

Ana Catarina Sousa Costa

Licenciada em Gestão Turística – Ramo Produtos Turísticos

VEGarum: Inovação de uma Iguaria Gastronómica Ancestral através da Fermentação de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*

MESTRADO EM CIÊNCIAS GASTRONÓMICAS

Departamento de Química

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2022 (**Versão Provisória**)

VEGarum: Inovação de uma Iguaria Gastronómica Ancestral através da Fermentação de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*

ANA CATARINA SOUSA COSTA

Licenciada em Gestão Turística – Ramo Produtos Turísticos

Orientadora: Doutora Marisa Andreia Viegas Ventura dos Santos

Coorientadora: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar, ISA-UL

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Arguentes: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior, ISA-UL

Vogais: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar, ISA-UL

MESTRADO EM CIÊNCIAS GASTRONÓMICAS

Departamento de Química

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2022

VEGarum: Inovação de uma Iguaria Gastronómica Ancestral Através da Fermentação de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*

Copyright © **Ana Catarina Sousa Costa**, 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 querido tio, Nuno Sousa.

AGRADECIMENTOS

Tudo começou com pão. Esta tese, significa a conclusão de uma fase muito gratificante e bonita da minha vida. É reflexo do meu fascínio pela área da microbiologia, nomeadamente alimentos fermentados.

Quero começar por agradecer à minha coorientadora e coordenadora de mestrado, Professora Catarina Prista, pela boa disposição constante, pela paciência para com a minha rebelião e energia, mas principalmente, pelo apoio e partilha do seu vasto conhecimento.

Um especial agradecimento à Professora Paulina Mata, por toda a dedicação, acompanhamento e preocupação nesta jornada tão bonita que foi o Mestrado em Ciências Gastronómicas.

Um obrigada à minha orientadora, Marisa Santos, por todos os ensinamentos.

Aos meus *partners in crime*, Rafaela e Pedro. Esta etapa foi mais bonita por vossa causa, obrigada por tudo.

Aos meus amigos, Tiago, Margarida, Rute e Sara por toda a força e apoio emocional.

Por fim, à minha família.

*"Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância,
já que viver é ser livre."*

Simone de Beauvoir

RESUMO

A procura crescente por produtos alimentares inovadores e mais saudáveis, tornam as macroalgas potenciais substitutos dos alimentos terrestres e piscícolas, dado possuírem uma composição nutricional rica em ácidos gordos polinsaturados, proteína, vitaminas, fibra e sais minerais.

O presente trabalho pretendeu desenvolver e otimizar uma versão de base vegetal do *garum* (produto fermentado produzido a partir das partes menos nobres dos peixes, amplamente utilizado como iguaria gastronómica/tempero pelos romanos), o VEGarum, a partir da fermentação espontânea de duas macroalgas (*Palmaria palmata* e *Ulva rigida*). As fermentações decorreram em presença de 5% (p/v) de NaCl adicionado e *Aspergillus oryzae* (koji) e foram realizadas pela microbiota fermentativa autóctone.

A microbiota dominante envolvida nas fermentações foi identificada por métodos clássicos e moleculares, sendo detetada a presença de bactérias ácido-lácticas (*Pediococcus pentosaceus* e *Levilactobacillus brevis*) e leveduras fermentativas (maioritariamente *Wickeranomyces anomalus*). A evolução da fermentação realizada pela microbiota autóctone foi avaliada determinando periodicamente o pH e °Brix, observando-se um abaixamento do pH e um aumento da concentração de ácido láctico em ambas as fermentações até ao 11º dia (valores de pH de 4,06 para *Palmaria palmata* e 4,08 para *Ulva rigida*), mais acentuados entre o 2º e o 4º dia de fermentação. O aumento do °Brix verifica-se até ao 11º dia para *Palmaria palmata* (12,2), enquanto *Ulva rigida* aumenta apenas até ao dia 9 (9,20). Verificou-se o aumento da acidez titulável em ambas as algas.

De forma a caracterizar os VEGaruns, foram realizadas análises à composição química, não se observando diferenças significativas na proteína total ($p < 0,05$). Por outro lado, observou-se um aumento no teor em fenóis e flavonoides totais, muito

embora os VEGaruns tenham apresentado uma redução no potencial antioxidante. Por fim, realizaram-se provas de análise sensorial pelo consumidor, verificando-se que os produtos foram sensorialmente aceites, destacando-se o VEGarum de *Palmaria palmata* (60% aceitação).

Palavras-chave: *Palmaria palmata*, *Ulva rigida*, Fermentação, Macroalgas, *Garum*.

ABSTRACT

Growing interest in food novels and healthy diets opens a window of opportunity to explore macroalgae as a potential substitute to terrestrial and fish food. Macroalgae detain a complete nutritional composition, composed by essential fat acids, high protein content and essential vitamins, fibers, and minerals.

Our main goal is to develop a green version of an ancient recipe, *garum*, a roman sauce fermented from fish uneatable parts. This sauce was greatly used in cooking to attenuate overall flavours. Our final product is not produced from animal protein, instead we studied the evaluation of spontaneous fermentation in Portuguese indigenous seaweed species - *Palmaria palmata* and *Ulva rigida*. Fermentation occurred under a NaCl 5% (p/v) concentration with the addition of koji inoculum (*Aspergillus oryzae*). Fermentation process started naturally due the indigenous microbiota of the seaweeds.

The dominant microbiota involved in the fermentations was identified by classical and molecular methods, and the presence of lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* and *Levilactobacillus brevis*) and fermentative yeasts (mostly *Wickeranomyces anomalus*) was detected. The evolution of the fermentation conducted by the autochthonous microbiota was evaluated by periodically determining the pH and °Brix. observing a decrease in pH and an increase in the concentration of lactic acid in both fermentations until the 11th day (pH values of 4.06 for *Palmaria palmata* and 4.08 for *Ulva rigida*), more pronounced between the 2nd and 4th day of fermentation. The increase in °Brix occurs until the 11th day for *Palmaria palmata* (12.2), while *Ulva rigida* increases only until the 9th day (9.20). There was an increase in titratable acidity in both macroalgae.

In order to characterize the VEGaruns, chemical composition analyzes were carried out, with no significant differences in total protein ($p < 0.05$). On the other hand, an

increase in the total phenols and flavonoids content was observed, although the VEGaruns showed a reduction in the antioxidant potential. Finally, sensorial analysis was carried out by the consumer, verifying that the products were sensorially accepted, with emphasis on VEGARum from *Palmaria palmata* (60% acceptance).

Keywords: *Palmaria palmata*, *Ulva rigida*, Fermentation, Macroalgae, *Garum*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
ÍNDICE.....	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
GLOSSÁRIO E SIGLAS	XXV
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. A FERMENTAÇÃO.....	5
2.1.1. Ancestralidade, tradição e identidade cultural	5
2.1.2. Processos fermentativos	8
2.1.3. Microrganismos fermentativos	9
2.1.3.1. Bactérias ácido-láticas (BAL)	9
2.1.3.2. Leveduras.....	10
2.1.3.3. Fungos filamentosos.....	11
2.2. DOS FERMENTADOS ANCESTRAIS AO PATRIMÓNIO GASTRONÓMICO	13
2.2.1. O sal e a salga: a importância comercial	13
2.2.2. Garum, liqueman, muria e allec	15
2.2.3. A herança gastronómica: molhos de peixe e atualidade.....	16
2.3. DO ANCESTRAL À INOVAÇÃO: POTENCIALIDADE DAS MACROALGAS	18
2.3.1. Os objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU	18
2.3.2. As macroalgas.....	19
2.3.2.1. <i>Palmaria palmata</i>	21
2.3.2.2. <i>Ulva rigida</i>	23
2.3.3. Fermentação de macroalgas	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. PRODUÇÃO DE KOJI.....	29
3.1.1. Preparação do arroz	29
3.1.2. Inoculação e produção do koji.....	29
3.2. PREPARAÇÃO DO VEGARUM E ENSAIO FERMENTATIVO	30
3.3. ANÁLISE DA MICROBIOTA FERMENTATIVA	32
3.3.1. Meios de isolamento.....	32

3.3.1.1.	De Man, Rogosa e Sharpe agar (MRS).....	32
3.3.1.2.	Yeast peptone dextrose em agar (YPD).....	32
3.3.2.	Isolamento, plaqueamento e quantificação da microbiota fermentativa	32
3.3.3.	Testes preliminares de caracterização da microbiota isolada	33
3.3.3.1.	Caracterização macromorfológica	33
3.3.3.2.	Teste de catalase	33
3.3.3.3.	Teste KOH.....	34
3.4.	MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FERMENTATIVA	34
3.4.1.	Os princípios básicos das reações de PCR.....	34
3.4.1.1.	Bactérias ácido-láticas.....	35
3.4.1.2.	Leveduras.....	35
3.4.2.	Amplificação de DNA.....	36
3.4.2.1.	Bactérias ácido-láticas.....	36
3.4.2.2.	Leveduras.....	36
3.4.3.	Quantificação do produto de PCR.....	37
3.4.4.	Purificação e sequenciação.....	38
3.5.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	38
3.5.1.	Preparação das amostras	38
3.5.2.	Acidez titulável.....	39
3.5.3.	Análise do sobrenadante por HPLC	39
3.5.4.	Compostos fenólicos.....	40
3.5.4.1.	Compostos fenólicos totais.....	40
3.5.4.2.	Fenóis solúveis	40
3.5.5.	Flavonoides	41
3.5.6.	Potencial antioxidante	41
3.5.6.1.	DPPH	41
3.5.6.2.	FRAP	42
3.5.7.	Proteínas	42
3.5.7.1.	Proteína total.....	42
3.5.7.2.	Proteínas solúveis.....	43
3.5.8.	pH	43
3.5.9.	Teor de sólidos solúveis.....	43
3.6.	ANÁLISE SENSORIAL	44
3.7.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1.	QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FERMENTATIVA AUTÓCTONE	45
4.1.1.	Tempo inicial - amostra dia 0.....	45
4.1.2.	Tempo intermédio - amostra dia 7	48
4.2.	IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA	50
4.2.1.	Tempo inicial - amostra dia 0.....	50
4.2.2.	Tempo intermédio - amostra dia 7	52

4.2.2.1.	Bactérias ácido-láticas.....	52
4.2.2.2.	Leveduras.....	55
4.3.	EVOLUÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO	58
4.3.1.	pH e °Brix.....	58
4.3.1.1.	<i>Palmaria palmata</i>	58
4.3.1.2.	<i>Ulva rigida</i>	61
4.3.2.	Produção de metabolitos.....	63
4.3.2.1.	<i>Palmaria palmata</i>	63
4.3.2.2.	<i>Ulva rigida</i>	64
4.4.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	66
4.4.1.	Acidez titulável.....	66
4.4.2.	Compostos fenólicos, atividade antioxidante e flavonoides.....	67
4.4.3.	Proteínas	69
4.5.	ANÁLISE SENSORIAL	70
5.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	75
6.	BIBLIOGRAFIA.....	77
A.	ANEXOS.....	93
I.	Retas de calibração ácidos orgânicos, açúcares, glicerol e etanol.....	94
II.	Questionário de análise sensorial.....	95
III.	Retas de calibração parâmetros de análise química.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - FUNGO FILAMENTOSO <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> VISTO AO MICROSCÓPIO.....	13
FIGURA 2 - TIPOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS, MÉTODOS FERMENTATIVOS, TIPOS DE SUBSTRATOS E CONCENTRAÇÃO DE SAL ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE PEIXE. ADAPTADO DE ZANG ET AL., (2020).....	17
FIGURA 3 - OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA ONU, AGENDA 2030, EM QUE AS MACROALGAS SE INSEREM.....	19
FIGURA 4 - <i>PALMARIA PALMATA</i>	22
FIGURA 5 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE <i>PALMARIA PALMATA</i> DA MARCA TOK DE MAR, ALGAPLUS, PORTUGAL. %VRN - VALORES DE REFERÊNCIA DO NUTRIENTE; %DDR - DOSE DIÁRIA RECOMENDADA.....	23
FIGURA 6 - <i>ULVA RIGIDA</i>	23
FIGURA 7 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE <i>ULVA RIGIDA</i> DA MARCA TOK DE MAR, ALGAPLUS, PORTUGAL. %VRN - VALORES DE REFERÊNCIA DO NUTRIENTE; %DDR - DOSE DIÁRIA RECOMENDADA.	24
FIGURA 8 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE MACROALGAS. ADAPTADO DE REBOLEIRA ET AL., (2021) E PÉREZ-ALVA ET AL. (2022).....	27
FIGURA 9 - PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA. ADAPTADO DE HTTPS://WWW.BIOMEDICINAPADRAO.COM.BR	35
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO TAMANHO DAS BANDAS (EM PARES BASES) ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE , CORRESPONDENTES AO NZYDNA LADDER I (NZYTECH, PORTUGAL).	38
FIGURA 11 - DIVERSIDADE DE COLÓNIAS EM MEIO MRS, RESULTANTES DO PLAQUEAMENTO DA AMOSTRA 0 DE <i>PALMARIA PALMATA</i>	47
FIGURA 12 - AMPLIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE rDNA DE BACTÉRIAS. ADAPTADO DE LAVRINIENKO ET AL., (2021).....	52
FIGURA 13 - GEL DE ELETROFORESE COM BANDAS (PB) DE DNA AMPLIFICADO PARA AS AMOSTRAS IDENTIFICADAS EM <i>PALMARIA PALMATA</i>	53
FIGURA 14 - AMPLIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE rDNA EM FUNGOS COM AS REGIÕES ITS AMPLIFICADAS (ITS1, 5.8S E ITS2) COM OS PRIMERS ITS1 E ITS4. ADAPTADO DE BOUQUELLAH (2019).....	56
FIGURA 15 - VEGARUNS DE <i>ULVA RIGIDA</i> E <i>PALMARIA PALMATA</i> COBERTOS COM LEVEDURAS DE VÉU, <i>WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</i> , À SUPERFÍCIE.....	57
FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO REPRESENTADO ATRAVÉS DOS VALORES DE pH E °BRIX DE <i>PALMARIA PALMATA</i>	60
FIGURA 17 - EVOLUÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO REPRESENTADO ATRAVÉS DOS VALORES DE pH E °BRIX DE <i>ULVA RIGIDA</i>	62
FIGURA 18 - AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E GLICEROL PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE <i>PALMARIA PALMATA</i>	64
FIGURA 19 - AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E GLICEROL PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE <i>ULVA RIGIDA</i>	66
FIGURA 20 - VALORES DE ACIDEZ TITULÁVEL OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA DE <i>PALMARIA PALMATA</i> E <i>ULVA RIGIDA</i> . LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.....	67

FIGURA 21 - VEGARUNS DE ULVA RIGIDA (AMARELO) E PALMARIA PALMATA (VERMELHO).....	71
FIGURA 22 - RESPOSTAS OBTIDAS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE AOS ATRIBUTOS SENSORIAIS DOS VEGARUNS DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. ESCALA HEDÓNICA DE CINCO NÍVEIS: 1 - MUITO DESAGRADÁVEL, 2 - DESAGRADÁVEL, 3- INDIFERENTE, 4 - AGRADÁVEL E 5 - MUITO AGRADÁVEL.....	71
FIGURA 23- RESULTADOS OBTIDOS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE À INTENSIDADE DO SAL.....	73
FIGURA 24 - RESULTADOS OBTIDOS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE À INTENÇÃO DE COMPRA.....	74
FIGURA 25 - RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO, LÁCTICO, GLUTÂMICO, ACÉTICO, GLUCOSE E GLICEROL.....	94
FIGURA 26 - QR PARA PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO DE ANÁLISE SENSORIAL.	105
FIGURA 27 -RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE FRAP, DPHH, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FENÓIS SOLÚVEIS, FLAVONOIDES E PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	106

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - SUMÁRIO DA CONSTITUIÇÃO FILOGENÉTICA, PIGMENTOS E FICOCOLÓIDES PRESENTES NAS ALGAS CASTANHAS, VERDES E VERMELHAS. FONTE: *GOMEZ-ZAVAGLIA ET AL.,(2019).	21
TABELA 2 - INGREDIENTES UTILIZADOS PARA PREPARAÇÃO DE DOIS VEGARUNS	30
TABELA 3 - PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARA BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS	36
TABELA 4- PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARA LEVEDURAS.....	37
TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA CORRESPONDENTES AO DIA 0 DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.	46
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM ULVA RIGIDA CORRESPONDENTES AO DIA 0 DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.....	47
TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.	48
TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO YPD.	49
TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM ULVA RIGIDA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.....	50
TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM ULVA RIGIDA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO YPD.....	50
TABELA 11 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS AO DIA 0 PARA <i>PALMARIA PALMATA</i>	51
TABELA 12 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS AO DIA 0 PARA <i>ULVA RIGIDA</i>	51
TABELA 13 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS EM <i>PALMARIA PALMATA</i>	54
TABELA 14 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS EM <i>ULVA RIGIDA</i>	55
TABELA 15 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM <i>PALMARIA PALMATA</i>	57
TABELA 16 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM <i>ULVA RIGIDA</i>	58
TABELA 17 - VALORES OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO PARA COMPOSTO FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FLAVONOIDES DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.....	68
TABELA 18 - TEORES DE PROTEÍNAS TOTAIS E SOLÚVEIS OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.....	70

GLOSSÁRIO E SIGLAS

AGAROS - Agaro-Oligossacáridos

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Hexahidrato de Cloreto de Alumínio

ALGOS - Alginato-Oligossacáridos

A_w - Atividade da Água

CH_3OH - Metanol

COS - Carrageninas-Oligossacáridos

FUCOS - Fucoïdãos

LAB - *Lactic Acid Bacteria*

GRAS - Generally Recognized as Safe

HCl - Ácido Clorídrico

HNO_3 - Ácido Nítrico

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogénio

H_2O - Água

H_2SO_4 - Ácido Sulfúrico

KOH - Hidróxido de Potássio

NaCl - Cloreto de Sódio

NAOS - Neo-Agaro-Oligossacáridos

Na_2CO_3 - Carbonato de Sódio

NaNO_2 – Nitrito de Sódio

O_2 - Oxigénio

PCR - Polymerase Chain Reaction

SDS - Dodecilsulfato de Sódio

SO_4^{2-} -Sulfato de Anidro

°Brix – Teor de Sólidos Solúveis

Introdução

Com o crescimento das dietas de base vegetal como o *plant-based* e vegetarianismo no sentido lato, surgem novas oportunidades de desenvolvimento de produtos alimentares inovadores e com foco numa alimentação mais *clean* e saudável (Mintel, 2021). Cada vez mais, o consumidor tem consciência do impacto da indústria alimentar, procurando produtos que visem a sustentabilidade e estimulação de economia locais e nacionais, onde a criatividade e autenticidade detêm um papel fundamental na tomada de decisão de compra, procurando ainda alimentos que apresentem funções nutracêuticas devido à preocupação acrescida com a saúde (Innova, 2022; Mintel, 2021).

Tendencialmente, os alimentos fermentados ganham relevância e espaço em todo o tipo de dietas, principalmente pelos benefícios que lhes estão associados. Durante os processos fermentativos, ocorrem transformações físico-químicas que os tornam alimentos mais ricos nutricionalmente: aumento da biodisponibilidade dos compostos nutricionais e bioatividade dos compostos promotores de saúde, aliados a uma nova experiência gastronómica através de *flavours* e texturas (Rezac et al., 2018; Tamang et al., 2016).

A fermentação trabalha em simbiose com sustentabilidade no setor alimentar, uma vez que facilmente se consegue inovar e transformar alimentos que seriam descartados, em novos produtos potencialmente nutritivos e apelativos ao consumidor (Tamang et al., 2020).

Dentro das novas tendências alimentares, as macroalgas surgem como potenciais substitutos dos alimentos provenientes da pesca, tendo especial relevância para dietas de base vegetal, onde se apresentam como uma solução sustentável face à exploração de plantas terrestres e produtos de origem animal (Mouritsen & Styrbaek, 2020), com uma composição nutricional bastante completa e interessante – contém ácidos gordos polinsaturados, elevados níveis de proteína, fibra alimentar, minerais como o iodo - mineral essencial que apenas se encontra em concentrações mais elevadas, sendo ricas em compostos bioativos como os antioxidantes, pigmentos, polissacáridos sulfatados, e vitaminas, entre estas a vitamina B12, ausente em vegetais e plantas terrestres (Shannon & Abu-Ghannam, 2019). Para além disso, apresentam um fator diferenciador que torna as macroalgas apetecíveis ao paladar, o sabor umami (Milinovic et al., 2021).

Atentos às exigências e necessidades do consumidor atual e à procura por parte dos *chefs* por produtos que visem a inovação aliada à herança cultural, seguindo a tendência de explorar as potencialidades das macroalgas na alimentação, surge o projeto VEGarum, pensando no forte contexto histórico e gastronómico da cozinha mediterrânica, valorizando a longa ligação afetuosa que o povo português detém com o mar, e explorando técnicas ancestrais através da fermentação. Neste contexto, este projeto pretendeu criar um produto inovador, reintroduzindo e inovando um produto fermentado ancestral deixado como herança gastronómica pelos romanos através do desenvolvimento de uma versão vegetal feita a partir de macroalgas portuguesas criadas em regime multitrófico de aquacultura, tornando-o inclusivo e proporcionando assim uma nova experiência gastronómica.

Durante o Império Romano, Troia e Lisboa foram os maiores polos de produção e exportação de *garum* em Portugal (Bugalhão, 2001). Este “elixir” era consumido pelas classes mais abastadas como substituto do sal e intensificador de sabor, resultado da transformação das partes menos nobres dos peixes como as vísceras e guelras, com recurso à técnica de salga e utilização ervas aromáticas (Grainger, 2014).

Este processo fermentativo, iniciava-se através das enzimas endógenas do peixe, que atuam na primeira fase de transformação, onde ocorria uma hidrólise enzimática, e simultaneamente, devido à grande concentração de sal existente (10% a 25%) (Zang et al., 2020), dava-se um processo osmótico, em que a água proveniente dos tecidos animais extraía os nutrientes e sais minerais necessários para o crescimento da microbiota fermentativa (Curtis, 2017). A duração da fermentação encontrava-se entre os 3 e 12 meses (Mouritsen et al., 2017). Após concluído o processo, a pasta de consistência gelatinosa seria prensada e filtrada: o sobrenadante extraído seria o *garum*, enquanto a pasta resultante da prensagem, seria designada como *allec* (Grainger, 2011).

Esta dissertação encontra-se inserida no projeto exploratório UID/AGR/04129/2020 financiado pelo LEAF - Landscape, Environment, Agriculture and Food Research Center do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa e tem como objetivo desenvolver os seguintes pontos:

1. Avaliação do processo metabólico;
2. Caracterização da microbiota fermentativa;
3. Isolamento, identificação dos microrganismos fermentativos que fazem parte da microbiota autóctone;
4. Avaliação das características químicas do produto;
5. Estudo e avaliação da aceitação do consumidor através da realização de testes de análise sensorial;

Revisão Bibliográfica

2.1. A fermentação

2.1.1. Ancestralidade, tradição e identidade cultural

A fermentação, no seu sentido lato, caracteriza-se pelo processo de transformação por atividade metabólica de microrganismos que convertem compostos orgânicos como hidratos de carbono em álcool e ou em ácidos orgânicos, tendo sido amplamente utilizada pelos nossos antepassados como forma de aumentar o tempo de vida útil e conservação dos alimentos (Amato et al., 2021; Terefe & Augustin, 2020).

O processo fermentativo pode ocorrer de uma forma espontânea, sendo observado frequentemente na natureza em matérias-primas em cru, como por exemplo quando frutas amadurecidas acabam por ter os açúcares naturalmente presentes convertidos em álcool, ou de uma forma não espontânea, amplamente utilizada pela indústria, e baseada na inoculação de determinados microrganismos específicos (*starters* ou culturas de arranque), para que esta ocorra de forma controlada, padronizada e otimizada (Amato et al., 2021; Ilango & Antony, 2021; Josephsen & Jespersen, 2004).

Segundo, Amato et al. (2021), o consumo de alimentos fermentados estaria associado ao início da civilização humana com o domínio da agricultura e aprendizagem de métodos de conservação, mas a relação desenvolveu-se a par da nossa evolução. É colocada a hipótese de que os nossos antepassados primatas consumiam frutas e tubérculos naturalmente fermentados, sendo que o consumo destes pode ter tido um

impacto direto na adaptação e evolução biológica dos seres humanos enquanto espécie, uma vez que os processos fermentativos, facilitavam a biodisponibilidade e a absorção dos nutrientes, podendo por exemplo, o consumo frequente destes alimentos ter contribuído para a encefalização da espécie *Australopithecus*.¹

O domínio das técnicas de fermentação permanece uma incógnita. Os fermentados surgiram de forma espontânea e inevitável, uma vez que a fermentação faz parte do ciclo natural de “reciclagem” de matéria orgânica, tendo acontecido repetidamente até serem observados os seus benefícios (R. Hutkins, 2006; Steinkraus, 2004; Tamang et al., 2020; Terefe, 2016).

Com a anexação das civilizações, a domesticação dos animais e o domínio das diferentes espécies de cultivo agrícola como os cereais, dão indícios de que as bebidas fermentadas foram as primeiras com as quais os seres humanos estabeleceram contacto, como o hidromel e o leite fermentado, enquanto o vinho, o pão e cerveja, foram possivelmente os primeiros a ter as suas produções massificadas, uma vez que matéria-prima utilizada era cultivada em grande escala para alimentação das populações. (R. Hutkins, 2006; Prajapati & Nair, 2008; Ross et al., 2002; Steinkraus, 2004).

Neste sentido, a fermentação surge como um método revolucionário e importante de armazenamento e conservação de alimentos, uma vez que diminuía a perecibilidade das matérias-primas utilizadas, através da produção de metabolitos primários e secundários, tornando-os mais seguros para consumo e supria as necessidades nutricionais (R. Hutkins, 2006; Ross et al., 2002; Terefe, 2016; Terefe & Augustin, 2020).

O conhecimento empírico da produção de alimentos fermentados foi possivelmente passado por via oral e de geração em geração (Tamang & Samuel, 2010; Terefe & Augustin, 2020), mas Katz (2012) e Tamang et al. (2020), argumentam que os fenómenos migratórios contribuíram para a disseminação do conhecimento ancestral e

¹ É importante salientar que não existem muitos estudos realizados nesta vertente, sendo que a hipótese colocada é difícil de comprovar, como referido pela própria autora.

práticas culturais, uma vez que os imigrantes levavam consigo culturas fermentativas como herança cultural e símbolo de tradição. Dunn et al. (2021), referem que a diversidade de alimentos fermentados, é resultado do contacto entre diferentes culturas, pela troca de conhecimento dos processos utilizados e dos substratos, tendo sido utilizados como moeda de troca e estimulação de economias no passado (Shoda, 2021).

A criação da enorme diversidade de alimentos fermentados, pode ser explicada por vários fatores externos e que diretamente se influenciam entre si: as condições ambientais, a localização geográfica e os locais utilizados para fermentação, as questões culturais e económicas, as práticas gastronómicas e dietas predominantes, e por fim, os substratos disponíveis e utilizados para fermentação, vão ter um impacto direto na introdução de microrganismos com características fermentativas específicas, quanto à viabilidade, dominância e interações das diferentes populações (Dunn et al., 2021; Ilango & Antony, 2021; Tamang et al., 2020; Terefe, 2016).

Dunn et al. (2021), argumentam que, quando os nossos antepassados ancestrais fermentavam e partilhavam alimentos fermentados, aumentavam o hologenoma individual e cultural, como uma identidade única, que facilitava a propagação de diferentes estirpes de microrganismos.

Apesar de ser do conhecimento geral que existem diferenças culturais e preferências a nível gastronómico entre o oriente e ocidente (Tamang et al., 2020), Luís Froís (1585) missionário jesuíta em missão no Japão no século XVI, citado por Shonda (2021), relata bem esse contraste, ao descrever que os japoneses detestavam os cheiros dos alimentos lácteos fermentados amplamente consumidos nos países de Ocidente, mas adoravam os odores libertados dos órgãos de peixe em processo de fermentação.

É importante referir a relevância que os produtos fermentados representam enquanto comidas étnicas, património gastronómico e atrações turísticas, estimulando economias. No Japão, frequentemente, a fermentação e alimentos fermentados, são colocados em destaque e são promovidos em revistas de turismo e gastronomia (Shoda, 2021). O Kimchi, na Coreia do Sul, integra a lista da UNESCO na categoria de

património imaterial da humanidade. Na Índia, o *Dahi* (coalhado) de leite de vaca ou búfala fermentado, é consumido por uma diversidade enorme de populações, sendo considerado um alimento sagrado em festivais e rituais para comunidades hindus e budistas. (Tamang et al., 2016). No ocidente, facilmente determinados fermentados são associados a localizações geográficas e tradições: os queijos à Suíça, as azeitonas e chouriços a Portugal e Espanha, os vinhos a França, e as cervejas a países com produção massificada de cerveja como Alemanha, Bélgica e Países Baixos.

2.1.2. Processos fermentativos

Os alimentos fermentados podem ser definidos como o resultado do processo tecnológico, em que a atividade metabólica e crescimento de microrganismos, estabilizam e transformam as matérias-primas utilizadas em produtos alimentares seguros, com valor nutricional acrescentado e com características organoléticas diferenciadas e únicas (Tamang et al., 2020; Terefe & Augustin, 2020).

Na produção de alimentos fermentados em pequena escala e de forma artesanal, é comum ser utilizada a técnica de *back slopping*, que consiste na inoculação do alimento com uma pequena parte do resultado da fermentação anterior, ou a fermentação espontânea, em que o ambiente envolvente e a microbiota autóctone do alimento dão início ao processo fermentativo (Dunn et al., 2021; Ilango & Antony, 2021; Nout & Aidoo, 2002; Tamang et al., 2020). As fermentações espontâneas, são resultado da atividade competitiva de diferentes microrganismos não identificados, em que diferentes espécies dominam diferentes fases do processo fermentativo (Holzapfel, 1997), resultando em consórcios (*mixed cultures*). As espécies podem estar ou não identificadas e caracterizadas isoladamente. Com a diversidade de microrganismos e espécies envolvidas nos processos fermentativos, as características dos produtos não são homogéneas, resultando numa variabilidade entre lotes de produtos (Hutkins, 2006).

Na indústria e produção de larga escala, são utilizados *starters* (culturas de arranque) conhecidos pelas suas características funcionais e tecnológicas, em que o resultado é mais facilmente previsível, com características sensoriais, nutricionais, e reológicas

padronizadas, onde os parâmetros de qualidade são consistentes, de forma a corresponder aos critérios de segurança alimentar (Hutkins, 2006; Ilango & Antony, 2021; Terefe, 2016). Os *starters* caracterizam-se pela preparação e definição de uma enorme variedade de microrganismos fermentativos previamente identificados que, quando inoculados, aceleram o processo de fermentação e diminuem a perda de produto (Buzzini et al., 2017; Ilango & Antony, 2021).

É bastante comum a adição de *starters* quando a microbiota autóctone é inativada através da aplicação de diversos tratamentos como temperaturas elevadas e pH, permitindo assim o crescimento dos microrganismos adicionados (Altieri et al., 2017; Josephsen & Jespersen, 2004). As culturas de *starters* definidas podem ser compostas por uma cultura/estirpe pura (monocultura) ou uma mistura entre 2 e 6 estirpes (multiculturas) de microrganismos identificados e conhecidos pelas suas características fermentativas (Hutkins, 2006; Josephsen & Jespersen, 2004; Tamang, 2010).

Os alimentos fermentados podem ser classificados com base no resultado da fermentação ou no tipo de processo. Por exemplo, Tamang (2010), menciona que os alimentos fermentados podem ser definidos pelas suas propriedades ácidas, alcalinas e alcoólicas, enquanto Terefe & Augustin (2020), classificam os processo fermentativos consoante os microrganismos dominantes envolvidos.

2.1.3. Microrganismos fermentativos

2.1.3.1. Bactérias ácido-láticas (BAL)

As Bactérias ácido-láticas (BAL) são bactérias Gram-positivas e não produtoras de catalase, anaeróbias obrigatórias ou facultativas e acidófilas que metabolizam açúcares em ácido lático. São ainda conhecidas pela produção de bacteriocinas, composto com potencialidade de biopreservação, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos patogénicos. A acidificação é responsável pela conservação através do abaixamento de pH e aumento da concentração de ácidos orgânicos. Para além disso, as BAL apresentam capacidade para tolerarem concentrações até 5%, o que leva a que o sal seja adicionado frequentemente em diversos alimentos fermentados que envolvem

fermentações lácticas proporcionando condições favoráveis para o seu desenvolvimento (Altieri et al., 2017; Josephsen & Jespersen, 2004; Lacasse, 2000a; Ross et al., 2002).

As BAL encontram-se subdividas com base no seu metabolismo:

- Homofermentativas quando a glucose é metabolizada através de enzimas pela via glicolítica de Embden-Meyrhopf. A partir de um 1 mol de glucose são produzidos 2 mol de ATP e 2 mol de piruvato, sendo este convertido em 2 mol de lactato por via enzimática, o que leva a que o ácido láctico seja o principal composto produzido através desta via metabólica (Altieri et al., 2017; Amato et al., 2021; Hutkins, 2006; Ross et al., 2002).

- Heterofermentativas quando produzem quantidades equimolares de diferentes compostos como ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono, a partir da glucose, pela via das hexoses monofosfatadas ou pentoses (Altieri et al., 2017; Josephsen & Jespersen, 2004; Ross et al., 2002).

As diferentes espécies de BAL podem ser classificadas consoante a temperatura ótima de crescimento e de produção de ácido láctico: as espécies/estirpes mesófilas têm temperaturas ótimas em torno de 30 °C , enquanto as espécies termófilas têm uma temperatura ótima de crescimento a 42 °C (Altieri et al., 2017; Lacasse, 2000a). Os géneros de bactérias *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* pertencem ao grupo das bactérias ácido-lácticas (Bourdichon et al., 2021).

2.1.3.2. Leveduras

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, em que na sua forma vegetativa se reproduzem de forma assexuada por gemulação ou fissão binária, sendo classificadas consoante o seu metabolismo respiratório (aeróbias estritas, anaeróbias estritas ou aeróbias-anaeróbias facultativas), os nutrientes utilizados para crescimento, tolerância térmica e osmótica, presença ou não de ascósporos, modo de reprodução e formação ou não de pseudomicélio, sendo encontradas em legumes, cereais e frutas (Lacasse, 2000b).

Estes microrganismos apresentam propriedades biotecnológicas importantes para a indústria alimentar (Rai et al., 2019). São os principais responsáveis pela realização de fermentações alcoólicas, uma vez que têm preferência por substratos ricos em fontes de carbono provenientes de hidratos de carbono, convertendo açúcares em álcool (Maicas, 2020; Rai et al., 2019). O seu crescimento depende da existência de compostos como açúcares fermentescíveis, aminoácidos disponíveis, vitaminas, minerais e não menos importante, a quantidade de oxigénio disponível (Maicas, 2020). A produção e tolerância ao etanol, ácidos orgânicos e dióxidos de enxofre são ferramentas que permitem a diferenciação metabólica das espécies (Maicas, 2020). Os valores de pH ótimos de crescimento encontram-se entre 4,5 e 5,5, dependendo da espécie podem adaptar-se a valores de pH mais ácidos ou mais alcalinos (Lacasse, 2000b). As temperaturas ótimas de crescimento situam-se entre os 20 °C e os 30 °C, mais uma vez, estes valores podem variar consoante a espécie (Lacasse, 2000b).

As leveduras estão frequentemente envolvidas em processos fermentativos resultante de consórcios, como fungos filamentosos ou bactérias ácido-lácticas, e detêm o importante papel na produção e utilização de ácidos orgânicos, desenvolver *flavours*, aromas e texturas, potencializando as propriedades nutricionais, através da redução de compostos anti nutricionais (Rai et al., 2019). As enzimas produzidas por leveduras são responsáveis pela produção de diferentes metabolitos que aumentam a biodisponibilidade de compostos bioativos, como péptidos, oligossacáridos e polifenóis livres (Rai et al., 2019).

2.1.3.3. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos ou bolores pertencem ao grupo dos organismos multicelulares, caracterizando-se como aeróbios estritos. A sua forma filamentosa, deve-se ao desenvolvimento de hifas, onde está contido o citoplasma e informação genética. Nas extremidades das hifas, encontram-se os esporos. O processo de esporulação é o principal responsável pelas diferentes colorações (Behera et al., 2019; Lacasse, 2000b).

A sua reprodução caracteriza-se por ser assexuada, mas a reprodução sexuada acontece em várias espécies de fungos filamentosos. Os esporos, por norma, são resis-

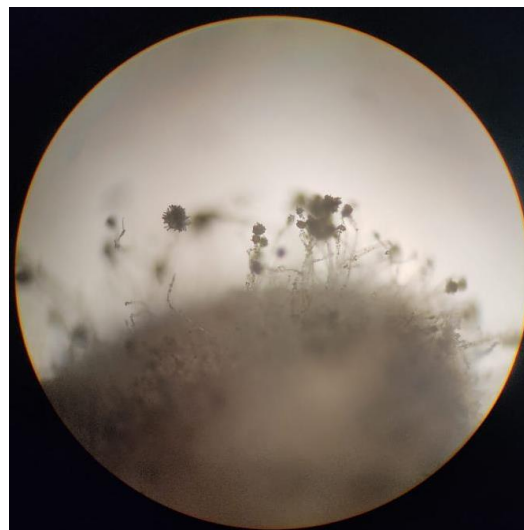
tentes a condições ambientais extremas. As temperaturas ótimas de crescimento situam-se na maioria dos casos entre os 20 °C e 25 °C, enquanto a gama de pH's ótimos localiza-se entre 4 e 6. No entanto, devido à grande capacidade adaptativa facilmente se desenvolvem numa gama ampla de temperaturas e valores de pH (Behera et al., 2019; Lacasse, 2000b).

Apesar de ser do conhecimento geral que os fungos filamentosos são problemáticos quando se trata de produção de micotoxinas causando grandes perdas a nível alimentar, diversas espécies de fungos são utilizados para a produção de alimentos fermentados, pela sua capacidade de produção de enzimas capazes de realizar a hidrólise de macromoléculas (lípidos, hidratos de carbono e proteínas) e pela produção de compostos responsáveis por propriedades organoléticas distintas, sendo muitos deles classificados como indígenas e tradicionais principalmente nos países orientais (Lacasse, 2000b; Nout & Aidoo, 2002).

Dentro dos grupo de fungos filamentosos que são utilizados para produção de alimentos, encontra-se *Aspergillus oryzae* (Figura 1). Este fungo, considerado como GRAS, tem uma temperatura ótima de crescimento entre 32 °C e 36 °C e o valor de pH ótimo encontra-se entre 5.0 e 6.0, sendo que pode multiplicar-se numa vasta gama de valores de pH (2.0-8.0) (Daba et al., 2021). Quando inoculado em substratos ricos em amido, como o arroz (koji), produz uma grande variedade e quantidade de enzimas, formando um *starter* enzimático altamente eficiente (Daba et al., 2021; Yamashita, 2021). As principais enzimas produzidas são amilases (α -amilases, β -amilases e glucoamilases), β -galactosidase, celulasas, pectinases, asparaginases, proteases e lipases (Daba et al., 2021; Nout & Aidoo, 2002).

FIGURA 1 - FUNGO FILAMENTOSO ASPERGILLUS ORYZAE VISTO AO MICROSCÓPIO.

CRÉDITOS: FRANCISCO DUARTE



O koji detém a importante função de hidrolisar macromoléculas complexas em moléculas simples, disponibilizando nutrientes e fontes de energia para a microbiota fermentativa, sendo amplamente utilizado na produção de uma variedade de produtos tradicionais no Japão como miso, molho de soja, sake, mirin, entre outros, sendo considerado o fungo nacional (Yamashita, 2021). Durante o processo de fabrico de koji, são libertados compostos que contribuem para aromas e *flavours* agradáveis deste tipo de alimentos (Yamashita, 2021).

2.2. Dos fermentados ancestrais ao património gastronómico

2.2.1. O sal e a salga: a importância comercial

Apesar das tendências alimentares atuais, visarem a redução do sal adicionado aos alimentos, é importante frisar que, desde os primórdios das civilizações, o sal apresenta uma elevada importância, tendo sido utilizado desde então como conservante e amplificador de sabores nos alimentos (Elias et al., 2020; Steinkraus, 2004). Para os romanos, o sal desempenhava um papel socioeconómico relevante, uma vez que o exército era pago em sal, dando origem à palavra *salarium* (Kurlansky, 2002).

Com a expansão do Império, a indústria conserveira detinha um papel socioeconómico acrescido, uma vez que permitiu o desenvolvimento da atividade piscícola e de

oficinas de manipulação dos produtos resultantes destes nas orlas marinhas, com o principal objetivo de conservar e estender o tempo de vida útil dos pescados, fornecer e garantir o consumo de peixe durante as épocas em que a pesca era escassa, e suprimir as necessidades existentes de sal (Bernardes, 2015; Bugalhão, 2001; Marzano, 2018).

Curtis (2017), menciona que os produtos derivados da salga do peixe podem ser divididos em duas tipologias de produtos: as salgas de peixe (incluindo as secagens e desidratações) e os molhos de peixes fermentado e não fermentados.

Salsamentum, era a palavra utilizada pelos romanos para descrever produtos conservados em sal utilizando diferentes técnicas de salga, sendo o peixe o mais importante de todos (Curtis, 1991; Kurlansky, 2002), as salgas sólidas eram designadas de *salsamenta* (Bernardes, 2015).

As técnicas de salga foram adaptadas e aprimoradas pelos romanos, partindo dos conhecimentos adquiridos através dos gregos, que utilizavam o termo geral *tari-chos*, para descrever salga de peixe, mas que detinham diferentes terminologias para descrever os tipos de cura, as espécies de peixe processadas (*thynnides*) e as partes do peixe (*melandrua*) que seriam utilizadas, se consistiam numa salga leve (*arkeopastos*), intermédia (*hēmitarichos*) ou intensa (*teleios*), entre outras (Curtis, 2017).

As partes menos nobres como o sangue, vísceras e guelras, também detinham a sua importância, uma vez que não eram descartadas, mas sim reutilizadas para a produção dos diferentes molhos de peixe (*garum*, *liquamen*, *muria* e *allec*) (Curtis, 1991; Kurlansky, 2002).

Troia foi um dos maiores centros industriais de salga de todo o império romano, onde as principais atividades seriam a transformação de pescado e produção de produtos a partir destes, devido à proximidade com as salinas, uma vez que a extração de sal já era uma atividade com forte expressão na região (Bugalhão, 2001; Pinto et al., 2014).

2.2.2. Garum, liqueman, muria e allec

Grainger (2018, 2021), argumenta sobre a dificuldade de definir o que é garum, uma vez que nos textos clássicos não é consensual a terminologia dos diferentes molhos de peixe utilizados, referindo ainda que a diferenciação entre *garum* e *liquamen* que utiliza nem sempre é aceite nas comunidades académicas.

Esta dificuldade, deve-se principalmente às referências encontradas em diferentes fontes, a partir do século III, em que a palavra *garum*, passa a ser substituída por *liquamen*, passando a ser o termo comum para qualquer tipo de molho de peixe fermentado (Bernardes, 2015; Curtis, 2017; Grainger, 2018).

Grainger, (2018, 2021), menciona que na obra de *Apicius*, os 2 temperos apresentam aplicações distintas na cozinha: o *garum* é utilizado como tempero de acabamento, enquanto o *liquamen* aparece mencionado como tempero adicionado durante o processo de cozedura com outros ingredientes para amplificar sabores e desenvolver *flavours*. A autora refere que a utilização de temperos com outros ingredientes adicionados como vinho (*Oenogarum*), vinagre (*Oxygarum*), azeite ou óleo (*Oleogarum*), água (*Hydrogarum*) e mel (*Meliogarum*) (Bernardes, 2015; Bugalhão, 2001; Curtis, 2017; Mouritsen et al., 2017) mencionados em diversas receitas de *Apicius*, apesar de se referirem ao *garum*, eram possivelmente misturados com *liquamen*, uma vez que a concentração de sal contida neste era menor, tornando-o assim mais facilmente utilizável e consumível como tempero. Um *liquamen* de peras, possível versão vegetariana do tradicional, é mencionado e discutido por *Palladius* na sua obra *Opus Agricultura* (Grainger, 2021).

O *Garum* resulta da fermentação de sangue, órgãos e vísceras de peixes que possam ser sangrados e eviscerados, como a cavala, e detém influências romanas, uma vez que foram estes que começam a produção em larga escala, criando diferentes tipos de *garum* com diferentes espécies de peixe, trazendo valor acrescentado ao produto, estando principalmente acessível apenas para as classes socialmente mais altas (Grainger, 2021).

O *Liquamen* (nome latim), por sua vez, apresentava ser um molho mais barato e comum, resultado da fermentação de todas as partes de médios/pequenos peixes com sal em que adicionavam vísceras extras para hidrolisação e maior liquidificação, tendo menos densidade do que o *garum*, amplamente utilizado pelos Gregos, apelidado de *Garos* (Grainger, 2011, 2018, 2021; Mouritsen et al., 2017). Curtis (2017), refere que apesar da diferenciação entre *garum* e *liquamen*, manter-se incerta, o *liquamen* poderia ser resultado das lavagens do *allec* com água morna e sal.

Halmer em grego ou *Muria* em latim, era um molho, resultante da salmoura de peixe armazenado durante longos períodos, resultado do processo osmótico induzido pela adição de sal e exsudação da água presente nos tecidos dos peixes, não eram adicionadas enzimas digestivas e, portanto, não era um molho fermentado (Grainger, 2021).

Por fim, o *allec* (ou *hallex*), pasta fermentada resultante do processo de filtração do *garum* e *liquamen*, composta por restos que não foram dissolvidos durante o processo fermentativo, como as espinhas. Segundo Bernardes (2015), existia diferentes variedades de *allec* classificadas consoante a constituição do mesmo ou receita utilizada.

2.2.3. A herança gastronómica: molhos de peixe e atualidade

Historicamente, a fermentação de peixe está intrinsecamente ligada ao uso de sal, uma vez que permite a sua preservação e criação de produtos. Apesar do consumo de molhos de peixes fermentados ser ancestral, detém uma importância acrescida nos países asiáticos, sendo incluído na alimentação diária, uma vez que garante o consumo recomendado de proteína diária e é uma fonte importante de minerais como cálcio, magnésio e ferro e vitaminas do grupo B, como a B12, sendo considerado património cultural, histórico e gastronómico (Lopetcharat et al., 2001; Xu et al., 2021; Zang et al., 2020).

A forma de fabrico dos molhos de peixe fermentados de hoje, continuam a ter o mesmo princípio fermentativo que os ancestrais, uso de todas as partes de peixe ou moluscos, sal para inibição de crescimento de patogénicos e diferentes tempos de fermentação, em que o abaixamento dos valores de pH e produção de ácidos orgânicos por bactérias ácido-lácticas e liquidificação através da hidrólise enzimática, são as principais transformações químicas que permitem a sua conservação e obtenção (Kose & Hall, 2011; Lopetcharat et al., 2001).

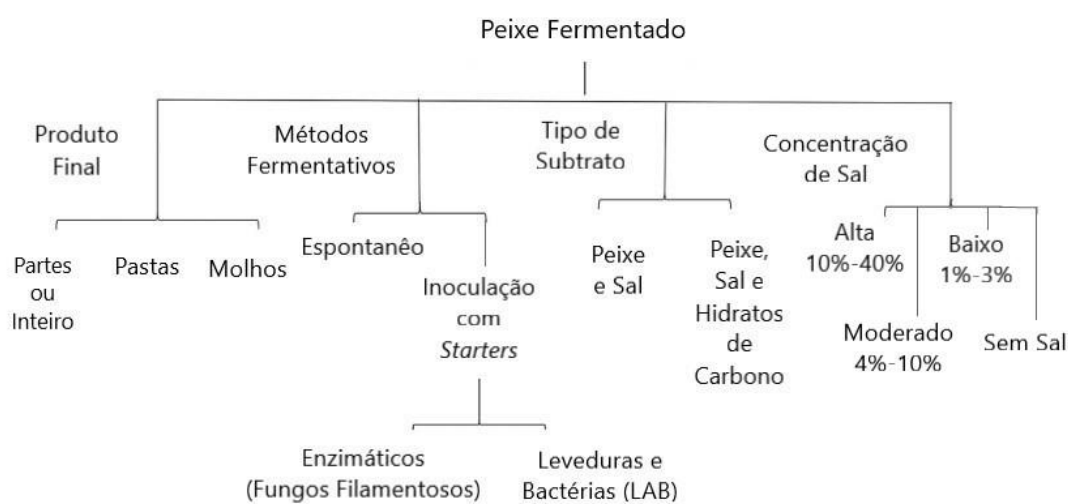


FIGURA 2 - TIPOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS, MÉTODOS FERMENTATIVOS, TIPOS DE SUBSTRATOS E CONCENTRAÇÃO DE SAL ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE PEIXE. ADAPTADO DE ZANG ET AL., (2020).

Os produtos obtido a partir da fermentação de peixe podem ser classificados consoante a quantidade de sal adicionado (0 até 30%), o tipo de substrato utilizado, onde é comumente adicionado arroz cozido ou assado, millet, farinha ou até mesmo açúcar, fonte de energia para a população de bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos (Saisithi, 1994), o método fermentativo (fermentação espontânea ou controlada através de inoculação), e por fim a aparência do produto final como demonstra a Figura 2 (Kose & Hall, 2011; Zang et al., 2020).

2.3. Do ancestral à inovação: potencialidade das macroalgas

2.3.1. Os objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU

Segundo Cai et al.,(2021), as macroalgas vão de encontro a diversos objetivos definidos pela Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Sustentável, Agenda 2030 (Figura 3), tendo sido definido um report *"Seaweeds Revolution: A Manifesto For A Sustainable Future"* por Lloyd's Register Foundation (2020):

SG1, SG2 e SG3: Devido à riqueza nutricional das macroalgas (macronutrientes e micronutrientes) enquanto alimento completo, tem o potencial de contribuir para o sistema alimentar mais justo, suprimindo necessidades nutricionais através do consumo de alimentos formulados à base das mesmas ou consumo direto. Atualmente, já são utilizadas na produção de rações animais (incluindo aquacultura), biofertilizantes e biodiesel. Utilização dos compostos bioativos para formulação de potenciais aplicações medicinais e na formulação de medicamentos à base dos mesmos (Bizzaro et al., 2022; Yong et al., 2022).

SG8 e SG10: O desenvolvimento de indústria de exploração de macroalgas e produtos derivados destas, podem ser uma oportunidade de gerar novas empresas, consequentemente, o desenvolvimento e criação de postos de trabalho em países de economias emergentes, principalmente em áreas costeiras, onde as comunidades que vivem nas orlas marítimas continuam a sofrer de desigualdades socioeconómicas (Cai et al., 2021; Yong et al., 2022).

SG12: A extração de polissacáridos presentes nas macroalgas, apresentam potencialidade de exploração e utilização para a produção de biofilmes e embalagens inteligentes não tóxicas e biodegradáveis, como forma de redução do plástico (Lloyd's Register Foundation, 2020; Yong et al., 2022).

SG13 e SG14: As macroalgas enquanto plantas marinhas contribuem para o desenvolvimento de biodiversidade dos ecossistemas e manutenção dos habitats mari-

nhos, sendo ainda produtoras de oxigénio a partir do dióxido de carbono, através do processo de fotossíntese e decompositoras de compostos inorgânicos. Face às plantas terrestres, têm a vantagem de não requerem o uso de terra, tornando a sua produção sustentável e amiga do ambiente. A aquacultura multitrófica integrada é uma fonte importante tanto na produção de macroalgas para aplicação na alimentação humana e animal como de preservação e produção de espécies marinhas para consumo humano (García-Poza et al., 2020; Yong et al., 2022).



FIGURA 3 - OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA ONU, AGENDA 2030, EM QUE AS MACROALGAS SE INSEREM.

2.3.2. As macroalgas

Classificadas como seres multicelulares e autotróficos, realizam fotossíntese e crescem principalmente nas zonas costeiras, com máximo de 60 metros de profundidade. Dividem-se em 3 grupos taxonómicos em que as verdes (*Chlorophyta*) e as vermelhas (*Rhodophyta*) pertencem ao Reino *Plantae*, enquanto as castanhas (*Phaeophyceae*), pertencem ao Reino *Chromist* (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Pereira, 2016). Esta divisão deve-se principalmente aos diferentes pigmentos fotossintéticos, e aos teores de fitocolóides presentes na constituição das diferentes espécies (Pereira, 2009).

A clorofila a, pigmento fotossintético orgânico comum a todas as macroalgas, tem a capacidade de absorver energia solar e produzir oxigénio (O_2) a partir da água. No processo fotossintético ocorre a fixação de dióxido de carbono (CO_2) e produção de glucose. Este processo torna as macroalgas, uma das principais fontes responsáveis de produção de oxigénio para a atmosfera (Pereira, 2016). Para além disso, contribuem

para a formação de ecossistemas marinhos, onde diferentes espécies coabitam e interagem (Gomez-Zavaglia et al., 2019).

Contrariamente às plantas terrestres, as macroalgas não contêm raízes, mas discos basais que facilitam a aderência às rochas, não sendo utilizados como órgão de nutrição, mas detêm a capacidade de absorver nutrientes em toda a sua superfície (Gomez-Zavaglia et al., 2019). A constituição nutricional varia consoante a época do ano e é influenciada através de diferentes fatores ambientais entre eles, a localização geográfica, a salinidade e pH da água, a intensidade solar, entre outros (Chye et al., 2018).

Os níveis de fibra presentes nas macroalgas são iguais ou superiores quando comparadas com as plantas terrestres (MacArtain et al., 2007; Øverland et al., 2019). Devido aos diferentes graus de polimerização, os oligossacáridos (AGAROS, NAOS, COS, ALGOS e FUCOS) presentes nas macroalgas não são decompostos na parte superior do trato gastrointestinal por via enzimática, mas apresentam potencial enquanto compostos pré-bióticos, uma vez que chegam ao intestino intactos, prontos a serem consumidos pela microbiota intestinal (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Patel et al., 2021; Zheng et al., 2020).

As macroalgas fazem parte da alimentação diária dos países asiáticos, enquanto o consumo em países ocidentais é relativamente limitado. A procura por alimentos tradicionais orientais, pela perceção de serem mais saudáveis e a busca por novas experiências gastronómicas em restaurantes de especialidades orientais (como o sushi) proporcionam a introdução de macroalgas na alimentação, ainda que o seu seja esporádico (Blikra et al., 2021). Principalmente utilizadas na formulação de rações para animais e produção de biodiesel, tendencialmente ganham destaque devido aos compostos bioativos, como os polissacáridos sulfatados, aminoácidos essenciais, ácidos gordos polinsaturados, pigmentos, compostos fenólicos, capacidade antimicrobianas, compostos antioxidante e anti-inflamatórios, que podem ser extraídos e utilizados como ingredientes chave na formulação de novos produtos alimentares (Chye et al., 2018; Monteiro et al., 2021).

TABELA 1 - SUMÁRIO DA CONSTITUIÇÃO FILOGENÉTICA, PIGMENTOS E FICOCOLÓIDES PRESENTES NAS ALGAS CASTANHAS, VERDES E VERMELHAS. FONTE: *GOMEZ-ZAVAGLIA ET AL.,(2019).

Reino	Filo	Classes*	Pigmentos	Ficocolóides	Referências
Protista	Ochrophyta	Phaeophyceae	Clorofila b, c ₁ , c ₂ , c ₃ ; α, β-caroteno; Xantofilas; - Fucoxantina, entre outras.	Alginato; Laminarina; Fucoidan.	Cardoso et al.,(2014) Gallardo (2015) Gomez-Zavaglia et al.,(2019); Pereira (2011) e (2016); Pérez-Alva et al.,(2022); Reboleira et al.,(2021);
	Chlorophyta	Ulvophyceae	Clorofila a e b; Carotenoides: - α, β, ε-caroteno; - Xantofilas;	Amido; Celulose; Ulvan.	
Plantae	Rhodophyta	Bangiophyceae; Compsopogonophyceae; Florideophyceae; Porphyridiophyceae; Rhodellophyceae; Stylonematophyceae.	Clorofila a e d; α, β-caroteno; Aloficocianina; r-Ficoeritrina; r-Ficocianina; Xantofilas.	Agar; Agarrose; Carrageninas.	.

2.3.2.1. *Palmaria palmata*

Palmaria palmata, em português, conhecida como Botelho Comprido, é uma macroalga vermelha, pertencente Reino Plantae, filo Rhodophyta e Classe Florideophyceae, o seu comprimento máximo é de 50 cm, crescendo em águas atlânticas e pacíficas, sendo que em regime de aquacultura o seu crescimento também é bem sucedido (Figura 4). O seu nome foi dado pela sua divisão, que se parece com os dedos de uma mão (Mouritsen, 2013), sendo das algas para as quais mais registos existem do seu consumo alimentar e usos medicinais pelos povos que viviam nas costas norte atlânticas e pacíficas durante séculos (Mouritsen et al., 2013).

Rica em teores de proteína (entre 8 a 35% em peso seco, estes valores podem variar do inverno para o verão), contendo quase todos os aminoácidos essenciais à exceção do triptofano, enquanto os mais abundantes, segundo Mouritsen et al.,(2013), são ácido aspártico, glicina, a alanina, ácido glutâmico, prolina e serina. O ácido aspártico e o ácido glutâmico são os responsáveis pelo sabor a umami, a prolina, serina e alanina responsáveis pelo sabor doce e por fim a isoleucina, leucina e va-

lina são responsáveis pelo sabor amargo, conferindo a *Palmaria palmata* um complexo de sabores intensos (Mouritsen, 2013; Mouritsen et al., 2013).



FIGURA 4 - PALMARIA PALMATA.

Fonte: algaeBASE

Palmaria palmata apresenta elevados níveis de vitamina C, potencializando a absorção de ferro (Pereira, 2011), é rica em ficoeritrina (0,5% em peso seco), ficobiliproteína característica das algas vermelhas, pigmento importante na formação de vitamina A (Pereira, 2009, 2018). Através da Figura 5, caracterização de *Palmaria palmata* utilizada na realização deste trabalho, é possível observar a riqueza de vitaminas do complexo B, grupo de vitamina solúveis em água que desempenham a função de regulação do metabolismo e crescimento celular, vitamina E e K, vitaminas solúveis em gordura, que detém a importante função de regulação de atividades biológicas, como a atividade antioxidante (Pereira, 2018).

Apresenta riqueza a nível de diversos minerais como demonstra a Figura 5, sendo que se destacam os elevados valores de iodo, potássio, cálcio, magnésio e ferro. Relativamente aos hidratos de carbono, *Palmaria palmata*, apresenta 50,6 g, destes, 28 g são fibra alimentar (solúvel e insolúvel) e 22,6 g são açúcares, potencialmente fermentescíveis como será discutido no ponto 4.3.

Informação Nutricional	Por 100 g	%DDR
Energia	227 kcal	11%
Lípidos	1,3 g	2%
Dos quais Ácidos Gordos Saturados	0,34 g	2%
Dos quais Ácidos Gordos Polinsaturados	0,25 g	N.A
Hidratos de Carbono	50,6 g	19%
Dos quais Açúcares	22,6 g	25%
Proteínas	17,2 g	34%
Sal*	4,2 g	70%
Fibra Alimentar	28 g	N.A

Minerais	Por 100 g	%VRN
Cálcio (mg)	547	68%
Cobre (mg)	1,1	110%
Ferro (mg)	34,8	130%
Fósforo (mg)	280	40%
Iodo (µg)	32500	21667%
Magnésio (mg)	241	64%
Manganésio (mg)	12,1	605%
Potássio (mg)	6812	341%
Selênio (µg)	9	16%
Zinco (mg)	4,2	42%

Vitaminas	Por 100 g	%VRN
Vitamina A (µg)	7440	930%
Vitamina D (µg)	0,9	18%
Vitamina E (mg)	3,4	28%
Vitamina K (µg)	420	560%
Vitamina C (µg)	83,6	10,5%
Tiamina - B1 (mg)	0,4	36%
Riboflavina - B2	0,5	36%
Niacina - B3 (mg)	4,3	27%
Ácido Fólico - B9 (µg)	92	46%
Biotina - B8 (µg)	11,8	24%
B12 (µg)	9,8	392%

FIGURA 5 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE *PALMARIA PALMATA* DA MARCA TOK DE MAR, ALGAPLUS, PORTUGAL. %VRN - VALORES DE REFERÊNCIA DO NUTRIENTE; %DDR - DOSE DIÁRIA RECOMENDADA.

2.3.2.2. *Ulva rigida*

Ulva rigida ou alface-do-mar, em português, é uma alga verde pertencente ao Reino Plantae, filo Chlorophyta, Classe Ulvophyceae, que pode atingir até 15 cm de comprimento, encontrada frequentemente em rochas (Figura 6). Usualmente cresce em climas temperados e quentes, podendo ser consumida em saladas e sopas (Pereira, 2016).



FIGURA 6 - *ULVA RIGIDA*.

Fonte: algaeBASE

Detém elevados níveis de proteínas (entre 10 a 25% de peso seco), contendo um bom aporte de aminoácidos e essenciais e não essenciais, fibras solúveis e insolúveis, vitaminas (destacando-se a A e a C) e minerais como cálcio, magnésio e ferro, como demonstra a Figura 7; e apresenta elevados níveis de ácidos glutâmico e aspártico, rica em ácidos gordos polinsaturados (Pereira, 2011; Queirós et al., 2021; Taboada et al., 2009).

Os ulvanos são heteropolissacáridos sulfatos solúveis em água que contribuem para a resistência e flexibilidade da alga, sendo constituídos por ácidos urónicos (ácido glucurónico e ácido idurónico), por L-ramnose sulfatada, xilose e glucose (Cesário et al., 2018). Os polissacáridos sulfatos estão associados a atividades biológicas como imuno inflamatória, antioxidante, antiviral, anticoagulante e anti tumor (Adrien et al., 2019; Cesário et al., 2018; Leiro et al., 2007).

Ulva rigida é frequentemente incorporada em rações para alimentação animal (Calheiros et al., 2021). As primeiras fermentações de macroalgas foram com algas da espécie *Ulva* (Uchida & Murata, 2004).

Informação Nutricional	Por 100 g	%DDR
Energia	188 kcal	9%
Lípidos	0,84 g	1%
Dos quais Ácidos Gordos Saturados	0,20 g	1%
Dos quais Ácidos Gordos Polinsaturados	0,57 g	N.A
Hidratos de Carbono	6,13 g	2%
Dos quais Açúcares	0,21 g	0,2%
Proteínas	19,24 g	38%
Sal*	4,25 g	71%
Fibra Alimentar	42,97 g	N.A

Vitaminas	Por 100 g	%VRN
Vitamina A (µg)	200	25%
Vitamina D (µg)	1,31	26%
Vitamina E (mg)	1,95	16%
Vitamina C (µg)	54,6	68%
Riboflavina - B2	0,3	21%
Niacina - B3 (mg)	8,6	54%
Ácido Fólico - B9 (µg)	53	27%
B12 (µg)	9,6	384%

Minerais	Por 100 g	%VRN
Cálcio (mg)	1198	150%
Cobre (mg)	1,3	130%
Ferro (mg)	78,9	564%
Fósforo (mg)	181	26%
Iodo (µg)	9200	6133%
Magnésio (mg)	2776	740%
Manganésio (mg)	3,9	195%
Potássio (mg)	1952	98%
Selénio (µg)	14,9	27%
Zinco (mg)	3,7	37%

FIGURA 7 - INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DE *ULVA RIGIDA* DA MARCA TOK DE MAR, ALGAPLUS, PORTUGAL. %VRN - VALORES DE REFERÊNCIA DO NUTRIENTE; %DDR - DOSE DIÁRIA RECOMENDADA.

2.3.3. Fermentação de macroalgas

A fermentação de macroalgas é estudada para produção de metano desde os anos 70. Em 1998, o Dr. Motoharu Uchida deu início ao estudo das fermentações lácticas e alcoólicas, através da utilização de diferentes inóculos em algas verdes, *Ulva spp.*, recorrendo ao uso de enzimas comerciais, para quebra dos diferentes polissacáridos. A fermentação durou 17 meses a uma temperatura controlada de 2 °C. (Uchida, 2014; Uchida & Miyoshi, 2013).

Um dos principais constituintes das macroalgas são hidratos de carbono, sendo a maior parte constituídos por fibras solúveis e insolúveis (MacArtain et al., 2007) Uchida (2014), refere que grande parte destas fibras são não fermentescíveis ou apresentam dificuldade de serem fermentáveis, sendo necessário recorrer à utilização de enzimas para degradação destas macromoléculas. Por outro lado, as macroalgas são ricas em açúcares armazenados com potencialidade para serem utilizados como substratos para fermentação.

Segundo Stiger-Pouvreau et al., (2016), as macroalgas são constituídas por diferentes hidratos de carbono: mono e dissacáridos (açúcares simples) onde se incluem os de baixo peso molecular e solúveis em água (glucose, galactose, fucose, manitol etc) e os polissacáridos (açúcares complexos), que se dividem em dois tipos: os homopolissacáridos (amido, celulose, laminarano etc) e os heteropolissacáridos (alginato, agar, carrageninas etc), de grande peso molecular e insolúveis em água.

MacArtain et al., (2007), argumentam que existem dois tipos de polissacáridos presentes nas macroalgas: os estruturais como a hemicelulose, e os armazenados, onde se incluem os ficocolóides como demonstra a Tabela 1. Estas fibras solúveis apresentam propriedades estabilizantes, gelificantes, emulsionantes e espessantes, com ampla utilização e importância para a formulação de produtos em diversas indústrias, mas detêm uma importância acrescida para a indústria alimentar (Cardoso et al., 2014), uma vez que conferem principalmente características físicas aos produtos (Roohinejad et al., 2017).

Zheng et al., (2020), detalham que os ficocolóides presentes nas algas castanhas são constituídos em subunidades de monossacáridos de glucose, ramnose, galactose, fucose, xilose, manose, ácido glucurónico e manurónico, enquanto a composição dos ficocolóides nas vermelhas são glucose, galactose e 3,6-anidro-galactose, e por fim nas verdes, pode-se encontrar glucose, manose, ramnose, xilose, ácido idurónico e glucurónico.

O processo de sacarificação de algas, é um passo importante para o processo fermentativo ocorrer, através da hidrólise enzimática, os polissacáridos são quebrados em monossacáridos e dissacáridos, tornando-se em açúcares simples de baixo peso molecular, disponíveis para serem utilizados como fonte de energia pela microbiota fermentativa (Uchida, 2014).

Pérez-Alva et al. (2022), referem que a fermentação de macroalgas não é diferente dos diferentes processos fermentativos existentes, onde os principais microrganismos envolvidos são fungos filamentosos e bactérias Gram-positivas (bactérias lácticas), e em estado líquido ou submersas, onde a microbiota fermentativa é principalmente constituída por leveduras e bactérias Gram-negativas (bactérias acéticas), em que o objetivo principal consiste na criação de biomassa, com valor acrescentado devido aos metabolitos primários e secundários produzidos durante os processos fermentativos (Figura 8).

Apesar de existirem diversas formas de conservação de macroalgas como a congelação e a preservação em sal, a desidratação é a mais comum. Ao ser retirada toda a água presente nas macroalgas, os microrganismos patogénicos não se desenvolvem, preservando assim o seu tempo de vida útil de prateleira (Blikra et al., 2021).

A fermentação de macroalgas para alimentação é um tópico ainda pouco explorado tanto academicamente como na indústria, mas que pode ser uma resposta para a preservação das macroalgas em fresco através da acidificação com aplicações biotecnológicas. A fermentação aumenta a biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos ativos, desenvolvimento de novos produtos que sigam as tendências alimenta-

res sustentáveis como a criação de micoproteína (Blikra et al., 2021; Reboleira et al., 2021; Salgado et al., 2021) .

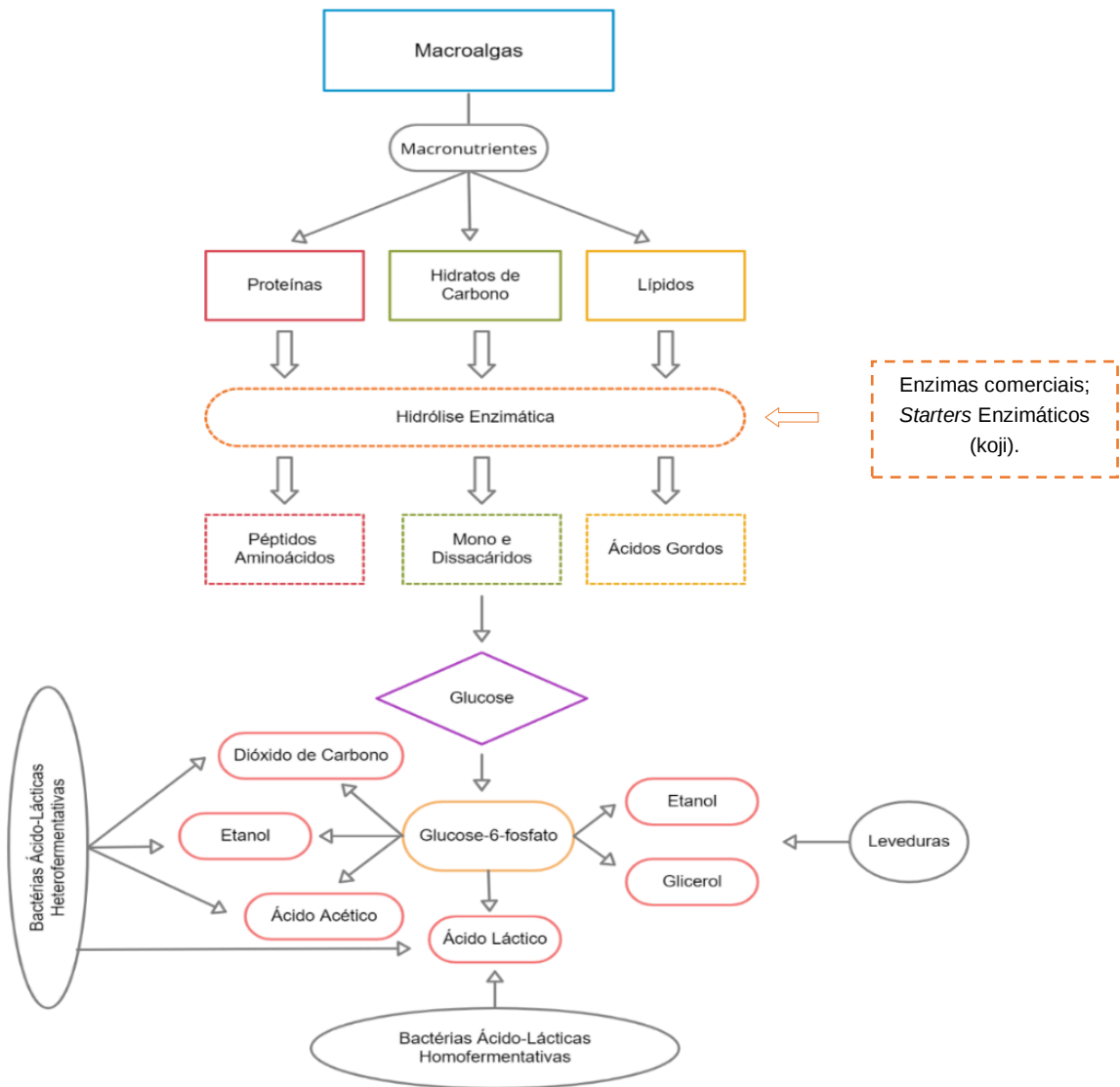


FIGURA 8 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE MACROALGAS. ADAPTADO DE REBOLEIRA ET AL., (2021) E PÉREZ-ALVA ET AL. (2022).

Materiais e Métodos

3.1. Produção de koji

3.1.1. Preparação do arroz

O substrato utilizado na preparação de koji foi arroz carolino da marca *Golden Sun* (Lidl, Alemanha), uma vez que este apresenta grandes quantidades de amilose. Primeiramente, o arroz foi lavado para remover impurezas com água corrente e deixado em imersão em água durante 24 horas, sendo coberto com um pano de forma a proteger das impurezas ambientais.

Após as 24 horas, o arroz foi lavado, cozido a vapor (100 °C) durante 30 minutos na *Bimby* (Vorwerk, Alemanha) e deixado a arrefecer. Posteriormente, foi dividido em 500 g em 2 sacos herméticos e congelados a -20 °C, até ser utilizado.

3.1.2. Inoculação e produção do koji

Para preparação do *starter* de koji, o arroz foi deixado a descongelar no frigorífico e posteriormente à temperatura ambiente para ser inoculado. Os cestos de incubação foram cobertos com gaze hidrófila. Recolheu-se o fungo *Aspergillus oryzae* de uma placa de meio PDA com 7 dias de incubação, ressuspendeu-se em 22,5 mL de água

desmineralizada estéril, obtendo-se uma concentração final entre 5×10^5 e 1×10^6 esporos por grama de arroz cozido.

Os sacos de arroz foram agitados vigorosamente de forma a homogeneizar o fungo, e em seguida o arroz foi distribuído pelos cestos de incubação e mexido com um garfo desinfetado previamente, por fim, foi tapado com a gaze e deixado a incubar à temperatura ambiente até crescimento visível do micélio que corresponde também a uma produção de aromas notória. Durante 3 dias, o arroz foi remexido duas vezes ao dia (manhã e noite) com o garfo desinfetado e borrifado com H_2O estéril desmineralizada, de forma a facilitar a propagação do fungo, homogeneizar a sua distribuição pelo arroz e permitir a libertação de calor e do vapor de água produzido pelo fungo. Após o crescimento, o koji foi armazenado em sacos herméticos e congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para parar a sua atividade e para sua conservação.

Previamente à sua utilização, procedeu-se à inativação do fungo, aplicando um tratamento térmico em estufa durante 4 horas a uma temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este processo permite a inativação do fungo *Aspergillus oryzae*, sem desnaturar as enzimas presentes (proteases, lipases e amilases) que detêm a importante função de quebrar macromoléculas complexas presentes nas algas, tornando-as biodisponíveis e bioativas, facilitando assim o crescimento da microbiota fermentativa.

3.2. Preparação do VEGarum e ensaio fermentativo

Para produção do VEGarum foram utilizadas duas espécies de macroalga (*Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, Tok de Mar, ALGApplus, Portugal) às quais foi adicionado koji com *Aspergillus oryzae* previamente inativado, água e sal marinho de acordo com as proporções indicadas na Tabela 2.

TABELA 2 - INGREDIENTES UTILIZADOS PARA PREPARAÇÃO DE DOIS VEGARUNS

<i>Palmaria palmata</i>	<i>Ulva rigida</i>
80 g de alga	40 g de alga
933 mL de H_2O estéril	900 mL de H_2O estéril
36 g de koji inativo	30 g de koji inativo
47 g de sal marinho	45 g de sal marinho

Primeiramente, foram adicionadas 282,64 mL e 259,12 mL de H₂O desmineralizada e estéril a 80 g de *Palmaria palmata* e 40 g de *Ulva rigida* desidratadas respectivamente, para reidratação durante 30 minutos. As diferentes quantidades de água adicionadas resultam da maior capacidade de absorção de água por *Palmaria palmata* e de forma a obtermos sobrenadante, adiciona-se 2x o peso da alga demolhada de H₂O desmineralizada e estéril. A quantidade de sal adicionado corresponde a 5% do peso total. Desta forma, adicionou-se à alga *Palmaria palmata* (362,64 g de alga demolhada), 570 mL de H₂O, 47 g de NaCl e 36 g de koji inativado, enquanto a *Ulva rigida* (299,12 g de alga demolhada), adicionou-se 600 mL de H₂O, 45 g de NaCl e 30 g de koji inativado. De forma a obter uma mistura homogênea e consistente, recorreu-se à utilização de uma varinha mágica para trituração.

Em seguida, os preparados de VEGarum de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida* foram colocados em balões de *Erlenmeyer*, em duplicado, identificados como A e B respetivamente, sendo colocados a fermentar em banho termostático, a 25 °C, sem agitação, durante 14 dias. O processo fermentativo ocorreu de forma espontânea e em ambiente de aerobiose, de forma a recriar as condições ambientais em que o *garum* era produzido. Ao longo do ensaio fermentativo, dos balões A foram recolhidas amostras periodicamente para posterior análise química, enquanto dos balões B foram retiradas 1 mL de amostra ao tempo 0, 7 e 14 dias do ensaio para análises microbiológicas descritas nos pontos 3.3 e 3.4. As amostras recolhidas tiveram como finalidade a observação da evolução da fermentação através da avaliação dos parâmetros pH e °Brix (teor de sólidos solúveis).

Após o término da fermentação e para posterior identificação da microbiota fermentativa, foram retirados 1 mL de cada um dos balões (A e B) de ambas as algas, colocando-se em *ependorfs* de 2 mL juntamente com glicerol a 30%, armazenando-se a -80 °C. O restante produto, foi centrifugado, armazenado a -20 °C e guardado para realização das análises químicas.

3.3. Análise da microbiota fermentativa

3.3.1. Meios de isolamento

3.3.1.1. De Man, Rogosa e Sharpe agar (MRS)

O meio MRS Agar (1960) (*Biokar*, França), foi preparado de acordo as instruções do fornecedor. As quantidades definidas e utilizadas foram: 70,3 g de meio e 1L de água desmineralizada, colocado a esterilizar na autoclave. Após esterilização, foi deixado a arrefecer a temperatura ambiente, para posterior adição de 100 ppm de ciclohexamida (*Sigma*, EUA) sendo em seguida distribuído em placas estéreis de Petri (cerca de 15 mL por placa).

3.3.1.2. Yeast peptone dextrose em agar (YPD)

O meio YPD foi preparado com 1,5% de Bactoagar (*Sigma*, EUA), 1% de extrato de levedura (*Biokar*, França), 2% de glucose (*Sigma*, EUA) e 2% de peptona (*Biokar*, França), sendo adicionado um 1L de água desmineralizada. Em seguida, foi autoclavado para dissolução do agar, homogeneização e esterilização. Após o processo de esterilização estar completo, a garrafa foi retirada do autoclave e deixada a arrefecer à temperatura ambiente até atingir aproximadamente 50 °C. Quando o meio já se encontra à temperatura desejada, adicionou-se ciclohexamida (*Sigma*, EUA) em pó, de forma a obter uma concentração final de 100 ppm, para inibição de crescimento de leveduras e bolores. Por fim, o meio foi distribuído em placas estéreis de Petri (cerca de 15 mL por placa).

3.3.2. Isolamento, plaqueamento e quantificação da microbiota fermentativa

Tendo sido realizada uma fermentação espontânea, a microbiota fermentativa é diversificada. Com o objetivo de obter e identificar os microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo para posterior caracterização procedeu-se ao seu isolamento em placa. As amostras utilizadas para este efeito, foram as mencionadas no ponto 3.2, tendo sido utilizadas a dos balões B a tempo 14, uma vez que foram sujeitas a menor manipulação, reduzindo a possibilidade de contaminação.

Foram realizadas diluições seriadas das amostras do tempo 0 e 14 do ensaio fermentativo de 10^0 a 10^{-6} a partir de 1,5 mL de amostras de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em que as diluições de 10^0 a 10^{-3} foram plaqueadas para o meio MRS, meio rico e seletivo para bactérias lácticas, enquanto de 10^{-3} a 10^{-6} foram plaqueadas no meio YPD com ciclohexamida, meio seletivo para leveduras. Ambos os meios foram plaqueados em duplicado e as placas incubadas durante 4 dias à temperatura ambiente.

3.3.3. Testes preliminares de caracterização da microbiota isolada

3.3.3.1. Caracterização macromorfológica

Após se observar crescimento de colónias, foram registadas as suas características macromorfológicas em relação ao tamanho, cor, forma, brilho e transparência, margem, relevo e consistência, em seguida, procedeu-se à contagem das colónias existentes. Foram selecionadas as colónias que macromorfológicamente se destacavam e diferenciavam, procedendo-se ao isolamento nos respetivos meios sem adição de antibiótico, por técnica de riscado em placa. Por fim, foram colocadas a incubar a uma temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 dias. Quando o crescimento foi evidente, recolheu-se biomassa das colónias e foram visualizadas ao microscópio, com ampliação máxima até 1000x, para observação das suas características micromorfológicas (tamanho, forma e mobilidade).

3.3.3.2. Teste de catalase

O teste de catalase baseia-se na presença e deteção da enzima catalase que hidrolisa peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigénio (O_2).

Numa lâmina previamente limpa, colocou-se uma porção de biomassa de uma colónia de bactérias isoladas, seguidamente adicionou-se duas gotas de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 3% (p/v) (*Wells*, Portugal), observando-se a presença ou ausência de efervescência.

3.3.3.3. Teste KOH

O teste de KOH tem como finalidade diferenciar de forma simples as bactérias Gram⁺ das Gram⁻. Quando adicionada a solução de KOH 3% (p/v) (*Merck*, Alemanha), as bactérias Gram-negativas formam um fio viscoso, uma vez que existe a destruição da parede celular e da membrana celular e libertação do material genético (DNA), enquanto com nas bactérias Gram-positivas tal processo não se verifica, devido à diferente composição e estrutura das paredes celulares.

Para realização do teste, colocou-se uma gota de KOH 3% (p/v) (*Merck*, Alemanha) numa lâmina previamente limpa, com a ajuda de uma ansa retirou-se um pouco de biomassa de uma colónia de bactérias identificadas em placa, adicionou-se à gota de KOH 3% (*Merck*, Alemanha), elevando a ansa para verificação da formação ou não de fio.

3.4. Métodos moleculares de identificação da microbiota fermentativa

3.4.1. Os princípios básicos das reações de PCR

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consiste na replicação e obtenção de múltiplas de cópias de um fragmento de DNA através de amplificação enzimática utilizando dois oligonucleotídeos (*primers*) desenhados especificamente para as regiões que são alvo de amplificação, de forma a ligarem-se com as cadeias complementares da sequência alvo, em que um dos *primers* reconhece a sequência do fragmento de DNA (*forward* ;5'-3'), enquanto o outro *primer* reconhece de forma oposta a sequência complementar (*reverse* ;3'-5') do mesmo fragmento de DNA. A *Taq* DNA polimerase é a enzima que permite a replicação da região correspondente ao espaço entre os *primers* (Kadri, 2019; Mullis, 1990; Thomas J. White et al., 1989).

Os programas de amplificação são constituídos por 3 etapas principais (Figura 9): a desnaturação, primeira etapa, em que se dá a separação das cadeias de DNA, através da quebra das pontes de hidrogénio por ação da temperatura (94 °C a 98 °C) (Kadri, 2019). O *annealing*, segunda etapa, em que as temperaturas diminuem (40 °C a 70 °C),

permitindo que os *primers* se liguem às regiões específicas das cadeias de DNA para as quais foram desenhados (Kadri, 2019) e a extensão, etapa final, que decorre a 72 °C, a Taq DNA polimerase liga-se às cadeias principais de DNA "hibridizadas" pelos *primers* e catalisa a replicação dos fragmentos (Kadri, 2019). Quando um primeiro ciclo termina, dá-se a sua repetição (entre 20 a 40 vezes), para síntese de um número suficiente de cópias de DNA para que seja analisável (Kadri, 2019).

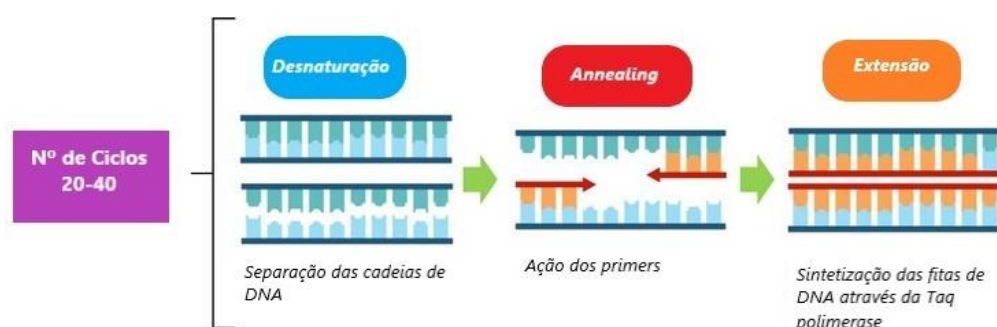


FIGURA 9 - PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA. ADAPTADO DE [HTTPS://WWW.BIOMEDICINAPADRAO.COM.BR](https://www.biomedicinapadiao.com.br).

3.4.1.1. Bactérias ácido-láticas

Primeiramente, as culturas foram previamente isoladas e colocadas a crescer em meio líquido de MRS, durante 24 horas a 30 °C. O processo de extração e purificação foi realizado com o auxílio do *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA).

3.4.1.2. Leveduras

Para extração de DNA, recorreu-se à técnica de "*boiling*", que consiste no re-bentamento das células por choque de temperatura, adaptados de Millar et al (2000) e Akada et al., (2000). Retirado com um palito estéril uma porção de biomassa de leveduras isoladas em meio YPD sólido, transferiu-se para um *ependorf* de 1,5 mL e espalhou-se bem no fundo. Em seguida, adicionou-se 30 µL de 1% (p/v) de SDS e procedeu-se à homogeneização no vortex. As amostras foram colocadas num banho de água a 100 °C durante 15 minutos, sendo em seguida centrifugadas à velocidade

de 16 000 *xg* durante 15 minutos a 4 °C, recolhendo-se o sobrenadante para a amplificação de DNA.

3.4.2. Amplificação de DNA

3.4.2.1. Bactérias ácido-láticas

Para preparação da solução mix de PCR, utilizou-se 25 µL de *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix com HF Buffer* (Thermo Fisher Scientific, EUA), 2 µL de primer Sara pA (*STABvida*) a 10 µM (*forward*) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 2 µL de primer Sara pH (*STABvida*) a 10 µM (*reverse*) (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-3') descritos por Edwards et al., (1989), 4 µL de DNA extraído e por fim 17 µL de água MiliQ, obtendo 50 µL de volume total. No tubo utilizado como controlo o DNA foi substituído por 4 µL de água MiliQ. Para realização da amplificação DNA foi utilizado o termociclador *T100* (Bio-Rad, EUA), com o programa de amplificação de PCR mencionado na Tabela 3.

TABELA 3 - PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARA BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Programa de PCR - 80 minutos - 105 °C			
Etapas	Temperatura	Duração	Número de Ciclos
1. <i>Desnaturação Inicial</i>	94 °C	5 minutos	1
2. <i>Desnaturação</i>	94 °C	30 segundos	
3. <i>Annealing</i>	56 °C	30 segundos	1
4. <i>Extensão</i>	72 °C	1 minuto	
5. <i>GOTO</i>	Passo 2		34x
6. <i>Extensão Final</i>	72 °C	5 minuto	1
	4 °C	∞	

3.4.2.2. Leveduras

Para preparação da solução mix de PCR, utilizou-se 25 µL de *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix com HF Buffer* (Thermo Fisher Scientific, EUA), 2 µL de primer ITS1 (*STABvida*) a 10 µM (*forward*) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 2 µL de primer ITS4 (*STABvida*) a 10 µM (*reverse*) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') mencionados por White et al., (1990), 4 µL de DNA extraído e por fim 17 µL de água MiliQ, obtendo 50 µL de volume total. No controlo o DNA foi substituído por 4 µL de água MiliQ.

Para realização da amplificação do DNA foi utilizado o termociclador *T100 (Bio-Rad, EUA)*, com o programa de amplificação de PCR mencionado na Tabela 4.

TABELA 4- PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARA LEVEDURAS

Programa de PCR - 217 minutos - 105 °C			
Etapa	Temperatura	Duração	Número de Ciclos
1. <i>Desnaturação Inicial</i>	94 °C	10 minutos	1
2. <i>Desnaturação</i>	94 °C	1 minuto	
3. <i>Annealing</i>	49 °C	1 minuto	1
4. <i>Extensão</i>	72 °C	1 minuto	
5. <i>GOTO</i>	Passo 2		28x
6. <i>Extensão Final</i>	72 °C	7 minuto	1
	4 °C	∞	

3.4.3. Quantificação do produto de PCR

Para análise e quantificação do produto de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose (*Lonza, Suíça*) a 0,85% (m/v) para bactérias lácticas e 1% (m/v) para leveduras, tendo sido preparado com uma solução de tampão TAE 1x e 2,5 µL/100 mL de *Green Safe (Nzytech, Portugal)*.

Após término do processo de amplificação, foram retiradas para *epperdorfs* de 1,5 mL, 10 µL de cada uma das amostras amplificadas, aos quais foram adicionados 2 µL de *Loading dye (Nzytech, Portugal)*. No poço ao centro do gel foram adicionados 5 µL de solução com NZYDNA Ladder I (*Nzytech, Portugal*) e aos restantes poços 12 µL de cada uma das amostras anteriormente mencionadas. A electroforese das amostras foi realizada durante cerca de 60 minutos a 70 V (*Power PAC 300, Bio-Rad, EUA*). O gel foi observado por ultravioleta através do equipamento *Clear View UV Transilluminator (Cleaver Scientific Ltd, Reino Unido)*.

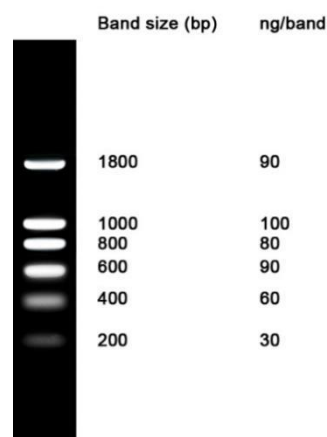


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO TAMANHO DAS BANDAS (EM PARES BASES) ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE , CORRESPONDENTES AO NZYDNA LADDER I (NZYTECH, PORTUGAL).

3.4.4. Purificação e sequenciação

O processo de purificação recorreu-se à utilização do *kit* purificação de *DNA Wizard R SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA). A sequenciação foi realizada pelo laboratório STABVida (Lisboa, Portugal), utilizando os primers ITS 1 e 4 (*STABvida*) para as leveduras, e Sara pH e pA (*STABvida*) para bactérias ácido-lácticas. O método utilizado para sequenciação do DNA amplificado foi o Sanger (1977) . Para identificação dos microrganismos, recorreu-se à plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

3.5. Análise da composição química

3.5.1. Preparação das amostras

Para se analisar os seguintes parâmetros físico-químicos e nutricionais, primeira-mente recorreu-se à centrifugação, a 4 °C, durante 15 minutos, a 16 000 *xg*, das amostras correspondentes ao dia 0 e 14 dos balões A uma vez que os produtos VEGarum são os sobrenadantes resultantes das fermentações das algas *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*.

3.5.2. Acidez titulável

A determinação da acidez titulável (Tyl & Sadler, 2017) foi realizada em 0,5 mL de sobrenadante resultante do processo de preparação mencionado no ponto 3.5.1.

A amostra recolhida foi diluída em 50 mL de H₂O desmineralizada, titulando-se com uma solução de 0,01 N de hidróxido de sódio (NaOH) (*Merck*, Alemanha), sendo a titulação controlada através do eletrodo de pH (*Broadley Jones Corporation*, EUA) ligado ao potenciômetro (*pHM92 Lab pH Meter, Radiometer*, Dinamarca), medindo-se continuamente até atingir 8,15 de pH. A acidez titulável foi expressa em equivalentes de ácido láctico (C₃H₆O₃) (*BDH*, UAE).

3.5.3. Análise do sobrenadante por HPLC

A determinação de ácidos orgânicos, açúcares, etanol e glicerol foi realizada por análise em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Procedeu-se à centrifugação (4 °C, 15 minutos, 16 000 *xg*) dos sobrenadantes mencionado no ponto 3.5.1., para obter o sobranço mais límpido possível. Primeiramente, foi realizada uma diluição na proporção de 1:2 com solução de H₂SO₄ a 50mM (*BDH*, UAE), centrifugou-se (20 °C, 5 minutos, a 16 000 *xg*). As amostras voltaram a ser diluídas na proporção de 1:10 com a solução anteriormente mencionada, sendo novamente centrifugadas (20 °C, 5 minutos, a 16 000 *xg*). Por fim, filtrou-se utilizando uma membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro (*Merck*, Alemanha).

Foram efetuadas retas de calibração para ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico e ácido glutâmico), açúcares (glucose e maltose), etanol e glicerol, em diferentes concentrações entre 0 e 2,5 g/L (Anexo I). As soluções padrão e amostras foram analisadas no sistema de HPLC da Hitachi (Japão), equipado com um detetor de Índice de Refração 5450 para detecção de açúcares, glicerol e etanol, um detetor UV-VIS 5420 para análise de ácidos ligados a uma Coluna de Exclusão Iônica 5310 (*Rezex™ ROA Organic Acid H+ (8 %) column, 300 × 7,8 mm, Phenomenex, USA*), ao *Auto Sampler* 5260 e a Bomba de Injeção 5160. A temperatura utilizada para análise foi de 65 °C. Foram injetadas 20 µL de amostra e foi utilizado H₂SO₄ a 5 mM como fase móvel.

3.5.4. Compostos fenólicos

3.5.4.1. Compostos fenólicos totais

A determinação dos teores de fenóis totais foi realizada de acordo com o método descrito por Thaipong et al., (2006) com alterações. Foi realizada uma extração dos sobrenadantes em CH₃OH (*Merck*, Alemanha) na proporção de 1:5 para *Ulva rigida* e 1:10 para *Palmaria palmata* fazendo 1 mL total, em triplicado, durante 1 hora, a 25 °C. Devido à precipitação dos polissacáridos presentes, as amostras foram centrifugadas (4 °C, 15 minutos, 16 000 *xg*).

A tubos de ensaio foram adicionados 150 µL de amostra extraída, 2,4 mL de H₂O desmineralizada e 140 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* (1927) (*BDH*, UAE), reagindo durante 3 minutos, em seguida foram adicionados 300 µL de Na₂CO₃ (*AnalaR*, UAE) a 10% (m/v), deixando-se reagir por 2 horas, à temperatura ambiente, em ambiente totalmente escuro, protegido da luz. Após o tempo de reação, as absorvâncias das amostras foram medidas a 725 nm no espectrofotômetro (*UV-visível Biochrom Libra S22, 190-1100nm*, Biochrom, Reino Unido), utilizando H₂O desmineralizada como branco. A reta de calibração utilizada expressou-se em concentração de ácido gálico (C₇H₆O₅) (*Sigma*, EUA), utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 200 mg/mL (Anexo II).

3.5.4.2. Fenóis solúveis

Para determinação dos teores de fenóis solúveis em água (Bunzel & Schendel, 2017) foram realizadas extrações dos sobrenadantes na proporção de 1:6 com H₂O MiliQ, em triplicado. A absorvância foi medida por espectrofotometria a 280 nm em *cuvette* de quartzo (*ultra Micro 10 mm Fo3, Hellma, Merck*, Alemanha) (Espectrofotômetro *UV-visível Biochrom Libra S22, 190-1100nm*, Biochrom, Reino Unido). A reta de calibração utilizada expressou-se em concentração de ácido gálico (C₇H₆O₅) (*Sigma*, EUA) utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 0,12 mg/mL (Anexo II).

3.5.5. Flavonoides

O teor total de flavonoides (TFC) foi determinado através do método adaptado de Barroso et al., (2011). As amostras foram analisadas em triplicado.

Em tubos de ensaio de 10 mL, adicionou-se 1 mL de sobrenadante e 600 µL de solução NaNO₂ (*AnalAR*, UAE) a 5% (m/v) (deixou-se reagir por 5 minutos, na ausência de luz). Em seguida, adicionou-se 600 µL de solução AlCl₃·6H₂O (*Merck*, Alemanha) a 10% (m/v) repetindo o passo anteriormente mencionado. Por fim, adicionou-se 40 µL de solução NaOH (*Merck*, Alemanha) a 4% (1 mol/L), deixando-se reagir por 2 minutos e completou-se o volume dos tubos de ensaio com 48 µL de água MiliQ. A absorvância foi medida por espectrofotometria (*Cary Series UV-Vis spectrophotometer*, *Agilent Technologies*, EUA) a 510 nm com CH₃OH (*Merck*, Alemanha), e o branco utilizado foi H₂O. Foi ainda realizada uma reta de calibração expressa em concentração de quercetina (C₁₅H₁₀O₇) (*Sigma*, EUA) utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 5000 ppm (Anexo II).

3.5.6. Potencial antioxidante

3.5.6.1. DPPH

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada pelo método de neutralização do radical livre *2,2-difenil-1-picril-hidrazil* (C₁₈H₁₂N₅O₆) (*TCI*, EUA), realizada com as adaptações descritas por Brand-Williams et al.,(1995). Primeiramente, foi realizada uma extração das amostras em CH₃OH (*Merck*, Alemanha) na proporção de 1:10 para *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, em triplicado, durante 1 hora, a 25 °C, na ausência de luz. Devido à precipitação dos polissacáridos presentes nas amostras, recorreu-se à centrifugação das mesmas (4 °C, 15 minutos, 16 000 *xg*).

A solução de DPPH (103,5 µM) foi preparada com 4,08 mg de DPPH e 100 de mL CH₃OH (*Merck*, Alemanha). Em tubos de ensaio de 10 mL, adicionaram-se 100 µL de amostra extraída e 3,9 mL de solução de DPPH, em triplicado, deixando-se reagir durante 60 minutos, à temperatura de 25 °C, em ambiente escuro. As absorvâncias dos produtos de reação das amostras com o DPPH foram medidas por espectrofotometria (Espectrofotómetro *UV-visível Biochrom Libra S22, 190-1100nm*, Biochrom, Reino Uni-

do) a 517 nm utilizando solução de DPPH como branco do método, e CH₃OH (*Merck*, Alemanha) como branco do espectrofotómetro. A reta de calibração utilizada expressou-se em concentração de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) (*Sigma*, EUA), utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 150 µg/mL (Anexo II).

3.5.6.2. FRAP

Para determinação da capacidade antioxidante recorreu-se ao método FRAP descrito por Benzie & Strain (1996) com adaptações. O método FRAP (*2,4,6- Tri(2-pyridyl)-1,3,5- triazine*) (*Ferric Redution Antioxidant Power*) tem como objetivo a medição da capacidade antioxidante através da redução do complexo Fe³⁺ a Fe²⁺, a pH reduzido.

Em tubos de ensaio de 10 mL, adicionou-se 90 µL de sobrenadante, 270 µL de H₂O desmineralizada e 2,7 mL de reagente FRAP (*Alfa Aesar*, EUA), deixando-se reagir durante 30 minutos, a 37 °C, em ambiente escuro. A absorvância foi lida a 595 nm por espectrofotometria (Espectrofotómetro *UV-visível Biochrom Libra S22, 190-1100nm*, Biochrom, Reino Unido), o branco utilizado foi H₂O desmineralizada. A reta de calibração utilizada expressou-se em concentração de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) (*Sigma*, EUA), utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 150 µg/mL (Anexo II).

3.5.7. Proteínas

3.5.7.1. Proteína total

O teor de proteína total foi determinado através do analisador *NDA 702 Dual Carrier Gas DUMAS Nitrogen Analyser* (*VELP Scientifica*, Itália), de acordo com o método Dumas. Após transferidas as amostras para a câmara de combustão, estas queimam na presença de catalisadores e de oxigénio atmosférico a 1030 °C, permitindo a libertação de óxido de Azoto (NO_x). Na superfície de redução, é removido todo o oxigénio, sendo o gás produzido convertido a azoto (N₂). Após remoção do CO₂ e H₂O é quantificado através de um detetor de condutividade térmica.

Primeiramente, pesou-se 100 µL de cada sobrenadante, em folhas de papel alumínio, em triplicado, adicionando-se entre 46 e 49 mg de pó absorvente de humidade

(VELP Scientifica, Itália) formando uma pasta. O teor de azoto foi quantificado através de um detetor de condutividade térmica, utilizando EDTA como padrão de calibração para o azoto. Os teores de azoto são multiplicados pelo fator de conversão geral de 6,25 (Mæhre et al., 2018).

3.5.7.2. Proteínas solúveis

Para determinação dos teores de proteínas solúveis (Chang & Zhang, 2017), recorreu-se ao reagente de *Bradford* (1976) (*Sigma*, Alemanha), tendo sido realizadas diluições dos sobrenadantes na proporção de 1:6 com H₂O MiliQ, em triplicado. Em seguida, em tubos de ensaio de 10 mL, adicionou-se 500 µL de sobrenadante diluído com 500 µL com o reagente de *Bradford*, deixando-se reagir durante 1 minuto. A absorbância foi lida a 595 nm por espectrofotometria (Espectrofotómetro *UV-visível Biochrom Libra S22, 190-1100nm*, Biochrom, Reino Unido). A reta de calibração utilizada expressou-se em concentração de albumina bovina (*Sigma*, EUA), utilizando soluções padrão com concentrações entre 0 e 35 µg/mL. (Anexo II).

3.5.8. pH

Durante a ocorrência dos ensaios fermentativos, foi realizada a medição diária, em triplicado, dos pH (Tyl & Sadler, 2017) dos sobrenadantes dos balões A com auxílio do eletrodo de pH (*Broadley Jones Corporation*, EUA) ligado ao potenciômetro (*pHM92 Lab pH Meter, Radiometer*, Dinamarca). Para calibração do equipamento foram utilizadas soluções tampão com valores de 4 e 7 de pH (*Sigma*, EUA).

3.5.9. Teor de sólidos solúveis

Aquando da ocorrência dos ensaios fermentativos, o °Brix (Mauer & Bradley, 2017) foi analisado diariamente com auxílio do refratômetro digital (*Hanna - HI96801, Hanna Instruments*, EUA). As amostras (não centrifugadas) foram medidas em triplicado.

3.6. Análise sensorial

As provas de análise sensorial dos VEGaruns de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, têm como finalidade, aferir a aceitabilidade por parte do público em geral. O questionário de análise sensorial (Anexo I) encontra-se dividido em 3 partes: dados gerais de identificação (sexo e idade), 3 questões alusivas aos hábitos alimentares que remetam para os produtos e 2 testes de aceitação das amostras, onde são avaliadas as diferentes características organoléticas. Para classificação de cada parâmetro organolético descrito, apreciação global e intenção de compra, foi utilizada uma escala hedônica de cinco níveis (Nora, 2021). De forma a tornar a análise mais detalhada, foi solicitado aos provadores para identificassem os aromas e sabores.

As provas foram realizadas em ambiente informal. O painel foi composto por 40 provadores não treinados, 28 do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idades compreendidas entre 20 e 63 anos. Os questionários foram preenchidos em formato digital através de um código Qr (Anexo I). A cada provador foi atribuído 1 copo de água, duas pipetas de Pasteur descartáveis, uma placa de Petri pequena com identificação das amostras, 2 *croûtons* para acompanhar com os temperos e 1 guardanapo, durante a prova os provadores usaram como limpa-palato água entre amostras. Foram ainda fornecidas folhas brancas para apreciação da cor e as amostras foram servidas à temperatura ambiente, em frascos de vidro transparentes identificados com os códigos com duas letras e um número, sendo FX1 para *Palmaria palmata* e NF3 para *Ulva rigida*.

3.7. Tratamento estatístico

Para efeitos de tratamento estatístico, foram calculadas as médias e respetivos desvios padrões para os resultados dos parâmetros de evolução do processo fermentativo, consumo de açúcares e produção de metabolitos, caracterização química e análise sensorial. O programa de análise estatística utilizado para aferir as diferenças significativas (ANOVA) entre variáveis foi o *Prism 5* (GraphPad Software, Inc.), recorrendo-se ao teste T para comparação de duas variáveis com um grau de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

Resultados e Discussão

4.1. Quantificação e caracterização da microbiota fermentativa autóctone

4.1.1. Tempo inicial - amostra dia 0

Com o objetivo de quantificar e identificar a microbiota fermentativa presente nas macroalgas *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, envolvida no processo fermentativo espontâneo dos VEGaruns, foram recolhidas amostras ao dia 0 (corresponde ao tempo inicial), ao dia 7 (tempo intermédio da fermentação) e dia 14 (tempo final). Como mencionado no ponto 3.2, foram realizadas diluições seriadas e respetivos plaqueamentos em meios seletivos para bactérias lácticas e leveduras.

Nas placas com as amostras diluídas correspondentes ao dia 0, não foram realizadas contagens de colónias, uma vez que apenas uma placa (10^{-1}) de *Palmaria palmata* apresentava colónias suficientes para realização da contagem, assim sendo, procedeu-se apenas à realização dos métodos preliminares de caracterização descritos no ponto 3.3.3, observação por microscópio e respetiva identificação por métodos de identificação molecular.

Para *Palmaria palmata*, foram identificadas cerca de 16 colónias de bactérias, das quais 9 foram isoladas, tendo sido agrupadas pelas suas características macromorfológicas relevantes como descritas na Tabela 5 e exemplificada na Figura 11, procedendo-

se à observação das características micromorfológicas ao microscópio. Após a realização dos testes de KOH e catalase, verificou-se que apenas 4 colónias de bactérias tiveram como resultados Gram positivas com catalase negativa, sendo excluídas as que tiveram resultados positivos para a presença de catalase por não serem consideradas relevantes para o presente trabalho.

No caso de *Ulva rigida*, a diversidade de colónias identificadas em placa foi menor, observando-se que apenas 7 colónias detinham características macromorfológicas distintas (Tabela 6), e procedendo-se ao seu isolamento. Todas as colónias isoladas foram submetidas aos testes de catalase e KOH, tendo sido obtidos como resultados, Gram positivas e catalase negativas para todas.

TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA CORRESPONDENTES AO DIA 0 DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.

Caracterização Macromorfológica								
Colónia ²	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
LBTOPP4	10 ⁻¹	Pequenas/Médias	Acinzentada	Amorfa	Brilhante e opaca	Inteira	Sem relevo	Firme
LBTOPP7	10 ⁻¹	Médias	Acinzentada	Redonda	Opaca e transparente	Inteira	Relevo ao centro	Firme
LBTOPP8	10 ⁻¹	Pequenas/Médias	Acinzentada	Redondas	Brilhante e opaca	Inteira	Formam rebordos	Firme
LBTOPP10	10 ⁻¹	Grande	Castanha	Amorfa	Opaca e transparente	Amorfa	Rebordos	Firme

² LBTOPP – *Lactic Bacteria Time 0 Palmaria palmata*

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÔNIAS ISOLADAS EM ULVA RIGIDA CORRESPONDENTES AO DIA 0 DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.

Caracterização Macromorfológica								
Colônia ³	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
LBT0UR1	10 ⁻¹	Pequenas	Branças	Redondas	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme
LBT0UR2	10 ⁻¹	Pequena	Branca	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme
LBT0UR3	10 ⁻¹	Médias	Acastanhadas	Redondas	Opacas e brilhante	Inteira	Formam rebordos	Firme
LBT0UR4	10 ⁻¹	Pequenas	Branças	Redondas	Brilhante e opaca	Inteira	Sem relevo	Firme
LBT0UR5	10 ⁻¹	Pequenas/Médias	Branças	Redondas (rebordos ondulados)	Brilhantes e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme
LBT0UR6	10 ⁻¹	Pequenas	Acinzentada	Amorfa	Opaca	Amorfa	Sem relevo	Firme
LBT0UR7	10 ⁻¹	Pequenas	Branças	Redondas	Brilhante e transparente	Inteira	Convexa	Viscosa



FIGURA 11 - DIVERSIDADE DE COLÔNIAS EM MEIO MRS, RESULTANTES DO PLAQUEAMENTO DA AMOSTRA 0 DE *PALMARIA PALMATA*.

³ LBT0UR – *Lactic Bacteria Time 0 Ulva rigida*

4.1.2. Tempo intermédio - amostra dia 7

Relativamente às placas das amostras diluídas correspondentes ao dia 7, realizou-se contagens (30 a 300 UFC/placa), observação e registo das características macromorfológicas das diferentes colónias. Apenas as que apresentavam características distintas nas placas de diferentes diluições foram catalogadas e isoladas, procedendo-se à identificação de espécie por métodos de identificação moleculares.

Para a alga *Palmaria palmata*, obteve-se a presença de 9 colónias isoladas em meio MRS de bactérias ácido-lácticas ou de outras espécies de bactérias, e apenas 3 de leveduras macromorfolologicamente descritas nas Tabelas 7 e Tabela 8, para as colónias isoladas nos meios mencionados no ponto 3.3.1.

TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.

Caracterização Macromorfológica								
Colónia ⁴	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
LBPAE1	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³	Pequenas	Branca	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Viscosa
LBPAE2	10 ⁻¹	Médias	Acinzentada	Redonda	Brilhante	Inteira	Sem relevo	Firme
LBPAE3	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³	Muito pequenas	Branca	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme
LBPAE4	10 ⁻² ; 10 ³	Pequenas	Branca	Redonda	Brilhante e opaca	Inteira	Sem relevo	Viscosa
LBPAE5	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³	Pequenas	Amarelada	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Convexa	Firme
LBPAE6	10 ⁻¹	Médias	Amarelada	Amorfa	Brilhante e opaca	Amorfa (ondulada)	Convexa	Firme
LBPAE7	10 ⁻³	Pequena	Branca	Redonda	Brilhante	Inteira	Convexa	Viscosa
LBPAE8	10 ⁻¹	Grandes	Acastanhada	Redonda	Brilhante e opaca	Amorfa (onduladas)	Sem relevo	Firme

⁴ LBPAE – *Lactic Bacteria Palmaria Aerobic*

TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÓNIAS ISOLADAS EM PALMARIA PALMATA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO YPD.

Caracterização Macromorfológica								
Colónia ⁵	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
YPAE1	10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	Médias/Grandes	Branca	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Cone	Firme
YPAE2	10 ⁻⁵	Médias	Amareladas	Redonda	Baça e opaca	Inteira (Ondulada)	Cone	Firme
YPAE3	10 ⁻⁴	Médias/Grandes	Amareladas	Redonda	Baça e transparente	Inteira	Cone	Firme

A partir das colónias isoladas, foi recolhida biomassa para realização dos testes de fenótipo descritos no ponto 3.3.3. Para todas as colónias isoladas em meio MRS, a partir da amostra de fermentação de *Palmaria palmata*, o teste de KOH 3% (p/v) revelou-se negativo, ou seja, não existiu formação de fio resultante da rutura celular e libertação do material genético (DNA), podendo-se concluir que as bactérias das colónias isoladas são todas Gram positivas. No caso do teste de catalase, não foi observado efervescência após a aplicação da gota de peróxido de hidrogénio, indicador da hidrólise do H₂O₂, indicando assim que todas as colónias isoladas são catalase negativa, ou seja, são possivelmente bactérias ácido-lácticas.

Para *Ulva rigida*, registaram-se apenas seis colónias de bactérias em meio MRS e seis leveduras (Tabela 9 e Tabela 10). Reproduziu-se o mesmo processo para os testes de fenótipo como mencionado anteriormente, tendo sido recolhida biomassas de todas as colónias isoladas em meio MRS. O resultado do teste KOH 3% (p/v) foi negativo, ou seja, não existiu formação de fio resultante da rutura celular de DNA e extração do material genético (DNA), indicador de que todas as colónias são Gram positivas.

O teste de catalase revelou que todas as colónias são catalase negativa, uma vez que não foi observada a formação de efervescência após a adição da gota de peróxido de hidrogénio, indicador da hidrólise do H₂O₂.

Por fim, as placas correspondentes às amostras do tempo 14, não apresentaram qualquer tipo de crescimento visível de colónias.

⁵ YPAE – Yeast *Palmaria Aerobic*

TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÔNIAS ISOLADAS EM ULVA RÍGIDA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO MRS.

Caracterização Macromorfológica								
Colônia ⁶	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
LBUAE1	10 ⁻¹	Pequenas/Médias	Branca	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme
LBUAE2	10 ⁻¹ 10 ⁻²	Grandes	Amarelada	Redonda	Brilhante e opaca	Inteira	Convexa	Firme
LBUAE3	10 ⁻²	Médias/Grandes	Bege	Redonda	Brilhante	Inteira	Convexa	Viscosa
LBUAE4	10 ⁻³	Pequenas	Branca	Redonda	Brilhante	Inteira	Convexa	Firme
LBUAE5	10 ⁻²	Pequenas/Médias	Esbranquiçada	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Viscosa
LBUAE6	10 ⁻³	Pequenas/Médias	Branca	Redonda	Brilhante e transparente	Inteira	Sem relevo	Firme

TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DAS PRINCIPAIS COLÔNIAS ISOLADAS EM ULVA RÍGIDA APÓS 7 DIAS DE FERMENTAÇÃO, EM MEIO YPD.

Caracterização Macromorfológica								
Colônia ⁷	Diluição	Tamanho	Cor	Forma	Brilho e Transparência	Margem	Relevo	Consistência
YUAE1	10 ⁻⁴	Médias	Branca	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme
YUAE2	10 ⁻⁴	Médias	Bege	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme
YUAE3	10 ⁻⁴	Médias	Bege	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme
YUAE4	10 ⁻⁴	Médias	Bege	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme
YUAE5	10 ⁻⁴	Médias	Amarelada	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme
YUAE6	10 ⁻⁴	Pequenas	Amarelada	Redonda	Baça e opaca	Inteira	Convexa	Firme

4.2. Identificação da microbiota

4.2.1. Tempo inicial - amostra dia 0

Através dos métodos de identificação molecular, podemos aferir que ao tempo inicial (dia 0), bactérias do gênero *Bacillus* estão presentes em ambas as algas, como demonstram as Tabelas 11 e 12, contrariando os resultados obtidos nos testes de catalase. A fraca efervescência após a adição do peróxido de hidrogênio, indicador da hidrólise do H₂O₂, levaram a concluir que, possivelmente, seriam bactérias ácido-láticas.

⁶ LBUAE – *Lactic Bacteria Ulva Aerobic*

⁷ YUAE – *Yeast Ulva Aerobic*

Ainda assim, confirma-se que na microbiota inicial para *Ulva rigida* estão presentes bactérias-láticas da espécie *Levilactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*, que se encontram envolvidas no processo fermentativo como discutido no ponto 4.2.2.1.

TABELA 11 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS AO DIA 0 PARA *PALMARIA PALMATA*.

<i>Palmaria palmata</i>			
Colónia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
LBTOPP4	<i>Bacillus tropicus</i>	MCCC 1A01406	99,91%
LBTOPP7	<i>Bacillus proteolyticus</i>	MCCC 1A00365	100%
LBTOPP8	<i>Bacillus proteolyticus</i>	MCCC 1A00365	100%
LBTOPP10	<i>Bacillus cereus</i>	IAM 12605	96,01%

TABELA 12 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS AO DIA 0 PARA *ULVA RIGIDA*.

<i>Ulva rigida</i>			
Colónia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
LBT0UR1	<i>Bacillus wiedmannii</i>	FSL W8-0169	100%
LBT0UR3	<i>Bacillus proteolyticus</i>	MCCC 1A00365	99,02%
LBT0UR4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	98%
LBT0UR5	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	97,01%
LBT0UR7	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,27%

As bactérias do género *Bacillus* spp. fazem parte da microbiota autóctone de algas, principalmente em algas desidratadas, uma vez que este género de bactérias detém a capacidade de formar endósporos, fenómeno que acontece quando as células vegetativas são expostas a condições desfavoráveis, não propícias à sua reprodução, como por exemplo temperatura, pH ácidos, grandes concentrações de sal, baixa atividade da água, como acontece com as algas desidratadas. Os endósporos representam uma forma de resistência de *Bacillus* spp., uma vez que têm a capacidade de resistir condições adversas, no caso das algas, quando se procede à sua reidratação, estão a ser fornecidas condições de esporulação que darão origem a novas células vegetativas (del Olmo et al., 2018; Lacasse, 2000a; Løvdal et al., 2021).

Como seria de esperar, bactérias ácido-láticas (*Levilactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*), como apresentado na Tabela 12, também se encontram na microbiota autóctone, apesar de apenas se terem conseguido identificar para a alga *Ulva rigida*, podendo concluir-se, que possivelmente as bactérias ácido-láticas, não são a microbiota dominante, uma vez que ao tempo 0, ainda não se encontram reunidas as condições para a sua reprodução e dominância (Uchida et al., 2004).

4.2.2. Tempo intermédio - amostra dia 7

4.2.2.1. Bactérias ácido-láticas

Após a corrida do gel de eletroforese, foram observadas bandas entre 1800 (pb) e 1000 (pb) para todos os produtos de PCR resultantes do processo de amplificação (Figura 10). As bandas marcadas como demonstra a Figura 13, tem cerca de 1500 (pares de bases). Os *primers* durante o processo de amplificação, utilizam as regiões conservadas 16S, 23S e 5S, para amplificar as regiões não conservadas variáveis em 16S, permitindo a distinção entre as espécies de bactérias (Lavrinienko et al., 2021). O *primer* pA (*forward*) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') realiza o *annealing* das zonas 8-28, enquanto o *primer* pH (*reverse*) (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-3') realiza das zonas 1542-1522 do gene (Edwards et al., 1989).

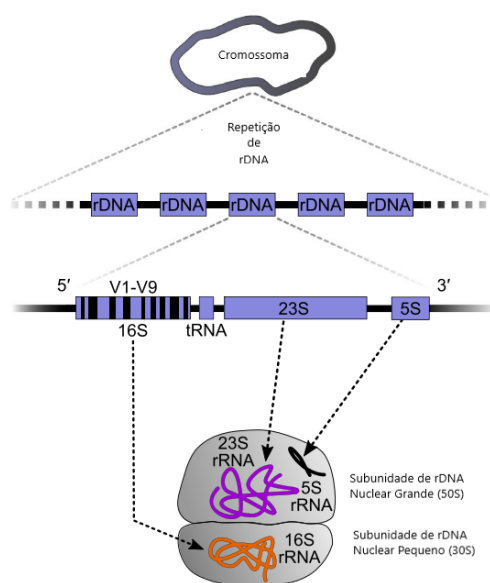


FIGURA 12 - AMPLIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE rDNA DE BACTÉRIAS. ADAPTADO DE LAVRINIENKO ET AL., (2021).

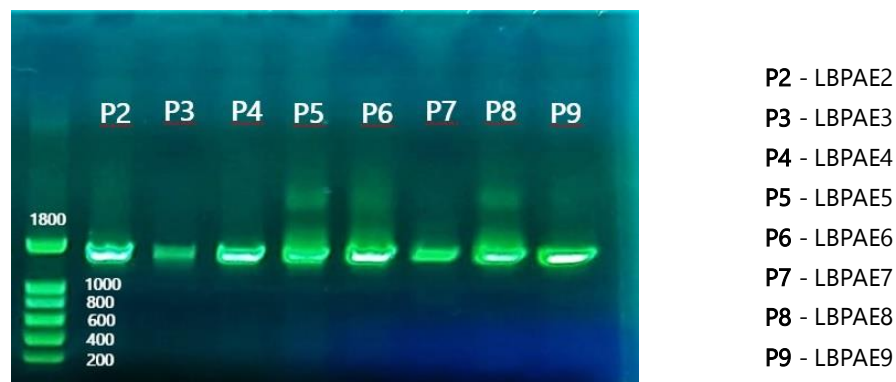


FIGURA 13 - GEL DE ELETROFORESE COM BANDAS (PB) DE DNA AMPLIFICADO PARA AS AMOSTRAS IDENTIFICADAS EM *PALMARIA PALMATA*.

Para ambas macroalgas foram identificadas duas espécies de bactérias ácido-lácticas hetero e homofermentativas: *Levilactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*, respectivamente como se demonstra nas Tabelas 13 e 14, levando a concluir que as populações destas dominam face às inicialmente identificadas. O sal desempenha um papel importante na seleção destas populações, uma vez que as bactérias ácido-lácticas são tolerante a concentrações de sal até 5% (Altieri et al., 2017).

Em *Palmaria palmata*, foi identificada uma bactéria não láctica, *Lysinibacillus macroides*, como demonstra a Tabela 13. Apesar da sua origem ser incerta, possivelmente é proveniente das rações utilizadas para alimentação dos peixes em regime de aquacultura, uma vez que é utilizada como probiótico adicionado (Mani et al., 2021). Estas bactérias são Gram-positiva formadoras de esporos, podendo sobreviver a condições extremas como temperaturas elevadas ou temperaturas de armazenamento, suco gástrico produzida pela biliar, passando intacta pelo trato digestivo dos peixes intacta, propriedades antimicrobianas que permitem a preservação das rações alimentícias para aquacultura (Mani et al., 2021).

TABELA 13 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS EM *PALMARIA PALMATA*.

<i>Palmaria palmata</i>			
Colônia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
LBPAE2	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,63%
LBPAE3	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,36%
LBPAE4	<i>Lysinibacillus macroides</i>	LMG 18474	99,28%
LBPAE5	<i>Lysinibacillus macroides</i>	LMG 18474	99,18%
LBPAE6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	99,64%
LBPAE7	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,81%
LBPAE8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	91,34%
LBPAE9	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,54%

Levilactobacillus brevis, pertence ao grupo de bactérias ácido-lácticas, Gram-positiva e catalase negativa, que se apresenta em forma de cocos ou bastonetes, não forma esporos (Feyereisen et al., 2019). O seu crescimento ótimo dá-se aos 30 °C e a gama de pH's varia entre os 4 e os 6 (Feyereisen et al., 2019; R. Hutkins, 2006). Heterofermentativa obrigatória, produz ácido-láctico, dióxido de carbono, ácido acético e ou etanol (Feyereisen et al., 2019; Teixeira, 2014). Fermenta glucose, frutose, maltose, lactose, sucrose entre outros, mas dentro da espécie pode existir variações dos açúcares (R. Hutkins, 2006; Teixeira, 2014).

Esta bactéria pode ser encontrada em diferentes ambientes como leite, vegetais, cereais, silagem, mas principalmente em alimentos fermentados resultantes de fermentações lácticas como *sauerkrauts* e pickles, uma vez que tolera pequenas quantidades de sal, enquanto aos queijos maturados é uma das responsáveis por conferir *flavours* e textura (Goldstein et al., 2015; R. Hutkins, 2006; Singh et al., 2020). A sua capacidade de produzir compostos bactericidas, que conferem a segurança aos alimentos fermentados, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos patogénicos, é reconhecida como GRAS e probiótica, devido à presença na microbiota intestinal humana e alimentos fermentados (Feyereisen et al., 2019; Singh et al., 2020; Teixeira, 2014).

TABELA 14 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS EM *ULVA RIGIDA*.

<i>Ulva rigida</i>			
Colônia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
LBUAE2	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,91%
LBUAE3	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,91%
LBUAE4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	97,48%
LBUAE5	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	97,01%
LBUAE6	<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,54%

Pediococcus pentosaceus, pode ser encontrada e isolada de diferentes ambientes como alimentos fermentados de fermentações espontâneas, produtos de alimentos aquáticos, peças de animais crus, produtos derivados de plantas, onde contribui para a potencialização de *flavours* (Jiang et al., 2021). Tal como o nome indica tem o aspeto de cocos, é homofermentativa, anaeróbia facultativa e detém características metabólicas de degradação de hidratos de carbono. A estirpe *Pediococcus pentosaceus* DSM 16,244 é aprovada e utilizada na formulação de rações animais (Jiang et al., 2021), sendo utilizada como probiótico em ração para alimentações de peixes (Gong et al., 2019). Pela capacidade de produzir bacteriocinas, mais concretamente pediocinas, confere capacidades de conservação e preservação contra patogénicos (Jiang et al., 2021).

4.2.2.2. Leveduras

Como White et al.,(1990), descreveram durante o processo de amplificação os primers ITS, utilizam as regiões conservadas 18S, 5,8S e genes de rRNA da região 25S-28S, para amplificar as regiões variáveis não codificadas entre 18S e 25S, possibilitando assim a distinção ao nível da espécie. O primer ITS1 (*forward*) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') liga-se ao gene 18S, e o primer ITS4 (*reverse*) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') liga-se ao início do gene 25S, amplificando as regiões entre estas, onde se inclui a região de rDNA 5,8S, como demonstra a Figura 14.

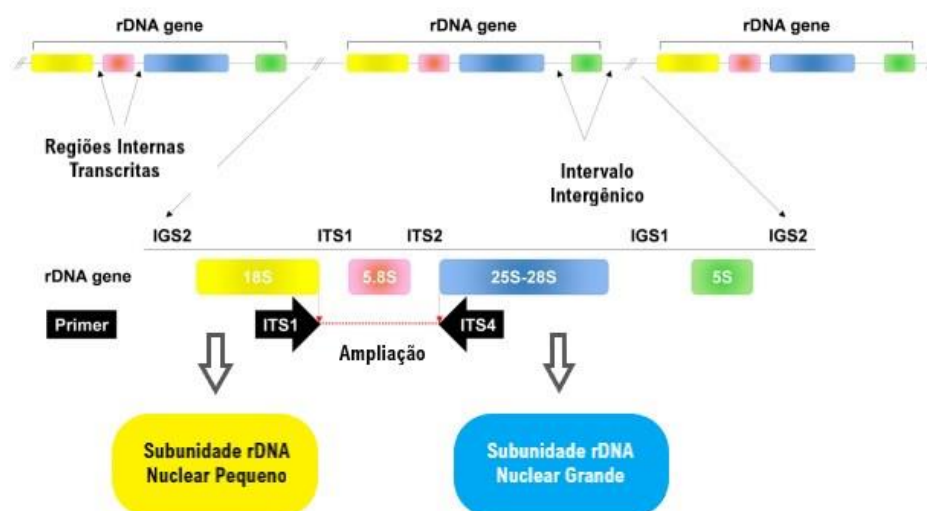


FIGURA 14 - AMPLIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE rDNA EM FUNGOS COM AS REGIÕES ITS AMPLIFICADAS (ITS1, 5.8S E ITS2) COM OS PRIMERS ITS1 E ITS4. ADAPTADO DE BOUQUELLAH (2019).

Após a eletroforese, foram observadas bandas (Figura 10) com tamanhos entre 400 (pb) e 900 (pb) para os produtos de PCR resultantes do processo de amplificação. Foram identificadas duas espécies diferentes para ambas as algas como demonstram as Tabelas 15 e 16.

Wickerhamomyces anomalus ou *Pichia anomala*, foi levedura dominante em ambas as algas, apresentou uma banda com cerca de 600 pb (Figura 10). Heterotática, encontra-se espalhada pela natureza (Kurtzman, 2011b), tendo sido isolada de diversos ambientes como plantas, alimentos salgados e ambientes marinhos (Walker, 2011), é comumente encontrada em alimentos e bebidas fermentadas resultantes de fermentações espontâneas (Passoth et al., 2006). Esta espécie tem a capacidade de resistência a diferentes pH's (2,0-10,0), cresce a diferentes temperaturas entre 3 °C e 37 °C, a sua tolerância máxima de NaCl é de 10% e 15%, e o mínimo de atividade de água (aw) é de 0,85 a 0,92 (Fleet, 2011). Uma característica típica desta levedura, é a formação de véu (Kurtzman, 2011b) como é possível observar na Figura 14. *Pichia anomala*, é produtora de diferentes enzimas, como glicosidases, entre elas β -D-glicosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -L-ramnosidase e β -D-xilosidase, responsáveis pela liberação de compostos aromáticos voláteis no vinho, entre eles ésteres (Padilla et al., 2018), e pec-

tinases, tendo a capacidade de degradação de pectinas provenientes de plantas (Kurtzman, 2011b). Uma característica muito importante a destacar, é a produção de toxinas *killer* que permitem a preservação dos alimentos, funcionando como um agente antimicrobiano de largo espectro (contra fungos, leveduras, bactérias e vírus) (Padilla et al., 2018; Walker, 2011).



FIGURA 15 - VEGARUNS DE *ULVA RIGIDA* E *PALMARIA PALMATA* COBERTOS COM LEVEDURAS DE VÉU, *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS*, À SUPERFÍCIE.

TABELA 15 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM *PALMARIA PALMATA*.

<i>Palmaria palmata</i>			
Colónia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
YPAE1	<i>Saccharomyces mikatae</i>	ATCC MYA-4448	97,15%
YPAE2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	99,11%
YPAE3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	99,11%

Uma outra levedura foi identificada como *Saccharomyces mikatae* apresentando uma banda entre os 800 e 900 (pb) (Figura 10), maior do que as restantes. Esta levedura selvagem é um híbrido genético natural resultante da hibridação de duas espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus*, tendo sido isolada de solos e folhas em estado de decomposição no Japão pelo taxonomista Kozaburo Mikata (Kellis et al., 2003; Naumov et al., 2000). Podendo crescer a temperaturas entre 4 °C e 30 °C, forma biofilmes à superfície em meio líquido incubada durante 25 dias a 20 °C (Naumov et al., 2000). *Saccharomyces mikatae* fermenta glucose, galactose, sucrose,

melibiose e refinose (Naumov et al., 2000). Para além disso, confere aromas frutados (banana) e florais a vinhos brancos (Bellon et al., 2013).

TABELA 16 - RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO DAS COLÓNIAS DE LEVEDURAS ISOLADAS EM *ULVA RIGIDA*.

<i>Ulva rigida</i>			
Colónia	Espécie	Estirpe	Identidade (%)
YUAE1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	98,86%
YUAE2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	99,11%
YUAE3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	98,42%
YUAE4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	99,29%
YUAE5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CBS 5759	98,95%
YUAE6	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CBS 2030	99,78%

Meyerozyma guilliermondii, apresentou uma banda entre 400 e 600 pb (Figura 10), é uma levedura heterotática, difundida natureza encontrada em diversos habitats, como solos, água, plantas e ar, aeróbica obrigatória, tem um crescimento ótimo a 30 °C, mas pode tolerar temperaturas até 42 °C (Yan et al., 2021). Detém a particularidade de metabolizar hexoses, como a glucose, pentoses, xilose e arabinose, produz diferentes ácidos orgânicos como ácido cítrico partir da celulose e produz diversas enzima endógenas como inulinase, α -amilase, α -ramnosidase lipase e nitrilase (Yan et al., 2021). As estirpes de *Meyerozyma guilliermondii*, são utilizadas como biocontrolo para evitar o crescimento de fungos em frutos e vegetais armazenados e o principais metabólitos produzidos são xilitol a partir da xilose e hemicelulose, e riboflavina (vitamina B2) (Kurtzman, 2011a; Yan et al., 2021).

4.3. Evolução do processo fermentativo

4.3.1. pH e °Brix

4.3.1.1. *Palmaria palmata*

De forma a obter dados e a controlar a evolução do processo fermentativo, recorreu-se à determinação dos valores de pH e °Brix. O uso de enzimas (proteases, amilases, lipases, entre outras) através do koji inativado e destruição mecânica da estrutura celular, facilitam a libertação de açúcares encapsulados e contribuem para a degrada-

ção das fibras, aumentando o teor de nutrientes disponível a ser consumida pela microbiota fermentativa (Pérez-Alva et al., 2022; Uchida & Miyoshi, 2013). Os teores de açúcares simples fermentescíveis constituintes das macroalgas, apresentam um impacto direto no processo fermentativo, espelhado nos valores de pH e °Brix finais (Mouritsen et al., 2017; Uchida, 2014).

Através da observação da Figura 16, pode-se verificar a diminuição dos valores ao longo do período de fermentação da alga *Palmaria palmata*. O valor de pH inicial é de 5,75, registrando um ligeiro aumento deste nos dias seguintes, este comportamento pode ser justificado pela presença de população de *Bacillus spp.* e pela adaptação da população de bactérias ácido-lácticas às condições do meio. O abaixamento de pH é abrupto a partir do dia 3, em que o valor apresentado é de 5,42, continuando a decrescer de forma significativa até dia 7, em que o valor registado foi de 4,29, possivelmente devido há predominância e atividade exponencial da população de bactérias ácidas-lácticas. A partir do dia 7, os valores continuam a baixar, mas forma gradual, comportamento que pode ser indicador de que as LAB entraram em fase estacionária, dando lugar à predominância da população de leveduras, responsáveis pela produção de metabolitos secundários que conferem aromas e sabores.

Os valores de pH acabam por estabilizar apenas no último dia de fermentação, atingindo valores de pH de 4,06. A adição de 5% de NaCl, desempenha um papel importante, uma vez que cria condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da população de LAB, neste caso mais especificamente, *Levilactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*, enquanto a adição de enzimas através do starter enzimático koji permite disponibilizar os nutrientes necessários promovendo a predominância de LAB e leveduras com capacidade de resistência ao sal, que tal como observado, fazem parte da microbiota autóctone de *Palmaria palmata*, dificultando o desenvolvimento de outros microrganismos presentes como bactérias do género *Bacillus spp.* A produção de metabolitos ácidos, confirmado pelo valor de pH final registado, torna o meio desfavorável à germinação de endósporos (Lacasse, 2000a; Uchida & Miyoshi, 2013).

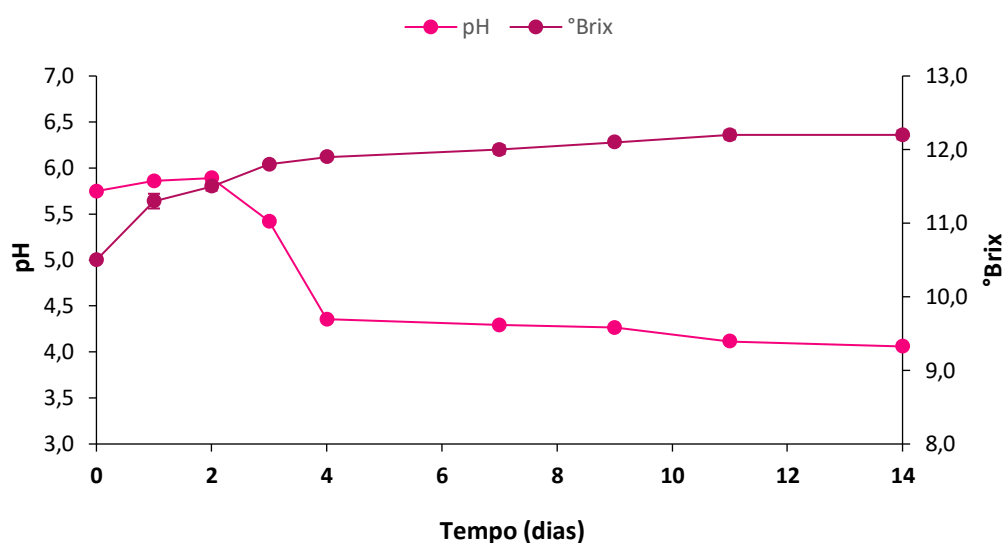


FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO REPRESENTADO ATRAVÉS DOS VALORES DE pH E °BRIX DE *PALMARIA PALMATA*.

Os valores de pH apresentados podem ser justificados pela presença de bactérias ácido-láticas heterofermentativas (*Levilactobacillus brevis*) produtoras de ácido acético, etanol e CO₂ e homofermentativas (*Pediococcus pentosaceus*), sendo o metabólito principal produzido por ambas o ácido láctico, conferindo propriedades de conservação ao produto (Lin et al., 2020; Monteiro et al., 2021; Pérez-Alva et al., 2022).

Relativamente aos valores de °Brix, através da observação da Figura 16, é bastante evidente o aumento durante o processo fermentativo, registrando valores iniciais de 10,5 de °Brix e terminando com 12,2 °Brix ao dia 14. O aumento exponencial verificou-se entre o início da fermentação (10,5 °Brix) e o dia 3 (11,8 °Brix). Este comportamento pode ser justificado pelo grande teor de sólidos solúveis disponíveis para fermentação (22,6 g) e a hidrólise enzimática de macromoléculas, entre as quais polissacáridos complexos que são decompostos em monossacáridos, dando origem ao processo de sacarificação como menciona Uchida (2014), que são metabolizados dando origem à produção de ácidos orgânicos, coincidindo com o abaixamento abrupto de pH nos dias mencionados anteriormente. A ação enzimática tem um impacto importante, uma vez que facilita a biodisponibilidade de nutrientes para a microbiota fermentativa. A partir do dia 4, foi registado 11,9 de °Brix, continuando a evoluir, de uma forma gradual

até ao dia 11, registando um valor de 12,1 de °Brix, e mantendo esse valor até ao último dia de fermentação como é possível observar na Figura 16. Esta estabilização, pode ser justificada pelo consumo de açúcares pela microbiota fermentativa como fonte de carbono e energia, dando continuidade à produção de ácido láctico, como demonstram os valores de pH registados. É importante referir que ao dia 7, o aparecimento de leveduras de véu, pode contribuir para evolução mínima dos valores registados, uma vez que estas consomem os açúcares presentes.

4.3.1.2. *Ulva rigida*

Como é possível observar na Figura 17, os valores iniciais registados para *Ulva rigida* são ligeiramente inferiores aos de *Palmaria palmata*, registando 5,38 de pH ao dia 0 do ensaio fermentativo. Tal como observado em *Palmaria palmata*, os valores de pH tendencialmente aumentam no início, mas o abaixamento de pH acontece a partir do dia 2, e ao dia 3 verifica-se o abaixamento gradual em termos de valores registados de (5,30 de pH), mantendo-se até ao dia 11 do ensaio fermentativo em que se regista 4,08 pH.

Este comportamento, pode ser justificado pelo valor de açúcares disponíveis para fermentação (apenas 0,21 g) e pela forte atividade de hidrólise enzimática de moléculas complexas. *Ulva rigida* é rica em fibra alimentar (42,77 g), mas pobre em hidratos de carbono (6,12 g), estando entre eles polissacáridos estruturais como a celulose e hemicelulose, que segundo Uchida (2014), são fibras difíceis de fermentar. O uso de enzimas através do koji, apesar de conter celulasas (Daba et al., 2021), pode não ser suficiente para a quantidade de fibras presentes no meio.

Tal como em *Palmaria palmata*, pelo consumo de nutrientes disponíveis no meio pela microbiota fermentativa composta por bactérias ácido-lácticas, homo e heterofermentativas (*Pediococcus pentosaceus* e *Levilactobacillus brevis*, respectivamente), tal como demonstra a Tabela 14, as espécies envolvidas na fermentação são as mesmas em ambas as algas, indo ao encontro do esperado, uma vez que as condições de meio de cultivo e crescimento são as mesmas. Tal como mencionado anteri-

ormente, a produção de metabolitos primários (ácido láctico, ácido acético, CO₂ e etanol) impedem a germinação dos endósporos de *Bacillus spp.*

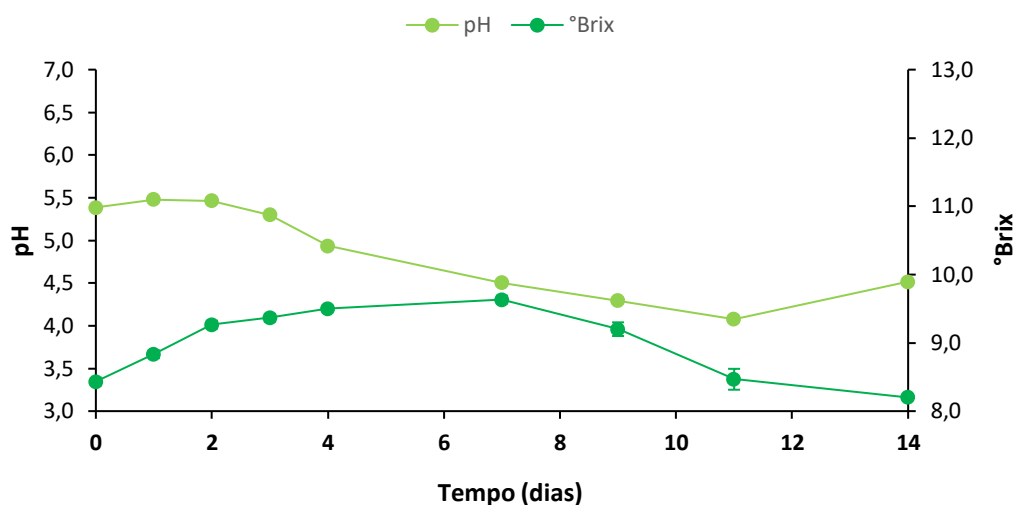


FIGURA 17 - EVOLUÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO REPRESENTADO ATRAVÉS DOS VALORES DE pH E °BRIX DE *ULVA RIGIDA*

Contrariamente ao comportamento de *Palmaria palmata*, o valor de pH até ao último dia do ensaio aumenta, tendo uma ligeira subida (4,53). Este comportamento, pode ser explicado pelo consumo de ácidos orgânicos por parte das leveduras presentes (Lacasse, 2000b).

Relativamente ao °Brix, apresenta valores mais baixos em todo o processo fermentativo do que *Palmaria palmata*, começando com 8,43 de °Brix e terminando com 8,20. Ao dia 2 (9,27 °Brix) do ensaio, existe um aumento acentuado nos valores de °Brix, correspondendo aos dias em que os valores de pH aumentaram. Esta etapa, tal como mencionado para *Palmaria palmata*, pode corresponder à fase de adaptação da microbiota fermentativa às condições do meio, sem um consumo ativo substancial, enquanto as enzimas realizavam hidrólise de polissacáridos em dissacáridos e monossacáridos. Este aumento gradual mantém-se até ao dia 7 (9,63 °Brix), valor mais alto registado, levando a concluir que possivelmente, existem bastantes sólidos solúveis em suspensão resultantes do processo de degradação anteriormente mencionado.

A partir do dia 7, os valores tendencialmente começam a baixar, podendo este resultado ser justificado pelo aparecimento da população de leveduras com metabolismo bastante ativo, uma vez que o meio é rico em açúcares fermentescíveis, utilizando estes como fonte de carbono e energia, levando a crer, que possivelmente estavam a consumir mais do que a quantidade que estava a ser obtida a partir da hidrólise enzimática dos polissacáridos presentes, justificando assim a descida do valor de °Brix final (8,20) e o aumento significativo do valor de pH. Este comportamento, leva a concluir, que para *Ulva rigida*, o tempo ótimo de fermentação seria até ao dia 11, apesar de o °Brix apresentar um decréscimo, o valor de 4,08 de pH é o ideal semelhante ao valor de pH final de *Palmaria palmata*.

4.3.2. Produção de metabolitos

4.3.2.1. *Palmaria palmata*

De forma a obter-se informação mais detalhada sobre o processo fermentativo e quais os principais metabolitos produzidos, recorreu-se à análise das amostras por HPLC. Através da Figura 18, o ácido glutâmico encontra-se em grande quantidade ao tempo 0 (41,15 g/L), e que nos dias seguintes é evidente o aumento bastante acentuado deste valor ao dia 3º do ensaio fermentativo (72,17 g/L), possivelmente devido à hidrólise enzimática realizada pelas enzimas produzidas pelo koji. A partir do dia 4 do ensaio fermentativo, o valor de ácido glutâmico, decresce abruptamente, coincidindo com o abaixamento igualmente abrupto do pH (Figura 16).

Paralelamente, verifica-se a produção de ácido láctico (metabolito principal produzido pelas LAB) entre o dia 2 e 3 dia (0,49 g/L) de fermentação, sendo que o seu crescimento evidente entre o dia 3 e 4, indo de acordo com a explicação mencionada no ponto 4.3.1.1, em que se verifica que a atividade exponencial de bactérias ácido-lácticas decorre a partir do dia 3. A produção de ácido láctico vai crescendo durante todo o ensaio fermentativo, terminando com 3,07 g/L. A produção de ácido acético, apesar de ser em menor quantidade (0,09 g/L ao tempo 0 e 0,55 g/L ao tempo 7 e por fim 0,53 g/L ao tempo 14), deve-se principalmente à presença de bactérias ácido lácticas heterofermentativas (*Levilactobacillus brevis*).

Relativamente à presença de glucose, que ao tempo 0 detinha um valor de 9,55 g/L, foi aumentado até ao dia 3, atingindo 21,55 g/L, possivelmente devido à grande quantidade de açúcares disponíveis para fermentação (22,6 g) e a atividade enzimática, como a transformação de polissacáridos complexos em simples, justificando, como mencionado anteriormente no ponto 4.3.1.1, o aumento acentuado de °Brix. A partir do dia 4, os valores de glucose começam a diminuir, correspondendo ao consumo dos açúcares presentes em suspensão em ácido láctico e acético, verificando-se a respetiva diminuição dos valores até ao final da fermentação (17,03 g/L).

A presença de glicerol verifica-se desde o tempo 0 (0,35 g/L) e observa-se a sua produção gradual ao longo de todo o processo fermentativo, terminando com 0,91 g/L ao tempo 14. A produção de glicerol deve-se possivelmente à presença de leveduras, durante todo o processo fermentativo, embora só se tornem população dominante a partir do tempo 7.

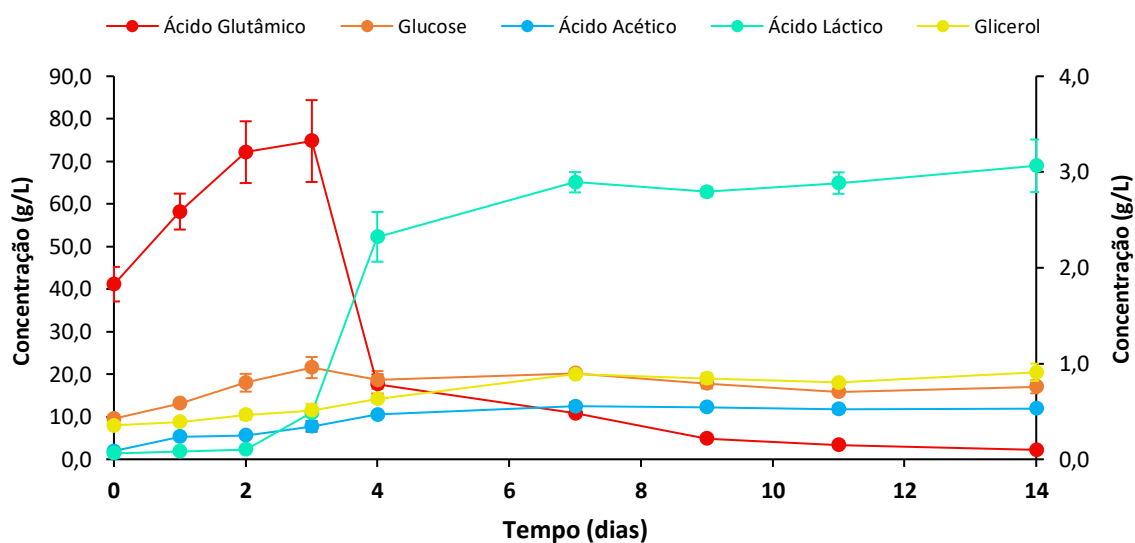


FIGURA 18 - AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E GLICEROL PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE *PALMARIA PALMATA*.

4.3.2.2. *Ulva rigida*

Na fermentação de *Ulva rigida*, os metabolitos produzidos foram os mesmos que na fermentação de *Palmaria palmata*, à exceção do ácido cítrico, que manteve valores constantes durante toda a fermentação como demonstra a Figura 19. *Ulva rigida* apresenta 57,41 g/L de ácido glutâmico ao dia 0 do ensaio fermentativo, mas tal como é

possível observar o valor registado decresce de uma forma gradual até ao dia 7 de fermentação, onde se registou 10,34 g/L, acompanhando a descida gradual do pH, registou-se valores semelhantes até ao final da fermentação. O abaixamento gradual, deve-se possivelmente, à maior quantidade de polissacáridos complexos e de difícil hidrolisação. A produção de ácido láctico é menor do que em *Palmaria palmata* (0,23 g/L no início da fermentação), dando-se de uma forma gradual e estabilizando entre os tempos 11 e 14 (1,29 e 1,30 g/L, respetivamente), indicando que a microbiota fermentativa de LAB deixou de ser dominante, mas continua presente no meio. Tal como em *Palmaria palmata*, verifica-se a produção de ácido acético, registando-se valores no início da fermentação de 0,42 g/L e terminando exatamente com o mesmo valor registado inicialmente. Verifica-se diminui até ao dia 4 (0,24 g/L), mas ao tempo 7 (0,43 g/L), verifica-se a sua produção novamente até ao final da fermentação (0,46 g/L), possivelmente por bactérias ácido lácticas heterofermentativas.

Relativamente à glucose, os valores obtidos para *Ulva rigida* são inferiores aos de *Palmaria palmata*, mas facilmente justificáveis pela pouca quantidade de açúcares disponíveis para fermentação (0,21 g). O valor inicial registado foi de 6,50 g/L, aumentou até ao dia 4 (15,39 g/L) do ensaio fermentativo, correspondendo à grande atividade enzimática que decorreu da adição de koji. A partir do dia 7, verifica-se um decréscimo acentuado no consumo de glucose, como mencionado no ponto 4.3.1.2, possivelmente por parte das leveduras com metabolismo bastante ativo, consumindo rapidamente as fontes de energia disponíveis, levando conseqüentemente ao abaixamento do °Brix.

Por fim, os valores de glicerol são também eles mais baixos do que registados para *Palmaria palmata*, em que inicialmente se registou 0,21 g/L e terminando com 0,18g/L.

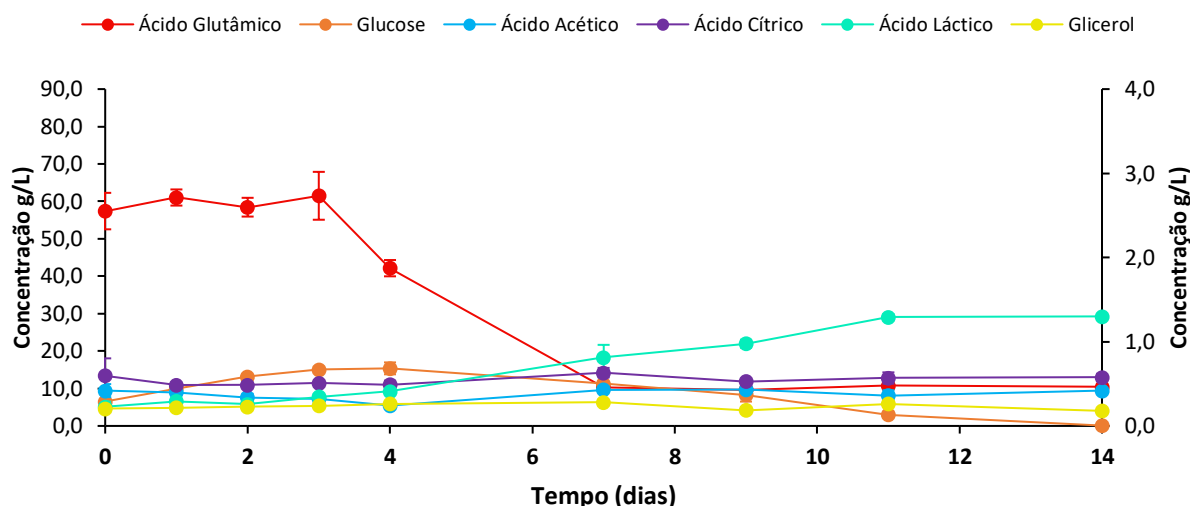


FIGURA 19 - AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E GLICEROL PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE *ULVA RIGIDA*.

4.4. Caracterização química

4.4.1. Acidez titulável

Relativamente à acidez titulável esta foi expressa em ácido láctico, uma vez que era expectável que este seja o ácido maioritariamente presente, dado que o processo fermentativo é claramente levado a cabo por bactérias-ácido lácticas.

Como seria expectável tendo em consideração os valores de pH iniciais de ambas as macroalgas, os valores obtidos no início da fermentação (T0) são ligeiramente diferentes, 0,108 g/mL para *Palmaria palmata* e 0,091 g/mL para *Ulva rigida*, sendo o valor registado para *Palmaria palmata* superior ao de *Ulva rigida*.

No produto final (tempo 14) de *Palmaria palmata*, observa-se um incremento significativo ($p=0,05$) (aproximadamente 30%) na acidez titulável face ao valor inicial (0,180 g em T0 vs 0,303 g de ácido láctico/mL) (e eventualmente outros ácidos) que pode ser atribuída à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação (Figura 18). O resultado apresentado é consistente com o valor de pH no final da fermentação (4,06). O produto final (T14) de *Ulva rigida*, apresenta um ligeiro aumento da acidez titulável (0,120 g de ácido láctico/mL), mas os valores apresentados não são significativamente diferentes ($p=0,05$) do valor obtido para T0, como demonstra a Figura 20.

Este comportamento pode ser justificado pelo consumo de ácidos orgânicos por parte das leveduras presentes, levando a uma redução da acidez titulável final, tal como justificado anteriormente relativamente ao valor de pH final registado (4,53).

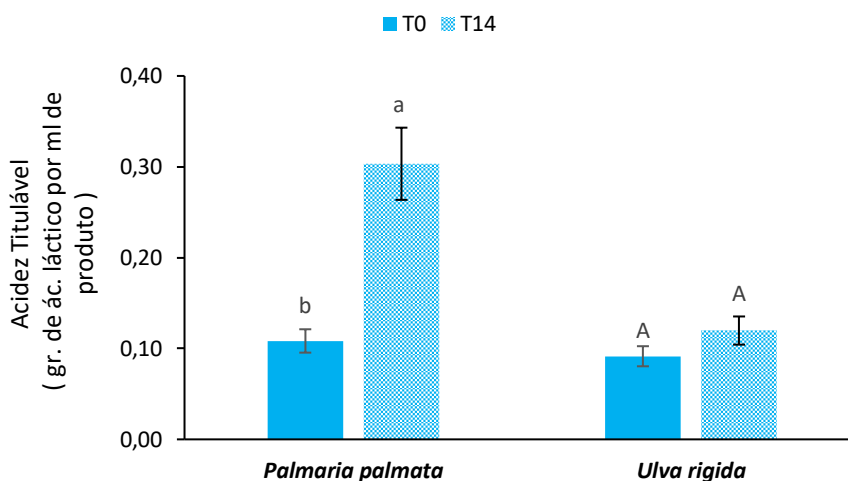


FIGURA 20 - VALORES DE ACIDEZ TITULÁVEL OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA DE *PALMARIA PALMATA* E *ULVA RIGIDA*. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.

4.4.2. Compostos fenólicos, atividade antioxidante e flavonoides

Relativamente aos compostos fenólicos (Tabela 17), os valores de fenóis totais obtidos são globalmente inferiores aos apresentados na literatura, o que poderá ser atribuído ao facto de corresponderem ao sobrenadante das macroalgas fermentadas e não a valores das algas propriamente ditas. No entanto observa-se em ambos os casos um aumento dos valores com a fermentação à semelhança do que tem sido encontrado por outros autores, que referem que o aumento dos compostos totais é comum quando se trata deste tipo de fermentações (Rafiquzzaman et al., 2015; Suraiya et al., 2018).

Comparativamente, os valores obtidos para os fenóis totais de *Palmaria palmata* apresentam-se superiores aos de *Ulva rigida*, enquanto no caso dos fenóis solúveis os valores obtidos para *Ulva rigida* foram significativamente superiores ($p=0,05$), levando

a concluir que os compostos fenólicos encontrados em *Ulva rigida* são principalmente fenóis solúveis que são extraídos para o meio aquoso durante o processo de fermentação. O aumento de fenóis solúveis em solução é um comportamento normal em fermentações que envolvam fungos filamentosos uma vez que na presença de enzimas existe hidrólise de compostos.

Já para o potencial antioxidante (Tabela 17), os valores apresentados decrescem com a fermentação e apontam para um comportamento contrário ao encontrado na literatura (Rafiquzzaman et al., 2015; Suraiya et al., 2018). Este fenómeno pode ser explicado pela possível remoção durante a fermentação de polissacáridos sulfatados que conferem o potencial antioxidante (Peñalver et al., 2020).

Por fim, os teores de flavonoides (Tabela 17) aumentam com a fermentação, tendo sido obtidos valores significativamente diferentes tanto para *Palmaria palmata* como para *Ulva rigida*. Este aumento é consensual com o estudo de Suraiya et al., (2018), que também observou um aumento dos valores registados entre as amostras de macroalgas não fermentadas e após fermentação com o fungo filamento *Monascus sp.*, e poderá resultar da conversão de flavonoides em formas mais solúveis, levando a um aumento da sua concentração no sobrenadante.

TABELA 17 - VALORES OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO PARA COMPOSTO FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FLAVONOIDES DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.

Macroalga	Tempo	Compostos Fenólicos (mg ácido gálico/mL)		Atividade Antioxidante (mg ácido gálico/mL)		Flavonoides (mg quercetina/mL)
		Fenóis Totais	Fenóis Solúveis	DPPH	FRAP	
<i>Palmaria palmata</i>	0	0,229±0,012 ^b	0,175±0,005 ^b	0,968±0,078 ^a	0,025±0,001 ^a	0,121±0,009 ^a
	14	0,375±0,026 ^a	0,188± 0,006 ^a	0,174±0,058 ^b	0,021±0,001 ^b	0,561±0,316 ^a
<i>Ulva rigida</i>	0	0,121±0,016 ^B	0,165± 0,005 ^B	0,602±0,018 ^A	0,019±0,001 ^B	0,063±0,015 ^B
	14	0,164±0,024 ^A	0,181±0,011 ^A	0,588±0,010 ^A	0,025±0,001 ^A	0,364±0,036 ^A

4.4.3. Proteínas

Ambas as macroalgas são ricas em proteínas (*Palmaria palmata* contém 17,2 g/100g e *Ulva rigida* 19,24 g/100 g, informação do rótulo Alga). Os teores de proteínas totais (Tabela 18) obtidos para o sobrenadante da fermentação de *Palmaria palmata* aumentam significativamente ($p=0,05$) após a fermentação (início da fermentação (T0) $21,752\pm0,921$ mg/mL, final da fermentação (T14) $24,143\pm0,519$ mg/mL). Os valores obtidos podem ser justificados por existir a libertação de proteínas, resultante inicialmente da destruição das paredes celulares pelo processo de trituração.

O teor de proteína solúvel (Tabela 18) vem de alguma forma sustentar os valores anteriormente mencionados, uma vez $40,604\pm5,479$ mg/mL no início da fermentação deve-se à libertação e solubilização das proteínas em água. Por outro lado, no caso das proteínas solúveis observa-se um decréscimo significativo com a fermentação ($p=0,05$), justificável pela atividade proteolítica das enzimas do koji, uma vez que as proteases fornecidas através do koji provocam a hidrólise das proteínas em péptidos e aminoácidos, que são por sua vez utilizados pelos microrganismos fermentativos presentes.

O valores obtidos para *Ulva rigida* relativamente ao valor das proteínas totais inicialmente (T0), pode ser justificado, tal como em *Palmaria palmata*, pela libertação de proteínas solúveis em água, através da destruição das paredes celulares. Apesar do valor final (T14) apresentar uma quantidade ligeiramente superior ($21,199\pm0,921$ mg/mL), os valores apresentados não são significativamente diferentes ($p=0,05$) (Tabela 18). O mesmo acontece com as proteínas solúveis, em que o valor inicial obtido (T0) é de $32,266\pm3,185$ mg/mL e embora se observe um aumento do teor de proteína solúveis ($37,016\pm3,136$ mg/mL) em solução no final (T14), os valores não são significativamente diferentes ($p=0,05$). O facto de no caso de *Ulva rigida* não se observar um decréscimo tão acentuado na proteína solúvel pode ser indicador de libertação de fibras não degradáveis pelas enzimas do koji (Ghorai et al., 2009).

TABELA 18 - TEORES DE PROTEÍNAS TOTAIS E SOLÚVEIS OBTIDOS NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($\alpha=0,05$). A ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA, COMPARA APENAS OS VALORES INICIAIS E FINAIS RESULTANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO AO INVÉS DE COMPARAR OS VALORES ENTRE AS ALGAS.

Macroalga	Tempo	Proteínas Totais	Proteínas Solúveis
<i>Palmaria</i>	0	21,752 $\pm$ 0,921 ^b	40,604 $\pm$ 5,479 ^a
<i>palmata</i>	14	24,143 $\pm$ 0,519 ^a	24,718 $\pm$ 1,891 ^b
<i>Ulva</i>	0	20,147 $\pm$ 0,279 ^A	32,266 $\pm$ 3,185 ^A
<i>rigida</i>	14	21,199 $\pm$ 1,455 ^A	37,016 $\pm$ 3,136 ^A

4.5. Análise sensorial

O painel de análises sensorial foi composto por 40 provadores não treinados sendo 28 do sexo feminino e 12 do sexo masculino, entre os 20 e os 63 anos. A média de idades encontra-se entre os 27 anos. Os provadores foram também caracterizados quanto ao regime alimentar, verificando-se que 70% dos provadores seguem uma dieta omnívora, 22,5% são flexitarianos, 5% vegetarianos e 2,5% são *vegan*. Foram ainda questionados sobre a inclusão de *garum* na alimentação (75% respondeu que não e 25% respondeu que sim) e relativamente aos *dressings* que usualmente utilizam para tempero para saladas ou aromatizar pratos, sendo as respostas mais frequentes vinagre com 34%, azeite com 33%, maionese com 9% e por fim molho de soja com 2%.

O painel teve como objetivo a avaliação de características organoléticas dos VEGARUNS de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida* apresentados na sua forma clarificada por centrifugação (Figura 21): aspeto visual, cor, aroma, sabor e consistência, foi solicitada ainda uma apreciação global do produto. A escala de classificação utilizada foi uma escala hedónica de cinco níveis: 1 - Muito Desagradável, 2 - Desagradável, 3 - Indiferente, 4 - Agradável e 5 - Muito Agradável. De forma a ser mais precisa, foram calculadas e analisadas as percentagens de respostas a todos os parâmetros.



FIGURA 21 - VEGARUNS DE ULVA RIGIDA (AMARELO) E PALMARIA PALMATA (VERMELHO).

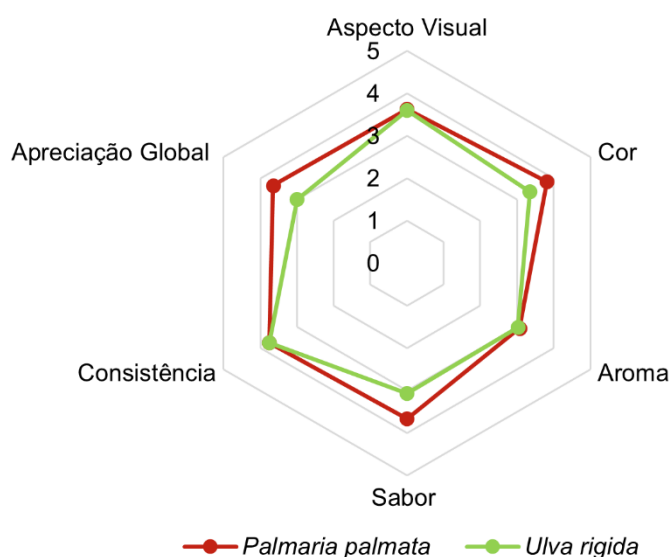


FIGURA 22 - RESPOSTAS OBTIDAS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE AOS ATRIBUTOS SENSORIAIS DOS VEGARUNS DE PALMARIA PALMATA E ULVA RIGIDA. ESCALA HEDÔNICA DE CINCO NÍVEIS: 1 - MUITO DESAGRADÁVEL, 2 - DESAGRADÁVEL, 3- INDIFERENTE, 4 - AGRAVÁVEL E 5 - MUITO AGRAVÁVEL.

O VEGarum de *Palmaria palmata* (amostra FX1), obteve resultados positivos em quase todos os parâmetros, à exceção do aroma, demonstrando a preferência do consumidor por este *dressing* (Figura 22). Quanto ao aspeto visual, mais de 50% classificaram este produto como muito agradável (15%) ou agradável (47,5%), sendo indicado por 32,5% do painel como indiferente e 5,1% como desagradável. Para o parâmetro da cor, destacou-se, uma vez que mais de metade do painel de provadores não treinados indicou como muito agradável (17,5%) ou agradável (57,5%), enquanto as restantes percentagens foram de 15% para indiferente e 10% como desagradável, possivelmente

pela cor mais forte que esta detém como demonstra a Figura 21. Quanto ao parâmetro do aroma as respostas encontram-se bastante distribuídas, 40% respondeu como agradável, 22,5% como indiferente, 32,5% como desagradável, apenas 2,5% respondeu desagradável e muito desagradável. O parâmetro do sabor, revelou respostas surpreendentes, uma vez que 20% dos provadores responderam como muito agradável, 45% responderam agradável, 20% como indiferente, 12,5% desagradável e por fim 2,5 como muito desagradável. O parâmetro da consistência não demonstrou tendências diferentes nas respostas, sendo que 15% respondeu muito agradável, 50% respondeu agradável, 30% respondeu indiferente e 5% desagradável. Tendo uma apreciação global bastante positiva, refletindo todas as respostas anteriormente mencionadas, 12,5% dos provadores classificaram como muito agradável, 60% como agradável, 10% como indiferente, 15% como desagradável e 2,5% como muito desagradável.

Na tentativa de procurar perceber qual a percepção de *flavours* sentida, foi pedido aos provadores que descrevessem o aroma e o sabor. Em 87 respostas, as palavras mais utilizadas para descrever os aromas foram mar com 11%, ácido e cheiro a iodo com 8%, e vinagre com 6%. Quanto ao sabor, a quantidade de respostas dada foi maior (99), em que as palavras mais frequentemente mencionadas foram salgado com 35%, ácido com 4%, intenso com 3%.

O VEGarum de *Ulva rigida* (amostra N3F), não obteve resultados tão positivos, sendo que os que mais se destacam são o aspeto visual e a consistência como demonstra a Figura 22. Apesar disso, as respostas obtidas para o parâmetro do aspeto visual foram globalmente positivas, indicando o produto como muito agradável (12,5%) ou agradável (42,5%), indicando 37,5% como indiferente e 7,5% como desagradável. O parâmetro da cor teve as maiores percentagens de respostas indiferente com 42,5% e agradável com 37,5%, possivelmente por não se destacar face à cor de *Palmaria palmata*, como demonstra a Figura 21. Os parâmetros do aroma e sabor tiveram resultados muito semelhantes e menos positivos, com apenas 37,5% dos provadores a classificarem como muito agradável (15%) ou como agradável (27,5%) e 17,5% como indiferente ambos os parâmetros, enquanto 32,5% responderam como desagradável o parâmetro do aroma e 35% como desagradável o parâmetro do sabor, por fim,

7,5% responderam muito desagradável para o aroma e 2,5% para o sabor. A consistência, como mencionado anteriormente, foi um dos parâmetros que se destacou apesar de as respostas se dividirem bastante, 20% classificou como muito agradável, 40% como agradável, 35% como indiferente e 5% como desagradável. O parâmetro da apreciação global é bastante claro, sendo a resposta desagradável a mais frequente com 40%, enquanto agradável apenas detém 27,5%, indiferente com 20%, muito agradável com 10% e muito desagradável com 2,5%. As palavras mais utilizadas para descrever os aromas do VEGarum de *Ulva rigida*, em 102 respostas totais, foram algas com 17%, mar com 16%, e peixe com 12%. Quanto ao sabor, obteve-se 93 respostas em que as palavras mais frequentemente mencionadas foram sal/salgado com 24%, maresia com 16%, e peixe com 11%.

Através da Figura 23, podemos observar que a resposta mais frequente relativamente à intensidade sentida ao sal é Intenso com 60% para o VEGarum de *Palmaria palmata* e 52,5% para o de *Ulva rigida*, enquanto 15% respondeu muito intenso para o *dressing* de *Palmaria palmata* e 25% para o *dressing* de *Ulva rigida* o que é facilmente justificável pela adição de sal (5%) na preparação do produto, mas também pelos teores de sal que as algas detém na sua constituição (4,2 gr/100 g em *Palmaria palmata* e 4,25 gr/100 g em *Ulva rigida*). Os restantes valores apresentados podem refletir a tolerância dos provadores não treinados face ao sal.

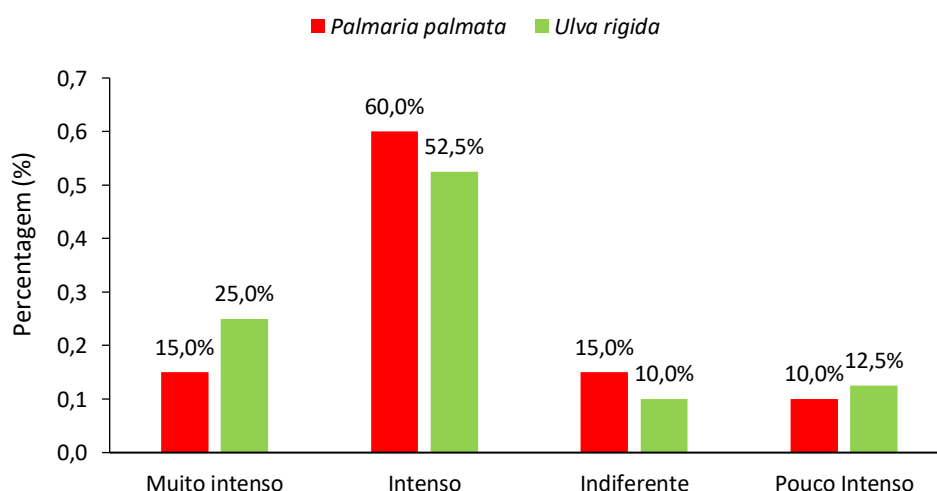


FIGURA 23- RESULTADOS OBTIDOS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE À INTENSIDADE DO SAL.

Relativamente às intenções de compra do painel de provadores, a Figura 24 reflete os dados discutidos anteriormente, onde as respostas mais frequentes refletem perfeitamente o contraste entre a preferência dos consumidores: provavelmente compraria para o VEGarum de *Palmaria palmata* com 40% das respostas enquanto *Ulva rigida* só obteve 22,5% e provavelmente não compraria para o VEGarum de *Ulva rigida* com 27,5%, enquanto *Palmaria palmata* obteve apenas 10%. Curiosamente, 7,5% das respostas obtidas demonstraram que teriam interesse em adquirir o produto ao responderem que comprariam ambos os produtos. Em dúvida se comprariam os produtos, obteve-se 27,5% para o *dressing* de *Palmaria palmata* e 22,5% para *Ulva rigida*. Por fim, provadores que possivelmente não detêm interesse nos produtos ou que possivelmente não apreciam demonstrando que não comprariam de todo ambos os produtos, representam 15% das respostas para *Palmaria palmata* e 20% para *Ulva rigida*.

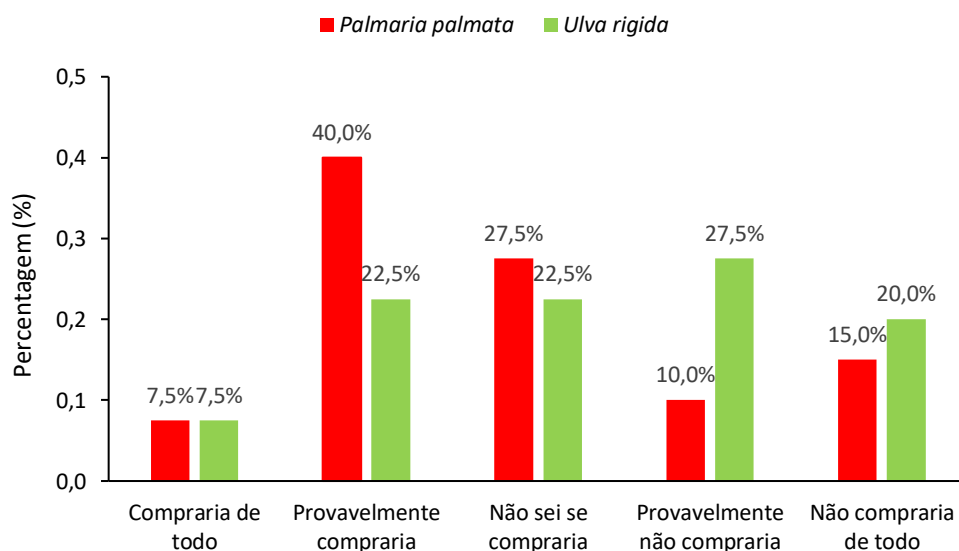


FIGURA 24 - RESULTADOS OBTIDOS DO PAINEL DE PROVADORES NÃO TREINADOS (N=40), RELATIVAMENTE À INTENÇÃO DE COMPRA.

De uma forma geral, o VEGarum de *Palmaria palmata* demonstra maior intenção de compra por parte dos provadores e de alguma forma de aceitação, enquanto o de *Ulva rigida* desperta menor interesse de compra.

Conclusão e Perspetivas Futuras

Apesar da procura por alimentos sustentáveis e inovadores por parte dos consumidores, as macroalgas ainda são alvo de neofobia, devido à falta de tradição de consumo e de incorporação na dieta dos consumidores ocidentais. Os sabores fortes a mar nem sempre as tornam agradáveis ou fáceis de consumir, mas apresentam-se como alimento potencial para desenvolvimento de novos produtos dentro das tendências alimentares, principalmente pela riqueza nutricional e de compostos bioativos, formulando produtos com valor acrescentado, dando resposta à escassez de alimentos e falta de recursos.

No presente trabalho demonstrou-se que, apesar da complexidade das suas matrizes, as macroalgas podem ser fermentadas com sucesso, atingindo-se os objetivos iniciais. O processo fermentativo espontâneo revelou-se eficaz, sendo a microbiota autóctone identificada coincidente com a de outros trabalhos já realizados ao nível de fermentação de macroalgas para alimentação animal, sendo o sal, possivelmente o elemento decisivo para a seleção da microbiota e para o sucesso do processo fermentativo.

Numa ótica de produto inovador, o VEGarum de *Palmaria palmata* foi bem aceite pelos consumidores apresentando possibilidade de comercialização contrariamente ao de *Ulva rigida*. No trabalho futuro a ser desenvolvido, poderá ser importante testar este tipo de fermentação utilizando concentrações de sal mais baixas, uma vez que as algas já detêm valores elevados deste mineral, afetando a questão sensorial como demonstrado através da avaliação do painel sensorial. Para além disso, a diminuição do teor de

sal permitirá ainda alinhar este produto com as tendências de consumo, que apontam as preocupações com a saúde como um fator importante. No entanto, há que ressaltar que estando em presença de um produto que será utilizado como *dressing*, e por isso em pequenas quantidades, leva a que a concentração elevada de sal não constitua uma preocupação, mas antes uma oportunidade, já que poderá ser usado em simultâneo como aromatizante e substituto do sal.

Os processos de maturação a frio e à temperatura ambiente detêm potencialidades para exploração, uma vez que apesar de não ter sido possível realizar o estudo aprofundado da influência das diferentes temperaturas na estabilização e desenvolvimento das características sensoriais do produto, resultados preliminares apontam no sentido de se obterem características sensoriais melhoradas quando os produtos foram sujeitos a um período de maturação. Para além disso, um outro aspeto relevante a considerar será a avaliação da atividade antimicrobiana e tempo de vida útil dos produtos, uma vez que os microrganismos envolvidos nas fermentações de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*, apresentam características tecnológicas importantes que tornam o produto seguro para consumo humano.

A realização de uma análise nutricional detalhada, incluindo hidratos de carbono, teores de humidade, cinzas, lípidos totais e ácidos gordos, e análises à vitamina B12 após o processo de fermentação, como também a avaliação das características físicas do produto através de testes reológicos permitirá também uma caracterização mais aprofundada dos produtos. Seria ainda importante trabalhar na texturização do produto, possivelmente através da adição de hidrocoloides, uma vez que através da análise sensorial é possível concluir que é um ponto a melhorar.

Tal como na produção de *garum*, em que as partes sólidas dos peixes era reutilizada através da criação de uma pasta fermentada chamada *allec*, a parte sólida das algas resultantes da centrifugação das amostras, apresenta-se com potencialidade para a criação de novos produtos ou mesmo em aplicações gastronómicas devido à riqueza de sabores e *flavours* a partir destas.

Bibliografia

- Adrien, A., Bonnet, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., & Bridiau, N. (2019). Anticoagulant Activity of Sulfated Ulvan Isolated from the Green Macroalga *Ulva rigida*. *Marine Drugs*, 17(5), 291. <https://doi.org/10.3390/md17050291>
- Akada, R., Murakane, T., & Nishizawa, Y. (2000). DNA Extraction Method for Screening Yeast Clones by PCR. *BioTechniques*, 28(4), 668–674. <https://doi.org/10.2144/00284st02>
- Altieri, C., Ciuffreda, E., Di Maggio, B., & Sinigaglia, M. (2017). Starter Cultures in Food Production. In B. Speranza, A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *Starter Cultures in Food Production*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118933794>
- Amato, K. R., Mallott, E. K., D'Almeida Maia, P., & Savo Sardaro, M. L. (2021). Predigestion as an Evolutionary Impetus for Human Use of Fermented Food. *Current Anthropology*, 62(S24), S207–S219. <https://doi.org/10.1086/715238>
- Barroso, M. F., Noronha, J. P., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2011). Flavored Waters: Influence of Ingredients on Antioxidant Capacity and Terpenoid Profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5062–5072. <https://doi.org/10.1021/jf1048244>
- Behera, S. S., Ray, R. C., Das, U., Panda, S. K., & Saranraj, P. (2019). Microorganisms in Fermentation. In A. Berenjian (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology* (pp. 1–40). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6>
- Bellon, J. R., Schmid, F., Capone, D. L., Dunn, B. L., & Chambers, P. J. (2013). Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial

- Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast and Saccharomyces mikatae. *PLoS ONE*, 8(4), e62053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062053>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernardes, J. P. (2015). Consumo e Transformação de Peixe entre o Mundo Romano e o Islâmico. In *Memória dos Sabores do Mediterrâneo*. <http://hdl.handle.net/10400.1/10575>
- Bizzaro, G., Vatland, A. K., & Pampanin, D. M. (2022). The One-Health Approach in Seaweed Food Production. *Environment International*, 158(October 2021), 106948. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106948>
- Blikra, M. J., Altintzoglou, T., Løvdal, T., Rognså, G., Skipnes, D., Skåra, T., Sivertsvik, M., & Noriega Fernández, E. (2021). Seaweed Products for the Future: Using Current Tools to Develop a Sustainable Food Industry. *Trends in Food Science & Technology*, 118(April), 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.002>
- Bourdichon, F., Arias, E., Babuchowski, A., Bückle, A., Bello, F. D., Dubois, A., Fontana, A., Fritz, D., Kemperman, R., Laulund, S., McAuliffe, O., Miks, M. H., Papademas, P., Patrone, V., Sharma, D. K., Sliwinski, E., Stanton, C., Von Ah, U., Yao, S., & Morelli, L. (2021). The Forgotten Role of Food Cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 368(14), 73230. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bugalhão, J. (2001). II Parte: A Indústria Romana de Transformação e Conserva de Peixe em Olisipo. In *Trabalhos de Arqueologia 15 - A indústria romana de transformação e conserva de peixe em Olisipo. Núcleo Arqueológico da Rua dos Correeiros*. <http://www.igespar.pt/media/uploads/trabalhosdearqueologia/15/2/4.pdf>
- Bunzel, M., & Schendel, R. R. (2017). Determination of (Total) Phenolics and Antioxidant

- Capacity in Food and Ingredients. In S. . Nielson (Ed.), *Food Analysis. Food Science Text Series*. (pp. 455–468). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_25
- Buzzini, P., Di Mauro, S., & Turchetti, B. (2017). Yeasts as Starters Cultures. In B. Speranza, A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *Starter Cultures in Food Production* (pp. 16–49). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118933794>
- Cai, J., Lovatelli, A., Aguilar-Manjarrez, J., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., Diffey, S., Garrido Gamarro, E., Geehan, J., Hurtado, A., Lucente, D., Mair, G., Miao, W., Potin, P., Przybyla, C., Reantaso, M., Roubach, R., Tauati, M., & Yuan, X. (2021). Seaweeds and Microalgae: An Overview for Unlocking their Potential in Global Aquaculture Development. *FAO Fisheries And Aquaculture Circular*, 1229. <https://doi.org/10.4060/cb5670en>
- Calheiros, A. C., Sales, L. P. M., Pereira Netto, A. D., Cavalcanti, D. N., Castelar, B., & Reis, R. P. (2021). Commercial Raw Materials from Algaculture and Natural Stocks of *Ulva* spp. *Journal of Applied Phycology*, 33(3), 1805–1818. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02413-3>
- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., & Pereira, L. (2014). Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896–917. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116>
- Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. D. (2018). Marine Algal Carbohydrates as Carbon Sources for the Production of Biochemicals and Biomaterials. *Biotechnology Advances*, 36(3), 798–817. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. In S. . Nielsen (Ed.), *Food Analysis. Food Science Text Series*. (pp. 315–331). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18
- Chye, F. Y., Ooi, P. W., Ng, S. Y., & Sulaiman, M. R. (2018). Fermentation-Derived Bioactive Components from Seaweeds: Functional Properties and Potential Applications. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(2), 144–164. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1412375>

- Curtis, R. I. (1991). *Garum and Salsamenta Production and Commerce in Materia Medica*. BRILL.
- Curtis, R. I. (2017). Salted Fish Products. In *Oxford Research Encyclopedia of Classics* (Issue October, pp. 1–18). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199381135.013.8076>
- Daba, G. M., Mostafa, F. A., & Elkhateeb, W. A. (2021). The Ancient Koji Mold (*Aspergillus oryzae*) As a Modern Biotechnological Tool. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- del Olmo, A., Picon, A., & Nuñez, M. (2018). The Microbiota of Eight Species of Dehydrated Edible Seaweeds from North West Spain. *Food Microbiology*, 70, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.10.009>
- Dunn, R. R., Wilson, J., Nichols, L. M., & Gavin, M. C. (2021). Toward a Global Ecology of Fermented Foods. *Current Anthropology*, 62(S24), S220–S232. <https://doi.org/10.1086/716014>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. (1989). Isolation and Direct Complete Nucleotide Determination of Entire Genes. Characterization of a Gene Coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
- Elias, M., Laranjo, M., Cristina Aguilheiro-Santos, A., & Eduarda Potes, M. (2020). The Role of Salt on Food and Human Health. In M. Laranjo (Ed.), *Salt in the Earth* (p. Ch. 2). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86905>
- Feyereisen, M., Mahony, J., Kelleher, P., Roberts, R. J., O'Sullivan, T., Geertman, J.-M. A., & van Sinderen, D. (2019). Comparative Genome Analysis of the *Lactobacillus brevis* Species. *BMC Genomics*, 20(1), 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5783-1>
- Fleet, G. H. (2011). Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 53–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00005-7>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine And Tryptophane Determination In

- Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
- Gallardo, T. (2015). Marine Algae: General Aspects (Biology, Systematics, Field, and Laboratory Techniques). In L. Pereira & J. M. Neto (Eds.), *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (1 st, pp. 1–67). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b17540>
- García-Poza, S., Leandro, A., Cotas, C., Cotas, J., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). The Evolution Road of Seaweed Aquaculture: Cultivation Technologies and the Industry 4.0. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 6528. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186528>
- Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. *Food Research International*, 42(5–6), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.019>
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98–S107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>
- Gomez-Zavaglia, A., Prieto Lage, M. A., Jimenez-Lopez, C., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2019). The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value. *Antioxidants*, 8(9), 406. <https://doi.org/10.3390/antiox8090406>
- Gong, L., He, H., Li, D., Cao, L., Khan, T. A., Li, Y., Pan, L., Yan, L., Ding, X., Sun, Y., Zhang, Y., Yi, G., Hu, S., & Xia, L. (2019). A New Isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) With Antibacterial Activity Against Fish Pathogens and Potency in Facilitating the Immunity and Growth Performance of Grass Carps. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>
- Grainger, S. (2011). Roman Fish Sauce: an Experiment in Archaeology. In H. Saberi (Ed.), *Cured, Fermented and Smoked Foods: Proceedings from the Oxford Symposium on Food and Cookery 2010* (29th ed., pp. 121–131). Prospect Books.
- Grainger, S. (2014). Garum, Liquamen, and Muria: A New Approach to the Problem of Definition. In E. Botte & V. Leitch (Eds.), *Fish & Ships: Production and Commerce of Salsamenta During Antiquity* (pp. 37–45). Publications du Centre Camille Jullian. <https://doi.org/10.4000/books.pccj.1507>

- Grainger, S. (2018). Garum and Liquamen, What's in a Name? *Journal of Maritime Archaeology*, 13(3), 247–261. <https://doi.org/10.1007/s11457-018-9211-5>
- Grainger, S. (2021). The Story of Garum. In *The Story of Garum*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315269825>
- Holzapfel, W. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, 8(5–6), 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00017-0)
- Hutkins, R. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (R. W. Hutkins (ed.); 1st ed.). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277515>
- Ilango, S., & Antony, U. (2021). Probiotic Microorganisms from Non-Dairy Traditional Fermented Foods. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 617–638. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.034>
- Innova, M. I. (2022). *Top Ten Trends for 2022* (Issue December 2021). <https://www.innovamarketinsights.com/>
- Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01537-y>
- Josephsen, J., & Jespersen, L. (2004). Starter Cultures and Fermented Products. In Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, J. Josephsen, W.-K. Nip, & P. S. Stanfield (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (pp. 27–59). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203913550>
- Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In M. L. Nagpal, O. Boldura, C. Baltă, & S. Enany (Eds.), *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* (pp. 147–164). IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/67558>
- Katz, E. S. (2012). Fermentation as a Coevolutionary Force. In *The Art of Fermentation: An In-depth Exploration of Essential Concepts and Processes from Around the World* (pp. 1–16). Chelsea Green Publishing. <https://doi.org/10.14288/1.0076729>
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., & Lander, E. S. (2003). Sequencing and Comparison of Yeast Species to Identify Genes and Regulatory Elements. *Nature*, 423(6937), 241–254. <https://doi.org/10.1038/nature01644>
- Kose, S., & Hall, G. M. (2011). Sustainability of Fermented Fish Products. In G. M. Hall (Ed.), *Fish Processing - Sustainability and New Opportunities* (1st ed., pp. 138–166).

- Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444328585>
- Kurlansky, M. (2002). Salt's Salad Days. In *Salt: A World History* (pp. 61–79). Walker Publishing Company, Inc.
- Kurtzman, C. P. (2011a). *Meyerozyma Kurtzman & M: Suzuki* (2010). In C. P. Kurtzman (Ed.), *The Yeasts* (5th ed., Vol. 2, pp. 621–624). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00047-1>
- Kurtzman, C. P. (2011b). *Wickerhamomyces Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers* (2008). In C. P. Kurtzman (Ed.), *The Yeasts* (5th ed., Vol. 2, pp. 899–917). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00080-X>
- Lacasse, D. (2000a). As Bactérias. In *Introdução à Microbiologia Alimentar* (pp. 27–95). Instituto Piaget.
- Lacasse, D. (2000b). Os Fungos. In *Introdução à Microbiologia Alimentar* (pp. 97–125). Instituto Piaget.
- Lavrinienko, A., Jernfors, T., Koskimäki, J. J., Pirttilä, A. M., & Watts, P. C. (2021). Does Intraspecific Variation in rDNA Copy Number Affect Analysis of Microbial Communities? *Trends in Microbiology*, 29(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.019>
- Leiro, J. M., Castro, R., Arranz, J. A., & Lamas, J. (2007). Immunomodulating Activities of Acidic Sulphated Polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology*, 7(7), 879–888. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.007>
- Lin, H.-T. V., Huang, M.-Y., Kao, T.-Y., Lu, W.-J., Lin, H.-J., & Pan, C.-L. (2020). Production of Lactic Acid from Seaweed Hydrolysates via Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Fermentation*, 6(1), 37. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010037>
- Lloyd's Register Foundation. (2020). *Seaweeds Revolution: A Manifesto For A Sustainable Future* (D. Vincent, K. Aass, & M. Selwyn (eds.)). <https://unglobalcompact.org/library/5743>
- Lopetcharat, K., Choi, Y. J., Park, J. W., & Daeschel, M. A. (2001). Fish Sauce Products And Manufacturing: A Review. *Food Reviews International*, 17(1), 65–88. <https://doi.org/10.1081/FRI-100000515>
- Løvdal, T., Lunestad, B. T., Myrnes, M., Rosnes, J. T., & Skipnes, D. (2021). Microbiological Food Safety of Seaweeds. *Foods*, 10(11), 2719.

- <https://doi.org/10.3390/foods10112719>
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65(12), 535–543. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535-543>
- Mæhre, H., Dalheim, L., Edvinsen, G., Elvevoll, E., & Jensen, I.-J. (2018). Protein Determination—Method Matters. *Foods*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Mani, S. R., Vijayan, K., Jacob, J. P., Vijayakumar, S., & Kandhasamy, S. (2021). Evaluation of Probiotic Properties of *Lysinibacillus macroides* under in Vitro Conditions and Culture of *Cyprinus carpio* on Growth Parameters. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4705–4714. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02452-x>
- Marzano, A. (2018). Fish and Fishing in the Roman World. *Journal of Maritime Archaeology*, 13(3), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s11457-018-9195-1>
- Mauer, L. J., & Bradley, R. L. (2017). Moisture and Total Solids Analysis. In S. . Nielsen (Ed.), *Food Analysis. Food Science Text Series*. (pp. 257–286). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_15
- Milinic, J., Mata, P., Diniz, M., & Noronha, J. P. (2021). Umami Taste in Edible Seaweeds: The Current Comprehension and Perception. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23(June 2020), 100301. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100301>
- Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E., & Earle, J. A. P. (2000). A Simple and Sensitive Method to Extract Bacterial, Yeast and Fungal DNA from Blood Culture Material. *Journal of Microbiological Methods*, 42(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00174-3)
- Mintel. (2021). *Global Food and Drink Trends*. <https://downloads.mintel.com/private/vKd7N/files/817369/>
- Monteiro, P., Lomartire, S., Cotas, J., Pacheco, D., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2021). Seaweeds as a Fermentation Substrate: A Challenge for the Food Processing Industry. *Processes*, 9(11), 1953. <https://doi.org/10.3390/pr9111953>
- Mouritsen, O. G. (2013). *Seaweeds: Edible, Available & Sustainable* (1st ed.). The

University of Chicago Press.

- Mouritsen, O. G., Dawczynski, C., Duelund, L., Jahreis, G., Vetter, W., & Schröder, M. (2013). On the human consumption of the red seaweed dulse (*Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr). *Journal of Applied Phycology*, 25(6), 1777–1791. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0014-7>
- Mouritsen, O. G., Duelund, L., Calleja, G., & Frøst, M. B. (2017). Flavour of Fermented Fish, Insect, Game, and Pea Sauces: Garum Revisited. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 9(May), 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2017.05.002>
- Mouritsen, O. G., & Styrbæk, K. (2020). Design and 'Umamification' of Vegetable Dishes for Sustainable Eating. *International Journal of Food Design*, 5(1–2), 9–42. https://doi.org/10.1386/ijfd_00008_1
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J., & Roberts, I. N. (2000). Three New Species in the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(5), 1931–1942. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1931>
- Nora, F. M. D. (2021). Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos. In *Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos*. Mérida Publishers. <https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-0-5>
- Nout, M. J. R., & Aidoo, K. E. (2002). Asian Fungal Fermented Food. In *Industrial Applications* (pp. 23–47). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10378-4_2
- Øverland, M., Mydland, L. T., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9143>
- Padilla, B., Gil, J., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation*, 4(3), 68. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Å., & Schnitzler, J. (2006). Biotechnology,

- Physiology and Genetics of the Yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x>
- Patel, A. K., Singhanian, R. R., Awasthi, M. K., Varjani, S., Bhatia, S. K., Tsai, M.-L., Hsieh, S.-L., Chen, C.-W., & Dong, C.-D. (2021). Emerging Prospects of Macro- and Microalgae as Prebiotic. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01601-7>
- Peñalver, R., Lorenzo, J. M., Ros, G., Amarowicz, R., Pateiro, M., & Nieto, G. (2020). Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet. *Marine Drugs*, 18(6), 301. <https://doi.org/10.3390/md18060301>
- Pereira, L. (2009). *Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa*. Imprensa da Universidade de Coimbra. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0397-1>
- Pereira, L. (2011). A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. In Vitor H. Pomin (Ed.), *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses* (1st ed., pp. 15–47). © 2011 Nova Science Publishers, Inc.
- Pereira, L. (2016). *Edible Seaweeds of the World* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19970>
- Pereira, L. (2018). Nutricional Composition of the Main Edible Algae. In *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae* (1st ed., pp. 65–127). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315152844>
- Pérez-Alva, A., MacIntosh, A. J., Baigts-Allende, D. K., García-Torres, R., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2022). Fermentation of Algae to Enhance their Bioactive Activity: A Review. *Algal Research*, 64, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102684>
- Pinto, I. V., Magalhães, A. P., & Brum, P. (2014). An Overview of The Fish-Salting Production Centre at Tróia (Portugal). In E. Botte & V. Leitch (Eds.), *Fish & Ships: Production and Commerce of Salsamenta During Antiquity* (Issue April, pp. 145–157). Publications du Centre Camille Jullian. <https://doi.org/10.4000/books.pccj.1696>
- Prajapati, J. B., & Nair, B. M. (2008). The History of Fermented Foods. In E. Farnworth (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (1st ed., pp. 1–25). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420053289>
- Queirós, A. S., Circuncisão, A. R., Pereira, E., Válega, M., Abreu, M. H., Silva, A. M. S., &

- Cardoso, S. M. (2021). Valuable Nutrients from *Ulva rigida*: Modulation by Seasonal and Cultivation Factors. *Applied Sciences*, 11(13), 6137. <https://doi.org/10.3390/app11136137>
- Rafiquzzaman, S. M., Kong, I.-S., & Kim, J.-M. (2015). Enhancement of Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of *Saccharina japonica* by Submerged Fermentation with *Aspergillus oryzae*. *KSBB Journal*, 30(1), 27–32. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.1.27>
- Rai, A. K., Pandey, A., & Sahoo, D. (2019). Biotechnological Potential of Yeasts in Functional Food Industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83(November 2018), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>
- Reboleira, J., Silva, S., Chatzifragkou, A., Niranjana, K., & Lemos, M. F. L. (2021). Seaweed Fermentation Within the Fields of Food and Natural Products. *Trends in Food Science and Technology*, 116(July), 1056–1073. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.018>
- Rezaca, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Saljoughian, S., Amid, M., & Greiner, R. (2017). Application of Seaweeds to Develop New Food Products with enhanced Shelf-life, Quality and Health-Related Beneficial Properties. *Food Research International*, 99, 1066–1083. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.016>
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Saisithi, P. (1994). Traditional Fermented Fish: Fish Sauce Production. In A. M. Martin (Ed.), *Fisheries Processing: Biotechnological applications* (1st ed., pp. 111–131). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5303-8_5
- Salgado, C. L., Muñoz, R., Blanco, A., & Lienqueo, M. E. (2021). Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi *Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein. *Algal Research*, 53, 102135. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102135>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing With Chain-

- Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2019). Seaweeds as Nutraceuticals for Health and Nutrition. *Phycologia*, 58(5), 563–577. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1640533>
- Shoda, S. (2021). Seeking Prehistoric Fermented Food in Japan and Korea. *Current Anthropology*, 62(S24), S242–S255. <https://doi.org/10.1086/715808>
- Singh, V., Ganger, S., & Patil, S. (2020). Characterization of *Lactobacillus brevis* with Potential Probiotic Properties and Biofilm Inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. *The 1st International Electronic Conference on Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066014>
- Steinkraus, K. H. (2004). Origin and History of Food Fermentation. In Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, J. Josephsen, W.-K. Nip, & P. S. Stanfield (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (pp. 1–9). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203913550>
- Stiger-Pouvreau, V., Bourgougnon, N., & Deslandes, E. (2016). Carbohydrates From Seaweeds. In *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 223–276). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02206-X>
- Suraiya, S., Lee, J. M., Cho, H. J., Jang, W. J., Kim, D.-G., Kim, Y.-O., & Kong, I.-S. (2018). *Monascus* spp. Fermented Brown Seaweeds Extracts Enhance Bio-Functional Activities. *Food Bioscience*, 21(September 2017), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.005>
- Taboada, C., Millán, R., & MÃ-guez, I. (2009). Composition, Nutritional Aspects and Effect on Serum Parameters of Marine Algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3836>
- Tamang, J. P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., & Chae, S.-W. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Tamang, J. P. (2010). Diversity of Fermented Foods. In J. P. Tamang & K. Kailasapathy (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World* (pp. 42–72). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>
- Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., Mayo, B., Westerik, N.,

- & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
- Tamang, J. P., & Samuel, D. (2010). Dietary Cultures and Antiquity of Fermented Foods and Beverages. In J. P. Tamang & K. Kailasapathy (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World* (pp. 1–41). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>
- Tamang, J. P., Thapa, N., Bhalla, C. T., & Savitri. (2016). Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of India. In J. P. Tamang (Ed.), *Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of Asia* (1st ed., pp. 17–72). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2800-4>
- Tamang, J. P., Thapa, N., Tamang, B., Rai, A., & Chettri, R. (2015). Microorganisms in Fermented Foods and Beverages. In J. P. Tamang (Ed.), *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages* (First, pp. 1–110). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18279>
- Teixeira, P. (2014). LACTOBACILLUS | Lactobacillus brevis. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 418–424). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6>
- Terefe, N. S. (2016). Emerging Trends and Opportunities in Food Fermentation. In *Reference Module in Food Science* (pp. 1–9). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21087-1>
- Terefe, N. S., & Augustin, M. A. (2020). Fermentation for Tailoring the Technological and Health related Functionality of Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(17), 2887–2913. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1666250>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tyl, C., & Sadler, G. D. (2017). pH and Titratable Acidity. In S. . Nielsen (Ed.), *Food Analysis. Food Science Text Series*. (pp. 389–406). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_22
- Uchida, M. (2014). Fermentation of Seaweeds and Its Applications. In S.-K. Kim (Ed.),

- Seafood Science: Advances in Chemistry, Technology and Applications* (pp. 14–46). CRC Press.
- Uchida, M., Amakasu, H., Satoh, Y., & Murata, M. (2004). Combinations of Lactic Acid Bacteria and Yeast Suitable for Preparation of Marine Silage. *Fisheries Science*, 70(3), 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2004.00832.x>
- Uchida, M., & Miyoshi, T. (2013). Algal Fermentation—The Seed for a New Fermentation Industry of Foods and Related Products. *JARQ* 47 (1), 47(1), 53–63. <http://www.jircas.affrc.go.jp>
- Uchida, M., & Murata, M. (2004). Isolation of a Lactic Acid Bacterium and Yeast Consortium from a Fermented Material of *Ulva* spp. (Chlorophyta). *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1297–1310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02425.x>
- Walker, G. M. (2011). *Pichia anomala*: Cell Physiology and Biotechnology Relative to Other Yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungi Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, & J. J. Sninsky (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. (pp. 315–322). Academic Press.
- White, Thomas J., Arnheim, N., & Erlich, H. A. (1989). The Polymerase Chain Reaction. *Trends in Genetics*, 5(C), 185–189. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90073-5)
- Xu, Y., Zang, J., Regenstein, J. M., & Xia, W. (2021). Technological Roles of Microorganisms in Fish Fermentation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(6), 1000–1012. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1750342>
- Yamashita, H. (2021). Koji Starter and Koji World in Japan. *Journal of Fungi*, 7(7), 569. <https://doi.org/10.3390/jof7070569>
- Yan, W., Gao, H., Qian, X., Jiang, Y., Zhou, J., Dong, W., Xin, F., Zhang, W., & Jiang, M. (2021). Biotechnological Applications of the Non-Conventional Yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances*, 46(November 2020), 107674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107674>
- Yong, W. T. L., Thien, V. Y., Rupert, R., & Rodrigues, K. F. (2022). Seaweed: A Potential Climate Change Solution. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159,

112222. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112222>

Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Regenstein, J. M. (2020). Quality, Functionality, and Microbiology of Fermented Fish: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(7), 1228–1242. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1565491>

Zheng, L.-X., Chen, X.-Q., & Cheong, K.-L. (2020). Current Trends In Marine Algae Polysaccharides: The Digestive Tract, Microbial Catabolism, and Prebiotic Potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.168>

| A.

Anexos

I. Retas de calibração ácidos orgânicos, açúcares, glicerol e etanol

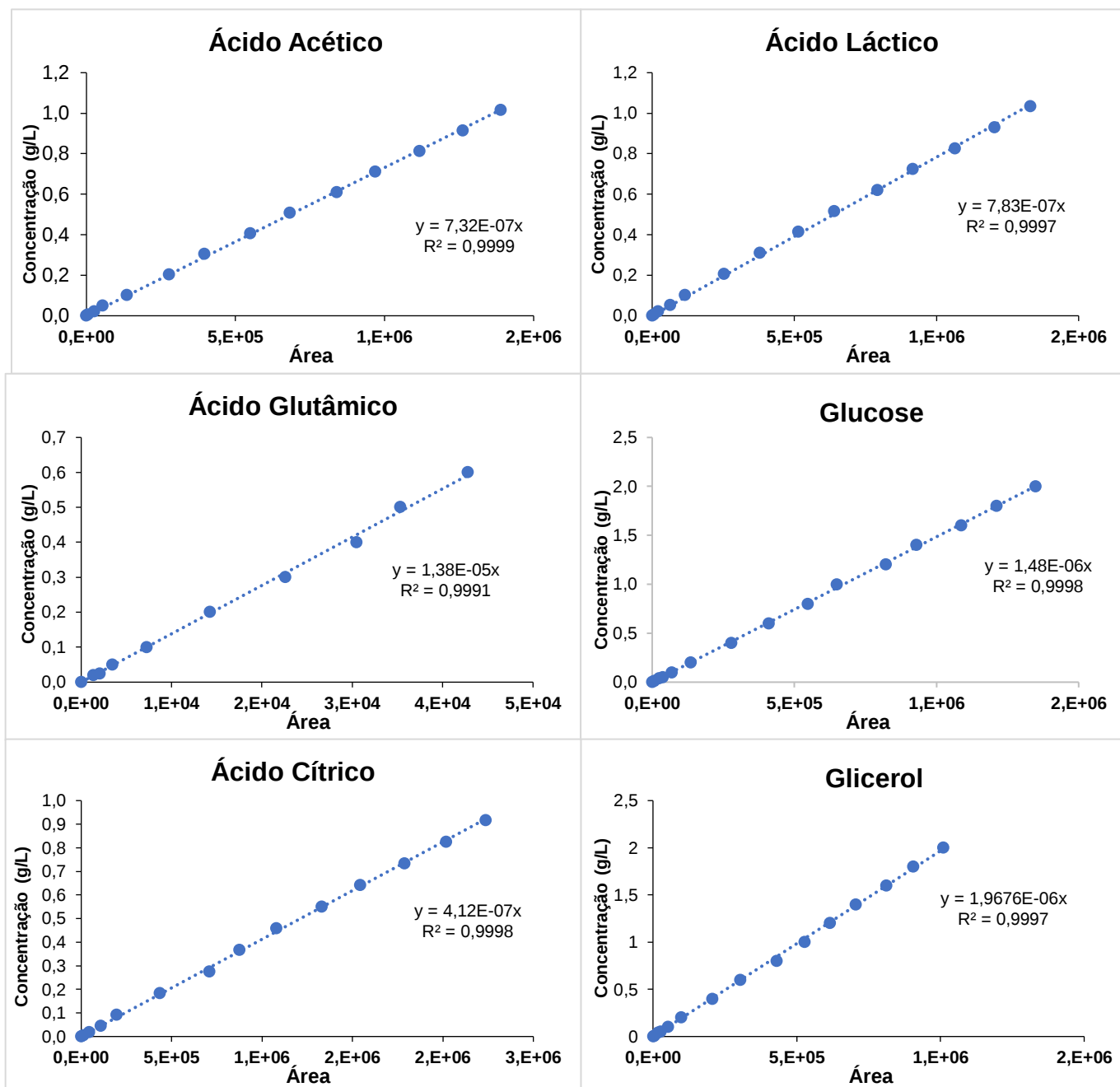


FIGURA 25 - RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO, LÁCTICO, GLUTÂMICO, ACÉTICO, GLUCOSE E GLICEROL.

II. Questionário de análise sensorial

Análise Sensorial: Dressings Fermentados de Macroalgas Portuguesas

Análise Sensorial: *Dressings* Fermentados de Macroalgas Portuguesas

Agradecemos a sua participação e contribuição para a realização desta prova de análise sensorial, realizada no âmbito de dissertação de mestrado em Ciências Gastronómicas para obtenção do Grau de Mestre.

O seguinte questionário tem como objetivo a avaliação das características organoléticas de dois temperos resultantes da fermentação de duas macroalgas portuguesas.

Informação Geral

A realização e preenchimento do questionário de análise sensorial é de carácter individual, pelo que não é permitida troca de informações sobre as amostras com outros provadores durante a sua realização. É obrigatório o preenchimento de todos os campos. Os dados recolhidos serão utilizados apenas no âmbito da prova de mestrado supracitada.

ATENÇÃO

Os temperos são preparados sem qualquer tipo de matéria-prima de origem animal, mas as macroalgas são cultivadas em regime de aquacultura multitrófica, podendo conter vestígios de **proteínas solúveis de crustáceos, peixes ou moluscos**.

Caso seja alérgico, intolerante ou tenha problemas associados ao consumo de sal e iodo, deverá informar o responsável, antes de iniciar a prova.

Muito obrigado e boa prova!

*Obrigatório

1. Data *

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

2. Idade *

3. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

☐ Feminino

☐ Masculino

4. Regime Alimentar *

Marcar apenas uma oval.

☐ Onívoro

☐ Flexitariano

☐ Vegetariano

☐ Vegan

5. Inclui macroalgas na sua alimentação ? *

Marcar apenas uma oval.

☐ Sim

☐ Não

6. Quais os *dressings* que utiliza usualmente como tempero para salada ou aromatização de pratos? *

Escreva até 3, por favor.

**Teste de Aceitação -
Amostra FX1**

INSTRUÇÕES DE PROVA

1. Para correta avaliação da cor utilize uma folha branca.
2. Cheire primeiro e só depois prossiga para a prova de paladar.
3. Retire com a pipeta 0,5 ml de produto para placa de petri para uma das metades
4. Coloque o croûton com parte rugosa no tempero, coloque na boca e saboreei.
5. Beba água entre a prova das amostras.

7. ASPECTO VISUAL

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito Desagradável

8. COR *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito Desagradável

9. **AROMA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

10. Indique até 3 palavras que descrevam os **aromas** sentidos. *

11. **SABOR ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

12. Indique até 3 palavras que descrevam os **sabores** sentidos. *

13. Selecione a intensidade sentida relativamente ao sal *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito intenso
☐ Intenso
☐ Indiferente
☐ Pouco intenso
☐ Nada intenso

14. **CONSISTÊNCIA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

15. **APRECIACÃO GLOBAL ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

16. **INTENÇÃO DE COMPRA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Compraria de todo
- ☐ Provavelmente compraria
- ☐ Não sei se compraria
- ☐ Provavelmente não compraria
- ☐ Não compraria de todo

**Teste de Aceitação -
Amostra N3F**

1. Para correta avaliação da cor utilize uma folha branca.
2. Cheire primeiro e só depois prossiga para a prova de paladar.
3. Retire com a pipeta 0,5 ml de produto para placa de petri para uma das metades.
4. Coloque o croûton com parte rugosa no tempero, coloque na boca e saboreei.
5. Beba água entre a prova das amostras.

17. **ASPECTO VISUAL**

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito Desagradável

18. **COR ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

19. **AROMA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

20. Indique até 3 palavras que descrevam os **aromas** sentidos. *

21. **SABOR ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
☐ Agradável
☐ Indiferente
☐ Desagradável
☐ Muito Desagradável

22. Indique até 3 palavras que descrevam os **sabores** sentidos. *

23. Selecione a intensidade sentida relativamente ao sal *

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito intenso
☐ Intenso
☐ Indiferente
☐ Pouco intenso
☐ Nada intenso

24. **CONSISTÊNCIA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito Desagradável

25. **APRECIÇÃO GLOBAL ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Muito Agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito Desagradável

26. **INTENÇÃO DE COMPRA ***

Marcar apenas uma oval.

- ☐ Compraria de todo
- ☐ Provavelmente compraria
- ☐ Não sei se compraria
- ☐ Provavelmente não compraria
- ☐ Não compraria de todo

27. Comentários e Observações

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pela Google.

Google Formulários



FIGURA 26 - QR PARA PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO DE ANÁLISE SENSORIAL.

III. Retas de calibração parâmetros de análise química

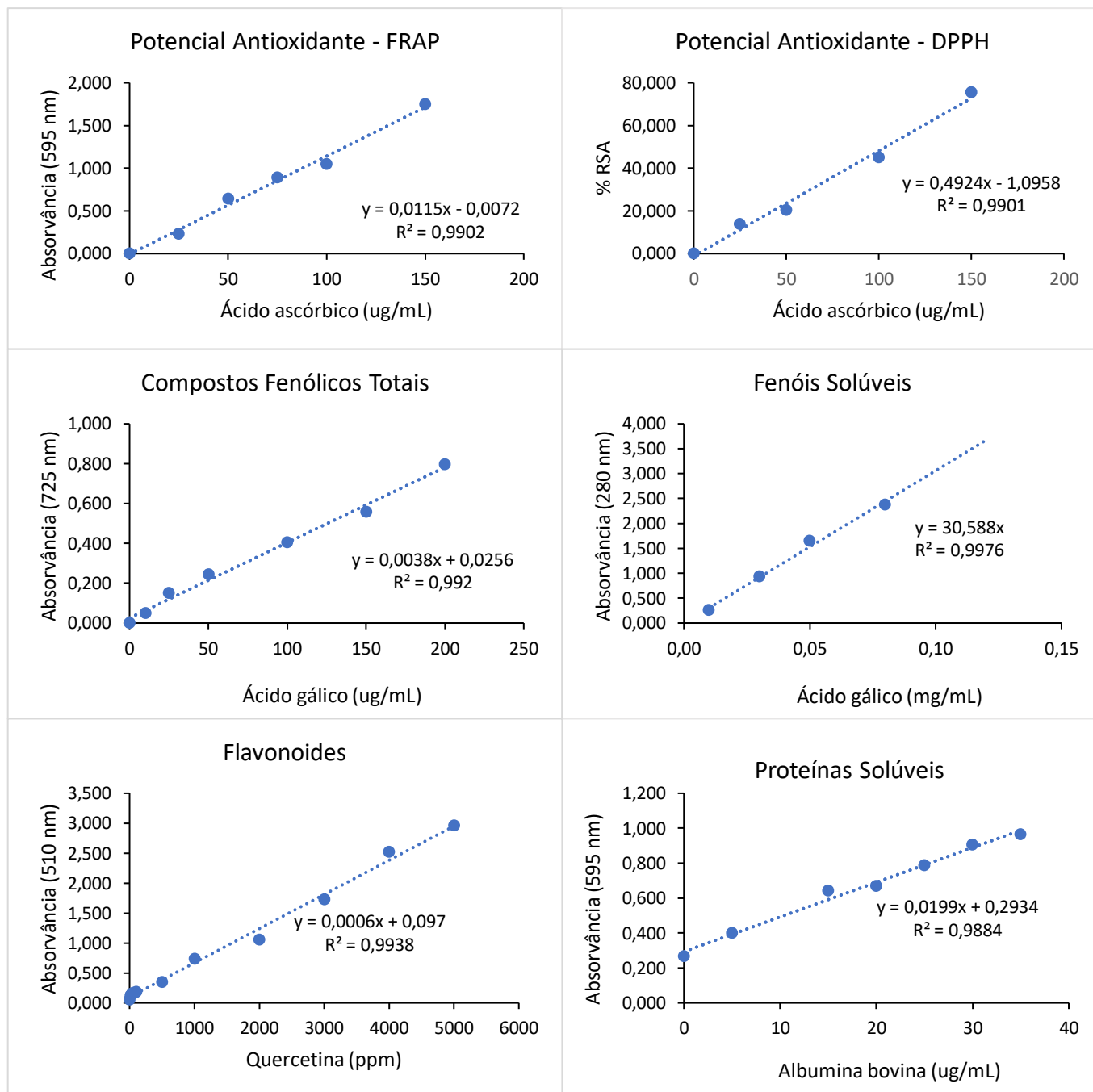


FIGURA 27 -RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES DE FRAP, DPPH, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FENÓIS SOLÚVEIS, FLAVONOIDES E PROTEÍNAS SOLÚVEIS.



2022

Ana Catarina Sousa Costa

VEGarum: Inovação de uma Iguaria Gastronómica Ancestral
através da Fermentação de *Palmaria palmata* e *Ulva rigida*