma produto, de maneira a criar uma segunda pele. A forma, a cor e a textura naturais do produto são realçadas e, como não é aplicada nenhuma grande pressão mecânica durante a extração do vácuo, os produtos macios ou delicados não são esmagados ou deformados [321].

5.1.1.2 Embalamento em Atmosfera Modificada

Alterar ou controlar os gases que envolvem o alimento podem ser recursos úteis para prolongar a vida de prateleira de alimentos frescos ou minimamente processados. O embalamento em atmosfera modificada (MAP) ou a armazenagem em atmosfera controlada (CAS) são técnicas de processamento mínimo, usadas para mudar o ambiente de armazenamento de um produto, aumentando a vida de prateleira [173].

A CAS visa controlar a composição ideal do gás numa sala de armazenamento de acordo com parâmetros específicos, de forma a controlar a atividade respiratória e o crescimento de microrganismos. É normalmente usado um gerador de gás para criar a atmosfera modificada no armazém refrigerado, onde os produtos, não embalados, são armazenados. Dessa forma, é preciso reequilibrar a atmosfera do câmara com o tempo, o que é feito pela adição ou remoção constante de gases durante o período de armazenamento dos alimentos [322].

O MAP é uma técnica onde o ar que envolve o alimento na embalagem é substituído por outro gás, ou mistura de gases com outra composição. A mistura de gases para o embalamento depende do tipo de produto, materiais de embalagem e condições de armazenamento. Essa nova atmosfera atua inibindo a respiração, a atividade microbiana ou reações de oxidação. Porém, este tratamento costuma manter as células vivas e, conseqüentemente, o seu metabolismo. Dessa maneira, as características originais do produto – em particular, sabor, textura e nutrientes – conseguem ser mantidas por um período maior, assim como a segurança alimentar do mesmo [319].

As principais vantagens do MAP são que o produto consegue conservar em grande parte as suas propriedades organolépticas originais, dada a natureza não térmica do processo, fazendo ainda um uso mínimo (ou até mesmo nulo) de conservantes. As embalagens, sendo em geral transparentes, permitem ao comprador avaliar as características do produto e, caso seja conveniente, consumi-lo imediatamente. Por fim, é a capacidade do MAP de reduzir o desperdício de alimentos altamente perecíveis – tais como carne, peixe, produtos frescos e refeições prontas – que faz com que fabricantes e retalhistas de produtos alimentícios adiram à tecnologia [320].

Contudo, a técnica possui algumas desvantagens, nomeadamente, é preciso realizar uma série de ensaios de maneira a se determinar a mistura ideal de gases; os custos operacionais costumam ser elevados devido às exigências da legislação sanitária, da linha de produção e da mão-de-obra especializadas; as embalagens costumam possuir um alto *ratio* entre o volume do *headspace* e o dos alimentos (dado o volume de gases), precisando ainda ser assegurada uma cadeia de frio, desde o embalamento até o consumidor final [320].

Os principais gases utilizados no MAP são azoto (N_2), oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2); há também algum uso de monóxido de carbono (CO) e árgon (Ar), além de dióxido de enxofre (SO_2), hidrogénio (H_2) e óxido nitroso (N_2O), entre outros [320], [323].

O azoto, gás inerte mais abundante no ar ambiente, possui a função de inibir as reações de oxidação, o crescimento de microrganismos aeróbicos e minimizar a taxa de respiração, sobretudo em frutas e vegetais. É também utilizado como gás de preenchimento, que ajuda a evitar o colapso das embalagens durante o armazenamento, como é o caso das batatas chips. O oxigénio é normalmente o gás que se deseja eliminar ao recorrer ao MAP, porém, em níveis de 2 a 3%, ele pode ser especialmente útil para aplicação em produtos que “respiram”, onde a sua ausência

completa pode resultar em fermentação e no surgimento de odores e sabores desagradáveis (por exemplo, em vegetais folhosos) [320], [323].

O dióxido de carbono é o gás mais utilizado em MAP e possui usos específicos na preservação de produtos que “não respiram”, tais como laticínios, carnes, peixes e frutos do mar. O dióxido de carbono tem propriedades fungistáticas e bacteriostáticas, ou seja, ajuda a retardar o crescimento de fungos e bactérias aeróbicas. No entanto, o CO₂ apresenta algumas restrições: em excesso, pode diminuir a capacidade de reter água de carnes e danificar tecidos de frutas e vegetais, possui efeito limitado sobre leveduras e pode até mesmo ajudar a promover o crescimento de bactérias ácido-láticas [320], [323].

O monóxido de carbono, gás que possui alguma toxicidade, ajuda a inibir, ou até mesmo reduzir a carga de diferentes bactérias deteriorantes e patogênicas, além de fixar o pigmento vermelho das carnes. Há muitos países que limitam ou proíbem o emprego do CO em MAP, como é o caso da União Europeia. O dióxido de enxofre é muito eficaz impedir o escurecimento enzimático de frutas e vegetais [320], [323].

O argon possui as mesmas propriedades do azoto e pode ser usado como substituto, apesar do seu maior custo. A sua principal mais-valia estaria relacionada à capacidade de inibir diversas reações enzimáticas. No entanto, ainda faltam evidências experimentais conclusivas de que a substituição parcial ou total de N₂ por Ar tenha efeitos comercialmente benéficos, em termos de extensão da vida útil e qualidade [320], [323].

O MAP é muitas vezes referenciada na literatura como “embalamento em atmosfera controlada” (CAP) quando se faz uso de “embalagens ativas”, assunto que será discutido a seguir.

5.1.1.3 Embalagens Passivas, Ativas e Inteligentes

As “embalagens passivas” – também denominadas por “atmosfera modificada passiva”, quando se refere à técnica de embalagem – são normalmente constituídas por polímeros com propriedades de permeabilidade capazes de compensar a taxa de respiração do produto alimentício de maneira a gerar, passivamente, uma atmosfera de equilíbrio [323]. A “embalagem passiva” é comumente usada para MAP de frutas e vegetais frescos, onde a permeabilidade ao gás do filme da embalagem é tal que suficiente O₂ consegue entrar na embalagem para evitar condições anóxicas e, consequentemente, a ocorrência de respiração anaeróbica. Já o excesso de CO₂ pode ser difundindo através do polímero de forma a evitar níveis indesejados desse gás no interior da embalagem [324].

Há muitas definições para o que seriam as “embalagens ativas”, dentre as quais aquela enunciada por Robertson [324]: “embalagem na qual constituintes subsidiários foram deliberadamente incluídos no material ou no *headspace* da mesma para melhorar o desempenho do sistema de embalamento”. Na maioria dos casos, trata-se da incorporação de certos componentes nos filmes, ou recipientes de embalagem, com o objetivo de manter e prolongar a vida útil do produto, dos quais se destacam: sistemas capazes de absorver compostos indesejáveis (etileno, a hormona do amadurecimento), ou libertar desejáveis (1-metilciclopropeno, um poderoso antagonista do etileno), adição de antioxidantes e/ou outros conservantes, além de filmes poliméricos capazes de manter ou compensar as mudanças de temperatura [323].

As “embalagens inteligentes” são um sistema em que a própria embalagem monitora a condição do alimento empacotado e fornece informações sobre mudanças desses parâmetros durante o período de armazenamento. Comumente, tais sistemas incluem indicadores baseados em cores aderidos ao material da embalagem ou ao próprio alimento e facilmente identificados pelo consumidor. As variáveis monitoradas podem ser tempo-temperatura, pH, composição dos gases na embalagem, vazamento, presença de substâncias indicadoras de deterioração microbiana, etc. [319].

5.1.2 Embalagens com Atmosferas Protetoras para Conservação de Algas Marinhas

Conforme mencionado acima, o MAP e o embalamento em vácuo – também conhecidas genericamente como “atmosferas protetoras” – são técnicas utilizadas para aumentar a vida útil de alimentos *in natura* ou minimamente processados. As atmosferas protetoras permitem que as características originais dos produtos sejam mantidas por um tempo superior àquele onde não houve quaisquer tratamentos [45].

Apesar de amplamente utilizado em hortaliças, carnes e outros alimentos, até o momento, foi publicado por outros autores apenas um artigo sobre a conservação de algas marinhas empregando embalagens com atmosferas protetoras, no qual se tentou utilizar o embalamento em vácuo em *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). As principais observações de Paull & Chen [284] foram que a redução do teor de humidade do recipiente de armazenamento levou à descoloração das algas e perda de conteúdo intracelular. Da mesma forma, o armazenamento em vácuo não resultou em maior vida útil pós-colheita para *G. salicornia*. Recipientes e invólucros com altas taxas de troca gasosa tampouco foram eficazes em prolongar a vida útil. No entanto, as algas que foram totalmente imersas em água do mar, e mantidas no escuro à temperatura

de 17 °C permaneceram viáveis em termos organoléticos, apesar de apresentarem um aumento relevante na carga microbiológica [284].

5.2 Ensaio MAP | Materiais e Métodos

O presente ensaio tem como objetivo estudar o impacto do MAP na preservação das características físico-químicas e na segurança alimentar de duas espécies de algas marinhas: “erva-patinha” (*Porphyra umbilicalis*, Rhodophyta) e “alface-do-mar” (*Ulva lactuca*, Chlorophyta). Para isso, foi utilizada uma mistura de gases – composta por 80% de árgon (Ar) e 20% de dióxido de carbono (CO₂) – em paralelo com embalagens a vácuo. O CO₂ foi selecionado devido às suas propriedades antimicrobianas e ao seu papel como fonte de carbono para o metabolismo das algas marinhas. O árgon, por outro lado, foi escolhido por suas propriedades semelhantes às do azoto, juntamente com a sua solubilidade superior em água e capacidade de inibir reações enzimáticas específicas. Foram avaliados parâmetros físicos, microbiológicos e químicos: composição dos gases do *headspace* (taxa respiratória), cor, textura (dureza), contagens de bactérias patogénicas e de bactérias heterotróficas marinhas e compostos orgânicos voláteis usando um GC-TOF-MS.

5.2.1 Processamento das Matérias-Primas

As matérias-primas usadas no ensaio foram processadas consoante o protocolo descrito na **Secção 2.2.1**, sendo selecionadas para o presente ensaio as algas “erva-patinha” (*P. umbilicalis*) e “alface-do-mar” (*U. lactuca*). As mesmas foram pesadas (30 ± 1 g) e acondicionadas em sacos com 300 x 400 mm de dimensão, fabricados a partir de extrudados de poliamida e polietileno (PA/PE) com 90 µm de espessura [Sammic, Espanha], sendo o procedimento feito em triplicado para cada dia e tratamento (réplicas verdadeiras).

Utilizando uma máquina de vácuo SU-316 [Sammic, Espanha], com entrada para gases inertes, as amostras foram submetidas a três tratamentos. As amostras do controlo (CTRL) foram preparadas apenas selando as embalagens e mantendo o ar ambiente no interior das mesmas. As amostras embaladas em vácuo (VAC), foram preparadas retirando-se o ar até que a pressão atingisse 5 mbar dentro da câmara (VAC). Nas amostras em “embalagem com atmosfera modificada” (MAP), todo o ar foi removido e 80% do *headspace* foi preenchido com a mistura de gases ALIGAL® 62 (80% Ar + 20% CO₂) [AirLiquide, França].

Para simular as condições mais comuns de armazenamento no comércio de retalho, as amostras foram armazenadas a 6 ± 2 °C, usando um frigorífico [Modelo GSL360ICEV, LG, Coreia do Sul], onde foi instalado sistema de iluminação LED, regulado para fornecer uma média de $1,5 \pm 0,2$ W·m⁻² em ciclos de 12 h de luz e escuridão (**Figura 5.1**) [325], [326]. A iluminação foi cuidadosamente controlada, com um temporizador que fornecia luz das 9 h às 21h, o que está de acordo com os horários de funcionamento da maioria dos supermercados em Portugal. Também foi registada a intensidade da luz em frigoríficos (saladas conservadas com MAP) em cinco lojas diferentes e calculada a intensidade média para replicar as condições em laboratório.

Os testes tiveram duração de 15 dias, sendo que nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 as amostras foram retiradas do frigorífico e processadas conforme protocolos de análise pré-definidos. Antes da abertura das embalagens, foi analisada a composição dos gases do *headspace*. Em seguida, 12 talos de algas marinhas foram selecionados aleatoriamente para medição de cor e textura. As amostras para análise microbiológica foram esvaziadas dentro da máquina de vácuo, sendo imediatamente seladas para evitar contaminação do ambiente. O material não analisado no mesmo dia foi imediatamente congelado e mantido a -45°C até posterior análise.



Figura 5.1 Algas marinhas após processamento: controlos e amostras conservadas com MAP

Fonte: Bruno Moreira-Leite

5.2.2 Caracterização Física

5.2.2.1 Colorimetria

A análise de cor foi realizada, usando o mesmo protocolo descrito na **Secção 4.2.2.1**, considerando-se que os tratamentos são $t = \text{CTRL}$, MAP ou VAC e a duração do ensaio $d = 3, 6, 9, 12$ ou 15 dias.

5.2.2.2 Análise de Textura

Para avaliar a textura das algas, devido à sua morfologia caracterizada pela presença de frondes laminares que lembram um filme, optou-se por um teste de rutura, onde foi registada a força máxima para romper a matriz celular da amostra. A firmeza da espécie foi medida, usando um analisador de textura CT3 com uma célula de carga de 45N [Brookfield, EUA]. As amostras foram escolhidas aleatoriamente e cortadas em círculos ($\varnothing 35$ mm) usando um cortador de metal, que foram colocados em placas de Petri contendo água do mar. Numa mesa de base (Modelo TA-BT-KIT), foi colocado um suporte de fixação em acrílico ($200 \times 200 \times 10$ mm; com um furo com $\varnothing 7,65$ mm), que foi utilizado para assentar as amostras que foram perfuradas com uma sonda metálica cilíndrica com $\varnothing 4$ mm (Modelo TA-44).

Os testes foram realizados à temperatura ambiente (20 ± 2 °C), tendo sido as amostras retiradas da água do mar 5 min antes das análises, sendo colocadas entre duas folhas de papel para remover o excesso de humidade.

A aquisição de dados foi realizada a uma taxa de 10 pontos/s com uma carga de *trigger* (disparo) de 20 mN e uma correção de 200 mN (descarga), usando o Software TexturePro CT [Brookfield, EUA].

A velocidade de pré-teste foi ajustada para 2 mm/s, a velocidade de teste para 0,1 mm/s e a velocidade de pós-teste para 4,5 mm/s. A força máxima foi medida fazendo uma punção em cada alga fresca, realizando 10 leituras para cada tratamento por dia de amostragem. Os valores médios foram então calculados, e os resultados expressos em N [327], [328].

5.2.3 Caracterização Biológica

5.2.3.1 Composição dos Gases do *Headspace* das Embalagens

Devido às atividades de fotossíntese e respiração das algas marinhas, a composição interna de O₂ e CO₂ das embalagens contendo a mistura de gases (MAP), assim como o ar ambiente (CTRL) foram monitoradas nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 do estudo

usando um analisador de gases Dansensor CheckPoint [AMETEK-Mocon, EUA] para examinar 10 mL do *headspace* de três réplicas verdadeiras [329]. Como não havia *headspace* para a amostra embalada a vácuo (VAC), a análise não foi realizada para este tratamento.

5.2.3.2 Análise Microbiológica

Para evitar contaminação, as amostras foram preparadas dentro de uma cabine de fluxo laminar horizontal [Aeolus H, Telstar®, Espanha]. Foram pesadas 10 g de cada amostra, sendo as mesmas colocadas assepticamente em um saco asséptico para homogeneização [BagLight PolySilk, Interscience, França] em 90 mL de solução de Ringer, com um quarto de força [Biokar Diagnostics, França] em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Após 90 s no homogeneizador *Stomacher* [BagMixer® 400 P, Interscience, França], diluições seriadas foram feitas, sendo estas espalhadas ou dispersas pelo método de *pour plate*, de acordo com o protocolo, em placas de Petri de $\varnothing$ 90 mm [Frilabo, Portugal]. Somente as placas contendo no mínimo 10 UFC e até 300 UFC, características e/ou não-características, foram consideradas para cada diluição. Caso os valores estivessem abaixo ou acima desse intervalo, seriam relatados como < LOQ (limite de quantificação) ou $> 3,0 \times 10^5$ (log 5,4771) UFC·g⁻¹, respetivamente.

Os microrganismos *Escherichia coli*, *Estafilococos* coagulase-positiva e *Vibrio* spp. foram quantificados de acordo com os métodos descritos na ISSO 16649-2, ISO 6888-2 e ISO 21872, respetivamente [330]–[332]. Os patógenos *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* tentaram ser detetados de acordo com os métodos descritos na ISO 6579 e ISO 11290-2, respetivamente [275], [333].

Há uma ausência de regulamentos europeus abrangentes que abordem especificamente as algas marinhas. No entanto, a França é um dos poucos países que estabeleceu uma regulamentação nesse sentido, definindo um limite de 10^5 UFC·g⁻¹ (log 5 UFC·g⁻¹) para mesófilos aeróbios (30 °C), em produtos contendo algas marinhas secas [334]. Além disso, a legislação portuguesa estabelece o limite para produtos frescos “minimamente processados” em 10^6 UFC·g⁻¹ (log 6 UFC·g⁻¹) [290]. Portanto, adotou-se o valor intermediário de $3,0 \times 10^5$ (log 5,4771) UFC·g⁻¹ como limite para um consumo seguro das algas estudadas.

Nas subseções a seguir, serão descritas as análises que foram realizadas usando um método interno descrito nos protocolos dos meios de cultura.

5.2.3.2.1 Coliformes Totais

Os coliformes totais foram quantificados de acordo com um método interno, baseado na ficha técnica do Compass® Ecc Agar [Biokar Diagnostics, França]: primeiramente, o meio (40,8 g/L) foi preparado, esterilizado em autoclave (121 °C, durante 15 min), e deixado arrefecer (44-47 °C). Em seguida, 1 mL de amostra, previamente preparada conforme descrito na secção anterior (5.2.3.2), foi colocada em cada placa de Petri e 15 mL do meio de cultura foram adicionados pelo método de *pour plate*. Em seguida, as placas foram postas para incubar a 37 ± 1 °C por 21 ± 3 h [MIR-154-PE, Panasonic, Japão]. Em caso de presença, as colônias características de coliformes, que possuem coloração rosada, foram contadas [335].

5.2.3.2.2 Bactérias Marinhas Heterotróficas

As bactérias marinhas heterotróficas (HMB) foram quantificadas de acordo com um método interno, baseado nas instruções da ficha técnica do Marine Agar [Condalab, Espanha]: primeiramente, o meio foi preparado (55,2 g/L), esterilizado em autoclave (121 °C, durante 15 min), distribuído em placas de Petri (15 mL a 50 °C) e posto para esfriar (42°C). De seguida, 100 µL de amostra, previamente preparada conforme descrito na Secção 5.2.3.2, foram espalhados sobre o meio de cultura, sendo a placa incubada a 20-25 °C por 72 h.

5.2.4 Caracterização Química

5.2.4.1 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (GC-TOF-MS)

A preparação das amostras e análises foram realizadas usando o mesmo protocolo descrito na Secção 3.2.3.

5.2.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando os mesmos programas e testes empregados na Secção 4.2.5.

5.3 Ensaio MAP | Apresentação e Discussão dos Resultados

5.3.1 Caracterização Física

Embora nenhum dos tratamentos parecesse ser eficiente na manutenção da cor original das algas, foi observada uma descoloração de ambas as algas em todos os tratamentos, o oposto parecia ser verdadeiro para a textura, que estava bem preservada, especialmente com o tratamento MAP.

5.3.1.1 Colorimetria

Como mostrado nas **Figuras 5.2A e 5.2B**, a coordenada L^* tornou-se ligeiramente mais clara para ambas as algas marinhas ao longo dos dias de armazenamento. Embora nenhum efeito significativo dos tratamentos tenha sido observado em *P. umbilicalis* (PU), o clareamento pareceu ser mais pronunciado em *U. lactuca* (UL) nas amostras CTRL e VAC.

Em relação à coordenada a^* (**Figura 5.2C**), foi observada diferença para os tratamentos MAP e VAC para PU, em relação ao CTRL nos dias 12 e 15. A partir do dia 9, os valores pareciam caminhar no sentido de um aumento nos valores para vermelho, principalmente para o tratamento VAC que duplicou (de 6,72 para 13,25). Para UL (**Figura 5.2D**), cujas coordenadas estavam no lado negativo (verde) do eixo a^* , os tratamentos MAP e VAC foram estatisticamente diferentes, em comparação com CTRL, a partir do dia 6. Os valores dos tratamentos CTRL, MAP e VAC cresceram em padrões diferentes e, no dia 15, foi observado um aumento de -14,73 no dia 0 para -10,58, -9,17 e -8,43, respectivamente.

Para a coordenada b^* de PU (**Figura 5.2E**), uma diferença, em relação ao CTRL, pôde ser observada para os tratamentos MAP e VAC a partir dos dias 12 e 9, respectivamente. Embora os valores não tenham mudado significativamente para o CTRL ao longo dos dias de armazenamento, os valores para o tratamento MAP variaram de 27,74 no dia 0 a 19,31 no dia 15. Para o tratamento VAC, foi observada uma mediana de 1,68 para o último dia (6 % do valor inicial), o que demonstra uma quase inversão de valores positivos para valores negativos – ou seja, uma mudança da componente amarela para a azul. Para UL (**Figura 5.2F**), foi notada uma grande variação dos valores em diversas direções, dificultando a detecção de uma tendência. Porém, no último dia, pôde-se observar uma diminuição nos valores dos tratamentos CTRL e VAC, enquanto o tratamento MAP pareceu manter o valor de referência.

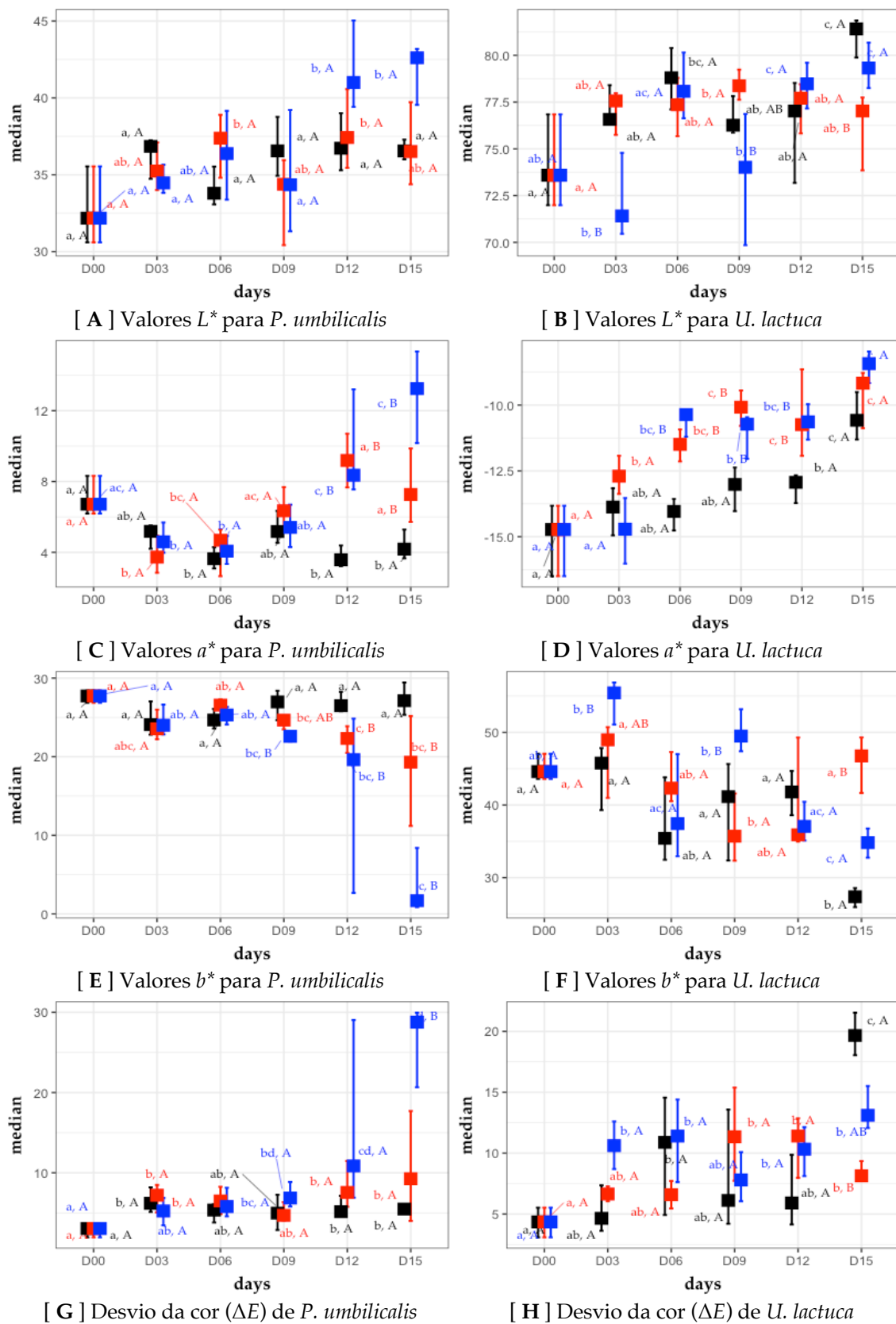


Figura 5.2 Mudanças de cor ao longo dos dias de armazenamento para *P. umbilicalis* e *U. lactuca* preservadas por diferentes tratamentos

Para ambas as algas, os valores para o controle CTRL de estão em em PRETO, do tratamento MAP estão em VERMELHO e tratamento VAC estão em AZUL.

Os resultados são expressos como as coordenadas CIELAB para L^* , a^* , b^* e ΔE .

Notas: Medianas (Q_2) e intervalo interquartil (IQR) das determinações do duodécuplo em cada experimento. Medianas seguidas por letra minúscula diferente são significativamente diferentes ($P < 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento. Medianas seguidas por letra maiúscula diferente são significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Em outras palavras, uma mudança positiva do valor a^* no eixo vermelho juntamente com uma mudança negativa do valor b^* no eixo amarelo, no espaço de cores CIELAB indicou uma mudança na cor para uma cor marrom (vermelho acastanhado escuro) para PU. Para o tratamento VAC no dia 15, dada à mudança de amarelo para azul, em combinação com um tom mais vermelho em relação à cor original, era percebida uma cor violeta resultante. Para UL, uma mudança positiva no valor a^* no eixo verde juntamente com uma mudança negativa no valor b^* no eixo amarelo indicou uma mudança na cor para um tom mais verde oliva.

Os valores de ΔE para PU (**Figura 5.2G**) apresentaram maior desvio de cor para VAC, principalmente nos dias 12 e 15. CTRL apresentou os melhores resultados para PU no último dia do experimento, mas a cor não diferiu estatisticamente do tratamento MAP. Para UL (**Figura 5.2H**), foram observadas grandes variações nos valores do CTRL, principalmente no dia 15. Portanto, o tratamento MAP pareceu ser a técnica que melhor preservou a cor de ambas as algas.

Lee *et al.* [286] investigaram o efeito das condições de super-arrefecimento (*super-chilling*) na conservação de *Pyropia yezoensis*. Este foi o único estudo encontrado sobre o efeito das condições de armazenamento na cor desta alga marinha fresca. As principais observações foram que os valores L^* , a^* e b^* das amostras frescas refrigeradas (armazenadas a 5 °C), foram afetados pela temperatura de armazenamento, com os valores CIELAB aumentando mais do que os das outras amostras armazenadas em temperatura constante e escalonada. resfriado (-2 °C) ou congelado (-18 °C), durante o período de armazenamento de 15 dias.

Isto, contudo, não está de acordo com nossos resultados nos quais houve uma pequena diminuição em a^* e nenhuma diferença significativa em b^* para PU-CTRL após 15 dias de armazenamento. É possível que as diferenças entre os resultados obtidos por Lee *et al.* e nossos resultados para PU-CTRL sejam devidas às diferentes configurações experimentais, como iluminação [336], [337]. Devido às diferenças nas quais as amostras MAP e VAC foram tratadas, não é razoável estabelecer correlações entre os estudos.

Olmo *et al.* [43] não encontraram diferenças significativas para L^* em *Ulva lactuca* nos primeiros 30 dias de armazenamento, para as amostras não tratadas (controles)

refrigeradas a 4 °C. Não foi encontrada diferença significativa para os parâmetros a^* e b^* no controle, porém, à semelhança do nosso estudo, pode-se observar uma tendência de aumento de a^* no lado negativo (verde) do eixo, e de diminuição de b^* no lado positivo (amarelo) do eixo.

Segundo os autores, as principais alterações nos parâmetros de cor para o controle poderiam ser atribuídas, em parte, à amplificação dos pigmentos do complexo antena, sob condições de pouca luz. Pinheiro *et al.* [31] avaliaram o impacto do tempo de armazenamento nas coordenadas CIELAB para a alga *Ulva rigida*, tratada sob diferentes condições (seca ao ar, salgada, salgada com 28% de NaCl e salgada com 40% de NaCl). Apesar das diferenças nas condições experimentais, as conclusões foram semelhantes às observadas no presente estudo para as coordenadas L^* e a^* , ou seja, houve tendência de ambos os valores aumentarem, com a^* estando no lado negativo (verde) do eixo.

Sánchez-García *et al.* [338] estudaram o impacto do período de armazenamento (12 dias) e duas temperaturas diferentes (4 °C e 16 °C) sobre o perfil de cor de *Ulva*. Os resultados estavam de acordo com nossos resultados: um aumento em a^* no lado negativo (verde) do eixo, uma diminuição em b^* no lado positivo (amarelo) do eixo, além de valores ambíguos para L^* , que diminuíram em amostras armazenadas a 4 °C e aumentaram naquelas armazenadas a 16 °C).

As principais conclusões foram que a temperatura parece ter um impacto significativo na cor, especialmente quando a alga *U. rigida* foi armazenada a temperaturas mais elevadas. Além disso, a partir do sexto dia de armazenamento, foi observado um escurecimento mais acentuado das algas. O escurecimento nas algas marinhas está relacionado à destruição do seu tecido, à quebra dos pigmentos clorofilinos (em feofitina e feoforbídeo), à alteração causada pela atividade enzimática e não enzimática, bem como ao crescimento microbiano [100], [338].

Aparentemente, os tratamentos não pareceram afetar significativamente a luminosidade em PU e afetaram apenas UL-VAC no dia 3 e UL-MAP no dia 15. Contudo, os resultados mostraram que o tempo de armazenamento teve um impacto positivo nos valores de L^* (branqueamento) para PU-VAC, UL-CTRL e UL-VAC.

Harrysson *et al.* [115] estudaram a cor de *Porphyra umbilicalis* e *Ulva fenestrata* após secagem em estufa a 40 °C e durante armazenamento subsequente por ≥ 370 dias, sob condições de luz, luz parcial e escuridão. A principal conclusão em relação às condições de iluminação e tempo de armazenamento foi que quanto mais intensa a luz utilizada e o tempo de armazenamento, maior o aumento nos valores de L^* . Além disso, as evidências disponíveis sugerem que uma elevação nos valores de L^* pode ocorrer devido à degradação do pigmento, como resultado da oxidação pela luz,

autooxidação (principalmente, devido à presença de ROS) e até mesmo reações enzimáticas [115], [133], [339].

As alterações nas coordenadas a^* e b^* para PU e UL foram afetadas pelos tratamentos e pelo tempo de armazenamento. Para PU, foi observada uma pequena diminuição seguida de um aumento nos valores de a^* , refletido em alterações nos tons vermelhos, para os tratamentos MAP e VAC, provavelmente devido a mudanças nas ficobiliproteínas, em particular as ficoeritrinas que apresentam coloração avermelhada [336], [337].

Deve-se notar que o aumento observado a partir do dia 9 parece ser devido a um exsudado vermelho (libertação de ficoeritrina), observado principalmente em PU-VAC, de forma semelhante ao que foi testemunhado na alga *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta), preservada *sob* vácuo [284].

As clorofilas parecem desempenhar um papel menor na alteração dos valores de a^* para algas “erva-patinha”, como resultado de sua baixa concentração nessas espécies [340]. Com relação ao b^* , a diminuição significativa para ambos os tratamentos (com maior intensidade no PU-VAC) parece ocorrer devido a alterações na composição dos carotenoides e das ficobilinas do tipo ficocianina (de coloração azulada) [115], [341]. As ficocianinas são mais estáveis que os carotenoides, e a proporção ficocianina/carotenoides parece aumentar com o tempo, promovendo uma diminuição nos tons amarelados e um aumento nos tons azulados nas algas vermelhas [341].

Para UL, todos os tratamentos envolveram um aumento de a^* (menor intensidade verde) ao longo do tempo de armazenamento, o que possivelmente ocorreu devido à degradação ou adaptação das clorofilas às condições experimentais [31], [43], [338]. Tal como PU, os valores de b^* para UL também diminuíram com o tempo, exceto para UL-MAP, que não foi significativamente diferente do dia 0. Essas variações nos valores de b^* podem ser causadas, exclusivamente, por alterações na composição dos carotenoides [31], [338]. O conteúdo de carotenoides em algas marinhas é diretamente afetado pelas ROS através da atividade quelante e, indiretamente, pela indução da via biossintética dos carotenoides [342].

Como os tratamentos VAC e MAP envolvem a eliminação de oxigênio, é possível que a ausência de O_2 , juntamente com a presença de Ar, e uma alta concentração de CO_2 nas amostras de MAP, tenham ajudado na manutenção dos carotenoides, suprimindo as reações de oxidação e/ou atividades enzimáticas [342], [343]. Uma coloração mais amarelada pôde ser observada a olho nu nas amostras processadas pelos tratamentos MAP e VAC no dia 9 em relação ao CTRL, conforme mostrado na **Figura 5.3A**.

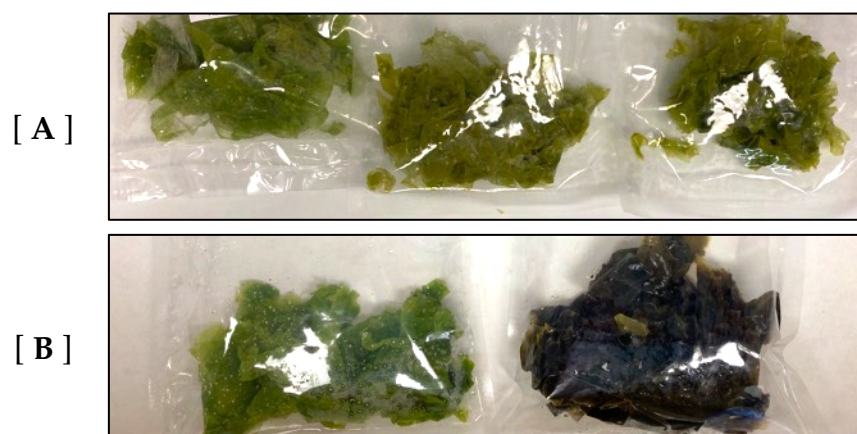


Figura 5.3 [A] Diferenças de cor para *U. lactuca* entre tratamentos no Dia 9: Controle (esquerda), MAP (centro) e Vácuo (direita); [B] Cor das algas *U. lactuca* (esquerda) e *P. umbilicalis* (direita) no Dia 0.

Fonte: Bruno Moreira-Leite

A adaptação ou degradação dos pigmentos devido à luz, tempo de armazenagem e outras condições, juntamente com respostas metabólicas a diversas fontes de stress, tais como o esgotamento de nutrientes e danos causados pelo frio, são as hipóteses mais plausíveis para o aumento dos valores de L^* , e as mudanças observadas em a^* e b^* para algas marinhas PU e UL [31], [43], [285], [338], [344]–[346]. Deve-se levar em consideração ainda que algumas das variações observadas ao longo dos dias de armazenamento, podem decorrer da heterogeneidade das amostras, como pode ser observado nos diferentes tons de verde para UL e de roxo-escuro com bordas descoloridas para PU apresentados na **Figura 5.3B**.

5.3.1.2 Análise de Textura

Tal como mostrado na **Figura 5.4**, não foram encontradas diferenças significativas entre o CTRL e o tratamento MAP na maioria dos dias. A exceção foi o tratamento VAC, que foi significativamente diferente do CTRL nos dias 12 e 15 para PU e nos dias 3, 9 e 12 para UL.

Para PU, os valores de dureza para o tratamento CTRL e MAP foram relativamente estáveis durante todo o período de armazenamento, enquanto o tratamento VAC apresentou uma diminuição significativa na dureza no dia 15 (de 3,917 N para 2,819 N). No caso do UL, os valores de dureza para os tratamentos CTRL, MAP e VAC também se mantiveram estáveis durante o armazenamento. No dia 15, nenhuma das amostras foi significativamente diferente em termos de textura do CTRL no dia 0.

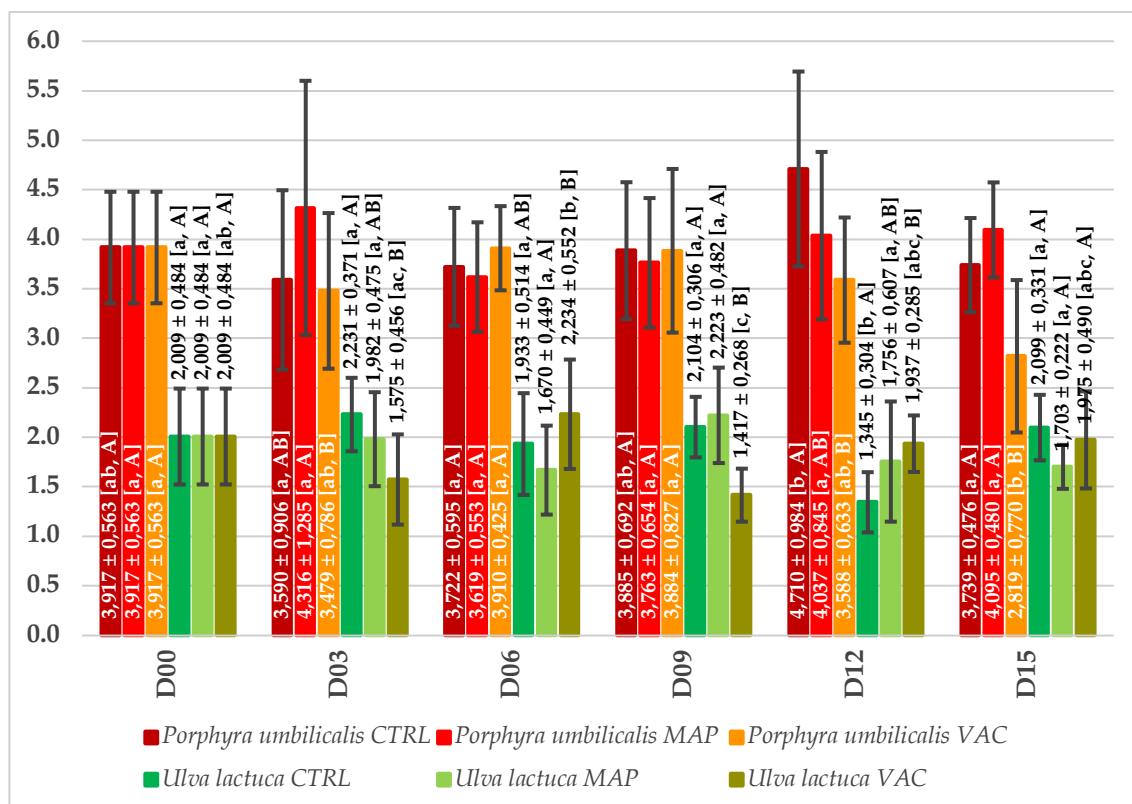


Figura 5.4 Dureza medida, ao longo dos dias de armazenamento, para *P. umbilicalis* e *U. lactuca*, preservadas por diferentes tratamentos

Os resultados são expressos em newtons (N).

Notas: Médias ± desvio-padrão das determinações em decupla, em cada experimento. Médias nas colunas da mesma cor, seguidas por uma letra minúscula, diferente, são significativamente diferentes ($p < 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento. Médias no mesmo grupo de barras, para cada dia de armazenamento e algas seguidas de letra maiúscula diferente, são significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Os estudos encontrados na literatura sobre análise de textura de algas frescas, submetidas a diferentes condições de armazenamento ou tratamentos são escassos, e as metodologias utilizadas variam muito entre os ensaios. Não foi possível encontrar análises para *P. umbilicalis* fresca (ou qualquer outra alga do mesmo gênero), durante um período de armazenamento. Portanto, resultados para outras algas vermelhas, ou com talos laminares, foram utilizados como referência.

Na análise do perfil de textura (TPA) de Nayyar & Skonberg [282], *Palmaria palmata* (Rhodophyta) mostra que os valores de dureza foram notavelmente impactados pelo tempo (2 semanas) e pela temperatura (2 °C e 7 °C), com valores diminuindo gradualmente ao longo do tempo, e mais intensamente para temperaturas de armazenamento mais altas. Para *Gracilaria salicornia*, a maior parte dos talos tinha perdido a sua firmeza no final do período de armazenamento de 6 dias, a 16°C e 21°C, em condições de luz ou escuridão. No entanto, este declínio não pôde ser correlacionado, nem com as temperaturas de armazenamento nem com as condições

de luz, devido à variabilidade considerável nos valores de textura [284]. Estes resultados não estão de acordo com os nossos achados para PU-CTRL, embora deva ser considerado que a *P. umbilicalis* possui morfologia e características texturais diferentes de *P. palmata* e *G. salicornia*.

Pesquisas sobre o uso de processamento por altas pressões (HPP) para *U. lactuca* não encontraram diferenças significativas de textura para o controle no 30º dia de armazenamento a 4 °C assim como ocorreu com UL-CTRL em nossa pesquisa. O mesmo não se verificou para a mesma alga tratada com 400 MPa, que pareceu perder dureza somente após 30 dias de armazenamento.

A rutura celular e a atividade da liase (bacteriana ou endógena) parecem ser a razão para tal deterioração [43]. O TPA, nas características sensoriais de *U. rigida* indicou que os valores de dureza foram influenciados pelo tempo de armazenamento (12 dias) e pela temperatura (4 °C e 16 °C), com diminuição gradual, observada ao longo do tempo em ambas as temperaturas. Esse enfraquecimento da estrutura celular pode ocorrer devido a reações químicas e enzimáticas, e até mesmo à atividade microbiana, tornando o tecido mais frágil e suscetível à quebra [338].

Com base no que foi discutido anteriormente, verifica-se que as algas marinhas podem apresentar comportamentos diferentes, dependendo da espécie avaliada ou das condições experimentais [43], [282], [338]. Além disso, uma mesma espécie pode apresentar alta variabilidade em suas propriedades texturais, relacionadas ao local de coleta, fragmentação irregular ou tecidos analisados [284], [327], [347]. Essas razões explicam os diversos padrões de comportamento observados nas obras abordadas.

Nossos resultados mostraram que os valores de dureza para o tratamento CTRL e MAP foram geralmente comparáveis, enquanto o tratamento VAC exibiu algum grau de variabilidade como alga *P. umbilicalis*, propensa a se tornar menos resistente no dia 15.

Embora muitos estudos tenham surgido no sentido de que o declínio na dureza das algas marinhas possa ser atribuído a fatores químicos ou biológicos, não há evidências no presente estudo que apoiem a deterioração das algas marinhas por microrganismos, uma vez que PU-VAC exibiu, no dia 15, a contagem microbiana mais baixa. Muito provavelmente as variações no tratamento VAC podem resultar da compressão das algas pela embalagem a vácuo, que pode ter causado alguma quebra desigual na matriz celular, de forma semelhante ao que aconteceu com as algas tratadas com HPP. A rutura da estrutura celular e o envelhecimento, juntamente com a perda de conteúdo intracelular, poderiam ter promovido reações de autólise nas amostras [43].

A principal conclusão foi a de que o tratamento MAP pode ser um método de preservação mais eficaz na manutenção das propriedades texturais das algas frescas em comparação com o VAC.

5.3.2 Caracterização Biológica

5.3.2.1 Composição dos Gases no Headspace das Embalagens

Conforme mostrado na **Figura 5.5**, a concentração de oxigénio (O₂) para o CTRL e a concentração de dióxido de carbono (CO₂) no tratamento MAP, para ambas as algas marinhas, tendem a diminuir ao longo do tempo. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de O₂ e CO₂ (padrão respiratório,) ao longo do tempo para o tratamento MAP para ambas as algas marinhas (**Figuras 5.5C e 5.5D**). Para o CTRL, a composição do *headspace* para cada alga difere significativamente após o dia 0 para ambos os gases.

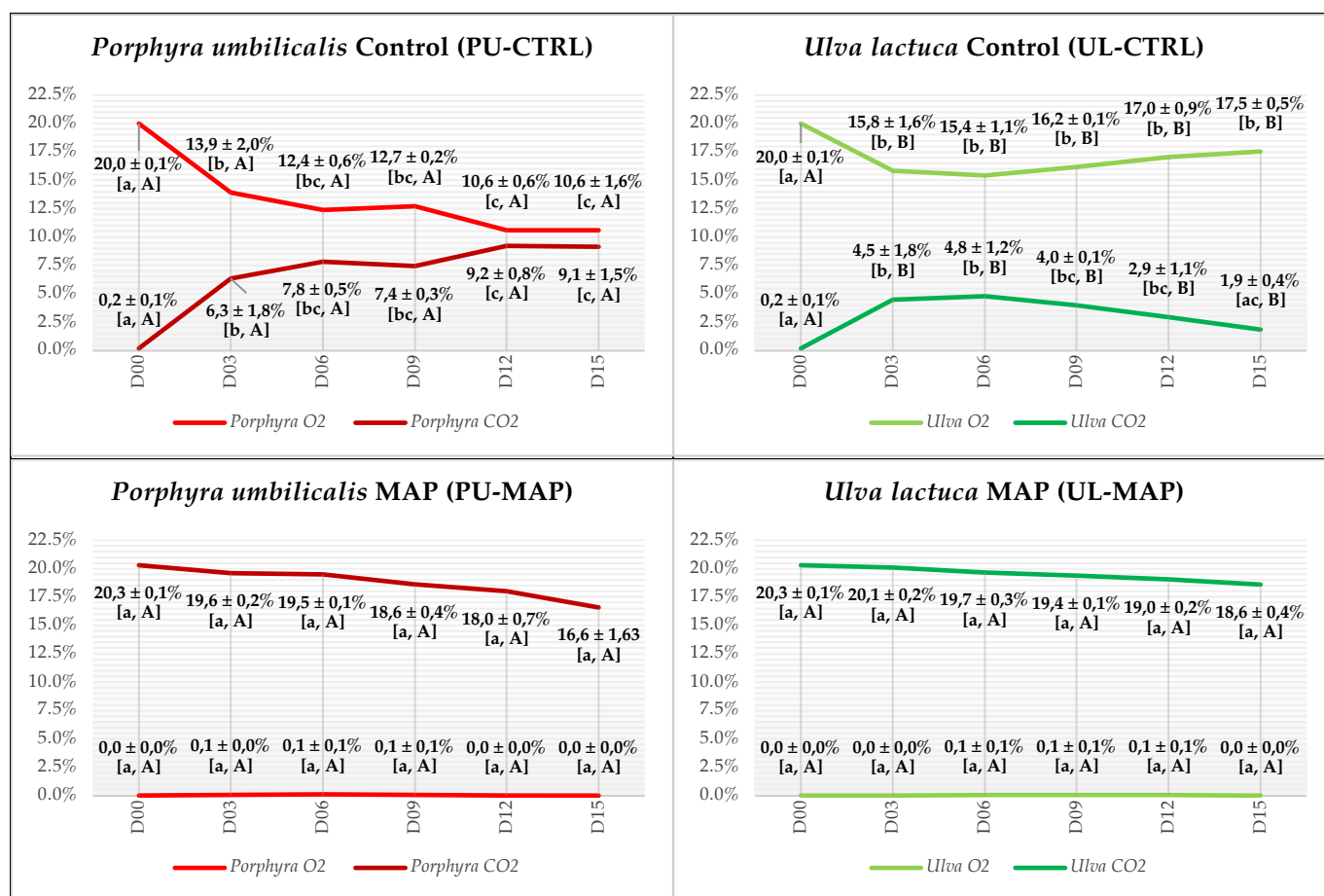


Figura 5.5 Composição dos gases *headspace*: concentração de O₂ e CO₂ ao longo dos dias de armazenamento para *P. umbilicalis* [A , C] (coluna da esquerda) e *U. lactuca* [B , D] (coluna da direita), Controlos [A , B] (linha superior) e algas tratadas com MAP [C , D] (linha inferior)

Notas: Os resultados são expressos como % da composição do *headspace*. Médias $\pm$ desvio padrão de determinações em triplicado em cada experimento. Médias seguidas por letra minúscula diferente são significativamente diferentes ($p < 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento. Médias seguidas por letra maiúscula diferente são significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre espécies de algas marinhas (mesmo tratamento e gás).

Conforme mostrado na **Figura 5.5A**, para PU-CTRL, entre os dias 0 e 15, a concentração de O_2 diminuiu cerca de 10% (metade do valor inicial, variando de 20,00% a 10,60%), e a concentração de CO_2 aumentou em proporção semelhante (cerca de 9%, variando entre 0,20% e 9,13%).

Como mostrado na **Figura 5.5B**, para UL-CTRL, a concentração de O_2 diminuiu cerca de 4% (de 20,00% para 15,83%), e a concentração de CO_2 aumentou na mesma extensão (de 0,20% para 4,50%), sem diferenças significativas para O_2 entre os dias 3 e 15 e para CO_2 entre os dias 3 e 12. Deve-se ressaltar também que a concentração de CO_2 no dia 15 para o UL-CTRL não foi significativamente diferente dos dias 0, 9 e 12.

A maioria das algas marinhas não sofre fotorrespiração (isto é, respiração na presença de luz), a menos que em circunstâncias especiais, quais sejam, alta concentração de O_2 em combinação com baixos níveis de CO_2 , durante a reprodução, reparação de tecidos ou crescimento, e em resposta a uma mudança no pH do meio. Se a fotorrespiração é insignificante no caso das algas marinhas, o mesmo não acontece com a respiração no escuro, que está relacionada à biossíntese, ao balanço de carbono e à manutenção da saúde celular e funções relacionadas com a fotossíntese [348].

Os resultados obtidos indicam que o tratamento MAP e as condições de armazenamento foram capazes de manter baixas as taxas de fotossíntese e respiração, uma vez que os níveis de O_2 foram mantidos próximos de 0%, e os de CO_2 diminuíram lentamente ao longo dos dias de armazenamento. Deve-se considerar que uma pequena parte do CO_2 se dissolve na água e que, caso seja necessário, a absorção de carbono pelas algas marinhas pode advir principalmente dos iões bicarbonato (HCO_3^-), através de uma reação catalisada pela enzima anidrase carbónica presente na sua superfície [349]. A baixa permeabilidade dos polímeros PA/PE usados para preservar as amostras também deve ser mencionada, porque estas películas provavelmente desempenharam um papel na redução efetiva das trocas gasosas com o ambiente externo [350]. O argon pode ter contribuído, devido à sua capacidade de interromper a ligação do oxigénio aos locais recetores enzimáticos [351].

Em relação aos controlos, foi observado um aumento na concentração de CO_2 no *headspace*, seguido de uma diminuição semelhante no O_2 . Isso ocorreu em taxas variáveis para as algas PU e UL, sendo observada maior atividade na primeira.

A relação entre a libertação de CO_2 e o consumo de O_2 foi próxima a 1 em ambas as algas marinhas, o que é consistente com o quociente respiratório médio (RQ) para as macroalgas [352]. No entanto, esperava-se que o O_2 produzido pela fotossíntese

pudesse compensar, em algumas ordens de grandeza, o seu consumo pela respiração (também conhecida como “fotossíntese líquida”) [353].

Os resultados sugerem que, muito provavelmente, não houve atividade fotossintética significativa, devido ao baixo teor de HCO_3^- ou nutrientes no meio (ou CO_2 no espaço à cabeça das amostras VAC), uma vez que as embalagens foram seladas sem água do mar [348], [354], [355].

Para que as algas atinjam um crescimento equilibrado, elas devem obter nutrientes nas proporções corretas [356], [357]. Caso contrário, o carbono fixado através da fotossíntese não pode ser efetivamente utilizado para produzir nova biomassa, sendo excretado como carbono orgânico dissolvido ou armazenado como polissacarídeos [358].

Outra hipótese baseia-se no facto de que, sob stress abiótico, as algas marinhas são propensas a produzir ROS, que podem danificar as clorofilas no cloroplasto, reduzindo assim a atividade fotossintética [359]–[361]. Portanto, pode-se supor que a mudança na composição dos gases do *headspace* foi principalmente devida à respiração no escuro (talvez fotorrespiração induzida por stress ou reprodução), combinada com uma supressão da fotossíntese [362].

5.3.2.2 Análise Microbiológica

Os resultados revelaram que as contagens microbianas iniciais de bactérias heterotróficas marinhas (HMB), para *P. umbilicalis* e *U. lactuca* foram relativamente altas, variando de $3,335 \pm 0,275 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ para UL a $4,775 \pm 0,148 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ para PU, conforme mostrado na **Figura 5.6**. Ao longo do período de armazenamento, as contagens microbianas variaram dependendo do tratamento de preservação e do tipo de alga marinha.

Para PU (**Figura 5.6A**), os tratamentos MAP e VAC resultaram em diminuição da contagem microbiana de HMB ao longo do período de armazenamento, enquanto o oposto ocorreu para o CTRL. No dia 6, a contagem microbiana para o CTRL atingiu o valor de $5,477 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, o que tornaria a alga imprópria para consumo, e os valores foram ainda maiores (acima do limite de quantificação) no dia 9. A partir do dia 9 em diante, foi possível notar uma queda acentuada na carga microbiana tanto para os tratamentos MAP quanto para VAC, principalmente neste segundo tratamento. No dia 15, a carga microbiana das HMB estava abaixo do limite de detecção para ambos os tratamentos MAP e VAC.

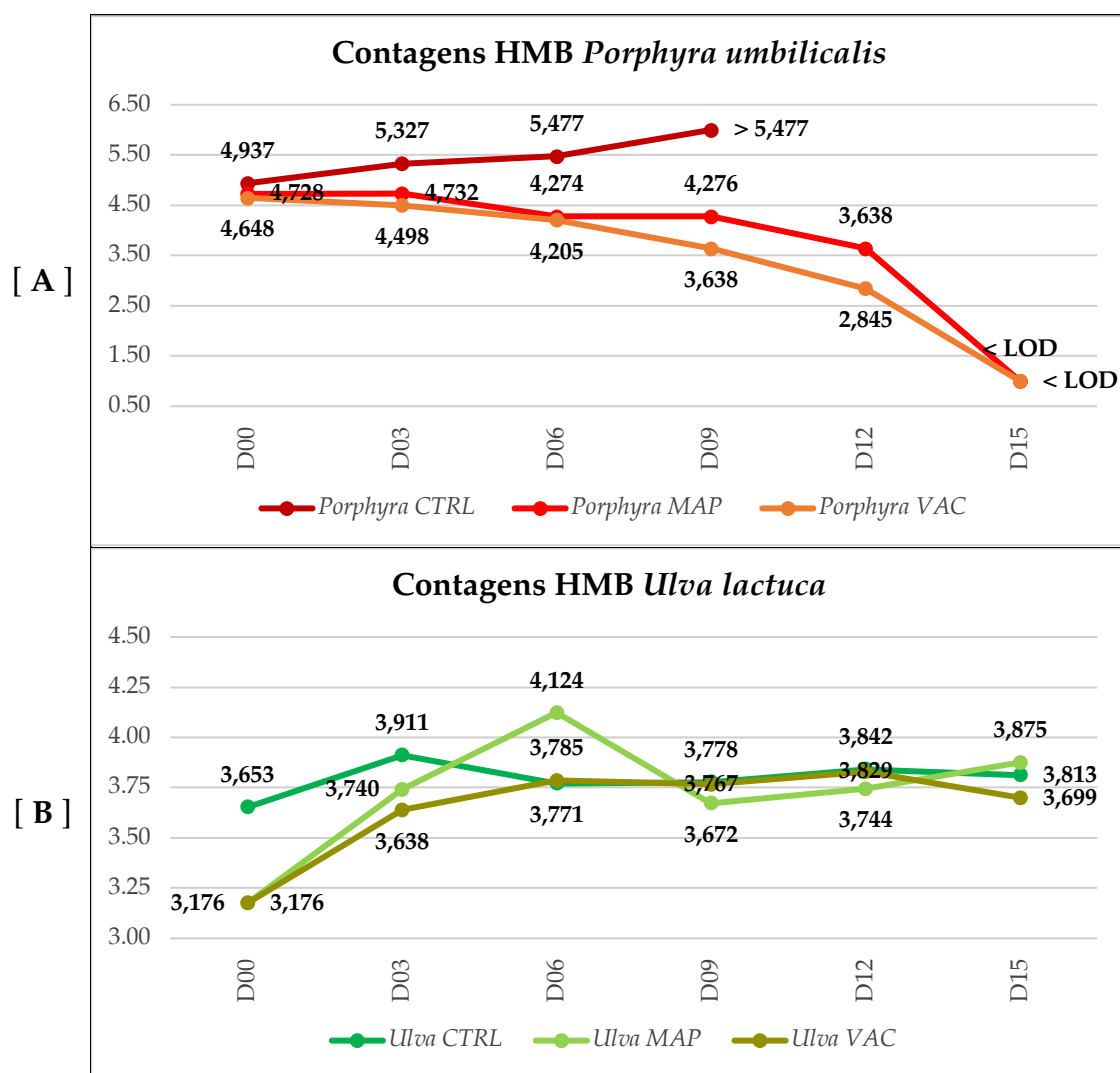


Figura 5.6 Contagens de bactérias marinhas heterotróficas ao longo dos dias de armazenamento para [A] *P. umbilicalis* e [B] *U. lactuca*, preservadas por diferentes tratamentos

Os resultados são expressos como o logaritmo da contagem de unidades formadora de colônia por grama de amostra ($\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$).

Notas: Dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 ($n = 2$ placas de Petri $\times$ 2 diluições $\times$ 1 repetição = 4, para cada tratamento); LOQ: limite de quantificação; LOQ < 1 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ para bactérias marinhas heterotróficas.

Para UL-CTRL (**Figura 5.6B**), as contagens microbianas de HMB foram geralmente inferiores às de PU. O tratamento VAC apresentou as menores contagens microbianas durante todo o período de armazenamento (com valores variando de 3,176 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 0 a 3,699 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 15), enquanto para o tratamento MAP, as contagens microbianas apresentaram as maiores contagens microbianas, variando durante o período de armazenamento (de 3,176 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 0 a 4,124 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ no dia 6). No entanto, as contagens microbianas no dia 15 foram notavelmente semelhantes para CTRL e ambos os tratamentos. Portanto, pode-se

deduzir que as contagens microbianas para UL permaneceram relativamente constantes durante o período de armazenamento para todos os tratamentos.

As amostras também foram analisadas para bactérias patogénicas, como Coliformes, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase-positivos e *Vibrio* spp. (quantificação), *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (identificação). Em todas as análises estas bactérias estavam abaixo dos limites de deteção (< LOD), ou não foram detetadas (N/D), exceto para Estafilococos coagulase-positiva, onde colónias pretas não características sem halo cresceram no meio de incubação de PU (vide **Anexo.A3**). Estes resultados sugerem que as algas coletadas eram adequadas para consumo humano.

Alguns dos estudos descritos na literatura referiram uma presença insignificante de leveduras e bolores em algas marinhas frescas [283], [363], [364]. Da mesma forma, as bactérias ácido-lácticas halofílicas, presentes nas algas marinhas, não parecem crescer nos meios de cultura disponíveis [365]. Além disso, a carga microbiana no ágar marinho (bactérias marinhas heterotróficas) excede consistentemente a do ágar para contagem de placas, que avalia o crescimento bacteriano total ou viável numa amostra [43], [44]. Consequentemente, o foco foi colocado na avaliação dos agentes patogénicos primários, no início e no final do teste, e na determinação da carga total de bactérias marinhas ao longo do tempo de armazenamento, para saber se as amostras cumpriam com os parâmetros regulamentares, definidos pelas diretrizes locais da União Europeia (EU) (vide **Anexo.A4**).

Para PU, houve um declínio de bactérias marinhas heterotróficas (HMB), ao longo do tempo, nas algas tratadas com MAP e VAC. Os tratamentos pareceram ter afetado as bactérias aeróbicas, pois elas continuaram a crescer em CTRL, que tinha aproximadamente 20% de oxigénio [320].

Deve-se ressaltar que muitas das bactérias que habitam a superfície das macroalgas marinhas vermelhas são aeróbias obrigatórias ou facultativas, como o *Bacillus* spp. e *Virgibacillus* spp. [366], [367].

Numerosas algas marinhas libertam metabolitos secundários com atividades antimicrobianas e anti-incrustantes, as quais, são capazes de regular o crescimento bacteriano e prevenir ou inibir a fixação de organismos indesejados na sua superfície [145], [363], [368]. Isto é particularmente válido para algas vermelhas que, sob certas circunstâncias, podem libertar uma variedade de compostos com propriedades antibióticas contra bactérias Gram-positivas e negativas [369]. Portanto, os tratamentos devem ter reduzido a carga bacteriana aeróbia total e, possivelmente, desencadeado alguma atividade em PU, que, por sua vez, deve ter libertado metabolitos secundários que afetaram a população microbiana.

Lee *et al.* [286], em seu estudo, enfatizaram a importância do armazenamento em baixa temperatura para minimizar o crescimento microbiano. Notavelmente, os autores utilizaram ágar para contagem de placas, em vez de ágar marinho, para avaliar a contagem aeróbica total (TAC). Seus resultados mostraram que o TAC inicial, para as amostras frescas de *Pyropia yezoensis* foi de 3,28 log UFC·g⁻¹. Após 6 dias de armazenamento, o TAC para amostras refrigeradas subiu para 4,25 log UFC·g⁻¹, valor significativamente maior em comparação com amostras armazenadas sob outras condições, como congelamento e super-arrefecimento. Este estudo também mostrou um crescimento significativo para o controle de *P. yezoensis* durante o período de armazenamento, enquanto os demais tratamentos exibiram uma carga microbiana consistente, com uma leve diminuição observada a partir do dia 6. Esses resultados são consistentes com os nossos.

Para UL, a carga microbiana permaneceu relativamente estável em todos os tratamentos durante os dias de armazenamento, e nem os tratamentos MAP nem VAC parecem ter tido qualquer efeito significativo na redução de TAC.

Liot *et al.* [283] estudaram a microbiologia de *Ulva lactuca* e *Palmaria palmata*, que foram submetidas a diferentes procedimentos de lavagem, sendo armazenadas a 4 °C por 14 dias. Os autores notaram que os mesófilos aeróbios mantiveram níveis relativamente estáveis ao longo dos dias de armazenamento, particularmente, em amostras de *U. rigida* e *P. palmata* não lavadas e passadas por água do mar, para as quais a população microbiana inicial variou de 10³ a 10⁵ UFC·g⁻¹, resultado que é semelhante do no nosso estudo com UL.

Olmo *et al.* [145], em um estudo sobre a diversidade microbiana das algas marinhas, observaram uma diminuição na diversidade bacteriana ao nível do gênero e das espécies, para todas as algas marinhas no final do período de armazenamento [145]. Em outro estudo de Olmo *et al.* sobre a diversidade bacteriana em algas marinhas secas (incluindo *U. lactuca* e *P. umbilicalis*), observou-se uma menor diversidade bacteriana em comparação com as macroalgas marinhas frescas (com maior intensidade no caso de *U. lactuca*), havendo uma prevalência de bactérias da família Bacillaceae para ambas as algas marinhas. Apesar do estudo ter sido realizado em amostras secas, pode-se deduzir que *U. lactuca* provavelmente possui uma maior diversidade bacteriana, em comparação com *P. umbilicalis*. Devido às restrições impostas pelas técnicas tradicionais baseadas em cultura, em comparação com os métodos moleculares (por exemplo, sequenciamento dos genes 16S rRNA), não foi possível determinar a diversidade da microflora em relação a sua classificação biológica [370]. Dessa forma, apesar da carga microbiana permanecer relativamente estável, não foi possível saber até que ponto ocorreram variações ao nível taxonômico.

Para concluir, as condições anaeróbicas dos tratamentos MAP e VAC, juntamente com o efeito bactericida dos metabolitos secundários libertados pelas algas marinhas, parecem ser responsáveis pela redução da carga microbiana global, abaixo dos limites de detecção, observada nas amostras de PU. Embora a carga microbiana de UL tenha permanecido estável para CTRL e ambos os tratamentos MAP e VAC, existe a possibilidade de que tenham ocorrido modificações na composição bacteriana das amostras. No final do período de armazenamento, ambas as algas tratadas com MAP e VAC cumpriam com os critérios microbiológicos primários definidos pela legislação. Como resultado, estes tratamentos garantiram o consumo das algas estudadas por um período mínimo de 15 dias em termos de segurança alimentar.

5.3.3 Caracterização Química

5.3.3.1 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis

Os desafios comuns enfrentados pelos alimentos minimamente processados incluem a ocorrência de decomposição e/ou senescência, surgimento de odores desagradáveis, descoloração e amolecimento do tecido [371].

Após a colheita e, sobretudo, durante o período de armazenamento, as algas libertam VOCs que, resumidamente, podem advir de 3 fontes primárias: compostos derivados do seu metabolismo, resultantes da atividade microbiana, e substâncias presentes na água do mar que aderem à sua superfície (incluindo contaminantes) [234], [245], [372].

A análise aqui descrita permitiu detetar 126 VOCs para *P. umbilicalis* e 148 para *U. lactuca*. Esses compostos podem ser divididos em agregados, caracterizados pela presença dos seguintes grupos funcionais: álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres (de ácidos gordos e lactonas), hidrocarbonetos (incluindo terpenos) e cetonas (incluindo aciloínas). Uma categoria “diversos” foi usada para reunir agregados menores de VOCs.

Conforme mostrado na **Figura 5.7**, a maioria dos VOCs em ambas as algas pertenciam ao grupo dos aldeídos, dos quais 36 VOCs foram identificados em PU e 37 VOCs em UL. A categoria seguinte mais bem representada foi a dos álcoois, dos quais foram identificados 23 VOCs em PU e 27 VOCs em UL. O terceiro grupo funcional mais abundante foi o da categoria dos hidrocarbonetos para PU (20 VOCs) e das cetonas para UL (22 VOC). Na categoria “diversos”, os VOCs incluídos são diferentes para cada uma das algas, assim como o número de compostos em cada categoria.

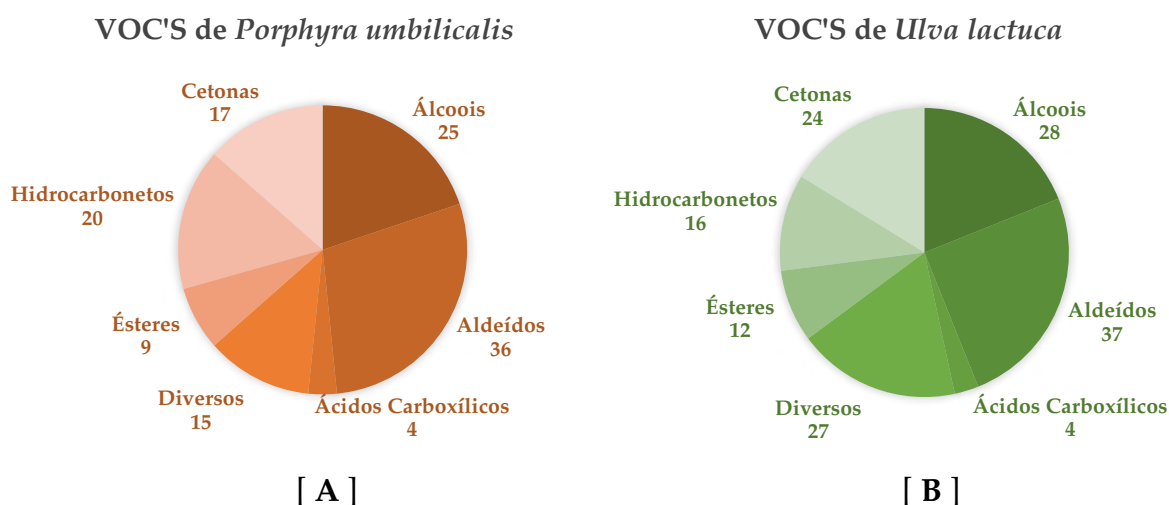


Figura 5.7 Número de VOCs por categorias de grupos funcionais identificados por GC-TOF-MS para as algas marinhas: [A] *P. umbilicalis* e [B] *U. lactuca*

Os seguintes VOCs foram identificados em PU: 3 azotados, 1 sulfurado, 6 furanos, 2 fenóis, 1 epóxido, 1 indano e 1 piridina. Em UL, foram identificados os seguintes VOCs: 4 halogenados (2 bromados, 1 clorado e 1 iodado), 4 sulfurados, 1 azotado, 8 furanos, 4 fenóis, 3 indanos, 1 epóxido, 1 benzotiazol e 1 naftol.

Em relação à categorização dos grupos funcionais ao longo dos dias de armazenamento, não houve grande variação em termos do número de compostos identificados para a maioria das amostras, com algumas exceções. Para PU, houve aumento dos compostos da categoria “diversos” em VAC, enquanto o número de hidrocarbonetos, que foi relativamente menor em relação ao CTRL e ao tratamento MAP.

Para UL, em todas as amostras, o número cetonas praticamente dobrou em relação ao dia 0. Os alcoois aumentaram cerca de 50%, porém, apenas nas amostras de CTRL. Os ésteres pareceram diminuir com o tempo de armazenamento para todos os tratamentos, o que talvez implique na ocorrência de reações de hidrólise. É importante notar que algum ácido acético foi encontrado em VAC durante todo o armazenamento e em MAP foi possível identificá-los em quantidades vestigiais, enquanto não foi possível detetá-lo em CTRL.

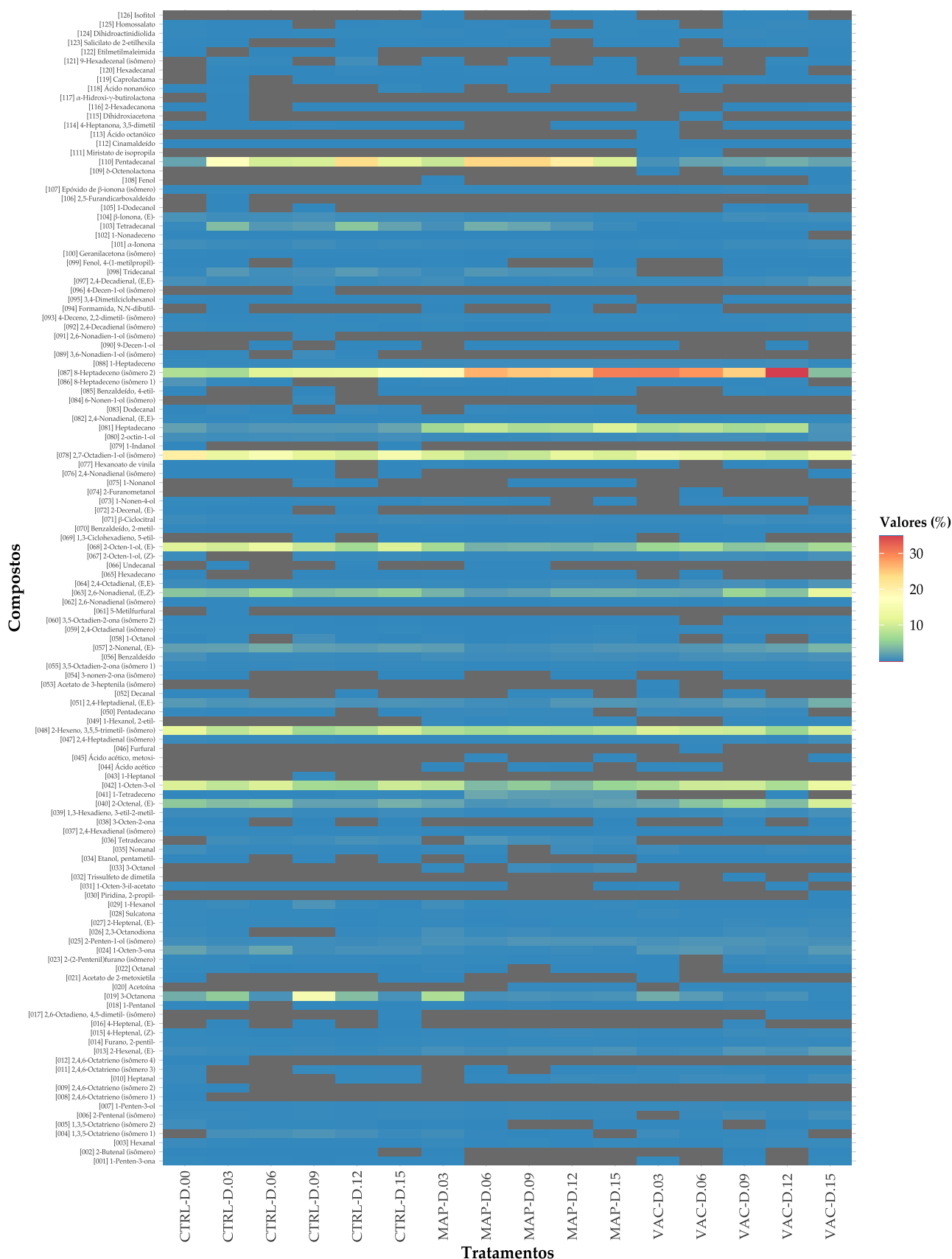


Figura 5.8 Heatmap da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de *P. umbilicalis* no controlo e nos tratamentos MAP e VAC ao longo do tempo de armazenagem de 15 dias

Para visualizar o heatmap em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

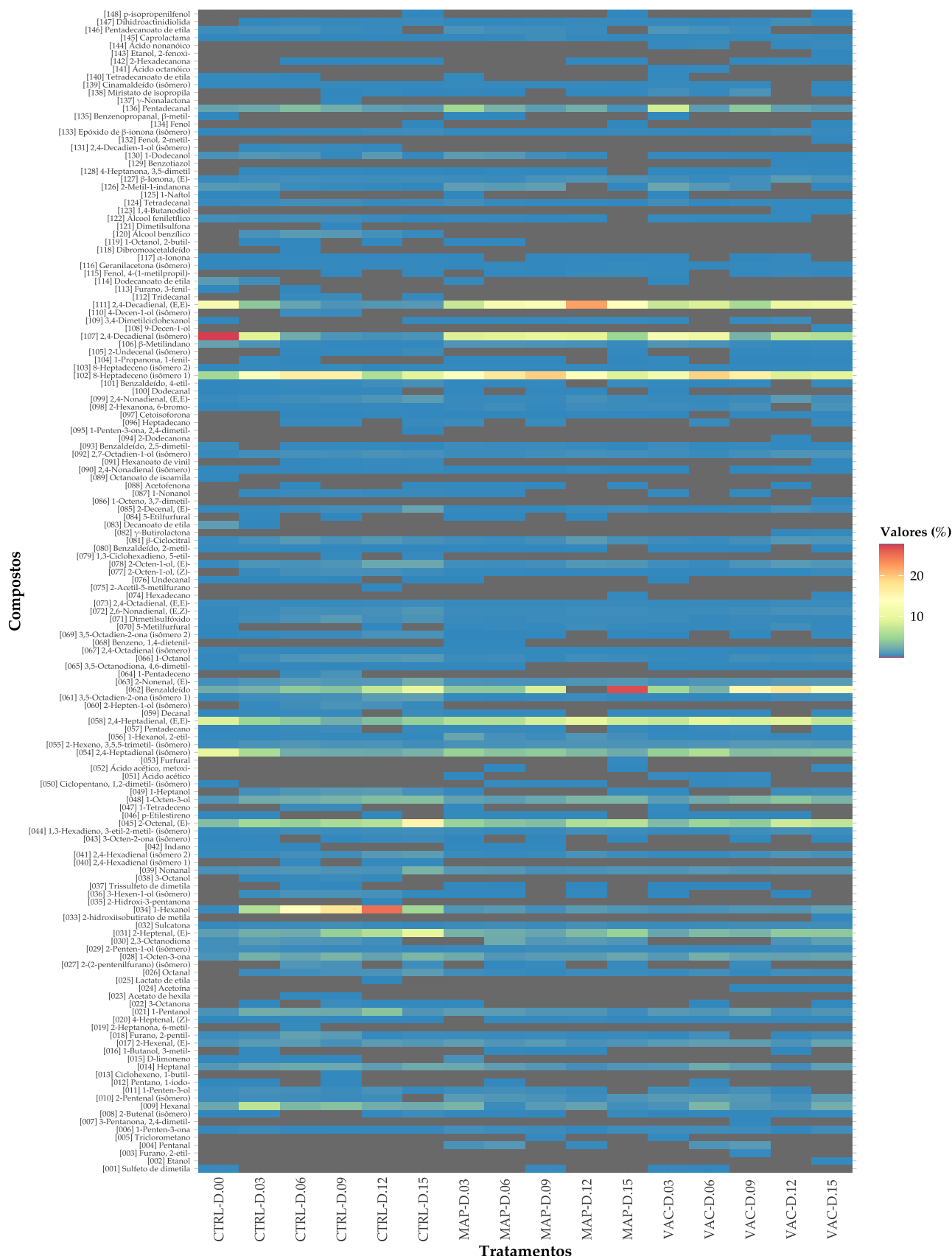


Figura 5.9 *Heatmap* da análise GC-TOF-MS para caracterização dos VOCs de *U. lactuca* no controle e nos tratamentos MAP e VAC ao longo do tempo de armazenagem de 15 dias

Para visualizar o *heatmap* em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clitando aqui!](#)

Para PU (**Figura 5.10A**), o primeiro componente principal (PC-1) explicou 50% da variância das amostras, enquanto o segundo componente principal (PC-2) explicou 35%, exprimindo conjuntamente 85% da variância total. Para UL (**Figura 5.10B**), o PC-1 foi responsável por explicar 43% da variância das amostras, enquanto o PC-2 explicou 27%, e o terceiro componente principal (PC-3) explicou 12%, exprimindo conjuntamente 82% da variância total.

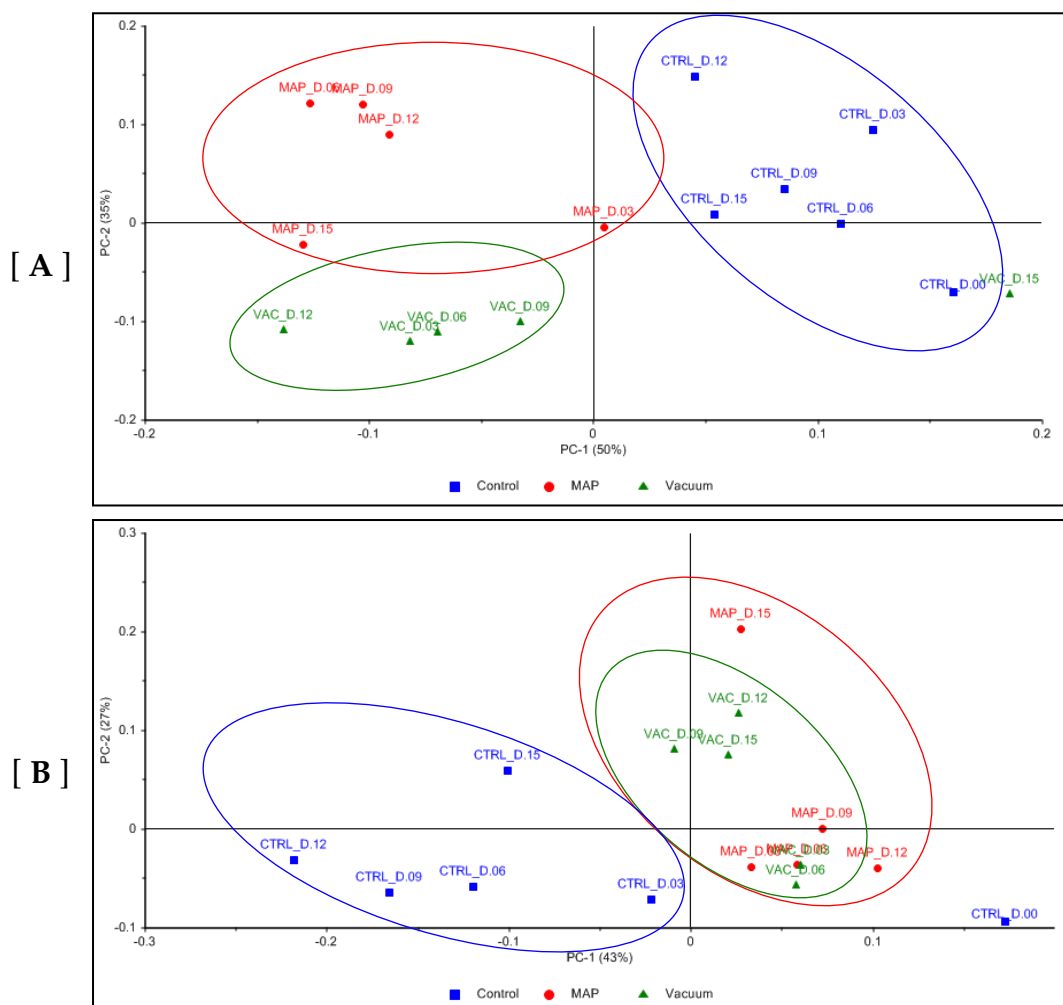


Figura 5.10 Gráficos da PCA contendo os scores de PC-1 vs. PC-2 para [A] *P. umbilicalis* e [B] *U. lactuca*

Examinando a **Figura 5.10A**, observa-se que o PCA conseguiu agrupar as amostras de PU por tipo de tratamento, já que estavam em zonas diferentes do “gráfico de pontuações” (*scores plot*) da PCA, exceto para o tratamento VAC no dia 15. Enquanto o PC-1 foi capaz de separar o CTRL, especificamente no 1º quadrante, dos agrupamentos dos tratamentos, o PC-2 permitiu a separação dos tratamentos VAC e MAP principalmente nos 3º e 4º quadrantes, respetivamente.

Em relação às amostras de UL (**Figura 5.10B**), o PCA não foi capaz de discriminar entre os tratamentos MAP e VAC, estando ambos localizados próximos à origem e, em sua maioria, no eixo positivo do PC-1, enquanto as amostras CTRL estavam localizadas no eixo negativo do PC1 – exceto CTRL no dia 0 - que foi positivamente associado aos padrões subjacentes capturados pelo PC-1.

Conforme mostrado na **Figura 5.11A**, os compostos 8-heptadeceno (isômero 2) (código 2579-04-6) e heptadecano (código 629-78-7), localizados no 3º quadrante, e pentadecanal (código 2765-11-9), localizado no 4º quadrante, pareceram ser as variáveis mais importantes para explicar as alterações nas amostras de PU ao longo dos dias de armazenamento.

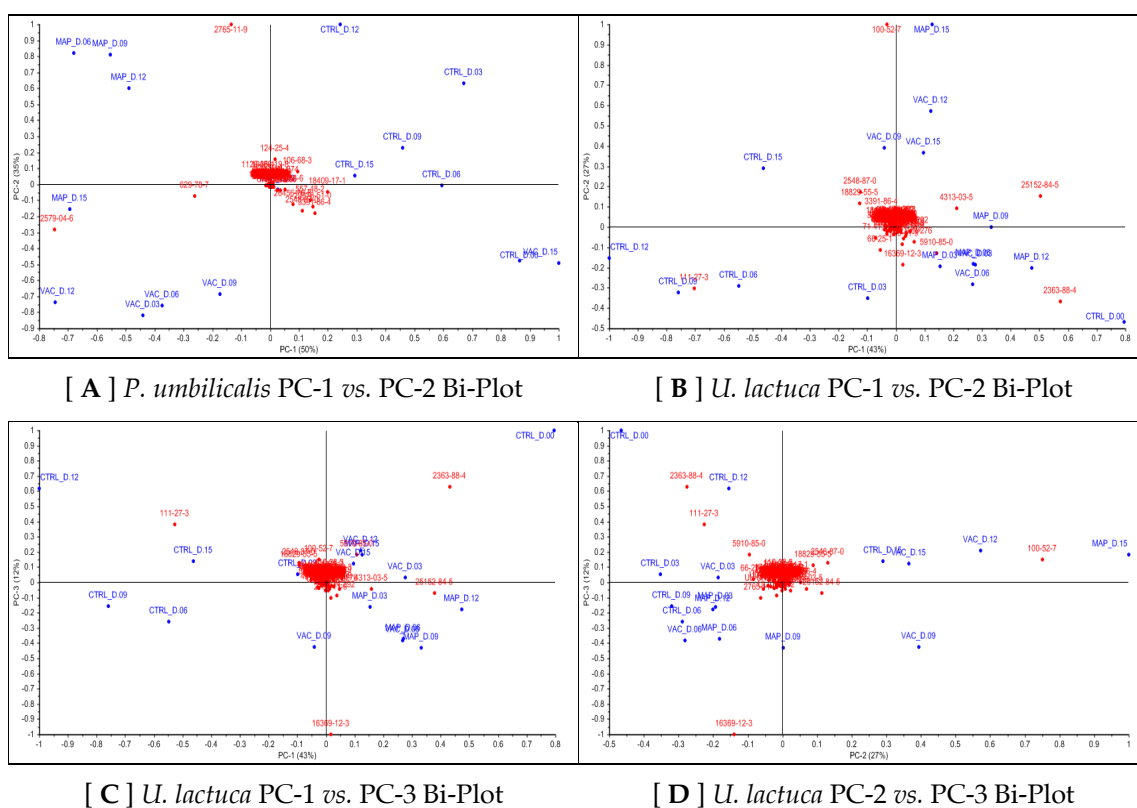
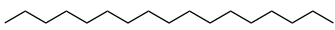
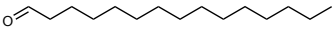


Figura 5.11 Gráficos bi-plot da PCA contendo as pontuações (scores) e cargas (loadings) de: [A] PC-1 vs. PC-2 para *P. umbilicalis*, [B] PC-1 vs. PC-2 para *U. lactuca*, [C] PC-1 vs. PC-3 para *U. lactuca*, e [D] PC-2 vs. PC-3 para *U. lactuca*.

Examinando as **Figuras 5.11B a D**, pode-se notar que os compostos (2E,4E)-decadienal (código 25152-84-5), no 1º quadrante, 2,4-decadienal (isômero) (código 2363-88-4), no 2º quadrante, 1-hexanol (código 111-27-3), no 3º quadrante, e benzaldeído (código 100-52-7), no 4º quadrante, de PC-1 vs. PC-2 foram responsáveis pela variação nas amostras UL. Analisando PC-2 vs. PC-3, 8-heptadeceno (isômero 1) (código 16369-12-3), no 3º quadrante, foi identificado como outra variável relevante do modelo.

No caso de PU (Tabela 5.1), a concentração de 8-heptadeceno (isômero 2) aumentou ao longo do período de armazenamento para o tratamento MAP. No dia 15, o tratamento MAP exibiu uma concentração aproximadamente duas vezes maior que a do CTRL, com valores de 27,679% e 14,501% respectivamente. Para o tratamento VAC, a concentração no dia 15 apresentou o nível mais baixo registrado de 5,527%. O heptadecano apresentou comportamento semelhante: no dia 15, por um lado, a concentração de heptadecano no MAP era aproximadamente cinco vezes maior que a do CTRL (com valores de 10,283% e 2,037% respectivamente), enquanto, por outro lado, o nível mais baixo de 1,143% foi registrado para o tratamento VAC.

Tabela 5.1 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de *P. umbilicalis* de acordo com a PCA.

VOC	Dias	<i>Porphyra umbilicalis</i>		
		CTRL	MAP	VAC
8-Heptadeceno (isômero 2) CAS# N/D  Limite: N/D	Dia 0	10,878% ± 4,982% ^a	10,878% ± 4,982% ^a	10,878% ± 4,982% ^a
	Dia 3	7,346% ± 0,801% ^a	19,952% ± 1,836% ^{ab}	28,141% ± 2,848% ^b
	Dia 6	12,577% ± 1,852% ^a	24,026% ± 3,459% ^b	29,272% ± 1,133% ^b
	Dia 9	10,939% ± 1,969% ^a	23,277% ± 2,356% ^{ab}	22,992% ± 1,849% ^b
	Dia 12	12,219% ± 0,368% ^a	25,666% ± 1,829% ^b	32,619% ± 3,041% ^b
	Dia 15	14,501% ± 1,913% ^a	27,679% ± 3,405% ^b	5,527% ± 1,823% ^a
Heptadecano CAS# 629-78-7  Limite: N/D	Dia 0	3,037% ± 1,524% ^a	3,037% ± 1,524% ^a	3,037% ± 1,524% ^a
	Dia 3	0,924% ± 0,024% ^a	7,098% ± 0,955% ^b	6,817% ± 0,667% ^b
	Dia 6	1,109% ± 0,058% ^a	7,920% ± 1,481% ^{ab}	8,552% ± 0,732% ^b
	Dia 9	0,961% ± 0,290% ^a	6,770% ± 0,710% ^b	6,648% ± 0,185% ^b
	Dia 12	1,192% ± 0,048% ^a	7,410% ± 0,338% ^{ab}	7,271% ± 0,559% ^b
	Dia 15	2,037% ± 0,262% ^a	10,283% ± 0,975% ^{ab}	1,143% ± 0,418% ^a
Pentadecanal CAS# 2765-11-9  Limiar: 715 µg/kg	Dia 0	1,826% ± 0,464% ^a	1,826% ± 0,464% ^a	1,826% ± 0,464% ^{ab}
	Dia 3	17,544% ± 0,702% ^{bc}	8,747% ± 0,709% ^b	0,695% ± 0,011% ^a
	Dia 6	10,309% ± 0,124% ^d	25,939% ± 3,018% ^c	1,529% ± 0,689% ^{ab}
	Dia 9	12,627% ± 3,127% ^{bd}	25,229% ± 2,091% ^c	1,993% ± 0,531% ^{ab}
	Dia 12	23,097% ± 0,329% ^c	19,565% ± 1,615% ^c	2,827% ± 0,132% ^b
	Dia 15	12,968% ± 1,836% ^{bd}	11,103% ± 0,539% ^b	1,732% ± 0,549% ^{ab}

Os resultados são expressos como a percentagem (%) da respetiva área do pico em relação à área total do pico. Os limites de odor na água foram calculados usando a mediana dos valores compilados por Gemert [93].

Em relação ao pentadecanal, houve um aumento significativo na concentração tanto para CTRL, como para MAP no dia 3, com valores de 17,544% e 8,747% respectivamente. No dia 6, o pentadecanal diminuiu no CTRL, enquanto aumentou em MAP, apresentando uma pequena oscilação no dia 9 e possuindo concentrações muito

próximas nos dias 12 e 15. Para o tratamento VAC, a concentração permaneceu relativamente estável durante o armazenamento, com média em torno de 1,755%.

No caso da alga marinha UL (**Tabela 5.2**), tanto o (2*E*,4*E*)-decadienal quanto o seu isômero exibiram comportamento semelhante no CTRL ao longo do período de armazenamento. Inicialmente contribuíram com maior participação de voláteis no dia 0 (12,425% e 27,565%, respectivamente) e, em menor proporção, no dia 3 (4,018% e 9,401%, respectivamente). No entanto, os valores continuaram caindo a partir do dia 6.

Em relação ao tratamento MAP, após uma queda inicial no dia 3, as concentrações dos isômeros de 2,4-decadienal continuaram aumentando para ambos os compostos até o dia 12, com maior intensidade para o (2*E*,4*E*)-decadienal, onde foram encontradas diferenças significativas. No final do período de armazenamento, registou-se ainda outra diminuição acentuada.

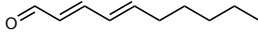
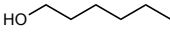
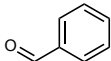
Em relação ao tratamento VAC, os valores de ambos os isômeros de 2,4-decadienal também apresentaram alguma variação, embora tenham apresentado comportamento semelhante: os valores continuaram caindo, com maior intensidade no 2,4-decadienal (isômero), atingindo a concentração mais baixa no dia 9. No dia 12, eles aumentaram novamente, apresentando pequenas alterações no dia 15.

No caso do 1-hexanol, sua concentração aumentou no CTRL até o dia 12, com valores variando de 0,133% a 24,474%, e, no dia 15, diminuiu para o valor de 4,760%. Nos demais tratamentos, os seus valores apresentaram um leve aumento em relação ao CTRL no dia 0, mas permaneceram relativamente estáveis até o final do período de armazenamento.

Em relação ao benzaldeído, houve um aumento considerável na concentração tanto para o CTRL quanto para os tratamentos MAP e VAC, com destaque para as amostras tratadas por MAP (de 2,287% para 33,800%).

Quanto ao 8-heptadeceno (isômero 1), esse composto demonstrou um comportamento semelhante em todas as amostras. Verificou-se uma tendência para a sua concentração aumentar até o dia 9 e depois diminuir, embora permanecendo relativamente acima do valor inicial de 6,000%. No entanto, devido à alta variabilidade nos dados, não foram verificadas diferenças significativas para este composto no tratamento VAC.

Tabela 5.2 Principais VOCs responsáveis pela variação nas amostras de *U. lactuca* de acordo com a PCA.

VOC	Dias	<i>Ulva lactuca</i>		
		CTRL	MAP	VAC
2,4-Decadienal (isômero) CAS# 25152-84-5 (?)  Limiar: 0,13 µg/kg	<i>Dia 0</i>	27,565% ± 0,082% ^a	27,565% ± 0,082% ^a	27,565% ± 0,082% ^a
	<i>Dia 3</i>	9,401% ± 0,596% ^b	8,748% ± 0,206% ^b	10,866% ± 1,603% ^b
	<i>Dia 6</i>	2,166% ± 0,003% ^c	9,163% ± 0,299% ^b	9,387% ± 1,902% ^b
	<i>Dia 9</i>	0,695% ± 0,105% ^d	9,796% ± 0,081% ^b	2,521% ± 0,002% ^c
	<i>Dia 12</i>	0,506% ± 0,021% ^d	8,731% ± 0,827% ^b	6,464% ± 0,024% ^d
	<i>Dia 15</i>	0,810% ± 0,163% ^d	4,250% ± 0,712% ^c	6,128% ± 0,142% ^d
2,4-Decadienal, (E,E)- CAS# 2363-88-4  Limiar: 0,3 µg/kg	<i>Dia 0</i>	12,425% ± 0,412% ^a	12,425% ± 0,412% ^a	12,425% ± 0,412% ^a
	<i>Dia 3</i>	4,018% ± 0,248% ^b	8,110% ± 1,208% ^a	6,853% ± 0,463% ^{bc}
	<i>Dia 6</i>	1,775% ± 0,022% ^c	12,590% ± 0,687% ^a	8,237% ± 0,381% ^b
	<i>Dia 9</i>	0,701% ± 0,118% ^d	12,584% ± 0,104% ^a	5,377% ± 0,004% ^c
	<i>Dia 12</i>	0,950% ± 0,027% ^{cd}	20,548% ± 1,950% ^b	10,449% ± 0,038% ^a
	<i>Dia 15</i>	1,210% ± 0,253% ^{cd}	12,312% ± 1,823% ^a	11,744% ± 1,109% ^a
1-Hexanol CAS# 111-27-3  Limiar: 1210 µg/kg	<i>Dia 0</i>	0,133% ± 0,025% ^a	0,133% ± 0,025% ^a	0,133% ± 0,025% ^a
	<i>Dia 3</i>	6,025% ± 0,050% ^b	0,856% ± 0,053% ^{bc}	0,504% ± 0,029% ^b
	<i>Dia 6</i>	14,377% ± 1,316% ^c	1,074% ± 0,070% ^{bd}	0,611% ± 0,011% ^{bc}
	<i>Dia 9</i>	17,684% ± 0,261% ^d	0,443% ± 0,004% ^e	0,879% ± 0,001% ^c
	<i>Dia 12</i>	24,474% ± 0,584% ^e	1,102% ± 0,103% ^d	0,850% ± 0,003% ^c
	<i>Dia 15</i>	4,670% ± 0,477% ^b	0,828% ± 0,03% ^c	1,594% ± 0,176% ^d
Benzaldeído CAS# 100-5-27  Limiar: 550 µg/kg	<i>Dia 0</i>	2,287% ± 0,027% ^a	2,287% ± 0,027% ^a	2,287% ± 0,027% ^a
	<i>Dia 3</i>	2,939% ± 0,571% ^a	4,004% ± 0,207% ^b	5,146% ± 0,094% ^b
	<i>Dia 6</i>	5,586% ± 2,27% ^{ab}	4,136% ± 0,325% ^b	3,371% ± 1,052% ^{ab}
	<i>Dia 9</i>	3,804% ± 0,431% ^a	8,441% ± 0,070% ^c	15,221% ± 0,010% ^c
	<i>Dia 12</i>	6,023% ± 1,384% ^{ab}	11,037% ± 0,812% ^c	17,494% ± 0,064% ^c
	<i>Dia 15</i>	9,642% ± 0,367% ^b	33,800% ± 9,784% ^d	11,800% ± 2,147% ^c
8-Heptadeceno (isômero 1) CAS# N/D  Limiar: N/D	<i>Dia 0</i>	6,000% ± 1,107% ^a	6,000% ± 1,107% ^a	6,000% ± 1,107% ^a
	<i>Dia 3</i>	13,026% ± 0,003% ^b	12,674% ± 1,198% ^b	13,193% ± 2,260% ^a
	<i>Dia 6</i>	15,353% ± 1,827% ^b	16,715% ± 0,625% ^{bc}	15,777% ± 4,864% ^a
	<i>Dia 9</i>	16,710% ± 0,912% ^b	19,334% ± 0,160% ^c	16,086% ± 0,011% ^a
	<i>Dia 12</i>	6,424% ± 0,752% ^a	12,419% ± 1,177% ^b	8,505% ± 0,031% ^a
	<i>Dia 15</i>	8,799% ± 0,376% ^a	7,026% ± 2,471% ^a	9,521% ± 0,38% ^a

Os resultados são expressos como a percentagem (%) da respectiva área do pico em relação à área total do pico. Os limiares de odor na água foram calculados usando a mediana dos valores compilados por Gemert [93].

Apesar de serem abundantes, os hidrocarbonetos não parecem contribuir significativamente para o seu aroma, e os compostos halogenados, comumente encontrados em várias espécies de algas marinhas vermelhas, não prosperam nestas macroalgas em particular (exceto o tricloroetileno) [37], [373], [374]. Esses resultados são consistentes com nossos achados.

Em relação à UL, os aldeídos não apenas prevalecem como os VOCs mais abundantes em termos de diversidade, mas também exibem a maior concentração em relação à área do cromatograma. Essas descobertas estão alinhadas com a descrição fornecida por Fujimura & Kawai [37] sobre os constituintes do sabor distinto da *Ulva australis* (anteriormente *Ulva pertusa*).

PU apresentou uma alta concentração de 8-heptadeceno (isômero 2) e heptadecano, que aparentemente não influenciam o aroma das amostras, devido aos seus altos limiares de odor [93]. A presença destes hidrocarbonetos pode resultar de respostas a tratamentos e atividade biológica das macroalgas marinhas e microrganismos associados [37], [374].

Nas algas marinhas, o 8-heptadeceno está envolvido em um mecanismo de proteção contra danos mecânicos, funcionando como molécula quimiorreceptiva e feromona biológica durante o processo de cicatrização de feridas. Algumas algas marinhas possuem um sistema enzimático, capaz de catalisar o ácido eicosapentaenóico para produzir este alceno [148]. A maior ocorrência de 8-heptadeceno nas amostras VAC parece estar relacionada ao dano causado pela compressão do UL durante o embalamento.

Numerosos estudos relataram a presença de heptadecano ou heptadeceno em algas tipo “nori” ou “erva-patinha”, incluindo heptadecano em *P. umbilicalis* [159] e 8-heptadeceno em *Pyropia* spp. [148], [244]. De acordo com Kamenarska *et al.*, o heptadecano e o heptadeceno foram os hidrocarbonetos predominantes encontrados em algas vermelhas coletadas no Mar Negro.

O pentadecanal parece ter um efeito relevante na caracterização do perfil aromático de PU tratado com CTRL e MAP, devido à sua alta abundância e limiares de odor mais baixos (715 µg/kg). O pentadecanal exibe um aroma refrescante de cera com notas florais [94], [135]. A formação de pentadecanal em algas marinhas parece estar relacionada à oxidação α do ácido palmítico (PA) pelas lipoxigenases [375]. Por alguma causa ainda desconhecida, parece que o tratamento VAC mostrou uma maior eficácia na inibição da produção de pentadecanal.

Para UL, o (2E,4E)-decadienal e um de seus isômeros foram os compostos com maior concentração, principalmente no controle no dia 0. O 2,4-decadienal é conhecido por seu aroma gorduroso, acompanhado de notas verdes, frescas e nuances cítricas.

Quando presente em grandes quantidades, seu sabor lembra o do frango frito, com um sabor rançoso subjacente [94]. Dado o baixo limiar de detecção (aproximadamente 0,3 - 0,13 µg/kg), e a alta concentração inicial dos isômeros de 2,4-decadienal, pode-se deduzir que estes compostos contribuem significativamente para a caracterização do odor do UL.

Em *Ulva conglobata*, foi demonstrado que os isômeros de 2,4-decadienal foram produzidos via ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs), derivados do ácido araquidônico (AA), por meio de extrato enzimático bruto, que foi isolado dessa alga marinha [376]. É notório que a atividade microbiana pode diminuir a presença destes compostos, associados a um aroma a “peixe”, em algas marinhas fermentadas [159], [172]. Da mesma forma, a exposição à luz também parece contribuir para o seu declínio [377]. A diminuição significativa dos isômeros de 2,4-decadienal em CTRL parece ser influenciada, principalmente, pela presença de microrganismos, e não pelo nível de exposição à luz que foi semelhante em todas as amostras.

O 1-hexanol carrega um aroma verde e herbáceo distinto, com um leve toque alcoólico, que lembra o cheiro de relva recém cortada [94]. Apesar do seu limiar de odor médio (121 µg/kg), foi referido que a sua contribuição no odor da alga marinha *Ulva australis* era baixa [93], [135]. O 1-hexanol pode ser gerado através da peroxidação de ácidos gordos insaturados. Além disso, os aldeídos podem ser convertidos em seus álcoois correspondentes, através de uma reação catalisada por aldeído desidrogenases (ALDHs) [131]. No caso das algas fermentadas, foi observado que o 1-hexanal sofre uma transformação em 1-hexanol, através da ação de enzimas liberadas pelos microrganismos inoculados [156]. Em UL-CTRL, o 1-hexanol atingiu seu máximo no dia 12, superando outros compostos abundantes, como os isômeros de 2,4-decadienal e 8-heptadeceno (isómero 1), enquanto na alga UL, tratada com MAP e VAC, sua presença permaneceu relativamente baixa. Portanto, sua ocorrência parece estar relacionada à atividade aeróbica do microbioma presente nas algas marinhas.

O benzaldeído apresenta um aroma doce e frutado, com sabor muito característico que lembra as amêndoas amargas e cerejas [94]. Embora esse composto possua um limiar de odor moderado (550 µg/kg) e pareça contribuir para o aroma de certas espécies de *Ulva* spp., sua influência é menos perceptível, em comparação com os outros aldeídos presentes [93], [135]. Em nosso estudo, o benzaldeído pareceu ter impacto no perfil aromático da alga UL, processada especificamente com MAP, embora essa influência pareça ser benéfica, considerando os atributos organoléticos positivos associados ao composto.

Existem muitas hipóteses sobre a via metabólica para a produção de benzaldeído em macroalgas marinhas, tais como: produzido termicamente e derivado da

degradação de aminoácidos por Strecker [378]; originado a partir de compostos aromáticos, através de peroxidação enzimática por haloperoxidases, na ausência de halogenetos [379]; e ainda derivada de aminoácidos por rotas químicas como consequência da oxidação lipídica. Isso pode ocorrer diretamente através de radicais livres derivados de hidroperóxidos lipídicos, ou indiretamente através de carbonilos reativos derivados de lípidos [239]. Semelhante aos estudos de López-Pérez *et al.* [245], nossos resultados identificaram o benzaldeído como o composto aromático mais abundante em *U. lactuca*. Sua concentração pareceu ser influenciada pelo tempo de armazenamento para todos os tratamentos, com destaque para as amostras preservadas por MAP.

Não foi encontrada literatura sobre o limiar de detecção do 8-heptadeceno, que possui aroma “terroso, semelhante ao de musgos” [147], e sua presença não parece impactar significativamente no aroma das algas marinhas do gênero *Ulva* spp. Alguns estudos indicaram o 8-heptadeceno como o hidrocarboneto primário em macroalgas verdes marinhas [158], [159], [165]. O composto foi isolado da alga marinha *Bryopsis maxima* (Chlorophyta), sendo identificado como o estereoisómero (8Z)-heptadeceno [140].

A literatura existente é muito limitada, no que diz respeito às alterações nos VOCs das algas marinhas, influenciadas pela duração do armazenamento. Stévant *et al.* [128] conduziram um estudo para examinar o impacto do armazenamento seco (6% de humidade) e semi-seco (20% de humidade) na alga vermelha *Palmaria palmata* por 126 dias. Semelhante às observações em PU, o heptadecano inicialmente diminuiu até aproximadamente a metade do período de armazenamento, após o qual exibiu uma tendência ascendente, enquanto tanto o (2E,4E)-heptadienal quanto o (2E,6Z)-nonadienal pareceram aumentar nas algas processadas. Além disso, o 1-octen-3-ol, componente relevante na caracterização de PU, demonstrou um aumento ao longo do período de armazenamento, o que no nosso caso só foi observado na alga armazenada sob condições de vácuo.

Num estudo realizado por Sánchez-García *et al.* com o objetivo de investigar as alterações nos VOCs em *Ulva rigida* durante um período de armazenamento de 12 dias, a 4 °C ou 16 °C. Foi observado que o 1-octen-3-ol aumentou ao longo do período de armazenamento, enquanto o 2,4-heptadienal exibiu inicialmente um aumento, mas posteriormente mostrou uma tendência decrescente no final do armazenamento, o que também é consistente com os nossos resultados.

Em contraste com o nosso estudo, onde o benzaldeído, o hexanal e o 2-heptenal exibiram um aumento, a análise feita pelos autores indicou que estes compostos diminuíram durante o armazenamento. Porém, em nosso caso, o hexanal apresentou

alguma oscilação, com uma diminuição observada apenas no tratamento MAP. Além disso, compostos relevantes, tais como 2,4-decadienal ou 8-heptadeceno, estavam ausentes na sua caracterização de *U. rigida*.

As diferenças nos resultados entre nossa pesquisa e a de Sánchez-García *et al.* podem ser atribuídas ao facto das algas marinhas do estudo mencionado terem sido submetidas à liofilização durante a amostragem, o que pode ter promovido a perda de VOCs importantes. Embora tenha havido algumas variações nos VOCs, é importante enfatizar que nenhuma alteração significativa no aroma característico das algas parece ter ocorrido.

Mirzayeva *et al.* [232] em seu estudo sobre a caracterização e diferenciação de algas marinhas, com base em sua composição volátil, concluíram que as mudanças nos VOCs tendem a ser mais pronunciadas em relação a fatores como local de coleta, variações sazonais e diferenças de espécies, em vez de mudanças resultantes de pré-tratamentos (técnicas de preservação). Além disso, os VOC normalmente associados ao aroma de “peixe”, que muitas vezes leva à rejeição da amostra pelos painéis de avaliação, diminuíram com o tempo de armazenamento [160]. Inclusive, os compostos associados a aromas agradáveis (por exemplo, benzaldeído e pentadecanal) aumentaram. Estas alterações podem ser interpretadas como um indicativo de uma melhoria nas propriedades organoléticas das algas tratadas.

Para confirmar os principais componentes odoríferos que contribuem para o aroma típico de *P. umbilicalis* e *U. lactuca*, são necessárias pesquisas adicionais, empregando técnicas como cromatografia gasosa, acoplada à olfatometria (GC-O) e análise sensorial. Estes métodos ajudariam a selecionar e determinar os compostos essenciais, responsáveis pelas fragrâncias distintas associadas a estas espécies de algas marinhas, bem como pelas mudanças notáveis ao longo do período de armazenamento.

Os resultados permitiram concluir que os tratamentos MAP e VAC sugerem ser mais eficientes na manutenção das propriedades organoléticas de UL em comparação com PU, sem diferenças significativas ao longo dos dias de armazenamento. Apesar da grande variedade de VOCs identificados, o PCA demonstrou que um número reduzido de compostos permitem explicar a maior parte da variação nas amostras de ambas as algas marinhas. Alguns destes compostos não tiveram, necessariamente, qualquer impacto relevante nas propriedades sensoriais do PU e UL, e a sua ocorrência esteve relacionada com os processos de cicatrização de feridas e, possivelmente, com o microbioma presente nas algas marinhas.

5.3.4 Considerações Finais

Os resultados obtidos sobre o impacto do MAP nas algas “erva-patinha” (*Porphyra umbilicalis*) e “alface” (*Ulva lactuca*) mostraram que estas permitiam um consumo seguro por um período mínimo de 15 dias. A composição dos gases do headspace indica que o tratamento e as condições de armazenamento do MAP foram capazes de manter baixas as taxas de fotossíntese e respiração.

A degradação dos pigmentos causou a descoloração em ambas as algas. No entanto, a técnica de preservação do MAP pareceu ser a mais eficaz na manutenção da cor de ambas as algas marinhas. Em relação à textura, os resultados indicam que o MAP pode ser superior ao VAC na preservação das propriedades texturais das algas frescas.

Ao final do período de armazenamento, ambas as algas tratadas com MAP e VAC atenderam aos critérios microbiológicos primários especificados pelos regulamentos. Notavelmente, ambos os tratamentos produziram melhorias significativas em *P. umbilicalis* com contagens microbianas abaixo dos limites de detecção no dia 15, enquanto para *U. lactuca*, nenhum dos tratamentos pareceu ter um efeito substancial na redução da carga microbiana.

Apesar de algumas variações nos VOCs, não houve mudança notável no aroma característico das algas estudadas. Entretanto, tanto o tratamento MAP, quanto o VAC demonstraram maior eficácia na preservação das características sensoriais do *U. lactuca* em comparação ao *P. umbilicalis*, não sendo observadas mudanças expressivas durante o armazenamento.

Foram observados sinais de respostas metabólicas a diversas fontes de stress abiótico, como temperatura (danos causados pelo frio), luz e outros parâmetros relacionados às condições de armazenamento (por exemplo, falta de nutrientes ou danos causadas pelo manuseio e embalagem), juntamente com atividades metabólicas ao nível da microbiota que parecem ter sido responsáveis pela maior parte das mudanças observadas através dos métodos analíticos.

O estudo apresentou algumas limitações, que já foram discutidas anteriormente. Para melhorar a compreensão dos principais compostos que contribuem para o aroma distinto das algas marinhas sob investigação, o emprego de técnicas como GC-O e análise sensorial seria de grande valor. Idealmente, em conjunto com métodos de cultivo convencionais, metodologias como o sequenciamento do gene 16S rRNA poderiam auxiliar na identificação da composição taxonômica da microbiota presente. Além disso, expandir o tamanho da amostra com réplicas verdadeiras e realizar repetições adicionais ajudaria a minimizar a variabilidade dos dados.

Este trabalho representa um primeiro passo no estudo de técnicas de processamento mínimo com o objetivo de melhor preservar as características organolépticas das algas marinhas. É necessária mais investigação nesta área, em particular o estudo do impacto de outras misturas de gases MAP, temperaturas de armazenamento ou configurações de iluminação. Além disso, também devem ser consideradas melhorias nas condições de embalagem: por exemplo, incorporando uma fonte de nutrientes como água do mar esterilizada ou explorando a criação de uma membrana protetora para evitar que as algas marinhas sofram dessecação. Mais pesquisas para demonstrar o impacto dessas técnicas nas características nutricionais, na diversidade microbiana ou na aceitação pelo mercado consumidor também são importantes.

O uso do MAP mostrou-se um método promissor para preservação de algas minimamente processadas, superando a eficácia do envasamento em vácuo na maioria dos ensaios. Ressalta-se que os resultados obtidos com as algas marinhas analisadas fornecem evidências de que diferentes espécies apresentam comportamentos variados com base nos tratamentos aplicados, ressaltando a necessidade de exploração desta técnica de preservação em outros tipos de macroalgas.

6

Conclusão

A humanidade ao longo dos séculos sempre buscou formas alternativas de produção, conservação e armazenagem de alimentos para fazer frente às suas necessidades básicas.

Num mundo cada vez mais populoso e com grandes problemas climáticos, que impactam na produção agrícola e alimentar, é essencial buscar fontes nutricionais alternativas e expandir o conhecimento sobre essas. Tal esforço representa uma contribuição valiosa, mesmo que modesta, para a sociedade. Além disso, fomenta o desenvolvimento de culturas de alimentação, que possam minimizar a insegurança alimentar, bem como garantir os nutrientes essenciais à saúde.

As algas são amplamente reconhecidas pelo seu elevado valor nutricional e sustentabilidade, posicionando-se como alternativa viável para complementar a procura por fontes proteicas.

No campo acadêmico, a ficologia tem conquistado espaço, mas a compreensão completa dos compostos químicos das macroalgas e seus impactos na saúde ainda é um campo aberto para pesquisa. Há uma carência de estudos que possam confirmar, em humanos, os efeitos positivos observados em pesquisas *in vitro* ou em modelos animais. A genética e a aquicultura representam áreas de oportunidade para padronizar e melhorar a qualidade das algas cultivadas, diminuindo a suscetibilidade aos fatores externos.

Além disso, a ciência e tecnologia dos alimentos fornece as ferramentas para compreender melhor os fenômenos físico-químicos e bioquímicos subjacentes ao processamento de alimentos, permitindo desenvolver novos produtos alimentares e processos que garantam a segurança, a qualidade e a nutrição advindas das algas marinhas.

A introdução bem-sucedida de alimentos à base de algas no mercado ocidental dependerá de uma estratégia que considere as propriedades sensoriais das algas, em conjunto com as preferências culturais dos consumidores.

As técnicas de conservação são essenciais para preservar a qualidade dos alimentos desde a produção até ao consumo, prevenindo o crescimento de microrganismos e alterações indesejadas. Elas não só ajudam a estender a vida de prateleira dos alimentos, mas também permitem superar a sazonalidade e manter uma dieta variada. No entanto, as técnicas convencionais de preservação aplicadas às algas marinhas, tais como a secagem e a salga, não conseguem preservar completamente as suas qualidades organoléticas e nutricionais.

As algas têm um elevado teor de humidade, o que as torna propensas à deterioração por microrganismos. No presente trabalho para as algas marinhas *C. crispus*, *U. pinnatifida*, *P. umbilicalis*, *S. polyschides*, *F. vesiculosus*, *C. tomentosum*, *C. teedei* var. *lusitanicus*, *Ulva* spp. e *G. gracilis*, observaram-se variações no teor de cinzas e de proteínas entre as espécies analisadas, com *P. umbilicalis* apresentando baixo teor de cinzas e alto conteúdo proteico, enquanto *C. tomentosum* se destacou pelo seu teor elevado de minerais. Os lípidos variaram de 1% a 7%, com *U. pinnatifida* apresentando o maior conteúdo lipídico, seguida por *C. tomentosum*.

As algas são consideradas um alimento de baixo aporte calórico e rico em proteínas e minerais, além de lípidos de excelente qualidade, o que as torna boas candidatas para consumo humano e uso em aplicações alimentares. Adicionalmente, elas possuem compostos sápidos, como o ácido glutâmico, que permitem melhorar o sabor dos alimentos. Esses resultados ajudam a ressaltar a importância de se estudar essas algas para encontrar novas maneiras de incorporá-las na dieta para incentivar a sua aceitação.

As algas vermelhas foram aquelas que apresentaram maior conteúdo de VOCs, o que demonstra a riqueza do seu aroma que remete ao ambiente marinho, às sardinhas, aos crustáceos, aos cogumelos, etc. As algas verdes e castanhas, caracterizadas pela predominância de aldeídos, podem permitir a incorporação nos alimentos de aromas verdes, vegetais e gordurosos, com notas de relva-cortada, pepino, chá-verde, ostras, berbigões, percebes, dentre outras. A análise por GC-MS conseguiu destacar os compostos voláteis de maior importância para a caracterização das algas, assim como o impacto promovido por diferentes técnicas de processamento tais como: secagem, salga, liofilização, processamento por altas pressões e embalagem em atmosferas protetoras.

Os métodos de conservação convencionais afetaram significativamente o perfil de compostos voláteis das algas, com diferenças notáveis, ao nível sensorial, entre as

amostras frescas e processadas. A liofilização aumentou a concentração de VOCs em algumas algas, enquanto a secagem por convecção reduziu uma gama compostos voláteis. Não houve um método de preservação superior para todas as espécies de algas. A liofilização preservou melhor os perfis de aroma de *U. pinnatifida*, *C. teedei* var. *lusitanicus* e *G. gracilis*; a salga foi eficaz em *C. tomentosum*; e a secagem se destacou em *F. vesiculosus*.

A complexidade dos processos que afetam os voláteis em algas marinhas inclui não só fatores físicos como a perda por evaporação ou a concentração, mas também mecanismos bioquímicos ainda não totalmente compreendidos. Estudos físico-químicos e microbiológicos adicionais poderiam contribuir para uma melhor compreensão destes mecanismos e para o aprimoramento de métodos de processamento com objetivos culinários ou de conservação. Além disso, uma investigação, já iniciada, tem como objetivo entender melhor as transformações resultantes do emprego de técnicas culinárias (branqueamento, fervura, cozedura a vapor e em *sous-vide*) num contexto de restauração ou doméstico. A análise por GC-MS foi escolhida devido à capacidade de correlacionar os seus resultados com aqueles obtidos por análise sensorial, trazendo contributos para a ficogastronomia.

No estudo sobre o processamento por altas pressões hidrostáticas (HPP), nas espécies de algas “chorão-do-mar” (*C. tomentosum*) e “erva-malagueta” (*O. pinnatifida*), este mostrou-se mais eficiente em manter os pigmentos das algas em comparação com o controlo, especialmente em *C. tomentosum*, que exibiu menor variação. As mudanças de pigmentação, influenciadas pelo processamento e armazenamento, resultaram em tonalidades mais claras e alterações na coloração das algas. As análises microbiológicas validaram a pasteurização por HPP como uma conservação eficaz, observando-se controles microbianos mais efetivos em *O. pinnatifida* que permaneceu com cargas microbianas abaixo dos limites de quantificação até o final do período de armazenagem refrigerada de 90 dias. Por outro lado, *C. tomentosum* mostrou maior contagem microbiana, mesmo após o processamento.

O estudo alertou para a necessidade de mais pesquisas sobre a composição bacteriana pós-tratamento por HPP e a deteção de agentes patogénicos em algas. Devido ao indício de contaminação no local de colheita ou durante o tratamento das amostras, recomenda-se ainda medidas profiláticas, de forma a minimizar riscos para a saúde e garantir a segurança alimentar.

Quanto aos voláteis, o HPP afetou a evolução destes em *C. tomentosum*, onde foram observados os melhores resultados, porém, com variações significativas no teor de benzaldeído e α -ionona. Em *O. pinnatifida*, o HPP inicialmente aumentou alguns VOCs, mas os efeitos variaram com o tempo. A pesquisa sugere que o HPP pode ter

impactos complexos na composição de VOCs e, conseqüentemente, no aroma e sabor das algas. Dessa forma, são necessários novos estudos com o objetivo de caracterizar compostos que não puderam ser identificados, além de um reforço dos resultados do GC-MS utilizando ferramentas de análise sensorial.

O ensaio que investigou a eficácia da embalagem em atmosfera modificada (MAP) na conservação das algas "erva-patinha" (*P. umbilicalis*) e "alface-do-mar" (*U. lactuca*), mostrou que ambas podem ser consumidas com segurança por até um período de 15 dias. O MAP mostrou-se eficaz em manter a coloração e textura das algas, atendendo também aos padrões microbiológicos impostos pela legislação. *U. lactuca* respondeu melhor ao tratamento em termos de preservação das propriedades sensoriais, enquanto *P. umbilicalis* apresentou contagens microbianas abaixo do limite de quantificação ao término do período de armazenagem de 15 dias. Respostas metabólicas a estressores abióticos e atividades do microbioma foram identificadas como causas de grande parte das alterações observadas. O MAP foi superior à embalagem a vácuo para preservação, indicando a necessidade de testar esta técnica em outras macroalgas.

O estudo sugeriu ainda o uso de técnicas analíticas adicionais para entender melhor os compostos que definem o aroma das algas e propõem-se futuras pesquisas sobre outras misturas de gases MAP, condições de armazenamento e embalagem, de modo a otimizar a preservação das propriedades organolépticas das algas marinhas.

A principal conclusão extraída dos resultados é que as algas constituem organismos de grande complexidade e que não há um tratamento único que se mostre superior em todos os atributos organolépticos. Além disso, o campo da ficologia, incluindo a ficogastronomia, ainda é relativamente menos explorado em comparação com as outras disciplinas científicas, necessitando de esforços que ampliem o entendimento sobre os "vegetais do mar" e suas possíveis aplicações tecnológicas.

Registe-se, por oportuno, a originalidade do presente trabalho que aplicou pela primeira vez, num estudo científico, técnicas de MAP em algas marinhas, sendo ainda um dos pioneiros no uso de HPP. Até mesmo em relação às técnicas convencionais, nota-se uma lacuna na literatura existente sobre o efeito destas no perfil aroma e outros atributos organolépticos das algas marinhas, bem como de sua alteração ao longo do armazenamento.

Destaca-se ainda que, durante a fase experimental, foram desenvolvidos diversos produtos alimentares que chegaram a ser avaliados por diferentes métodos analíticos. No entanto, devido à limitação de tempo e à necessidade de análises complementares, serão objeto de pesquisas futuras, visando a produção de novos artigos científicos.

Espera-se, com este trabalho, dar um pequeno contributo para área da ciência dos alimentos e da ficogastronomia, rumo à consciencialização sobre a importância das algas marinhas como recurso nutricional, num mundo carente de novas fontes de alimentação. Vivemos um momento histórico em que os efeitos deletérios das mudanças climáticas e da insegurança alimentar convergem para uma possível crise global, sem precedentes, no futuro iminente. Ressalte-se, por último, que o estudo atual traz em si a possibilidade de espargir-se para além das fronteiras académicas, como forma de colaboração, mesmo que insuficiente, para mitigar a severa crise que enfrentamos. Antecipa-se, dessa forma, que as algas marinhas emergirão como uma solução promissora e eficaz.

Bibliografia

- [1] J. L. Pérez-Lloréns, A. T. Critchley, M. L. Cornish, and O. G. Mouritsen, "Saved by seaweeds (II): Traditional knowledge, home remedies, medicine, surgery, and pharmacopoeia," *J. Appl. Phycol.*, vol. 35, no. 5, pp. 2049–2068, Oct. 2023, doi: 10.1007/s10811-023-02965-6.
- [2] L. Pereira and F. Correia, *Macroalgas Marinhas da Costa Portuguesa: Biodiversidade, ecologia e utilizações*, 1st ed. Paris: Nota de Rodapé, 2015.
- [3] O. G. Mouritsen, *Seaweeds: Edible, available & sustainable*, 1st ed., vol. 1. Chicago: University of Chicago Press, 2013.
- [4] O. G. Mouritsen, P. Rhatigan, M. L. Cornish, A. T. Critchley, and J. L. Pérez-Lloréns, "Saved by seaweeds: phyconomic contributions in times of crises," *J. Appl. Phycol.*, vol. 33, no. 1, pp. 443–458, 2021, doi: 10.1007/s10811-020-02256-4.
- [5] J. Peng, S. Min, P. Qing, and M. Yang, "The impacts of urbanization and dietary knowledge on seaweed consumption in china," *Foods*, vol. 10, no. 6, 2021, doi: 10.3390/foods10061373.
- [6] L. Pereira, *Edible Seaweeds of the World*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. doi: 10.1201/b19970.
- [7] FAO, "The State of World Fisheries and Aquaculture 2018," Rome, 2018. [Online]. Available: <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>
- [8] R. L. Naylor *et al.*, "A 20-year retrospective review of global aquaculture," *Nature*, vol. 591, no. 7851, pp. 551–563, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03308-6.
- [9] J. W. Blunt, A. R. Carroll, B. R. Copp, R. A. Davis, R. A. Keyzers, and M. R. Prinsep, "Marine natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 35, no. 1, pp. 8–53, 2018, doi: 10.1039/c7np00052a.
- [10] O. G. Mouritsen, P. Rhatigan, and J. L. Pérez-Lloréns, "The rise of seaweed gastronomy: Phycogastronomy," *Bot. Mar.*, vol. 62, no. 3, pp. 195–209, 2019, doi: 10.1515/bot-2018-0041.
- [11] L. Mišurcová, "Chemical Composition of Seaweeds," in *Handbook of Marine*

Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology, S.-K. Kim, Ed., 1st ed. John Wiley & Sons, 2012, pp. 173–192.

- [12] F. Rey *et al.*, “Domesticated populations of *Codium tomentosum* display lipid extracts with lower seasonal shifts than conspecifics from the wild-relevance for biotechnological applications of this green seaweed,” *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 4, 2020, doi: 10.3390/md18040188.
- [13] J. L. Pérez-Lloréns, “Seaweed Consumption in the Americas,” *Gastronomica*, vol. 19, no. 4, pp. 49–59, 2019, doi: 10.1525/gfc.2019.19.4.49.
- [14] O. G. Mouritsen, “The emerging science of gastrophysics and its application to the algal cuisine,” *Flavour*, vol. 1, no. 1, p. 6, 2012, doi: 10.1186/2044-7248-1-6.
- [15] J. Fleurence, “Seaweeds as Food,” in *Seaweed in Health and Disease Prevention*, J. Fleurence and I. Levine, Eds., 1st ed. Amsterdão, Holanda: Elsevier, 2016, pp. 149–167. doi: 10.1016/B978-0-12-802772-1.00005-1.
- [16] L.-E. Rioux, L. Beaulieu, and S. L. Turgeon, “Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 68, pp. 255–265, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.02.005.
- [17] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, and Population Division, “World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423),” New York, USA, 2019. [Online]. Available: https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf
- [18] E. F. Vieira *et al.*, “Seaweeds from the Portuguese coast as a source of proteinaceous material: Total and free amino acid composition profile,” *Food Chem.*, vol. 269, no. April, pp. 264–275, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.145.
- [19] J. L. P. L. León, I. H. Carrero, J. J. V. Oñate, F. G. B. Murillo, and Á. León, *Those Curious and Delicious Seaweeds. A Fascinating Voyage from Biology to Gastronomy*, 1ª. Cádiz, Espanha: UCA Press, 2018.
- [20] A. H. Buschmann *et al.*, “Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity,” *Eur. J. Phycol.*, vol. 52, no. 4, pp. 391–406, Oct. 2017, doi: 10.1080/09670262.2017.1365175.
- [21] O. G. Mouritsen and K. Styrbæk, “Design and ‘umamification’ of vegetable dishes for sustainable eating,” *Int. J. Food Des.*, vol. 5, no. 1–2, pp. 9–42, 2020, doi: 10.1386/IJFD_00008_1.
- [22] A. Sridhar, M. Ponnuchamy, P. S. Kumar, and A. Kapoor, “Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices: a review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 2, pp. 1715–1735, Apr. 2021, doi: 10.1007/s10311-020-01126-2.
- [23] M. S. Rahman, “Food Preservation: An Overview,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 3rd ed. CRC Press, 2020, pp. 7–18. doi: 10.1201/9780429091483-3.
- [24] M. S. Rahman, “Types of Foods and Food Products,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 3rd ed. CRC Press, 2020, pp. 3–6. doi: 10.1201/9780429091483-2.

- [25] H. Maarse, *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, 1st ed. in Food Science and Technology. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991.
- [26] A. R. B. De Quirós and J. López-Hernández, "An overview on effects of processing on the nutritional content and bioactive compounds in seaweeds," *Foods*, vol. 10, no. 9, 2021, doi: 10.3390/foods10092168.
- [27] S. U. Kadam, C. Álvarez, B. K. Tiwari, and C. P. O'Donnell, "Processing of seaweeds," in *Seaweed Sustainability*, 1st ed. Elsevier, 2015, pp. 61–78. doi: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00004-0.
- [28] Z. Berk, "Thermal processes, methods, and equipment," in *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed. London: Academic Press, 2018, pp. 421–438. doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00018-X.
- [29] X. Zhu *et al.*, "Impacts of novel blanching treatments combined with commercial drying methods on the physicochemical properties of Irish brown seaweed *Alaria esculenta*," *Food Chem.*, vol. 369, no. May 2021, p. 130949, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130949.
- [30] P. K. Sappati, B. Nayak, and G. P. van Walsum, "Effect of glass transition on the shrinkage of sugar kelp (*Saccharina latissima*) during hot air convective drying," *J. Food Eng.*, vol. 210, pp. 50–61, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.04.018.
- [31] V. F. Pinheiro, C. Marçal, H. Abreu, J. A. Lopes da Silva, A. M. S. S. Silva, and S. M. Cardoso, "Physicochemical Changes of Air-Dried and Salt-Processed *Ulva rigida* over Storage Time," *Molecules*, vol. 24, no. 16, p. 2955, Aug. 2019, doi: 10.3390/molecules24162955.
- [32] A. Nongonierma, A. Voilley, P. Cayot, J.-L. Le Quéré, and M. Springett, "Mechanisms of Extraction of Aroma Compounds from Foods, Using Adsorbents. Effect of Various Parameters," *Food Rev. Int.*, vol. 22, no. 1, pp. 51–94, 2006, doi: 10.1080/87559120500379951.
- [33] O. López-Pérez, A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, "Volatile compounds and odour characteristics during long-term storage of kombu seaweed (*Laminaria ochroleuca*) preserved by high pressure processing, freezing and salting," *LWT*, vol. 118, no. September 2019, p. 108710, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108710.
- [34] S. Akomea-Frempong, J. J. Perry, and D. I. Skonberg, "Effects of pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties and microbial quality of frozen sugar kelp," *J. Appl. Phycol.*, vol. 34, no. 1, pp. 609–624, 2022, doi: 10.1007/s10811-021-02610-0.
- [35] D. Li, Z. Zhu, and D. W. Sun, "Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 75, no. March, pp. 46–55, 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.019.
- [36] E. Obluchinskaya and A. Daurtseva, "Effects of air drying and freezing and long-term storage on phytochemical composition of brown seaweeds," *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 6, pp. 4235–4249, Dec. 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02225-x.
- [37] T. Fujimura and T. Kawai, "Enzymes and Seaweed Flavor," in *Seafood Enzymes*, N. F. Haard and B. K. Simpson, Eds., 1st ed. New York: CRC Press, 2000, pp.

411–436. doi: 10.1201/9781482289916-17.

- [38] M.-A. LePape, J. Grua-Priol, and M. Demaimay, "Effect of Two Storage Conditions on the Odor of an Edible Seaweed, *Palmaria palmata*, and Optimization of an Extraction Procedure Preserving its Odor Characteristics," *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 8, pp. 3135–3139, Oct. 2002, doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08871.x.
- [39] L. Bennamoun, M. T. Afzal, and A. Léonard, "Drying of alga as a source of bioenergy feedstock and food supplement - A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 50, pp. 1203–1212, 2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.04.196.
- [40] E. Uribe *et al.*, "Effect of drying methods on bioactive compounds, nutritional, antioxidant, and antidiabetic potential of brown alga *Durvillaea antarctica*," *Dry. Technol.*, vol. 38, no. 14, pp. 1915–1928, 2020, doi: 10.1080/07373937.2019.1679830.
- [41] A. M. Amorim, A. E. Nardelli, and F. Chow, "Effects of drying processes on antioxidant properties and chemical constituents of four tropical macroalgae suitable as functional bioproducts," *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 2, pp. 1495–1509, Apr. 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02059-7.
- [42] U. O. Badmus, M. A. Taggart, and K. G. Boyd, "The effect of different drying methods on certain nutritionally important chemical constituents in edible brown seaweeds," *J. Appl. Phycol.*, vol. 31, no. 6, pp. 3883–3897, 2019, doi: 10.1007/s10811-019-01846-1.
- [43] A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, "Preservation of five edible seaweeds by high pressure processing: effect on microbiota, shelf life, colour, texture and antioxidant capacity," *Algal Res.*, vol. 49, no. January, p. 101938, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.101938.
- [44] A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, "High pressure processing for the extension of *Laminaria ochroleuca* (kombu) shelf-life: A comparative study with seaweed salting and freezing," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 52, no. February, pp. 420–428, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ifset.2019.02.007.
- [45] M. Zhang, X. Meng, B. Bhandari, and Z. Fang, "Recent Developments in Film and Gas Research in Modified Atmosphere Packaging of Fresh Foods," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 13, pp. 2174–2182, Oct. 2016, doi: 10.1080/10408398.2013.819794.
- [46] R. E. Lee, *Phycology*, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. [Online]. Available: <https://www.cambridge.org/pt/academic/subjects/life-sciences/plant-science/phycology-5th-edition?format=AR>
- [47] S.-K. Kim, Ed., *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 1st ed. in Springer Handbooks. Berlin: Springer, 2015. doi: 10.1007/978-3-642-53971-8.
- [48] O. G. Mouritsen, L. Williams, R. Bjerregaard, and L. Duelund, "Seaweeds for Umami Flavour in the New Nordic Cuisine," *Flavour*, vol. 1, no. 1, p. 4, Dec. 2012, doi: 10.1186/2044-7248-1-4.
- [49] O. G. Mouritsen and K. Styrbæk, *Umami*, 1st ed. in Arts and Traditions of the Table. New York Chichester, West Sussex: Columbia University Press, 2014. doi: 10.7312/mour16890.

- [50] L. Pereira, *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*, 1^a. Boca Raton, FL: CRC Press, 2018. doi: 10.1201/9781315152844.
- [51] J.-M. Li and S.-P. Nie, "The Functional and Nutritional Aspects of Hydrocolloids in Foods," *Food Hydrocoll.*, vol. 53, pp. 46–61, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.035.
- [52] D. J. McHugh, "A Guide to the Seaweed Industry," Roma, 441, 2003. [Online]. Available: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4765e/y4765e00.pdf>
- [53] G. O. Phillips and P. A. Williams, *Handbook of Hydrocolloids*, 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009. doi: 10.1533/9781845695873.
- [54] D. G. V. Yashaswini, J. Venkatesan, and S. Anil, "Hydrocolloids from Marine Macroalgae: Isolation and Applications," in *Algae for Food: Cultivation, Processing and Nutritional Benefits*, R. Raja, S. Hemaiswarya, K. Arunkumar, and I. S. Carvalho, Eds., 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2021, pp. 185–200. doi: 10.1201/9781003165941-13.
- [55] M. Younes *et al.*, "Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives," *EFSA J.*, vol. 16, no. 4, 2018, doi: 10.2903/j.efsa.2018.5238.
- [56] FAO, "Properties, Manufacture and Application of Seaweed Polysaccharides – Agar, carrageenan and algin," FAO Fisheries and Aquaculture Department, Pequim, 1990. [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E00.htm>
- [57] M. Urbanova *et al.*, "Interaction Pathways and Structure–Chemical Transformations of Alginate Gels in Physiological Environments," *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 11, pp. 4158–4170, Nov. 2019, doi: 10.1021/acs.biomac.9b01052.
- [58] F. Marques *et al.*, "Seaweed blends as a valuable source of polyunsaturated and healthy fats for nutritional and food applications," *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3390/md19120684.
- [59] D. Rodrigues *et al.*, "Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal," *Food Chem.*, vol. 183, pp. 197–207, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.057.
- [60] B. Choudhary, O. P. Chauhan, and A. Mishra, "Edible Seaweeds: A Potential Novel Source of Bioactive Metabolites and Nutraceuticals With Human Health Benefits," *Front. Mar. Sci.*, vol. 8, no. October, 2021, doi: 10.3389/fmars.2021.740054.
- [61] M. L. Cornish and D. J. Garbary, "Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition," *ALGAE*, vol. 25, no. 4, pp. 155–171, Dec. 2010, doi: 10.4490/algae.2010.25.4.155.
- [62] K. Samarakoon and Y. J. Jeon, "Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review," *Food Res. Int.*, vol. 48, no. 2, pp. 948–960, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.03.013.
- [63] M. L. Wells *et al.*, "Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding," *J. Appl. Phycol.*, vol. 29, no. 2, pp. 949–982, Apr. 2017, doi: 10.1007/s10811-016-0974-5.

- [64] J. Dumay, M. Moránçais, M. Munier, C. Le Guillard, and J. Fleurence, "Phycoerythrins," in *Advances in Botanical Research*, Elsevier, 2014, pp. 321–343. doi: 10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1.
- [65] S. W. A. Himaya and S.-K. Kim, "Marine Nutraceuticals," in *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, S. Kim, Ed., 1st ed. Berlin: Springer, 2015, pp. 995–1014.
- [66] E. M. Brown *et al.*, "Seaweed and human health," *Nutr. Rev.*, vol. 72, no. 3, pp. 205–216, Mar. 2014, doi: 10.1111/nure.12091.
- [67] E. Garicano Vilar, M. G. O'Sullivan, J. P. Kerry, and K. N. Kilcawley, "Volatile compounds of six species of edible seaweed: A review," *Algal Res.*, vol. 45, no. December 2019, p. 101740, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2019.101740.
- [68] ISO, "ISO 5492:2008 — Sensory Analysis – Vocabulary," Genebra, Suíça, 2009. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/38051.html>
- [69] G. M. Shepherd, *Neurogastronomy: How the brain creates flavor and why it matters*, 1st ed. New York: Columbia University Press, 2013.
- [70] N. Shu and H. Shen, "Identification of odour-active compounds in dried and roasted nori (*Porphyra yezoensis*) using a simplified gas chromatography-SNIF technique," *Flavour Fragr. J.*, vol. 27, no. 2, pp. 157–164, 2012, doi: 10.1002/ffj.2096.
- [71] T. Miyasaki, H. Ozawa, H. Banya, H. Tanaka, M. Usui, and K. Hanaoka, "Discrimination of excellent-grade 'nori', the dried laver *Porphyra* spp., with analytical methods for volatile compounds," *Fish. Sci.*, vol. 80, no. 4, pp. 827–838, 2014, doi: 10.1007/s12562-014-0749-3.
- [72] V. Figueroa, A. Bunker, J. Ortiz, and J. M. Aguilera, "Sensory descriptors for three edible Chilean seaweeds and their relations to umami components and instrumental texture," *J. Appl. Phycol.*, vol. 34, no. 6, pp. 3141–3156, Dec. 2022, doi: 10.1007/s10811-022-02848-2.
- [73] A. Salgado, B. Moreira-Leite, A. Afonso, P. Infante, and P. Mata, "Chocolates enriched with seaweed: Sensory profiling and consumer segmentation," *Int. J. Gastron. Food Sci.*, no. January, p. 100747, May 2023, doi: 10.1016/j.ijgfs.2023.100747.
- [74] V. Figueroa, M. Farfán, and J. M. Aguilera, "Seaweeds as Novel Foods and Source of Culinary Flavors," *Food Rev. Int.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–26, Jan. 2023, doi: 10.1080/87559129.2021.1892749.
- [75] B. S. Moreira Leite, "Novas Alternativas para o Uso de Macroalgas da Costa Portuguesa em Alimentação," FCT/UNL, Caparica, 2017. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10362/23801>
- [76] L. Pereira and P. Silva, "A concise review of the red macroalgae *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützinger and *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (J.E. De Mesquita Rodrigues) Bárbara & Cremades," *J. Appl. Phycol.*, vol. 33, no. 1, pp. 111–131, Feb. 2021, doi: 10.1007/s10811-020-02243-9.
- [77] N. Francezon, A. Tremblay, J.-L. Mouget, P. Pasetto, and L. Beaulieu, "Algae as a Source of Natural Flavors in Innovative Foods," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, no. 40, pp. 11753–11772, Oct. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.1c04409.
- [78] H. T. Lawless and H. Heymann, *Sensory evaluation of food: principles of good*

practice. 2010.

- [79] ARIELLE JURCHAK JOHNSON, "Flavor Chemistry and Gastronomy: Sensory, Instrumental, and Multivariate Approaches," University of California Davis, 2014.
- [80] L. Moran *et al.*, "Characterisation of the volatile profile of microalgae and cyanobacteria using solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 3661, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-07677-4.
- [81] E. Abilleira, H. Schlichtherle-Cerny, M. Virto, M. de Renobales, and L. J. R. Barron, "Volatile composition and aroma-active compounds of farmhouse Idiazabal cheese made in winter and spring," *Int. Dairy J.*, vol. 20, no. 8, pp. 537–544, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.idairyj.2010.02.012.
- [82] M. Brattoli *et al.*, "Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds," *Sensors*, vol. 13, no. 12, pp. 16759–16800, 2013, doi: 10.3390/s131216759.
- [83] G. S. Araujo *et al.*, "Calliblepharis jubata Cultivation Potential—A Comparative Study between Controlled and Semi-Controlled Aquaculture," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 21, p. 7553, Oct. 2020, doi: 10.3390/app10217553.
- [84] S. García-Poza *et al.*, "A Comparative Study of the Fatty Acids and Monosaccharides of Wild and Cultivated *Ulva* sp.," *J. Mar. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 2, p. 233, Feb. 2022, doi: 10.3390/jmse10020233.
- [85] AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists – Volume 1*, 15th ed., vol. 1. Arlington, USA: AOAC International, 1990.
- [86] S. Watts and L. Halliwell, "Detailed field and chemical methods for soil," in *Essential Environmental Science: Methods & Techniques*, S. Watts and L. Halliwell, Eds., 1st ed. Oxon: Routledge, 2003, p. 548. doi: 10.4324/9780203435540.
- [87] W. J. Bligh, E. G. and Dyer, E. G. Bligh, and W. J. Dyer, "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959, doi: 10.1139/o59-099.
- [88] J. Folch, M. Lees, and G. H. S. Stanley, "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, May 1957, doi: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
- [89] P. Kumari, C. R. K. Reddy, and B. Jha, "Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae," *Anal. Biochem.*, vol. 415, no. 2, pp. 134–44, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.ab.2011.04.010.
- [90] W. Tang and G. Eisenbrand, "Ecklonia kurome Okam.," in *Chinese Drugs of Plant Origin*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992, pp. 475–477. doi: 10.1007/978-3-642-73739-8_60.
- [91] L. L. Yu *et al.*, "Development of a kelp powder (*Thallus laminariae*) Standard Reference Material," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 4, pp. 1265–1278, 2018, doi: 10.1007/s00216-017-0766-z.
- [92] H. van Den Dool and P. Dec. Kratz, "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition

- chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 11, no. 3, pp. 463–471, 1963, doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- [93] L. J. van Gemert, *Odour Thresholds: Compilations of odour threshold values in air, water and other media*, 2nd ed. Utrecht, Netherlands: Oliemans Punter & Partners, 2011.
- [94] The Good Scents Company, "TGSC Information System," 2018. <http://www.thegoodscentscompany.com/> (accessed Oct. 15, 2023).
- [95] RStudio Team, "RStudio: Integrated Development for R." RStudio, PBC, Boston, MA, USA, 2022. [Online]. Available: <http://www.rstudio.com/>
- [96] L. Pereira, *Guia Ilustrado das Macroalgas*, 1st ed. in *Natura Naturata*. Coimbra: Imprensa da Univ. de Coimbra, 2009. doi: 10.14195/978-989-26-0397-1.
- [97] G. JS and P. V, "Nutritional Potential of Four Seaweed Species Collected in the Barbate Estuary (Gulf of Cadiz, Spain)," *J. Nutr. Food Sci.*, vol. 06, no. 03, pp. 4–10, 2016, doi: 10.4172/2155-9600.1000505.
- [98] D. Pacheco *et al.*, "Portuguese Kelps: Feedstock Assessment for the Food Industry," *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 22, p. 10681, Nov. 2021, doi: 10.3390/app112210681.
- [99] F. Herbreteau, L. J. M. Coiffard, A. Derrien, and Y. De Roeck-Holtzhauer, "The Fatty Acid Composition of Five Species of Macroalgae," *Bot. Mar.*, vol. 40, no. 1–6, pp. 25–28, 1997, doi: 10.1515/botm.1997.40.1-6.25.
- [100] A. F. R. Silva, H. Abreu, A. M. S. Silva, and S. M. Cardoso, "Effect of Oven-Drying on the Recovery of Valuable Compounds from *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp. and *Fucus vesiculosus*," *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 2, p. 90, Feb. 2019, doi: 10.3390/md17020090.
- [101] L. López-Hortas *et al.*, "Comparative evaluation of physicochemical profile and bioactive properties of red edible seaweed *Chondrus crispus* subjected to different drying methods," *Food Chem.*, vol. 383, no. December 2021, p. 132450, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132450.
- [102] M. ONODERA, Y. YOSHIE-STARK, and T. SUZUKI, "Changes in Texture and Dietary Fiber of the Brown Alga *Undaria Pinnatifida* by Various Processing Methods," *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 14, no. 1, pp. 89–94, 2008, doi: 10.3136/fstr.14.89.
- [103] M. V. Freitas, L. G. Inácio, M. Martins, C. Afonso, L. Pereira, and T. Mouga, "Primary Composition and Pigments of 11 Red Seaweed Species from the Center of Portugal," *J. Mar. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 9, p. 1168, Aug. 2022, doi: 10.3390/jmse10091168.
- [104] H. K. Maehre, M. K. Malde, K.-E. Eilertsen, and E. O. Elvevoll, "Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 15, pp. 3281–3290, Dec. 2014, doi: 10.1002/jsfa.6681.
- [105] R. Alghazeer *et al.*, "Nutritional and Nonnutritional Content of Underexploited Edible Seaweeds," *Aquac. Nutr.*, vol. 2022, pp. 1–8, Oct. 2022, doi: 10.1155/2022/8422414.
- [106] C. P. Rocha, D. Pacheco, J. Cotas, J. C. Marques, L. Pereira, and A. M. M.

- Gonçalves, "Seaweeds as valuable sources of essential fatty acids for human nutrition," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 9, 2021, doi: 10.3390/ijerph18094968.
- [107] D. Pacheco, J. Cotas, A. Domingues, S. Ressurreição, K. Bahcevandziev, and L. Pereira, "Chondracanthus teedei var. Lusitanicus: The nutraceutical potential of an unexploited marine resource," *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 10, 2021, doi: 10.3390/md19100570.
- [108] H. Oucif, M. Benaissa, S. Ali Mehidi, R. Prego, S. P. Aubourg, and S.-M. E.-A. Abi-Ayad, "Chemical Composition and Nutritional Value of Different Seaweeds from the West Algerian Coast," *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, vol. 29, no. 1, pp. 90–104, Jan. 2020, doi: 10.1080/10498850.2019.1695305.
- [109] M. Madden, M. Mitra, D. Ruby, and J. Schwarz, "SEASONALITY OF SELECTED NUTRITIONAL CONSTITUENTS OF EDIBLE DELMARVA SEaweeds," *J. Phycol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1289–1298, Oct. 2012, doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01207.x.
- [110] E. Gómez-Ordóñez, A. Jiménez-Escrig, and P. Rupérez, "Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 9, pp. 2289–2294, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.foodres.2010.08.005.
- [111] V. Sanz, M. D. Torres, H. Domínguez, I. S. Pinto, I. Costa, and A. C. Guedes, "Seasonal and spatial compositional variation of the red algae *Mastocarpus stellatus* from the Northern coast of Portugal," *J. Appl. Phycol.*, vol. 35, no. 1, pp. 419–431, Feb. 2023, doi: 10.1007/s10811-022-02863-3.
- [112] L. Paiva, E. Lima, A. I. Neto, and J. Baptista, "Seasonal Variability of the Biochemical Composition and Antioxidant Properties of *Fucus spiralis* at Two Azorean Islands," *Mar. Drugs*, vol. 16, no. 8, p. 248, Jul. 2018, doi: 10.3390/md16080248.
- [113] P. RUPEREZ, "Mineral content of edible marine seaweeds," *Food Chem.*, vol. 79, no. 1, pp. 23–26, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00171-1.
- [114] B. M. Campos *et al.*, "Proximate Composition, Physicochemical and Microbiological Characterization of Edible Seaweeds Available in the Portuguese Market," *Front. Biosci.*, vol. 14, no. 4, p. 26, Sep. 2022, doi: 10.31083/j.fbe1404026.
- [115] H. Harrysson *et al.*, "Effect of storage conditions on lipid oxidation, nutrient loss and colour of dried seaweeds, *Porphyra umbilicalis* and *Ulva fenestrata*, subjected to different pretreatments," *Algal Res.*, vol. 56, no. March, p. 102295, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102295.
- [116] J. Milinovic *et al.*, "Nutritional Benefits of Edible Macroalgae from the Central Portuguese Coast: Inclusion of Low-Calorie 'Sea Vegetables' in Human Diet," *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour.*, vol. 28, no. 5, 2021, doi: 10.19080/ijesnr.2021.28.556250.
- [117] L. Cassani *et al.*, "Thermochemical Characterization of Eight Seaweed Species and Evaluation of Their Potential Use as an Alternative for Biofuel Production and Source of Bioactive Compounds," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 4, p. 2355, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23042355.

- [118] F. Ferreira, M. V. Freitas, M. Cavaco, and T. Mouga, "Towards Sustainable Seaweed Production - Optimising the Culture of *Gracilaria Gracilis*," in *Proceedings of the 2nd International Conference on Water Energy Food and Sustainability (ICoWEFS 2022)*, Cham: Springer International Publishing, 2023, pp. 365–374. doi: 10.1007/978-3-031-26849-6_38.
- [119] G. De Bhowmick and M. Hayes, "In Vitro Protein Digestibility of Selected Seaweeds," *Foods*, vol. 11, no. 3, 2022, doi: 10.3390/foods11030289.
- [120] G. Gao, A. S. Clare, C. Rose, and G. S. Caldwell, "Reproductive sterility increases the capacity to exploit the green seaweed *Ulva rigida* for commercial applications," *Algal Res.*, vol. 24, pp. 64–71, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.algal.2017.03.008.
- [121] T. Wijers, A. Hylkema, T. Visser, and K. Timmermans, "Effects of preservation on protein extraction in four seaweed species," *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 5, pp. 3401–3409, 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02197-y.
- [122] K. Raja, V. Kadirvel, and T. Subramaniyan, "Seaweeds, an aquatic plant-based protein for sustainable nutrition - A review," *Futur. Foods*, vol. 5, no. December 2021, p. 100142, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.fufo.2022.100142.
- [123] G. de Souza Celente, Y. Sui, and P. Acharya, "Seaweed as an alternative protein source: Prospective protein extraction technologies," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 86, no. April, p. 103374, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.ifset.2023.103374.
- [124] E. da Costa *et al.*, "Lipidomic Signatures Reveal Seasonal Shifts on the Relative Abundance of High-Valued Lipids from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*," *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 6, p. 335, Jun. 2019, doi: 10.3390/md17060335.
- [125] D. Lopes, F. Rey, M. C. Leal, A. I. Lillebø, R. Calado, and M. R. Domingues, "Bioactivities of Lipid Extracts and Complex Lipids from Seaweeds: Current Knowledge and Future Prospects," *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 12, p. 686, Nov. 2021, doi: 10.3390/md19120686.
- [126] M. Francavilla, M. Franchi, M. Monteleone, and C. Caroppo, "The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source," *Mar. Drugs*, vol. 11, pp. 3754–3776, 2013, doi: 10.3390/md11103754.
- [127] O. Rekik, A. ben Mansour, M. D. R. G. Da Silva, and M. Bouaziz, "Identification of Trace Volatile and Phenolic Compounds in Olive Oils with Trees Growing in Different Area Conditions: Using SPME/GC–MS," *Food Anal. Methods*, vol. 14, no. 12, pp. 2494–2510, Dec. 2021, doi: 10.1007/s12161-021-02061-w.
- [128] P. Stévant *et al.*, "Semi-dry storage as a maturation process for improving the sensory characteristics of the edible red seaweed dulse (*Palmaria palmata*)," *Algal Res.*, vol. 51, no. August, p. 102048, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.102048.
- [129] L. Schober, H. Dobiašová, V. Jurkaš, F. Parmeggiani, F. Rudroff, and M. Winkler, "Enzymatic reactions towards aldehydes: An overview," *Flavour Fragr. J.*, no. March, pp. 1–22, Apr. 2023, doi: 10.1002/ffj.3739.
- [130] A. O. Olaniran, L. Hiralal, M. P. Mokoena, and B. Pillay, "Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control," *J. Inst. Brew.*, vol. 123, no. 1, pp. 13–23, Jan. 2017, doi: 10.1002/jib.389.

- [131] K. R. Vieira, P. N. Pinheiro, and L. Q. Zepka, "Volatile organic compounds from microalgae," in *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*, Elsevier, 2020, pp. 659–686. doi: 10.1016/B978-0-12-818536-0.00024-5.
- [132] I. Peinado, J. Girón, G. Koutsidis, and J. M. Ames, "Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds," *Food Res. Int.*, vol. 66, pp. 36–44, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.035.
- [133] S. Baldermann, M. Yamamoto, Z. Yang, T. Kawahashi, K. Kuwano, and N. Watanabe, "C¹³-Apocarotenoids: More than Flavor Compounds?," in *Carotenoid Cleavage Products*, 2013, pp. 73–80. doi: 10.1021/bk-2013-1134.ch007.
- [134] T. Kajiwara, A. Hatanaka, T. Kawai, M. Ishihara, and T. Tuneya, "Long chain aldehydes in the green marine algae Ulvaceae," *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, vol. 53, no. 10, p. 1901, 1987.
- [135] H. Sugisawa, K. Nakamura, and H. Tamura, "The Aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*)," *Food Rev. Int.*, vol. 6, no. 4, pp. 573–589, Jan. 1990, doi: 10.1080/87559129009540893.
- [136] T. Kajiwara, K. Kodama, A. Hatanaka, and K. Matsui, "Volatile Compounds from Japanese Marine Brown Algae," in *Bioactive Volatile Compounds from Plants ACS 525*, R. Teranishi, R. G. Buttery, and H. Sugisawa, Eds., Washington, DC, EUA: ACS Publications, Apr. 1993, pp. 103–120. doi: 10.1021/bk-1993-0525.ch009.
- [137] Z. Kamenarska *et al.*, "Comparative study of the volatile compounds from some Black Sea brown algae," *Bot. Mar.*, vol. 45, no. 6, pp. 502–509, 2002, doi: 10.1515/BOT.2002.053.
- [138] C. Anselmi *et al.*, "Unsaturated Hydrocarbons with Fruity and Floral Odors," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 4, pp. 1285–1289, Apr. 2000, doi: 10.1021/jf991156p.
- [139] G. Ben Salha, M. Abderrabba, and J. Labidi, "A status review of terpenes and their separation methods," *Rev. Chem. Eng.*, vol. 37, no. 3, pp. 433–447, Apr. 2021, doi: 10.1515/revce-2018-0066.
- [140] Y. Akakabe, S. Iwamoto, S. Miyamura, and T. Kajiwara, "Induction of (Z)-8-heptadecene in marine green alga *Bryopsis maxima* by mechanical wounding," *Fish. Sci.*, vol. 73, no. 5, pp. 1057–1060, 2007, doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01436.x.
- [141] A. Maruti, E. Durán-Guerrero, C. G. Barroso, and R. Castro, "Optimization of a multiple headspace sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of volatile compounds in macroalgae," *J. Chromatogr. A*, vol. 1551, pp. 41–51, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.04.011.
- [142] N. Barzkar *et al.*, "Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 193, no. 4, pp. 1187–1214, Apr. 2021, doi: 10.1007/s12010-020-03483-8.
- [143] J. R. Seymour and R. Stocker, "The Ocean's Microscale: A Microbe's View of the Sea," in *Microbial Ecology of the Oceans*, J. M. Gasol and D. L. Kirchman, Eds., 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., 2018, p. 528.

- [144] S. Torres, M. D. Baigorí, A. Pandey, and G. R. Castro, "Production and Purification of a Solvent-Resistant Esterase from *Bacillus licheniformis* S-86," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 221–232, Dec. 2008, doi: 10.1007/s12010-008-8181-8.
- [145] A. Picon, A. del Olmo, and M. Nuñez, "Bacterial diversity in six species of fresh edible seaweeds submitted to high pressure processing and long-term refrigerated storage.," *Food Microbiol.*, vol. 94, no. September 2020, p. 103646, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.fm.2020.103646.
- [146] P. Potin, "Oxidative Burst and Related Responses in Biotic Interactions of Algae," in *Algal Chemical Ecology*, C. D. Amsler, Ed., 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 245–271. doi: 10.1007/978-3-540-74181-7_12.
- [147] S. Selli, C. Rannou, C. Prost, J. Robin, and T. Serot, "Characterization of Aroma-Active Compounds in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eliciting an Off-Odor," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 25, pp. 9496–9502, Dec. 2006, doi: 10.1021/jf0619582.
- [148] M. Zhang *et al.*, "The metabolism of 8-heptadecene in *Pyropia* (Bangiaceae, Rhodophyta)," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 2, pp. 1181–1187, Apr. 2014, doi: 10.1007/s10811-013-0205-2.
- [149] F. Shahidi and A. Hossain, "Role of Lipids in Food Flavor Generation," *Molecules*, vol. 27, no. 15, p. 5014, Aug. 2022, doi: 10.3390/molecules27155014.
- [150] H. Stam, A. L. G. M. Boog, and M. H. Quest, "THE PRODUCTION OF NATURAL FLAVOURS BY FERMENTATION," in *FLAVOUR SCIENCE: Recent Developments*, A. J. Taylor and D. S. Mottram, Eds., 1st ed. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1996, pp. 122–125.
- [151] S. B. Watson and F. Jüttner, "Malodorous volatile organic sulfur compounds: Sources, sinks and significance in inland waters," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 43, no. 2, pp. 210–237, Mar. 2017, doi: 10.1080/1040841X.2016.1198306.
- [152] E. Bylaite, Ž. Ilgūnaitė, A. S. Meyer, and J. Adler-Nissen, "Influence of λ -Carrageenan on the Release of Systematic Series of Volatile Flavor Compounds from Viscous Food Model Systems," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 3542–3549, Jun. 2004, doi: 10.1021/jf0354996.
- [153] A. Juteau, J.-L. Doublier, and E. Guichard, "Flavor Release from ι -Carrageenan Matrices: A Kinetic Approach," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 6, pp. 1621–1629, Mar. 2004, doi: 10.1021/jf034622q.
- [154] J. R. Tanoeiro, D. Fortunato, J. Cotas, T. Morais, C. Afonso, and L. Pereira, "Different *Chondrus crispus* Aquaculture Methods and Carrageenan Extraction," *Appl. Sci.*, vol. 13, no. 9, p. 5466, Apr. 2023, doi: 10.3390/app13095466.
- [155] X. Du *et al.*, "Removal of the fishy malodor from *Bangia fusco-purpurea* via fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter pasteurianus*, and *Lactobacillus plantarum*," *J. Food Biochem.*, vol. 45, no. 5, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1111/jfbc.13728.
- [156] Y. X. Xu *et al.*, "The identification of biotransformation pathways for removing fishy malodor from *Bangia fusco-purpurea* using fermentation with

- Saccharomyces cerevisiae*," *Food Chem.*, vol. 380, no. January, p. 132103, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132103.
- [157] S. Rubiño, C. Peteiro, T. Aymerich, and M. Hortós, "Brown Macroalgae (Phaeophyceae): A Valuable Reservoir of Antimicrobial Compounds on Northern Coast of Spain," *Mar. Drugs*, vol. 20, no. 12, p. 775, Dec. 2022, doi: 10.3390/md20120775.
- [158] P. Wang, J. Chen, L. Chen, L. Shi, and H. Liu, "Characteristic Volatile Composition of Seven Seaweeds from the Yellow Sea of China," *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 4, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3390/md19040192.
- [159] S. Li *et al.*, "A review of volatile compounds in edible macroalgae," *Food Res. Int.*, vol. 165, no. February, p. 112559, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.foodres.2023.112559.
- [160] Y.-H. R. Hung *et al.*, "Monitoring the Aroma Compound Profiles in the Microbial Fermentation of Seaweeds and Their Effects on Sensory Perception," *Fermentation*, vol. 9, no. 2, p. 135, Jan. 2023, doi: 10.3390/fermentation9020135.
- [161] E. Delort, A. Jaquier, C. Chapuis, M. Rubin, and C. Starkenmann, "Volatile composition of oyster leaf (*Mertensia maritima* (L.) Gray)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 47, pp. 11681–11690, 2012, doi: 10.1021/jf303395q.
- [162] Z. Guler, F. Karaca, and H. Yetisir, "Volatile Compounds in the Peel and Flesh of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fraught onto Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*) Rootstocks," *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, vol. 88, no. 2, pp. 123–128, Jan. 2013, doi: 10.1080/14620316.2013.11512945.
- [163] D. Majithia, R. Metrani, N. Dhowlaghar, K. M. Crosby, and B. S. Patil, "Assessment and classification of volatile profiles in melon breeding lines using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry," *Plants*, vol. 10, no. 10, 2021, doi: 10.3390/plants10102166.
- [164] J. Zhang, S. Liu, W. C. Walton, and Y. Wang, "Volatile organic compounds of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) cultured by two treatments and their changes during cold storage," *Aquac. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 1442–1452, 2021, doi: 10.1111/are.14998.
- [165] O. López-Pérez, A. Picon, and M. Nuñez, "Volatile compounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds," *Food Res. Int.*, vol. 99, pp. 1002–1010, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2016.12.013.
- [166] F. Fernandes, P. Guedes de Pinho, P. Valentão, J. A. Pereira, and P. B. Andrade, "Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. Var. *acephala* germination," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 15, pp. 6795–802, Aug. 2009, doi: 10.1021/jf901532m.
- [167] J. A. Maga, "Furans in foods," *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 11, no. 4, pp. 355–400, May 1979, doi: 10.1080/10408397909527268.
- [168] J. A. Maga, C. E. Sizer, and D. V. Myhre, "Pyrazines in foods," *C R C Crit. Rev. Food Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 39–115, Sep. 1973, doi: 10.1080/10408397309527153.
- [169] V. Ummat *et al.*, "Optimisation of Ultrasound Frequency, Extraction Time and Solvent for the Recovery of Polyphenols, Phlorotannins and Associated

Antioxidant Activity from Brown Seaweeds.," *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 5, p. 250, May 2020, doi: 10.3390/md18050250.

- [170] V. Audouin, F. Bonnet, Z. M. Vickers, and G. A. Reineccius, "Limitations in the Use of Odor Activity Values to Determine Important Odorants in Foods," in *Gas-Chromatography-Olfactometry: The state of the art*, J. V. Leland, P. Schieberle, A. Buettner, and T. E. Acree, Eds., 1st ed. in ACS Symposium Series, 782. Washington, DC, EUA: American Chemical Society, 2001, pp. 156–171. doi: 10.1021/bk-2001-0782.
- [171] A. J. Johnson, G. D. Hirson, and S. E. Ebeler, "Perceptual characterization and analysis of aroma mixtures using gas chromatography recomposition-olfactometry," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42693, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042693.
- [172] T. Wu, M. Wang, P. Wang, H. Tian, and P. Zhan, "Advances in the Formation and Control Methods of Undesirable Flavors in Fish," *Foods*, vol. 11, no. 16, p. 2504, Aug. 2022, doi: 10.3390/foods11162504.
- [173] R. P. Singh and B. A. Anderson, "The major types of food spoilage: an overview," in *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*, R. Steele, Ed., 1st ed. Woodhead Publishing Limited, 2004, pp. 3–23. doi: 10.1533/9781855739024.1.3.
- [174] T. G. Mezger, "Complex behavior, surfactant systems," in *The Rheology Handbook*, 4th ed. Vincentz Network, 2019, pp. 213–232. doi: 10.1515/9783748600367-010.
- [175] S. Foundations, E. Practices, and C. Applications, *Handbook of Molecular Gastronomy*. 2021. doi: 10.1201/9780429168703.
- [176] H. McGee, *On Food and Cooking – The science and lore of the kitchen*, Rev. Upd. New York: Scribner, 2004.
- [177] M. Repetto, J. Semprine, and A. Boveris, "Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination," in *Lipid Peroxidation*, A. Catala, Ed., 1st ed. London, UK: InTech, 2012, pp. 3–30. doi: 10.5772/45943.
- [178] M. S. Rahman and J. F. Velez-Ruiz, "Food Preservation by Freezing," in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, pp. 653–684. doi: 10.1201/9781420017373-35.
- [179] S. K. Amit, M. M. Uddin, R. Rahman, S. M. R. Islam, and M. S. Khan, "A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing," *Agric. Food Secur.*, vol. 6, no. 1, p. 51, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40066-017-0130-8.
- [180] C. M. D. Man, "Food storage trials: an introduction," in *Food and Beverage Stability and Shelf Life*, D. Kilcast and P. Subramaniam, Eds., 1st ed. Woodhead Publishing Limited, 2011, pp. 325–349. doi: 10.1533/9780857092540.2.325.
- [181] J. Sangeetha, D. Thangadurai, S. Islam, and R. Hospet, *Algal Metabolites*, 1st ed. New York: Apple Academic Press, 2023. doi: 10.1201/9781003346081.
- [182] Y. Özogul and F. Özogul, "Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food," in *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity*, B. Saad and R. Tofalo, Eds., 1st ed. London: Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 1–17.

doi: 10.1039/9781788015813-00001.

- [183] R. Steele, *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Woodhead Publishing Limited, 2004. doi: 10.1533/9781855739024.
- [184] D. Kilcast and P. Subramaniam, *Food and beverage stability and shelf life*, 1st ed. Woodhead Publishing Limited, 2011. doi: 10.1533/9780857092540.
- [185] S. Shephard, *Pickled, Potted, and Canned: How the Art and Science of Food Preserving Changed the World*. New York: Simon & Schuster, 2006. [Online]. Available: <https://books.google.pt/books?id=pNxLRqSreGkC>
- [186] N. N. Misra *et al.*, "Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies," *Food Res. Int.*, vol. 97, no. February, pp. 318–339, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.05.001.
- [187] M. U. H. Joardder and M. Hasan Masud, *Food Preservation in Developing Countries: Challenges and Solutions*. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-11530-2.
- [188] W. B. B. Hugo, "A brief history of heat and chemical preservation and disinfection," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 71, no. 1, pp. 9–18, Jul. 1991, doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb04657.x.
- [189] J. Bottéro, *The Oldest Cuisine in the World: Cooking in Mesopotamia*. Chicago: University of Chicago Press, 2004. [Online]. Available: <https://books.google.pt/books?id=PxnaaTzC8tMC>
- [190] P. Zeuthen and L. Bøgh-Sørensen, Eds., *Food Preservation Techniques*, 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855735309500012>
- [191] A. Elansari and A. E.-D. A. Bekhit, "Processing, Storage and Quality of Cook-Chill or Cook-Freeze Foods," in *Food Engineering Series*, M. W. Siddiqui and M. S. Rahman, Eds., 1st ed. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 125–150. doi: 10.1007/978-3-319-10677-9_7.
- [192] J. B. Conant, Ed., "CASE 7 – Pasteur's and Tyndall's Study of Spontaneous Generation," in *Harvard Case Histories in Experimental Science, Volume II*, Repr. 2014. Boston, USA: Harvard University Press, 1957, pp. 486–539. doi: 10.4159/harvard.9780674598713.c4.
- [193] FAO, "Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention," Rome, 2011.
- [194] F. Alfieri, "Politics, Economics, and Demographics of Food Sustainability and Security," *Reference Module in Food Science*. Elsevier, pp. 1–4, 2016. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03435-1.
- [195] L. Leistner and L. G. M. Gorris, "Food preservation by hurdle technology," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 2, pp. 41–46, Feb. 1995, doi: 10.1016/S0924-2244(00)88941-4.
- [196] H. W. Xiao *et al.*, "Recent developments and trends in thermal blanching – A comprehensive review," *Inf. Process. Agric.*, vol. 4, no. 2, pp. 101–127, 2017, doi: 10.1016/j.inpa.2017.02.001.
- [197] F. Salehi, "Physicochemical characteristics and rheological behaviour of some fruit juices and their concentrates," *J. Food Meas. Charact.*, vol. 14, no. 5, pp. 2472–

2488, Oct. 2020, doi: 10.1007/s11694-020-00495-0.

- [198] M. F. Sancho-Madriz, "Preservation of Food," in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, B. Caballero, Ed., 2nd ed. Elsevier, 2003, pp. 4766–4772. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00968-8.
- [199] H. Sabarez, "Drying of Food Materials," in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2016. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03416-8.
- [200] V. Belessiotis and E. Delyannis, "Solar drying," *Sol. Energy*, vol. 85, no. 8, pp. 1665–1691, 2011, doi: 10.1016/j.solener.2009.10.001.
- [201] O. S. Rahman and C. O. Perera, "Drying and Food Preservation," in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. CRC Press, 2007, pp. 404–432.
- [202] I. Ahmed, I. M. Qazi, and S. Jamal, "Developments in osmotic dehydration technique for the preservation of fruits and vegetables," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 34, pp. 29–43, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.ifset.2016.01.003.
- [203] M. N. Ramesh, "Pasteurization and Food Preservation," in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. CRC Press, 2007, pp. 571–583.
- [204] A. A. Teixeira, "Thermal Processing: Canning and Pasteurization," in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 1994, pp. 1–9. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.02993-0.
- [205] G. L. Robertson, *Ultrahigh Temperature Treatment (UHT): Aseptic Packaging*, vol. 2019. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00810-6.
- [206] M. Lewis, "Ultra-High-Temperature Processing," in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22571-7.
- [207] M. Regier, "Microwave Heating," in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2017. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22364-0.
- [208] L. Punathil and T. Basak, *Microwave Food Processing Applications: Modeling Investigations*, no. 1. Elsevier, 2017. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.21845-3.
- [209] S. Chandrasekaran, S. Ramanathan, and T. Basak, "Microwave food processing-A review," *Food Res. Int.*, vol. 52, no. 1, pp. 243–261, 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.033.
- [210] D. Tanner, *Refrigerated Transport*, no. April. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.03485-5.
- [211] V. Gaukel, *Cooling and Freezing of Foods*. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.03415-6.
- [212] A. Leiter and V. Gaukel, *Food Freezing: Crystal Structure and Size*, no. 2001. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.03109-7.
- [213] J. F. Diehl, "Preservation of food," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 9, no. 1–3, pp. 193–206, Jan. 1977, doi: 10.1016/0146-5724(77)90079-6.
- [214] I. C. Claussen, "Superchilling Concepts Enabling Safe, High Quality and Long Term Storage of Foods," *Procedia Food Sci.*, vol. 1, pp. 1907–1909, 2011, doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.280.
- [215] L. D. Kaale and T. M. Eikevik, "The development of ice crystals in food products during the superchilling process and following storage, a review," *Trends Food*

- Sci. Technol.*, vol. 39, no. 2, pp. 91–103, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.tifs.2014.07.004.
- [216] G. Petzold and J. M. Aguilera, “Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods,” *Food Biophys.*, vol. 4, no. 4, pp. 378–396, Dec. 2009, doi: 10.1007/s11483-009-9136-5.
- [217] J. F. Velez-Ruiz and M. S. Rahman, “Freezing Methods of Foods,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 3rd ed. CRC Press, 2020, pp. 681–690. doi: 10.1201/9780429091483-45.
- [218] X. Duan, X. Yang, G. Ren, Y. Pang, L. Liu, and Y. Liu, “Technical aspects in freeze-drying of foods,” *Dry. Technol.*, vol. 34, no. 11, pp. 1271–1285, Aug. 2016, doi: 10.1080/07373937.2015.1099545.
- [219] C. Ratti, “Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review,” *J. Food Eng.*, vol. 49, no. 4, pp. 311–319, 2001, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00228-4.
- [220] D. S. Jayas, “Food Dehydration,” in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2016, p. 1517. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.02913-9.
- [221] Z. Berk, “Chemical preservation,” in *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed. London: Academic Press, 2018, pp. 591–606. doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00025-7.
- [222] Z. Berk, “Ionizing irradiation and other nonthermal preservation processes,” in *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed. London: Elsevier, 2018, pp. 607–624. doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00026-9.
- [223] Parlamento Europeu, *Regulamento (CE) No 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos alimentares*. Portugal, 2008, pp. 16–33. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj>
- [224] M. S. Rahman, “pH in Food Preservation,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2d ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, pp. 305–316. doi: 10.1201/9781420017373-19.
- [225] E. J. Smid and L. G. M. Gorris, “Natural Antimicrobials for Food Preservation,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, pp. 255–276. doi: 10.1201/9781420017373-17.
- [226] J. Pokorny, “Antioxidants in Food Preservation,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, pp. 277–304. doi: 10.1201/9781420017373-18.
- [227] A. M. Nejib Guizani, “Fermentation as a Method for Food Preservation,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, pp. 233–254. doi: 10.1201/9781420017373-16.
- [228] CAMO Software, “The Unscrambler X.” CAMO Software AS, Oslo, Norway, 2017. [Online]. Available: <https://www.aspentech.com/en/products/apm/aspens-unscrambler>
- [229] A. J. Meléndez-Martínez *et al.*, “A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 62, no. 8, pp. 1999–2049, Mar. 2022, doi: 10.1080/10408398.2020.1867959.
- [230] F. Sánchez-García *et al.*, “Evolution of volatile compounds and sensory

- characteristics of edible green seaweed (*Ulva rigida*) during storage at different temperatures," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 99, no. 12, pp. 5475–5482, Sep. 2019, doi: 10.1002/jsfa.9808.
- [231] Z. Berk, "Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration," in *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed. London: Academic Press, 2018, pp. 567–581. doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00023-3.
- [232] A. Mirzayeva, R. Castro, C. G. Barroso, and E. Durán-Guerrero, "Characterization and differentiation of seaweeds on the basis of their volatile composition," *Food Chem.*, vol. 336, no. April 2020, p. 127725, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127725.
- [233] A. Bordoloi and N. Goosen, *Green and integrated processing approaches for the recovery of high-value compounds from brown seaweeds*, vol. 95. Elsevier Ltd, 2020. doi: 10.1016/bs.abr.2019.11.011.
- [234] C. Ren, Z. Liu, X. Wang, and S. Qin, "The seaweed holobiont: from microecology to biotechnological applications," *Microb. Biotechnol.*, vol. 15, no. 3, pp. 738–754, Mar. 2022, doi: 10.1111/1751-7915.14014.
- [235] H. Chen *et al.*, "1-Octen-3-ol, a self-stimulating oxylipin messenger, can prime and induce defense of marine alga," *BMC Plant Biol.*, vol. 19, no. 1, p. 37, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12870-019-1642-0.
- [236] B. Coleman *et al.*, "The effect of drying, cell disruption and storage on the sensory properties of *Nannochloropsis* sp.," *Algal Res.*, vol. 71, no. March, p. 103092, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.algal.2023.103092.
- [237] F. Sánchez-García *et al.*, "Effect of different cooking methods on sea lettuce (*Ulva rigida*) volatile compounds and sensory properties," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 101, no. 3, pp. 970–980, 2021, doi: 10.1002/jsfa.10705.
- [238] B. Nieva-Echevarría, E. Goicoechea, M. J. Manzanos, and M. D. Guillén, "Fish in Vitro Digestion: Influence of Fish Salting on the Extent of Lipolysis, Oxidation, and Other Reactions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 4, pp. 879–891, Feb. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.6b04334.
- [239] F. J. Hidalgo and R. Zamora, "Formation of phenylacetic acid and benzaldehyde by degradation of phenylalanine in the presence of lipid hydroperoxides: New routes in the amino acid degradation pathways initiated by lipid oxidation products," *Food Chem. X*, vol. 2, no. June, p. 100037, 2019, doi: 10.1016/j.fochx.2019.100037.
- [240] H. Xing and V. Yaylayan, "Mechanochemistry of Strecker Degradation: Interaction of Glyoxal with Amino Acids," p. 27, 2023, doi: 10.2139/ssrn.4551893.
- [241] H.-H. Tian, X.-H. Huang, and L. Qin, "Insights into application progress of seafood processing technologies and their implications on flavor: a review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–16, Oct. 2023, doi: 10.1080/10408398.2023.2263893.
- [242] J. S. Câmara, M. A. Alves, and J. C. Marques, "Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines," *Anal. Chim. Acta*, vol. 555, no. 2, pp. 191–200, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.aca.2005.09.001.

- [243] J. Wu *et al.*, "Comparative evaluation of physical characteristics and volatile flavor components of *Bangia fusco-purpurea* subjected to hot air drying and vacuum freeze-drying," *Curr. Res. Food Sci.*, vol. 7, no. October, p. 100624, 2023, doi: 10.1016/j.crfs.2023.100624.
- [244] Q. Luo *et al.*, "Different Responses to Heat Shock Stress Revealed Heteromorphic Adaptation Strategy of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e94354, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094354.
- [245] O. López-Pérez, A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, "Volatile compounds and odour characteristics of five edible seaweeds preserved by high pressure processing: Changes during refrigerated storage," *Algal Res.*, vol. 53, no. November 2020, p. 102137, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2020.102137.
- [246] Q.-Z. Su, P. Vera, J. Salafranca, and C. Nerín, "Decontamination efficiencies of post-consumer high-density polyethylene milk bottles and prioritization of high concern volatile migrants," *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 171, p. 105640, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.resconrec.2021.105640.
- [247] C. M. Timm, E. P. Lloyd, A. Egan, R. Mariner, and D. Karig, "Direct Growth of Bacteria in Headspace Vials Allows for Screening of Volatiles by Gas Chromatography Mass Spectrometry," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–11, Mar. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00491.
- [248] T. Kajiwara, K. Matsui, A. Hatanaka, T. Tomoi, T. Fujimura, and T. Kawai, "Distribution of an Enzyme System Producing Seaweed Flavor: Conversion of fatty acids to long-chain aldehydes in seaweeds," *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, no. 2, pp. 225–230, Apr. 1993, doi: 10.1007/BF00004022.
- [249] M. Kumar, P. Kumari, C. R. K. Reddy, and B. Jha, "Salinity and Desiccation Induced Oxidative Stress Acclimation in Seaweeds," in *Advances in Botanical Research*, Elsevier, 2014, pp. 91–123. doi: 10.1016/B978-0-12-408062-1.00004-4.
- [250] K. Bischof and R. Rautenberger, "Seaweed Responses to Environmental Stress: Reactive Oxygen and Antioxidative Strategies," in *Seaweed Biology*, C. Wiencke and K. Bischof, Eds., in *Ecological Studies*, vol. 219. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 109–132. doi: 10.1007/978-3-642-28451-9_6.
- [251] M. Schmitt, H. Hasse, K. Althaus, H. Schoenmakers, L. Götze, and P. Moritz, "Synthesis of n-hexyl acetate by reactive distillation," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 43, no. 3, pp. 397–409, Mar. 2004, doi: 10.1016/S0255-2701(03)00124-7.
- [252] M. Espino-Díaz, D. R. Sepúlveda, G. González-Aguilar, and G. I. Olivas, "Biochemistry of Apple Aroma: A Review," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 4, pp. 375–397, Dec. 2016, doi: 10.17113/ftb.54.04.16.4248.
- [253] T. Ohlsson and N. Bengtsson, *Minimal processing technologies in the food industries*, 1st ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2002. doi: 10.1533/9781855736795.
- [254] S. Rodgers, "Minimally Processed Functional Foods: Technological and Operational Pathways," *J. Food Sci.*, vol. 81, no. 10, pp. R2309–R2319, Oct. 2016, doi: 10.1111/1750-3841.13422.
- [255] M. G. O'Sullivan, "Packaging Technologies for Maintaining Sensory Quality,"

- in *A Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development*, Elsevier, 2017, pp. 125–149. doi: 10.1016/B978-0-08-100352-7.00007-5.
- [256] E. Laurila and R. Ahvenainen, “Minimal processing in practice: Fresh fruits and vegetables,” in *Minimal Processing Technologies in the Food Industries*, T. Ohlsson and N. Bengtsson, Eds., 1st ed. Cambridge, UK: Elsevier, 2002, pp. 219–244. doi: 10.1533/9781855736795.219.
- [257] P. Zeuthen, “Safety criteria for minimally processed foods,” in *Minimal Processing Technologies in the Food Industries*, T. Ohlsson and N. Bengtsson, Eds., 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2002, pp. 196–218. doi: 10.1533/9781855736795.196.
- [258] A. Ali, W. K. Yeoh, C. Forney, and M. W. Siddiqui, “Advances in postharvest technologies to extend the storage life of minimally processed fruits and vegetables,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 58, no. 15, pp. 2632–2649, Oct. 2018, doi: 10.1080/10408398.2017.1339180.
- [259] M. R. Tapia *et al.*, “Washing, Peeling and Cutting of Fresh-Cut Fruits and Vegetables,” in *Minimally Processed Foods*, M. W. Siddiqui and M. S. Rahman, Eds., 1st ed. in Food Engineering Series. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 57–78. doi: 10.1007/978-3-319-10677-9_4.
- [260] H.-W. Huang, S.-J. Wu, J.-K. Lu, Y.-T. Shyu, and C.-Y. Wang, “Current status and future trends of high-pressure processing in food industry,” *Food Control*, vol. 72, no. 12, pp. 1–8, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.019.
- [261] H. Mújica-Paz, A. Valdez-Fragoso, C. T. Samson, J. Welte-Chanes, and A. Torres, “High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, no. 6, pp. 969–985, 2011, doi: 10.1007/s11947-011-0543-5.
- [262] M. F. Patterson, D. A. Ledward, and N. Rogers, “High Pressure Processing,” in *Food Processing Handbook*, Wiley, 2005, pp. 173–200. doi: 10.1002/3527607579.ch6.
- [263] M.-V. Muntean *et al.*, “High Pressure Processing in Food Industry – Characteristics and Applications,” *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 10, pp. 377–383, 2016, doi: 10.1016/j.aaspro.2016.09.077.
- [264] J. S. Chacha *et al.*, “Revisiting Non-Thermal Food Processing and Preservation Methods—Action Mechanisms, Pros and Cons: A Technological Update (2016–2021),” *Foods*, vol. 10, no. 6, p. 1430, Jun. 2021, doi: 10.3390/foods10061430.
- [265] L. Leistner and M. S. Rahman, “Hurdle Technology (Combined Methods) for Food Preservation: Theory and Basic Aspects,” in *Handbook of Food Preservation*, M. S. Rahman, Ed., 3rd ed. CRC Press, 2020, pp. 229–240. doi: 10.1201/9780429091483-17.
- [266] I. Khan, C. N. Tango, S. Miskeen, B. H. Lee, and D.-H. Oh, “Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review,” *Food Control*, vol. 73, pp. 1426–1444, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.11.010.
- [267] C. Mateluna, V. Figueroa, J. Ortiz, and J. M. Aguilera, “Effect of processing on texture and microstructure of the seaweed *Durvillaea antarctica*,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 6, pp. 4211–4219, 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02259-1.

- [268] X. Zhu, A. D. Patange, G. Macori, D.-W. Sun, and B. K. Tiwari, "Impact of high pressure treatment on shelf life and microbial profile of wild harvested *Ascophyllum nodosum* and aquacultured *Alaria esculenta* during storage," *LWT*, vol. 170, no. July, p. 114022, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.114022.
- [269] R. E. Wrolstad and D. E. Smith, "Color Analysis," in *Food Analysis*, S. S. Nielsen, Ed., 5th ed. in Food Science Text Series. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 545–555. doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_31.
- [270] ISO, "ISO 4833-2:2013 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique," vol. 4833, no. 2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, p. 12, 2013. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/59509.html>
- [271] ISO, "ISO 21528-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 1: Detection of Enterobacteriaceae," vol. 21528, no. 1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, p. 17, 2017. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/55228.html>
- [272] ISO, "ISO 21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95," vol. 21527, no. 2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, p. 9, 2008. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/38276.html>
- [273] Condalab, "Marine Agar," 2022. https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=24225 (accessed May 02, 2022).
- [274] ISO, "9308-1:2014 Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora," vol. 9308, no. 1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, p. 10, 2014. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/55832.html>
- [275] International Organization for Standardization, "ISO 6579-1:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.," Geneva, Switzerland, 2017. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/56712.html>
- [276] ISO, "ISO 11290-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method," vol. 11290, no. 1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, p. 36, 2017. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/60313.html>
- [277] L. A. Elkin, M. Kay, J. J. Higgins, and J. O. Wobbrock, "An Aligned Rank Transform Procedure for Multifactor Contrast Tests," in *The 34th Annual ACM Symposium on User Interface Software and Technology*, New York, NY, USA: ACM, Oct. 2021, pp. 754–768. doi: 10.1145/3472749.3474784.
- [278] L. Pereira, "Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care

Therapy—Cosmeceuticals, Algothraphy, and Thalassotherapy,” *Cosmetics*, vol. 5, no. 4, p. 68, Nov. 2018, doi: 10.3390/cosmetics5040068.

- [279] S. N. H. Oslan *et al.*, “A Review on Haematococcus pluvialis Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, p. 256, Feb. 2021, doi: 10.3390/biom11020256.
- [280] V. A. Gerard, S. E. Dunham, and G. Rosenberg, “Nitrogen-fixation by cyanobacteria associated with *Codium fragile* (Chlorophyta): Environmental effects and transfer of fixed nitrogen,” *Mar. Biol.*, vol. 105, no. 1, pp. 1–8, Feb. 1990, doi: 10.1007/BF01344264.
- [281] P. Silva and L. Pereira, “Concise review of *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 5, pp. 2761–2771, 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02183-4.
- [282] D. Nayyar and D. I. Skonberg, “Contrasting effects of two storage temperatures on the microbial, physicochemical, and sensory properties of two fresh red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Gracilaria tikvahiae*,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 31, no. 1, pp. 731–739, Feb. 2019, doi: 10.1007/s10811-018-1545-8.
- [283] F. Liot, A. Colin, and S. Mabeau, “Microbiology and storage life of fresh edible seaweeds,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, no. 2, pp. 243–247, Apr. 1993, doi: 10.1007/BF00004025.
- [284] R. E. Paull and N. J. Chen, “Postharvest handling and storage of the edible red seaweed *Gracilaria*,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 48, no. 2, pp. 302–308, May 2008, doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.12.001.
- [285] M. Takahashi, P. Kumari, C. Li, and K. Mikami, “Low temperature causes discoloration by repressing growth and nitrogen transporter gene expression in the edible red alga *Pyropia yezoensis*,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 159, no. December 2019, p. 105004, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.marenvres.2020.105004.
- [286] H. Lee, D. H. Park, E. J. Kim, and M.-J. Choi, “Freshness Analysis of Raw Laver (*Pyropia yezoensis*) Conserved under Supercooling Conditions,” *Foods*, vol. 12, no. 3, p. 510, Jan. 2023, doi: 10.3390/foods12030510.
- [287] S. M. Castro and J. A. Saraiva, “High-Pressure Processing of Fruits and Fruit Products,” in *Emerging Technologies for Food Processing*, Elsevier, 2014, pp. 65–76. doi: 10.1016/B978-0-12-411479-1.00004-8.
- [288] H. W. Huang, H. M. Lung, B. B. Yang, and C. Y. Wang, “Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing,” *Food Control*, vol. 40, no. 1, pp. 250–259, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.007.
- [289] C. A. Pinto, S. A. Moreira, L. G. Fidalgo, R. S. Inácio, F. J. Barba, and J. A. Saraiva, “Effects of high-pressure processing on fungi spores: Factors affecting spore germination and inactivation and impact on ultrastructure,” *Compr. Rev. food Sci. food Saf.*, vol. 19, no. 2, pp. 553–573, Mar. 2020, doi: 10.1111/1541-4337.12534.
- [290] INSA, “Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar (Valores-Guia),” Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, Sep. 2019. [Online]. Available: <https://www.insa.min-saude.pt/wp->

content/uploads/2019/12/INSA_Valores-guia.pdf

- [291] E. M. Mascini *et al.*, "Genotyping and preemptive isolation to control an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 42, no. 6, pp. 739–46, Mar. 2006, doi: 10.1086/500322.
- [292] G. Le Pennec and E. A. Gall, "The microbiome of *Codium tomentosum*: original state and in the presence of copper.," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 11, p. 167, Oct. 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2740-8.
- [293] Y. Farid and S. Etahiri, "Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d' Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte .," *Appl. Biosci.*, pp. 1543–1552, 2009.
- [294] J. Martin-Lescanne *et al.*, "Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus* , *Laurencia* , *Osmundea* , *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov.," *Eur. J. Phycol.*, vol. 45, no. 1, pp. 51–61, Feb. 2010, doi: 10.1080/09670260903314292.
- [295] L. S. de Oliveira *et al.*, "Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome.," *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 487, Sep. 2012, doi: 10.1186/1471-2164-13-487.
- [296] P. Silva, C. Fernandes, L. Barros, I. C. F. R. Ferreira, L. Pereira, and T. Gonçalves, "The antifungal activity of extracts of: *Osmundea pinnatifida*, an edible seaweed, indicates its usage as a safe environmental fungicide or as a food additive preventing post-harvest fungal food contamination," *Food Funct.*, vol. 9, no. 12, pp. 6187–6195, 2018, doi: 10.1039/c8fo01797b.
- [297] S. Akomea-Frempong, D. I. Skonberg, R. Arya, and J. J. Perry, "Survival of Inoculated *Vibrio* spp., Shigatoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. on Seaweed (Sugar Kelp) During Storage.," *J. Food Prot.*, vol. 86, no. 7, p. 100096, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.jfp.2023.100096.
- [298] F. J. Barba, N. S. Terefe, R. Buckow, D. Knorr, and V. Orlien, "New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review," *Food Res. Int.*, vol. 77, pp. 725–742, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.015.
- [299] Y. Le Strat, N. Ruiz, J. Fleurence, Y.-F. Pouchus, P. Déléris, and J. Dumay, *Marine fungal abilities to enzymatically degrade algal polysaccharides, proteins and lipids: a review*, vol. 34, no. 3. Springer Netherlands, 2022. doi: 10.1007/s10811-022-02713-2.
- [300] W. C. Paradas *et al.*, "A Novel Antifouling Defense Strategy from Red Seaweed: Exocytosis and Deposition of Fatty Acid Derivatives at the Cell Wall Surface," *Plant Cell Physiol.*, vol. 57, no. 5, pp. 1008–19, May 2016, doi: 10.1093/pcp/pcw039.
- [301] C. D. Amsler, "Chemical Ecology of Seaweeds," in *Seaweed Biology*, C. Wiencke and K. Bischof, Eds., in Ecological Studies, vol. 219. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 177–188. doi: 10.1007/978-3-642-28451-9_9.
- [302] C. Moreira, P. Ferreira-Santos, J. A. Teixeira, and C. M. R. Rocha, "Active aroma compounds assessment of processed and non-processed micro- and macroalgae by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry

- targeting seafood analogs," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 6, Oct. 2022, doi: 10.3389/fsufs.2022.1011020.
- [303] Y. Wang *et al.*, "Carotenoid fates in plant foods: Chemical changes from farm to table and nutrition," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, pp. 1–19, 2022, doi: 10.1080/10408398.2022.2115002.
- [304] M. J. Dring, "Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism," *Adv. Bot. Res.*, vol. 43, no. C, pp. 175–207, 2005, doi: 10.1016/S0065-2296(05)43004-9.
- [305] N. Zheng *et al.*, "Behavior of enzymes under high pressure in food processing: mechanisms, applications, and developments," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–15, May 2023, doi: 10.1080/10408398.2023.2217268.
- [306] T. KAJIWARA, K. KODAMA, and A. HATANAKA, "Attractants of male-gamete from a marine brown alga *Sargassum horneri*," *Nippon SUISAN GAKKAISHI*, vol. 46, no. 5, pp. 555–557, 1980, doi: 10.2331/suisan.46.555.
- [307] E. F. G. Woerlee, R. H. A. Bosma, J. M. M. Van Eijl, and J. C. Mol, "Metathesis of conjugated dienes: a possible way to synthesise insect pheromones and other speciality chemicals," *Appl. Catal.*, vol. 10, no. 2, pp. 219–229, May 1984, doi: 10.1016/0166-9834(84)80106-2.
- [308] J. E. Baldwin and V. P. Reddy, "Primary deuterium kinetic isotope effects for the thermal [1,7] sigmatropic rearrangement of 7-methylocta-1,3(Z),5(Z)-triene," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 24, pp. 8223–8228, Nov. 1988, doi: 10.1021/ja00232a040.
- [309] B. J. David, C. L. Robert, and A. S. David, "Identification of Volatile Aroma Compounds from Oxidized Frozen Whitefish (*Coregonus clupeaformis*)," *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 178–182, Jul. 1984, doi: 10.1016/S0315-5463(84)72511-9.
- [310] I. G. Medina-Meza, C. Barnaba, and G. V. Barbosa-Cánovas, "Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 22, pp. 1–10, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.ifset.2013.10.012.
- [311] S. Gerassimidou *et al.*, "Unpacking the complexity of the polyethylene food contact articles value chain: A chemicals perspective," *J. Hazard. Mater.*, vol. 454, no. March, p. 131422, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131422.
- [312] X. Wu, Z. Tan, R. Liu, Z. Liao, and H. Ou, "Gaseous products generated from polyethylene and polyethylene terephthalate during ultraviolet irradiation: Mechanism, pathway and toxicological analyses," *Sci. Total Environ.*, vol. 876, no. March, p. 162717, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162717.
- [313] Q.-Z. Su, P. Vera, and C. Nerín, "Direct Immersion–Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Response Surface Methodology for Nontarget Screening of (Semi-) Volatile Migrants from Food Contact Materials," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 7, pp. 5577–5584, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00532.
- [314] N.-Y. Ji and B.-G. Wang, "Nonhalogenated organic molecules from *Laurencia* algae," *Phytochem. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 653–670, Sep. 2014, doi: 10.1007/s11101-013-9326-0.

- [315] M. Harizani, E. Ioannou, and V. Roussis, "The Laurencia Paradox: An Endless Source of Chemodiversity," in *Progress in the chemistry of organic natural products*, 2016, pp. 91–252. doi: 10.1007/978-3-319-33172-0_2.
- [316] X.-Q. Yu *et al.*, "Compositacins A-K: Bioactive chamigrane-type halosesquiterpenoids from the red alga *Laurencia composita* Yamada.," *Phytochemistry*, vol. 136, pp. 81–93, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.phytochem.2017.01.007.
- [317] M. Suzuki and H. Matsuura, "Laurencia Database," 2020. <http://laurencia-database.jp/database.html> (accessed Nov. 10, 2023).
- [318] V. Trinetta, "Definition and Function of Food Packaging," in *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2018, pp. 1–2. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03319-9.
- [319] Z. Berk, "Food packaging," in *Food Process Engineering and Technology*, 3rd ed. London: Academic Press, 2018, pp. 625–641. doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00027-0.
- [320] A. Embleni, "Modified atmosphere packaging and other active packaging systems for food, beverages and other fast-moving consumer goods," in *Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG)*, Elsevier, 2013, pp. 22–34. doi: 10.1533/9780857098979.22.
- [321] D. Dearden, "Chilled foods packaging: an introduction," in *Chilled Foods*, 3rd ed. Elsevier, 2008, pp. 138–157. doi: 10.1533/9781845694883.1.138.
- [322] E. Kirtil, M. Kilercioglu, and M. H. Oztop, *Modified Atmosphere Packaging of Foods*. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.03218-2.
- [323] B. P. F. Day, "Modified atmosphere and active packaging of chilled foods," in *Chilled Foods*, M. Brown, Ed., 3rd ed. Sawston, UK: Elsevier, 2008, pp. 158–187. doi: 10.1533/9781845694883.1.158.
- [324] G. L. Robertson, *Food Packaging – Principles and Practice*, 3 rd. Boca Raton, USA: CRC Press, 2016. doi: 10.1201/b21347.
- [325] F. Galgano, M. C. Caruso, N. M. Ventura, C. Magno, and F. Favati, "Effects of anti-UV film and protective atmosphere on fresh-cut iceberg lettuce preservation," *Acta Aliment.*, vol. 46, no. 1, pp. 35–42, Mar. 2017, doi: 10.1556/066.2017.46.1.5.
- [326] A. L. Monge Brenes *et al.*, "Temperature profiling of open- and closed-doored produce cases in retail grocery stores," *Food Control*, vol. 113, no. January, p. 107158, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107158.
- [327] A. Lubsch and K. Timmermans, "Texture analysis of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) thallus reveals trade-off between tissue tensile strength and toughness along lamina," *Bot. Mar.*, vol. 60, no. 2, pp. 229–237, Jan. 2017, doi: 10.1515/bot-2016-0075.
- [328] C. Tello-Ireland, R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, J. López, and K. Di Scala, "Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 10, pp. 2112–2118, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2011.06.008.
- [329] F. Licciardello, L. Cipri, and G. Muratore, "Influence of packaging on the quality

- maintenance of industrial bread by comparative shelf life testing," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 1, no. 1, pp. 19–24, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.fpsl.2013.10.001.
- [330] International Organization for Standardization, "ISO 16649-2:2001 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide," Geneva, Switzerland, 2001. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/29824.html>
- [331] International Organization for Standardization, "ISO 6888-2:2021 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium," Geneva, Switzerland, 2021. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/76673.html>
- [332] International Organization for Standardization, "ISO 21872-1:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. — Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*," Geneva, Switzerland, 2017. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/74112.html>
- [333] International Organization for Standardization, "ISO 11290-2:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 2: Enumeration method," Geneva, Switzerland, 2017. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/60314.html>
- [334] CEVA, "Macroalgues et microalgues alimentaires - Statut réglementaire en France et en Europe (Synthèse CEVA 2019)," Pleubian, France, 2019. [Online]. Available: <https://www.ceva-algues.com/document/synthese-reglementaire-algues-alimentaires/>
- [335] Biokar Diagnostics, "Technical Data Sheet — Compass® Ecc Agar — Enumeration of *Escherichia coli* and other coliforms," Beauvais, France, 2016. [Online]. Available: https://www.solabia.com/fr/Produito_291,9/BIOKAR-Diagnostics/COMPASS-ECC-AGAR.html
- [336] S. Oh, E. Lee, and E. Choe, "Light effects on lipid oxidation, antioxidants, and pigments in dried laver (*Porphyra*) during storage," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 23, no. 3, pp. 701–709, Jun. 2014, doi: 10.1007/s10068-014-0095-3.
- [337] M. Munier *et al.*, "Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*," *Food Chem.*, vol. 150, pp. 400–407, May 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.113.
- [338] F. Sánchez-García, I. Hernández, V. M. Palacios, and A. M. Roldán, "Freshness Quality and Shelf Life Evaluation of the Seaweed *Ulva rigida* through Physical, Chemical, Microbiological, and Sensory Methods," *Foods*, vol. 10, no. 1, p. 181, Jan. 2021, doi: 10.3390/foods10010181.
- [339] A. Pérez-Gálvez and M. Roca, "Phyllobilins: A New Group of Bioactive Compounds," in *Studies in Natural Products Chemistry*, F. Atta-ur-Rahman, Ed.,

- 1st ed.Elsevier B.V, 2017, pp. 159–191. doi: 10.1016/B978-0-444-63931-8.00004-7.
- [340] K. Chen, J. J. Ríos, A. Pérez-Gálvez, and M. Roca, “Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds,” *Food Chem.*, vol. 228, pp. 625–633, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.036.
- [341] S. Oh, M. Shin, K. Lee, and E. Choe, “Effects of water activity on pigments in dried laver (*Porphyra*) during storage,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 22, no. 6, pp. 1523–1529, Dec. 2013, doi: 10.1007/s10068-013-0247-x.
- [342] A. I. Eismann, R. Perpetuo Reis, A. Ferreira da Silva, and D. Negrão Cavalcanti, “*Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions,” *Algal Res.*, vol. 48, no. April, 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.101916.
- [343] K. C. Spencer and D. J. Humphreys, “Argon Packaging and Processing Preserves and Enhances Flavor, Freshness, and Shelf Life of Foods,” in *Freshness and Shelf Life of Foods*, K. R. Cadwallader and H. Weenen, Eds., 1st ed.Washington (DC), USA: American Chemical Society, 2002, pp. 270–291. doi: 10.1021/bk-2003-0836.ch020.
- [344] S. Zhu *et al.*, “Cold stress tolerance of the intertidal red alga *Neoporphyra haitanensis*,” *BMC Plant Biol.*, vol. 22, no. 1, p. 114, Mar. 2022, doi: 10.1186/s12870-022-03507-x.
- [345] M. Kakinuma, D. A. Coury, C. Nakamoto, K. Sakaguchi, and H. Amano, “Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta),” *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 24, no. 6, pp. 629–639, Dec. 2008, doi: 10.1007/s10565-007-9053-7.
- [346] J. B. Kim, W.-C. Lee, H. C. Kim, and S. Hong, “Photosynthetic characteristics of *Pyropia yezoensis* (Ueda) Hwang & Choi measured using Diving-PAM in the Jindo-Haenam region on the southwestern coast of the Korean Peninsula,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 32, no. 4, pp. 2631–2640, Aug. 2020, doi: 10.1007/s10811-019-01997-1.
- [347] J. Balbas *et al.*, “Comparison of physicochemical characteristics, sensory properties and volatile composition between commercial and New Zealand made wakame from *Undaria pinnatifida*,” *Food Chem.*, vol. 186, pp. 168–175, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.079.
- [348] R. G. S. G. S. Bidwell and J. Mclachlan, “Carbon Nutrition of Seaweeds: Photosynthesis, Photorespiration and Respiration,” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 86, pp. 15–46, Mar. 1985, doi: 10.1016/0022-0981(85)90040-1.
- [349] P. A. Fernández, C. L. Hurd, and M. Y. Roleda, “Bicarbonate uptake via an anion exchange protein is the main mechanism of inorganic carbon acquisition by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) under variable pH,” *J. Phycol.*, vol. 50, no. 6, pp. 998–1008, Dec. 2014, doi: 10.1111/jpy.12247.
- [350] S. Mrkić, K. Galić, M. Ivanković, S. Hamin, and N. Ciković, “Gas transport and thermal characterization of mono- and di-polyethylene films used for food packaging,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 99, no. 4, pp. 1590–1599, Feb. 2006, doi: 10.1002/app.22513.
- [351] A. C. De Aguiar Saldanha Pinheiro *et al.*, “The impact of gas mixtures of Argon and Nitrous oxide (N₂O) on quality parameters of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets during refrigerated storage,” *Food Res. Int.*, vol. 115, no. December 2018,

pp. 268–275, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.030.

- [352] M. Carvalho and B. Eyre, “Carbon stable isotope discrimination during respiration in three seaweed species,” *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 437, pp. 41–49, Sep. 2011, doi: 10.3354/meps09300.
- [353] G. Rosenberg, D. S. Littler, M. M. Littler, and E. C. Oliveira, “Primary Production and Photosynthetic Quotients of Seaweeds from São Paulo State, Brazil,” *Bot. Mar.*, vol. 38, no. 1–6, pp. 369–377, 1995, doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.369.
- [354] K. Sand-Jensen, T. Binzer, and A. L. Middelboe, “Scaling of photosynthetic production of aquatic macrophytes: A review,” *Oikos*, vol. 116, no. 2, pp. 280–294, Feb. 2007, doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.15093.x.
- [355] M. Nakamura *et al.*, “Photosynthesis and growth of *Ulva ohnoi* and *Ulva pertusa* (Ulvophyceae) under high light and high temperature conditions, and implications for green tide in Japan,” *Phycol. Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 152–160, Apr. 2020, doi: 10.1111/pre.12410.
- [356] X. Fan *et al.*, “The effect of nutrient concentrations, nutrient ratios and temperature on photosynthesis and nutrient uptake by *Ulva prolifera*: implications for the explosion in green tides,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 1, pp. 537–544, Feb. 2014, doi: 10.1007/s10811-013-0054-z.
- [357] F. Figueroa *et al.*, “Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress,” *Aquat. Biol.*, vol. 7, no. 1–2, pp. 173–183, Oct. 2009, doi: 10.3354/ab00187.
- [358] J. M. Mercado, S. Salles, and D. Cortés, “Ecophysiology of Marine Algae,” in *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, Wiley, 2020, pp. 341–357. doi: 10.1002/9781119143802.ch10.
- [359] P. Sampath-Wiley, C. D. Neefus, and L. S. Jahnke, “Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales),” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 361, no. 2, pp. 83–91, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.jembe.2008.05.001.
- [360] Z. Feng *et al.*, “Control of Reactive Oxygen Species through Antioxidant Enzymes Plays a Pivotal Role during the Cultivation of *Neopyropia yezoensis*,” *J. Mar. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 1, p. 109, Jan. 2022, doi: 10.3390/jmse10010109.
- [361] A. Edreva, “Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach,” *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 106, no. 2–3, pp. 119–133, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.agee.2004.10.022.
- [362] J. E. Vermaat and K. Sand-Jensen, “Survival, metabolism and growth of *Ulva lactuca* under winter conditions: a laboratory study of bottlenecks in the life cycle,” *Mar. Biol.*, vol. 95, no. 1, pp. 55–61, Jun. 1987, doi: 10.1007/BF00447485.
- [363] S. Gupta, G. Rajauria, and N. Abu-Ghannam, “Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 3, pp. 482–489, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02149.x.

- [364] J. E. Moore, J. Xu, and B. C. Millar, "Diversity of the microflora of edible macroalga (*Palmaria palmata*)," *Food Microbiol.*, vol. 19, no. 2–3, pp. 249–257, 2002, doi: 10.1006/fmic.2001.0467.
- [365] M. Uchida, T. Miyoshi, G. Yoshida, K. Niwa, M. Mori, and H. Wakabayashi, "Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria acting as a starter culture for sauce fermentation of the red alga Nori (*Porphyra yezoensis*)," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 6, pp. 1506–20, Jun. 2014, doi: 10.1111/jam.12466.
- [366] T. Løvdal, B. T. Lunestad, M. Myrmel, J. T. Rosnes, and D. Skipnes, "Microbiological Food Safety of Seaweeds," *Foods*, vol. 10, no. 11, p. 2719, Nov. 2021, doi: 10.3390/foods10112719.
- [367] A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, "The microbiota of eight species of dehydrated edible seaweeds from North West Spain," *Food Microbiol.*, vol. 70, pp. 224–231, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.fm.2017.10.009.
- [368] S. Cox, N. Abu-Ghannam, and S. Gupta, "An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds," *Int. Food Res. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 205–220, 2010, doi: 10.21427/D7HC92.
- [369] F. Goecke, A. Labes, J. Wiese, and J. Imhoff, "Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 409, pp. 267–299, Jun. 2010, doi: 10.3354/meps08607.
- [370] J. Hollants, F. Leliaert, O. De Clerck, and A. Willems, "What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 83, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2013, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01446.x.
- [371] A. Allende, Y. Luo, J. L. McEvoy, F. Artés, and C. Y. Wang, "Microbial and quality changes in minimally processed baby spinach leaves stored under super atmospheric oxygen and modified atmosphere conditions," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 33, no. 1, pp. 51–59, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.03.003.
- [372] L. Zhang, E. Gionfriddo, V. Acquaro, and J. Pawliszyn, "Direct immersion solid-phase microextraction analysis of multi-class contaminants in edible seaweeds by gas chromatography-mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1031, pp. 83–97, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.05.066.
- [373] M. Kladi, C. Vagias, and V. Roussis, "Volatile halogenated metabolites from marine red algae," *Phytochem. Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 337–366, 2004, doi: 10.1007/s11101-004-4155-9.
- [374] E. G. Vilar, M. G. O'Sullivan, J. P. Kerry, and K. N. Kilcawley, "A chemometric approach to characterize the aroma of selected brown and red edible seaweeds / extracts," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 101, no. 3, pp. 1228–1238, 2021, doi: 10.1002/jsfa.10735.
- [375] T. Kajiwara, K. Matsui, and Y. Akakabe, "Biogenesis of Volatile Compounds via Oxylipins in Edible Seaweeds," 1996, pp. 146–166. doi: 10.1021/bk-1996-0637.ch014.
- [376] Y. Akakabe, K. Matsui, and T. Kajiwara, "2,4-Decadienals are produced via (R)-11-HPITE from arachidonic acid in marine green alga *Ulva conglobata*," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 11, no. 17, pp. 3607–3609, 2003, doi: 10.1016/S0968-

0896(03)00364-X.

- [377] X. Pan, H. Ushio, and T. Ohshima, "Photo-oxidation of lipids impregnated on the surface of dried seaweed (*Porphyra yezoensis* Ueda). Characterization of volatiles," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 81, no. 8, p. 773, Aug. 2004, doi: 10.1007/s11746-004-0977-5.
- [378] S.-M. Sun, G. Chung, and T.-S. Shin, "Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 5, pp. 1003–1013, Oct. 2012, doi: 10.1007/s10811-011-9724-x.
- [379] C. Flodin and F. B. Whitfield, "Biosynthesis of bromophenols in marine algae," *Water Sci. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 53–58, 1999, doi: 10.1016/S0273-1223(99)00537-5.
- [380] FAO/WHO/UN, "Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition," Geneva, 935, 2007. [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411>
- [381] E. Nakamura, "One Hundred Years since the Discovery of the 'Umami' Taste from Seaweed Broth by Kikunae Ikeda, who Transcended his Time," *Chem. - An Asian J.*, vol. 6, no. 7, pp. 1659–1663, Jul. 2011, doi: 10.1002/asia.201000899.
- [382] S. R. Jaeger *et al.*, "A Mendelian Trait for Olfactory Sensitivity Affects Odor Experience and Food Selection," *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 16, pp. 1601–1605, 2013, doi: 10.1016/j.cub.2013.07.030.
- [383] A. Plotto, K. W. Barnes, and K. L. Goodner, "Specific Anosmia Observed for β -Ionone, but not for α -Ionone: Significance for Flavor Research," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 5, pp. S401–S406, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00047.x.
- [384] U. Kappler and H. Schäfer, "Transformations of Dimethylsulfide," in *Metal Ions in Life Sciences*, P. M. H. Kroneck and M. E. S. Torres, Eds., in *Metal Ions in Life Sciences*, vol. 14. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, pp. 279–313. doi: 10.1007/978-94-017-9269-1_11.
- [385] C. Wiencke and K. Bischof, Eds., *Seaweed Biology*, vol. 219. in *Ecological Studies*, vol. 219. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-28451-9.
- [386] M. R. I. Shishir and W. Chen, "Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 49–67, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.006.
- [387] R. Garcia and J. Adrian, "Nicolas Appert: Inventor and Manufacturer," *Food Rev. Int.*, vol. 25, no. 2, pp. 115–125, Apr. 2009, doi: 10.1080/87559120802682656.
- [388] E. B. Yeh, A. N. Schiano, Y. Jo, D. M. Barbano, and M. A. Drake, "The effect of vitamin concentrates on the flavor of pasteurized fluid milk," *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 6, pp. 4335–4348, Jun. 2017, doi: 10.3168/jds.2017-12613.
- [389] L. Jirovetz, G. Buchbauer, G. T. Abraham, and M. P. Shafi, "Chemical composition and olfactoric characterization of *Acmella radicans* (Jacq.) R.K. Jansen var. *radicans* from southern India," *Flavour Fragr. J.*, vol. 21, no. 1, pp. 88–91, Jan. 2006, doi: 10.1002/ffj.1524.
- [390] B. Jung, S. Kim, and J. Lee, "Microcycle conidiation in filamentous fungi," *Mycobiology*, vol. 42, no. 1, pp. 1–5, Mar. 2014, doi: 10.5941/MYCO.2014.42.1.1.

- [391] V. F. De Figueiredo and P. L. de O. Costa Neto, "Implantação do HACCP na indústria de alimentos," *Gestão & Produção*, vol. 8, no. 1, pp. 100–111, Apr. 2001, doi: 10.1590/S0104-530X2001000100008.

Anexos

Sumário

- **Anexo 1.** *Heatmaps* das algas marinhas tratadas por diferentes técnicas de conservação convencionais: controlo/fresco (FRESH), secagem (DRY), liofilização (LYO) e salga (SALT):
 1. **Figura A.1** *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *U. pinnatifida* (UP) processado por diferentes técnicas de conservação
 2. **Figura A.2** *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *F. vesiculosus* (FV) processado por diferentes técnicas de conservação
 3. **Figura A.3** *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *C. tomentosum* (CT) processado por diferentes técnicas de conservação
 4. **Figura A.4** *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *C. teedei* var. *lusitanicus* (LU) processado por diferentes técnicas de conservação
 5. **Figura A.5** *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *G. Gracilis* (GG) processado por diferentes técnicas de conservação
- **Anexo 2: Tabela A.1** Presença ou ausência em 25g de amostra dos microrganismos patogénicos: *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em *O. pinnatifida* e *C. tomentosum*
- **Anexo 3: Tabela A.2** Contagens microbianas para Coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., e *L. monocytogenes* nos dias 0 e 15 de armazenamento para *P. umbilicalis* e *U. lactuca* preservadas por diferentes tratamentos.
- **Anexo 4: Tabela A.3** Diretrizes francesas que se aplicam aos produtos de algas secas e diretrizes portuguesas que se aplicam a produtos alimentares "minimamente processados"

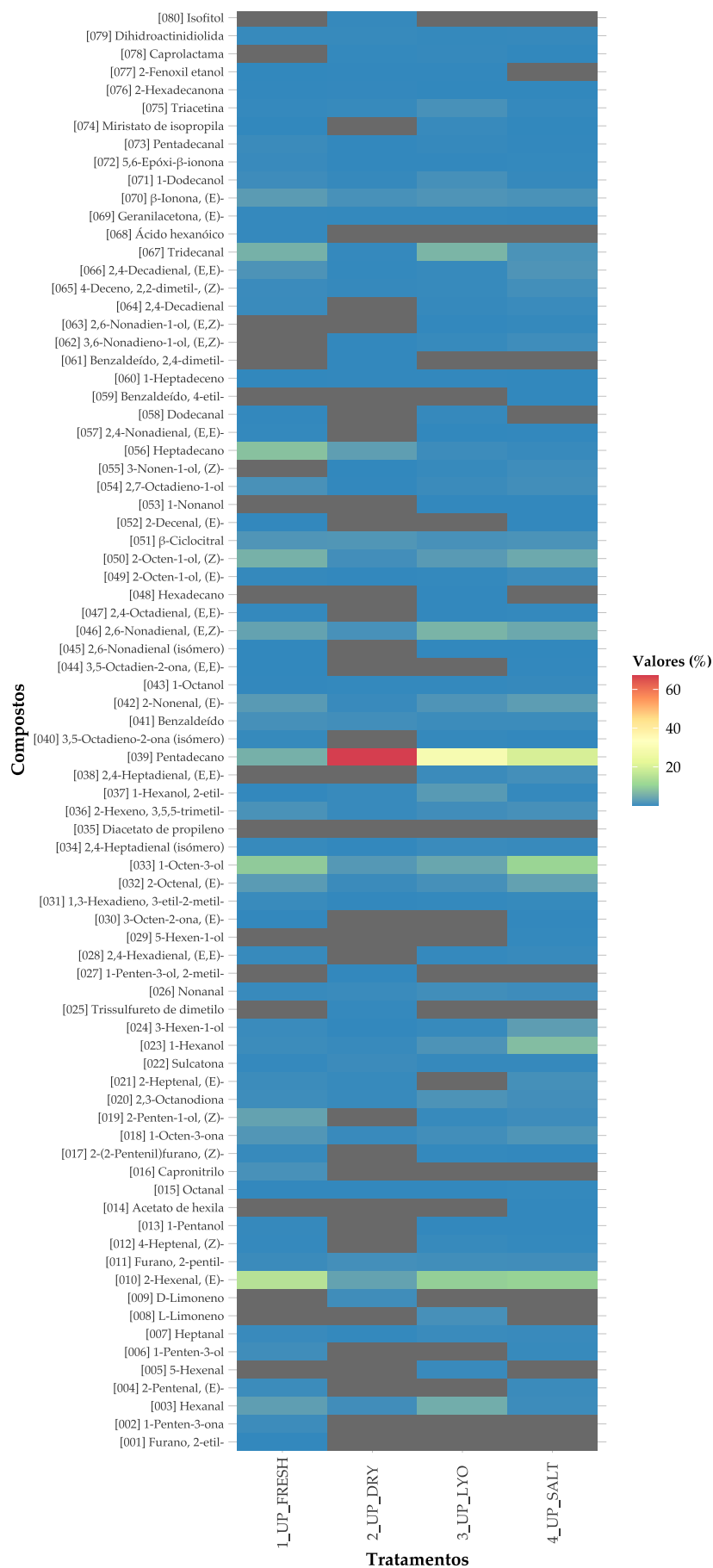


Figura A.1 *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *U. pinnatifida* (UP) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga

Para visualizar o *heatmap* em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

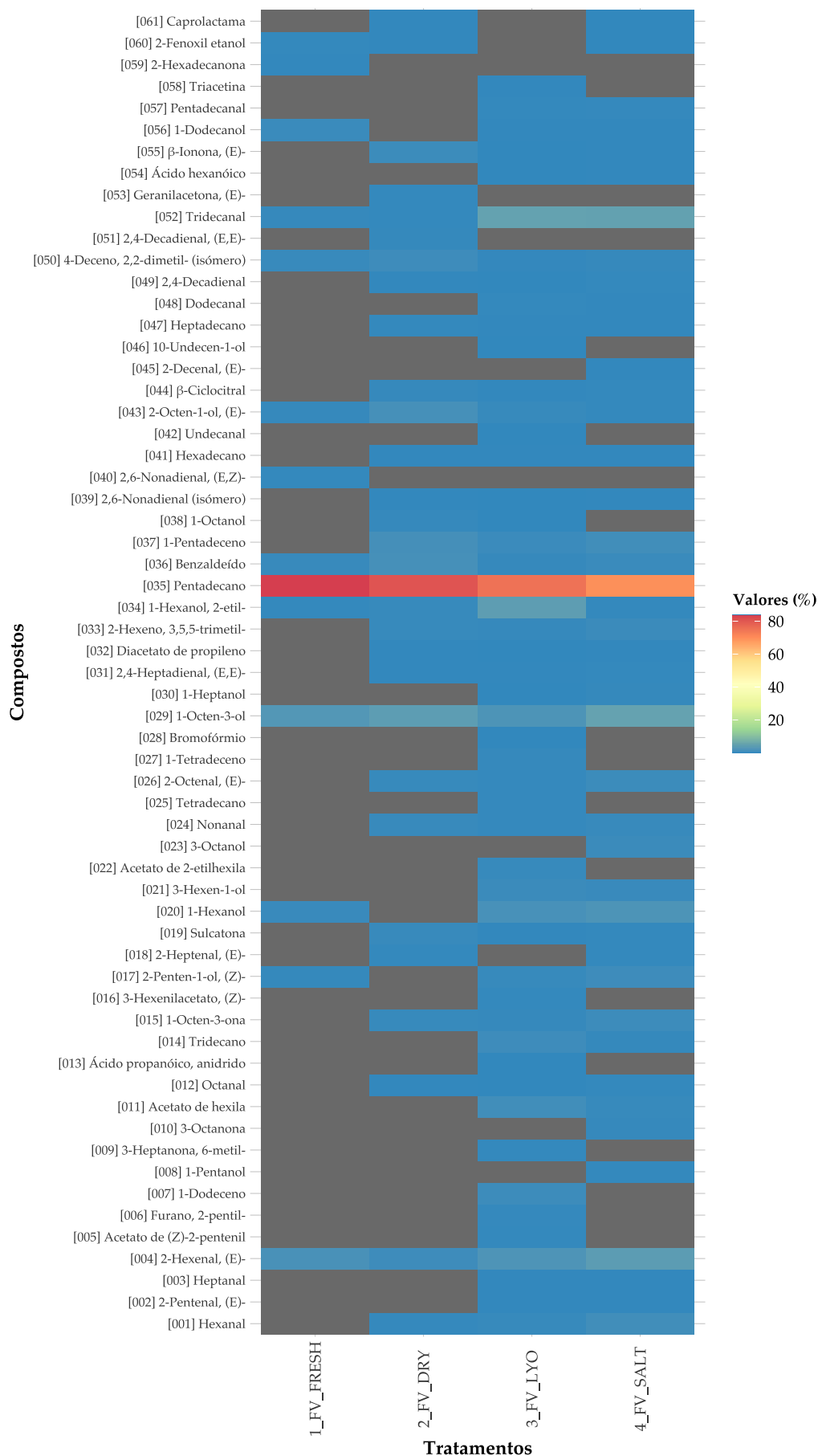


Figura A.2 *Heatmap* da análise GC-MS para caracterização de *F. vesiculosus* (FV) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga

Para visualizar o *heatmap* em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

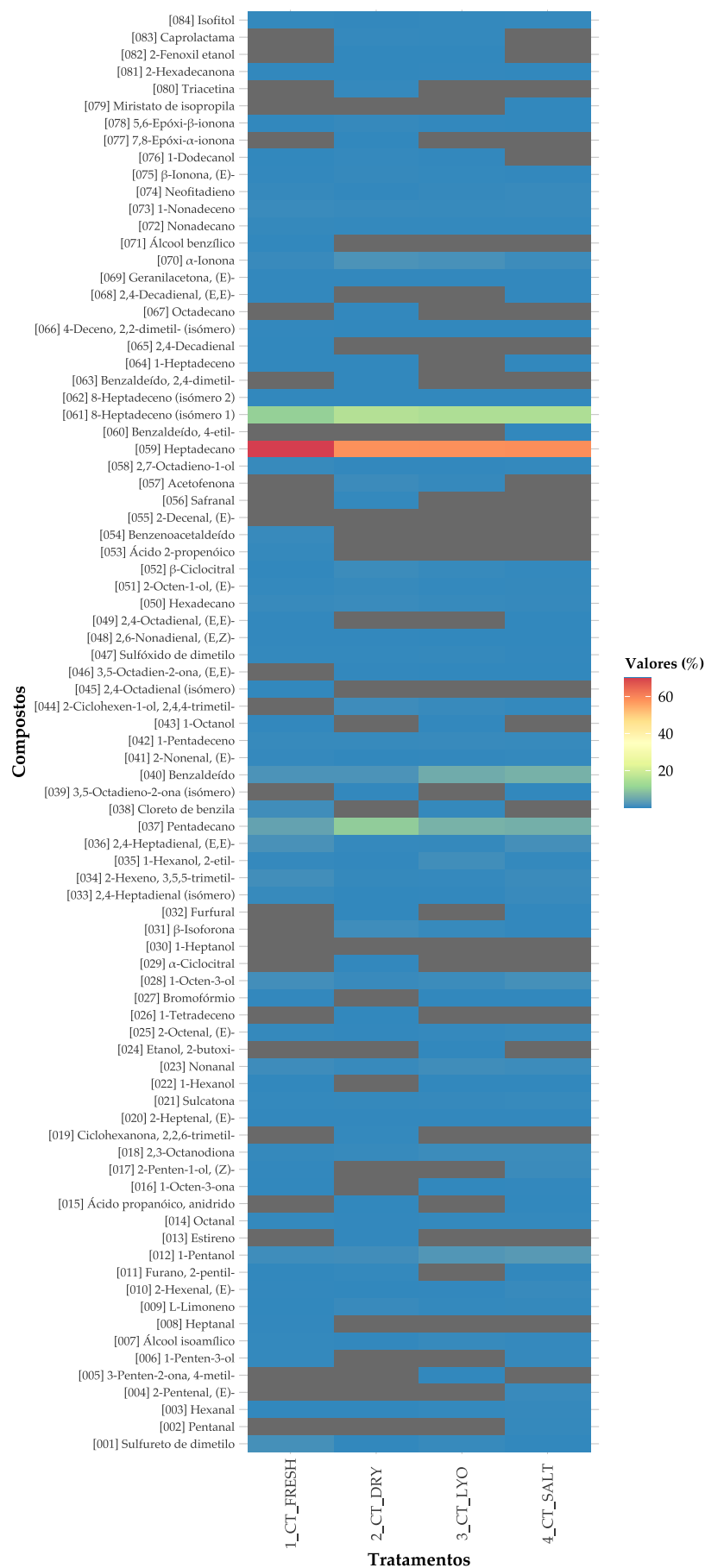


Figura A.3 Heatmap da análise GC-MS para caracterização de *C. tomentosum* (CT) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga. Para visualizar o heatmap em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

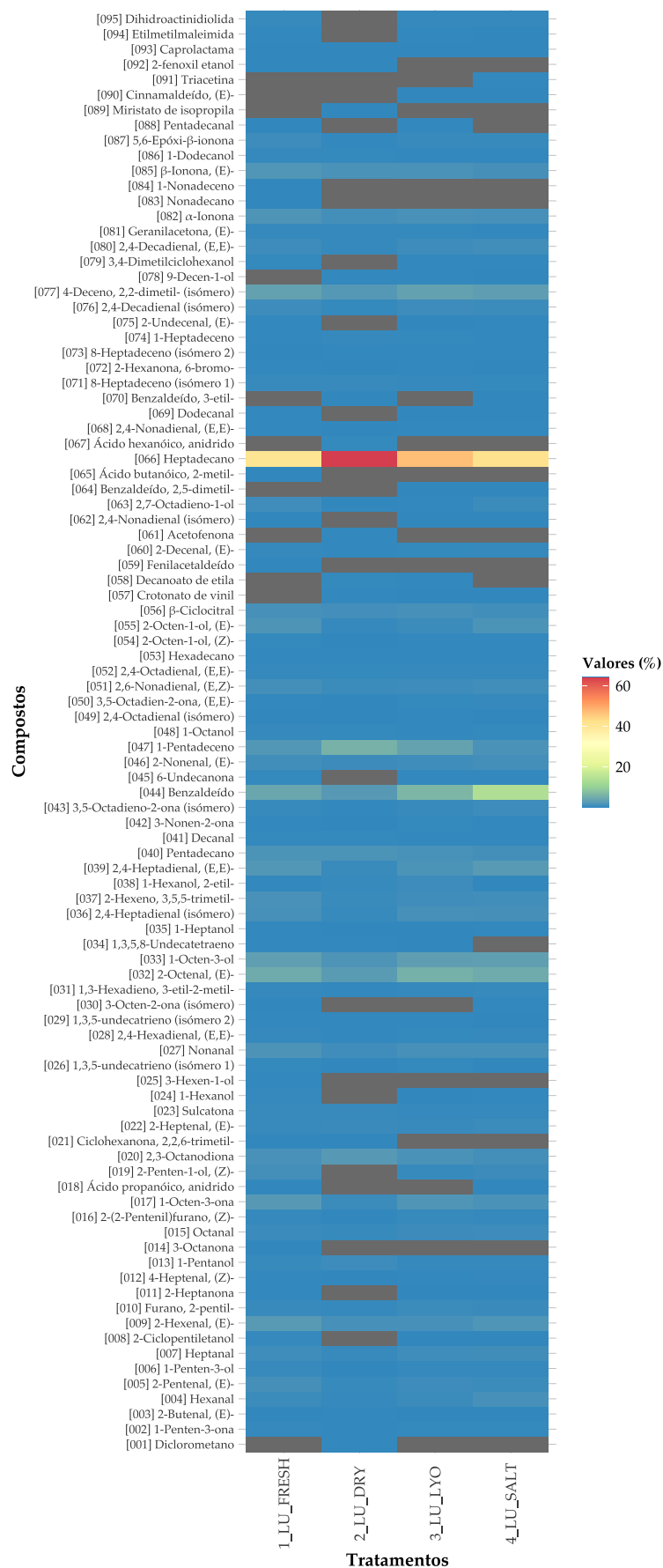


Figura A.4 Heatmap da análise GC-MS para caracterização de *C. teedei* var. *lusitanicus* (LU) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga

Para visualizar o *heatmap* em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

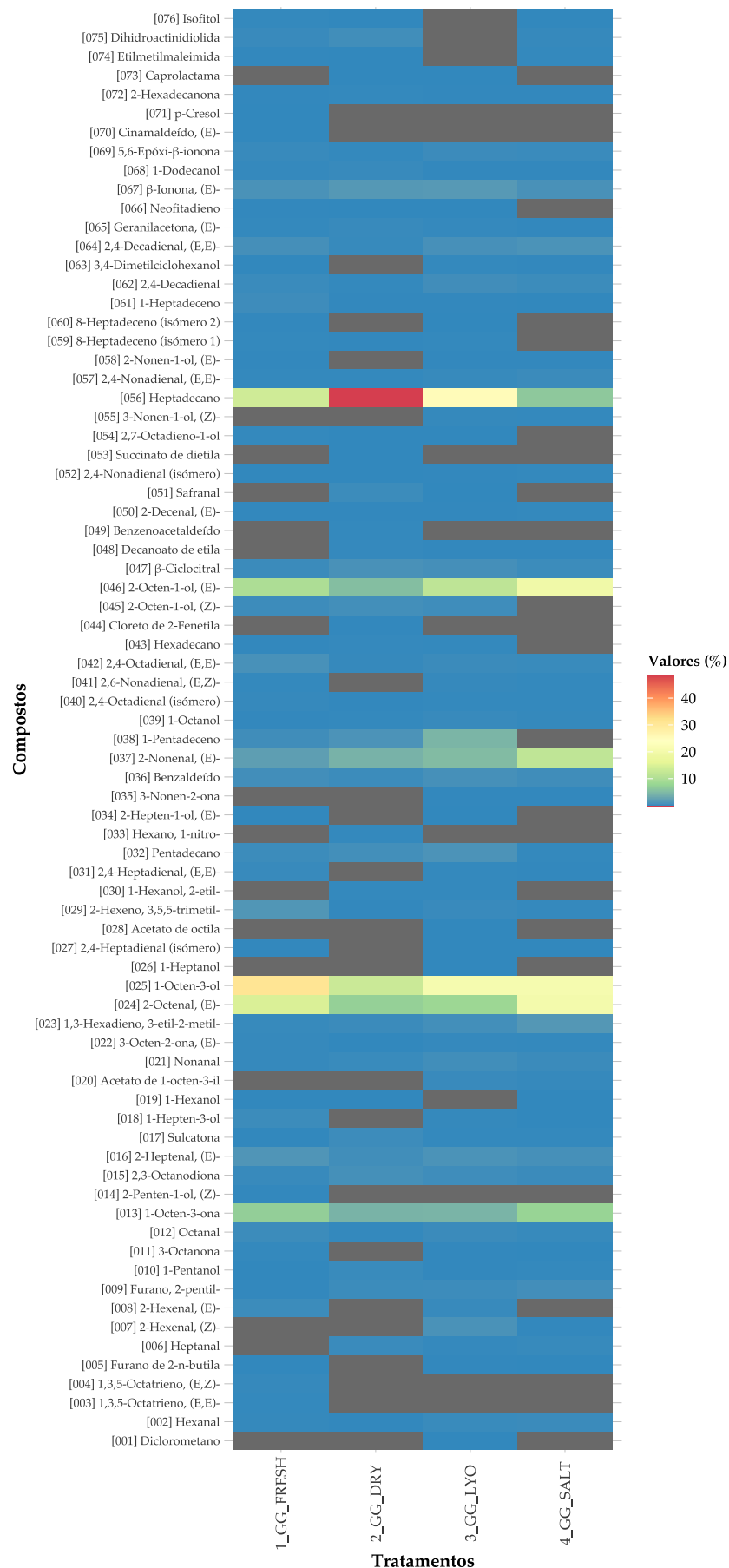


Figura A.5 Heatmap da análise GC-MS para caracterização de *G. gracilis* (GG) processado por diferentes técnicas de conservação: [1] controlo, [2] secagem, [3] liofilização e [4] salga. Para visualizar o heatmap em maiores detalhes, acesse a figura externamente [clikando aqui!](#)

Tabela A.1 Presença ou ausência em 25g de amostra dos microrganismos patogênicos: *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em *O. pinnatifida* e *C. tomentosum*

	Erva Malagueta (<i>Osmundea pinnatifida</i>)		Chorão-do-mar (<i>Codium tomentosum</i>)	
	C (0.1 MPa)	P (600 MPa, 5 min)	C (0.1 MPa)	P (600 MPa, 5 min)
<i>E. coli</i>	A, A, A	P, A, A	A, P, A	P, A, A,
<i>Salmonella</i> spp.	A, A, P	P, A, A	A, A, P	P, A, A
<i>L. monocytogenes</i>	P, P, P	P, P, P	P, P, P	P, P, P

* Notas:

1. A = Ausente;
2. P = Presente.

Tabela A.2 Contagens microbianas para Coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., e *L. monocytogenes* nos dias 0 e 15 de armazenamento para *P. umbilicalis* e *U. lactuca* preservadas por diferentes tratamentos.

Resultados da Análise	<i>Porphyra umbilicalis</i> (PU)				<i>Ulva lactuca</i> (UL)			
	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 15</i>	<i>Dia 15</i>
	CTRL	CTRL	MAP	VAC	CTRL	CTRL	MAP	VAC
Coliformes	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<i>Escherichia coli</i>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva [#]	2.7637	2.6505	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<i>Vibrio</i> spp.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<i>Salmonella</i> spp.	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
<i>Listeria monocytogenes</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

* Notas:

1. Os resultados são expressos como o logaritmo da unidade formadora de colônias por grama de amostra (log CFU·g⁻¹).
2. *Dia 0* (n = 2 placas de Petri x 2 diluições x 4 repetições = 16);
3. *Dia 15* (n = 2 placas de Petri x 2 diluições x 1 repetição = 4, para cada tratamento);
4. LOD < 1 log UFC·g⁻¹ para coliformes e *Escherichia coli*;
5. LOD < 2 log UFC·g⁻¹ para estafilococos coagulase positivos e *Vibrio* spp.

[#] Observação: Colônias negras e sem halo, não características de *Staphylococcus* coagulase-positiva.

Tabela A.3 Diretrizes francesas que se aplicam aos produtos contendo algas secas e diretrizes portuguesas que se aplicam a produtos alimentares "minimamente processados" [290], [334]

Microorganismos / Patógenos	Diretrizes francesas Limites (UFC.g⁻¹)	Diretrizes Portuguesas Limites (UFC.g⁻¹)
Mesófilos aeróbios (30 °C)	$\leq 10^5$	$\leq 10^6$
Leveduras	—	$\leq 10^5$
Bolores	—	$\leq 5 \times 10^2$
Enterobacteriaceae (37 °C)	—	$\leq 10^5$
Coliformes (fecais) / <i>E. coli</i>	≤ 10	≤ 10 (N/D)
Anaeróbios Sulfito-Redutores	$\leq 10^2$	—
Staphylococcus coagulase-positiva / <i>S. aureus</i>	$\leq 10^2$	≤ 10 (N/D)
<i>Bacillus</i> spp.	—	$\leq 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	—	$\leq 10^3$
<i>Clostridium perfringens</i>	≤ 1	$\leq 10^2$
<i>Listeria</i> spp.	—	≤ 10 (N/D)
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	Não detetado (por 25 g)
<i>Salmonella</i> spp.	Não detetado (por 25 g)	Não detetado (por 25 g)
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Cronobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i>	N/D	Não detetado (por 25 g)



