



**Ana Carolina
Soares Veríssimo**

**Estudo do perfil de ácidos gordos de
Salicornia ramosissima para a sua
valorização nutricional e determinação da
origem geográfica**

**Study of the fatty acid profile of *Salicornia
ramosissima* for its nutritional valorization
and determination of geographical origin**



**Ana Carolina
Soares Veríssimo**

**Estudo do perfil de ácidos gordos de
Salicornia ramosissima para a sua
valorização nutricional e determinação da
origem geográfica**

**Study of the fatty acid profile of *Salicornia
ramosissima* for its nutritional valorization
and determination of geographical origin**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Ricardo Calado, Investigador Principal com Agregação em Regime Laboral do CESAM e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Traseafood - Rastreabilidade da Origem Geográfica como uma Via de Valorização Inteligente dos Recursos Marinhos Endógenos ao abrigo do programa Operacional da Competitividade e Internacionalização (02/SAICT/2017) e fundo da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Agradecemos financiamento ao CESAM (UIDB/50017/2020 + UIDP/50017/2020)

*Dedico este trabalho à memória do meu avô Zé e da minha
prima Catarina*

o júri

presidente

Prof. Doutor Brian James Goodfellow

Professor Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutora Ana Isabel Francisco Sousa

Equiparada a Investigadora auxiliar, Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques
Domingues

Professora Associada c/ agregação, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Rosário Domingues e Doutor Ricardo Calado pela oportunidade concedida, pela incansável orientação científica, por todo o apoio, disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo deste trabalho. À Doutora Elisabete Maciel por todo o suporte, conhecimento transmitido e orientação.

A todos os membros do projeto TraSeafood, por toda a ajuda. Em particular, ao Doutor Fernando Ricardo, por todo o conhecimento transmitido, orientação, tempo despendido e apoio constante.

Ao grupo de lipidómica marinha, pelo acolhimento, ajuda e boa disposição. Em particular ao Tiago Conde e à Daniela pela ajuda e disponibilidade. À Doutora Elisabete Costa e à Marisa por toda a simpatia, motivação, partilha de conhecimento e preocupação demonstrada. Por estarem sempre disponíveis para me ajudar. Por todo o companheirismo em todos os momentos, em particular nos mais difíceis. Obrigada!

A todos os meus amigos, em especial à Barbara, pela amizade, paciência e apoio. Por todos os momentos bons passados ao longo dos anos de Universidade. Só assim foi possível chegar aqui.

A toda a minha família por todo o carinho e confiança. Por estarem presentes nos momentos importantes e por acreditarem em mim.

O mais sincero obrigada, aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado por todo o apoio incondicional, por toda a compreensão, e por acreditarem sempre em mim. Por estarem sempre lá, nos momentos de conquistas e alegrias e nos momentos difíceis. Por não me deixarem desistir, mostrando-me sempre o objetivo final desta etapa e acompanhando-me neste percurso, por me ajudarem a manter-me firme. Um profundo obrigado por estarem sempre a meu lado!

Ao meu avô Zé, que teria muito orgulho de me ver concluir esta etapa, e à minha prima Catarina. Deles guardo a perseverança, o trabalho e a alegria de viver... princípios que levo para a vida e nos quais me suportei para a realização desta dissertação.

Palavras-chave

Halófitas, Rastreabilidade, ácidos gordos *n*-3, GC-MS, valorização nutricional.

Resumo

Salicornia ramosissima, também conhecida como sal verde, é uma planta halófitas, e caracteriza-se pela sua capacidade de sobreviver em ambientes costeiros com altas concentrações de sal. Atualmente, esta planta está bem estabelecida na Europa, sendo cultivada e utilizada para diversas aplicações. Ela é consumida como um “legume do mar” ou como um substituto do sal. Uma das suas características nutricionais que tem despertado interesse é a sua composição em lípidos, nomeadamente pela presença de ácidos gordos (FA - do inglês *fatty acids*) *n*-3, incluindo FA essenciais com benefícios para a saúde. No entanto, o perfil de FA pode variar com as condições ambientais, tais como salinidade e temperatura. Com o aumento do consumo e da produção deste “vegetal marinho”, tem surgido a necessidade de compreender como é que a sua composição bioquímica, e em especial os lípidos, são afetados pelas condições abióticas. A identificação de uma assinatura de FA poderá ser utilizada como informação para identificação do local de origem de *S. ramosissima*, tal como já foi descrito para outras macrófitas marinhas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade espacial do perfil de FA de *S. ramosissima* e avaliar se essa variabilidade pode ser usada para rastrear a sua origem geográfica. Os FA de *S. ramosissima* recolhidas em diferentes locais ao longo da Costa Continental Portuguesa foram analisados por GC-MS. Os resultados mostraram que os extratos lipídicos apresentam um alto teor de FA essenciais, tais como 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3. O perfil de FA mostrou variação na abundância relativa de algumas destas moléculas em função da origem das amostras em estudo. Nas amostras da Figueira da Foz foi possível identificar um FA epóxido. A análise estatística realizada evidenciou a existência de diferenças significativas entre os locais, baseada nos perfis de FA, podendo estes ser usados como uma impressão digital lipídica para cada local de origem. Deste modo, a assinatura lipídica tem potencial para ser usada para rastrear a origem geográfica de *S. ramosissima*, podendo contribuir para salvaguardar a qualidade e certificar a origem destas plantas, tal como para aumentar a segurança dos consumidores que procuram cada vez mais produtos saudáveis com melhores propriedades nutricionais.

Keywords

Halophytes, traceability, *n*-3 fatty acids, GC-MS, nutritional valorization.

Abstract

Salicornia ramosissima, also known as green salt, is a halophyte plant, that can survive in coastal environments with high salt concentrations. Nowadays, this plant is well-established in Europe, being cultivated and used for several applications. It is currently consumed as a sea vegetable or as a salt substitute. One of its main nutritional features is its lipid composition, namely the presence of *n*-3 fatty acids (FA), including essential FA, with health promoting benefits. However, the FA profile can vary with environmental conditions, such as salinity and temperature. With the increase in the consumption and production of this marine vegetable, there is a need to understand how its biochemical and nutritional composition, namely lipids, are affected by abiotic conditions. The identification of a FA signature can also be used to identify its place of origin, as has already been described for other marine macrophytes. Thus, the present work aimed to evaluate the spatial variability of the FA profile of *S. ramosissima* and identify if this variability can be used to trace its geographic origin. The FA of *S. ramosissima* collected in different locations along the Portuguese coast were profiled by GC-MS. The results showed that lipid extracts have a high content of essential FA, such as 18:2*n*-6 and 18:3*n*-3. The FA profiles analyzed evidenced variation in the relative abundance of some FA, depending on the origin of samples. In samples collected from Figueira da Foz it was possible to identify an epoxide FA. The statistical analysis carried out showed the existence of significant differences in the FA profiles of plants from different locations, and these can be used as a site-specific lipid fingerprint. This lipid signature holds the potential to be used to trace the geographic origin of *S. ramosissima*, thus contributing to safeguard its quality and certify the origin of these plants, as well as to increase the safety of consumers looking for more healthy products with better nutritional properties.

Índice

Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas.....	VI
Abreviaturas	VIII
1. Introdução.....	1
1.1. Halófitas, vegetais tolerantes ao cultivo em solos salinos	1
1.2. Halófitas – plantas que toleram ambientes salinos	2
1.2.1. O que são plantas halófitas e as suas aplicações	2
1.2.2. <i>Salicornia</i> – Composição química e bioquímica	6
1.2.2.1. Importância da composição lipídica na valorização de <i>Salicornia</i>	9
1.3. A importância da rastreabilidade em plantas halófitas	13
1.3.1. A rastreabilidade de alimentos	13
1.3.2. Métodos de determinação da origem dos alimentos	15
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Obtenção e preparação das amostras.....	21
3.2. Extração lipídica	22
3.3. Análise de ácidos gordos.....	23
3.3.1. <i>Método de transesterificação</i>	23
3.3.2. <i>Método de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)</i> 24	
3.3.3. <i>Identificação e integração dos ácidos gordos</i>	25
3.3.4. <i>Índices de qualidade lipídica</i>	26
3.4. Análise Estatística	26
4. Resultados e Discussão.....	29
4.1. Identificação dos Ácidos gordos.....	29
4.2. Ácidos gordos da família ómega e sua contribuição para o valor nutricional das halófitas e índices lipídicos	35
4.3. Utilização do perfil de ácidos gordos na rastreabilidade da origem geográfica	41
5. Conclusão	47
6. Bibliografia	49

Lista de Figuras

Figura 1: Aplicações de plantas halófitas.....	3
Figura 2: <i>Salicornia ramosissima</i> , por Ana Lillebø, e a sua distribuição geográfica ao longo da costa Portuguesa ²⁶	5
Figura 3: Produtos alimentares com <i>Salicornia ramosissima</i> : (a) rebentos frescos (snack); (b) em conserva ou como (c) tempero – seca e moída (Sal Verde).....	5
Figura 4: Metabolismo dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3. Esquema simplificado do metabolismo dos PUFA <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3, que envolve enzimas de dessaturação e alongamento e os respetivos derivados eicosanóides. AA – ácido araquidónico; ALA – ácido α -linolénico; DHA – ácido docosaeaenóico; EPA – ácido eicosapentanóico; LA – ácido linoleico.....	12
Figura 5: Ilustração da cadeia de rastreabilidade evidenciando todo o percurso do produto/alimento desde o produtor (origem) até ao consumidor.	14
Figura 6: Locais onde foram realizadas as recolhas de <i>Salicornia ramosissima</i> , ao longo da costa continental Portuguesa e respetivas coordenadas.....	21
Figura 7: Moinho mecânico (Retsch, RM 200, Alemanha) (a) utilizado para macerar as amostras liofilizadas de <i>S. ramosissima</i> (b).....	22
Figura 8: Extração lipídica: a fase orgânica recolhida (a) é sujeita a uma lavagem com água Milli-Q, formando 2 fases (b). Por fim, recolhe-se a fase orgânica obtida após a lavagem - extrato lipídico (c).....	22
Figura 9: Método de transesterificação dos ácidos gordos: após a adição do padrão interno C19:0, do hidróxido de potássio(2M) em metanol e da solução aquosa de NaCl (10 g/L), obtêm-se duas fases (fase orgânica e fase aquosa). Da fase orgânica (fase superior) são recolhidos 600 μ L para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	23
Figura 10: Aparelho de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).	24
Figura 11: Esquema-resumo da metodologia usada para a identificação do perfil de ácidos gordos: a biomassa da <i>Salicornia ramosissima</i> , depois de macerada, é sujeita a uma extração lipídica. Os ácidos gordos presentes no extrato lipídico obtido são metilados por uma transmetilação alcalina. De seguida os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) são analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	

(GC-MS). Os cromatogramas e espectros de massa são analisados de modo a obter o perfil de ácidos gordos.....	25
Figura 12: Cromatogramas dos ácidos gordos presentes no extrato lipídico de rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> dos 4 locais da costa Portuguesa ((a) Ria de Aveiro (RAv); (b) Figueira da Foz (FF); (c) Estuário do Tejo (ET); (d) Ria Formosa (RF)), com a identificação dos picos correspondentes a cada um dos ácidos gordos.....	30
Figura 13: Contribuição de cada classe de ácido gordos para o perfil de FA de rebentos de <i>S ramosissima</i> obtidos em 4 locais da costa continental portuguesa: RAv - Ria de Aveiro, FF - Figueira da Foz, ET – Estuário do Tejo; RF – Ria Formosa. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.....	32
Figura 14: Representação do FAME 9,10-epoxi-octadecanoico e dos seus fragmentos $m/z = 155$ e $m/z = 199$ (a); espectros de massa do ácido 9,10-epoxi-octadecanoico: Espectro de massa adaptado de 71 (b) e o espectro de massa obtido na análise por cromatografia gasosa apoiada a espectrometria de massa (GC-MS) (c).	34
Figura 15: Representação da reação de formação do ácido 9, 10-epóxi-octadecanoico por ação de uma família de enzimas P450.....	34
Figura 16: Representação gráfica da abundância relativa de ácidos gordos $n-3$ e $n-6$ (a) e do rácio $n-3/n-6$ (b) em rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> de cada um dos locais amostrados: RAv - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$).....	36
Figura 17: Representação gráfica do índice de Aterogenicidade (IA) (a) e do Índice de Trombogenicidade (IT) (b) registados em rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> amostrada em cada um dos locais em estudo (RAv - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa). Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$).....	40
Figura 18: Análise canónica das coordenadas principais (CAP) do perfil de ácidos gordos da <i>S. ramosissima</i> dos 4 locais em estudo: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).	44
Figura 19: Análise canónica das coordenadas principais (CAP) baseada no perfil de ácidos gordos de rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> em 4 locais da costa continental Portuguesa. RAv - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa	45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição bioquímica (humidade, proteína, lípidos, fibras e cinzas), quantidade de minerais e a concentração de tocoferol, clorofila e carotenoides presentes em diferentes espécies de <i>Salicornia</i>	8
Tabela 2: Perfil de ácidos gordos de diferentes espécies de <i>Salicornia</i> , expresso em % de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME - do inglês <i>fatty acids methyl esters</i>) totais.	10
Tabela 3: Prós e contras dos métodos usados na determinação da origem geográfica.	16
Tabela 4: Abundância relativa de ácidos gordos presentes em rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> em % (valores da média \pm desvio padrão (SD)) e respetiva variação para cada ácido gordo presente nos 4 locais: RAv (Ria de Aveiro), ET (Estuário do Tejo) e RF (Ria Formosa) (n=30 por local, exceto para FF (Figueira da Foz) com n=27).	31
Tabela 5: Diferenças significativas (ANOVA) entre os ácidos gordos presentes nos rebentos de <i>S. ramosissima</i> dos 4 locais da costa Portuguesa: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF). SFA - ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - ácidos gordos polinsaturados; n-3 - ácidos gordos n-3; n-6 – ácidos gordos n-6, n-6/n-3 – rácio n-6/n-3; IA - índice de aterogenicidade; IT - índice de tromogenicidade. Os valores de <i>p</i> destacados em negrito são <0,05. Não é apresentado o ácido 9, 10-epóxi-octadecanóico, uma vez que este só está presente na Figueira da Foz.	37
Tabela 6: Valores de similaridade (ANOSIM) entre o perfil de ácidos gordos de rebentos de <i>S. ramosissima</i> amostradas na Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).	41
Tabela 7: Sucesso de classificação da análise canônica das coordenadas principais (CAP) do perfil de ácidos gordos da <i>Salicornia ramosissima</i> nos 4 locais da costa Portuguesa: Ria de Aveiro (Av), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF)	43
Tabela 8: Sucesso de classificação da validação cruzada para rebentos de <i>Salicornia ramosissima</i> com base no seu perfil de ácidos gordos em 4 locais da costa continental Portuguesa: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).....	46

Abreviaturas

AA – ácido araquidónico (C20:4n-6) (do inglês *arachidonic acid*)

ALA – ácido α -linolénico (C18:3 n-3) (do inglês *alpha linolenic acid*)

CAP – análise canónica das coordenadas principais (do inglês *Canonical analysis of principal coordinates*)

DHA – ácido docosahexanóico (C22:6n-3) (do inglês *docosahexaenoic acid*)

EPA – ácido eicosapentanóico (C20:5n-3) (do inglês *eicosapentaenoic acid*)

ET – Estuário do Tejo

FA – ácidos gordos (do inglês *Fatty Acids*)

FAME – ésteres metílicos de ácidos gordos (do inglês *fatty acids methyl esters*)

FF – Figueira da Foz

GC – cromatografia gasosa (do inglês *gas chromatography*)

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês *gas chromatography coupled with mass spectrometry*)

GL – glicolípidos (do inglês *glycolipids*)

IA – índice de aterogenicidade

IT – índice de trombogenicidade

LA – ácido linoléico (C18:2n-6) (do inglês *linoleic acid*)

MS – espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

MUFA – ácidos gordos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*)

m/z – massa/carga

n-3 – ómega-3

n-6 – ómega 6

PL – fosfolípidos (do inglês *phospholipids*)

PUFA – ácidos gordos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*)

RAv – Ria de Aveiro

RF – Ria Formosa

SFA – ácidos gordos saturados (do inglês *saturated fatty acids*)

SIA – análise de isótopos estáveis (do inglês *stable isotope analysis*)

1. Introdução

1.1. Halófitas, vegetais tolerantes ao cultivo em solos salinos

A população mundial tem vindo a aumentar e estima-se que até 2050 cresça em 2 biliões de habitantes, atingindo valores entre os 9 e 10 biliões ^{1,2}. Associado a este crescimento prevê-se também um aumento de 50% na procura de alimentos ¹, o que implica uma maior necessidade de produção e, conseqüentemente, uma maior área destinada à agricultura. Assim, é necessário procurar novos terrenos que possam ser utilizados para a produção de alimentos. Contudo, a continua subida do nível do mar e a escassez de água doce, devido às alterações climáticas, tem levado ao aumento da salinização dos solos ¹. Este efeito é mais frequente em zonas costeiras, transformando solos anteriormente férteis e úteis para cultivos convencionais em solos com elevadas concentrações de sais, afetando o seu potencial uso para a agricultura ¹. A salinização dos solos, para além de afetar a produção agrícola, afeta também a qualidade dos recursos naturais aí obtidos e leva ao desequilíbrio dos ecossistemas, tendo também implicações nas condições de vida e na economia local ¹. Assim, o cultivo de plantas, tais como as plantas halófitas, que possuam tolerância ao sal começa a ser usado para a utilização destes solos para fins de produção de alimentos.

Atualmente, é importante procurar soluções que permitam alcançar uma produção agrícola sustentável, por exemplo, recorrendo a solos salinizados e à utilização de água salobra e/ou salgada. Desta forma o cultivo de plantas tolerantes ao sal é considerado uma estratégia promissora para fazer face à crescente necessidade de alimento, ao aumento da salinização dos solos e à escassez de água doce. Estas plantas halófitas têm sido cada vez mais utilizadas na alimentação humana devido à sua textura, sabor salgado e ao elevado valor nutricional, pela presença de ácidos gordos (FA - do inglês *Fatty Acids*) *n*-3, pelo que se tem observado um aumento do seu consumo e produção³.

1.2. Halófitas – plantas que toleram ambientes salinos

1.2.1. O que são plantas halófitas e as suas aplicações

Apenas uma pequena parte das plantas - 1% da flora mundial ⁴ - é capaz de se desenvolver com exposição repetida a elevadas concentrações salinas. A este tipo de extremófilos dá-se o nome de plantas halófitas ⁵. De acordo com Flowers e Colmer ⁴, as halófitas são plantas com capacidade de se desenvolverem e reproduzirem em ambientes salinos, onde a concentração de sal é igual ou superior a 200 mM de NaCl, podendo em situações extremas atingir os 400 mM de NaCl ^{4,6}, valores potencialmente letais para plantas glicófitas (não-halófitas) ⁷. Assim, o desenvolvimento de plantas halófitas em ambientes de hipersalinidade envolve adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas ⁵. Este mecanismo de tolerância à salinidade depende principalmente da captação controlada de iões pelo sistema radicular, da compartimentalização dos iões de Na⁺ e Cl⁻ nos vacúolos celulares e da síntese de solutos orgânicos compatíveis ^{4,8}. A acumulação de iões de Na⁺ e Cl⁻ nos vacúolos celulares provoca um desequilíbrio do potencial osmótico das células, que é compensado pela acumulação de solutos orgânicos no citoplasma (tais como açúcares, amino ácidos, compostos relacionados com metilados de prolina e betaínas) ^{4,5,7}.

As plantas halófitas podem ser encontradas em diferentes locais do planeta, principalmente, em zonas com uma elevada concentração de sal, como águas pouco profundas junto à costa, estuários, salinas e desertos salinos ⁵. Há vários séculos que as halófitas são utilizadas pelo homem, devido tanto às suas qualidades medicinais, como pelo seu alto teor em sal ⁹. Estas plantas começaram por ser utilizadas, principalmente nos países asiáticos, como ervas medicinais (por exemplo na medicina tradicional Coreana ¹⁰) e também na alimentação ⁹. As halófitas tradicionalmente mais usadas, quer na alimentação quer na medicina tradicional, são do género *Salicornia*, tal como *Salicornia herbacea* ^{10,11}, *Salicornia bigelovii* e *Salicornia europaea* ¹², assim como do género *Atriplex*, nomeadamente *Atriplex hortensis* ¹².

Nos últimos anos as plantas halófitas têm conhecido novas aplicações, nomeadamente na alimentação humana ^{12,13}, a biorremediação dos solos ¹⁴⁻¹⁶, no tratamento de efluentes

salinos de aquacultura ^{17,18}, na forragem animal ^{19,20} ou como fonte de energia renovável – biodiesel ^{21,22} (Figura 1).

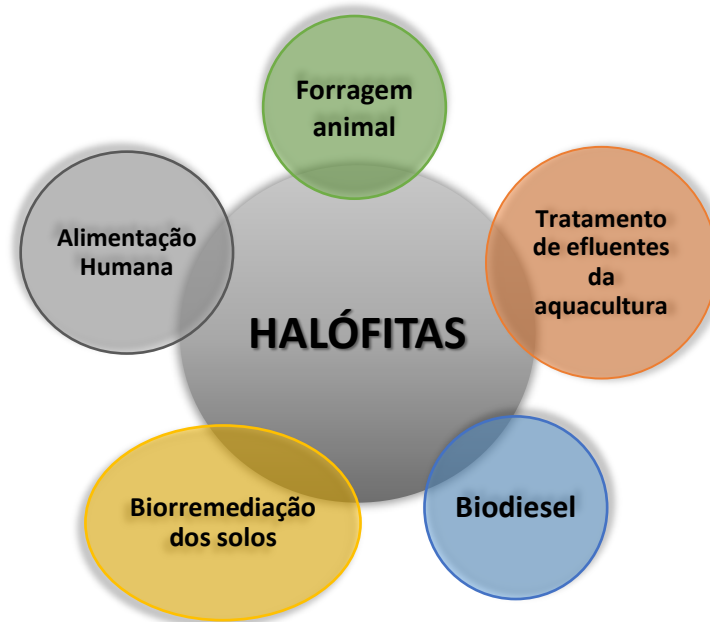


Figura 1: Aplicações de plantas halófitas.

Estas plantas podem ter um importante papel na descontaminação dos solos, através da sua capacidade de bioacumular metais ou tolerar níveis elevados de iões tóxicos ^{15,16}, permitindo a biorremediação dos solos. De facto, este mecanismo de adaptação que permite às plantas halófitas sobreviver em concentrações elevadas de Na^+ e Cl^- confere-lhes igualmente uma tolerância a outros iões potencialmente tóxicos, tais como metais ¹⁴. No entanto este processo torna-as impróprias para o consumo humano e animal.

Estas plantas podem ainda ser consideradas como biofiltros em sistemas de aquacultura integrada ^{17,18}. Nestes sistemas de aquacultura integrada há várias espécies que são cultivadas em diferentes níveis tróficos, sempre com o objetivo de aumentar a produção total e minimizar desperdícios. Este tipo de sistemas permite o co-cultivo de peixes e macrófitas marinhas, tais como algas e halófitas. Os nutrientes presentes na água decorrente da atividade de produção piscícola, são aproveitados para a produção de macrófitas (algas, halófitas), que por sua vez são usadas como alimento para os peixes ou para consumo humano ²³. Assim, o tratamento de efluentes salinos da aquacultura, evita o desperdício de nutrientes, e por outro lado evita a contaminação/alteração dos ecossistemas junto a essas zonas de produção ²³.

Algumas plantas halófitas, tais como *Salicornia bigelovii*²⁰ e *Salicornia europaea*¹⁹ foram testadas para serem usadas como forragem animal. Contudo, a acumulação de sal reduz o valor nutricional e a qualidade alimentar da maioria das plantas, impedindo assim o seu uso isolado para forragem animal, porém poderiam ser utilizadas como suplemento alimentar^{12,20}. Assim surgiu a possibilidade de utilizar espécies halófitas com baixa acumulação de sal em combinação com espécies herbáceas anuais, o que, mesmo assim, se revelou uma prática pouco benéfica para a alimentação animal²⁴.

Contudo, é na alimentação humana que estas plantas têm ganho real destaque. O aumento da procura, por parte dos consumidores, de novos alimentos, que possam ser usados como alimentos e/ou condimentos mais saudáveis com melhores propriedades nutricionais, capazes de serem produzidos de forma sustentável, contribuiu para a utilização destas plantas na alimentação. Assim a utilização de halófitas na alimentação tem crescido rapidamente, o que levou ao aumento da produção e comercialização destas plantas. Das várias espécies de halófitas, atualmente utilizadas, destaca-se a espécie *Salicornia ramosissima*, por ser a mais produzida e comercializada para a alimentação humana. Esta planta, pertencente à família *Chenopodiaceae* e ao género *Salicornia*, apresentando uma altura de 30 a 40 cm, um tronco suculento aparentemente sem folhas e um sabor salgado⁹. Apresenta uma cor verde, ficando laranja, rosa avermelhado no Outono, antes da planta morrer durante o Inverno. Tem uma distribuição geográfica que abrange a zona Oeste da Europa e a zona Noroeste de África²⁵. Em Portugal, esta planta surge em grande evidência na sua forma selvagem ao longo de toda a zona costeira, sendo habitual em estuários e pântanos salgados (sapais)²⁶. Na Figura 2 encontra-se representada a distribuição geográfica da espécie *S. ramosissima* ao longo da costa portuguesa. Esta planta é utilizada desde tempos antigos na alimentação, principalmente, nos países asiáticos¹⁰. Atualmente a sua utilização já está estabelecida na alimentação ocidental, em particular na Europa, como um vegetal saudável. Ela tem sido mais utilizada na cozinha gourmet¹², sendo conhecida como “Sea asparagus”⁹ ou como “Erva-Salada” (em Portugal e Espanha)¹⁰. Devido ao seu elevado teor de sal é utilizada como um substituto do sal convencional, podendo ser consumida em saladas frescas^{10,11}, em conserva, como um *snack* ou ainda como tempero, na forma seca e moída, ganhando assim a designação de “Sal Verde”¹⁰ (Figura 3). Com o aumento do seu consumo, houve também um desenvolvimento dos métodos de produção e comercialização desta planta. Se por um lado há empresas que apostam na apanha da planta selvagem e na sua venda

²⁷, há também outras empresas que a cultivam em estufas (hidroponia) ²⁸, com o objetivo da sua comercialização. Existem ainda empresas que produzem estas plantas em sistemas de aquacultura integrada ²⁹.

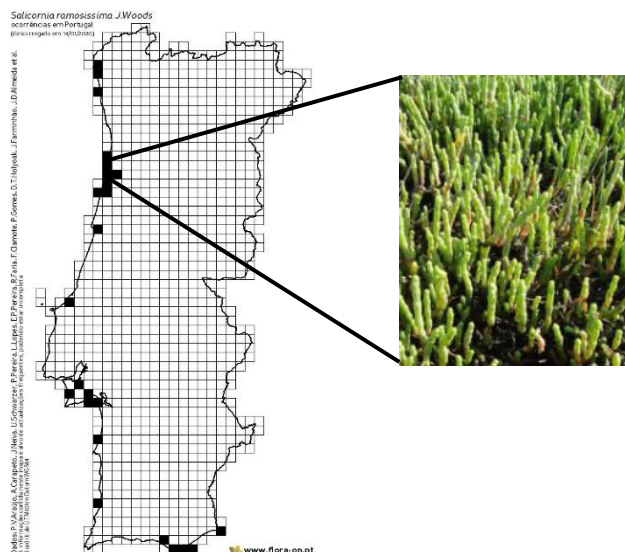


Figura 2: *Salicornia ramosissima*, por Ana Lillebø, e a sua distribuição geográfica ao longo da costa Portuguesa ²⁶.



Figura 3: Produtos alimentares com *Salicornia ramosissima*: (a) rebentos frescos (snack); (b) em conserva ou como (c) tempero – seca e moída (Sal Verde).

Em suma, o aumento da utilização e implementação de plantas halófitas em diferentes áreas levou á necessidade de obter novos conhecimentos relativamente a estas plantas. Para tal, foram já realizados diversos estudos que abordam estas plantas, sob diferentes perspetivas, e com a possibilidade de serem aplicadas em vários contextos, desde a agricultura, até à indústria, passando pela alimentação quer animal, quer humana, tal como foi mencionado anteriormente. De todas estas aplicações a que apresenta uma

maior adesão é a alimentação humana. Neste sector as plantas halófitas que tem ganho maior destaque pertencem ao género *Salicornia*. Assim, no capítulo seguinte irá ser abordada a composição química e bioquímica de diferentes espécies de *Salicornia*, de entre as quais se destaca *S. ramosissima*.

1.2.2. *Salicornia* – Composição química e bioquímica

Com o crescente interesse e utilização de plantas halófitas em diferentes áreas, houve a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a sua composição. Nos últimos anos têm surgido diferentes estudos que abordam a composição química (minerais, tocoferol, clorofila e carotenoides) e bioquímica (humidade, proteína, lípidos, fibras e cinzas) de diferentes espécies de *Salicornia*^{10,13,35,36,20–22,30–34}, onde se inclui *S. ramosissima*^{10,13,34,35}. Estes estudos abordaram a composição dos talos comestíveis (rebentos), bem como das raízes e sementes. Contudo a maioria dos estudos realizados foca-se principalmente na parte edível da planta. Na Tabela 1 encontram-se resumidos os resultados obtidos para a composição química e bioquímica das espécies *Salicornia bigelovii*³⁰, *Salicornia perennans*³¹, *Salicornia herbacea*³², *Salicornia persica*³⁶ e a *S. ramosissima*¹³. Estes resultados cingem-se, principalmente, aos parâmetros bioquímicos (tais como a humidade, proteína, lípidos, fibras e cinzas), à quantidade de minerais e ainda à concentração de biomoléculas como tocoferol, clorofila II e carotenoides presentes nas plantas. Os estudos descritos mostram resultados diferentes consoante as espécies estudadas e refletem também a variação entre os diferentes órgãos da planta (sementes, rebentos e raízes). Os parâmetros que mostram maiores variações são os da composição bioquímica (humidade, proteína, lípidos, fibras e cinzas) e que os outros (como minerais, tocoferol, clorofila II e carotenoides) mantêm-se mais constantes entre as diferentes espécies de *Salicornia*. Quando comparamos a composição bioquímica dos diferentes órgãos de uma planta (sementes e rebentos), são a proteína e os lípidos que apresentam uma maior variação. Quer as proteínas, quer os lípidos encontram-se em maior abundância nas sementes (proteína: 23,1% - 33,07%; lípidos: 29,4% - 29,7%) do que nos rebentos (proteína: 3,6% - 9,8%; lípidos: 1,87% - 2,0%). Por outro lado, quando é realizada uma comparação dos parâmetros para um dos órgãos, mas entre espécies

diferentes, verifica-se que o parâmetro que tem uma maior variabilidade entre as diferentes espécies é a fibra. No caso dos rebentos, a fibra pode variar entre 15,7% - 68,3%, enquanto que para as sementes apresenta valores entre 5,79% - 30.2%.

No entanto, nos últimos anos, com a introdução das plantas halófitas no quotidiano dos consumidores, os estudos sobre estas plantas têm-se direcionado mais no sentido da sua valorização nutricional. A maioria destes trabalhos tem como objeto de estudo os rebentos de diversas espécies de *Salicornia*, sendo uma delas *S. ramosissima*, uma vez que são os órgãos mais utilizados na alimentação humana. Esta valorização tem sido feita em particular através do estudo dos lípidos presentes nestas plantas. Estes estudos abordam principalmente o perfil de FA, que têm revelado a existência de um conteúdo de lípidos *n-3* relevante ^{13,22,30-35}. Este aspeto contribuí para a valorização nutricional destas plantas quando comparadas com outros vegetais, tais como os espinafres e a alface ³⁷. Assim, o capítulo seguinte foca-se no estudo do perfil de FA em diversas espécies de *Salicornia*.

Tabela 1: Composição bioquímica (humidade, proteína, lípidos, fibras e cinzas), quantidade de minerais e a concentração de tocoferol, clorofila e carotenoides presentes em diferentes espécies de *Salicornia*.

Espécie	<i>S. bigelovii</i> ³⁰	<i>S. ramosissima</i> ¹³	<i>S. perennans</i> ³¹	<i>S. herbacea</i> ³²			<i>S. persica</i> ³⁶	
	sementes	rebentos	rebentos	rebentos	sementes	raízes	rebentos	
Composição bioquímica	Humidade (%)	---	59	---	10,7	10,5	11,3	---
	Proteína (%)	33,07	3,6	---	9,8	23,1	14,9	---
	Lípidos (%)	29,70	1,87	---	2,0	29,4	1,8	---
	Fibras (%)	5,79	15,7	---	68,3	30,2	53,8	---
	Cinzas (%)	6,06	20,4	---	9,2	6,8	18,2	---
Minerais	Na ⁺ (mg/g)	---	89,9	154	---	---	---	13,61
	Mg ²⁺ (mg/g)	---	9,43	---	---	---	---	0,89
	Ca ²⁺ (mg/g)	---	4,86	---	---	---	---	0,42
	K ⁺ (mg/g)	---	8,92	2,0	---	---	---	2,82
α-Tocoferol (mg/g)	0,2	0,0114	---	---	0,2492	---	---	
γ-Tocoferol (mg/g)	0,0746	---	---	---	0,0756	---	---	
δ-Tocoferol (mg/g)	0,069	0,0077	---	---	0,0896	---	---	
Clorofila II a (mg/g)	---	0,138	0,28	---	---	---	---	
Clorofila II b (mg/g)	---	0,0776	0,11	---	---	---	---	
Carotenoides (mg/g)	---	2	0,09	---	0,094	---	---	

1.2.2.1. Importância da composição lipídica na valorização de *Salicornia*

Os lípidos são uma das classes principais de biomoléculas presentes nas células dos seres vivos. Os lípidos polares, glicolípidos (GL – do inglês *glycolipids*) e fosfolípidos (PL – do inglês *phospholipids*), são os principais constituintes das membranas celulares e das membranas de organelos em plantas, sendo igualmente considerados como a primeira linha de defesa celular³⁸. Os GL são um dos componentes-chave, principalmente, de membranas de tilacoides dos cloroplasto, podendo também ser encontrados em membranas extraplastidiais³⁹. Estas biomoléculas são componentes estruturais da membrana, conferindo-lhes integridade e estando envolvidas nos processos de reconhecimento extracelular, comunicação célula-célula e como reguladores de transdução de sinal⁴⁰. Os PL desempenham funções não apenas como componentes estruturais das membranas, mas também como intermediários metabólicos⁴¹. Consoante as condições ambientais a que as plantas são sujeitas, os GL e PL, enquanto componentes das membranas celulares, adaptam-se de forma a conferir resistência, adaptabilidade celular, permitindo assim a sobrevivência das plantas em diferentes ambientes. Um destes mecanismos de resposta está associado à plasticidade dos FA que estão esterificados nos GL e PL. A variação de FA tem impacto nas membranas celulares, afetando a sua fluidez e permitindo assim uma melhor adaptação das plantas a condições ambientais mais externas. Assim, o perfil de FA pode apresentar variações consoante as condições ambientais a que as plantas estão sujeitas⁴²⁻⁴⁵. Na Tabela 2 são apresentados os perfis de FA de diferentes espécies de *Salicornia*^{13,22,33,34,46}, no caso de *S. ramosissima*, são apresentados os perfis de FA de dois estudos realizados^{13,34}.

Tabela 2: Perfil de ácidos gordos de diferentes espécies de *Salicornia*, expresso em % de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME - do inglês *fatty acids methyl esters*) totais.

Ácidos Gordos	<i>S. europea</i>⁴⁶	<i>S. perennans</i>³³	<i>S. brachiata</i>²²	<i>S. ramosissima</i>³⁴	<i>S. ramosissima</i>¹³
12:0	n.d	n.d	n.d	n.d	0,74
C14:0	1,33	0,8	n.d	0,29	1,99
C14:1	n.d	n.d	0,69	n.d	n.d
C15:0	n.d	n.d	0,14	n.d	0,52
C16:0	21,57	24,4	25,82	22,14	20,1
C16:1	1,40	2,0	0,41	1,57	1,1
C16:2	0,64	n.d	n.d	n.d	n.d
C16:3	0,76	n.d	n.d	n.d	n.d
C17:0	n.d	0,6	0,39	0,23	0,67
C18:0	2,85	2,6	7,2	5,53	3,15
C18:1n-9	4,42	7,1	6,13	4,31	1,06
C18:2n-6	23,49	20,0	25,70	20,02	16,8
C18:3n-3	28,03	28,8	29,06	39,6	19,8
C18:3n-6	0,55	0,3	n.d	n.d	n.d
C18:4	0,44	n.d	n.d	n.d	n.d
C20:0	2,44	1,3	0,91	0,69	8,6
C20:1	n.d	n.d	n.d	0,17	0,48
C20:2	n.d	n.d	n.d	0,14	n.d
C20:3	n.d	n.d	n.d	0,13	n.d
C20:5	0,39	n.d	n.d	n.d	n.d
C21:0	n.d	n.d	1,62	n.d	n.d
C22:0	2,45	7,8	n.d	1,17	10
C22:1n-9	n.d	1,1	n.d	n.d	n.d
C22:4	1,88	n.d	n.d	n.d	n.d
C23:0	n.d	n.d	n.d	0,37	2,32
C24:0	n.d	2,0	1,92	2,78	7,12
C26:0	n.d	n.d	n.d	n.d	2,51
C28:0	n.d	n.d	n.d	n.d	3,09

Os perfis de FA apresentados, nomeadamente os de *S. ramosissima*, evidenciam que os FA que se encontram em maior quantidade nestas plantas são os ácidos gordos poli-insaturados (PUFA - do inglês *polyunsaturated fatty acids*), ácido α -linolénico (C18:3n-3; ALA -do inglês *alpha linolenic acid*) e ácido linoléico (C18:2n-6; LA - do inglês *linoleic acid*). Para a classe de ácidos gordos saturados (SFA - do inglês *saturated fatty acids*), o FA mais abundante é o ácido palmítico (C16:0), e o ácido oleico (C18:1n-9) é o FA mais abundante da classe dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA - do inglês *monounsaturated fatty acids*)^{13,22,33,34,46}. Contudo o perfil de FA destas plantas é rico em FA *n*-3 e *n*-6¹⁰. A presença destes FA nas plantas halófitas valoriza-as nutricionalmente, principalmente devido à presença de PUFA, como é o caso dos FA essenciais ALA e LA. Estes FA são precursores de outros FA *n*-6, tal como o ácido araquidónico (C20:4n-6; AA - do inglês *arachidonic acid*), e FA *n*-3, tais como o ácido docosahexanóico (C22:6n-3; DHA - do inglês *docosahexaenoic acid*) e o ácido eicosapentatónico (C20:5n-3; EPA - do inglês *eicosapentaenoic acid*), com importantes funções fisiológicas e reguladoras nos seres humanos (Figura 4). Os FA ALA e LA são sintetizados em plantas⁴⁷ e são precursores de importantes mediadores lipídicos de sinalização (eicosanóides), com um papel relevante na regulação do processo inflamatório⁴⁸ nos animais. Os PUFA *n*-3 (ALA) e os PUFA *n*-6 (LA), são precursores de moléculas eicosanóides anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, respetivamente (Figura 4). Estes aspetos reforçam a adequabilidade de incluir plantas do género *Salicornia* na alimentação humana⁴⁷.

Os FA encontrados nestas plantas edíveis têm benefícios para a saúde, em especial os FA essenciais^{49,50}. Por outro lado, o perfil de ácidos gordos apresentado por estas plantas pode ser igualmente utilizado para diferenciar os locais de origem geográfica, e assim contribuir para a rastreabilidade e certificação de origem de halófitas. O perfil de FA varia de planta para planta e entre locais^{13,22,33,34,46}. A composição em FA é afetada maioritariamente por fatores extrínsecos, tais como temperatura, profundidade e salinidade⁵¹⁻⁵³. No caso das halófitas, estas estão sujeitas a variações dos níveis de salinidade e de temperatura a que são expostas, vetores que contribuem para a modulação da estrutura e fluidez da membrana celular⁵¹⁻⁵³. O aumento da salinidade e/ou a diminuição da temperatura promovem a diminuição dos níveis de SFA, que são responsáveis pela estabilização da estrutura da bicamada fosfolipídica, e levam a um incremento da concentração de PUFA, que aumentam a fluidez da membrana⁵¹⁻⁵³. Assim,

alguns dos mecanismos de adaptação das plantas às condições ambientais estão associados à variação do perfil de ácidos gordos, podendo este aspeto permitir distinguir plantas de diferentes origens.

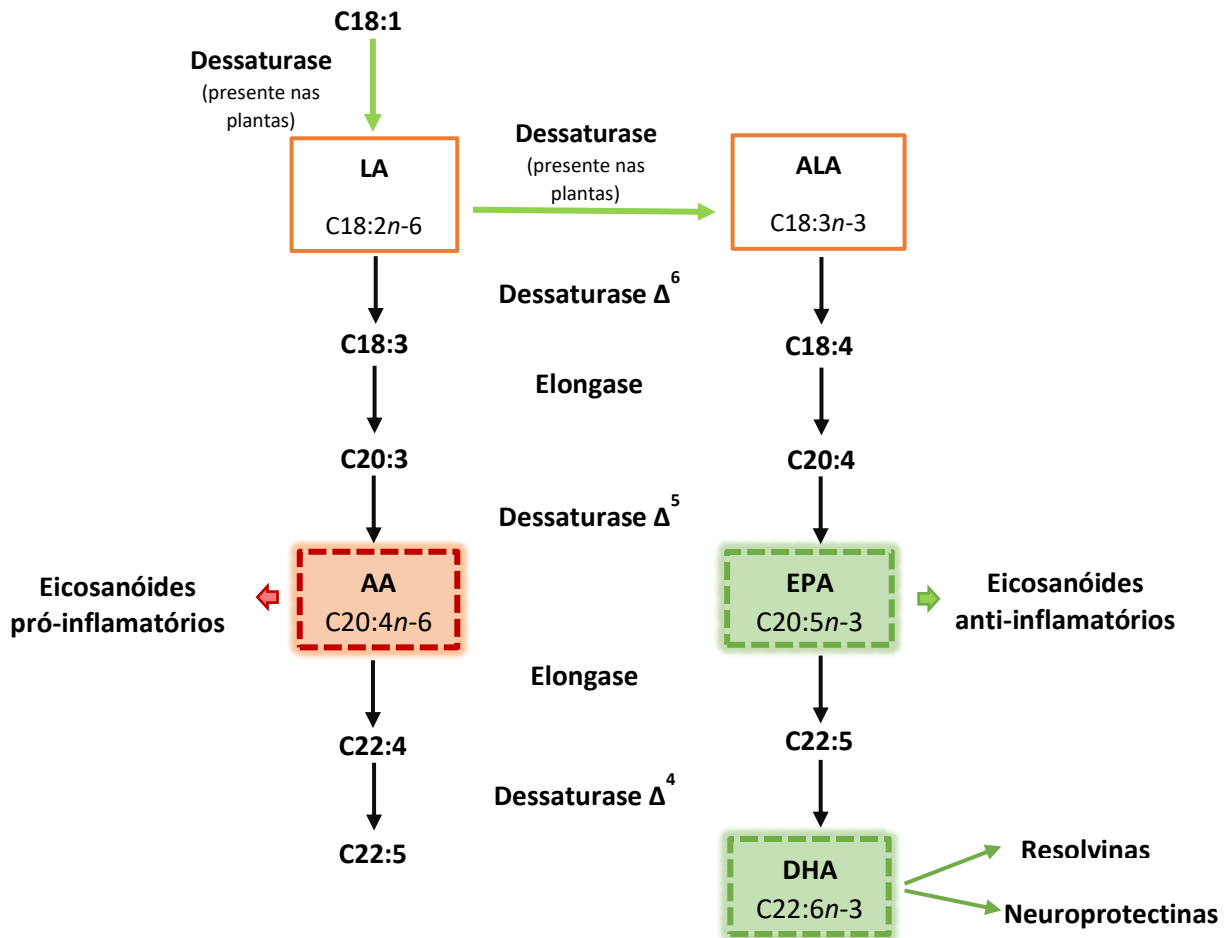


Figura 4: Metabolismo dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) $n-6$ e $n-3$. Esquema simplificado do metabolismo dos PUFA $n-6$ e $n-3$, que envolve enzimas de dessaturação e alongamento e os respetivos derivados eicosanóides. AA – ácido araquidónico; ALA – ácido α -linolénico; DHA – ácido docosaeenónico; EPA – ácido eicosapentanóico; LA – ácido linoleico.

Assim, a informação sobre o perfil de FA pode contribuir para a valorização das plantas halófitas, aumentando o seu valor comercial. Se por um lado o perfil de FA das plantas tem permitido valorizá-las nutricionalmente devido à presença de FA essenciais, por outro, o perfil de FA pode variar com o meio ambiente (temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes), criando uma assinatura lipídica única, o que permite a sua aplicação para a rastreabilidade e certificação de origem, como será descrito de seguida.

1.3. A importância da rastreabilidade em plantas halófitas

Com o crescente uso de plantas halófitas na alimentação, é importante garantir a qualidade e origem dos produtos apresentados no mercado, bem como a segurança para os consumidores. No caso particular das halófitas, a sua composição pode variar com as condições de crescimento, o que pode afetar tanto o seu valor nutricional como o seu valor comercial ³⁵. Para além disso é ainda importante garantir o conhecimento da origem destas plantas halófitas, ou seja, garantir que estas não têm origem em solos menos próprios para a produção de alimentos, como é o caso de terrenos poluídos e contaminados, por exemplo com metais. Estas características trazem a necessidade de desenvolver marcadores que permitam identificar a origem destas plantas. Esta necessidade de ferramentas de rastreabilidade torna-se ainda mais relevante face ao crescimento do mercado global, onde as cadeias de comercialização de alimentos são cada vez maiores e mais complexas ⁵⁴. Em resultado disto, surge a necessidade de desenvolver ferramentas de rastreabilidade de forma a que seja possível monitorizar todo o percurso dos alimentos, desde o produtor/fornecedor até ao consumidor final, oferecendo assim uma maior transparência e segurança alimentar para consumidores e empresas.

1.3.1. A rastreabilidade de alimentos

A rastreabilidade de alimentos é considerada uma condição prévia da qualidade dos mesmos, de segurança alimentar e saúde pública, sendo uma obrigação legal em muitos países do mundo, estando fortemente legislada na União Europeia ^{54,55}. Segundo a Comissão Europeia, a rastreabilidade é definida como “a capacidade de detetar a origem e de seguir o rasto de um género alimentício, de um alimento para animais, de um animal produtor de géneros alimentícios ou de uma substância, destinados a ser incorporados em géneros alimentícios ou em alimentos para animais, ou com probabilidades de o ser, ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição” ⁵⁴. A rastreabilidade resulta essencialmente de um sistema que permite registar os dados e operações relativas a um determinado alimento nos diferentes pontos da cadeia alimentar, e assim melhorar

a monitorização detalhada das propriedades dos produtos alimentares, desde a sua produção até ao consumidor^{56,57}. Este sistema permite a identificação do produto, bem como das informações a si associadas, tais como país de origem, espécie, lote e informação relativa à sua produção, e o registo de quando, onde e como o produto é transportado e processado/transformado ⁵⁸. Assim, todos os dados relevantes de rastreabilidade são vinculados ao produto que segue para o próximo ponto da cadeia de comercialização ⁵⁸. É importante que esta informação seja exclusiva para cada item a rastrear. Desta forma, cada produto tem de ter associado um número de identificação exclusivo ⁵⁷. Este aspeto vincula o produto físico aos requisitos e informação necessários. Portanto, num sistema de rastreabilidade, em cada etapa deve-se ser capaz de identificar a fonte e o recetor direto do produto em causa (one-step-forward-one-step-back) (Figura 5) ⁵⁸.

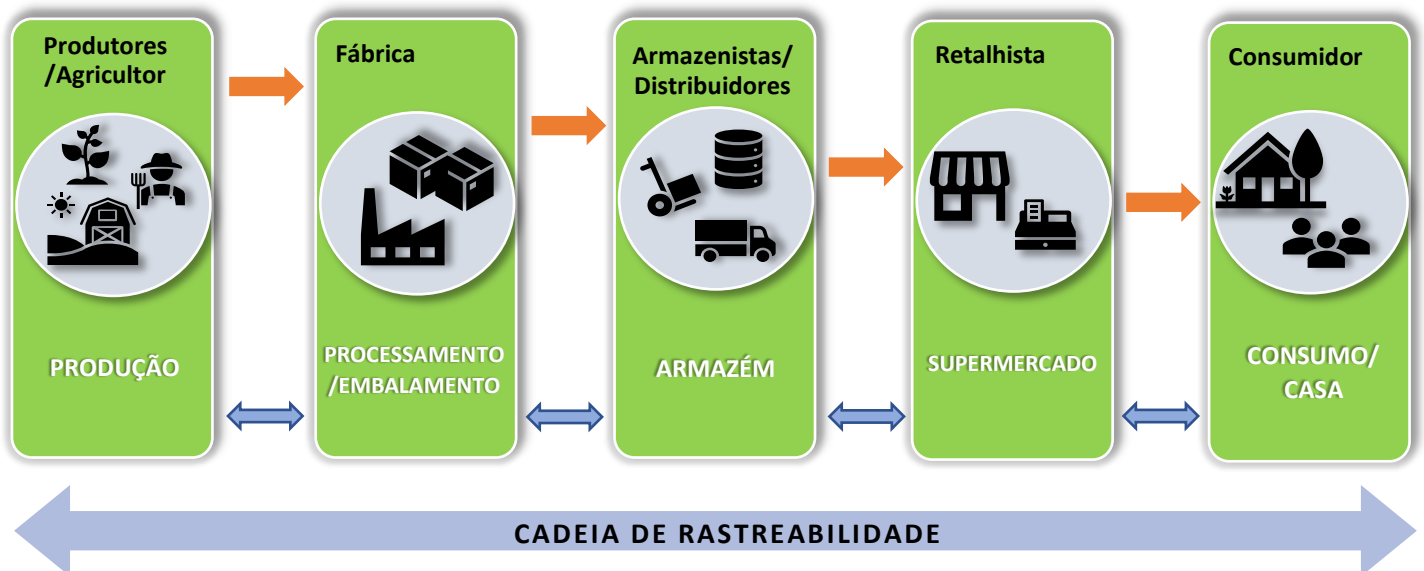


Figura 5: Ilustração da cadeia de rastreabilidade evidenciando todo o percurso do produto/alimento desde o produtor (origem) até ao consumidor.

Tanto consumidores como produtor/fornecedor (empresas) podem tirar partido do sistema de rastreabilidade, sendo o seu principal benefício a possibilidade de fornecer informação sobre o correto funcionamento ou não dos pontos de controlo ao longo da

cadeia de produção e fornecimento, facilitando o rastreamento dos alimentos de forma a garantir a sua segurança e qualidade ^{59,60}. As empresas, através do sistema de rastreabilidade conseguem aumentar a sua transparência e assegurar uma melhor gestão dos alimentos ⁶⁰. A rastreabilidade pode ainda ter um papel relevante na certificação da origem e qualidade dos alimentos. É fundamental fornecer transparência e segurança aos consumidores, que exigem cada vez mais produtos saudáveis e com melhores características nutricionais. Contudo, é também importante para os produtores a certificação de origem, pois garante a qualidade da matéria-prima que é introduzida na cadeia alimentar, evitando fraudes e concorrência desleal.

1.3.2. Métodos de determinação da origem dos alimentos

A proveniência dos alimentos é uma preocupação para autoridades, consumidores e produtores, uma vez que alguns alimentos são fortemente afetados pela fraude alimentar. Desta forma é importante garantir a sua origem e qualidade. A determinação da origem serve como uma impressão digital dos alimentos e também como ponto de partida indispensável para a sua rastreabilidade. Para a determinação da origem dos alimentos têm sido utilizados métodos tais como, perfil de DNA ⁶¹⁻⁶³, perfil elementar, ⁶⁴⁻⁶⁷, análise de isótopos estáveis (SAI – do inglês *stable isotope analysis*), como ¹³C, ¹⁵N e ⁸O ⁶⁸⁻⁷⁰ ou pela análise de lípidos, sendo esta focada na determinação do perfil dos FA ^{71,72}. Na Tabela 3 estão mencionados os prós e contras de cada um dos métodos abordados. A análise do perfil de FA para a determinação de origem geográfica é uma das abordagens que tem despertado mais interesse para a rastreabilidade da origem geográfica de vários produtos alimentares.

A utilização do perfil de FA para rastreabilidade foi já testada em diversas matrizes como azeite ^{73,74}, grãos de café ⁷⁵, alcaparras ⁷⁶, frutos secos ⁷⁷. Contudo uma grande parte dos estudos têm-se focado em alimentos com origem marinha, como invertebrados marinhos ^{71,78-80}, peixes ^{68,81} e algas ⁸². Na década de 2000 iniciaram-se estudos sobre a utilização de FA como biomarcadores com possível aplicação na rastreabilidade, com o objetivo de determinar/diferenciar o método de produção de peixes ^{68,81}. Molquentin, J., et

al ⁶⁸, utilizou o perfil de FA para diferenciar o cultivo de salmão (*Salmo salar*) no Atlântico, o cultivo tradicional e a produção de salmão selvagem. A análise de FA permitiu diferenciar o salmão selvagem do cultivo tradicional, pelo aumento de C18:0 no salmão selvagem, e pelo aumento de C18:2n-6 e C18:3n-3 no cultivo tradicional e no cultivo no Atlântico, permitindo assim distinguir o método de cultivo do salmão. Num estudo desenvolvido por Grigorakis, K., et al ⁸¹, foi analisado o conteúdo lipídico de dourada (*Sparus aurata*) cultivada em aquacultura e de dourada selvagem.

Tabela 3: Prós e contras dos métodos usados na determinação da origem geográfica.

Método	Prós	Contras
Perfil de DNA (PCR-DGGE)	<p>Distinção da origem geográfica;</p> <p>Pode ser usado em alimentos processados.</p>	<p>Caro (quando comparado com a análise elementar e o perfil de FA);</p> <p>Não distingue métodos de produção;</p> <p>DNA é suscetível de ser degradado.</p>
Perfil elementar	<p>Distinção da origem geográfica;</p> <p>Distinção do método de produção;</p> <p>Baixo custo (quando comparado com outros métodos bioquímico e molecular);</p> <p>Não sofre degradação.</p>	<p>É preciso estruturas duras mineralizas;</p> <p>As amostras têm de ser digeridas antes de ser analisadas;</p> <p>Uso de diferentes padrões para a mesma amostra.</p>
Análise de isótopos estáveis	<p>Distinção da origem geográfica;</p> <p>Distinção do método de produção.</p>	<p>Composição isotópica pode ser manipulada através das condições ambientais.</p>
Perfil de FA	<p>Distinção da origem geográfica;</p> <p>Distinção do método de produção;</p> <p>Baixo custo.</p>	<p>Variação sazonal da composição de FA dificulta a utilização para a rastreabilidade de origem;</p> <p>FA são suscetíveis à oxidação.</p>

Neste estudo observaram-se diferenças significativas nos perfis de FA entre estes dois métodos de produção. Nos peixes de aquacultura observou-se um aumento de MUFA $n-9$ (C18:1 $n-9$ e C20:1 $n-9$). No caso dos peixes selvagens há uma maior abundância do FA C20:4 $n-6$ e do rácio $n-3/n-6$, em relação aos peixes de aquacultura. Atualmente têm surgido estudos que utilizam o perfil de FA como ferramenta para a rastreabilidade da origem geográfica de invertebrados marinhos ^{71,78} e algas ⁸². Ricardo *et al.* ⁷¹ avaliou o perfil de FA do músculo adutor do berbigão (*Cerastoderma edule*), recolhido em diferentes zonas de produção/captura da ria de Aveiro. Dos resultados obtidos destacam-se os FA C16:0, C18:0, C20:5 $n-3$ e C22:6 $n-3$, que variam significativamente entre locais. Contudo são o C16:0 e o C22:6 $n-3$ que mais contribuem para as variações entre locais. Ricardo *et al.* realizaram um estudo semelhante ao longo da costa portuguesa ⁷⁸. Neste caso, verificaram-se diferenças significativas nos perfis de FA, principalmente devido aos diferentes níveis de C20:5 $n-3$, C20:4 $n-6$ e de MUFA (C18:1 $n-9$, C20:1 $n-9/n-11$). Para além de frutos do mar, também surgiram estudos em macroalgas ⁸². Monteiro *et al.*, comparou o perfil de FA da *S. latissima* colhida em três locais diferentes na Europa (França, Noruega e Reino Unido). Os PUFA foram os FA mais relevantes, contribuindo para a discriminação entre os locais. Os FA C18:4 $n-3$, C16:0, C22:0 e C18:3 $n-3$ foram os principais contribuintes para a variabilidade observada. No entanto não há estudos sobre rastreabilidade de plantas halófitas.

Em suma, os resultados obtidos nos estudos referidos acima, demonstram que é possível distinguir a origem dos alimentos através do seu perfil de FA. É importante continuar a apostar no desenvolvimento e validação deste método, de forma a obter mais dados que permitam corroborar a informação já existente. É assim necessário continuar a aprofundar e desenvolver os estudos nesta temática, nomeadamente através da aplicação deste método a outras matrizes.

2. Objetivos

Atualmente, *S. ramosissima* já está bem estabelecida em vários mercados Europeus e é consumida como vegetal do mar ou como substituto do sal. Para além disso, esta planta tem sido caracterizada por um lipidoma nutricionalmente relevante, com presença de lípidos *n*-3. Com o aumento do consumo e da produção deste vegetal é importante garantir a verificação da sua origem geográfica, de forma a aumentar a segurança dos consumidores que procuram cada vez mais produtos saudáveis e com melhores propriedades nutricionais.

Assim, os objetivos da presente tese são:

- Identificar o perfil de FA de *S. ramosissima* produzida em diferentes locais.
- Promover a *S. ramosissima*, valorizando-a nutricionalmente, como fonte de FA benéficos para a saúde humana.
- Avaliar a aplicação do perfil de FA como uma ferramenta para a rastreabilidade da origem geográfica da *S. ramosissima*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção e preparação das amostras

As amostras de *S. ramosissima* analisadas no presente estudo foram recolhidas durante o verão de 2019, em 4 localizações diferentes ao longo da costa continental Portuguesa: Ria de Aveiro – Marina de Santiago (RAv) (30 réplicas), Figueira da Foz (FF) (30 réplicas), Estuário do Tejo (ET) (30 réplicas) e Ria Formosa (RF) (27 réplicas), num total de 117 amostras (3 locais x 30 réplicas + 1 local x 27 réplicas = 117 amostras). Nos 3 primeiros locais as amostras realizadas são de plantas selvagens, recolhidas em antigas salinas. Já as amostras recolhidas na Ria Formosa dizem respeito a plantas produzidas em estufas. Os locais de recolha encontram-se identificados na Figura 6. Em todos os locais foram recolhidos os rebentos das plantas, tendo sido estes armazenados em sacos de plástico. Posteriormente, os rebentos de *S. ramosissima* foram lavados, uma primeira vez com água corrente seguida de uma lavagem com água destilada, e armazenados a - 80 °C até serem liofilizadas e posteriormente macerados, com recurso a um almofariz mecânico (Retsch, RM 200, Alemanha) (Figura 7). A biomassa macerada foi armazenada a - 80 °C até ser analisada bioquimicamente.



Figura 6: Locais onde foram realizadas as recolhas de *Salicornia ramosissima*, ao longo da costa continental Portuguesa e respetivas coordenadas.

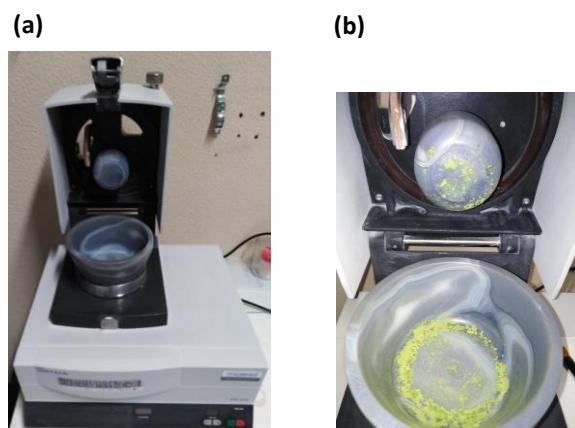


Figura 7: Moinho mecânico (Retsch, RM 200, Alemanha) (a) utilizado para macerar as amostras liofilizadas de *S. ramosissima* (b).

3.2. Extração lipídica

O extrato lipídico total das amostras de *S. ramosissima* foi obtido de acordo com o método de Bligh and Dyer ⁸³ com pequenas modificações: num tubo de vidro, adicionou-se, 1 mL de CH_2Cl_2 e 2 mL de MeOH a 50 mg de biomassa. A mistura foi sujeita a agitação no vortex durante 1 min, seguido de 1 min num banho de ultra-sons. Posteriormente, os tubos foram incubados em gelo, no agitador orbital durante 1 h. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm durante 10 min e a fase orgânica foi recolhida para um novo tubo de vidro e sujeita a uma lavagem, com 1,2 mL de água Milli-Q (Synergy, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), seguida de centrifugação a 2000 rpm durante 5 min. A fase orgânica (inferior) foi posteriormente transferida para um novo tubo de vidro, sendo a amostra seca em corrente de azoto. Por fim, o extrato lipídico foi dissolvido em CH_2Cl_2 , transferido para vials, seco em corrente de azoto, pesado e armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até ser determinado o perfil em FA.



Figura 8: Extração lipídica: a fase orgânica recolhida (a) é sujeita a uma lavagem com água Milli-Q, formando 2 fases (b). Por fim, recolhe-se a fase orgânica obtida após a lavagem - extrato lipídico (c)

3.3. Análise de ácidos gordos

3.3.1. Método de transesterificação

Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME - do inglês *fatty acids methyl esters*) foram obtidos através de uma transesterificação em meio alcalino⁸⁴. Resumidamente, 60 µg de extrato lipídico em diclorometano foram transferidos para um tubo de vidro (previamente lavado com hexano), tendo o solvente sido posteriormente evaporado sob corrente de azoto. Subsequentemente, adicionou-se ao tubo 1 mL de uma solução de padrão interno C19:0 metilado (1 µg/mL Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado em hexano e 200 µL de hidróxido de potássio (2M) em metanol. Após agitação em vórtex durante 2 min, foram adicionados 2 mL de uma solução aquosa de NaCl (10 g/L) seguida de centrifugação durante 5 min a 2000 rpm. Foram recolhidos 600 µL da fase orgânica para um tubo *eppendorf*, tendo amostra sido concentrada em corrente de azoto para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS - do inglês *gas chromatography coupled with mass spectrometry*).



Figura 9: Método de transesterificação dos ácidos gordos: após a adição do padrão interno C19:0, do hidróxido de potássio(2M) em metanol e da solução aquosa de NaCl (10 g/L), obtêm-se duas fases (fase orgânica e fase aquosa). Da fase orgânica (fase superior) são recolhidos 600 µL para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

3.3.2. Método de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A análise dos FAME presentes nos extratos lipídicos foi realizada com recurso a cromatografia gasosa (Agilent 8860 GC System) acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (Figura 10) num sistema GC 5977B Network Mass Selective Detector equipado com uma fonte de impacto eletrónico que opera a 70 eV e à temperatura de 250 °C. A coluna usada foi a DBFFAP (Agilent 123-3232, 30 m x 320 µm x 0,25 µm). Para a análise por GC-MS, o extrato derivatizado foi dissolvido em 100 µL de hexano, transferido para um *insert* vial, 2 µL da amostra foram injetados, com o auxílio de um autosampler G 4513 A, no equipamento. A injeção das amostras decorreu em modo *splitless*, com um tempo de *splitless* de 3 min, com o injetor a 220 °C e o detetor a 250 °C. O programa de temperaturas utilizado inclui uma temperatura inicial de 80 °C por 2 min, um aumento linear até 160 °C com um fluxo de 25 °C/min, seguido de outro aumento até 210 °C num fluxo de 2°C/min e até 225 °C com um fluxo de 20 °C/min, mantida durante 15 min. O gás de arraste (hélio) é mantido em fluxo constante 1,4 mL/min. Os espectros de massa são adquiridos em modo *full scan* na gama de m/z 50-550.



Figura 10: Aparelho de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

3.3.3. Identificação e integração dos ácidos gordos

No processo de derivatização dos FA, estes foram metilados, para melhorar a sua volatilidade e sua análise por GC-MS. Assim a partir dos cromatogramas obtidos de GC-MS identificaram-se os FAME correspondentes a cada FA presente na amostra. A identificação dos FAME foi efetuada usando o software Agilent MassHunter Qualitative 10.0, suportada pela Biblioteca NIST14L. A confirmação da identificação dos FAME foi ainda feita pela comparação do tempo de retenção e dos espectros de massa, com padrões comerciais de FAME (Supelco 37 Component FAME Mix). Para a integração dos picos correspondentes a cada FAME foi utilizado o software Agilent MassHunter Qualitative 10.0. A quantidade de ácidos gordos foi calculada na forma de percentagem relativa, tendo sido utilizada a área de cada pico obtida através da sua integração e normalizada em relação à área do padrão interno, (C19:0).

Em forma de resumo, na figura seguinte está esquematizada toda a metodologia usada para a identificação do perfil de FA por GC-MS.

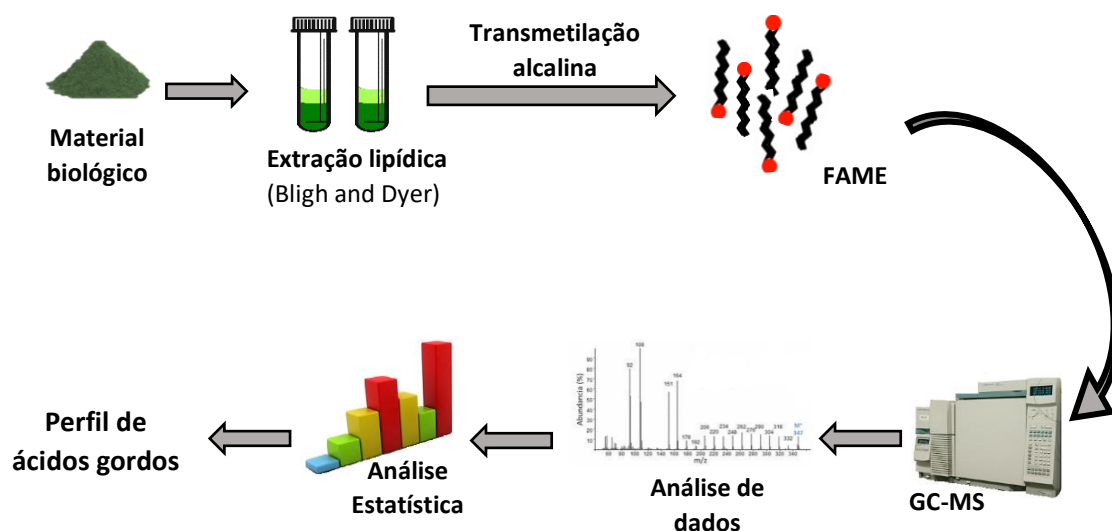


Figura 11: Esquema-resumo da metodologia usada para a identificação do perfil de ácidos gordos: a biomassa da *Salicornia ramosissima*, depois de macerada, é sujeita a uma extração lipídica. Os ácidos gordos presentes no extrato lipídico obtido são metilados por uma transmetilação alcalina. De seguida os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) são analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os cromatogramas e espectros de massa são analisados de modo a obter o perfil de ácidos gordos.

3.3.4. Índices de qualidade lipídica

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), usados para estimar a qualidade lipídica dos alimentos para a saúde humana, foram calculados usando as seguintes equações⁸⁵:

$$IA = (C12:0 + 4 * C14:0 + C16:0) / [\sum MUFA + \sum(n - 3 PUFA) + \sum(n - 6 PUFA)]$$

$$IT = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / [0.5 * \sum MUFA + 0.5 * \sum(n - 6 PUFA) + 3 * \sum(n - 3 PUFA) + \frac{\sum(n - 3 PUFA)}{\sum(n - 6 PUFA)}]$$

Onde $\sum MUFA$, $\sum(n-3 PUFA)$ e $\sum(n-6 PUFA)$ são a soma do conteúdo de MUFA, $n-3$ PUFA e $n-6$ PUFA, respetivamente.

3.4. Análise Estatística

Os dados analisados dizem respeito a abundâncias relativas de FA de rebentos de *S. ramosissima*, por local. Os dados foram inicialmente padronizados através da transformação $\log(x+1)$, tendo a matriz de semelhança entre amostras sido obtida recorrendo ao coeficiente de similaridade Bray-Curtis. Foi realizada uma análise de similaridade (ANOSIM) de um fator para identificar diferenças significativas (p -value $<0,05$) nos perfis de FA de *S. ramosissima*, entre os 4 locais, permitindo calcular uma estatística R global que avalia as diferenças entre os grupos (locais). Quanto mais próximo de 1 for o valor do R global, maiores são as diferenças entre os grupos analisados; quando este valor é mais próximo de zero este traduz uma sobreposição de grupos⁸⁶. Considerando cada variável (FA) individualmente, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator após a verificação da normalidade dos dados com o teste de Shapiro e da homogeneidade da variância com o teste de Bartlett. O teste post hoc de

Bonferroni foi usado quando ANOVA revelou diferenças significativas ($p < 0,05$). De forma a avaliar se o perfil de FA pode ser utilizado para discriminar a origem geográfica das diferentes amostras de *S. ramosissima* através do seu perfil de FA, foi realizada uma análise canónica das coordenadas principais (CAP – do inglês *Canonical analysis of principal coordinates*). De modo a validar o modelo preditivo, o conjunto de amostras utilizado foi dividido a meio, considerando metade para a elaboração do modelo e a outra metade como amostras cegas para a sua validação. A análise CAP foi utilizada para avaliar a confiabilidade do uso do perfil de FA de *S. ramosissima* para inferir a sua origem geográfica. A análise multivariada dos dados (ANOSIM e CAP) foi feita recorrendo ao programa Primer 6 & Permanova⁸⁶, enquanto que as análises de variância foram realizadas com recurso ao programa R⁸⁷.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação dos Ácidos gordos

Neste trabalho foram identificados os perfis de FA presentes nas amostras de rebentos de *S. ramosissima* recolhidas em 4 localizações diferentes. Na Figura 12 está apresentado um cromatograma representativo de cada local, com a identificação dos picos e respetivos FA.

A análise dos dados de GC-MS permitiu a identificação de 11 FA diferentes no extrato lipídico de *S. ramosissima*, em 3 dos locais estudados, que são RAv, ET e RF. A exceção verifica-se na FF, onde se identificaram 12 FA, que incluíram os 11 FA detetados nas amostras dos outros 3 locais e mais um FA diferente. Os FA identificados em cada um dos locais e as respetivas abundâncias relativas estão apresentados na Tabela 4. Na Figura 13 está representada a abundância de cada classe de FA, para cada local. Os resultados obtidos mostram que as amostras têm um alto teor de FA de cadeia longa, com o comprimento entre 16 e 18 carbonos e que os FA mais abundantes, nos quatro locais, são C18:3*n*-3, C18:2*n*-6 e C16:0, com uma abundância relativa entre 38,8% - 51,2%, 16,9% - 25,1% e 18,1% - 20,3%, respetivamente, consoante o local em estudo. Nos locais, ET e RF, o conteúdo destes FA diminui na sequência C18:3*n*-3 > C16:0 > C18:2*n*-6. Já em RAv e FF este conteúdo diminui na sequência: C18:3*n*-3 > C18:2*n*-6 > C16:0. Os PUFA são a classe de FA mais abundante em todas as amostras, com uma abundância entre 61,3% - 70,8%. Para este grupo contribuem os dois FA mais abundantes, C18:3*n*-3 e C18:2*n*-6. Os SFA são o segundo grupo mais abundante de FA, com uma contribuição de 25,6% - 31,4% do total de FA presentes em *S. ramosissima* nos 4 locais. O SFA que mais contribui para esta percentagem é C16:0. Por último, os MUFA são a classe menos abundante, representando apenas 2,5% - 4,0% dos FA totais. O FA que tem uma maior contribuição para esta classe é o C18:1*n*-9, que, no entanto, corresponde a apenas 0,9% - 3,4% dos FA totais, consoante o local. Os perfis de FA dos 4 locais apresentados neste trabalho estão de acordo com o descrito na literatura para o género *Salicornia*, onde o C18:*n*-3, C18:2*n*-6 e C16:0 também são os FA mais abundantes^{34,36}. Os dados obtidos encontram-se de acordo com o reportado por Maciel *et al.*³⁴ para a *S. ramosissima* (onde os FA mais abundantes são o C18:3*n*-3 (39,6%), o C18:2*n*-6 (22,1%)) e por Ventura *et*

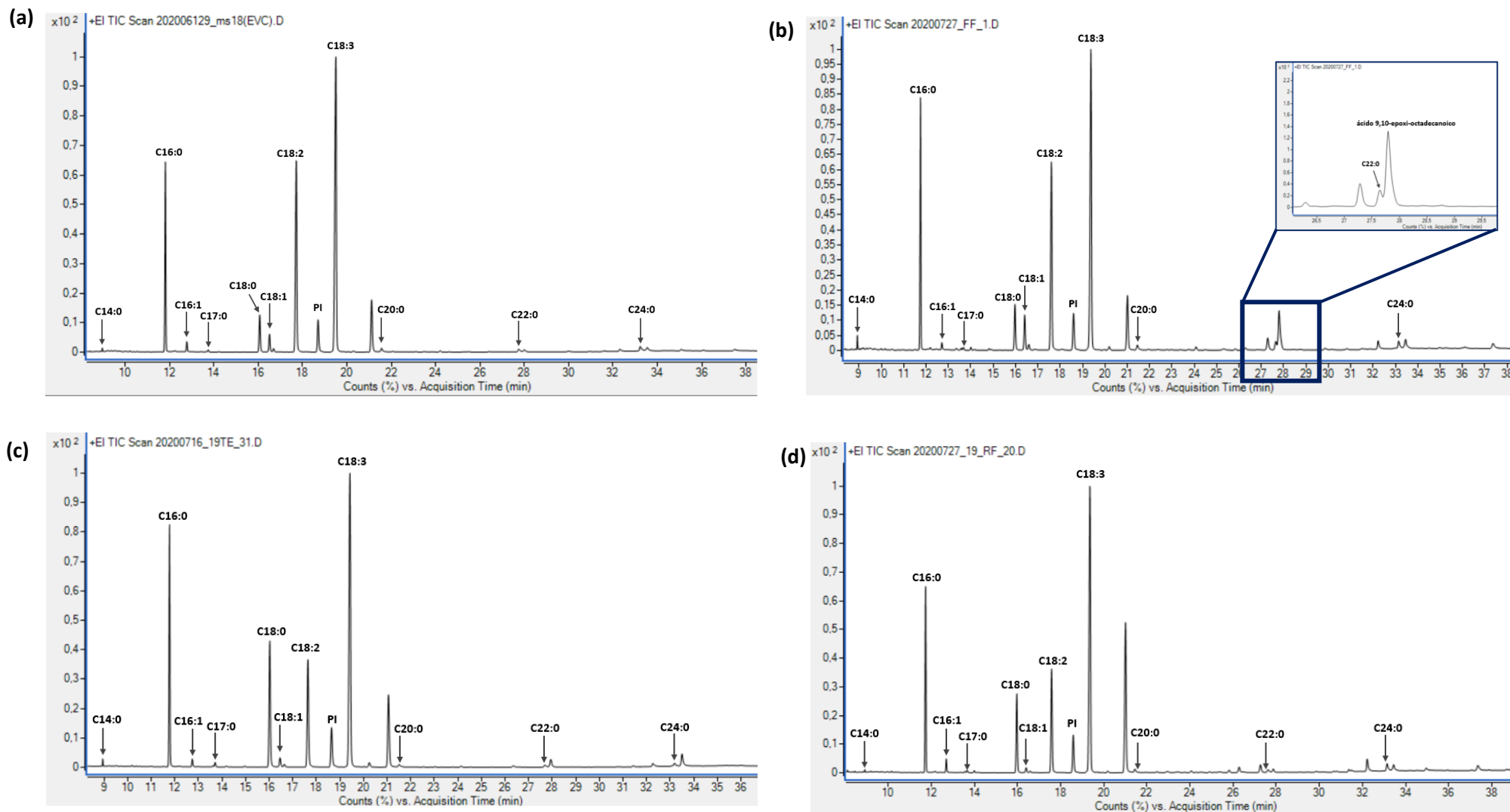


Figura 12: Cromatogramas dos ácidos gordos presentes no extrato lipídico de rebentos de *Salicornia ramosissima* dos 4 locais da costa Portuguesa ((a) Ria de Aveiro (RAV); (b) Figueira da Foz (FF); (c) Estuário do Tejo (ET); (d) Ria Formosa (RF)), com a identificação dos picos correspondentes a cada um dos ácidos gordos.

Tabela 4: Abundância relativa de ácidos gordos presentes em rebentos de *Salicornia ramosissima* em % (valores da média \pm desvio padrão (SD)) e respetiva variação para cada ácido gordo presente nos 4 locais: RAv (Ria de Aveiro), ET (Estuário do Tejo) e RF (Ria Formosa) (n=30 por local, exceto para FF (Figueira da Foz) com n=27).

FA	RAv	FF	ET	RF
C14:0	0,3 \pm 0,07% (0,2% - 0,4%)	0,6 \pm 0,17% (0,4% - 1,1%)	0,4 \pm 0,07% (0,2% - 0,5%)	0,2 \pm 0,04% (0,1% - 0,3%)
C16:0	18,1 \pm 1,58% (14,6% - 21,6%)	20,2 \pm 1,7% (17,7% - 25,5%)	20,3 \pm 1,66% (17,4% - 24,1%)	19,1 \pm 1,09% (17,6% - 21,5%)
C16:1	1,0 \pm 0,13% (0,7% - 1,2%)	0,6 \pm 0,16% (0,0% - 0,8%)	1,0 \pm 0,13% (0,8% - 1,2%)	1,6 \pm 0,23% (1,2% - 2,1%)
C17:0	0,3 \pm 0,06% (0,1% - 0,4%)	0,3 \pm 0,10% (0,2% - 0,6%)	0,4 \pm 0,13% (0,2% - 0,7%)	0,2 \pm 0,08% (0,1% - 0,4%)
C18:0	5,1 \pm 2,43% (2,8% - 14,5%)	6,8 \pm 3,22% (3,7% - 15,5%)	9,0 \pm 4,32% (3,7% - 19,2%)	7,1 \pm 4,17% (3,4% - 17,0%)
C18:1n-9	2,6 \pm 0,48% (1,1% - 3,3%)	3,4 \pm 1,10% (1,9% - 6,9%)	1,6 \pm 0,37% (0,8% - 2,4%)	0,9 \pm 0,28% (0,6% - 1,7%)
C18:2n-6	25,1 \pm 2,61% (20,8% - 30,9%)	22,5 \pm 2,63% (17,4% - 28,3%)	16,9 \pm 1,71% (13,6% - 21,0%)	17,1 \pm 1,34% (14,1% - 19,0%)
C18:3n-3	45,8 \pm 3,65% (36,9% - 53,2%)	38,8 \pm 3,47% (32,0% - 46,6%)	48,6 \pm 5,54% (35,8% - 57,0%)	51,2 \pm 3,68% (42,1% - 55,6%)
C20:0	0,5 \pm 0,19% (0,2% - 0,9%)	0,6 \pm 0,15% (0,3% - 0,9%)	0,5 \pm 0,23% (0,1% - 1,0%)	0,6 \pm 0,09% (0,3% - 0,7%)
C22:0	0,5 \pm 0,26% (0,1% - 1,0%)	1,0 \pm 0,35% (0,4% - 1,7%)	0,7 \pm 0,30% (0,1% - 1,5%)	0,6 \pm 0,22% (0,1% - 1,0%)
Ácido 9,10-epoxi-octadecanoico	-----	4,0 \pm 3,57% (0,0% - 12,2%)	-----	-----
C24:0	0,8 \pm 0,24% (0,3% - 1,4%)	1,3 \pm 0,53% (0,0% - 3,5%)	0,7 \pm 0,32% (0,1% - 1,3%)	1,5 \pm 0,38% (0,6% - 2,3%)

al.³⁶ para a *S. persica* (com o C18:3n-3 (47,7% - 48,3%), o C18:2n-6 (22,8% - 23,7%) e o C16:0 (18,9% - 20,3%) como FA mais abundantes). No caso da FF, é importante referir a presença de um ácido gordo oxidado, apenas identificado neste local e cuja identificação irá ser abordada mais à frente.

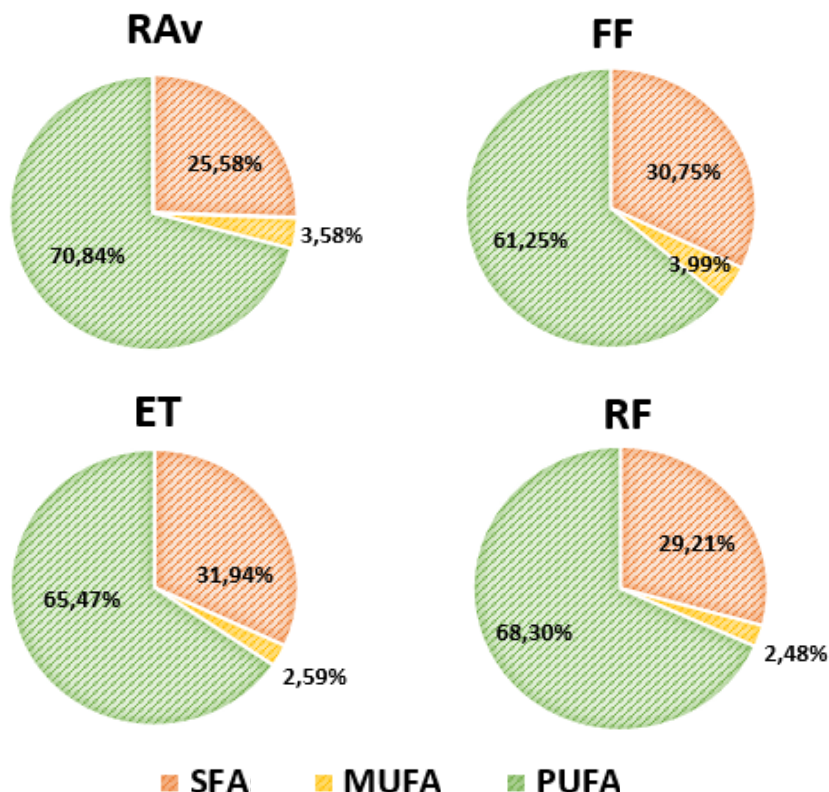


Figura 13: Contribuição de cada classe de ácido gordos para o perfil de FA de rebentos de *S ramosissima* obtidos em 4 locais da costa continental portuguesa: RAv - Ria de Aveiro, FF - Figueira da Foz, ET – Estuário do Tejo; RF – Ria Formosa. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.

Tal como referido acima, nas amostras coletadas em FF foi identificado um FA que não estava presente em nenhum dos outros locais estudados. Este composto foi identificado como um ácido gordo oxidado, o ácido gordo com 18 carbono oxidado nas posições 9 e 10 (ácido 9,10-epoxi-octadecanoico) na sua forma de epóxido. A identificação foi feita pela presença dos fragmentos característicos no seu espectro de massa, e pela comparação do espectro de massa obtido e o espectro de massa da base de dados LipidWeb⁸⁸ (Figura 14 (b) e (c)), pois não existia padrão para este FAME. No espectro de massa é possível identificar o ião molecular (m/z 312) e o ião fragmento de

m/z 74 originado pelo rearranjo de McLafferty, tal como esperado para um derivado de um éster metílico de ácido gordo saturado. Contudo, os íons fragmento mais úteis para a identificação são os íons em m/z 155 e em m/z 199. O íon m/z 155 é o íon formado a partir da parte terminal da molécula após a clivagem entre os carbonos 8 e 9. O íon m/z 199 reflete a clivagem entre os carbonos 10 e 11 (incluindo o grupo carboxilo) como descrito na literatura(Figura 14 (a))⁸⁸.

O FA oxidado, 9, 10-epóxi-octadecanóico, já foi encontrado em óleos de sementes de algumas plantas, mas nunca em plantas halófitas^{88,89}. A formação de FA oxidados por parte de plantas é considerada um forma de defesa das mesmas⁹⁰⁻⁹², estando estas moléculas envolvidas na resposta a situações de stress biótico e abiótico⁸⁹. Os FA oxidados, como o 9, 10-epóxi-octadecanóico, são constituintes da cutina de várias plantas, tendo como função criar uma película protetora⁹³. Também já foi referenciada a possibilidade de pequenas quantidades de FA epóxi serem formados devido a armazenamento prolongado⁸⁸. Muitas das reações de oxidação de ácidos gordos são catalisadas pelo citocromo P450, uma das maiores superfamílias de proteínas em plantas⁸⁹. O citocromo P450 pode ser regulado a nível transcricional por stress biótico e abiótico, levando à síntese de FA oxidados⁹⁴. Na Figura 15 está representada a reação de formação do ácido 9, 10-epóxi-octadecanóico por ação de uma família de enzima P450. Assim, a presença do derivado epóxi de FA nas amostras da FF poderá ter duas explicações: pode estar associado a armazenamento incorreto das amostras ou pode dever-se à exposição das plantas a condições de stress. Uma vez que apenas nas plantas da FF foi detetado este FA e que foi identificado em todas as réplicas biológicas deste local, a segunda hipótese parece ser a mais plausível. A possibilidade destas plantas terem estado sujeitas a condições de stress biótico ou abiótico prevalece sobre a possibilidade de um armazenamento incorreto, pois para se verificar esta última possibilidade seria provável encontrar este ou outro FA oxidado nas amostras de plantas dos restantes locais, armazenadas nas mesmas condições, o que não se verificou. Contudo, para confirmar que a presença deste FA se deve à exposição a condições de stress e não ao incorreto armazenamento será necessário realizar futuramente um estudo do perfil lipídico das plantas da FF, em diferentes zonas do mesmo habitat e sob diferentes condições de armazenamento.

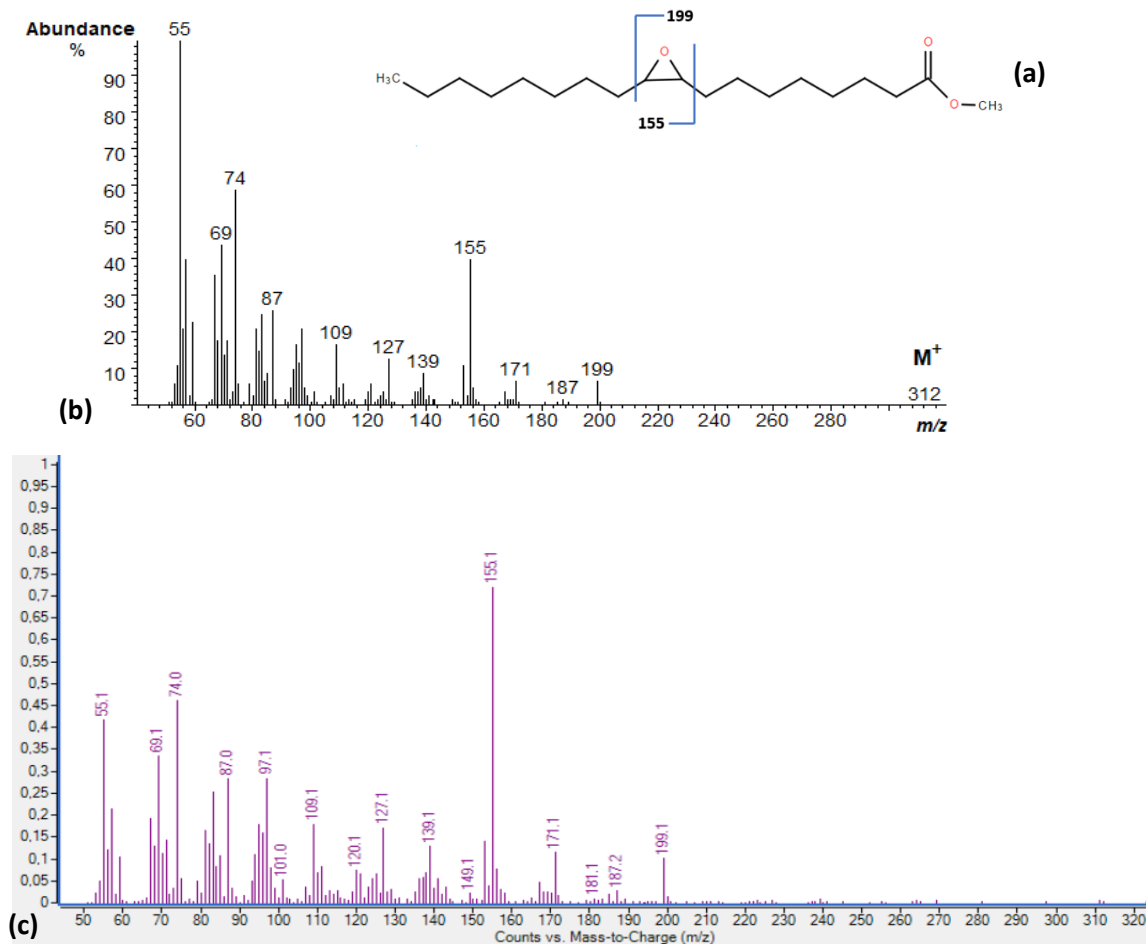


Figura 14: Representação do FAME 9,10-epoxi-octadecanoico e dos seus fragmentos m/z 155 e m/z 199 (a); espectros de massa do ácido 9,10-epoxi-octadecanoico: Espectro de massa adaptado de 71 (b) e o espectro de massa obtido na análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (c).

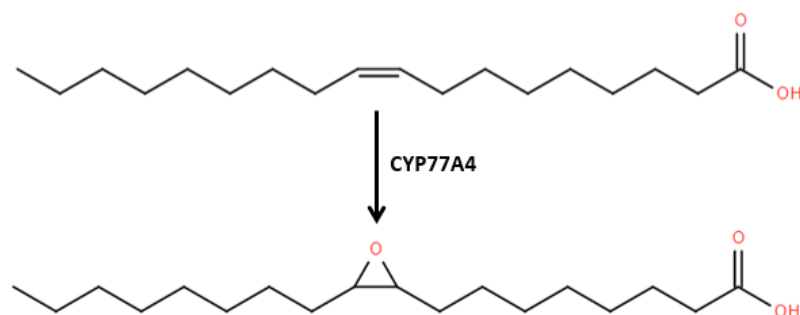


Figura 15: Representação da reação de formação do ácido 9, 10-epóxi-octadecanoico por ação de uma família de enzimas P450.

4.2. Ácidos gordos da família ómega e sua contribuição para o valor nutricional das halófitas e índices lipídicos

A classe de FA com maior representatividade nas plantas estudadas foram os PUFA, onde se incluem os FA essenciais: o ALA (C18:3n-3) e LA (C18:2n-6). O conteúdo de FA *n*-3 e *n*-6 e o rácio *n*-6/*n*-3 são apresentados na Figura 16. O FA ALA (*n*-3) é o mais abundante nos 4 locais, variando a sua abundância relativa entre 38,8% e 51,2%. ALA foi mais abundante nas amostras colhidas em RF (51,2%). No caso do LA (*n*-6), este apresenta uma abundância inferior ao ALA (*n*-3), cuja abundância relativa varia entre 16,9% (ET) e 25,1% (RAv). O LA foi mais abundante nas amostras colhidas em RAv (25,1%). A abundância do ALA (*n*-3) e do LA (*n*-6) é semelhante entre os locais ET e RF, e significativamente diferentes nos outros locais (Tabela 5). Os valores registados em termos de abundância relativa dos ALA e LA estão na mesma ordem de grandeza dos reportados na literatura para a *S. ramosissima*³⁴, onde é apresentada uma abundância relativa para o ALA (*n*-3) de 39,6% e para o LA (*n*-6) de 20,0%. Para além disso, estão ainda de acordo com os resultados registados para outras espécies de *Salicornia*, como é o caso da *S. persica*³⁶ com ALA: 47,8% e LA: 23,3%; da *S. perennans*³³ (LA: 20,0%) e da *S. brachiata*²² (LA: 25,7%).

Foi ainda estudado o rácio *n*-6/*n*-3 para as plantas de cada um dos locais, onde aquelas que apresentaram um rácio mais baixo foi RF. O rácio mais elevado foi registado na FF. Os locais mais a norte apresentaram valores de rácio semelhantes entre si (RAv e FF). O mesmo aconteceu para os locais a sul (ET e RF). As diferenças significativas (Tabela 5) foram registadas quando comparando os locais a norte (RAv: 0,55 e FF: 0,58) com os locais a sul (ET: 0,34 e RF: 0,35). Os resultados relativos aos locais do Norte do país estão de acordo com o reportado pela literatura³⁴, onde, para a *S. ramosissima*, foram registados valores de rácio *n*-6/*n*-3: 0,51³⁴. Neste estudo³⁴ as amostras de *S. ramosissima*

estudadas foram recolhidas na mesma região onde foram obtidas as plantas analisadas no presente trabalho, o que ajuda a demonstrar a consistência dos dados obtidos.

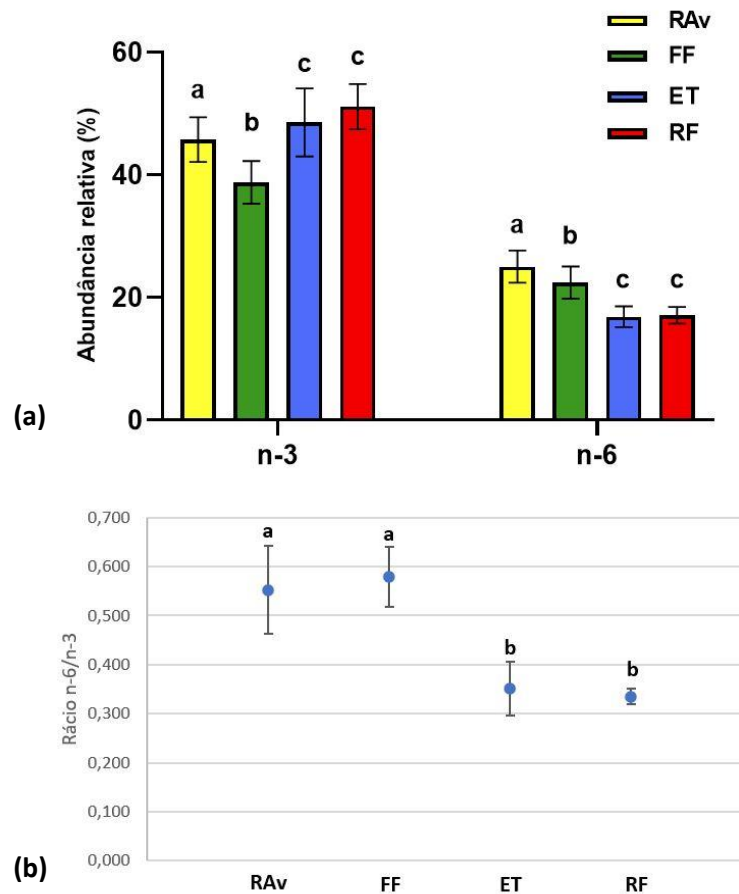


Figura 16: Representação gráfica da abundância relativa de ácidos gordos *n*-3 e *n*-6 (a) e do rácio *n*-6/*n*-3 (b) em rebentos de *Salicornia ramosissima* de cada um dos locais amostrados: RAv - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Tabela 5: Diferenças significativas (ANOVA) entre os ácidos gordos presentes nos rebentos de *S. ramosissima* dos 4 locais da costa Portuguesa: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF). SFA - ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - ácidos gordos polinsaturados; *n*-3 - ácidos gordos *n*-3; *n*-6 – ácidos gordos *n*-6, *n*-6/*n*-3 – rácio *n*-6/*n*-3; IA - índice de aterogenicidade; IT - índice de trombogenicidade. Os valores de *p* destacados em negrito são <0,05. Não é apresentado o ácido 9, 10-epóxi-octadecanóico, uma vez que este só está presente na Figueira da Foz.

FA	RAv vs FF	RAv vs ET	RAv vs RF	FF vs ET	FF vs RF	ET vs RF
C14:0	<0,001	0,039	0,005	0,002	<0,001	<0,001
C16:0	<0,001	<0,001	0,215	0,692	0,002	0,056
C16:1	<0,001	0,960	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
C17:0	0,755	0,001	0,193	0,017	0,017	<0,001
C18:0	0,017	<0,001	0,108	0,382	0,929	0,134
C18:1 <i>n</i> -9	0,224	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,015
C18:2 <i>n</i> -6	0,600	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,990
C18:3 <i>n</i> -3	0,001	0,203	0,002	<0,001	<0,001	0,337
C20:0	0,023	0,911	0,999	0,003	0,035	0,890
C22:0	<0,001	0,139	0,658	0,008	<0,001	0,784
C24:0	<0,001	0,850	<0,001	<0,001	0,880	<0,001
SFA	<0,001	<0,001	0,013	0,924	0,080	0,284
MUFA	0,750	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,950
PUFA	<0,001	<0,001	0,234	0,345	0,002	0,217
<i>n</i> -3	0,001	0,203	0,002	<0,001	<0,001	0,337
<i>n</i> -6	0,600	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,990
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	0,750	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,870
IA	<0,001	<0,001	0,248	0,487	<0,001	0,021
IT	<0,001	0,035	0,995	0,154	<0,001	0,079

A presença de lípidos com alto valor nutricional, como os FA essenciais (*n*-3 e *n*-6) valorizam nutricionalmente esta planta halófito. ALA (*n*-3) e LA (*n*-6) são precursores de compostos eicosanóides anti-inflamatórios e pró-inflamatórios, respectivamente ⁹⁵. Assim, o ALA tem diversos efeitos benéficos para a saúde humana, sendo um precursor de EPA e DHA, e as evidências mostram que o aumento do consumo de ALA está associado a maiores teores, nos tecidos, de ALA, EPA, e, em menor extensão, de DHA⁹⁶ (Figura 4). Estes dois últimos FA são precursores importantes de moléculas eicosanóides, com importante função no processo anti-inflamatório ^{49,95}. Para além disso, o ALA pode auxiliar na redução dos níveis de AA, ao competir com LA pelas mesmas enzimas ⁵⁰. A conversão de LA em AA, e de ALA em EPA e DHA são feitas recorrendo ao mesmo conjunto de enzimas⁵⁰, o que exige, desde logo, uma competição entre os FA *n*-3 e *n*-6 pelas enzimas de dessaturação (Figura 4). No entanto as enzimas Δ 4- e Δ 6-dessaturase têm uma maior afinidade para os FA *n*-3. Como o ALA é um FA fundamental para a síntese de compostos anti-inflamatórios, a sua ingestão contribui para ajudar na prevenção de doenças coronárias⁴⁹. Assim, tendo em consideração o que foi referido, e lembrando que o ser humano não tem maquinaria enzimática que permita sintetizar LA e ALA de novo⁴⁷, o consumo de FA *n*-3 é fundamental para a resposta anti-inflamatória do organismo. Contudo é também necessário o consumo de FA *n*-6 para a manutenção da homeostasia do organismo^{50,97}. Deste modo, é importante assegurar um consumo equilibrado destas duas famílias de FA, tentando encontrar fontes que forneçam estes dois FA, mas com maior predominância de *n*-3 ^{49,96,97}. Um rácio *n*-6/*n*-3 adequado é portanto desejável nos alimentos, de modo a promover benefícios para a saúde humana e contribuindo para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e estados de inflamação no organismo⁹⁷. Plantas que apresentem rácios de *n*-6/*n*-3 com valores mais baixos, permitem assim uma maior valorização. Os valores mais baixos de rácio *n*-6/*n*-3 foram identificados no ET e na RF.

O IA e o IT calculados para o perfil de FA de rebentos de *S. ramosissima*, dos 4 locais analisados estão resumidos na Figura 17. As plantas estudadas nos diferentes locais apresentaram um IA e um IT igual ou inferior a 0,35. Os valores de IA mais baixos foram identificados na RAv (0,26) e RF (0,28), não registando diferenças significativas entre eles (Tabela 5); os valores de IA mais altos foram identificados na FF (0,35) e no ET (0,32), também não apresentando diferenças significativas entre si. Entre estes dois conjuntos de locais (RAv, RF e ET, FF) verificaram-se diferenças significativas (Tabela 5). Os valores de IT mais baixos foram registados na RAv (0,15) e RF (0,16), sem diferenças significativas entre eles, seguidos da FF (0,21) e ET (0,19), também sem diferenças significativas entre os 2 locais (Tabela 5). As plantas da RF também não apresentaram diferenças significativas com o ET (Tabela 5). Os resultados obtidos apresentam valores inferiores aos reportados pela literatura, quer para a *S. ramosissima*, quer para plantas de diferentes géneros de halófitas¹³. Para o caso da *S. ramosissima* os valores reportados pela literatura são os que se encontram mais afastados dos valores obtidos neste trabalho (com IA=0,73 e IT=0,36)¹³. Os valores encontrados na literatura para os outros géneros de halófitas estudados (*Arthrocnemum macrostachyum*, *Sarcocornia perennis alpini*, *Sarcocornia perennis perennis*), são igualmente elevados (IA: 0,45 – 0,62; IT: 0,21 – 0,37) comparativamente aos resultados obtidos para a *S. ramosissima*, nos 4 locais.

A composição de FA na dieta, em particular os PUFA, têm implicações no risco de doenças cardiovasculares. Assim, o IA e o IT, são dois índices que permitem avaliar e prever os benefícios associados à ingestão de lípidos, podendo ser usados como indicadores de risco cardiovascular⁸⁵. Estes índices podem ser usados para avaliar a qualidade lipídica dos alimentos⁹⁸. O IA indica a relação entre os FA saturados, que são considerados pró-aterogénicos, e os FA insaturados, considerados anti-aterogénicos, ou seja, avalia a relação entre os FA que favorecem a adesão de lípidos às células dos sistemas imunológico e circulatório e os FA que inibem a formação de placas lipídicas⁹⁸. O IT é definido como a relação entre os FA saturados (pró-trombogénicos) e os MUFA e os PUFA *n*-3 e *n*-6 (anti-trombogénicos) e reflete a tendência para formar coágulos nos vasos sanguíneos⁹⁸. Portanto, é desejável baixos valores de IT e IA (<1)⁹⁸. Os valores de IA e IT inferiores a 1, para a *S. ramosissima*, são devidos, principalmente, ao elevado conteúdo de ALA presente nas plantas estudadas. Assim, as plantas que apresentam

valores de IA e IT mais baixos, são as que apresentam um melhor valor nutricional. Os valores mais baixos de IA e IT foram identificados em plantas oriundas da RAv e da RF.

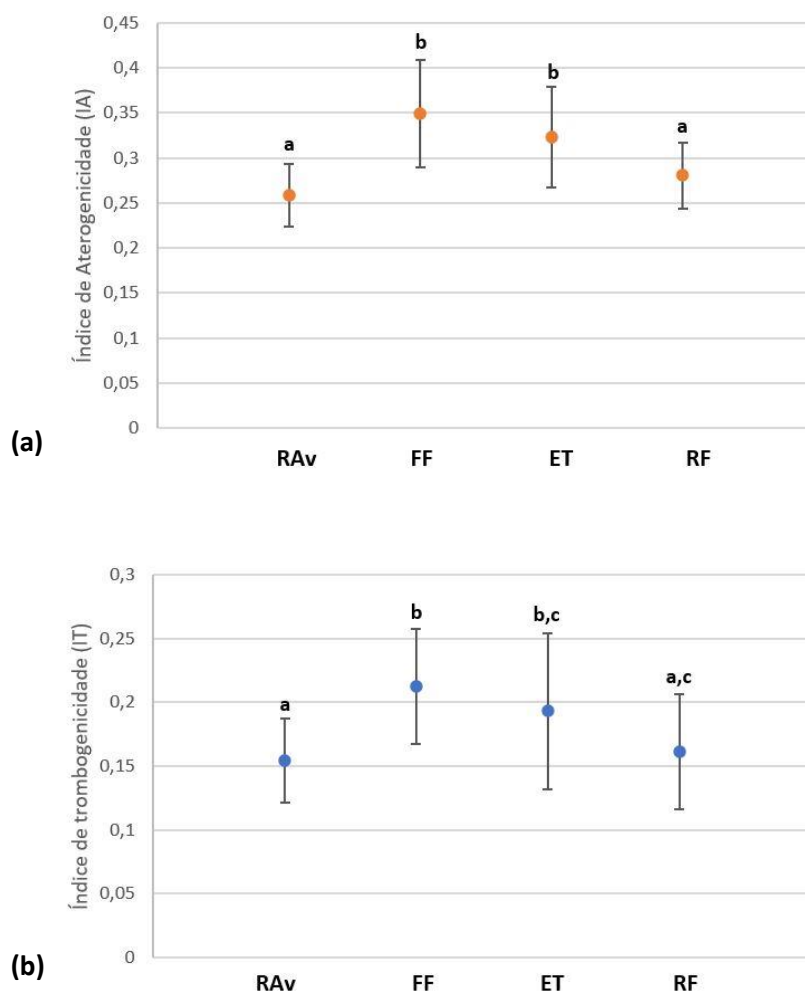


Figura 17: Representação gráfica do índice de Aterogenicidade (IA) (a) e do Índice de Trombogenicidade (IT) (b) registados em rebentos de *Salicornia ramosissima* amostrada em cada um dos locais em estudo (RAv - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa). Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Em suma, todos os locais apresentaram valores inferiores a 1 para os rácios $n-6/n-3$ e para os índices IA e IT, apresentando assim características nutricionais benéficas para a saúde humana, o que, de uma forma geral, valoriza nutricionalmente a planta *S. ramosissima*.

4.3. Utilização do perfil de ácidos gordos na rastreabilidade da origem geográfica

A análise ANOSIM resultou num R global de 0,686 ($p = 0,001$). Na Tabela 6 estão representados os valores de similaridade (ANOSIM) entre os perfis de FA de rebentos de *S. ramosissima* dos 4 locais amostrados ao longo da costa Portuguesa. Com o valor de R global (R= 0,686) apresentado é possível inferir que a utilização do perfil de FA pode ter aplicação na discriminação dos locais de origem das amostras, fornecendo um ponto de partida para continuar e aprofundar a utilização do perfil de FA na identificação da origem geográfica de *S. ramosissima*. Analisando os valores de R para cada par de locais (Tabela 6), verifica-se que os locais que apresentam um R mais elevado são aqueles que estão geograficamente mais afastados, como é o caso da RAv vs. RF (R=0,874) e da FF vs. RF (R=0,895). Os locais que apresentam um menor R são aqueles que se encontram mais próximos geograficamente, e que provavelmente, face à proximidade geográfica, apresentam igualmente condições ambientais mais semelhantes. Apesar de isto se confirmar para o caso de ET e RF (R=0,576), não se verificou para a situação de RAv e FF (R=0,697) como poderíamos esperar, uma vez que são dois ecossistemas muito próximos entre si. Isto pode estar associado à presença do ácido 9,10-epoxi-octadecanoico na FF, que pode ser determinante para a distinção deste local dos restantes. Analisando os resultados obtidos pelas ANOVAs realizadas (Tabela 5), verifica-se que os FA identificados em *S. ramosissima* apresentam diferenças significativas entre os 4 locais estudados, provavelmente como uma consequência das diferentes condições ambientais existentes em cada local.

Tabela 6: Valores de similaridade (ANOSIM) entre o perfil de ácidos gordos de rebentos de *S. ramosissima* amostradas na Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).

Locais	R estatístico	<i>p-value</i>
RAv vs FF	0,697	0,001
RAv vs ET	0,568	0,001
RAv vs RF	0,874	0,001
FF vs ET	0,763	0,001
FF vs RF	0,895	0,001
ET vs RF	0,576	0,001

As plantas halófitas, tal como a maioria das plantas, estão sujeitas a diversos fatores de stress abiótico, consoante o local onde vivem, tal como temperatura, água, luz, sal, contaminação por metais, entre outros ^{44,99,100}. A maioria destes fatores físico-químicos tendem a variar geograficamente, levando a que se criem condições ambientais diferentes, que podem influenciar o desenvolvimento das plantas⁴²e conseqüentemente podem levar a alterações na absorção de nutrientes, atividade fotossintética e metabolismo^{43,45}. Os lípidos são moléculas essenciais que mantêm a integridade das células e podem atuar como compostos sinalizadores para controlar processos biológicos vitais e proteger os organismos de ambientes hostis ^{101,102}. Assim, um mecanismo utilizado pelas plantas para se adaptarem às mudanças ambientais, é a modificação do perfil lípidico das membranas celulares, incluindo os FA⁴³⁻⁴⁵. No caso das halófitas, uma vez que normalmente ocorrem em zonas costeiras, estão sujeitas a variações de temperatura e de níveis de salinidade. Este trabalho foi realizado ao longo da costa Portuguesa, onde se verifica uma variação da temperatura da água do mar, com temperaturas mais baixas no Norte do país e temperaturas mais quentes no Sul ¹⁰³. Com temperaturas mais baixas verificam-se níveis mais elevados de insaturação de FA, do que com temperaturas mais elevadas. O aumento de insaturações de FA devido à diminuição da temperatura, permite que as membranas celulares mantenham a sua fluidez sem comprometer a homeostasia entre o ambiente intracelular e extracelular⁵¹. Estas previsões foram confirmadas neste estudo, uma vez que as amostras de *S. ramosissima* coletadas em ecossistemas localizados a norte de Portugal, que apresentam temperaturas mais baixas (RAv e FF – Temperatura: 20°C – 22°C (¹⁰³)), apresentam um nível de insaturação superior ao dos ecossistemas a sul (% FA insaturados: RAv= 74,42%; FF= 65,24%; ET= 68,06%; RF= 70,78%), onde as temperaturas são mais altas (ET e RF – Temperatura: 22°C – 24°C) ¹⁰³.

Para além da temperatura, um dos fatores que influencia o perfil de FA é a salinidade. A maior abundância de FA de cadeia longa e PUFA poderá estar relacionada com a resistência das plantas ao sal. Os resultados obtidos mostram que a *S. ramosissima* tem um conteúdo elevado de FA de cadeia longa e PUFA. Em plantas halófitas, o papel principal na resistência ao sal é desempenhado por FA C18:2n-6 e C18:3n-3. Tendo sido já demonstrado que as plantas halófitas desenvolveram vários mecanismos para a regulação da fluidez da membrana através da alteração da composição de FA, nomeadamente o aumento da percentagem de FA de cadeia longa ⁵², tal como

documentado em *A. santonica* ou *S. perennans*³³, e/ou a regulação pelo aumento das contribuições individuais de FA para o nível geral de FA insaturados^{33,53}.

De forma a confirmar se o perfil de FA pode ser usado para discriminar os diferentes locais de origem realizou-se o CAP, que tem como objetivo a associação das amostras, criando conjuntos de amostras que se correlacionem fortemente⁸⁶, permitindo a discriminação dos locais. O CAP apresenta uma taxa de sucesso de 93% (Tabela 7; Figura 18). As amostras recolhidas na RF apresentaram a percentagem de classificação correta mais elevada (100%), seguidas das amostras do ET, onde apenas 1 amostra de *S. ramosissima* foi classificada incorretamente (ou seja, 96,7% das classificações foram corretas). A RAv apresentou uma classificação correta de 90%, onde 3 amostras foram erradamente atribuídas a outros locais e por fim, a FF foi o local que apresentou um mais número de amostras erradamente alocadas (4 amostras), fazendo com que a percentagem de classificação correta tenha sido de 86,7%. Estes resultados demonstram que o perfil de FA pode ser efetivamente usado com um elevado grau de segurança, para discriminar os diferentes locais de origem das plantas estudadas. Contudo é importante confirmar se o perfil de FA permite determinar o local de cultivo de plantas em que este é desconhecido, ou seja, validar o método.

Tabela 7: Sucesso de classificação da análise canônica das coordenadas principais (CAP) do perfil de ácidos gordos da *Salicornia ramosissima* nos 4 locais da costa Portuguesa: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).

Grupo de origem	Localização prevista				Total de amostras por local	%Correto
	RAv	FF	ET	RF		
RAv	27	2	1	0	30	90
FF	3	26	1	0	30	86,7
ET	1	0	29	0	30	96,7
RF	0	0	0	27	27	100
Sucesso médio de classificação						93

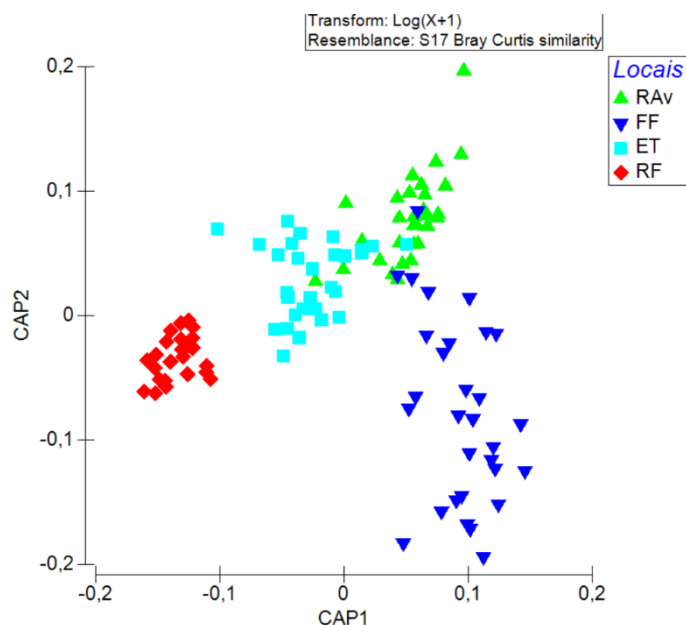


Figura 18: Análise canônica das coordenadas principais (CAP) do perfil de ácidos gordos da *S. ramosissima* dos 4 locais em estudo: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).

Assim procedeu-se à validação do método, que permite identificar o local de origem de uma amostra desconhecida, através do seu perfil de FA. Para tal recorreu-se aos dados (perfil de FA) já recolhidos para as amostras analisadas neste trabalho para criar as bases de dados do modelo. As amostras que foram dadas ao modelo como amostras cegas foram alocadas nos diferentes locais consoante o seu perfil de FA. Os resultados do CAP mostram uma taxa de sucesso do modelo de 95% (Figura 19; Tabela 8). Olhando pormenorizadamente para os resultados obtidos para cada local, os dados são os seguintes: para a RAv e RF a percentagem de erro é 0%, ou seja, todas as réplicas de RAv e RF usadas como amostras cegas foram alocadas aos respetivos locais de origem; para a FF a percentagem de erro na alocação foi de 40%. Ou seja, 40% das réplicas de FF usadas como amostras cegas não foram alocadas, pelo modelo, à FF; no caso de ET verificou-se que, tal como na FF, nem todas as amostras foram corretamente alocadas. Neste caso a percentagem de erro na alocação das amostras cegas foi de 27%.

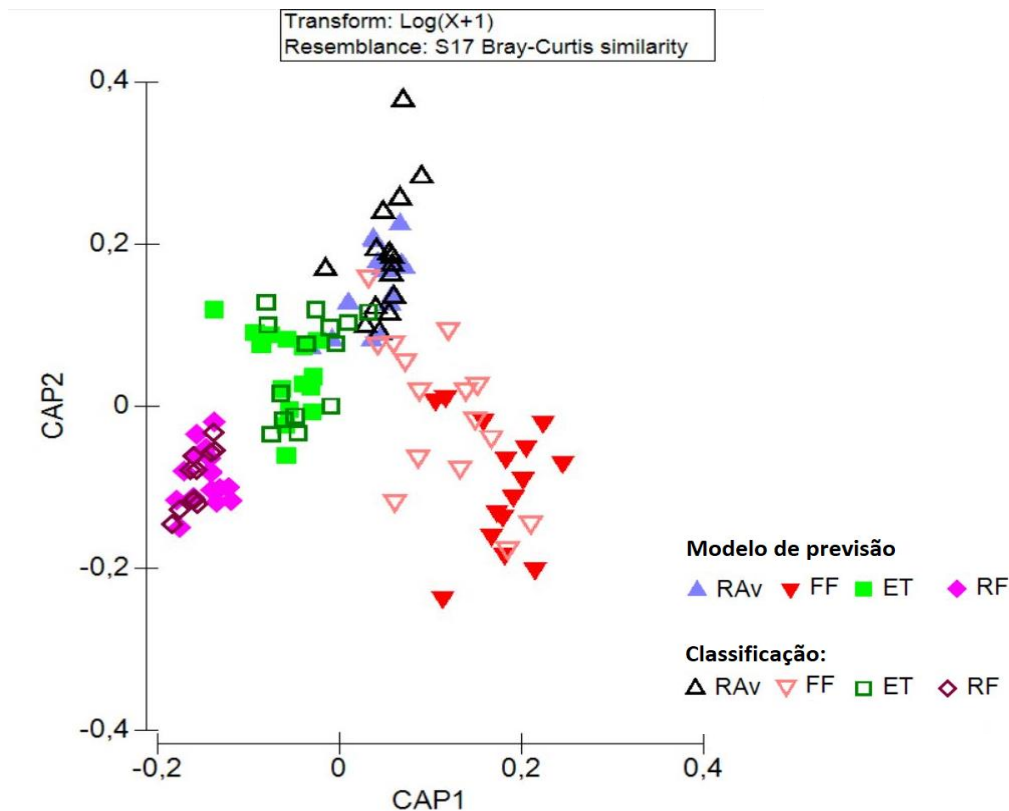


Figura 19: Análise canónica das coordenadas principais (CAP) baseada no perfil de ácidos gordos de rebentos de *Salicornia ramosissima* em 4 locais da costa continental Portuguesa. RAV - Ria de Aveiro; FF - Figueira da Foz; ET - Estuário do Tejo; RF - Ria Formosa.

Em suma, alguns dos fatores abióticos que mais influenciam o perfil de FA com a variação latitudinal, no caso das plantas halófitas, são a temperatura e a salinidade, entre outros. A variação destes fatores ao longo da costa Portuguesa, fazem com que as plantas sejam sujeitas a mudanças das condições ambientais, consoante os locais onde são cultivadas. Desta forma, as halófitas desenvolvem mecanismos de proteção, sendo um deles a alteração do perfil de FA de forma a se adaptarem às condições ambientais envolventes. Assim o presente estudo mostra que o perfil de FA exibido pela *S. ramosissima* pode ser usado com sucesso para rastrear sua origem geográfica num conjunto de ecossistemas distribuídos ao longo da costa Portuguesa. Com a validação do método demonstrou-se que o modelo apresentado é robusto, e que pode ser usado na rastreabilidade da origem geográfica de *S. ramosissima*. Uma forma de melhorar o presente modelo preditivo será, num próximo estudo, usar verdadeiras amostras cegas para alocar aos respetivos locais de origem.

Tabela 8: Sucesso de classificação da validação cruzada para rebentos de *Salicornia ramosissima* com base no seu perfil de ácidos gordos em 4 locais da costa continental Portuguesa: Ria de Aveiro (RAv), Figueira da Foz (FF), Estuário do Tejo (ET) e Ria Formosa (RF).

Área de origem	Área prevista				Total de amostras por local	%Correta de alocação do local de origem	%Classificação			
	RAv	FF	ET	RF			RAv	FF	ET	RF
RAv	15				15	100	100			
FF	6	9			15	60	40	60		
ET	4		11		15	73	27		73	
RF				11	11	100				100

5. Conclusão

Devido à ocorrência de alterações climáticas, um dos efeitos espectáveis é a subida do nível médio da água do mar, que tem como consequência um aumento da salinização dos solos em zonas costeiras ¹. Atualmente existe um esforço acrescido na busca de soluções que permitam alcançar uma produção agrícola sustentável, recorrendo a solos salinizados e à utilização de água salobra e/ou salgada³. Assim, o cultivo de plantas tolerantes ao sal, como *S. ramosissima*, é considerado uma estratégia promissora para fazer face à crescente necessidade de alimento, ao aumento da salinização dos solos e à escassez de água doce. Hoje em dia, *S. ramosissima*, é consumida em vários mercados Europeus e é caracterizada por um lipídoma nutricionalmente relevante com a presença de vários lípidos *n-3* ^{34,35}. Os estudos mostram que o perfil dos FA pode variar com as condições ambientais, com a salinidade e a temperatura ^{44,51}. Com o aumento do consumo e da produção deste vegetal marinho, foi importante aprofundar os estudos da sua composição bioquímica, em particular o perfil de FA, e como as condições abióticas o podem afetar, podendo ser usado como uma assinatura natural para a *S. ramosissima* produzida em diferentes locais.

No presente trabalho pretendeu-se estudar o perfil de FA da *S. ramosissima*, cultivada em diferentes locais da costa continental Portuguesa. Assim, identificaram-se os FA presentes em cada um dos locais, de forma a valorizar nutricionalmente *S. ramosissima*, como fonte de FA benéficos para a saúde humana, e avaliar o perfil de FA como uma ferramenta para a rastrear a sua origem geográfica.

Neste estudo foram identificados 11 FA nos 4 locais, com a exceção da FF, onde para além dos 11 FA, foi ainda identificado um FA oxidado (ácido 9,10-epoxi-octadecanoico). Em todos os locais foi verificada uma predominância de PUFA (61,25% - 70,84%), como o C18:3*n-3* (38,80% - 51,16%) e o C18:2*n-6* (16,88% - 25,05%), sendo os FA mais abundantes na planta. Os SFA são a segunda classe mais abundante (25,58% - 31,44%), seguida dos MUFA (2,48% - 3,99%). Relativamente ao FA oxidado, estes derivados de FA são encontrados em plantas e a sua formação está associada à resposta destes organismos a situações de stress biótico e abiótico, ou a um incorreto armazenamento. É possível que a presença deste FA se deva à exposição das plantas a condições de stress. Contudo, para confirmar esta informação é necessário proceder ao

estudo lipídico das plantas da FF, em diferentes zonas do mesmo habitat, e em diferentes condições de armazenamento.

De forma a promover nutricionalmente a *S. ramosissima*, foi avaliada a presença de FA *n*-3, *n*-6, rácio *n*-6/*n*-3, IA e IT. Verificou-se que, em todos os locais, os FA *n*-3 (38,8% - 51,2%) são mais abundantes do que os FA *n*-6 (16,9% - 25,1%). Todos os locais apresentaram valores inferiores a 1 para os rácios *n*-6/*n*-3 e os índices IA e IT, apresentam valores correspondentes a propriedades nutricionais benéficas para a saúde humana, o que valoriza nutricionalmente a *S. ramosissima*. Neste trabalho, as amostras que apresentaram melhores valores de rácio *n*-6/*n*-3 foram recolhidas em ET (0,34) e a RF (0,35). Para os IA e IT os melhores valores foram apresentados em RAv (IA: 0,26; IT: 0,15) e RF (IA: 0,28; IT: 0,16). De uma forma geral, os rebentos de *S. ramosissima* da RF são aqueles que apresentam melhores características nutricionais.

O estudo realizado demonstrou como o perfil de FA, suportado por uma análise estatística adequada, pode ser uma ferramenta robusta para rastrear a origem geográfica de *S. ramosissima*. Esta abordagem bioquímica permitiu-nos diferenciar plantas de diferentes locais da costa portuguesa com uma taxa de sucesso na discriminação dos locais de pelo menos 93%. A rastreabilidade geográfica pode desempenhar um papel fundamental para os produtores que pretendem valorizar os seus produtos, garantindo que as plantas comercializadas têm origem em zonas seguras relativamente à presença de metais e outras substâncias que possam constituir uma ameaça para a saúde pública. Para além disso, esta estratégia ajuda a salvaguardar a qualidade e a origem destas plantas halófitas e a aumentar a segurança dos consumidores, que procuram cada vez mais produtos saudáveis e com melhores propriedades nutricionais.

Um aspeto importante a desenvolver em trabalhos futuros será a monitorização da variabilidade sazonal e inter-anual no perfil de FA destas plantas, de modo a verificar se é possível a criação de um banco de dados que permita rastrear o local de colheita/produção destes legumes do mar.

6. Bibliografia

- (1) FAO. Salinity Seminar | Land & Water | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/land-water/overview/wasag/events/wasagsalinity/en/> (acedido a Out 21, 2019).
- (2) População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU | ONU Brasil. <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/> (acedido a Out 21, 2019).
- (3) Ventura, Y.; Sagi, M. Halophyte Crop Cultivation: The Case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *92*, 144–153.
- (4) Flowers, T. J.; Colmer, T. D. Salinity Tolerance in Halophytes. *New Phytol.* **2008**, *179* (4), 945–963.
- (5) Flowers, T. J.; Colmer, T. D. Plant Salt Tolerance: Adaptations in Halophytes. *Ann. Bot.* **2015**, *115* (3), 327–331.
- (6) Silva, H.; Caldeira, G.; Freitas, H. *Salicornia ramosissima* Population Dynamics and Tolerance of Salinity. *Ecol. Res.* **2007**, *22*, 125–134.
- (7) Flowers, T. J.; Munns, R.; Colmer, T. D. Sodium Chloride Toxicity and the Cellular Basis of Salt Tolerance in Halophytes. *Ann. Bot.* **2015**, *115* (3), 1–13.
- (8) Gil, R.; Boscaiu, M.; Lull, C.; Bautista, I.; Lidón, A.; Vicente, O. Are Soluble Carbohydrates Ecologically Relevant for Salt Tolerance in Halophytes? *Funct. Plant Biol.* **2013**, *40* (9), 805–818.
- (9) Davy, A. J.; Bishop, G. F.; Costa, C. S. B. *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. Obscura* P.W. Ball & Tutin, *S. Nitens* P.W. Ball & Tutin, *S. Fragilis* P.W. Ball & Tutin and *S. Dolichostachya* Moss). *J. Ecol.* **2001**, *89* (219), 681–707.
- (10) Isca, V. M. S.; Seca, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, H.; Silva, A. M. S. Lipophilic Profile of the Edible Halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chem.* **2014**, *165*, 330–336.
- (11) Patel, S. *Salicornia*: Evaluating the Halophytic Extremophile as a Food and a Pharmaceutical Candidate. *3 Biotech* **2016**, *6*, 104.
- (12) Ventura, Y.; Eshel, A.; Pasternak, D.; Sagi, M. The Development of Halophyte-Based Agriculture: Past and Present. *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 1–12.
- (13) Barreira, L.; Resek, E.; Rodrigues, M. J.; Rocha, M. I.; Pereira, H.; Bandarra, N.; da Silva, M. M.; Varela, J.; Custódio, L. Halophytes: Gourmet Food with Nutritional Health Benefits? *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *59*, 35–42.
- (14) Van Oosten, M. J.; Maggio, A. Functional Biology of Halophytes in the Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils. *Environ. Exp. Bot.* **2015**, *111*, 135–146.
- (15) de Melo, H.; de Souza, E.; de Almeida, B.; Mulas, M. Water Potential in Soil and *Atriplex nummularia* (Phytoremediator Halophyte) under Drought and Salt Stresses. *Int. J. Phytoremediation* **2018**, *20* (3), 249–255.
- (16) Feng, J.; Lin, Y.; Yang, Y.; Shen, Q.; Huang, J.; Wang, S.; Zhu, X.; Li, Z. Tolerance and Bioaccumulation of Cd and Cu in *Sesuvium portulacastrum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 306–312.
- (17) Brown, J. J.; Glenn, E. P. Reuse of Highly Saline Aquaculture Effluent to Irrigate a

- Potential Forage Halophyte, *Suaeda esteroa*. *Aquac. Eng.* **1999**, *20* (2), 91–111.
- (18) Brown, J. J.; Glenn, E. P.; Fitzsimmons, K. M.; Smith, S. E. Halophytes for the Treatment of Saline Aquaculture Effluent. *Aquaculture* **1999**, *175*, 255–268.
 - (19) Imai, H.; Kinoshita, M.; Ohnishi, M. Chemical Characterization of Glycerolipids and Cerebrosides in a Halophytic Plant, *Salicornia Europaea* L. *J. Oleo Sci.* **2004**, *53* (7), 337–341.
 - (20) Glenn, E. P.; Coates, W. E.; Riley, J. J.; Kuehl, R. O.; Swingle, R. S. *Salicornia bigelovii* Torr.: A Seawater-Irrigated Forage for Goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1992**, *40* (1), 21–30.
 - (21) Eganathan, P.; Subramanian, H. M.; Latha, R.; Rao, C. S. Oil Analysis in Seeds of *Salicornia brachiata*. *Ind. Crops Prod.* **2006**, *23*, 177–179.
 - (22) Patel, M. K.; Pandey, S.; Brahmabhatt, H. R.; Mishra, A.; Jha, B. Lipid Content and Fatty Acid Profile of Selected Halophytic Plants Reveal a Promising Source of Renewable Energy. *Biomass and Bioenergy* **2019**, *124*, 25–32.
 - (23) De Lange, H. J.; Paulissen, M. P. C. P.; Slim, P. A. “Halophyte Filters”: The Potencial of Constructed Wetlands for Application in Saline Aquaculture. *Int. J. Phytoremediation* **2013**, *15*, 352–364.
 - (24) Pasternak, D. Fodder Production with Saline Water: Project Report, January 1982–December 1989. *Institutes Appl. Res. Ben Gurion Univ. Negev (Israel)*. **1990**, No. 35.
 - (25) *Salicornia ramosissima* (J.Woods). <http://almargem.org/biodiv/especie/salicornia-ramosissima/> (acedido a Jan 23, 2021).
 - (26) Distribuição geográfica da *Salicornia ramosissima*. <https://flora-on.pt/#/1salicornia> (acedido a Jan 13, 2020).
 - (27) ALGApplus. <https://www.algaplus.pt/> (acedido a Jan 23, 2021).
 - (28) RiaFresh. <https://www.algaplus.pt/> (acedido a d Jan 23, 2021).
 - (29) Projecto Matéria - Neptun Pearl. https://www.projectomateria.pt/pt/produtores/neptun-pearl_9 (acedido a Jan 23, 2021).
 - (30) Nwar, F. A. A.; Hanger, M. I. B.; Asir, M. K. H. A. N.; Smail, S. A. I. Analytical Characterization of *Salicornia bigelovii* Seed Oil Cultivated in Pakistan. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4210–4214.
 - (31) Rozentsvet, O. A.; Nesterov, V. N.; Bogdanova, E. S. Physiological and Biochemical Aspects of Halophyte Ecology. *Biol. Bull.* **2017**, *44* (10), 1295–1301.
 - (32) Choi, D.; Lim, G. S.; Piao, Y. L.; Choi, O. Y.; Cho, K. A.; Park, C. B.; Chang, Y. C.; Song, Y. Il; Lee, M. K.; Cho, H. Characterization, Stability, and Antioxidant Activity of *Salicornia herbacea* Seed Oil. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31* (12), 2221–2228.
 - (33) Rozentsvet, O. A.; Nesterov, V. N.; Bogdanova, E. S. Membrane-Forming Lipids of Wild Halophytes Growing under the Conditions of Prieltonie of South Russia. *Phytochemistry* **2014**, *105*, 37–42.
 - (34) Maciel, E.; Lillebø, A.; Domingues, P.; da Costa, E.; Calado, R.; Domingues, M. R. M. Polar Lipidome Profiling of *Salicornia ramosissima* and *Halimione portulacoides* and the Relevance of Lipidomics for the Valorization of Halophytes. *Phytochemistry* **2018**, *153*, 94–101.
 - (35) Maciel, E.; Domingues, P.; Domingues, M. R. M.; Calado, R.; Lillebø, A. Halophyte

- Plants from Sustainable Marine Aquaponics Are a Valuable Source of Omega-3 Polar Lipids. *Food Chem.* **2020**, *320*, 1–8.
- (36) Ventura, Y.; Wuddineh, W. A.; Myrzabayeva, M.; Alikulov, Z.; Khozin-Goldberg, I.; Shpigel, M.; Samocha, T. M.; Sagi, M. Effect of Seawater Concentration on the Productivity and Nutritional Value of Annual *Salicornia* and Perennial *Sarcocornia* Halophytes as Leafy Vegetable Crops. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2011**, *128*, 189–196.
- (37) Simopoulos, A. P.; Artemis, D.; Simopoulos, P. Omega-3 Fatty Acids and Antioxidants in Edible Wild Plants. *Biol Res* **2004**, *37*, 263–277.
- (38) Campos, L. S. *Entender a Bioquímica*, 5^a ed.; Escolar Editora: Lisboa, 2009.
- (39) Boudière, L.; Michaud, M.; Petroustos, D.; Rébeillé, F.; Falconet, D.; Bastien, O.; Roy, S.; Finazzi, G.; Rolland, N.; Jouhet, J.; Block, M. A.; Maréchal, E. Glycerolipids in Photosynthesis: Composition, Synthesis and Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837* (4), 470–480.
- (40) Malhotra, R. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **2012**, *1* (2), 1–5.
- (41) Dowhan, W. Role of Phospholipids in Cell Function. *Dyn. Membrane Assem.* **1992**, *63*, 11–32.
- (42) Abd El-Maboud, M. M.; Abd Elbar, O. H. Adaptive Responses of *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. Growing Naturally at Different Habitats. *Plant Physiol. Reports* **2020**, *25* (2), 325–334.
- (43) Tsydendambaev, V. D.; Ivanova, T. V.; Khalilova, L. A.; Kurkova, E. B.; Myasoedov, N. A.; Balnokin, Y. V. Fatty Acid Composition of Lipids in Vegetative Organs of the Halophyte *Suaeda Altissima* under Different Levels of Salinity. *Russ. J. Plant Physiol.* **2013**, *60* (5), 661–671.
- (44) He, M.; Ding, N. Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–15.
- (45) Sui, N.; Han, G. Increases of Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protects Photosystem II from Photoinhibition under Salinity in Different Halophytes. *J. Agric. Sci.* **2014**, *6* (12), 251–264.
- (46) Guil, J.L.; Torija, M.E.; Giménez, J.J.; Rodríguez, I. Identification of Fatty Acids in Edible Wild Plants by Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *719* (3), 229–235.
- (47) Stuchlík, Milan; Žák, S. Vegetable Lipids as Components of Functional Foods. *biomed. Pap.* **2002**, *146* (2), 3–10.
- (48) Bandeira-Melo, C.; Bozza, P. T.; Weller, P. F. The Cellular Biology of Eosinophil Eicosanoid Formation and Function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *109* (3), 393–400.
- (49) Barceló-Coblijn, G.; Murphy, E. J. Alpha-Linolenic Acid and Its Conversion to Longer Chain n-3 Fatty Acids: Benefits for Human Health and a Role in Maintaining Tissue n-3 Fatty Acid Levels. *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48* (6), 355–374.
- (50) Schmitz, G.; Ecker, J. The Opposing Effects of N-3 and n-6 Fatty Acids. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47* (2), 147–155.
- (51) Canvin, D. T. The Effect of Temperature on the Oil Content and Fatty Acid Composition of the Oils from Several Oil Seed Crops. *Can. J. Bot.* **1965**, *43*, 63–69.
- (52) Kasamo, K.; Nouchi, I. The Role of Phospholipids in Plasma Membrane ATPase Activity in *Vigna radiata* L. (Mung Bean) Roots and Hypocotyls. *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 323–

- (53) Allakhverdiev, S. I.; Nishiyama, Y.; Suzuki, I.; Tasaka, Y.; Murata, N. Genetic Engineering of the Unsaturation of Fatty Acids in Membrane Lipids Alters the Tolerance of *Synechocystis* to Salt Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5862–5867.
- (54) Parlamento Europeu. Regulamento N° 178/2002 Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 28 de Janeiro de 2002. *J. Of. das Comunidades Eur.* **2002**, *31*, 1–24.
- (55) Banerjee, R.; Menon, H. Traceability in Food and Agricultural Products. *Int. Trade Cent.* **2015**, 1–48.
- (56) Van Der Vorst, J. G. A. J. Product Traceability in Food-Supply Chains. *Accredit. Qual. Assur.* **2006**, *11*, 33–37.
- (57) Zhang, J.; Bhatt, T. A Guidance Document on the Best Practices in Food Traceability; 2014; Vol. 13.
- (58) Aung, M. M.; Chang, Y. S. Traceability in a Food Supply Chain: Safety and Quality Perspectives. *Food Control* **2014**, *39*, 172–184.
- (59) Moe, T. Perspectives on Traceability in Food Manufacture. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 211–214.
- (60) Golan, E.; Krissoff, B.; Kuchler, F.; Calvin, L.; Nelson, K.; Price, G. *Traceability in the U.S. Food Supply: Economic Theory and Industry Studies*; Washington, 2004.
- (61) Le Nguyen, D. D.; Ngoc, H. H.; Dijoux, D.; Loiseau, G.; Montet, D. Determination of Fish Origin by Using 16S rDNA Fingerprinting of Bacterial Communities by PCR-DGGE: An Application on Pangasius Fish from Viet Nam. *Food Control* **2008**, *19*, 454–460.
- (62) Nguyen, D. D. Le; Gemrot, E.; Loiseau, G.; Montet, D. Determination of Citrus Fruit Origin by Using 16S rDNA Fingerprinting of Bacterial Communities by PCR- DGGE: An Application to Clementine from Morocco and Spain. *Fruits* **2008**, *63* (2), 75–84.
- (63) Tatsadjieu, N. L.; Maïworé, J.; Hadjia, M. B.; Loiseau, G.; Montet, D.; Mbofung, C. M. F. Study of the Microbial Diversity of *Oreochromis Niloticus* of Three Lakes of Cameroon by PCR-DGGE: Application to the Determination of the Geographical Origin. *Food Control* **2010**, *21*, 673–678.
- (64) Zhao, H.; Guo, B.; Wei, Y.; Zhang, B. Effects of Wheat Origin, Genotype, and Their Interaction on Multielement Fingerprints for Geographical Traceability. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10957–10962.
- (65) Silva, B.; Gonzaga, L. V.; Maltez, H. F.; Samochvalov, K. B.; Fett, R.; Costa, A. C. O. Elemental Profiling by ICP-MS as a Tool for Geographical Discrimination: The Case of Bracatinga Honeydew Honey. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *96*, 1–9.
- (66) Qi, J.; Li, Y.; Zhang, C.; Wang, C.; Wang, J.; Guo, W.; Wang, S. Geographic Origin Discrimination of Pork from Different Chinese Regions Using Mineral Elements Analysis Assisted by Machine Learning Techniques. *Food Chem.* **2021**, *337* (1–8), 127779.
- (67) Molkentin, J.; Lehmann, I.; Ostermeyer, U.; Rehbein, H. Traceability of Organic Fish - Authenticating the Production Origin of Salmonids by Chemical and Isotopic Analyses. *Food Control* **2015**, *53*, 55–66.
- (68) Molkentin, J.; Meisel, H.; Lehmann, I.; Rehbein, H. Identification of Organically Farmed Atlantic Salmon by Analysis of Stable Isotopes and Fatty Acids. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 535–543.

- (69) Karalis, P.; Poutouki, A. E.; Nikou, T.; Halabalaki, M.; Proestos, C.; Tsakalidou, E.; Gougoura, S.; Diamantopoulos, G.; Tassi, M.; Dotsika, E. Isotopic Traceability (¹³C and ¹⁸O) of Greek Olive Oil. *Molecules* **2020**, *25*, 1–12.
- (70) Guo, B. L.; Wei, Y. M.; Pan, J. R.; Li, Y. Stable C and N Isotope Ratio Analysis for Regional Geographical Traceability of Cattle in China. *Food Chem.* **2010**, *118*, 915–920.
- (71) Ricardo, F.; Pimentel, T.; Moreira, A. S. P.; Rey, F.; Coimbra, M. A.; Rosário Domingues, M.; Domingues, P.; Costa Leal, M.; Calado, R. Potential Use of Fatty Acid Profiles of the Adductor Muscle of Cockles (*Cerastoderma edule*) for Traceability of Collection Site. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–8.
- (72) James, G. O.; Hocart, C. H.; Hillier, W.; Chen, H.; Kordbacheh, F.; Price, G. D.; Djordjevic, M. A. Fatty Acid Profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under Nitrogen Deprivation. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3343–3351.
- (73) Portarena, S.; Farinelli, D.; Lauteri, M.; Famiani, F.; Esti, M.; Brugnoli, E. Stable Isotope and Fatty Acid Compositions of Monovarietal Olive Oils: Implications of Ripening Stage and Climate Effects as Determinants in Traceability Studies. *Food Control* **2015**, *57*, 129–135.
- (74) Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D. L.; Lobo-Prieto, A.; Aparicio, R. Andalusian Protected Designations of Origin of Virgin Olive Oil: The Role of Chemical Composition in Their Authentication. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, *121*, 1–9.
- (75) Mehari, B.; Redi-Abshiro, M.; Chandravanshi, B. S.; Combrinck, S.; McCrindle, R.; Atlabachew, M. GC-MS Profiling of Fatty Acids in Green Coffee (*Coffea arabica* L.) Beans and Chemometric Modeling for Tracing Geographical Origins from Ethiopia. *Soc. Chem. Ind.* **2019**, *99*, 3811–3823.
- (76) Mottese, A. F.; Albergamo, A.; Bartolomeo, G.; Bua, G. D.; Rando, R.; De Pasquale, P.; Saija, E.; Donato, D.; Dugo, G. Evaluation of Fatty Acids and Inorganic Elements by Multivariate Statistics for the Traceability of the Sicilian *Capparis spinosa* L. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *72*, 66–74.
- (77) Amorello, D.; Orecchio, S.; Pace, A.; Barreca, S. Discrimination of Almonds (*Prunus Dulcis*) Geographical Origin by Minerals and Fatty Acids Profiling. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30* (18), 2107–2110.
- (78) Ricardo, F.; Maciel, E.; Domingues, M. R.; Calado, R. Spatio-Temporal Variability in the Fatty Acid Profile of the Adductor Muscle of the Common Cockle *Cerastoderma edule* and Its Relevance for Tracing Geographic Origin. *Food Control* **2017**, *81*, 173–180.
- (79) Gong, Y.; Li, Y.; Chen, X.; Chen, L. Potential Use of Stable Isotope and Fatty Acid Analyses for Traceability of Geographic Origins of Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2018**, *32*, 583–589.
- (80) Mamede, R.; Ricardo, F.; Santos, A.; Díaz, S.; Santos, S. A. O.; Bispo, R.; Domingues, M. R. M.; Calado, R. Revealing the Illegal Harvesting of Manila Clams (*Ruditapes philippinarum*) Using Fatty Acid Profiles of the Adductor Muscle. *Food Control* **2020**, *118*, 1–9.
- (81) Grigorakis, K.; Alexis, M. N.; Anthony Taylor, K. D.; Hole, M. Comparison of Wild and Cultured Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*); Composition, Appearance and Seasonal Variations. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 477–484.
- (82) Monteiro, J. P.; Rey, F.; Melo, T.; Moreira, A. S. P.; Arbona, J. F.; Skjermo, J.; Forbord, S.; Funderud, J.; Raposo, D.; Kerrison, P. D.; Perrineau, M. M.; Gachon, C.; Domingues, P.; Calado, R.; Domingues, M. R. The Unique Lipidomic Signatures of *Saccharina latissima* Can Be Used to Pinpoint Their Geographic Origin. *Biomolecules* **2020**, *10* (1–

- 17).
- (83) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37* (8), 911–917.
- (84) Aued-Pimentel, S.; Lago, J. H. G.; Chaves, M. H.; Kumagai, E. E. Evaluation of a Methylation Procedure to Determine Cyclopropanoid Fatty Acids from *Sterculia Striata* St. Hil. Et Nauds Seed Oil. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 235–239.
- (85) Ulbricht, T. L. V.; Southgate, D. A. . Coronary Heart Disease: Seven Dietary Factors. *Lancet* **1991**, *338*, 985–992.
- (86) Anderson, M. J.; Clarke, K. R.; Gorley, R. N. *PERMANOVA+ for Primer. Guide to Software and Statistical Methods*, 1st ed.; PRIMER-E: Plymouth, UK, 2008.
- (87) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <https://www.r-project.org> (accedido a Jan 14, 2021).
- (88) Christie, W. W. Epoxy, Furanoid and Alkoxy Fatty Acids <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-epoxy/index.htm> (accedido a Nov 27, 2020).
- (89) Pinot, F.; Beisson, F. Cytochrome P450 Metabolizing Fatty Acids in Plants: Characterization and Physiological Roles. *FEBS J.* **2011**, *278* (2), 195–205.
- (90) Kandel, S.; Morant, M.; Benveniste, I.; Blée, E.; Werck-Reichhart, D.; Pinot, F. Cloning, Functional Expression, and Characterization of CYP709C1, the First Sub-Terminal Hydroxylase of Long Chain Fatty Acid in Plants: Induction by Chemicals and Methyl Jasmonate. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (43), 35881–35889.
- (91) Kandel, S.; Sauveplane, V.; Compagnon, V.; Franke, R.; Millet, Y.; Schreiber, L.; Werck-Reichhart, D.; Pinot, F. Characterization of a Methyl Jasmonate and Wounding-Responsive Cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* Catalyzing Dicarboxylic Fatty Acid Formation in Vitro. *FEBS J.* **2007**, *274* (19), 5116–5127.
- (92) Sauveplane, V.; Kandel, S.; Kastner, P. E.; Ehling, J.; Compagnon, V.; Werck-Reichhart, D.; Pinot, F. Arabidopsis Thaliana CYP77A4 Is the First Cytochrome P450 Able to Catalyze the Epoxidation of Free Fatty Acids in Plants. *FEBS J.* **2009**, *276* (3), 719–735.
- (93) Kolattukudy, P. E. Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1981**, *32* (1), 539–567.
- (94) Pinot, Franck; Salaun, Jean-Pierre; Bosch, Hubert; Lesot, Agnès; Mioskowski, Charles; Durst, F. W-Hydroxylation of Z9-Octadecenoic, Z9,10-Epoxystearic and 9,10-Dihydroxystearic Acids by Microsomal Cytochrome P450 Systems from *Vicia Sativa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184* (1), 183–193.
- (95) Nelson, David L.; Cox, M. M. *Principios de Bioquímica de Lehninger*; 2014. <https://doi.org/10.2307/j.ctvk8vxxm.7>.
- (96) Reiffel, J. A.; McDonald, A. Antiarrhythmic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Am. J. Cardiol.* **2006**, *98* (4A), 50–60.
- (97) Simopoulos, A. P. The Importance of the Ratio of Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acids. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56* (8), 365–379.
- (98) Garaffo, M. A.; Vassallo-Agius, R.; Nengas, Y.; Lembo, E.; Rando, R.; Maisano, R.; Dugo, G.; Giuffrida, D. Fatty Acids Profile, Atherogenic (IA) and Thrombogenic (IT) Health Lipid Indices, of Raw Roe of Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus* L.) and Their Salted Product “Bottarga.” *Food Nutr. Sci.* **2011**, *02* (07), 736–743.

- (99) Lima, A. R.; Castañeda-Loaiza, V.; Salazar, M.; Nunes, C.; Quintas, C.; Gama, F.; Pestana, M.; Correia, P. J.; Santos, T.; Varela, J.; Barreira, L. Influence of Cultivation Salinity in the Nutritional Composition, Antioxidant Capacity and Microbial Quality of *Salicornia ramosissima* Commercially Produced in Soilless Systems. *Food Chem.* **2020**, *333*, 1–8.
- (100) Khalilzadeh, R.; Pirzad, A.; Sepehr, E.; Khan, S.; Anwar, S. Long-Term Effect of Heavy Metal–Polluted Wastewater Irrigation on Physiological and Ecological Parameters of *Salicornia europaea* L. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2020**, *20* (3), 1574–1587.
- (101) Li-Beisson, Y.; Thelen, J. J.; Fedosejevs, E.; Harwood, J. L. The Lipid Biochemistry of Eukaryotic Algae. *Prog. Lipid Res.* **2019**, *74*, 31–68.
- (102) Guschina, I. A.; Harwood, J. L. Lipids and Lipid Metabolism in Eukaryotic Algae. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 160–186.
- (103) IPMA. Boletim Climatológico - Julho 2019. **2019**, 1–14.